

Polifenoloxidasas, fenoles totales y oscurecimiento de nopal verdura*

Poliphenoloxidase, total phenols and darkening of nopal

Jorge Manuel Apodaca-Pérez, María de la Luz Martínez-Miranda, María del Refugio Robles-Burgueño y Armida Rodríguez Félix^{1§}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. CIADA. C. A. P. 1735. Hermosillo, Sonora, México 83304. Tel: (662) 2892400 Ext. 270 y 246. (cuquis@ciad.mx). [§]Autor para correspondencia: armida@ciad.mx.

Resumen

En este trabajo se evaluó la actividad de polifenoloxidasas (PPO), el contenido de compuestos fenólicos totales y de ácido ascórbico y el grado de oscurecimiento durante el desarrollo de nopal verdura de variedades comerciales. Se cosecharon cladodios tiernos de 9 a 30 cm de longitud de nopal verdura (*Opuntia ficus indica*), variedades COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta y Atlixco. Se clasificaron en seis estados de desarrollo y se almacenaron a -20 °C. El contenido de ácido ascórbico disminuyó y la actividad de PPO se incrementó al avanzar el desarrollo de los cladodios. La actividad de PPO fue similar en las variedades evaluadas. Los cladodios de la variedad COPENA F-1 presentaron el mayor contenido de fenoles totales y de ácido ascórbico total, mientras que los de Atlixco los menores. El grado de oscurecimiento fue similar en los distintos estados de desarrollo, mostrando Milpa Alta y COPENA F-1 la mayor tendencia a oscurecerse.

Palabras clave: *Opuntia ficus indica*, ácido ascórbico, cultivares.

Abstract

In this work the activity of polyphenol oxidase (PPO), the content of total phenolics and ascorbic acid and the degree of browning during the development of commercial varieties nopal was evaluated. The tender cladodes harvested 9 to 30 cm length of nopal (*Opuntia ficus indica*), varieties COPENAF-1, COPENAV-1, Milpa Alta and Atlixco. They were classified into six development stages and stored at -20 °C. The content of ascorbic acid decreased and PPO activity increased to advance the development of the cladodes. The PPO activity was similar in the varieties tested. The cladodes variety COPENA F-1 had the highest total phenolic content and total ascorbic acid, while those of Atlixco minors. The degree of darkening was similar in the different stages of development, showing Milpa Alta and COPENA F-1 greater tendency to darken.

Keywords: *Opuntia ficus indica*, ascorbic acid, cultivars.

* Recibido: enero de 2016
Aceptado: abril de 2016

Introducción

Las variedades de importancia comercial para producción de nopal verdura en México son Milpa Alta, Atlixco, COPENAS y Valtierra (Flores *et al.*, 1995). La norma internacional de calidad de nopal, CODEX STAN 185-1993, establece que los cladodios tiernos pueden comercializarse cuando estos presentan desde 9 cm hasta 30 cm de longitud (FAO-WHO, 1993). Los cladodios de 20 cm de longitud y peso de 90-100 g, se comercializan como penca entera (Cantwell, 1999); mientras que los cladodios más pequeños (12 cm) o más largos (casi 30 cm), se utilizan para la elaboración de productos frescos-cortados (Rodríguez, 2002).

El oscurecimiento enzimático es uno de los principales problemas que limita la comercialización de nopal verdura, tanto en su forma entera como fresca-cortada (Rodríguez, 2002). Este deterioro tiene gran importancia por su impacto visual que afecta la aceptación organoléptica y la calidad comercial, y por reducir el valor nutritivo de frutas y hortalizas (Artés *et al.*, 2007). El oscurecimiento enzimático se presenta en la superficie de cortes y heridas y es causado por la enzima polifenoloxidas (PPO). Esta enzima en presencia de oxígeno actúa sobre los sustratos fenólicos, formando las quinonas. Estos compuestos reaccionan entre sí o con otros compuestos (aminoácidos, péptidos y azúcares reductores) formando melaninas, compuestos de color rojo, café o negro (Artés *et al.*, 2007). Sin embargo, la formación de quinonas es reversible en presencia de agentes reductores como el ácido ascórbico, los cuales son capaces de reducir las quinonas a los compuestos fenólicos nativos; mientras que la formación de melaninas es irreversible (Barbagallo *et al.*, 2009). El oscurecimiento enzimático ocurre cuando los sustratos fenólicos, la PPO y el oxígeno molecular se unen bajo condiciones apropiadas de pH, temperatura y actividad de agua (Artés *et al.*, 1998).

Existen diferencias en el grado de oscurecimiento, en el contenido y tipo de compuestos fenólicos, en la actividad de PPO y en el contenido de ácido ascórbico entre variedades de hortalizas como papa, alcachofa y otras (Barbagallo *et al.*, 2009; Cabezas *et al.*, 2009ab). Adicionalmente, se ha observado que existen cambios en la actividad de PPO, contenido de compuestos fenólicos, oscurecimiento y contenido de ácido ascórbico durante el desarrollo de hortalizas de hoja como col rizada (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) (Korus, 2011) y lechuga (Chutichudet *et al.*, 2011). Aguilar *et al.* (2007) evaluaron la actividad de PPO y el potencial de oscurecimiento en cladodios de 21 variedades

Introduction

The varieties of commercial importance for the production of nopal in Mexico are Milpa Alta, Atlixco, COPENAS and Valtierra (Flores *et al.*, 1995). The international quality standard nopal, CODEX STAN 185-1993, provides that the tender cladodes can be marketed when they present from 9 cm to 30 cm in length (FAO-WHO, 1993). Cladodes 20 cm in length and weight of 90-100 g, are marketed as whole stalk (Cantwell, 1999); while smaller cladodes (12 cm) or longer (about 30 cm) are used for the production of fresh-cut produce (Rodríguez, 2002).

The enzymatic browning is one of the main problems limiting the marketing of nopal, both in their whole form as fresh-cut (Rodríguez, 2002). This deterioration is of great importance for its visual impact affecting the organoleptic acceptance and merchantable quality and reduce the nutritional value of fruits and vegetables (Artés *et al.*, 2007). The enzymatic browning occurs on the surface of cuts and wounds and is caused by the enzyme polyphenol oxidase (PPO). This enzyme in the presence of oxygen phenolic substrates acts on forming quinones. These compounds react with each other or with other compounds (amino acids, peptides and reducing sugars) melanins forming compounds, red or black coffee (Artés *et al.*, 2007). However, the formation of quinones is reversible in the presence of reducing agents such as ascorbic acid, which are capable of reducing quinones to native phenolic compounds; while the formation of melanin is irreversible (Barbagallo *et al.*, 2009). Enzymatic browning occurs when phenolic substrates, PPO and molecular oxygen under appropriate conditions bind pH, temperature and water activity (Artés *et al.*, 1998).

There are differences in the degree of dimming, the content and type of phenolic compounds, PPO activity and the ascorbic acid content between varieties of vegetables such as potatoes, artichoke and other (Barbagallo *et al.*, 2009; Cabezas *et al.*, 2009ab). Additionally, it has been observed that there are changes in the activity of PPO, content of phenolic compounds, darkening and ascorbic acid content during the development of leafy vegetables like kale (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) (Korus, 2011) and lettuce (Chutichudet *et al.*, 2011). Aguilar *et al.* (2007) evaluated PPO activity and browning potential in cladodes of 21 varieties of *Opuntia*, finding

de *Opuntia*, encontrando diferencias significativas entre las variedades, presentando 'Chicomostoc', 'Negrito' y 'Jade', los menores valores de oscurecimiento.

