



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRUTOS DE ZAPOTE  
MAMEY (*Pouteria sapota*) CON DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ**

**TESIS**

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN

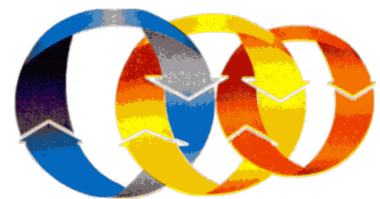
CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA



SECRETARÍA GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**PRESENTA**

ARACELI TORRES RODRÍGUEZ

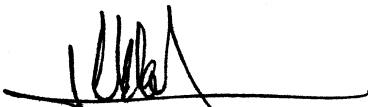


Chapingo, Texcoco, Edo. de México, diciembre de 2012

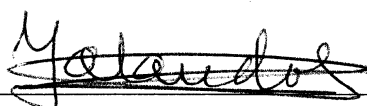
**COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRUTOS DE  
ZAPOTE MAMEY (*Pouteria sapota*) CON DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ.**

Tesis realizada por Araceli Torres Rodríguez bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

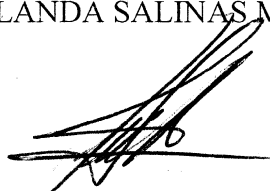
**MAESTRO EN CIENCIAS EN  
CIENCIA Y TECNOLOGIA AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR: 

DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA

CODIRECTORA: 

DRA. YOLANDA SALINAS MORENO

ASESOR: 

DR. IRÁN ALIA TEJACAL

## DEDICATORIAS

♣ **A mis padres, Efraín y Teresa:**

Por darme la vida y guiarme por el camino a seguir, por motivarme a trabajar cada día. Sobre todo a esta linda mujer que ha estado conmigo cada momento de mi vida, porque gracias a su apoyo y consejos, he llegado a realizar una de mis metas lo cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir.

♣ **A mis hermanos, Albino, Tere, Lucy y Dulce:**

Por estar conmigo en cada etapa de mi vida y ese amor incondicional. Sabiendo que jamás encontraré la forma de agradecer su constante apoyo y confianza, sólo espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos y logros son también suyos.

♣ **Jacinto, Arlen:**

Por el cariño y apoyo moral que siempre he recibido de ustedes.

♣ **A mis sobrinos, Yosmery, Kenzy, Amairany, Joshajandy y Santiago:**

Mis pequeños angelitos, que me brindan mucha alegría y amor incondicional.

*No temas porque yo estoy contigo; no desmayes por que yo soy tu Dios que te esfuerzo siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de mis estudios de posgrado.
- A la Universidad Autónoma Chapingo que me ha formado profesionalmente.
- Al Dr. Salvador Valle Guadarrama, por su apoyo, confianza y sus valiosas observaciones que contribuyeron a fortalecer el conocimiento.
- A la Dra. Yolanda Salinas Moreno, por su tiempo, dedicación e impulsarme a mejorar día a día.
- Al Dr. Irán Alia Tejacal, por sus asesorías y el valioso tiempo que destino a este trabajo.
- Al Dr. Gustavo Mena Nevárez, por su disponibilidad y su valioso tiempo en la última etapa de mi tesis.
- A la Dr. Carmen Ybarra Moncada, por sus acertadas observaciones.
- Al M.C. Juan Manuel Villareal Fuentes, por su apoyo incondicional en la recolección de los frutos.
- Al M. C. Cecilio Bautista Bañuelos, por sus asesorías y valiosas aportaciones.
- A Lupita, Elvia, Lety, Cesar y Alberto por su amistad y su apoyo incondicional en el desarrollo de mi tesis.
- A mis amigos y compañeros de la MCYTA, fue un placer haber recorrido juntos esta etapa de mi vida, por su amistad gracias.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Araceli Torres Rodríguez, originaria de Tepalcingo, Morelos. Obtuvo el título de Ingeniero Agroindustrial en la Universidad Autónoma Chapingo con la tesis “Fenoles solubles y actividad antioxidante en frutos de mamey (*Pouteria zapote*) con diferentes estados de madurez”. Del trabajo realizado en la tesis de licenciatura se publicó el artículo con el nombre de “Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest”, en la revista Food Research International. Tiene formación profesional en investigación de maíz y papa en el Instituto de Nacional de Investigación, Agrícola y Pecuaria (INIFAP).

# COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRUTOS DE ZAPOTE MAMEY (*Pouteria sapota*) CON DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ

## PHENOLICS COMPOUND AND ENZYMATIC ACTIVITY IN FRUITS OF MAMEY SAPOTE (*Pouteria sapota*) WITH DIFFERENT STATES OF MATURITY

Torres-Rodríguez, A; Valle-Guadarrama, S; Salinas-Moreno, Y; Alia-Tejacal, I.

### Resumen

El fruto de *Pouteria sapota* tiende a presentar oscurecimiento enzimático durante su madurez comercial. Esto se debe a la acción de las enzimas polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) sobre los fenoles del fruto. Con el fin de contribuir al conocimiento sobre los cambios que sufren los fenoles solubles totales (FST) del fruto de zapote mamey durante su proceso de maduración y su relación con las enzimas responsables del oscurecimiento, se realizó el presente trabajo, cuyos objetivos fueron: 1) caracterizar el proceso de maduración mediante variables físicas y tasa respiratoria 2), analizar los FST durante el proceso de maduración y 3). Monitorear la actividad de las enzimas PPO y POD durante la maduración del fruto. Dentro de las variables físicas la firmeza es la que mejor describe el proceso de maduración con valores de 50 a 5 N. La concentración de FST determinado por el método Folin-Ciocalteu disminuyó de 19777.7 a 2012.6 mg g<sup>-1</sup> de MF. Sin embargo, este método no es específico para fenólicos por lo cual se determinó con los métodos de Vanillina y DMAC con valores de 7552.2 a 1862.7 mg g<sup>-1</sup> de MF y de 2393.3 a 221.0 mg g<sup>-1</sup> de MF, respectivamente. La fracción de fenoles de baja polaridad se analizó por HPLC en frutos maduros encontrando ácido gálico, catequina, epicatequina, epicatequingalato y el pico 6 que fue tentativamente identificado como un dímero de catequina y se encontró la presencia de derivados de miricetina. La actividad enzimática de las enzimas PPO y POD aumentó al llegar a madurez de consumo con valores de 182.28 UI y 6288 UI, respectivamente. Por esta razón el oscurecimiento de la pulpa de la fruta está relacionado al incremento de las enzimas y la disminución de fenoles.

**Palabras clave:** Fenoles solubles totales, PPO, POD, Folin-Ciocalteu, vainillina y DMAC.

### Abstract

The fruit of *Pouteria sapota* tends to present enzymatic browning during their commercial maturity. Due to the action of the enzymes polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) on the phenols of the fruit. The following work was carried out with the purpose of contributing to the knowledge about the changes that suffer the total soluble phenols (FST) of the fruit of mamey sapota during their maturation process and their relationship with the enzymes responsible for the browning. The objectives were: 1) to characterize the maturation process by means of physical variables and breathing rate 2), to analyze the FST during the maturation process and 3). Monitor the enzymes PPO and peroxidase POD activity during the maturation of the fruit. Inside the physical variables stability is the one that better describes the maturation process with values from 50 to 5 N. The concentration of FST determined by the method Folin-Ciocalteu diminishes from 19777.7 to 2012.6 mg g<sup>-1</sup> of MF however, this method is not specific for phenolics that is why it was determined with Vanillin and DMAC methods with values from 7552.2 to 1862.7 mg g<sup>-1</sup> of MF and of 2393.3 to 221.0 mg g<sup>-1</sup> of MF, respectively. The fraction of phenols of low polarity was analyzed by HPLC in mature fruits finding gallic acid, catechin, epicatechin, epicatechingallato and the peak 6 that it was identified tentatively as a dimer catechin also it was found as a derivative of myricetin. The enzymatic activity of the enzymes PPO and POD increased when arriving to consumption maturity with values of 61.6 to 182.28 UI and 929.6 to 6288 UI. For that reason it has been considered that the browning of the pulp of the fruit is related to the increment of the enzymes and the phenols decrease.

**Keywords:** Total soluble phenols, PPO, POD, Folin-Ciocalteu, vanillin and DMAC.

## ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DATOS BIOGRÁFICOS .....	v
LISTA DE CUADROS .....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Situación actual del zapote mamey en México.....	5
2.2 Cultivares.....	5
2.3 Composición química general del mamey.....	6
2.4 Índice de madurez.....	7
2.5 Calidad de los frutos de zapote mamey .....	8
2.6 Descripción del fruto .....	8
2.7 Cosecha.....	9
2.8 Firmeza .....	10
2.9 Almacenamiento a temperatura ambiente.....	11
2.10 Daños por frío .....	11
2.11 Tecnologías para prolongar la vida postcosecha de frutos de zapote mamey .....	12
2.12 Enzimas del fruto de zapote mamey .....	13
2.13 Compuestos fenólicos.....	16
2.13.1 Síntesis de los compuestos fenólicos.....	17
2.13.2 Ácidos fenólicos .....	18
2.13.3 Flavonoides .....	19

2.13.3.2. Flavanoles.....	20
2.13.3.3 Proantocianidinas.....	21
2.14. Compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey.....	23
III. LITERATURA CITADA .....	25
CAPÍTULO I. COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRUTOS DE ZAPOTE MAMEY ( <i>Pouteria sapota</i> ) CON DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ.....	
	35
I. INTRODUCCIÓN .....	38
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	39
2.1 Material vegetal .....	39
2.2 Variables de calidad del fruto.....	40
2.2.1 Respiración.....	40
2.2.2 Firmeza .....	41
2.2.3 Color.....	41
2.2.5 Sólidos solubles totales (SST).....	41
2.3 Caracterización fitoquímica.....	42
2.3.1 Extracción de compuestos fenólicos (proantocianidinas).....	42
2.3.2 Cuantificación de compuestos fenólicos Folin-Ciocalteu.....	42
2.3.3 Actividad enzimática.....	43
2.3.3.1 Polvo de acetona.....	43
2.3.3.2 Enzima polifenol oxidasa (EC.1.14.18.1; PPO) .....	43
2.3.3.3 Enzima peroxidasa (EC. 1.11.1.7; POD).....	44
2.5 Análisis de datos.....	45
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
3.1 Variables fisiológicas.....	47
3.1.1 Respiración.....	47
3.2 Variables biofísicas.....	48
3.2.1 Firmeza .....	48
3.2.2 Sólidos solubles totales (SST).....	49
3.2.3 Color.....	51
3.2.3.2. Angulo de matiz .....	52



3.2.3.4. Cromaticidad .....	54
3.3 Fenoles solubles totales .....	55
3.4 Enzimas .....	56
3.4.1. Polifenol oxidasa (PPO) .....	56
3.4.2. Peroxidasa .....	58
IV. CONCLUSIONES .....	60
V. LITERATURA CITADA .....	61
CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE PROANTOCIANIDINAS EN ZAPOTE MAMEY	
<i>(Pouteria Sapota</i> jacq. H.E. Moore & Stearn) DURANTE SU PROCESO DE MADURACIÓN	
.....	67
I. INTRODUCCIÓN .....	68
2.1 Material vegetal .....	72
2.2 Firmeza en frutos de <i>P. sapota</i> .....	72
2.3 Extracción de compuestos fenólicos (proantocianidinas).....	73
2.4 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	73
2.4.1 Folin-Ciocalteu .....	73
2.4.2 Proantocianidinas .....	74
2.4.2.1 DMAC (4-Dimetilaminocinalmadehído) .....	74
2.4.2.2 Vainillina.....	75
2.4.2.3 Butanol/HCl.....	75
2.5Análisis de proantocianidinas por HPLC.....	76
2.6 Análisis estadísticos.....	78
II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	79
3. 1 Análisis de proantocianidinas por HPLC.....	84
III. CONCLUSIONES .....	88
IV. LITERATURA CITADA .....	89

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.-Composición química del zapote mamey (kg).....	7
Cuadro 2. Clasificación de compuestos fenólicos.....	17
Cuadro 3. Correlación entre los valores de FST con variables fisiológicas, físicas y químicas. .	59
Cuadro 4. Correlaciones de Pearson entre los valores de fenoles obtenidos con los diferentes métodos utilizados. ....	84
Cuadro 5. Contenido de fenoles en dos etapas de maduración del fruto de sapote mamey en la fracción de acetato de etilo obtenida del extracto fenólico y analizada por HPLC. ....	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización externa e interior de compuestos fenólicos y enzimas que oxidan a los compuestos fenolicos (polifenol oxidasa y peroxidasa) en una célula típica vegetal. Adaptación (Toivonen y Brummell, 2008). .....	14
Figura 2. Biosíntesis de compuestos fenólicos. Fuente: Fennema., 2000; Salisbury y Ross, 1994. ....	18
Figura 3. Esqueleto estructural de los flavanoides. Fuente: Rivas y García <i>et al.</i> (2002).....	19
Figura 4. Velocidad de respiración durante el proceso de maduración en frutos de zapote mamey almacenados a 12 °C.....	47
Figura 5. Firmeza durante el proceso de maduración en pulpa frutos de zapote mamey almacenados a 12. ....	49
Figura 6. Sólidos solubles totales durante el proceso de maduración en frutos de zapote mamey almacenados a 12 °C.....	50
Figura 7. Comportamiento de Luminosidad (L) en la pulpa del fruto de zapote mamey durante el proceso de maduración, almacenado a 12 ° C. ....	51
Figura 8. Comportamiento del Ángulo Hue en la pulpa de frutos de zapote mamey durante el proceso de maduración, almacenados a 12 °C.....	53
Figura 9. Comportamiento de cromaticidad en la pulpa de zapote mamey durante su proceso de maduración, almacenados a 12 °C.....	54
Figura 10. Contenido de fenoles totales solubles en frutos de zapote mamey durante su proceso de maduración, en frutos almacenados a 12 °C. ....	55

Figura 11. Actividad de la PPO durante el proceso de maduración en frutos de zapote mamey, almacenados a 12°C.....	57
Figura 12. Actividad de la enzima POD durante el proceso de maduración en frutos de zapote mamey, almacenados a 12 °C. ....	59
Figura 13. Firmeza del fruto y contenido de fenoles solubles totales (FST) durante almacenamiento a 12°C de sapote mamey (Pouteria sapota). ....	79
Figura 14. Proantocianidinas por los métodos de Vainillina y DMAC en frutos de sapote mamey durante su proceso de maduración a 12°C.....	81
Figura 15. Proantocianidinas por el método de Vainillina utilizando como estándares catequina y ProB2 en frutos de sapote mamey durante su maduración a 12°C. ....	82
Figura 16. Dinámica de los taninos condensados en frutos de sapote mamey durante su maduración bajo temperatura de 12°C.....	83
Figura 17. . Cromatogramas por HPLC de la mezcla de estándares de flavanoles (A) y de la fracción de acetato de etilo del extracto fenólico del fruto de sapote mamey en madurez comercial (B). ....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS

DMAC	4-dimetilamino-cinamaldehído
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FST	Fenoles solubles totales
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
PAs	Proantocianidinas
PAsM	PAs monómericas
POD	Peroxidasa
PPO	Polifenol oxidasa
ProB2	Proantocianidina B2
PVP	Polivinilpirrolidona
MC	Madurez comercial
MF	Materia fresca
MFI	Madurez fisiológica
SST	Sólidos solubles totales

## I. INTRODUCCIÓN

El zapote mamey (*Pouteria sapota*) es un árbol que crece en las zonas tropicales de baja humedad y es nativo de México y Centro América (Torral, 1998). En la actualidad se cultivan en México alrededor de 1,700 ha, de las que se obtiene una producción aproximada de 16,000 t (SAGARPA, 2011). El fruto de zapote mamey es considerado exótico, por sus características organolépticas y nutricionales se consume en fresco en el mercado nacional, pero en su producción existen problemas de manejo pre y postcosecha (Saucedo, 2001; Bayuelo y Ochoa., 2006; Azurdía, 2006). Por su excelente sabor este fruto, goza de una buena aceptación en toda América Central y EUA debido a la inmigración de cubanos y centroamericanos (Alia *et al.*, 2005a). Actualmente se considera como una fruta con posibilidades altas de exportar o ampliar sus mercados a nivel nacional (Ramos *et al.*, 2009).

En zapote mamey, la concentración de compuestos fenólicos disminuye durante la maduración, lo cual puede estar relacionado con un oscurecimiento de la pulpa por exposición al oxígeno del aire o bien por una condición natural de sobre-maduración, en la cual la degradación de membranas puede favorecer el contacto entre la PPO y los fenoles (Alia *et al.*, 2005b)

Por otro lado, se ha realizado la cuantificación de compuestos fenólicos totales en el fruto de zapote mamey por el método de Folin-Ciocalteu y la identificación de compuestos fenólicos por HPLC (Ma *et al.*, 2004; Alia *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2011; Yahia *et al.*, 2011); sin embargo, solo Torres *et al.* (2011) reportaron información acerca de los cambios que ocurren durante la maduración, pero no evaluaron si existe la presencia de taninos condensables responsables de la astringencia cuando el fruto es inmaduro.

En general, el consumo alto de frutas y vegetales se ha correlacionado con una reducción del riesgo de padecer distintos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Genkinger *et al.*, 2004), lo cual se origina en gran medida por la actividad antioxidante que proveen compuestos como vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno y polifenoles (Valencia y Robles-Sardin, 2005), incluyendo en éstos a ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, antocianinas, flavonoles, flavonas y flavanonas (Manach *et al.*, 2004).

El contenido de compuestos con capacidad antioxidante varía ampliamente entre materiales vegetales (Manach *et al.*, 2004) y la capacidad para reducir el estrés oxidativo varía en forma considerable. Por ello, hay un interés creciente por identificar los productos hortofrutícolas con mayor potencial antioxidante y por caracterizar los compuestos responsables de dicha actividad.

De esta manera al aplicar tecnologías de conservación en los frutos de zapote mamey que minimicen la degradación de los compuestos fenólicos, se requiere conocer el contenido y el tipo de éstos en diferentes estados de maduración del fruto.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Caracterizar los procesos de maduración en frutos de zapote mamey procedentes de Tapachula, Chiapas, con base en variables fisiológicas, biofísicas y bioquímicas.

### **Particulares**

Cuantificar los fenólicos solubles totales por el método de Folin-Ciocalteu presentes en el proceso de maduración del fruto de zapote mamey.