Sin embargo, los valores de actividad de PPO de estas tres variedades fue similar al de otras variedades que presentaron un mayor potencial de oscurecimiento. Estos autores no evaluaron otras variables como el contenido de ácido ascórbico (reductor de quinonas), fenoles totales, ni el contenido de sustratos de PPO, que pueden influir en el desarrollo del oscurecimiento. Se ha observado que el oscurecimiento del tejido ocurre cuando el contenido de ácido ascórbico se ha agotado (Adams y Brown, 2007). Adicionalmente, se ha indicado que el ácido ascórbico puede inhibir a PPO al disminuir el pH del citosol (Yoruk y Marshall, 2003). Degl'Innocenti *et al.* (2007) concluyeron que el alto contenido de ácido ascórbico de rúcula (*Eruca sativa*) está altamente asociado con la resistencia al oscurecimiento mostrada durante el almacenamiento de esta hortaliza en su forma fresca-cortada, mientras que Bottino *et al.* (2009) observaron un comportamiento similar en espinaca.

Aunque se ha evaluado la actividad de PPO y el oscurecimiento de diferentes variedades de nopal, se desconoce si hay cambios en el contenido de compuestos fenólicos y ácido ascórbico durante el desarrollo de los cladodios de los tamaños comerciales establecidos por la norma de la Comisión del Codex Alimentarius (CODEX STAN 185-1993). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad de polifenoloxidasas (PPO), el contenido de compuestos fenólicos y de ácido ascórbico, y el grado de oscurecimiento durante el desarrollo de nopal verdura de variedades comerciales.

Materiales y métodos

Material experimental

Se utilizó nopal verdura (*Opuntia ficus indica*) de las variedades COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta y Atlixco, de una plantación comercial ubicada en Hermosillo, Sonora, México (29° 11' 27.53" latitud norte, 110° 51' 17.13" longitud oeste). Las cuatro variedades de nopal estuvieron bajo las mismas condiciones de cultivo comercial, mismo tipo de suelo, clima y manejo agronómico. La cosecha de los cladodios de las cuatro variedades y tamaños se realizó manualmente el mismo día y a la misma hora, en el mes de

significant differences between varieties, presenting 'Chicomostoc', 'Negrito' and 'Jade', the lowest values of dimming.

However, PPO activity values of these three varieties was similar to other varieties had a higher potential blackout. These authors did not evaluate other variables such as ascorbic acid (reducing quinones), total phenols, or the content of PPO substrates, which can influence the development of darkening. It has been observed that the darkening of the fabric occurs when the ascorbic acid content is exhausted (Adams and Brown, 2007). Additionally, it indicated that ascorbic acid may inhibit PPO with decreasing pH of the cytosol (Yoruk and Marshall, 2003). Degl'Innocenti *et al.* (2007) concluded that the high content of ascorbic acid of arugula (*Eruca sativa*) is highly associated with resistance to darkening shown during storage of this vegetable in its fresh-cut form, while Bottino *et al.* (2009) observed similar behavior in spinach.

Although it has been evaluated PPO activity and browning of different varieties of cactus, it is unknown whether there are changes in the content of phenolic compounds and ascorbic acid during the development of the cladodes of commercial sizes established by the standard of the Codex Alimentarius (CODEX STAN 185-1993). Therefore, the objective of this work was to study the activity of polyphenol oxidase (PPO), the content of phenolic compounds and ascorbic acid, and the degree of dimming during the development of commercial varieties of nopal.

Materials and methods

Experimental Material

The nopal was used (*Opuntia ficus indica*) varieties COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta and Atlixco, a commercial plantation located in Hermosillo, Sonora, Mexico (29° 11' 27.53" north latitude, 110° 51' 17.13" west longitude). The four varieties of nopal were under the same conditions of commercial cultivation, same type of soil, climate and crop management. Cladodes harvest of the four varieties and sizes are manually performed the same day and at the same time, in July. Tender cladodes harvested, had leaves, and immediately transported to the laboratories of the institution, where firm and free of defects cladodes were selected. They were classified into six development

julio. Se cosecharon cladodios tiernos, con presencia de hojas, y se transportaron inmediatamente hacia los laboratorios de la Institución, donde se seleccionaron cladodios firmes y libres de defectos. Se clasificaron en seis estados de desarrollo con base a longitud, incluyendo cladodios de 9 a 30 cm de longitud, tamaños considerados comerciales por la norma internacional de calidad de nopal, CODEX STAN 185-1993 (FAO-WHO, 1993). A continuación se les midió longitud, peso y grosor (Cuadro 1), y se almacenaron a -20 °C.

based on length, including cladodes 9-30 cm in length, sizes considered commercial by the international quality standard nopal, CODEX STAN 185-1993 (FAO-WHO, 1993). They were then measured length, weight and thickness (Table 1), and stored at -20 °C.

They were subsequently cleaved again and stored at -20 °C. In the frozen tissue analyzes degree of blackening and ascorbic acid were performed; and acetone powders prepared

Cuadro 1. Longitud, peso y grosor durante el desarrollo de los cladodios de nopal verdura de las variedades COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta y Atlixco.

Table 1. Length, weight and thickness during the development of nopal cladodes varieties of COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta and Atlixco.

Variedad y Edo. de desarrollo	Longitud* (cm)	Peso* (gr)	Grosor* (mm)
COPENA F-1			
I	10.3 ± 1.2	16.1 ± 3.9	7.3 ± 1.0
II	13.9 ± 0.9	30.0 ± 5.5	7.3 ± 0.9
III	17.0 ± 0.7	43.4 ± 7.5	8.9 ± 1.6
IV	20.0 ± 0.9	60.5 ± 12.0	9.3 ± 1.0
V	22.9 ± 0.9	89.7 ± 14.4	9.5 ± 1.2
VI	25.9 ± 1.0	111.4 ± 23.5	9.4 ± 1.2
COPENA V-1			
I	9.3 ± 0.9	19.0 ± 4.6	8.9 ± 1.6
II	11.4 ± 0.4	31.5 ± 4.9	9.4 ± 1.5
III	13.4 ± 0.4	48.2 ± 6.3	10.2 ± 0.8
IV	15.7 ± 0.4	56.6 ± 7.7	10.3 ± 1.0
V	17.4 ± 0.5	71.5 ± 10.3	10.0 ± 1.1
VI	19.5 ± 0.8	91.7 ± 14.0	10.6 ± 1.1
Milpa Alta			
I	12.3 ± 1.1	33.4 ± 7.5	6.7 ± 1.3
II	14.7 ± 0.6	46.0 ± 12.2	5.8 ± 1.1
III	16.3 ± 0.4	53.3 ± 7.8	5.8 ± 0.7
IV	18.0 ± 0.6	65.1 ± 10.1	6.6 ± 0.9
V	20.4 ± 0.7	87.0 ± 18.4	6.6 ± 0.9
VI	23.2 ± 1.8	112.2 ± 29.6	6.7 ± 1.1
Atlixco			
I	11.4 ± 0.9	36.5 ± 7.2	5.5 ± 1.1
II	13.6 ± 0.6	46.0 ± 9.1	5.8 ± 1.0
III	15.6 ± 0.5	57.0 ± 8.9	6.6 ± 1.1
IV	17.9 ± 0.5	74.9 ± 12.4	6.8 ± 0.9
V	19.6 ± 0.5	87.1 ± 15.9	6.9 ± 1.0
VI	23.1 ± 0.9	123.8 ± 25.1	7.3 ± 1.2

*Los datos representan el promedio y su desviación estándar, n= 30.

Posteriormente fueron troceados y almacenados de nuevo a -20 °C. En el tejido congelado se realizaron los análisis de grado de oscurecimiento y ácido ascórbico; y se prepararon

for analysis PPO activity. Additionally, they were taken in triplicate, 150 g of nopal frozen, lyophilized in a freeze dryer trays Freezemobile UNITOP 600L. The lyophilized

polvos de acetona para análisis de actividad de PPO. Adicionalmente, se tomaron por triplicado, 150 g de nopal congelado, se liofilizaron en un liofilizador de charolas Freezemobile UNITOP600L. El nopal liofilizado se colocó en frascos de plástico herméticamente sellados, los cuales se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, estas muestras liofilizadas se utilizaron en la determinación de fenoles totales. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Metodología

Extracción y actividad específica de PPO. La preparación del polvo de acetona y la extracción de PPO se realizaron de acuerdo al procedimiento indicado por Sciancalepore y Longone (1984). Se pesaron 200 g de nopal finamente picado, se les agregaron 400 mL de acetona fría ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y 1.4 g de polietilenglicol, se homogeneizaron en una licuadora. El homogeneizado obtenido se filtró con vacío utilizando papel Whatman No.1. Al residuo se le realizaron de 2 a 3 lavados con 200 mL de acetona fría, hasta que se obtuvo un polvo de color blanco (polvo de acetona), éste se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h, se colocó en frascos de plástico sellados y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la extracción de PPO se pesaron 0.3 g de polvo de acetona y se les agregó 40 mL de fosfato de potasio (K_3PO_4) 0.05 M que contenía KCl 1 M a un pH de 8.5. Esta mezcla se sometió a agitación constante por 1 hora a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, la muestra se centrifugó a $4101 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo de 45 min. El sobrenadante se filtró con una tela de organza. El filtrado obtenido representó el extracto enzimático, que se dividió en dos partes que se utilizaron para análisis de proteína y medición de actividad específica de PPO.

La actividad específica de PPO se determinó midiendo la velocidad inicial de formación de quinona siguiendo la metodología propuesta por Sciancalepore y Longone (1984). A un mL del extracto enzimático se le agregó 1 mL de 4-metilcatecol 0.02 M en buffer de citratos 0.1 M a pH 3.5 (definido en pruebas preliminares como el pH óptimo para la actividad de PPO de nopal). Se midió la velocidad inicial de formación de quinona indicada por el incremento en absorbancia a 395 nm. Se calculó la pendiente de la parte inicial de la curva, expresando los resultados como unidades de actividad por miligramo de proteína. Una unidad de actividad de la enzima se define como la cantidad de enzima que causa un cambio en absorbancia de 0.01/min.

vials nopal placed in hermetically sealed plastic, which were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, these lyophilized samples were used in the determination of total phenols. All determinations were performed in triplicate.

Methodology

Extraction and specific activity of PPO. Preparation of acetone powder extraction and PPO were performed according to the procedure indicated by Sciancalepore and Longone (1984). The 200 g of finely chopped nopal weighed, were added 400 mL of cold acetone ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) and 1.4 g of polyethyleneglycol, homogenized in a blender. The homogenate obtained was filtered with vacuum using Whatman No.1. To the residue were performed 2 to 3 washes with 200 mL of cold acetone, until a white powder (acetone powder) was obtained, it was allowed to dry at room temperature for 24 h, placed in plastic bottles sealed and they stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. For extraction of PPO 0.3 g of acetone powder they are weighed and added 40 mL of potassium phosphate (K_3PO_4) 0.05 M containing KCl 1 M to pH 8.5. This mixture was subjected to constant agitation for 1 hour at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Subsequently, the sample was centrifuged at $4101 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 min time. The supernatant was filtered with a organza fabric. The filtrate obtained represented the enzyme extract, which was divided into two parts which were used for protein analysis and measurement of specific activity of PPO.

The specific activity of the PPO was determined by measuring initial rate of formation of quinone following the methodology proposed by Sciancalepore and Longone (1984). A one mL of enzyme extract was added 1 mL of 4-methylcatechol in 0.02 M citrate buffer 0.1 M pH 3.5 (as defined in preliminary tests the optimum pH for activity nopal of PPO). The initial rate of formation of quinone indicated by the increase in absorbance at 395 nm was measured. The slope of the initial part of the curve was calculated by expressing the results as units of activity per milligram protein. One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme which causes a change in absorbance of 0.01/min.

The soluble protein content in enzyme extracts was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

Total phenolic. In 500 mg of lyophilized nopal three successive sonication extractions were carried out with methanol to 80% according to the proposed Escarpment

El contenido de proteína soluble en los extractos enzimáticos se determinó por el método de Bradford, utilizando albúmina de suero de bovino como estándar (Bradford, 1976).

Fenoles totales. En 500 mg de nopal liofilizado se efectuaron tres extracciones sucesivas sonicando con metanol al 80% de acuerdo a lo propuesto por Escarpa y González (2000) y Kähkönen *et al.* (1999). La determinación de los fenoles totales se efectuó de acuerdo al procedimiento de Singleton y Rossi, (1965). El incremento en absorbancia a 765 nm se relaciona con la concentración de fenoles totales con una curva estándar preparada con ácido gálico. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g de peso seco.

Ácido ascórbico total. La extracción se realizó en 30 g de muestra congelada que se homogeneizó con 100 mL de solución extractora (30 g de ácido fosfórico, 80 mL de ácido acético en un litro de agua), se filtró en tela de organza y posteriormente en filtros Millipore de 0.22 µm. La determinación se realizó de acuerdo a la técnica de Doner y Hicks, (1981) en un HPLC Varian 9012, con una columna µBondapak NH₂, a una longitud de onda de 268 nm. Se utilizó un estándar externo de ácido L-ascórbico a 0.05 mg/ mL. Se empleó ditiotreitól (DTT) para reducir el ácido dehidroascórbico a ácido L-ascórbico. Los resultados se expresaron como mg de ácido ascórbico total/ 100 g de peso fresco.

Grado de oscurecimiento. Este método se basa en la medición de la absorbancia de las quinonas formadas debido a la oxidación de los compuestos fenólicos por PPO en presencia de oxígeno. La longitud de onda de máxima absorbancia de la quinona formada a partir de pirocatecol y L-DOPA es de 390 y 480 nm, respectivamente (Nicolas *et al.*, 1994). 20 g de muestra se homogeneizaron con 100 ml de buffer de citratos pH 4.46 (pH promedio del nopal verdura), se incubaron en un baño de agua a 35 °C y agitación constante por 48 h. Posteriormente, las muestras se filtraron con tela de organza y el filtrado se centrifugó por 10 min a 18 500 rpm en una centrífuga refrigerada Beckman Model J2-21. En pruebas preliminares se midió la absorbancia del extracto de 380 a 510 nm y se encontró que la mayor absorbancia se obtuvo a 420 nm. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 420 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3A (UV-VIS). Los resultados se expresaron como valores de absorbancia a 420 nm (Sapis *et al.*, 1983).

and Gonzalez (2000) and Kähkönen *et al.* (1999). The determination of total phenols was carried out according to the procedure of Singleton and Rossi (1965). The increase in absorbance at 765 nm is related to the concentration of total phenolic with a standard curve prepared with gallic acid. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (EAG)/g dry weight.