Cuantificar las proantocianidinas por el método de vainillina y DMAC en el proceso de maduración.

Medir la actividad enzimática de la enzima polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) en el proceso de maduración.

Identificar y cuantificar los flavonoides presentes en el frutos de zapote mamey por el método de en HPLC, durante el proceso de maduración.



## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

*Pouteria* es un género de la familia de las sapotáceas. Entre las 188 especies conocidas de importancia comercial están *Pouteria sapota* (zapote mamey), *Pouteria viridis* (green zapote) y *Pouteria campechiana* (canistel) (Azurdia, 2006). La palabra zapote se deriva del náhuatl “tzapotl” o “tezontzapotl” y este término se aplica de manera general a toda la fruta de textura suave y sabor dulce (Morton, 1987; Azurdia, 2006; Alia *et al.*, 2007).

El centro de origen del zapote mamey es el sur de México, Yucatán, Guatemala, Honduras y Nicaragua. De estas regiones se difundió al Caribe, Sur América, Florida, las Filipinas, Malasia, Colombia, Venezuela, Ecuador, República Dominicana, Puerto Rico, Hawai y la India (Donadio y Durigan, 1995; Azurdia, 2006; Alia *et al.*, 2007). Debido al valor potencial que representa este material genético se hacen necesarios estudios básicos de caracterización y conservación (Campbell *et al.*, 1997).

La caracterización in situ de especies nativas es el paso inicial para determinar características morfológicas y fenológicas que conforman la variabilidad genética (Benavides, 2001). Este frutal es un recurso fotogénico con gran potencial comercial para el mercado interno y para exportación, por tal razón la especie *sapota* en América Tropical es la que acumula la mayor información hasta el momento y la que se considera que tiene mayores oportunidades en el mercado (Ramírez, 2007).

Su importancia radica principalmente en el valor comercial de sus frutos, por su sabor exquisito en los frutos y por tener alto valor nutritivo (Saucedo *et al.*, 2001). Sin embargo, en su centro de origen se cultivan solamente en áreas pequeñas y es un componente de un sistema agroforestal, es decir, no existen plantaciones comerciales considerables en México. En Chiapas se cultivan en asociación con cultivos como el café o cacao. Su consumo se da básicamente a nivel familiar, mercado local y a nivel regional (Nava and Ricker, 2004; Bayuelo y Ochoa, 2006; Azurdía, 2006). Sin embargo, la falta de variedad investigación en el manejo del huerto y del fruto durante su cosecha ha hecho difícil su desarrollo comercial (Sandoval *et al.*, 2006) por lo cual aún no es una actividad económica importante. No obstante, por su excelente sabor, goza de una buena aceptación en toda América central, EUA debido, a la inmigración de Cubanos y Centroamericanos (Alia *et al.*, 2005).

## **2.1 Situación actual del zapote mamey en México**

Actualmente, en México se cultivan 1,700 ha, de las que se obtiene una producción de 16,000 ton de zapote mamey. El rendimiento medio a nivel nacional es actualmente de 12.24ton ha<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2011). Los principales estados productores son Yucatán, Guerrero, Chiapas, Michoacán, Tabasco, Colima, Puebla, Veracruz, México, Oaxaca, Morelos, Campeche, Hidalgo y Nayarit (SAGARPA, 2011).

## **2.2 Cultivares**

En el estado de Yucatán existen plantaciones injertadas con material seleccionado, entre las que destacan variedades ‘Magaña 1’ y ‘Magaña 2’, en los demás estados, las plantaciones son principalmente en semilla. En México se tienen muy pocas

plantaciones comerciales con plantas injertadas de material seleccionado, aspecto que impiden lograr altos rendimiento y fruta de alta calidad debido a la variabilidad de los árboles que provienen de la semilla (Sauri *et al.*, 2007; Ledesma, 2011). En Alpuyecá, Guerrero se han reportado selecciones como ‘El regalo’, ‘Alfonso’, ‘Cid 19’, ‘Nidito de amor’, ‘Dany 66’, ‘Alfonso 15’ y ‘Selección ‘Pardo’ (Téllez *et al.*, 2009; Ledesma *et al.*, 2011). En huertos comerciales establecidos en Florida, EEUU existen los cultivares ‘ARE3’, ‘Patin’, y ‘Tamuzal’ y ‘Zapote Valiente’, ‘Zapote Rivera’ en San Andrés, el Salvador (Morton, 1987; Cruz y Deras, 2001).

### **2.3 Composición química general del mamey**

El zapote mamey tiene un alto contenido de vitaminas y minerales (el calcio y el potasio) (**Cuadro 1**) (Alia *et al.*, 2007). La coloración de la pulpa de zapote mamey se debe a los carotenoides los cuales aumentan durante la maduración con valores iniciales de 28.9 y valores finales de 69.6 mg g<sup>-1</sup> (Alia *et al.*, 2002). Yahia *et al.* (2011) identificaron los componentes de los carotenoides por medio de análisis LC-ESI-MS encontrando a la luteína, β- caroteno y β-cryptoxantina como los principales. Durante la maduración el zapote mamey presentó un aumento entre 82.7-87 a 158-267 mg g<sup>-1</sup> de azúcares totales en madurez fisiológica y de consumo respectivamente (Alia *et al.*, 2005a; Martínez *et al.*, 2008) que disminuye al llegar a la senescencia, presentando el máximo contenido de azúcares en la madurez de consumo (Alia *et al.*, 2000, 2002; Ramos *et al.*, 2009).

## 2.4 Índice de madurez

El índice de madurez es difícil de definir ya que el fruto muestra muy pocos cambios en su apariencia externa cuando ya ha madurado (Díaz *et al.*, 2000). El contenido de sólidos solubles y el color de la pulpa son buenos índices de madurez. Sin embargo, muchos productores consideran el color de la pulpa como el índice principal (Villanueva *et al.*, 1998). Este índice de madurez es subjetivo, pero es el que se usa comercialmente para identificar madurez fisiológica y no se ha consolidado un índice mejor (Martínez *et al.*, 2008).

**Cuadro 1.-**Composición química del zapote mamey (kg).

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Agua	550-730 g	<b>Aminoácidos</b>	
Contenido Energético	5066-5610 kJ kg <sup>-1</sup>	Triptofano	0.19-0.33 g
Proteína	1.2-21.2 g	Metionina	0.12-0.16 g
Grasas	0.90-6.0 g	Treonina	0.90-0.96 g
Fibra	12.1-32.0 g	Isoluecina	0.58 g
Carbohidratos	311.0 g	Fenilalanina	0.46 g
Cenizas	8.9-13.2 g	Tirosina	0.53 g
<b>Vitaminas</b>		Valina	0.55 g
Ácido Ascórbico	0.22 g	Valina	0.42 g
Vitamina A (Carotenoides)	1150 I.U.	Arginina	1.15 g
Tiamina	0.0001-0.00025 g	Acido Aspártico	5.32 g
Riboflamina	0.00006-0.00046 g	Acido Glutámico	2.16 g
Niacina	0.0157-0.0258 g	Glicina	0.57 g
<b>Minerales</b>		Prolina	0.57 g
Calcio	0.4 g	Serina	2.27 g
Fosforo	0.28-0.30 g		
Hierro	0.0052-0.0262 g		
Sodio	0.06-0.10 g		
Potasio	2.26 g		
Magnesio	0.28-1.21 g		

Fuente: (Alia *et al.*, 2007).

## **2.5 Calidad de los frutos de zapote mamey**

La calidad de los frutos depende de varios factores, entre los cuales destacan el momento adecuado para su cosecha y las condiciones óptimas de temperatura para su maduración y manejo postcosecha (Saucedo, 1999). La mayoría de los cambios fisicoquímicos que ocurren en las frutas cosechadas están relacionados con el metabolismo oxidante, incluso la respiración. Debido al alcance de ésta, la oxidación bioquímica está relacionada con los cambios de calidad.

En su madurez de consumo los frutos presentan sabor dulce, buen aroma y fácil desprendimiento de pulpa (Benavides, 2001). El número de semillas es un factor importante al seleccionar frutos para consumo en fresco dado a que se prefieren aquellos con una semilla de tamaño pequeño (Saucedo *et al.*, 2001; Domínguez *et al.*, 2010).

## **2.6 Descripción del fruto**

El fruto es una baya, con forma ovoidea o elipsoidea que posee un cáliz persistente en su base. Su tamaño varía desde 10-25 cm de longitud por 8-12 cm de ancho. Su peso va desde 227 g hasta 2.3 kg. El pericarpio es grueso y leñoso, de un color café oscuro y su superficie es algo casposa (Andrade-Rodríguez *et al.*, 2008). La pulpa de los frutos maduros es color salmón rosado, anaranjado, rojo o marrón rojizo, por lo general baja en fibra. La pulpa tiene un dulce, almendrado, sabor único. Normalmente, la fruta contiene una semilla elíptica, pero puede tener hasta cuatro. La semilla tiene un color brillante es oscura y dura, una superficie marrón con un ligero hilo marrón en la parte ventral (Azurdia, 2006; Orwa *et al.*, 2009).

## 2.7 Cosecha

El índice de cosecha es un punto crítico para preservar la calidad del fruto de zapote mamey, en ocasiones los frutos son colectados antes de madurez fisiológica y no alcanzan los niveles deseados de calidad organoléptica. Los frutos cortados antes de madurez fisiológica disminuirá su firmeza que puede ser el resultado de la acción de la enzima implicada en la modificación de la textura pero no con el fin de cambios bioquímicos (Arenas *et al.*, 2003), por lo cual su pulpa adquiere un color oscuro y no son comestibles.

El índice de cosecha utilizado actualmente, requiere de mucha experiencia. Este método, consiste en hacer un pequeño rasguño en la superficie del fruto para remover solo la epidermis. El fruto estará maduro si la capa de la pulpa expuesta tiene un color rosado- carmelitoso, naranja o rojo aunque se sugiere encontrar otro índice de madurez debido a que el color presenta mucha variabilidad (Ergun *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2008; Gaona *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2010). El fruto debe ser removido cuidadosamente. Se deben evitar golpes y arañazos que cambien su apariencia y que provocarán madurez irregular y un tiempo de almacenamiento corto (Balerdi and Crane, 2005). Por tal razón se han tomado algunas medidas que ayuden a preservar la calidad del zapote mamey dado que anteriormente con frecuencia los frutos se lanzan al suelo o directamente a las cajas, de este modo los frutos caían desde alturas superiores a los 10 m. Por lo que el fruto recibe daños por impacto, compresión y abrasión, que probablemente afecten su calidad final (Azurdia, 2006).

Actualmente la cosecha se realiza con mayor cuidado, aunque la cosecha es difícil debido a que los árboles crecen de 30-40 m de altura, para evitar que el fruto sufra daños

físicos, los cosechadores trepan a los árboles con ayuda de una cuerda larga, se cosecha con una herramienta que consiste en una garrocha con una pequeña navaja en el extremo y el fruto se colocan dentro de un recipiente, para bajarlos del árbol posteriormente se ponen una caja de madera o plástico para su transporte (Alia *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008), algunos productores las colocan en arpillas pero los frutos reciben magulladuras.

La producción de zapote mamey enfrenta problemas relacionados con la falta de capacitación respecto a las técnicas de manejo precosecha, así como las condiciones óptimas de conservación, transporte, mercadeo e industrialización (Saucedo *et al.*, 2001).

## **2.8 Firmeza**

El proceso de maduración es el resultado de las interacciones entre los factores fisiológicos y bioquímicos. Entre los cambios de maduración del zapote mamey esta la disminución de firmeza (Saucedo *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 2009). El Ablandamiento de la pulpa se correlaciona con la actividad de la enzima  $\beta$  – Galactosidase ( $\beta$ -GAL), pero no con la pectinmetilesterasa (PME) o polygalacturnase (PG) esto puede ser atribuido parcialmente a la rotura de las cadenas laterales de los residuos ricos en galactanos. Por su parte la actividad enzimática de la pectina metilesterasa (EC 3.1.1.11) y poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) aumentó entre la etapa de pre-climatérico y el pico climatérico y a continuación, la actividad de ambas enzimas se redujo drásticamente (Arenas *et al.*, 2003).

## **2.9 Almacenamiento a temperatura ambiente**

Los frutos almacenados a temperatura ambiente alcanzan su madurez de consumo entre 4-7 días después de la cosecha, esto indica que tiene un corto periodo de vida postcosecha (Martínez *et al.*, 2006; Alia *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2009). Sin embargo, pueden almacenarse a temperaturas menores lo que alarga su vida útil. Son diversos los trabajos realizados para determinar cuales son las mejores condiciones de almacenamiento para los frutos. En general se acepta que nos amplia un poco la vida postcosecha del fruto de acuerdo con esto, Saucedo *et al.* (2001) afirma que frutos expuestos directamente a 25 °C alcanzaron la madurez de consumo 1.2 días antes que a 20 °C.

## **2.10 Daños por frío**

Los frutos tropicales son muy sensibles a bajas temperaturas, por lo cual el fruto de zapote mamey tiene una temperatura óptima de almacenamiento entre 10 y 15 °C (Alia *et al.*, 2005, a, b). Martínez *et al.* (2006) señalan que 12 °C es la temperatura adecuada para almacenar frutos de zapote mamey. Si se almacena a temperaturas inferiores se producen daños por frío. (Díaz *et al.*, 2000; Téllez *et al.*, 2009). Los daños por frío incluyen desde alteraciones en el patrón respiratorio de los frutos, evidenciado por la presencia de dos picos atípicos de CO<sub>2</sub>, presencia de manchado de la pulpa, incapacidad de maduración, alteraciones del color característico en la pulpa, endurecimiento de los haces vasculares, ablandamiento heterogéneo y adhesión de la semilla a la pulpa del fruto (Díaz *et al.*, 2000; Alia *et al.*, 2000, 2005a).

Con el almacenamiento a bajas temperaturas (< 5°C) se incrementa la actividad de la polifenol oxidasa (PPO), y se favorece el contacto de la enzima con sus sustratos



por el desorden celular que se presenta, lo que conduce a los problemas de pardeamiento de la pulpa, característicos de este tipo de daño (Alia *et al.*, 2000).

### **2.11 Tecnologías para prolongar la vida postcosecha de frutos de zapote mamey**

La tecnología más utilizada son las bajas temperaturas en frutos de zapote mamey, la temperatura óptima de almacenamiento es a 12 °C (Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, la combinación con otras técnicas como atmósferas controladas (AC) de CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> aumenta la eficiencia de esta técnica, ya que así la actividad metabólica disminuye no sólo por reducción de la temperatura, sino también por la baja disponibilidad de CO<sub>2</sub> y elevada concentración de O<sub>2</sub>. En los frutos de zapote mamey al aplicar atmósferas controladas con 5 % de O<sub>2</sub> y 2% de CO<sub>2</sub> a 12 °C, permitió el alargamiento de la vida postcosecha de los frutos en forma tal que después de 7, 14, 21 y 28 días se consiguió mantener la condición fisiológica en estado preclimatérico (Martínez *et al.*, 2008).

El 1-metilciclopropeno (1-MCP) es otra alternativa para prolongar la vida postcosecha de diversos productos hortofrutícolas ya que bloquea el receptor de etileno, impidiendo que las reacciones ligadas a este biorregulador se lleven a cabo. Por otra parte Téllez *et al.* (2009) indicaron que en frutos almacenados por 7 d a 10 ±1 °C, en dosis de 600 y 900 nL L<sup>-1</sup> 1-MCP retraso la maduración a 23 ± 2 °C en 3 y 6 d, con respecto a los frutos testigo, sin afectar las características de calidad del mamey. La aplicación de 1-MCP en combinación con recubrimiento de cera de carnauba extiende la vida postcosecha (Ergun *et al.*, 2005).

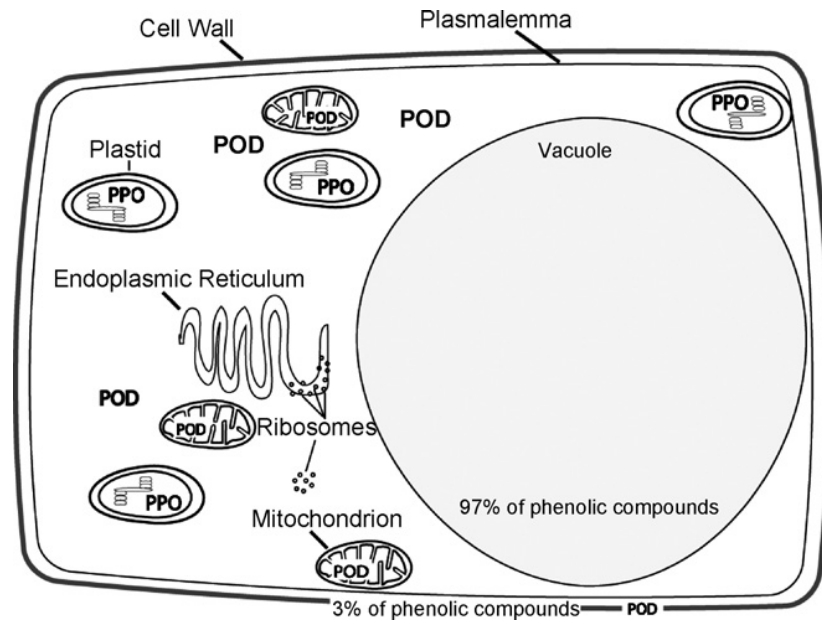
En contraparte el etileno acelera el metabolismo de los frutos de zapote mamey en una concentración de  $50 \mu\text{L L}^{-1}$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  acelera la maduración en 1.2 d con respecto a los frutos testigos y favorece un mayor contenido de azúcares (Saucedo *et al.*, 2001).

En una reciente investigación se aplicó ethrel en concentraciones de 0, 100, 300 y  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de etileno a dos tiempos de almacenamiento de 12 y 24 h, acelerando la maduración de los frutos en 4.9 y 6.2 d y presentaron una maduración más heterogénea, comparado con el testigo 7.2 d (Álvarez *et al.*, 2011).