Total ascorbic acid. Extraction was performed on 30 g of frozen sample was homogenized with 100 mL of buffer solution (30 g of phosphoric acid, 80 mL of acetic acid in one liter of water), filtered in organza fabric and subsequently Millipore filters 0.22 microns. The determination was performed according to the technique Doner and Hicks, (1981) in a HPLC Varian 9012 with a µBondapak NH₂ column at a wavelength of 268 nm. An external standard of L-ascorbic 0.05 mg/mL acid was used. The dithiothreitól (DTT) was used to reduce dehydroascorbic acid to L-ascorbic acid. The results were expressed as mg total ascorbic acid/100 g fresh weight.

Degree of darkening. This method is based on measuring the absorbance of the quinone formed due to oxidation of phenolic compounds by PPO in the presence of oxygen. The wavelength of maximum absorbance of the quinone formed from catechol and L-DOPA is 390 and 480 nm, respectively (Nicolas *et al.*, 1994). The 20 g samples were homogenized with 100 ml of buffer pH 4.46 citrate (pH average nopal vegetables), incubated in a water bath at 35 °C and constant stirring for 48 h. Subsequently, the samples were filtered with organza fabric and the filtrate was centrifuged for 10 min at 18 500 rpm in a refrigerated centrifuge Beckman Model J2-21. In preliminary tests of the extract absorbance at 380 to 510 nm it was measured and found that the highest absorbance at 420 nm was obtained. The absorbance of the supernatant at 420 nm was read on a Perkin Elmer Lambda 3A (UV-VIS). Results were expressed as absorbance values at 420 nm (Sapis *et al.*, 1983).

Experimental design and statistical analysis. An experimental design was used in blocks with factors variety and state of development, in which the range factor was used as a block. An analysis of variance was performed by general linear models (GLM) at a significance level of 0.05. When there were significant mean comparisons were made by the Tukey test. All data were processed in the computational statistical package NCSS (Hintze, 1997).

Diseño experimental y análisis estadístico. Se empleó un diseño experimental en bloques con los factores variedad y estado de desarrollo, en el que el factor variedad fue utilizado como bloque. Se realizó un análisis de varianza por modelos lineales generales (GLM) a un nivel de significancia de 0.05. Cuando hubo significancia se efectuaron comparaciones de medias por la prueba de Tukey. Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico computacional NCSS (Hintze, 1997).

Resultados y discusión

Las características morfológicas de las cuatro variedades de nopal estudiadas son diferentes. Los cladodios de nopal COPENA F-1 se caracterizan por ser largos y delgados con muchas espinas; mientras que los de COPENA V-1 son discoides y con pocas espinas. Los cladodios de COPENA F-1 presentaron la mayor longitud y los de COPENA V-1 la menor, los de Milpa Alta y Atlixco presentaron longitudes similares (Cuadro 1). La variedad Atlixco presentó el mayor peso y la variedad COPENA V-1 el menor; mientras que COPENA F-1 y Milpa Alta presentaron un peso similar. El grosor de los cladodios de COPENA V-1 fue mayor y el de los de Milpa Alta fue el menor.

Actividad específica de PPO. En las cuatro variedades de nopal verdura estudiadas, la actividad específica de PPO mostró una tendencia a aumentar significativamente ($p < 0.05$) a medida que avanzó el estado de desarrollo del cladodio, con valores de 36.83 unidades de actividad por miligramo de proteína en el estado I hasta alcanzar valores de 62.08 unidades de actividad por miligramo de proteína en el estado VI; lo cual representa un incremento de 168% (Figura 1). Comparando la actividad específica de PPO de las diferentes variedades no se encontró efecto ($p > 0.05$) de la variedad en la actividad de esta enzima, mostrando estas valores promedio similares de 48.71, 46.81, 49.15 y 47.43 unidades de actividad por miligramo de proteína, para COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta y Atlixco, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con lo publicado por Aguilar *et al.* (2007) quienes encontraron diferencias no significativas en la actividad de PPO de los cladodios de aproximadamente 20 cm de las variedades COPENA F-1, Atlixco y Milpa Alta. Se ha mostrado que el pH causa cambios conformacionales en la enzima y afecta la cinética de actividad de PPO. El pH óptimo de PPO varía dependiendo del vegetal, con valores de pH óptimos entre 4 y 8. Se ha estimado que el

Results and discussion

The morphological characteristics of the four varieties of nopal studied are different. Cactus cladodes COPENA F-1 are characterized by long and thin with many thorns; COPENA while the V-1 are discoid and few bones. COPENA F-1 cladodes had the highest length and COPENA V-1 of the minor, Milpa Alta and Atlixco had similar lengths (Table 1). The Atlixco variety had the highest weight and variety COPENA V-1 minor; while COPENA F-1 and Milpa Alta presented a similar weight. The thickness of the cladodes COPENA V-1 was higher and those of Milpa Alta was the lowest.

PPO specific activity. In the four varieties of nopal studied, the specific activity of PPO showed a tendency to increase significantly ($p < 0.05$) as advanced development status cladode, with values of 36.83 units of activity per milligram protein in the state reaching values 62.08 units of activity per milligram of protein in the state VI; which represents a 168% increase (Figure 1). Comparing the specific activity of PPO of different varieties no effect ($p > 0.05$) of the variety found in the activity of this enzyme, showing these average similar values of 48.71, 46.81, 49.15 and 47.43 units of activity per milligram of protein, for COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta and Atlixco, respectively.

These results are consistent with that published by Aguilar *et al.* (2007) who found no significant differences in the activity of PPO cladodes about 20 cm of varieties COPENA F-1, Atlixco and Milpa Alta. It has been shown that the pH causes conformational changes in the enzyme and affects the kinetics of PPO activity. The pH optimum plant PPO vary, with optimum pH values between 4 and 8. It is estimated that the optimal pH of grape and apple PPO is 3.5 to 4.0 (Yoruk and Marshall, 2003). In this study it was determined that 3.5 is the optimal pH for PPO activity nopal, this value is similar to the optimum pH of PPO activity apple and grape. In the present study the results of specific activity of PPO were expressed as activity units per mg protein, while Aguilar *et al.* (2007) results expressed as activity units per g fresh weight, the above is not possible to compare the activity values of this study with those of these authors. The increase in PPO activity observed during the development of nopal consistent with that observed by Korus (2011), who showed that PPO activity increased as they advanced the state of maturity of the leaf kale.

pH óptimo de PPO de manzana y uva es de 3.5 a 4.0 (Yoruk y Marshall, 2003). En este estudio se determinó que 3.5 es el pH óptimo para la actividad de PPO de nopal, este valor es similar al pH óptimo de actividad de PPO de manzana y uva. En el presente estudio los resultados de actividad específica de PPO se expresaron como unidades de actividad por mg proteína, mientras que Aguilar *et al.* (2007) expresaron sus resultados como unidades de actividad por g de peso fresco, por lo anterior no es posible comparar los valores de actividad del presente estudio con los de estos autores. El incremento en la actividad de PPO observado durante el desarrollo de nopal verdura concuerda con lo observado por Korus (2011), quien mostró que la actividad de PPO se incrementó a medida que avanzó el estado de madurez de la hoja de col rizada.