### **2.12 Enzimas del fruto de zapote mamey**

Muchas frutas poseen un sistema enzimático, como la polifenol oxidasa (EC. 1.14.18.1; PPO) y peroxidasa (EC. 1.11.1.7; POD), que catalizan la oxidación de los fenoles propios de la célula, abundantes en las vacuolas, que generan quinonas. Estos compuestos además de originar colores oscuros, reducen la calidad y conducen a la muerte del fruto (Apel y Hirt, 2004; Balois-Morales *et al.*, 2007). La PPO es una enzima soluble en el citosol y ligada a las membranas, por lo que al evolucionar la maduración o senescencia el cambia de permeabilidad de membranas, podría favorecer la interacción de esta enzima con los compuestos fenólicos que se localizan en las vacuolas, y por tanto su oxidación (**Figura 1**).

En frutos de zapote negro la enzima PPO incrementa su actividad significativamente durante la maduración, coincidiendo con la disminución de la concentración de fenólicos totales; esto sugiere que los compuestos son utilizados como



**Figura 1.** Localización externa e interior de compuestos fenólicos y enzimas que oxidan a los compuestos fenolicos (polifenol oxidasa y peroxidasa) en una célula típica vegetal. Adaptación (Toivonen y Brummell, 2008).

sustrato por dicha enzima para formar quinonas y la actividad disminuye cuando las concentraciones del sustrato fueron bajas, contribuyendo así, al típico color negro-café de la pulpa del zapote negro (Arellano *et al.*, 2005).

En los frutos de zapote mamey durante el proceso de maduración la actividad de la polifenol oxidasa (POF), peroxidasa (POD), catalasa (CAT) y superoxidoso dismutasa (SOD) incrementaron su actividad de 23.8 a 53.1, 383 a 2104, 11.4 a 21 y de 6.7 a 28.5 U g<sup>-1</sup> respectivamente (Alia *et al.*, 2005b). La actividad de la enzima PPO y POD tienen el mismo comportamiento a aumentar en la investigación de Arellano *et al.* (2005), lo cual nos hace suponer que el oscurecimiento que se presenta en la madurez de consumo o senescencia y se debe a la presencia de estas enzimas, lo cual disminuye la calidad.

Palma *et al.* (2011) realizaron un aislamiento y caracterización de la enzima PPO donde encontraron dos isoenzimas, la PPO1 y PPO 2. La primera es relativamente

inestable ya que su actividad se perdió después de 15 días a 4°C y la segunda no se caracterizó debido a que su actividad se pierde después de 24 horas. La PPO1 mostró propiedades bioquímicas y fisicoquímicas diferentes de otras frutas. Sus inhibidores son el ácido ascórbico y el meta sulfito de sodio y tuvo mayor afinidad por el pirogalol, seguida por la catequina, con un pH óptimo de 7 y una estabilidad térmica de 35 °C.

En relación a los compuestos fenólicos y las enzimas PPO y POD en frutos de zapote mamey se podría deducir la siguiente explicación, Valencia (1995) señala que algunos taninos son de naturaleza glicosídica, probablemente la mayoría lo son. Cuando se hidrolizan dan fenoles polihídricos simples como el ácido gálico, del que se obtiene pirogalol o bien ácido protocatecuico, que a su vez producen catecol para dar lugar a taninos condensables o catequinas. Ma *et al.* (2004) en su investigación en frutos de zapote mamey encontraron en mayor concentración a la dihydromirecetina seguida por (+)- galocatequina, ácido gálico, y catequina -3-*O*-galato en frutos en madurez de consumo. Torres *et al.* (2011), encontró en mayor proporción a la catequina seguida por catequina-3-*O*-galato, epicatequina y ácido gálico. Esto parece indicar que el pirogalol puede ser el mejor sustrato de la PPO1 del mamey según la investigación de Palma *et al.* (2011), pero en el fruto cuando llega a su estado de madurez comercial los fenólicos que están en mayor concentración son de manera general las catequinas responsables del oscurecimiento enzimático (Walker, 1995; Todaro *et al.*, 2010).

### 2.13 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son considerados como metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante el desarrollo normal y en respuesta a condiciones de estrés tales como infecciones, heridas o ante una radiación ultravioleta excesiva, entre otros (Naczka *et al.*, 2004).

De manera general, pueden dividirse en solubles e insolubles. Los fenoles insolubles se encuentran en las paredes celulares, mientras que los fenoles solubles están en las vacuolas. En el tejido externo de las plantas se encuentran niveles de fenoles superiores que los que se encuentran en su interior. Los fenoles de la pared celular como lignanos y ácidos hidroxicinámicos están vinculados a los diversos componentes de la célula. Estos compuestos contribuyen a la resistencia mecánica de las paredes celulares y juegan un papel importante en el crecimiento de las plantas y la morfogénesis, en respuesta a estrés y patógenos (Naczka *et al.*, 2004).

Los fenoles es un grupo muy amplio de compuestos (mas de 8 000). Químicamente, los fenoles son sustancias que poseen uno o más sustituyentes hidroxilo (OH), unidos a un anillo aromático, incluyendo grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, entre otros (Tsimidou, 1998; Vermerris, 2006). La clasificación de los compuestos fenólicos es compleja. Se dividen en clases de acuerdo a su estructura química básica (tipo y número de anillos fenólicos), y en subclases en función de los sustituyentes presentes en la estructura básica, su asociación con carbohidratos y las formas polimerizadas (**Cuadro2**) (Farah y Marino, 2006).

**Cuadro 2.** Clasificación de compuestos fenólicos.

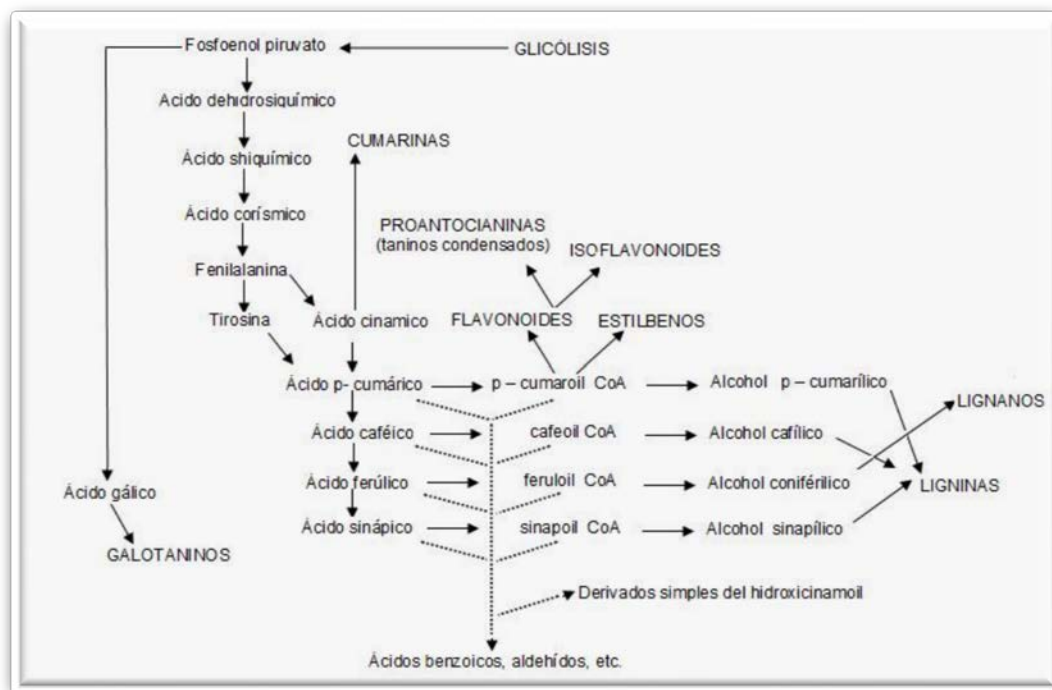
<b>Clase/ subclase</b>	<b>Ejemplos</b>
Ácidos fenólicos	
• Ácidos benzóicos	<i>p</i> -Hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico, siringico, gálico.
• Hidroxicinámicos	Cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico.
Estilbenos	Resveratrol, piceatannol.
Lignanós	Secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, pinoresinol
Flavonoides	
• Chalcona	Buteina, floretina ,okanina.
• Flavonoles	Quercetina, caempferol, , mirecetina
• Flavonas flavones	Apigenina, luteolina
• Flavanonas	Naringenina, hesperetina.
• Flavanoles	Catequinas, galocatequinas, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina galato
• Antocianidinas	Pelargonidina, cianidina, malvidina pelargonidina, epigenidina.
• Proantocianidinas	Trímeros de procianidina, prodelfinidinas, Catequina, Polímeros de epicatequina
Taninos hidrolizables	Pentagaloiil glucosa

Fuente: King ,1999; Shahidi y Naczk, 1995; Farah y Marino, 2006.

### 2.13.1 Síntesis de los compuestos fenólicos

La ruta del ácido siquímico se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenol piruvato, originario de la glucólisis. Tras diversas modificaciones, se obtiene el ácido siquímico, del que derivan directamente algunos fenoles. La vía del ácido siquimico con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenol piruvato, da lugar a la fenilalanina. La fenilalanina forma parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que elimina un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido *r*-cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA), la CoA-ligasa,

transforma el ácido *p*-cumárico en *p*-cumaroil CoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal (**Figura 2**) (Quiñones *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Biosíntesis de compuestos fenólicos. **Fuente:** Fennema, 2000; Salisbury y Ross, 1994.

### 2.13.2 Ácidos fenólicos

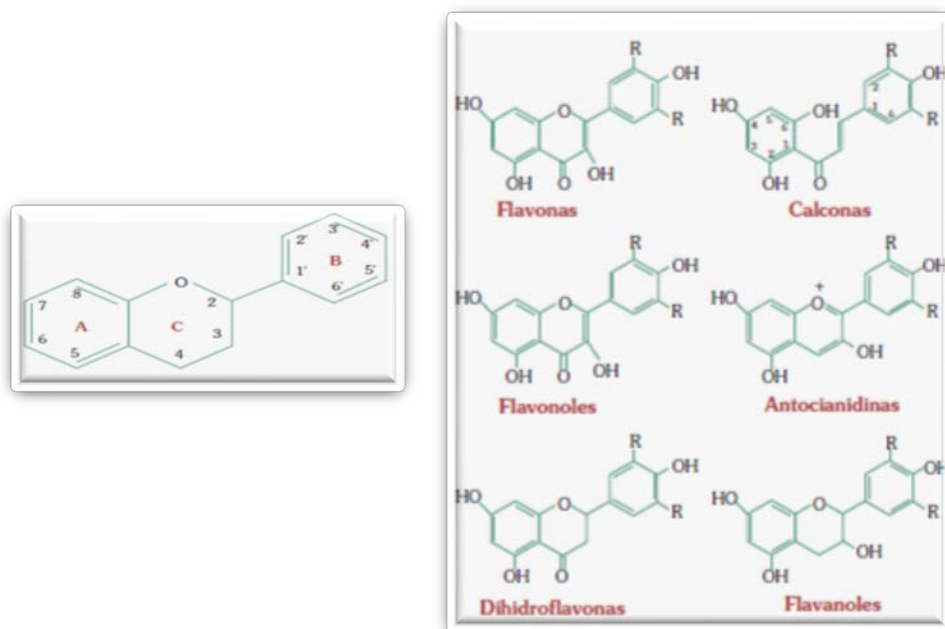
Los ácidos fenólicos incluyen los derivados del ácido cinámico y benzoico. Los ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico son el ácido gálico y el ácido hidroxicinámico. Los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico son los ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico y sinápico que por regla general se hallan presentes en forma de derivados. Los ácidos fenólicos se originan en la ruta del ácido shiquímico, que comienza con la condensación del fosfoenol piruvato y la eritrosa 4-fosfato (Fennema, 2000). Los derivados del ácido cinámico se generan durante la metilación y hidroxilación de ácido cinámico. Los derivados del ácido benzoico

pueden ser generados de ácido shiquímico o *p*- cumárico (King *et al.*, 1999; Taiz y Zeiger, 2002; Amarowicz *et al.*, 2009).

### 2.13.3 Flavonoides

Entre los polifenoles, los flavonoides constituyen el grupo más importante e incluye a más de 5,000 compuestos bien identificados. Son sustancias de bajo peso molecular que poseen una estructura de 3 anillos, dos de los cuales son aromáticos (anillos A y B) y el tercero un heterociclo oxigenado central (anillo C) (**Figura 3**).

Estructuralmente, los flavonoides se caracterizan por poseer un esqueleto C6-C3-C6. (Rivas y García, 2002).



**Figura 3.** Esqueleto estructural de los flavonoides. Fuente: Rivas y García (2002).



### **2.13.3.1 Flavonoles**

Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3 (Quiñones, 2012).

Los flavonoles se encuentran repartidos abundantemente en todos los alimentos de origen vegetal, el pericarpio u hollejos de las frutas son particularmente ricas en estos compuestos. Los más conocidos son la quercetina, kaempferol y miricetina, y se presentan generalmente en forma de glicósidos. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en plantas superiores, aunque los flavonoles son predominantes en las frutas (Rivas y García, 2002).

### **2.13.3.2. Flavanoles**

Los flavanoles presentan estructuras derivadas de tres esqueletos básicos: flavan-3-ol, flavan-4-ol y flavan-3,4-diol, con diversos sustituyentes hidroxilo en su anillo B. En la naturaleza se pueden encontrar como monómeros o condensados entre sí, formando compuestos con diverso grado de polimerización (Baoshan and Spranger, 2005).

Los flavanoles que tienen sustituida la posición 4 son capaces de transformarse en antocianidinas por tratamiento en medio ácido mineral, por lo que se denominan también proantocianidinas. Se distingue entre proantocianidinas monómeras (o leucoantocianos), que poseen estructuras de tipo flavan-4-ol o flavan-3,4-diol, y proantocianidinas condensadas (o taninos condensados) (Rivas y García, 2002).

Los más conocidos son la catequina, epicatequina, epigallocatequina, galocatequinas. Se ha descrito que los flavanoles poseen una serie de actividades

biológicas como: antioxidantes, analgésica, captadora de radicales, antiinflamatoria y broncodilatadora, así como un potencial efecto sobre la salud cardiovascular, mediante la mejora de la fragilidad capilar (Cunningham *et al.*, 2005).

Las catequinas presentes en el té verde, son las que tienen mejores propiedades quimioprotectoras. Estos polifenoles, entre otras funciones, actúan como detoxificadores de ROS inducido por radiación UV-A, UV-B y UV-C26. La aplicación del polifenol de la epigallocatequina galato (EGCG), antes de la exposición a la radiación UV-A, ha mostrado significativa disminución de las quemaduras celulares y de la infiltración leucocitaria en la dermis aunque sin efectos en la administración pos-exposición (Valenzuela y Espinoza, 2012).

### **2.13.3.3 Proantocianidinas**

Las proantocianidinas (PAs) son compuestos polifenólicos derivados de flavanos, producidos en el metabolismo secundario de las plantas. De acuerdo al número de unidades flavanol elementales que entran a formar parte de su estructura, se suele distinguir entre proantocianidinas oligómeras y polímeras (Rivas y García, 2002; Baoshan and Spranger, 2005; Valenzuela y Espinoza, 2012). Las PAs oligoméricas pueden considerarse desde dímeros hasta heptámeros ( $n=2 \rightarrow 5$ ), en tanto que cadenas más largas ( $n=6 \rightarrow \infty$ ) se consideran como poliméricas (Hummer y Scheirer, 2008).

Las proantocianidinas o taninos condensados, son responsables en gran parte de la astringencia y la polimerización de los taninos aumenta con la madurez (Harbertson *et al.*, 2002).

Las proantocianidinas constituidas exclusivamente por epicatequina y catequina se denominan procianidinas. Según el tipo de unión entre los monómeros, se distinguen las proantocianidinas de tipo A y de tipo B. En las moléculas tipo B, las unidades de flavan-3-ol están unidas mediante un enlace carbono-carbono (C-C) entre el C4 de una unidad y el C6 o C8 de la otra unidad, siendo más abundantes las uniones C4-C8. Las proantocianidinas tipo A, por su parte, además de este enlace interflavánico C-C, presentan al menos un enlace tipo éter entre las dos unidades, generalmente entre el C2 de una unidad y el C7 de la otra unidad (Rivas y García, 2002; Baoshan and Spranger, 2005; Xie y Dixon, 2005).

Las proantocianidinas tipo B se encuentran en muchas especies vegetales, sin embargo, son escasas las fuentes naturales encontradas hasta ahora de proantocianidinas tipo A (arándano americano, cacahuete, aguacate, ciruela, canela y algunos otros). Las proantocianidinas tipo A son las que presentan la capacidad de inhibición de la adhesión bacteriana en el tracto urinario con la consecuente reducción del riesgo de infecciones urinarias. Las protoantocianidinas tipo B no han demostrado poseer actividad anti-adhesión en los modelos experimentales (Rivas y García, 2002).

Los métodos de cuantificación de PAs más comúnmente usados son: HCl/butanol, vainillina y DMACA (4-dimetilamino-cinamaldehído). Cada uno de ellos tiene sus respectivas ventajas y desventajas. En el caso del HCl/butanol, se considera como específico para taninos condensables. Sin embargo tiene el inconveniente de que si las PAs de la muestra son de alto grado de polimerización se producen más procianidinas que dímeros, por lo que para obtener resultados confiables se hace necesario purificar los taninos de la propia muestra, labor que resulta complicada. El de la vainillina tiene el inconveniente de que la presencia de antocianinas interfiere con la determinación,

además de que se favorece la reacción con los grupos terminales más que con los grupos flavan 3-ols y rinde valores de absorbancia mayores para procianidinas que para monómeros. El uso de catequina como estándar en lugar de PAs purificadas conduce a una sobre-estimación de los valores (Hummer y Scheirer, 2008).

El DMAC es más apropiado para analizar muestras de arándano americano debido a las reducidas interferencias de antocianinas y ácido ascórbico. Todo ello, puede conducir tanto a una sobre estimación como a una subestimación del contenido de PAs y hace que los resultados obtenidos en los diferentes métodos no sean comparables. (Cunningham *et al.*, 2005; Nohales y Nohales, 2010). Otros métodos más sofisticados como HPLC-MS, espectrofotometría de masas (Nohales y Nohales, 2010; Cunningham *et al.*, 2004).

#### **2.14. Compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey**

Los mayoría de los compuestos fenólicos han realizado su cuantificación por el método Folin-Ciocalteu donde diversos autores indican que la concentración de los compuestos fenólicos durante la maduración tiende a disminuir, y se ha relacionado con la reducción de la astringencia del fruto, por lo cual podría atribuirse a la presencia de taninos condensables (Alia *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2009).