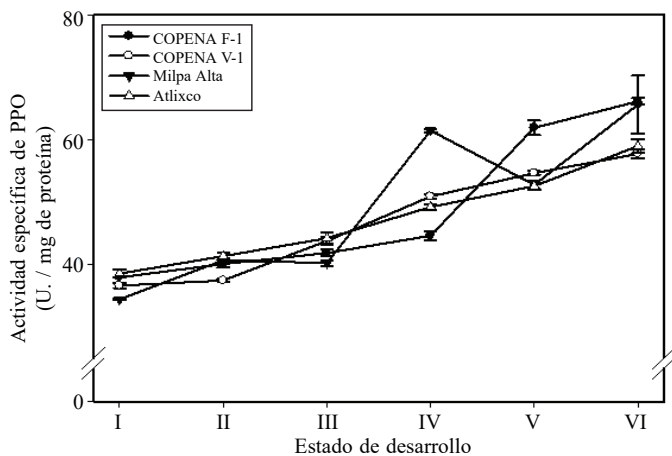


Figura 1. Actividad específica de polifenoloxidasa durante el desarrollo de cladodios de nopal verdura de las variedades COPENAF-1, COPENAV-1, Milpa Alta y Atlixco. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que causa un incremento en absorbancia de 0.01/min. Las barras verticales indican la desviación estándar para cada estado de desarrollo, n=3.

Figure 1. Specific activity of polyphenol oxidase during the development of nopal cladodes of COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta and Atlixco varieties. One unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme which causes an increase in absorbance of 0.01/min. The vertical bars indicate the standard deviation for each stage of development, n=3.

Fenoles totales. El estado de desarrollo tuvo un efecto significativo en el contenido de fenoles totales de los cladodios de nopal de las cuatro variedades estudiadas ($p < 0.05$), encontrando que los cladodios en estado de desarrollo II tuvieron un mayor contenido que los cladodios de los estados V y VI (Figura 2). Asimismo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de estos compuestos en las distintas variedades, observándose que COPENA F-1

Total phenolics. The state of development had a significant effect on total phenol content of cactus pads of the four varieties studied ($p < 0.05$), finding that the cladodes in the development stage II had a higher content than cladodes of V states and VI (Figure 2). Also, significant differences ($p < 0.05$) were found in the content of these compounds in different varieties, observing that COPENAF-1 had the highest content (19.89 mg EAG/g dry weight), followed by Milpa Alta (16.06 mg EAG/g dry weight) presented similar values to COPENA V-1 (13.85 mg EAG/g dry weight) and finally Atlixco had the lowest content (12.12 mg EAG/g dry weight), although similar to COPENA V-1.

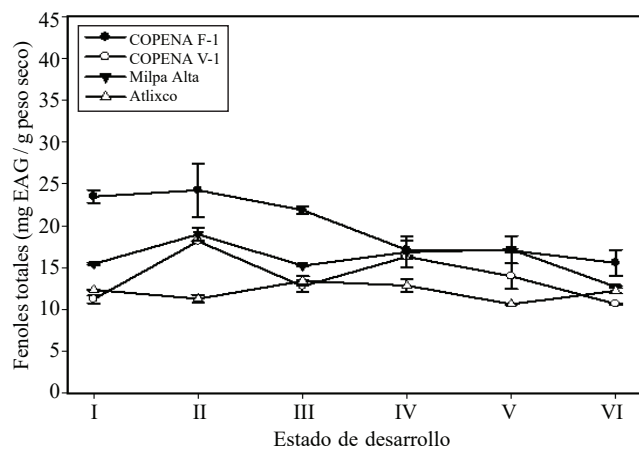


Figura 2. Contenido de fenoles totales durante el desarrollo de cladodios de nopal verdura de las variedades COPENAF-1, COPENA V-1, Milpa Alta y Atlixco. EAG: equivalentes de ácido gálico. Las barras verticales indican la desviación estándar para cada estado de desarrollo, n=3.

Figure 2. Contents of total phenols during the development of nopal cladodes varieties COPENAF-1, COPENA V-1, Milpa Alta and Atlixco. EAG: gallic acid equivalents. The vertical bars indicate the standard deviation for each stage of development, n=3.

As in this study, Guevara *et al.* (2010) found significant differences in total phenol content of 10 varieties of nopal (8 wild and 2 grown) collected in different regions of Mexico, showing the highest values (19.9 mg EAG/g dry weight) in the Morado variety and cladodes minors in the range plug (less than 2 mg EAG/g dry weight). These authors attribute the differences between the varieties to differences in climatic conditions. However, in the present study they evaluated the four varieties were grown under the same conditions and were sampled on the same day, suggesting that the differences are intrinsic to the variety. The total phenol content of cladodes COPENA F-1 is similar to that found by Guevara *et al.* (2010) in the wild variety Morado (19.9 mg EAG/g dry weight). The total phenolic content

presentó el mayor contenido (19.89 mg EAG/ g peso seco), seguido de Milpa Alta (16.06 mg EAG/ g peso seco) que presentó valores similares a COPENA V-1 (13.85 mg EAG/ g peso seco) y por último Atlixco presentó el menor contenido (12.12 mg EAG/ g peso seco), aunque similar a COPENA V-1.

Al igual que en el presente estudio, Guevara *et al.* (2010) encontraron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales de 10 variedades de nopal (8 silvestres y 2 cultivadas) colectadas en diferentes regiones de México, observándose los valores más altos (19.9 mg EAG/ g peso seco) en la variedad Morado y los menores en los cladodios de la variedad Tapón (menores a 2 mg EAG/ g peso seco). Estos autores atribuyen las diferencias encontradas entre las variedades a diferencias en las condiciones climáticas. Sin embargo, en el presente estudio las cuatro variedades evaluadas fueron cultivadas en las mismas condiciones y fueron muestreadas el mismo día, lo cual sugiere que las diferencias son intrínsecas a la variedad. El contenido de fenoles totales de los cladodios de COPENAF-1 es similar al encontrado por Guevara *et al.* (2010) en la variedad silvestre Morado (19.9 mg EAG/ g peso seco). El contenido de fenoles totales de las cuatro variedades analizadas en este estudio es mayor al de la variedad comercial de *O. ficus indica*, Blanco que tuvo un contenido de 5.25 mg EAG/ g peso seco (Guevara *et al.*, 2010). Sin embargo, los valores encontrados en los cladodios de Milpa Alta del presente estudio son inferiores al de 32.20 mg EAG/ g peso seco mostrado por Corral *et al.* (2008), lo cual pudiera atribuirse a diferencias en las condiciones climáticas de las regiones de cultivo.

El contenido de fenoles totales de nopal verdura varió de 10.63-24.23 mg de equivalentes de ácido gálico/ g de peso seco en los distintos estados de desarrollo de las variedades estudiadas. Estos valores son mayores a los de otros productos hortícolas como cebolla, pepino, zanahoria, tomate y papa, que mostraron valores de 0.4-6.6 mg de EAG/ g de peso seco (Kähkönen *et al.*, 1999).

Ácido ascórbico total. El contenido de AA total en las cuatro variedades estudiadas disminuyó significativamente ($p < 0.05$) conforme avanzó el desarrollo del cladodio, con valores de 13.50 a 7.41 mg de AA/100 g de peso fresco en los cladodios de los estados I y VI, respectivamente (Figura 3). Lo anterior indica una disminución de casi el 50% del contenido. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de AA entre las variedades estudiadas, se observó que COPENAF-1 presentó un contenido mayor (11.90 mg de AA/ 100 g de peso fresco), seguido de COPENA V-1 (10.72

of the four varieties tested in this study is greater than the commercial variety of *O. ficus indica*, Blanco had a content of 5.25 mg EAG/g dry weight (Guevara *et al.*, 2010). However, the values found in Milpa Alta cladodes of this study are lower at 32.20 mg EAG/g dry weight shown by Corral *et al.* (2008), which could be attributed to differences in climatic conditions growing regions.