Los fenólicos identificados en HPLC en *Pouteria sapota* son ácidos fenólicos, flavanoles y algunos glicósidos de flavonoles. De Los ácidos fenólicos que han sido identificados son: gálico, p-hidroxibenzoico, siríngico y p-coumárico (Maet *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2001; Yahia *et al.*, 2011).

En frutos inmaduros, Ma *et al.* (2004) reportaron la presencia de catequina, epicatequina, galocatequina y catequin 3-galato, de los cuales el más abundante fue

galocatequina ( $172.85 \pm 2.21$  ppm). Por su parte, Torres-Rodríguez *et al.* (2011) informaron los mismos flavanoles, pero con predominancia de catequina en frutos maduros ( $100.3 \pm 10.4$  ppm). Dentro de los flavonoles, se ha cuantificado dihidromiricetina ( $207.77 \pm 11.73$  ppm) y miricetin ramnósido ( $25.48 \pm 3.7$  ppm) (Ma *et al.*, 2004). Mediante la técnica de cromatografía en capa fina, Alia-Tejacal *et al.* (2005b) reportaron la presencia de un glucósido de quercetina como el principal flavonol en frutos maduros de sapote mamey.

Con respecto a PA's Torres *et al.* (2011) mencionan que el fruto inmaduro tiene una sensación de astringencia al masticar, pero ese fenómeno disminuye al madurar. No existe previamente ningún estudio sobre la cuantificación de taninos condensables, los cuales se encargan de dar esa sensación de astringencia en frutos inmaduros de zapote mamey.

### III. LITERATURA CITADA

- Alia-Tejacal, I., Saucedo-Veloz, C., Martínez-Damián, M.T., Y Colinas-León, M. T. 2000. Temperaturas de almacenamiento y maduración en frutos de mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H. E. Moore & Stearn). Rev. Chapingo Serie Hort. 6, 73–78.
- Alia-Tejacal, I., Colinas-León, M.T. Martínez-Damián, M.T. Y Soto-Hernández, R.M. 2002. Factores bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey. (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). Durante postcosecha. Revista Chapingo serie Horticultura 8(2):263-281.
- Alia-Tejacal, I., Colinas, M.T.L., Martínez, M.T.D., Hernández, R.M.S. 2005a. Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn). I. Comportamiento de volátiles, firmeza y azúcares totales. Rev. Fitotecnia Méx. 28, 17–24.
- Alia-Tejacal, I., Colinas-León, M.T. Martínez-Damián, M.T. Y Soto-Hernández. 2005b. Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn).II cambios en fenoles totales y actividad enzimática. Rev. Fitotec. Méx. Vol. 28 (1) pp. 25-32.
- Alia-Tejacal, I., Soto-Hernández, R.M., Colinas-León, M.T. Y Martínez-Damián, M.T., 2005c. Análisis preliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey. (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore&Stearn). Rev. Chapingo Serie Hort. 11, 225–231.

- Alia-Tejacal I., Villanueva-Arce R., Pelayo-Zaldívar C., Colinas-León M.T., López-Martínez V., Y Bautista-Baños S. 2007. Postharvest physiology and technology of zapote mamey fruit (*Pouteria sapota (Jacq.) H. E. Moore & Stearn*). *Postharvest Biology and Technology*. 45 (2007), pp. 285–297.
- Arenas O, M.L, Evangelista L. S, Arana E. R, Jiménez A. A.R y Dávila O. A. 2003. Softening and biochemical changes of zapote fruit (*Pouteria sapota (Jacq.) H. E. Moore & Stearn*) at different development and ripening stages. *J. Food biochemistry*. 27, pp. 91-107.
- Álvarez V, J. E.; Chávez F. S. H; Tejacal, I. A.; Nieto A. D.; Hernández, A; Valle G. S. 2011. Maduración de frutos de zapote mamey con Etefón. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 12 ( 1), pp.28-34.
- Andrade–Rodríguez, M., Rodríguez–Rojas, T.J., Y Alia-Tejacal, T. 2008. El zapote mamey en México: Avances de Investigación. Capítulo IV. Caracterización morfológica y molecular del zapote mamey (*Pouteria sapota (Jacq.) H.E. Moore & Stearn*). Méx. Pp 41-56.
- Amanrowics, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G. and Piskula, M. K. 2009. Influence of postharvest processing storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Mol. Nutr. Food Res*. 53, S151-S183.
- Arellano G. L. A., Saucedo V. C. y Arévalo G. L. 2005. Cambios bioquímicos y fisiológicos durante la maduración de frutos de zapote negro (*Diospyros digyna Jacq*). *Agrociencia*, 39 (002), pp 173-181.
- Arenas O, M.L, Evangelista L. S, Arana E. R, Jiménez A. A.R, Dávila O. A. 2003. Softening and biochemical changes of zapote fruit (*Pouteria sapota (Jacq.) H. E. Moore & Stearn*) at different development and ripening stages. *J. Food biochemistry*. 27, pp. 91-1007
- Ariza-Flores, R.; Yahia Kazuz, E. M.; Vázquez-García, E.; Barrios-Ayala, A.; Garrido-Ramírez, E. R.; Michel-Aceves, A. C.; Otero-Sánchez, M. A.; Alia -Tejacal, I.

2009. Control de *anastrepha serpentina* (wiedemann) y calidad de los frutos de Zapote mamey (*Pouteria sapota (jacq) moore & stearn*) tratados con aire Caliente forzado. Revista Chapingo. Serie horticultura, 15(1), pp. 9-15.
- Azurdía, C. 2006. Tres especies de zapote mamey en América tropical (*Pouteria campechiana*, *P. sapota* y *P. viridis*) Southampton centre for Underutilised Crops, Universidad de Southampton, UK. 1-216p.
- Balerdi C, F. Y Crane J, H. 2005. El mamey zapote en Florida. UF- 30 University of Florida, p. 10.
- Balois-Morales, R.; Colinas-León, M. T.; Peña-Valdivia, C. B.; Chávez-Franco, S. H.; Alia-Tejacal, I. 2007. Sistema de estrés oxidativo, fenoles-polifenol oxidasaperoxidasa, de frutos de pitahaya (*Hylocereus undatus*) almacenados con frío revista chapingo. Serie horticultura, 13 (2), pp. 115-120.
- Baoshan, S. and Spranger, M. 2005. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. Ciência Téc. Vitiv. 20 (2), 59-89.
- Bautista-Baños, S., Díaz-Pérez, J.C. and Barrera-Necha, L. L. 2002. Postharvest fungal rots of zapote mamey (*Pouteria sapota (Jacq.)H. E. Moore and Stearn*).Postharvest Biology and Technology. 44, pp. 197-200.
- Bayuelo, J. J.S. y Ochoa, I. 2007. Caracterización morfológica de zapote mamey (*Pouteria sapota (Jacq.) H. E. Moore and Stearn*) del centro occidente de Michoacán, México. Rev. Fitotecnia Mexicana 29 (001), pp. 9-17.
- Benavides, G. A. 2001. Estudio de frutales nativos de Sapotaceas en Nicaragua: zapote (*Pouteria sapota Jacquin*), níspero (*Manilkara zapota L.*) y caimito (*Chrysophyllum cainito L.*). Rev. LA CALERA, 1 (1).
- Calan C. N; Tello C. J; Escamilla S. J; Vargas V. L; Tamayo C. J. 2010. La polifenoloxidasas en el gel de sábila (*Aloe vera mill*) revista iberoamericana de tecnología postcosecha, 11(2), diciembre, pp. 221-227.



- Campbell, R.J., Zill, G., Mahdeem, H., 1997. New mamey zapote cultivars from tropical america. Proc. Interamer. Soc. Tropical Hort. 41, pp. 219–222.
- Cruz E. y Deras H. 2001. Colecta de frutos tropicales en el salvador. Agronomía mesoamericana. 11 (002), pp. 97-100.
- Cunningham D. G., Vannozzi S.A., Turk R., Roderick R., O'S-Hea E., Brilliant K. 2005. Cranberry phytochemicals and their health benefits. Rev. Fitoteraphya. 5 (1), pp 5-16.
- Díaz-Pérez, J. C., Bautista, S., Villanueva, R. 2000. Quality changes in sapota mamey fruit during ripening and storage. Postharvest. Biol. Technol. 18, pp. 67–73.
- Díaz-Pérez, J.C., Mejia, A., Bautista, S., Zavaleta, R., Villanueva, R., López, G. R. 2001. Response of zapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn] fruit to hot water treatments. Postharvest Biology and Technology 22, pp 159–167.
- Domínguez, B; Martínez-Morales, A. y Alia-Tejacal, I. Caracterización de la maduración en ecotipos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 11(2), pp. 122-129.
- Donadio, L. and Durigan, J. (1995) Evaluation of new fruit species in Sao Paulo, Brazil. Proceeding of the Interamerican. Society for Tropical Horticulture 39, pp 162-165.
- Ergun, M., Sargent, S. A., Fox, A.J. and Crane, J. A. And Huber, D.J. 2005. Ripening and quality responses of mamey zapote fruit to postharvest wax and 1-methylcyclopropene treatments. Postharv. Biol. Technology. 36, pp. 127–134.
- Farah, A. And Marino, C. D. 2006. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology. 18 (1):23-26.
- Fennema, O.R., 2000. Química de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España, pp 1258.

- Galván D. M y T. R. Nuñez. 1994. Selección de materiales sobresalientes de zapote mamey (*Calocarpum sapota*). Interamerican Society for Tropical horticulturae XL Reunión anual. Programa y Memoria de Resúmenes. Campeche, México. 155 p.
- Gaona-García, A., Alía-Tejacal, I., López-Martínez V., Andrade-Rodríguez., Colinas-León, M.T., Villegas-Torres, O. 2008. Caracterización de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en el sureste del estado de Morelos. Revista Chapingo Serie Horticultura 14(1), pp. 41-47.
- Genkinger J.M., Platz E.A., Hoffman S.C., Comstock G.W. and Helzlsouer K.J. 2004. American Journal of Epidemiology 160:1223–1233.
- Gómez-Jaimes, R; Nieto-Ángel, D; Téliz-Ortiz, D; Mora-Aguilera, A; Martínez-Damián, M. T; Vargas-Hernández, M. 2009. Calidad e incidencia de hongos en frutos refrigerados de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) Agro ciencia, 43(1), pp. 37-48.
- Hummer, H., P, Schreier.(2008). Analysis of proanthocyanidins. Mol. Nutrit. Food Research, 52:1381-1398.
- Hartbertson, J. F., J. A: Kennedy Y D. Adams. 2002. Tanins in skin and seed of Cabernet Sauvignon, Syrah and Pinot noir berries during ripening. American Journal of Enology and Viticulture 53 (1): 54 - 59.
- Hernández, M. M., Martínez, M. A. Alía, T. I. Hernández, H. L. U., Osorio, O. R., Colinas, L. M.T., López, M. V., Bautista, B. S. y Valle, G. S. 2008. Estrés por impacto en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) durante el manejo postcosecha. Revista Fitotecnia Mexicana, 31(3), pp 61-66.
- Hrazdina, G., Wagner, G.J., 1985. Compartmentation of plant phenolic compounds: Sites of synthesis and accumulation. Annu. Proc. Phytochem. Soc.Eur. 25, pp. 133–199.

- King, A. Y Young, G.1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.J. of the American dietetic association. (99) 2; pp. 213-218.
- Ledesma M. A. 2011. Estimadores de fotosíntesis en selecciones. [*Pouteria sapota* (Jacq.)H.E. Moore & Stearn].Tesis de Maestría. Colegio de posgraduados. Posgrado de recursos genéticos y productividad frutícola. Montecillos Edo. De México.
- Liu R.H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. The American Journal of Clinical Nutrition 78(suppl):517S–520S.
- Ma, J.,Yang, H., Basile, J.M., Kennelly, J.E. 2004. Analysis of polyphenolic antioxidants from fruit of three: *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 52, 5873–5878.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition 79:727–747.
- Marangoni, A.G., Palma, T., Stanley, D.W., 1996. Membrane effects in postharvest physiology. Postharvest Biol. Technol. 7, 193–217.
- Martínez M. A., Alia T. I., y Colinas L. Ma.T. 2006. Refrigeración de frutos de zapote mamey [*Pouteria sapota* (jacq.) H. E. Moore & Stearn] cosechados en diferentes fechas en tabasco, México.Rev.Fitotec. Mex. 29 (2): 51 – 57.
- Martínez M. A., Alia T. I., Valle G. A., Colinas L. Ma. T., López M. V., Bautista B. S., Andrade R. M., Villegas T. O. y Guillen S. D. 2008. Comportamiento de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en atmósferas con bajo O<sub>2</sub> y moderado CO<sub>2</sub>. Rev. Fitotec. Mex. 31 (3), pp. 53 – 59,
- Morton, J. F.1987. Friut of Word climates. Creative Resources Systems, Inc. N.C. USA.SOS. pp. 398-402.

- Naczki M, Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. of Chromatography A* 1054: 95-111.
- Nava Y. and Ricker, M. 2004. Mamey sapote [*Pouteria sapota (Jacq.) H.E. Moore & Stearn*], a mexican forest fruit of high commercial value. *Forest products, livelihoods and conservation. - Latin America* 3. pp. 43- 61.
- Nohales A. F. y Nohales C. M. 2010. Arándano americano (*Vaccinium Macrocarpon*): conclusiones de la Investigación y de la evidencia clínica. *Revista de Fitoterapia*; 10 (1), pp. 5-21.
- Orwa, C; Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Anthony, S. 2009. *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0*. World Agroforestry Centre, Kenya, pp 2-5.
- Palma-Orozco, G., Ortiz-Moreno, A, Dorantes-Alvarez. L., Sampedro J.G., Najera, H. 2011. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*), *Phytochemistry*. 72, pp. 82–88.
- Prior, R., Gu, L. 2005. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* 66, pp. 2264-2280.
- Quiñones M., Miguel M. y Aleixandre A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 27(1), pp. 76-89.
- Ramírez, A. 2007, Respuesta del injerto en el mamey colorado (*Pouteria sapota Jacq*) al uso del Biobras-16. *Comunicación corta. Cultivos Tropicales*, 28 (1), p. 37-39.
- Ramos-Ramírez, F.X., Alia-Tejacal, I., López-Martínez, V., Colinas-León, M. T., Acosta-Duran, C.M., Tapia-Delgado, A. Y Villegas-Torres, O. 2009. Almacenamiento de frutos de zapote mamey [*Pouteria sapota (Jacq.) H. E. Moore & Stearn*] en atmosfera modificada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1), pp.17-23.

- Risco, E; Miguélez, C; Sánchez De B., Eduardo Y Rouseaud A. 2010. Efecto del arándano americano (Cysticlean®), sobre la adherencia de *Escherichia Coli* A células epiteliales de vejiga. Estudio in vitro y ex vivo. Archivos Españoles de Urología 63 (6), pp. 422-430.
- Rivas G. J. Y García A. M. 2002. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. ALIM. NUTRI. SALUD Vol. 9, N.º 2, pp. 31-38.
- SAGARPA, 2007. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. México. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>. Consultado Septiembre 2012.
- Salisbury, B. F. Y Ross, W.C. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana. México. pp. 764.
- Sandoval M. E., Nieto A. E., Irán A. T., López M. V., Colinas L. Ma. T., Martínez M. A., Acosta D. C.M., Andrade R. M., Villegas T. O., Guillen S. D. 2006. Crecimiento del fruto de zapote mamey Zapote [*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn], en Morelos, México. Revista Fitotecnia Mexicana. 29(2). Pp. 59-62.
- Saucedo V.C. 1999. Fisiología de la maduración y problemas de oscurecimiento interno en frutos de mamey (*Pouteria sapota*). Requerimientos de tratamientos cuarentenarios en frutas tropicales y subtropicales. CYTED – CONACYT. Proy. XI. 10. Ed. Dr. Crescenciano Saucedo Veloz y DR. Reginaldo Báez Sañudo.
- Saucedo-Veloz, C., Martínez-Morales, A., Chávez-Franco, S. H. Y Soto-Hernández, R.M. 2001. Maduración de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). Rev. Fitotec. Méx. Vol 24 (2) pp. 231-234.
- Sauri, E., Tamayo, E., Díaz, J., García, K., Vargas, L., González, S. y Centurion, A. 2007. Calidad y vida útil de dos cultivares de mamey (*Pouteria sapota*) cosechados en Yucatán, México. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones.

- Shahidi, F. and Naczk, M. 1995. Foods phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application. Tecnnomic, Publishing CO. INC ed. Lancaster, Pennsylvania, USA, pp. 331.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. Plant physiology. Tercera Ed. Chapter 13 pp. 283-308.
- Téllez, P. P., Saucedo, V. C., Arévalo, G.M.L., Valle, G.S. 2009. Ripening of mamey fruits (*Pouteria sapota jacq.*) treated with 1-methylcyclopropene and refrigerated storage | [Maduración de frutos de mamey (*Pouteria sapota jacq.*) tratados con 1-metilciclopropeno y refrigeración]. Ciencia y Tecnología Alimentaria 7 (1), pp. 45-51.
- Toivonen, P.M.A. and Stan, S., 2004. The effect of washing on physicochemical changes in packaged, sliced green peppers. Int. J. Food Sci. Technol. 39, 43–51.
- Toral-Jarquín, J.O. 1988. El cultivo de mamey (*Calocarpum sapota*). Escuela Nacional de Fruticultura. Xalapa, Veracruz. México. 40 p.
- Torres-Rodríguez, A., Salinas-Moreno, Y., Valle-Guadarrama, S., and Alía-Tejagal, I. 2011. Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest. Food Research International 44, pp. 1956–1961.
- Uberos J., Narbona-López, E., Tortosa-Pinto P., Ruiz-López, A., Segura- Carretero, A., Muñoz-Hoyos. A. 2012. Efecto de una formulación de cranberry pediátrica sobre la adherencia de *E. coli*. Bol. SPAO; 6 (1). 6-14.
- Valencia, O. C. 1995. Fundamentos de fotoquímica. Primera edición. Ed. Trillas. México, D. F. pp. 124-125.
- Valencia M.E., Robles-Sardín A.E. 2005. El valor nutrimental y protector de las frutas y verduras y la dieta humana. In: Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados (Edited by G.A. González-Aguilar, A.A. Gardea A.A. & F. Cuamea-Navarro). México: Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Pp. 1-14.

- Valenzuela L. K. y Espinoza P. M. 2012. Estrés oxidativo, carcinogénesis cutánea por radiación solar y quimioprotección con polifenoles. Article impress. Piel (b arc).201 2; xx (xx), pp.xxx – xxx.
- Vallejo-Pérez, M. R.; Nieto-Ángel, D.; Martínez-Damián, M. T.; Mora-Aguilera, J. A.; Téliz-Ortiz, D.; Nava-Díaz, C. El riego y fertilización en la calidad postcosecha del zapote mamey [*Pouterian sapota (Jacq.) H. E. Moore & Stearn*].Revista Chapingo. Serie horticultura, 15 (1), pp. 91-96.
- Vásquez-López, A; Mora-Aguilera, J. A; Cárdenas-Soriano, E; Téliz-Ortiz, D. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota (jacq.) h. e. Moore y Stearn*) en el estado de guerrero, México. Agrociencia, 43(7). 717-728.
- Vázquez-Florea., Álvarez-Parrilla E, López-Díaz J.A.,Wall-Medrano A. Y., De La Rosa L. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. Tecno ciencia. VI (2) 84-93.
- Villanueva, A.R., Lozano, S.E., Ocampo, M.L.A., Pérez, J.C.D., Bautista-Baños, S., 1998. Índices de cosecha del mamey (*Pouteria sapota*) cultivado en Coatlán del Río, Morelos. Primer Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. ACTAS, Hermosillo, Son, México.
- Villanueva-Arce, R., Evangelista-Lozano, S., Arenas-Ocampo, M.L., Díaz- Pérez, J.C., Bautista-Baños, S., 2000. Cambios bioquímicos y físicos durante el desarrollo y postcosecha del mamey (*Pouteria sapota (Jacq.) H. E. Moore & Stearn*).Rev. Chapingo Serie Horticultura 6, 63–72.
- Xie, D. Y. and. Dixon, R. A. 2005.Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? Phytochemistry 66, pp. 2127–2144.
- Yahia, E. M., Gutiérrez-Orozco, F. and Arvizu, De L. C. 2011. Phytochemical and antioxidant characterization of mamey (*Pouteria sapota Jacq.H.E. Moore & Stearn*) fruit. Food Research International. 44, pp. 2175–2181.

## CAPÍTULO I. COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN FRUTOS DE ZAPOTE MAMEY (*Pouteria sapota*) CON DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ

### CHAPTER I. PHENOLICS COMPOUND AND ENZYMATIC ACTIVITY IN FRUIT OF MAMEY SAPOTE (*Pouteria sapota*) WITH DIFFERENT STATES OF MATURITY

Torres-Rodríguez, A; Valle-Guadarrama, S; Salinas-Moreno, Y. y Alia-Tejagal,

#### Resumen

El zapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn] tiene un alto potencial en el mercado de frutas frescas, su principal problema al alcanzar su madurez de consumo es el oscurecimiento enzimático, esto afecta en la apariencia y sabor demeritando la calidad del fruto frente al consumidor por lo cual es necesario aplicar tecnologías postcosecha en el transporte y comercialización. Debido a lo anterior el objetivo de este estudio fue caracterizar el grado de madurez en frutos de zapote mamey provenientes de Chiapas, con base en el contenido de fenoles solubles totales (FST), Actividad enzimática de las enzimas Polifenol oxidasa (PPO) y Peroxidasa (POD), en combinación de las variables fisiológicas (Tasa de respiración (TR)), biofísicas (Firmeza de la pulpa (FP), sólidos solubles totales (SST), Color). La FP disminuye durante el proceso de maduración. La TR mostró un comportamiento climatérico por lo que a los 23 días tuvo su máximo pico. Los SST se incrementaron, el color, expresado en función del ángulo Hue mostró alta variabilidad en el proceso de maduración. Los FST disminuyeron al llegar a madurez comercial con valores de 2012.6 mg de MF. en contraparte la actividad enzimática de las enzimas PPO y POD aumento al llegar a madurez de consumo con valores de 182.28 y 6288 UI.

**Palabras Clave:** Firmeza, Fenoles solubles Totales, ángulo Hue, PPO y POD.

#### Abstract

The mamey sapote [*P. sapota* (Jacq.) E. Moore & Stearn] has a high potential in the fresh fruit market, its main problem consumer reach maturity is enzymatic darkening, this affects the appearance and taste decreasing fruit quality to the consumer so it is necessary to apply postharvest technologies in transport and marketing. Due to the above, the aim of this study was to characterize the degree of maturity in mamey sapote fruit from Chiapas, based on the total soluble phenolic content (FST), enzymatic activity of polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD), in combination of physiological variables (respiration rate (TR)), biophysical (pulp firmness (FP), total soluble solids (TSS), Color). The FP decreases during the ripening process. The TR showed a climacteric behavior so that at 23 days had its maximum peak. TSS is increased, the color, expressed in terms of Hue angle showed high variability in the maturation process. The FST decreased to reach commercial maturity values of 2012.6 mg of MF in counterpart the enzymatic activity of enzymes increase the PPO and POD ripening reach values of 182.28 and 6288 IU.

**Keywords:** Firmness, total soluble phenols, Hue angle, PPO and POD.



## I. INTRODUCCIÓN

El zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore & Stearn) es una especie tropical de la familia Sapotaceae nativo de México y América Central. Este fruto, tiene un alto potencial en el mercado de frutas frescas, por lo cual es necesario mantener su calidad por un tiempo adecuado mediante la aplicación de tecnologías postcosecha necesarias en el transporte y comercialización (Sauri *et al.*, 2007).

La maduración del fruto del zapote mamey es acompañada de reacciones enzimáticas causantes de la síntesis de azúcares y carotenoides, de los cambios de acidez, ablandamiento de tejidos y pardeamiento enzimático. Este último es causante de la pérdida de calidad en el fruto provocando pérdidas económicas importantes (Alia *et al.*, 2005b y 2007, Palma *et al.*, 2011).

Palma *et al.* (2011) mencionan que el mejor sustrato de la enzima PPO (EC. 1.14.18.1; PPO) del fruto de zapote mamey es el pirogalol, seguido por catecol. Sin embargo, Valencia (1995) señala que algunos taninos son de naturaleza glicosídica, y probablemente la mayoría los son, pues cuando se hidrolizan dan fenoles polihídricos simples como el ácido gálico, del que se obtiene pirogalol o bien ácido protocatequico, que a su vez producen catecol para dar lugar a taninos condensables o catequinas. En relación a los compuestos fenólicos, Ma *et al.* (2004) reportaron presencia de catequina, epicatequina, galocatequina y catequin-3-galato, de los cuales la más abundante fue

galocatequina (172.85 ppm). Por su parte, Torres-Rodríguez *et al.* (2011) informaron los mismos flavanoles, pero con predominancia de catequina en frutos maduros (100.3 ppm).

Esto parece indicar que el pirogalol puede ser el mejor sustrato de la PPO1 del mamey, pero cuando el fruto llega a su estado de madurez de consumo los fenólicos que están en mayor concentración general, son las catequinas responsables del oscurecimiento enzimático (Walker, 1995; Todaro *et al.*, 2010).

En frutos de zapote mamey existe información sobre el comportamiento de fenoles solubles totales pero no de las proantocianidinas (PAs) durante el proceso de maduración. Por tanto, el presente trabajo consistió en estudiar estos compuestos fenólicos que le dan esa consistencia astringente a los frutos cuando están inmaduros y su relación con las enzimas polifenol oxidasa.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Se colectaron frutos de material criollo de zapote mamey de un solo árbol en Tapachula, Chiapas. Los frutos fueron cosechados por una persona con experiencia en el corte de esta fruta, es decir, se usó el índice de cosecha de los productores, que consiste en eliminar una pequeña porción de la cáscara cerca del ápice del fruto, y cuando la pulpa muestra una coloración rosada-naranja se cosecha (Ergun *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009; Gaona *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010). Estos frutos fueron cosechados en forma manual en agosto de 2011, teniendo cuidado para no causar daño físico posible (Bayuelo *et al.*, 2006). Este índice de madurez es subjetivo, pero es el que se usa comercialmente para identificar madurez fisiológica y no se ha consolidado un índice mejor (Martínez *et al.*, 2008).

Los frutos se transportaron a la Universidad Autónoma Chapingo, donde se almacenaron a 12 °C en una cámara de refrigeración (Díaz *et al.*, 2000 y Alia *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2008), hasta alcanzar diferentes grados de maduración. En el almacenamiento, se realizaron muestreos diariamente durante 24 días, retirando tres frutos en cada momento a los cuales se les midió tasa respiratoria, color y firmeza de la pulpa.

Después de realizar estas mediciones se homogeneizó la pulpa del fruto y se congeló en nitrógeno líquido, para después almacenarlas a -20 °C hasta la determinación del contenido de sólidos solubles totales (SST, °Brix), acidez, color de pulpa, contenido de compuestos fenólicos solubles.

## 2.2 Variables de calidad del fruto

### 2.2.1 Respiración

**Tasa respiratoria.** Se midió con un método estático (Mendoza-Wilson y Báez-Sañudo, 2000); el lote se colocó en un recipiente ventilado durante una hora. Al cumplirse este tiempo se tomaron muestras del contenido gaseoso del espacio de cabeza del recipiente, las cuales se guardaron en tubos de vidrio herméticos Vacuntainer ® y sirvieron para evaluar concentración de CO<sub>2</sub>. La determinación se realizó con 0.5 mL del contenido gaseoso tomado de los tubos que se inyectó a un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 CX, EE. UU equipado con columna empacada de sílica fundida y detectores de ionización de flama y de conductividad térmica. La temperatura del horno fue de 80 °C, 150 °C en el inyector y 150 °C detector; como gas de arrastre se utilizó N<sub>2</sub>. Se registró el volumen libre del recipiente y también la masa exacta del lote sometido a valoración, para aplicar la ecuación:

$$g_{CO_2} = (y_{CO_2}^f - y_{CO_2}^i) V_L / (m t_f)$$

Y determinar la tasa respiratoria ( $g_{CO_2}$ ) en unidades de mL CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Donde ( $y_{CO_2}^f$  y  $y_{CO_2}^i$ ), son las concentraciones (fracción volumen) final (superíndice f) e inicial (superíndice i) del CO<sub>2</sub>, encontrado en el recipiente,  $V_L$  es el volumen libre (mL),  $m$  es

la masa del producto (kg);  $t_r$  es el tiempo (h) de evaluación. Dado que el recipiente se ventiló previo a la evaluación, el valor de  $y_{CO_2}^i$  se tomó como cero.

### **2.2.2 Firmeza**

Se eliminó una parte de la cáscara en la parte ecuatorial del fruto y se ejerció en ese punto la fuerza de penetración; esto se realizó en dos puntos del fruto. Esto se hizo con un texturómetro (Stable Micro Systems, modelo TA-xT2i) al cual se le adaptó un cono de prueba, con diámetro de 0.255 mm. Se usó una rutina de penetrometría con velocidad de ensayo de  $4.0 \text{ mm s}^{-1}$ , distancia de penetración de 3.0 mm y una celda de carga de 5 kg. Los valores se reportaron en newton (N).

### **2.2.3 Color**

Para medir el color de la pulpa, se eliminó una parte de la cáscara en dos secciones opuestas de la parte media del fruto. El equipo usado fue un colorímetro MiniScan XE Plus (Hunter-Lab, modelo 45/0-L), utilizando la escala Cielab. Las mediciones se realizaron registrando los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . La luminosidad se tomó como el valor de  $L^*$  y se calculó el ángulo de matiz ( $\text{Hue} = \arctan^{-1} b^*/a^*$ ) y la pureza de color o cromaticidad  $\left( C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \right)$  (McGuire, 1992).

### **2.2.5 Sólidos solubles totales (SST)**

Se midieron sólidos solubles totales ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) con un refractómetro portátil Abbe (American Optical, USA) con escala 0-32 %. Se colocó una gota del jugo de la muestra y se tomó la lectura del índice de refracción de los sólidos solubles. Los resultados se expresaron en  $^{\circ}\text{Brix}$  (Sauri *et al*, 2007).

## **2.3 Caracterización fitoquímica**

### **2.3.1 Extracción de compuestos fenólicos (proantocianidinas)**

La extracción de proantocianidinas se adaptó a la metodología de Prior *et al.* (2010). Se usó una mezcla de acetona, agua deionizada y ácido acético en proporción 75:24.5:0.5 v/v/v como solución disolvente extractora. Se pesaron 15 g de pulpa de zapote mamey y se molieron en un licuadora Hamilton Beach (modelo 50200-mx, EUA), para hacer una homogeneización de la pulpa del fruto. Para la extracción de compuestos fenólicos se pesó 1 g de pulpa de zapote mamey, colocándola en un matraz y donde se añadieron 20 mL de la solución extractora, cubriéndose con Parafilm®. Se sonicó en un equipo Branson (modelo 2510, EUA) por 30 min. Después, la mezcla se colocó en un equipo Gyrotory shaker (modelo G10, EUA) agitándose por 1 h y posteriormente se centrifugó (Universal 32, Hettich Zentrifugen, Alemania) a 2200 xg por 10 min a 20 °C. Luego, el extracto se filtró con papel Whatman Núm. 1 y se aforó con la solución extractora a 20 mL. Posteriormente se hizo la cuantificación de fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu.

### **2.3.2 Cuantificación de compuestos fenólicos Folin-Ciocalteu**

La cuantificación de fenoles solubles totales (FST) se hizo con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Para ello se tomaron 125 µL del reactivo Folin-Ciocalteu: agua (1:1) y se colocaron en tubos de ensayo. Después, se adicionó una alícuota de 100 µL del extracto de fenoles y se dejó reaccionar por seis minutos, para posteriormente neutralizar la reacción con 1250 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 19 %. Finalmente, se ajustó a un volumen final de 3 mL con agua destilada, se agitó en un

vórtex y se dejó estabilizar la muestra durante 90 minutos en oscuridad. Para el caso de los blancos, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución extractora (acetona, agua deionizada y ácido acético en una proporción 75:24.5:0.5 v/v/v) en lugar de extracto de fenoles. Se midió la absorbancia de la muestra usando un espectrofotómetro (Perkin Elmer, modelo Lambda 25, EUA) a una longitud de onda de 760 nm, de acuerdo a la cita anterior. Se preparó una curva patrón con ácido gálico para expresar la concentración de fenoles en función de este compuesto. Los resultados se reportaron en  $\text{mg kg}^{-1}$ .

### **2.3.3 Actividad enzimática**

#### **2.3.3.1 Polvo de acetona**

Se pesaron 40 g de pulpa de zapote mamey y se agregaron 50 mL de acetona fría ( $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), grado reactivo. Después, se homogeneizó en una licuadora Man (LMU 9013, México) por 1 min y el macerado se filtró al vacío. Este proceso se repitió las veces que fueran necesarias hasta que el polvo tomara un color blanco. Finalmente se dejó secar a temperatura ambiente. El peso del polvo obtenido fue determinado en función de la relación peso fresco / peso seco. El polvo se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su determinación de actividad de las enzimas polifenol oxidasa, peroxidasa y proteína (Alia *et al.*, 2005b).

#### **2.3.3.2 Enzima polifenol oxidasa (EC.1.14.18.1; PPO)**

La actividad enzimática de la PPO, se determinó a partir del polvo de acetona, y se evaluó con el método de Alia *et al.* (2005 b). La enzima se extrajo a partir de 0.2 g de polvo de acetona con 5 mL de Tris-HCl frío, 100 mM pH 7.1 que contenía 1% de polivinilpirrolidona (PVP). Se mezclaron en un homogeneizador IKA (T 25 Basic, Ultra

– Turrax ®, EUA) durante 30 s, posteriormente se centrifugó en un equipo Sorvall ® (RC – 5B, EUA) por 20 min a 10,000 xg a 4°C.

El sobrenadante se utilizó para el ensayo de la actividad enzimática, que consistió en colocar 3 mL de catecol 60 mM disuelto en un amortiguador Tris- HCl, 100 mM pH 7.1 y 0.2 de sobrenadante en una celda de cuarzo. Para los blancos se utilizó la solución Tris-HCl frío, 100 mM pH 7.1. La evaluación de cambio de absorbancia se evaluó a 420 nm en un espectrofotómetro Termo scientific (Genesy 10-5, USA). Los ensayos se llevaron a cabo a 20 °C. La actividad enzimática se reportó como U g<sup>-1</sup> de peso fresco, donde la unidad enzimática es igual a la formación de 1 μmol de *o*- benzoquinona min<sup>-1</sup> (Alia *et al.*, 2005b).

### **2.3.3.3 Enzima peroxidasa (EC. 1.11.1.7; POD)**

La extracción de la peroxidasa (POD) se hizo de la misma manera que la PPO. La cuantificación se hizo de acuerdo con el método de Alia *et al.* (2005b). La reacción consistió en mezclar 2.6 mL del amortiguador Tris- HCl, 100 mM pH 7.1, 0.25 mL de guayacol 0.1 M, 0.1 mL de peróxido de hidrógeno 0.25 % y 0.05 mL de sobrenadante en una celda de cuarzo. Para los blancos se utilizó la solución Tris-HCl frío, 100 mM pH 7.1. Se determinó el cambio de absorbancia a 470 nm en 3 min en un espectrofotómetro Termo scientific (Genesy 10-5, USA). La actividad enzimática se reportó como U g<sup>-1</sup> de peso fresco, donde la unidad enzimática es igual a la formación de 1 μmol de tretaguayacol min<sup>-1</sup>.