The total phenol content of nopal ranged from 10.63-24.23 mg equivalent gallic acid/g dry weight in the various development stages of the varieties studied. These values are higher than those of other horticultural products such as onion, cucumber, carrot, tomato and potato, which showed values of 0.4-6.6 mg of EAG/g dry weight (Kähkönen *et al.*, 1999).

Total ascorbic acid. The content of total AA in the four varieties studied decreased significantly ($p < 0.05$) as advanced development cladode, with values of 13.50 to 7.41 mg AA/100 g fresh weight in cladodes states I and VI, respectively (Figure 3). This indicates a decline of almost 50% of the content. significant differences ($p < 0.05$) in AA content between varieties studied were found, it was observed that COPENA F-1 had a higher content (11.90 mg AA/100 g fresh weight), followed by COPENA V-1 (10.72 mg AA/100 g fresh weight); while Milpa Alta and Atlixco presented the lowest content (8.79 and 8.19 mg AA/100 g fresh weight, respectively). These results show that the cladodes COPENAF-1 had an AA content of 40% higher than those of Milpa Alta and Atlixco.

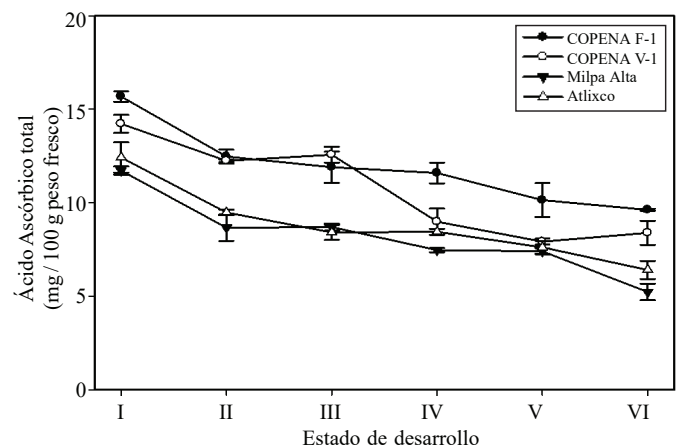


Figura 3. Contenido de ácido ascórbico total durante el desarrollo de cladodios de nopal verdura de las variedades COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta y Atlixco. Las barras verticales indican la desviación estándar para cada estado de desarrollo, n=3.

Figure 3. Total ascorbic acid content during the development of nopal cladodes varieties COPENAF-1, COPENAV-1, Milpa Alta and Atlixco. The vertical bars indicate the standard deviation for each stage of development, n=3.

mg de AA/ 100 g de peso fresco); mientras que Milpa Alta y Atlixco presentaron el menor contenido (8.79 y 8.19 mg de AA/ 100 g de peso fresco, respectivamente). Estos resultados muestran que los cladodios de COPENA F-1 presentaron un contenido de AA 40% mayor que los de Milpa Alta y Atlixco.

Rodríguez y Cantwell (1988), no encontraron un patrón consistente de cambio en el contenido de ácido ascórbico durante el desarrollo de cladodios de tres especies de *Opuntia*, con valores de 7 a 18 mg de AA/ 100 g de peso fresco, aunque cabe resaltar que estos autores emplearon un método colorimétrico a diferencia del presente estudio que utilizó la técnica de HPLC. Estos resultados concuerdan con los de Rodríguez y Villegas (1997) quienes reportaron valores de 12 mg de AA/ 100 g de peso fresco en cladodios de 20 cm de longitud de dos variedades de nopal verdura (COPENA F-1 y COPENA V-1). Corral *et al.* (2008) mostraron un contenido de 22.2 mg de AA/ 100 g de peso fresco en cladodios de Milpa Alta cultivados en el Estado de México, México; valores superiores a los del presente estudio. Estas diferencias pudieran atribuirse a diferencias en la metodología empleada en la determinación o al efecto de las condiciones climáticas de los sitios de cultivo, ya que se ha mostrado que tanto la intensidad de luz como la temperatura ambiental tienen influencia en el contenido de AA (Lee y Kader, 2000).

El mayor contenido de AA en los primeros estados de desarrollo de los cladodios de nopal concuerda con lo mostrado por Parsons y Fry (2012), quienes indicaron que las altas concentraciones de ácido ascórbico son características de tejidos en rápido crecimiento, a pesar de que estos también presentan altas actividades de ascorbato oxidasa, enzima que inicia el catabolismo del ácido ascórbico.

El contenido de AA total de nopal verdura obtenido en este estudio es similar al reportado para plátano, papas frescas y tomates frescos; aunque es menor al reportado para zarzamora, melón, uvas, kiwi, mandarina, naranja, frambuesa, brócoli, berza, coliflor y espinacas (Lee y Kader, 2000). Adicionalmente se observó que en nopal, el ácido L-ascórbico es el principal componente del ácido ascórbico total, con aproximadamente 80% en promedio para los diferentes estados de desarrollo y variedades; este comportamiento es similar al mostrado por Lee y Kader (2000) en diferentes frutas y hortalizas.

Se encontró una relación inversa entre ácido ascórbico y actividad específica de PPO con coeficientes de correlación de -0.80, -0.93, -0.88 y -0.87 en las variedades COPENA F-1,

Rodríguez and Cantwell (1988) found no consistent pattern of change in the content of ascorbic acid during the development of cladodes of three species of *Opuntia*, with values of 7-18 mg AA/100 g fresh weight, although it should be noted these authors used a colorimetric method unlike the present study using HPLC technique. These results agree with those of Rodríguez and Villegas (1997) who reported values of 12 mg AA/100 g fresh weight in cladodes of 20 cm length of two varieties of nopal vegetables (COPENA F-1 and COPENA V-1). Corral *et al.* (2008) showed a content of 22.2 mg AA/100 g fresh weight cladodes in Milpa Alta grown in the State of Mexico, Mexico; higher than the values of this study. These differences could be attributed to differences in the methodology used in the determination or the effect of the climatic conditions of the cultivation sites, since it has been shown that both the light intensity and ambient temperature influence the content of AA (Lee and Kader, 2000).

The highest content of AA in the early development stages of cactus cladodes agrees with that shown by Parsons and Fry (2012), who indicated that high concentrations of ascorbic acid are characteristic of tissue rapidly growing, despite these also they have high activities of ascorbate oxidase, an enzyme that initiates ascorbic acid catabolism.

The content of total AA of nopal vegetables obtained in this study is similar to that reported for bananas, fresh potatoes and fresh tomatoes; although it is lower than reported for blackberry, melon, grapes, kiwi, tangerine, orange, raspberry, broccoli, cabbage, cauliflower and spinach (Lee and Kader, 2000). Additionally it was observed that in nopal, L-ascorbic acid is the main component of the total ascorbic acid, approximately 80% on average for the different stages of development and varieties; this behavior is similar to that shown by Lee and Kader (2000) in different fruits and vegetables.

An inverse relationship between ascorbic acid and specific activity of PPO with correlation coefficients of -0.80, -0.93, -0.88 and -0.87 in varieties COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta and Atlixco, respectively was found. This behavior shows that by decreasing the content of total ascorbic acid increases the specific activity of PPO.