## **2.5 Análisis de datos**

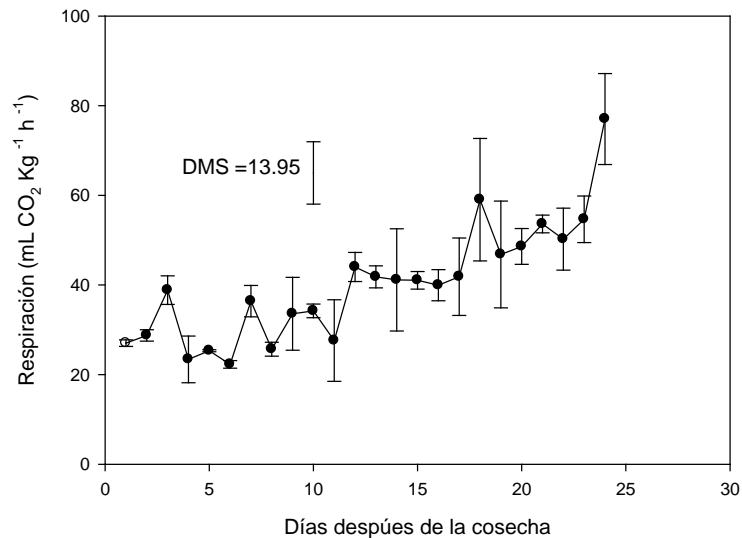
A lo largo de la maduración de los frutos se formaron 24 grupos de tres frutos con características semejantes de firmeza. Cada grupo se consideró un tratamiento y la unidad experimental fue referida a un fruto. De esta forma, se tuvieron tres repeticiones. Los datos se analizaron como un diseño completamente al azar; se aplicó un análisis de varianza y cuando se detectó que había al menos un tratamiento distinto al resto se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se utilizó como apoyo el programa SAS (SAS Institute, 2002).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Variables fisiológicas

##### 3.1.1 Respiración

Los frutos de zapote mamey almacenados a  $12 \pm 1^\circ\text{C}$  mostraron un aumento continuo en la producción de  $\text{CO}_2$ , durante todo el almacenamiento (**Figura 4**) Esta reconocido que este fruto es climatérico (Alia *et al.*, 2005b).



**Figura 4.** Velocidad de respiración durante el proceso de maduración en frutos de zapote mamey almacenados a  $12^\circ\text{C}$ . La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

Sin embargo, en el presente trabajo no se observó la presencia de un punto climatérico y el posterior descenso respiratorio, la cual pudo ser originada por un efecto significativo de la baja temperatura empleada

En frutos de zapote mamey almacenados a 10, 12, 15, 20 y 30 °C por 8 y posterior maduración a 20 y 25°C en el caso de 15 °C, tuvieron su máximo punto climatérico con 92.8, 90-114.2, 110.0, 104.2-116.5 y 219.0-365.0 mL kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> respectivamente (Alia *et al.*, 2000, 2002; Díaz *et al.*, 2000; Villanueva *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2006, 2008).

Además de la temperatura de almacenamiento existen otros factores que afectan a la tasa de respiración como son de la región donde fueron cultivados, la fecha en que se cosechan, la aplicación de películas comestibles o plásticas y daños por impacto en el fruto (Ergun *et al.*, 2005).

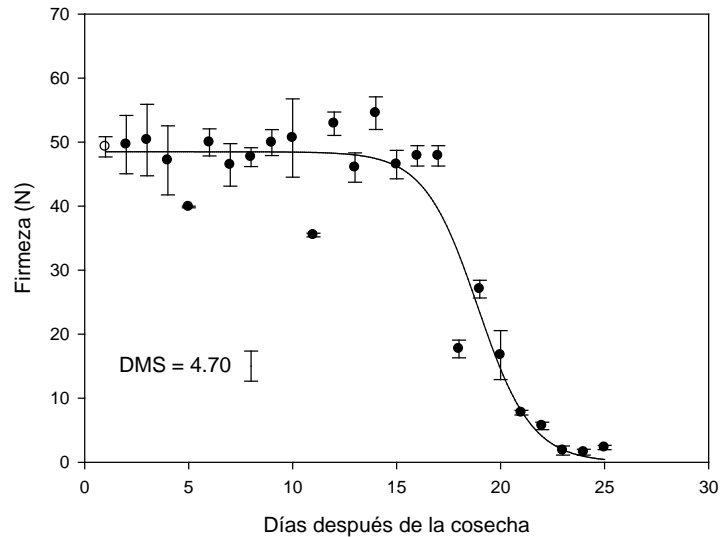
## **3.2 Variables biofísicas**

### **3.2.1 Firmeza**

La firmeza de los frutos de zapote mamey, al inicio de la cosecha (preclimaterio) presentó valores promedio de 50 (± 1.57) N y 18 días más tarde la firmeza disminuyó a 30 N para encontrar su madurez de consumo a los 21 días (climaterio) con una firmeza de 5 – 1 (± 0.52) N (**Figura 5**).

Arenas *et al.* (2003) indicaron que la reducción de la firmeza en este fruto ocurre entre el ascenso climatérico y el preclimatérico. En el presente trabajo haber almacenado los frutos a 12 °C no detuvo el proceso de maduración, simplemente la prolongó a 24 días, sin causar desórdenes fisiológicos como daños por frío, que consisten en manchado de la pulpa, incapacidad de maduración, alteraciones del color característico en la pulpa,

endurecimiento de los haces vasculares, ablandamiento heterogéneo y adhesión de la semilla a la pulpa del fruto (Martínez *et al.*, 2006; Sauri *et al.*, 2007; Téllez *et al.*, 2009).

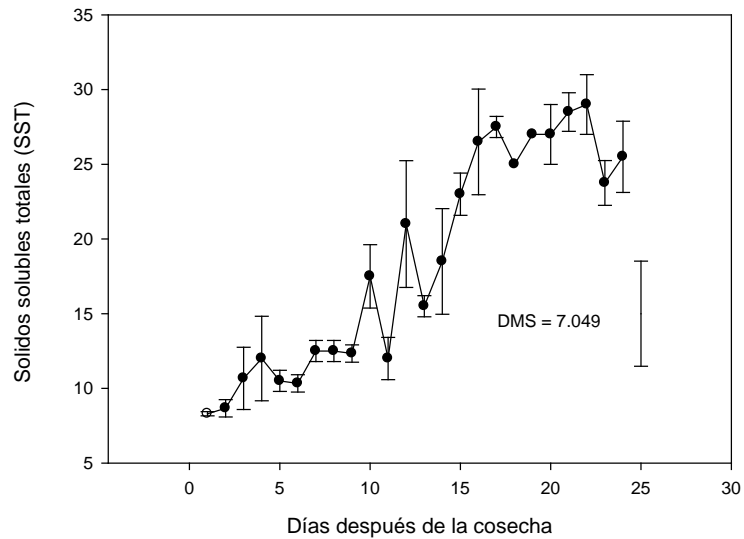


**Figura 5.** Firmeza durante el proceso de maduración en pulpa frutos de zapote mamey almacenados a 12. La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$

Díaz *et al.* (2000) y Alía *et al.* (2005a) indican que los frutos de zapote mamey presentan valores de 50 N en madurez fisiológica y de 1 a 4 N en madurez de consumo, lo cual concuerda con lo encontrado en la presente investigación. Existen otras condiciones que aceleran la disminución de la firmeza como la fertilización, aunque ésta también favorece la calidad del fruto (Vallejo *et al.*, 2009).

### 3.2.2 Sólidos solubles totales (SST)

Los sólidos solubles totales presentaron un aumento de 8.3 ( $\pm 4.6$ ) a 24.6 ( $\pm 2.8$ ) durante el proceso de maduración, se incrementaron hasta tres veces desde madurez fisiológica a madurez de consumo (**Figura 6**).



**Figura 6.** Sólidos solubles totales durante el proceso de maduración en frutos de zapote mamey almacenados a 12 °C. La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$

Este comportamiento coincide con lo reportado por las investigaciones de Sauri *et al.* (2007), Ramos *et al.* (2009), Martínez *et al.* (2008) y Díaz *et al.* (2000).

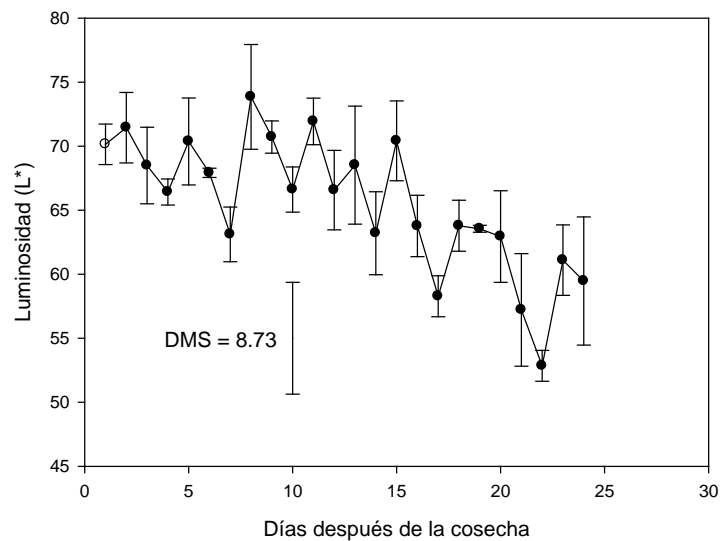
Gaona *et al.* (2008) reportaron datos entre 9-12 % a 30-35% en madurez fisiológica y de consumo respectivamente. Sin embargo, los valores pueden variar dependiendo de la región del estudio Gaona *et al.* (2008) y Ramos *et al.* (2009) reportaron valores de 36.8 y 19.8 ° Brix, ambos en madurez de consumo en frutos de zapote mamey de la misma región.

En los primeros días después de la cosecha el jugo de los frutos tuvo una apariencia lechosa y opaca mientras que en los últimos días del muestreo su apariencia cambio a cristalina de color ligeramente rojizo, en el primer caso podría deberse a la presencia de látex cuando el fruto está en su madurez fisiológica (Nava y Ricker, 2004; Villanueva *et al.*, 2000).

### 3.2.3 Color

#### 3.2.3.1 Luminosidad

Existe una tendencia a disminuir en los valores de  $L^*$ , debido a un oscurecimiento gradual de la pulpa que se presenta de manera normal durante el proceso de maduración. En la presente investigación se obtuvieron valores de  $70 (\pm 1.58)$  a  $52 (\pm 6.39)$  en madurez fisiológica y de consumo, respectivamente. Estos valores fueron similares a lo reportado por Ramos *et al.* (2009), quienes indican valores de 66 y 57.5 en madurez fisiológica y de consumo, respectivamente. Sin embargo, en la **Figura 7** se puede observar la variabilidad que presentan los valores a través del proceso de maduración.



**Figura 7.** Comportamiento de luminosidad ( $L^*$ ) en la pulpa del fruto de zapote mamey durante el proceso de maduración, almacenado a  $12^\circ\text{C}$ . La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

Este comportamiento coincide con Domínguez *et al.* (2010), quienes mencionan que existe variabilidad, dado que encontraron valores de luminosidad desde 52 a 68 al inicio de la cosecha y de 32 a 60 en la madurez de consumo.

La luminosidad puede ser mayor en frutos de zapote mamey que durante su crecimiento, se les aplicó una fertilización en una dosis de 2 kg de NPK (2-2-2) (Vallejo *et al.*, 2009). No obstante, también puede ser afectada por daños por impacto durante su manejo postcosecha, por lo que se debe considerar el efecto negativo en la calidad del fruto, que se observará en su comercialización (Hernández *et al.*, 2008). El oscurecimiento de la pulpa también se asociada con altas concentraciones de fenoles en la fruta (Díaz *et al.*, 2000; Gaona *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009).

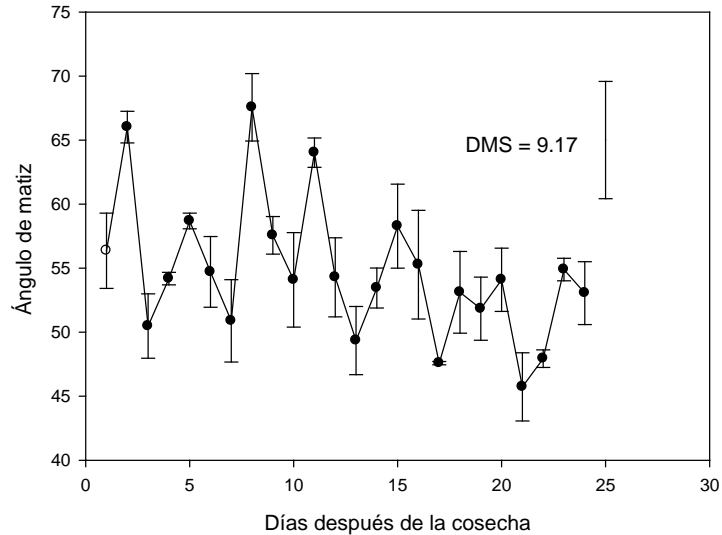
### **3.2.3.2. Angulo de matiz**

El color de la pulpa indicado por el ángulo de matiz tuvo valores de 58.42 ( $\pm$  4.13) a 55.38 ( $\pm$ 3.6) en madurez fisiológica y de consumo, respectivamente (**Figura 8**), sin embargo los valores tuvieron alta variabilidad dentro del proceso de maduración en un intervalo de 67.5 ( $\pm$ 2.63) a 45.7 (2.66) aunque existe una pequeña tendencia a disminuir los valores de ángulo de matiz.

Diversos autores indican que la tonalidad de la pulpa es un factor importante en la calidad del fruto de zapote mamey, además de ser actualmente el índice de cosecha, el cual no evita la amplia variabilidad que existe en las características de los frutos en postcosecha, pues una pequeña modificación de ese atributo de color puede corresponder a cambios grandes en otras variables como contenido de SST, contenido de azúcares y firmeza (Sauri *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2011).

Sin embargo, el color de la pulpa evolucionó desde una tonalidad rosa-salmón al momento de la cosecha, hasta rojo-anaranjado o rojo escarlata en la madurez de consumo (Saucedo *et al.*, 2001; Sauri *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2008; Gaona *et al.*,

2008). Este cambio de color se puede deber a la síntesis de carotenoides durante el proceso de maduración (Villanueva *et al.*, 2000).



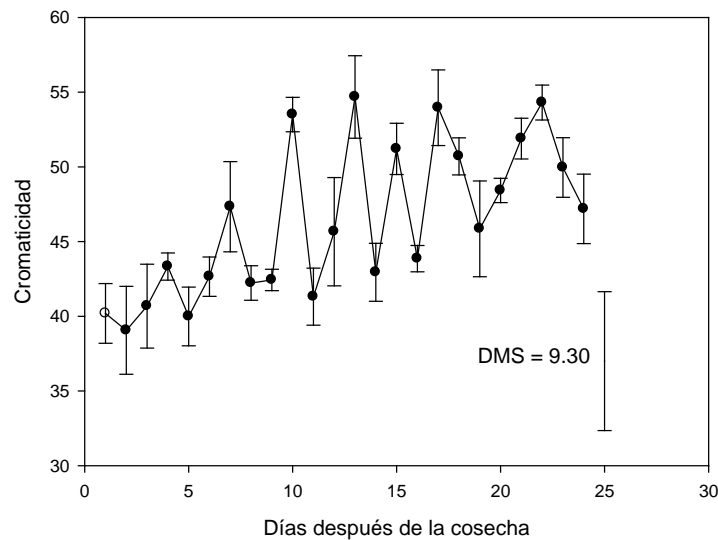
**Figura 8.** Comportamiento del Ángulo de matiz en la pulpa de frutos de zapote mamey durante el proceso de maduración, almacenados a 12 °C. La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

Los parámetros de color de la pulpa de sapote mamey pueden modificarse mediante el tipo de fertilización que se aplica al huerto (Vallejo *et al.*, 2009), pero también el color puede verse afectado por los tratamientos térmicos que se aplican en este fruto para eliminar la mosca mexicana de la fruta (*A. ludens* y *A. serpentina*). Sobre este último aspecto, Díaz *et al.* (2001) señalan que los frutos tratados térmicamente, mostraron un valor de  $L^*$  superior al de los frutos testigo. Sin embargo, afecto al ángulo de matiz debido a que los frutos presentaron un color anaranjado o amarillo y no tuvieron un color típico de un zapote mamey.



### 3.2.3.4 Cromaticidad

La pureza de color de la pulpa del fruto de zapote mamey presentó valores de 40.19 ( $\pm 1.20$ ) a 44.56 ( $\pm 4.47$ ) durante el proceso de maduración y tuvo una alta variabilidad en intervalo de 39.72 ( $\pm 2.28$ ) a 53.96 ( $\pm 2.52$ ), como valor máximo y mínimo. Sin embargo, existe una tendencia mínima a ser mayor en madurez de consumo (**Figura 9**) lo cual concuerda con lo reportado por Gaona *et al.* (2008). Con respecto a la variabilidad del valor de cromaticidad Domínguez *et al.* (2010) reportan valores entre 67 a 76 al inicio de la cosecha y de 35 a 73 en la madurez de consumo.



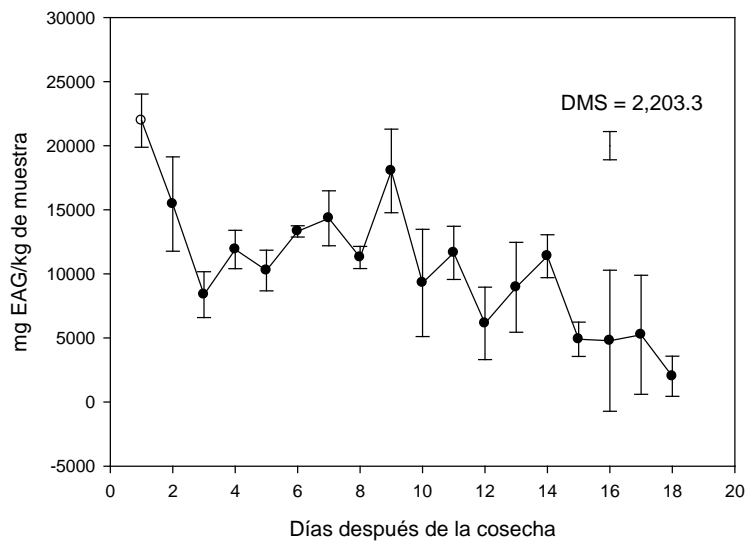
**Figura 9.** Comportamiento de cromaticidad en la pulpa de zapote mamey durante su proceso de maduración, almacenados a 12 °C. La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

Esto confirma que podemos encontrar frutos en madurez comercial con los mismos valores que un fruto en madurez fisiológica. En contraste, Ramos *et al.* (2009) afirmaron que existen poco cambios de la cromaticidad en la pulpa de zapote mamey. Por otra parte, Hernández *et al.* (2008) reportaron valores de cromaticidad y de ángulo

de matiz menores, en frutos que fueron sufrieron daños por impacto, lo que confirma que al dañarse las células del fruto se favorece el oscurecimiento de los frutos de zapote mamey.

### 3.3 Fenoles solubles totales

El contenido de fenoles solubles totales disminuyó de 19,777 ( $\pm 4046$ ) a 2,012 ( $\pm 1,566$ ) mg kg<sup>-1</sup>, en madurez fisiológica y de consumo respectivamente (**Figura 10**). Estos valores son parecidos a los reportados por Saucedo *et al.* (2001) quienes indican valores de fenoles totales 15,300 y 1,600 mg kg<sup>-1</sup> en madurez fisiológica y en madurez de consumo, en esta misma razón Mahattanatawee *et al.* (2006) reporta en madurez de consumo valores de 1,010.5 mg kg<sup>-1</sup> en madurez de consumo.



**Figura 10.** Contenido de fenoles totales solubles en frutos de zapote mamey durante su proceso de maduración, en frutos almacenados a 12 °C. La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

En contraste Alia *et al.* (2005) y Vallejo *et al.* (2009) reportan valores en un intervalo de 1653 a 790 y de 646 a 220 y 66 mg kg<sup>-1</sup> en madurez fisiológica, comercial y senescencia respectivamente. La variación entre los resultados obtenidos se puede deber a diferencias genéticas entre los materiales analizados y los métodos de cuantificación, particularmente el solvente de extracción empleado, que es de alto impacto en el contenido y tipo de fenoles que se extraen (Alia *et al.*, 2005).

Sin embargo, la concentración de los compuestos fenólicos durante la maduración tiende a disminuir, y se ha relacionado con la reducción de la astringencia del fruto, que se atribuye a la presencia de taninos condensables (Alia *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2011).

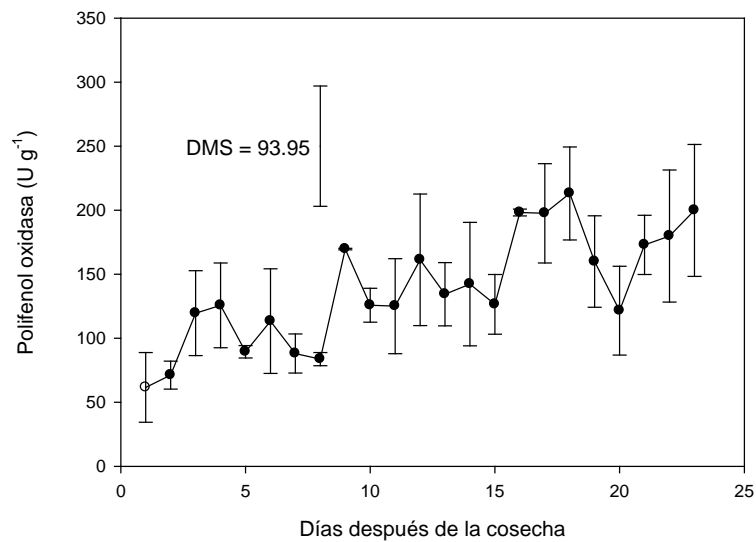
Existe una estrecha relación entre las variables luminosidad, firmeza y fenoles, es decir a mayores valores existe una mayor concentración de compuestos fenólicos y viceversa Alia *et al.* (2002). Esta relación se podría deber a un oscurecimiento gradual durante la maduración, que se atribuye a la oxidación de los compuestos de los fenoles por la enzima PPO en presencia de oxígeno (Alia *et al.*, 2005b).

### **3.4 Enzimas**

#### **3.4.1. Polifenol oxidasa (PPO)**

La actividad de la enzima PPO durante el proceso de maduración tuvo un aumento constante entre 61.6 ( $\pm 27.2$ ) a 182.2 ( $\pm 59.4$ ) en madurez de fisiológica y de consumo respectivamente (**Figura 11**). Comportamiento que es similar a lo reportado por Alia *et al.* (2005b) quienes indicaron un aumento de 23.8 a 53.1 U g<sup>-1</sup>, teniendo su máximo en madurez de consumo. El aumento de la actividad de la enzima PPO se explica como

parte del proceso de maduración, en cuyo caso ocurren pérdidas de la compartimentalización por efecto del etileno, que el mismo fruto genera en el proceso de maduración (Alia *et al.*, 2000, 2002; García *et al.*, 2006). La enzima y su sustrato (fenoles) se encuentran en diferentes compartimentos de la célula (citoplasma/plastidios y vacuola, respectivamente), y el oscurecimiento enzimático es consecuencia de la desintegración de la membrana.



**Figura 11.** Actividad de la PPO durante el proceso de maduración en frutos de zapote mamey, almacenados a 12°C. . La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

Que puede ocurrir por el mismo proceso de maduración o por algún daño mecánico (Franck *et al.*, 2007). Por esta razón, existe una relación inversa entre la actividad enzimática y luminosidad, que se relaciona con el oscurecimiento de los frutos debido a que se oxida los o- dihidroxifenoles a o-quinonas en presencia de oxígeno, las quinonas se polimerizan formando compuestos coloreados color café (Alia *et al.*, 2002;

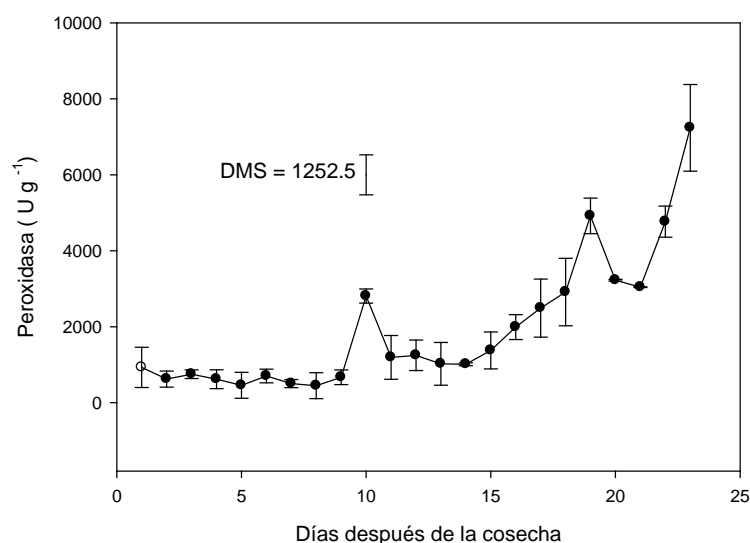
Franck *et al.*, 2007). Sin embargo, específicamente para esta investigación los valores reportados de PPO y POD en los frutos de zapote mamey no presentaron oscurecimiento enzimático, pero si existe una relación una correlación de -0.2845\*.

### 3.4.2. Peroxidasa

La actividad de la enzima peroxidasa tuvo un incremento de 633.6 ( $\pm$  183.9) U g<sup>-1</sup> en madurez fisiológica a 7,235 ( $\pm$  1,139.27) U g<sup>-1</sup> en madurez de consumo. Estos valores tienen el mismo comportamiento a disminuir a lo reportado por Alia *et al.* (2005b) quienes reportan 3,83U g<sup>-1</sup> en madurez fisiológica a 2,104 U g<sup>-1</sup> en madurez de consumo, los valores obtenidos en esta investigación son tres veces mayor que lo reportado por Alia *et al.* (2005b) y se podría inferir que se debe a la variabilidad morfológica en el zapote mamey, pero también está influenciado por otros factores como son la precipitación, prácticas de manejo, temperatura (Bayuelo y Ochoa, 2006).

En la **Figura 12** se puede observar claramente que a partir de los días 1-9 su actividad se mantiene constante y el día 10 inicia un incremento constante hasta el día 24.

El aumento en la actividad enzimática de la peroxidasa se debe a un incremento en la respiración, debido a que estas dos enzimas utilizan como sustrato peróxido de oxígeno (Alia *et al.*, 2002). En la presente investigación se encontró una correlación de 0.82807 \*\* la cuál concuerda con lo antes mencionado.



**Figura 12.** Actividad de la enzima POD durante el proceso de maduración en frutos de zapote mamey, almacenados a 12 °C. . La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

La firmeza y los fenoles presentaron una correlación positiva y altamente significativa, debido a que la firmeza es una variable que permite evaluar el proceso de maduración. Con respecto a la variable L\* y fenoles se encontró una correlación positiva y significativa confirmando que la luminosidad disminuye durante el proceso de maduración. Estos cambios pueden deberse a la degradación de las membranas celulares permitiendo estar en contacto a las enzimas PPO y POD con sus sustratos (los FST) que presentaron una correlación negativa y significativa **Cuadro 3**.

**Cuadro 3. Correlación entre los valores de FST con variables fisiológicas, físicas y químicas.**

	<b>Fir</b>	<b>Resp</b>	<b>° Brix</b>	<b>L*</b>	<b>Hue</b>	<b>Croma</b>	<b>PPO</b>	<b>POD</b>
<b>FST</b>	0.64937	-0.47045	-0.69058	0.5136	0.31154	-0.38682	-0.43852	-0.1320
	0.0001	0.0010	0.0001	0.0002	0.0350	0.0079	0.0023	0.0002

Fir: Firmeza, Resp: Respiración; L: Luminosidad; PPO: polifenol oxidasa; POD: peroxidasa.

#### **IV. CONCLUSIONES**

La maduración de la fruta mamey se asoció con el ablandamiento de la pulpa, y un aumento en el contenido de sólidos solubles, de las enzimas PPO, POD. Existió una disminución de los FST durante el proceso de maduración, y un cambio en la pulpa de color de rosa o amarillo pálido a naranja o rojo. En todas las evaluaciones se presentó alta variabilidad. La cuantificación de compuestos fenólicos y su relación con las enzimas PPO durante la maduración nos permiten observar en qué momento la calidad del fruto ya no satisface al consumidor. Sin embargo, las concentraciones reportadas de FST y las enzimas PPO y POD en madurez de consumo en los frutos de zapote mamey no presentaron oscurecimiento enzimático.

## V. LITERATURA CITADA

- Alia-Tejacal, I., Colinas-León, M.T. Martínez-Damián, M.T. y Soto-Hernández, R.M. 2002. Factores bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey. (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). Durante postcosecha. Revista Chapingo serie Horticultura 8(2):263-281.
- Alia-Tejacal, I., Colinas, M.T.L., Martínez, M.T.D., y Hernández, R.M.S. 2005a. Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and stearn). I. Comportamiento de volátiles, firmeza y azúcares totales. Rev. Fitotecnia Méx. 28, pp. 17–24.
- Alia-Tejacal, Colinas-León, Martínez-Damián y Soto-Hernández. 2005b. Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn).II cambios en fenoles totales y actividad enzimática. Rev. Fitotec. Méx. Vol. 28 (1) pp. 25-32.
- Álvarez V, J. E.; Chávez F. S. H; Tejacal, I. A.; Nieto A. D.; Hernández, A; Valle G. S. 2011. Maduración de frutos de zapote mamey con etefón. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 12, núm. 1, junio, pp.28-34.
- Arenas O, M.L, Evangelista L. S, Arana E. R, Jiménez A. A.R y Dávila O. A. 2003. Softening and biochemical changes of zapote fruit (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn) at different development and ripening stages. J. Food biochemistry. 27, pp. 91-107.
- A.O.A.C. 1998.Official methods of analysis.Asociation of Official Analytical Chemist (AOAC).Washington, D.C.USA. Chapter 37, p. 10.
- Bayuelo, J. J.S. y Ochoa, I. 2007. Caracterización morfológica de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) del centro occidente de Michoacán, México.Rev. Fitotecnia Mexicana 29 (001), pp. 9-17.



- Brandford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analit. Biochem.* 72, pp. 248-254.
- Claypool, L. L., Keefer, R. M. 1942. A colorimetric method for CO<sub>2</sub> determination in respiration studies. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 40, 177-186.
- De La Rosa, L. A., Álvarez-Parrilla, E. And Shahidi, F. 2011. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Kernels and Shells of Mexican Pecan (*Carya illinoensis*). *J. Agric. Food Chem.* 2011. 59, 152–162.
- Díaz-Pérez, J. C., Bautista, S., Villanueva, R. 2000. Quality changes in sapota mamey fruit during ripening and storage. *Postharvest. Biol. Technol.* 18, pp. 67–73.
- Díaz-Pérez, J.C., Mejía, A., Bautista, S., Zavaleta, R., Villanueva, R., López, G. R. 2001. Response of zapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn] fruit to hot water treatments. *Postharvest Biology and Technology* 22, pp 159–167.
- Domínguez B; Martínez-Morales A; Alía-Tejacal I. 2010. Caracterización de la maduración en ecotipos de zapote mamey (*Pouteria sapota*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11(2), pp. 122-129.
- Frack, C., Lammertyn, J., Tri Ho, Q., Verboven, P., Verlinden, B. and Nicolai, B. M. 2006. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 43, pp. 1-3.
- Ergun, M., Sargent, S. A., Fox, A. J., Crane, J. A. and Huber, D.J. 2005. Ripening and quality responses of mamey zapote fruit to postharvest wax and 1-methylcyclopropene treatments. *Postharv. Biol. Technology.* 36, pp. 127–134.
- Gaona-García, A., Alía-Tejacal I., López-Martínez V., Andrade-Rodríguez., Colinas-León, M.T., y Villegas-Torres, O. 2008. Caracterización de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en el sureste del estado de Morelos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(1), pp. 41-47.

- Hernández, M. M., Martínez, M. A. Alia, T. I. Hernández, H. L. U., Osorio, O. R., Colinas, L. M.T., López, M. V., Bautista, B. S. y Valle, G. S. 2008. Estrés por impacto en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) durante el manejo postcosecha. Revista Fitotecnia Mexicana, 31(3), pp 61-66.
- Mahattanatawee, K., Manthey, J. A., Luzio, G., Talcott, S. T., Goodner, K. And Baldwin, E: A.2006 Total Antioxidant Activity and Fiber Content of Select Florida-Grown Tropical Fruits.J. Agric. Food Chem. 54, pp. 7355-7363.
- Mcguire R. G. 1992.Reporting of objective color measurements. HortScience 27:1254-1255.
- Mendoza-Wilson, A.M., Báez-Salduño, R. (2000). Medición de la tasa respiratoria por sistema cerrado en melón cantaloupe. Hort. Méx. 8(2): 158-163.
- Martínez M. A., Alia T. I., Y Colinas L. Ma.T. 2006. Refrigeración de frutos de zapote mamey [*Pouteria sapota (jacq.) H. E. Moore & Stearn*] cosechados en diferentes fechas en tabasco, México. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 29 (2): 51 – 57.
- Martínez M. A., Alia T. I., Valle G. A., Colinas L. Ma.T., López M. V., Bautista B. S., Andrade R. M., Villegas T. O. Y Guillen S. D. 2008. Comportamiento de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en atmósferas con bajo O<sub>2</sub> y moderado CO<sub>2</sub>. Rev. Fitotec. Mex. 31 (3): 53 – 59.
- Mcguire R. G. 1992.Reporting of objective color measurements. HortScience 27:1254-1255.
- Mendoza-Wilson, A.M., Báez-Salduño, R. (2000). Medición de la tasa respiratoria por sistema cerrado en melón cantaloupe. Hort. Mex. 8(2): 158-163.
- Nava Y. And Ricker, M. 2004. Mamey Zapote [*Pouteria sapota (Jacq.)H.E. Moore & Stearn*], A Mexican Forest Fruit of High Commercial Value.Forest products, livelihoods and conservation. - Latin America 3. pp. 43- 61.

- Palma-Orozco, G., Ortiz-Moreno, A, Dorantes-Alvarez.L., Sampedro J.G., Najera, H. 2011. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*), *Phytochemistry*. 72, pp. 82–88.
- Prior Ronald L, Ellen Fan, Hongping Ji, Amy Howell, Christian Nio, Mark J Payne y Jess Reed. 2010. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *J Sci Food Agric*; 90: 1473–1478.
- Ramos-Ramírez, F.X., Alia-Tejacal, I., López-Martínez, V., Colinas-León, M. T., Acosta-Duran, C.M., Tapia-Delgado, A. Y Villegas-Torres, O. 2009. Almacenamiento de frutos de zapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn] en atmosfera modificada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1), pp. 17-23.
- Saucedo-Veloz, C., Martínez-Morales, A., Chávez-Franco, S. H. Y Soto-Hernández, R.M. 2001. Maduración de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq) H.E. Moore & Stearn). *Rev. Fitotec. Méx.* Vol 24 (2) pp. 231-234.
- Sauri, E., Tamayo, E., Díaz, J., García, K., Vargas, L., González, S. Y Centurion, A. 2007. Calidad y vida útil de dos cultivares de mamey (*Pouteria sapota*) cosechados en Yucatán, México. V Congreso Iberoamericano De Tecnología Postcosecha Y Agroexportaciones.
- SAS.Institute Inc. 2002.SAS/STAT® User's Guide, Version 9.0, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. J. A.(1965).Colorimetry of total phenolics with Phosphomolybdic-phophotungstic acid reagents.*American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., and Wichers, H.J. 2000.An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foods tuffs.*Phytochemical Anal.* 11, pp. 330-338.

- Sousa De Brito and Narain N. 2001. Physical and chemical characteristics of sapota fruit at different stages of maturation. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 37(49), p. 567-572.
- Sun, Baoshan., Ricardo-Da-Silva, J.M. and Spranger, I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem*; 46: 4267 – 4274.
- Ramos-Ramírez, F.X., Alia-Tejagal, I., López-Martínez, V., Colinas-León, M. T., Acosta-Duran, C.M., Tapia-Delgado, A. y Villegas-Torres, O. 2009. Almacenamiento de frutos de zapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn] en atmosfera modificada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1), pp. 17-23.
- Téllez, P. P., Saucedo, V.C., Arévalo, G.M.L., y Valle, G.S. 2009. Ripening of mamey fruits (*Pouteria sapota jacq.*) treated with 1-methylcyclopropene and refrigerated storage | [Maduración de frutos de mamey (*Pouteria sapota jacq.*) tratados con 1-metilciclopropeno y refrigeración]. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 7 (1), pp. 45-51.
- Torres-Rodríguez, A., Salinas-Moreno, Y., Valle-Guadarrama, S., and Alia-Tejagal, I. 2011. Soluble phenols and antioxidant activity in mamey zapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest. *Food Research International*. 44 (2011) 1956–1961.
- Vallejo-Pérez, M. R.; Nieto-Ángel, D.; Martínez-Damián, M. T.; Mora-Aguilera, J. A.; Téliz-Ortiz, D.; Nava-Díaz, C. El riego y fertilización en la calidad postcosecha del zapote mamey [*Pouterian sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn]. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15 (1), pp. 91-96.
- Vázquez-Florea., Álvarez-Parrilla E, López-Díaz J.A., Wall-Medrano A. Y., De La Rosa L. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecno ciencia*. VI (2) 84-93.
- Villanueva-Arce, R., Evangelista-Lozano, S., Arenas-Ocampo, M.L., Díaz- Pérez, J.C., Bautista-Baños, S., 2000. Cambios bioquímicos y físicos durante el desarrollo y

postcosecha del mamey (*Pouteria sapota (Jacq.)* H. E. Moore & Stearn). Rev. Chapingo Serie Horticultura 6, 63–72.