Darkening. Values darkening displayed by cladodes nopal of different varieties and stages of development were low, even after 48 h with absorbance at 420 nm of 0 to 0.2 (Figure 4), finding that no significant changes ($p > 0.05$) in the degree of darkening at 420 nm during the development of the cladodes

COPENA V-1, Milpa Alta y Atlixco, respectivamente. Este comportamiento muestra que al disminuir el contenido de ácido ascórbico total aumenta la actividad específica de PPO.

Oscurecimiento. Los valores de oscurecimiento mostrados por los cladodios de nopal verdura de las distintas variedades y estados de desarrollo fueron bajos, aún después de 48 h con valores de absorbancia a 420 nm de 0 a 0.2 (Figura 4), encontrando que no hay cambios significativos ($p > 0.05$) en el grado de oscurecimiento a 420 nm durante el desarrollo de los cladodios de las cuatro variedades evaluadas. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el oscurecimiento entre las distintas variedades, observándose que COPENA F-1 y Milpa Alta presentaron los valores más altos, seguido de las variedades COPENA V-1 y Atlixco que presentaron valores similares.

Los resultados del presente estudio concuerdan con los mostrados por Aguilar *et al.* (2007), quienes evaluaron la actividad de PPO y el potencial de oscurecimiento en cladodios de 30 días de edad de 21 variedades de *Opuntia*, encontrando diferencias significativas entre las variedades analizadas, presentando 'Chicomostoc', 'Negrito' y 'Jade', los menores valores de oscurecimiento. Sin embargo, los valores de actividad de PPO de estas variedades fueron similares al de otras variedades que presentaron un mayor potencial de oscurecimiento. Artés *et al.* (1998) indicaron que la especie y la variedad se encuentran entre los factores más importantes que influyen en la susceptibilidad al oscurecimiento de las frutas y hortalizas, resaltando que en papa y manzana la susceptibilidad al oscurecimiento depende de la variedad.

Cabezas *et al.* (2009a) evaluaron cinco variedades de papa (Agata, Agria, Almera, Marabel y Vivaldi), encontrando diferencias en el oscurecimiento entre variedades, mostrando que Marabel se caracterizó por presentar un bajo contenido de fenoles totales, una baja actividad de PPO y menor incidencia de oscurecimiento, mientras que Almera presentó el mayor contenido de fenoles totales, de actividad de PPO y de incidencia de oscurecimiento. De igual manera, Cabezas *et al.* (2009b) encontraron diferencias en la susceptibilidad al oscurecimiento de cinco variedades de alcachofa (C3, Catanese, Tema, Violetto Foggiano y Violetto Sardo), indicando que C3 mostró el mayor contenido de fenoles totales y de actividad de PPO, así como la mayor incidencia de oscurecimiento; mientras que Catanese mostró el mayor contenido de ácido ascórbico total y la más baja incidencia de oscurecimiento.

of the four varieties tested. However, significant differences ($p < 0.05$) in the darkening between different varieties were found, showing that COPENA F-1 and Milpa Alta had the highest values, followed by varieties COPENA V-1 and Atlixco that had similar values.

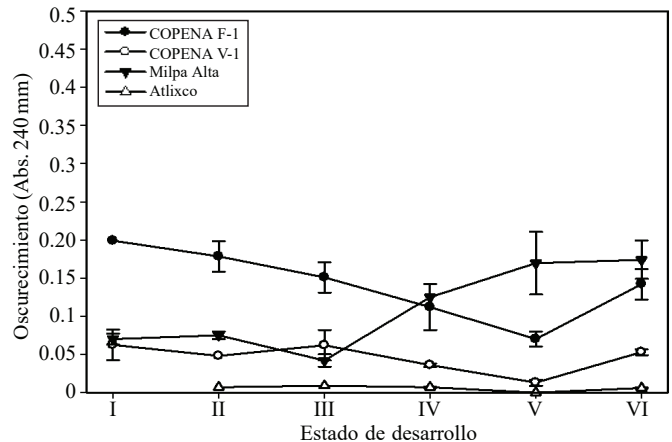


Figura 4. Grado de oscurecimiento (Abs 420 nm) durante el desarrollo de cladodios de nopal verdura de las variedades COPENAF-1, COPENAV-1, MilpaAlta y Atlixco. Las barras verticales indican la desviación estándar para cada estado de desarrollo, n= 3.

Figure 4. Degree of obscuration (Abs 420 nm) during the development of nopal cladodes varieties COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta and Atlixco. The vertical bars indicate the standard deviation for each stage of development, n= 3.

The results of this study are consistent with those shown by Aguilar *et al.* (2007), who evaluated PPO activity and browning potential in cladodes 30 days old of 21 varieties of *Opuntia*, finding significant differences between varieties analyzed, presenting 'Chicomostoc', 'Negrito' and 'Jade', the lower values of dimming. However, PPO activity values of these varieties were similar to other varieties had a higher potential blackout. Artes *et al.* (1998) indicated that the species and variety are among the most important factors that influence susceptibility to browning of fruits and vegetables, noting that potato and apple susceptibility to darkening depends on the variety.

Heads *et al.* (2009a) evaluated five potato varieties (Agata, Agria, Almera, Marabel and Vivaldi), finding differences in the darkening between varieties, showing that Marabel was characterized by a low content of total phenols, low PPO activity and lower incidence dimming, while Almera had the highest total phenol content, PPO activity and browning incidence. Similarly, Cabezas *et al.* (2009b) they found differences in susceptibility to darkening of five varieties

Los resultados del presente estudio muestran que tal y como se indicó en papa y manzana (Artés *et al.*, 1998), papa (Cabezas *et al.*, 2009a) y alcachofa (Cabezas *et al.*, 2009b) la variedad es el factor que más influye en la susceptibilidad al oscurecimiento de los cladodios de nopal verdura, ya que la susceptibilidad a oscurecerse fue similar entre los cladodios de los distintos estados de desarrollo. Sin embargo no se observaron diferencias la actividad específica de PPO en las cuatro variedades evaluadas. Los cladodios de COPENA F-1 mostraron mayor tendencia a oscurecerse y aunque presentaron el mayor contenido de ácido ascórbico, compuesto que reduce a las quinonas, también mostraron el mayor contenido de fenoles totales, los cuales son los sustratos de la enzima PPO. Los cladodios de Atlixco mostraron menor tendencia a oscurecerse y un menor contenido de ácido ascórbico y de compuestos fenólicos totales.

Conclusiones

La actividad específica de PPO de los cladodios de las cuatro variedades de *Opuntia ficus indica* aumentó significativamente al avanzar el desarrollo, alcanzando los máximos valores en el estado VI; y un comportamiento inverso ocurrió en el contenido de ácido ascórbico, que disminuyó al avanzar el estado de desarrollo. Se encontraron diferencias en el contenido ácido ascórbico total, de fenoles totales y oscurecimiento de las variedades COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta y Atlixco, presentando los cladodios de COPENA F-1 el mayor contenido de ácido ascórbico total, de fenoles totales y de oscurecimiento, mientras que los de Atlixco presentaron los menores valores. Estos resultados sugieren que desde el punto de vista de oscurecimiento los cladodios de Atlixco pudieran ser más adecuados para destinarse a la elaboración de nopal fresco cortado.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, el financiamiento otorgado para la realización del proyecto 31453-B, al Consejo Mexicano del Nopal y Tuna y al Sr. Vicente Santos Becerril por aportar el material vegetal, a la Q. B. Mónica A. Villegas-Ochoa y a la M. en C. Judith Fortiz Hernández por el apoyo técnico.

of artichoke (C3, Catanese, Tema, Violetto Foggiano and Violetto Sardo), indicating that C3 showed the highest total phenol content and PPO activity and the highest incidence dimming; while Catanese showed the highest content of total ascorbic acid and the lowest incidence of darkening.

The results of this study show that as indicated in potato and apple (Artes *et al.*, 1998), potato (Cabezas *et al.*, 2009a) and artichoke (Cabezas *et al.*, 2009b) variety is the factor that more influences susceptibility to darkening of nopal cladodes as the susceptibility to darken cladodes was similar between the various stages of development. However no differences were observed specific activity of PPO in the four varieties tested. The cladodes COPENA F-1 showed a greater tendency to darken and even showed the highest content of ascorbic acid compound that reduces the quinones, also showed the highest content of total phenols, which are substrates of PPO enzyme. Atlixco cladodes showed less tendency to darken and a lower content of ascorbic acid and total phenolic compounds.

Conclusions

The specific activity of PPO cladodes of four varieties of *Opuntia ficus indica* significantly increased with advancing development, reaching maximum values in the state VI; and a reverse behavior occurred in the content of ascorbic acid, which decreased to advance the state of development. Differences in total ascorbic acid content, total phenol and darkening of the varieties were found COPENA F-1, COPENA V-1, Milpa Alta and Atlixco, presenting cladodes COPENA F-1 the highest content of total ascorbic acid, total darkening and phenols, while Atlixco showed the lowest values. These results suggest that from the point of view darkening the cladodes of Atlixco may be more suitable to be used for the production of cut fresh cactus.

End of the English version



Literatura citada

- Adams, J. B. and Brown, H. M. 2007. Discoloration in raw and processed fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47(3):319-333.
- Aguilar, L.; Martínez, M. A.; Barrientos, A.F.; Aguilar, N. y Gallegos, C. 2007. Potencial de oscurecimiento enzimático de variedades de nopalitos. *J. Prof. Assoc. Cactus Develop.* 9:165-184.

- Artés, F.; Castañer, M. y Gil, M. I. 1998. El pardeamiento enzimático en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Food Sci. Technol. Int.* 4(6):377-389.
- Artés, F.; Gómez, P. A. and Artés-Hernández, F. 2007. Physical, physiological and microbial deterioration of minimally fresh processed fruits and vegetables. *Food Sci. Technol. Int.* 13(3):177-188.
- Barbagallo, R. N.; Chisari, M. and Spagna, G. 2009. Enzymatic browning and softening in vegetable crops: Studies and experiences. *Italian J. Food Sci.* 21(1):3-16.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2):248-254.
- Bottino, A.; Degl'Innocenti, E.; Guidi, L.; Graziani, G. and Fogliano, V. 2009. Bioactive compounds during storage of fresh-cut spinach: The role of endogenous ascorbic acid in the improvement of product quality. *J. Agr. Food Chem.* 57(7):2925-2931.
- Cantwell, M. 1999. Manejo poscosecha de tunas y nopalitas. *In: agroecología, cultivo y usos del nopal.* Barbera, G.; Inglese, P. y Pimienta-Barrios, E. (Eds.). Núm. 132. Estudio FAO producción y protección vegetal. Roma, Italia. 126-143 pp.
- Cabezas, A. B.; Amodio, M. L.; Cornacchia, R.; Rinaldi, R. and Colelli, G. 2009a. Suitability of five different potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) to be processed as fresh-cut products. *Postharvest Biol. Tech.* 53(3):138-144.
- Cabezas, A. B.; Amodio, M. L.; Cornacchia, R.; Rinaldi, R. and Colelli, G. 2009b. Screening quality and browning susceptibility of five artichoke cultivars for fresh-cut processing. *J. Sci. Food Agr.* 89(15):2588-2594.
- Corral, R. D.; Yahia, E. M.; Carrillo, A. and Gonzalez, G. A. 2008. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *J. Agr. Food Chem.* 56(22):10498-10504.
- Chutichudet, B.; Chutichudet, P. and Kaewsit, S. 2011. Influence of developmental stage on activities of polyphenol oxidase, internal characteristics and colour of lettuce cv. grand rapids. *Am. J. Food Tech.* 6(3):215-225.
- Degl'Innocenti, E.; Pardossi, A.; Tognoni, F. and Guidi, L. 2007. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in 'lettuce', 'escarole' and 'rocket salad' when stored as fresh-cut products. *Food Chem.* 104(1):209-215.
- Doner, L. W. and Hicks, K. B. 1981 High-performance liquid chromatographic separation of ascorbic acid, erythorbic acid, dehydroascorbic acid, dehydroerythorbic acid, diketogulonic acid, and diketogluconic acid. *Anal. Biochem.* 115(1):225-230.
- Escarpa, A. and González, M. C. 2000. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *J. Chromatography A.* 897(1):161-170.
- FAO-WHO. 1993. Worldwide codex standard for nopal. *Codex Stan 185-1993-CODEX Alimentarius.* Vol. 5B. Tropical Fresh Fruits and Vegetables. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Rome, Italy. 19-23 pp.
- Flores, V. C.; De Luna, J. M. y Ramírez P. P. 1995. Mercado mundial del nopalito. ASERCA-UACH-CIESTAAM. Chapingo, México. 21 p.
- Guevara, T.; Jimenez, H.; Reyes, M. L.; Mortensen, A. G.; Laursen, B. B.; Lin, L. W.; De León, A.; Fomsgaard, I. S. and Barba de la Rosa, A. P. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *J. Food Compos. Anal.* 23(6):525-532.
- Hintze, J. 1997. NCSS 97. Number Cruncher Statistical System for Windows. Version 6.0. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA.
- Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S. and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.* 47(10):3954-3962.
- Korus, A. 2011. Level of vitamin C, polyphenols, and antioxidant and enzymatic activity in three varieties of kale (*Brassica oleracea* L. var. Acephala) at different stages of maturity. *Int. J. Food Prop.* 14(4):1069-1080.
- Lee, S. K. and Kader, A. A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Tec.* 20(3):207-220.
- Nicolas, J. J.; Richard-Forget, F. C.; Goupy, P. M.; Amiot, M. and Aubert, S. Y. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34(2):109-157.
- Parsons, H. T. and Fry, S. C. 2012. Oxidation of dehydroascorbic acid and 2,3-diketogulonate under plant apoplastic conditions. *Phytochemistry.* 75:41-49.
- Rodriguez, A. 2002. Postharvest physiology and technology of cactus pear fruits and cactus leaves. *Acta Hort.* 581:191-199.
- Rodriguez, A. and Cantwell, M. I. 1988. Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitas). *Plant Foods Human Nutr.* 38(1):83-93.
- Rodriguez, A. and Villegas, M. A. 1997. Quality of cactus stems (*Opuntia ficus-indica*) during low temperature storage. *J. Prof. Assoc. Cactus Develop.* 2:142-151.
- Sapis, J. C.; Macheix, J. J. and Cordonnier, R. E. 1983. The browning capacity of grapes. ii. browning potential and polyphenol oxidase activities in different mature grape varieties. *Am. J. Enol. Viticult.* 34(3):157-161.
- Sciancalepore, V. and Longone, V. 1984. Polyphenol oxidase activity and browning in green olives. *J. Agr. Food Chem.* 32(2):320-321.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16(3):144-158.
- Yoruk, R. and Marshall, M. R. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *J. Food Biochem.* 27(5):361-422.