Wallace T. C. y Giusti M. M. 2010. Evaluation of Parameters that Affect the 4-Dimethylaminocinnamaldehyde Assay for Flavanols and Proanthocyanidins. *Journal of Food Science*. 75 (7), C619-C625.

Yahia, E. M., Gutiérrez-Orozco, F and Arvizu, De L. C. 2011. Phytochemical and antioxidant characterization of mamey (*Pouteria sapota Jacq.* H.E. Moore & Stearn) fruit. *Food Research International*. 44, pp. 2175–2181.

## CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE PROANTOCIANIDINAS EN ZAPOTE MAMEY (*Pouteria Sapota jacq.* H.E. Moore & Stearn) DURANTE SU PROCESO DE MADURACIÓN

### CHAPTER 2. ANALYSIS OF PROANTHOCYANIDINS IN MAMEY SAPOTE (*P. SAPOTA JACQ.* HE MOORE & STEARN) DURING MATURATION PROCESS

Torres-Rodríguez, A<sup>1</sup>; Valle-Guadarrama, S<sup>1</sup>; Salinas-Moreno, Y<sup>2</sup>. y Alia-Tejocal, I<sup>3</sup>

#### Resumen

El fruto de zapote mamey presenta un elevado contenido de fenoles solubles que no han sido plenamente caracterizados. Dadas las múltiples actividades biológicas reportadas para estos compuestos, el objetivo del presente trabajo fue analizar las proantocianidinas en frutos de *P. sapota* durante su proceso de maduración. Los fenoles solubles totales del fruto de sapote mamey son predominantemente proantocianidinas (PAs), cuyo contenido decrece durante el proceso de maduración. El contenido de PAs monómericas (PAsM) y oligoméricas es menor que el de las PAs poliméricas. Las PAs extractables en el fruto maduro de sapote mamey fueron de 322.4 y 124.8 mg/100 g MF mediante los métodos de Vanillina y DMAC, respectivamente. Dentro de las PAsM se presentó un compuesto de baja polaridad ( $T_r=26.2$  min) que fue identificado tentativamente como un dímero de catequina, el cual mostró un incremento creciente en su contenido durante el proceso de maduración del fruto. Los valores de PAs en sapote mamey son superiores a los informados para frutos como manzana y uva, por lo que puede considerarse como una fuente de PAs importante, con los beneficios reconocidos que el consumo de alimentos con este tipo de fenoles proporciona a la salud humana.

**Palabras clave:** *Pouteria sapota*, Fenoles solubles, taninos condensados, DMAC, Vanillina.

#### Abstract

The mamey sapote fruit has a high content of soluble phenols that have not been fully characterized. Given the multiple biological activities reported for these compounds, the objective of this study was to analyze proanthocyanidins in fruits of *P. sapota* during their maturation process. The total soluble phenols mamey sapote fruit are predominantly proanthocyanidins (PAs), whose content decreases during the process of maturation. The content of monomeric PAs (PAsM) and oligomeric is less than the PAs polymeric. The extractable APs of the ripe fruit mamey sapote were 322.4 and 124.8 mg/100 g MF Vanillin method and DMAC, respectively. Within PAsM presented a low polarity compound ( $R_t = 26.2$  min) that was tentatively identified as a dimer of catechin, which showed an increase in its content increased during the ripening process. The values Pas mamey sapote are superior to those reported for fruits such as apple and grape therefore be regarded as an important source of PAs with the recognized benefits that consumption of foods with phenols such human health provides .

**Keywords:** *P. sapota*, soluble phenols, condensed tannins, DMAC, Vanillin

## I. INTRODUCCIÓN

Las proantocianidinas (PAs) o taninos condensados son oligómeros o polímeros de polihidroxi flavan -3-ols, unidos mediante enlaces carbono-carbono entre las subunidades de flavanol (Schofield *et al.*, 2001) y carentes de color. Las unidades que las constituyen son comúnmente epi-catequinas y epi-galocatequinas y conforman las procianidinas y prodelfinidinas, respectivamente (Hellström y Mattila, 2008). Su estructura polifenólica les confiere actividad antioxidante sobresaliente, además de otras actividades biológicas de importancia en la salud humana, que se encuentran determinadas por su grado de polimerización y estructura química particular (Dixon *et al.*, 2004). En los frutos que las contienen se encuentran predominantemente en forma extractable o soluble, concentradas en las capas periféricas o en la cáscara. En manzana “Red delicious” el contenido total de PAs es de  $162 \pm 10$ , en tanto que en uva roja es de  $54 \pm 4.2$  mg/100 g de fruta fresca (Hellström y Mattila, 2008).

Las PAs se producen de manera abundante durante el crecimiento y desarrollo de los frutos, y se consideran responsables del amargor y astringencia que los caracteriza en su estado inmaduro. Durante el proceso de maduración, la astringencia se reduce considerablemente (Goldstein y Smith, 1963). Sin embargo, no en todos los frutos una reducción de su astringencia se asocia con una reducción de sus taninos, ya que no todos los taninos son astringentes.

En frutos de persimonio (*Diospyros kaki* Thunb) se ha observado que algunos mantienen la astringencia aun cuando el contenido de taninos condensados se reduce, en tanto que otros frutos, con niveles similares de taninos, no son astringentes (Ayakago *et al.*, 2009).

El fruto de *Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn o zapote mamey es un fruto tropical dulce, de baja acidez, no jugoso, de consistencia suave y ligeramente fibrosa. Posee un color naranja rojizo dado por la presencia de carotenoides (Alia-Tejagal *et al.*, 2005a; Yahia *et al.*, 2011). Se caracteriza por ser astringente cuando está inmaduro y por contener una cantidad elevada de fenoles solubles totales (FST), los cuales se reducen de manera significativa al madurar (Saucedo *et al.* 2001; Alia-Tejagal *et al.*, 2005b; Torres-Rodríguez *et al.*, 2011).

Los tipos de fenoles identificados en frutos de *P. sapota* son ácidos fenólicos, flavanoles, y algunos glicósidos de flavonoles. Los ácidos fenólicos que han sido identificados son: gálico, p-hidroxibenzoico, siríngico y p-coumárico (Ma *et al.*, 2004; Yahia *et al.*, 2011). De estos ácidos, únicamente se ha cuantificado gálico (Ma *et al.*, 2004; Torres-Rodríguez *et al.*, 2011). En frutos inmaduros, Ma *et al.* (2004) reportaron presencia de catequina, epicatequina, galocatequina y catequin -3-galato, de los cuales el más abundante fue galocatequina ( $172.85 \pm 2.21$  ppm). Por su parte, Torres-Rodríguez *et al.* (2011) informaron los mismos flavanoles, pero con predominancia de catequina en frutos maduros ( $100.3 \pm 10.4$  ppm). Dentro de los flavonoles, se ha cuantificado dihidromiricetina ( $207.77 \pm 11.73$  ppm) y miricetin ramnósido ( $25.48 \pm 3.7$  ppm) (Ma *et al.*, 2004). Mediante la técnica de cromatografía en capa fina, Alia-Tejagal *et al.* (2005b)



reportaron la presencia de un glucósido de quercetina como el principal flavonol en frutos maduros de sapote mamey.

En la mayoría de los trabajos realizados con zapote mamey, la cuantificación de los FST se ha realizado por el método de Folin-Ciocalteu. El análisis de estos FST se ha realizado parcialmente (Ma *et al.*, 2004; Yahia *et al.*, 2010; Torres-Rodríguez *et al.*, 2011) ya que únicamente se ha explorado la composición de la fracción de menor polaridad. No existen reportes publicados sobre análisis de proantocianidinas en este fruto, por tanto se desconoce si es una fuente importante de estos compuestos. Como fruto climatérico, el sapote mamey experimenta múltiples cambios en su composición química durante su maduración, y los fenólicos no están exentos de ello. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue analizar las proantocianidinas en frutos de *P. sapota* durante su proceso de maduración.

## I. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

Se obtuvieron 70 frutos de material criollo de zapote mamey de un huerto comercial en Tapachula, Chiapas. Los frutos se cosecharon manualmente en la etapa de madurez fisiológica, considerando como índice de cosecha el establecido en forma empírica en la región. Este consiste en remover una pequeña porción de la cáscara cerca del ápice del fruto, y verificar la presencia de una coloración rosada-naranja (Martínez *et al.*, 2008). Los frutos se colocaron en cajas de plástico, en las que se trasladaron por tierra hasta las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo, en Texcoco, Estado de México. Donde se colocaron en una cámara de refrigeración a  $12 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ . Según Martínez *et al.* (2008) a esta temperatura de almacenamiento se alarga la vida del fruto sin que se provoquen daños de oscurecimiento por bajas temperaturas. A intervalos de uno o tres días se tomaron tres frutos al azar a los cuales se les determinó la firmeza de su pulpa, de ese mismo fruto se tomó una muestra de la parte media que se colocó en nitrógeno líquido, la cual se utilizó posteriormente para los análisis de fenólicos.

### 2.2 Firmeza en frutos de *P. sapota*

Se eliminó una parte de la cáscara en la parte ecuatorial del fruto y se ejerció en ese punto la fuerza de penetración; esto se realizó en dos puntos del fruto. Para ello se usó un texturómetro (Stable Micro Systems, modelo TA-xT2i) al cual se le adaptó un cono de prueba, con diámetro de 0.255 mm en la base. Se usó una rutina de

penetrometría con velocidad de ensayo de  $4.0 \text{ mm s}^{-1}$ , de distancia de penetración de 3.0 mm y una celda de carga de 5 kg. Los valores se reportaron en newton (N).

### **2.3 Extracción de compuestos fenólicos (proantocianidinas)**

Una muestra de 15 g de pulpa congelada se molió en una licuadora doméstica. De la muestra molida se pesó 1 g y se depositó en un matraz Erlenmeyer; se añadieron 20 mL de disolvente formado con acetona, agua desionizada y ácido acético en una proporción 75:24.5:0.5 v/v/v (Prior *et al.*, 2010). Se sonicó en un equipo Branson (Modelo 2510, USA) por 30 min, para luego colocarse en un agitador (Gyratory shaker, modelo G10, USA) por 1 h. Para facilitar la separación del sobrenadante, la muestra se centrifugó (Universal 32, Hettich Zentrifugen, Alemania) a 2200 xg por 10 min a 20 °C. El extracto se filtró con papel Whatman Núm. 1 y se aforó con la solución extractora a 20 mL. El extracto se dividió en dos volúmenes iguales. Uno de ellos se concentró casi a sequedad a baja temperatura (40 °C) en un rota-evaporador Heidolph (modelo Laborata 4010, Alemania) y se aforó a 10 mL con agua destilada. A partir de este extracto se realizaron tres extracciones líquido-líquido con acetato de etilo. La fase orgánica recuperada en cada caso se concentró a sequedad en un rotaevaporador. El residuo se re-suspendió en 2 mL de metanol grado HPLC. El otro volumen se usó para la cuantificación de compuestos fenólicos por diferentes métodos.

### **2.4 Cuantificación de compuestos fenólicos**

#### **2.4.1 Folin-Ciocalteu**

La cuantificación se realizó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Se tomaron 125  $\mu\text{L}$  del reactivo Folín-Ciocalteu 1 N y se

colocaron en tubos de ensayo; se adicionó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del extracto de fenoles, se mezcló y dejó reaccionar por seis minutos. La reacción se neutralizó al agregar 1250  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 19 %. La muestra se ajustó a un volumen de 3 mL con agua destilada, se agitó en un vórtex y se dejó en oscuridad durante 90 minutos a temperatura de cuarto. Se preparó un blanco en iguales condiciones, pero en lugar de muestra se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución extractora de fenoles. Se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, modelo Lambda 25, USA) a una longitud de onda de 760 nm (de acuerdo a la cita anterior). Se preparó una curva patrón con ácido gálico para expresar la concentración de fenoles en función de este fenol. Los resultados se reportaron en mg equivalentes de ácido gálico/ 100 g de muestra fresca.

## **2.4.2 Proantocianidinas**

### **2.4.2.1 DMAC (4-Dimetilaminocinalmadehído)**

La cuantificación de proantocianidinas se hizo con el método colorimétrico de DMAC (Wallance y Giusti, 2010). Para la reacción de DMAC se colocaron 2,380  $\mu\text{L}$  de metanol grado HPLC en tubos de ensayo y se agregó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  del extracto de fenoles, seguida de 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de DMAC preparado de acuerdo con lo descrito por Wallance y Giusti (2010). La mezcla se agitó en vórtex y se dejó estabilizar por 25 min en oscuridad. Para los blancos se utilizó metanol grado HPLC en lugar del extracto de fenoles. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, modelo Lambda 25, USA) a 640 nm (se hace referencia a la cita anterior). Se preparó

una curva patrón con catequina solubilizada en la solución extractora. La concentración de proantocianidinas se expresó en mg equivalentes de catequina/100 g de fruta fresca.

#### **2.4.2.2 Vainillina**

Se aplicó el método propuesto por Sun *et al.* (1998). Para ello, un volumen de 2,500 µL de la solución de vainillina al 1% se colocó en tubos de ensayo y se agregaron 1,000 µL del extracto de proantocianidinas. Posteriormente se añadieron 2,500 µL de ácido clorhídrico al 8%. Los tubos se agitaron en un vórtex y se centrifugaron a 2200 xg por 10 min. La reacción se dejó estabilizar por 10 min en oscuridad. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, modelo Lambda 25, USA) a 510 nm (de acuerdo a cita antes mencionada). Se prepararon dos curvas patrón, una a partir de catequina (Sigma, MN) y la otra a partir de la proantocianidina B2 (Fluka, MN). Ambos estándares fueron solubilizados en la solución de extracción.

#### **2.4.2.3 Butanol/HCl**

Se siguió la metodología propuesta por Porter *et al.* (1986). De forma breve: un volumen de 500 µL del extracto se colocó en tubos de ensayo con rosca de baquelita. Se adicionaron 3,000 µL de la solución butanol/HCl concentrado (95:5 v/v) y 100 µL del reactivo férrico (2% sulfato férrico de amonio en HCl 2N). Se cerraron los tubos y se sometieron a tratamiento térmico en baño de agua a ebullición (92 °C) durante 60 min y se leyó la absorbancia a 550 nm (de acuerdo a la cita anterior) en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, modelo Lambda 25, USA). Para expresar el contenido de taninos en porcentaje, se preparó una curva patrón a partir de los propios taninos del fruto. Para la purificación de estos taninos se siguió la metodología de Wolfe *et al.* (2008) que consistió en tomar 10 mL del extracto de taninos y removerles parte de la acetona en un

rotaevaporador, hasta un volumen aproximado de 5 mL. Posteriormente, se realizaron dos extracciones líquido-líquido con 10 mL de hexano para remover los carotenoides del extracto. Para extraer las PAs. Posteriormente se realizaron tres extracciones líquido-líquido con dietil éter. A la fase acuosa que contenía los taninos condensados se le eliminaron los residuos de solventes orgánicos con ayuda del rotaevaporador. El extracto acuoso se aplicó a una columna de resina Sephadex LH-20, previamente activada con agua destilada. La columna se lavó repetidas veces con una mezcla de metanol:agua (1:1,v/v) y se eluyó con una mezcla de acetona:agua (7:3, v/v). Los taninos removidos de la columna se concentraron en un rotaevaporador hasta sequedad en un matraz previamente puesto a peso constante. El matraz con el residuo de taninos se colocó en estufa a 40 °C hasta peso constante. La cantidad de taninos recuperada se obtuvo por diferencia de pesos del matraz. Se elaboró una solución patrón de 900 ppm a partir de la cual se realizaron diluciones para tener cuatro puntos de curva (200, 400, 600 y 800 ppm). La concentración de taninos totales se obtuvo en porcentaje y en base seca.

## **2.5 Análisis de proantocianidinas por HPLC**

Para el análisis se utilizó un equipo PerkinElmer Series 200 con un detector de UV-DAD con arreglo de diodos, controlados por una computadora personal a través del programa TotalChrom™. La columna analítica fue una Luna C<sub>18</sub> de Phenomenex (250 x 4.6 mm). Se utilizó el método de análisis descrito por Cabrera *et al.* (2003). Las fases móviles fueron ácido acético al 0.1 % en agua (A), y metanol (B), con una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La composición de la fase móvil inició con 100 % de disolvente A por 1 min, seguido de un incremento lineal del solvente B hasta 63 % en 27 min, para volver a las condiciones iniciales en 5 min. La detección se realizó a dos longitudes de

onda, 280 y 360 nm (de acuerdo a la cita antes mencionada). Para las catequinas se utilizó 280 nm, en tanto que para los flavonoles se usó 360 nm. Las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de inyectarse al equipo. Los solventes utilizados en el equipo fueron grado HPLC. El volumen inyectado fue 10  $\mu\text{L}$  y la temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C.

Se elaboraron curvas patrón de ácido gálico, catequina, epicatequina y epigallocatequina (Sigma-Aldrich, MN) en concentraciones de 5 a 20 ppm. Todas las curvas se corrieron a 280 nm, y sus coeficientes de correlación lineal fueron  $\geq 0.997$ . La identidad de los picos del cromatograma de la muestra se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares puros y sus respectivos espectros en UV.

Para determinar si en la muestra de sapote mamey se presentan derivados de miricetina, como lo establecen Ma *et al.* (2004), o si en realidad se trata de derivados de quercetina, como lo reporta Alia-Tejacal *et al.* (2005b), se analizó la muestra con y sin hidrólisis ácida. Se utilizaron estándares de quercetina y mircitina para comprobar la presencia de estas agliconas en las muestras del extracto fenólico de zapote mamey hidrolizadas. La detección de las agliconas de flavonol se realizó a 360 nm (Castillo-Muñoz *et al.*, 2010).

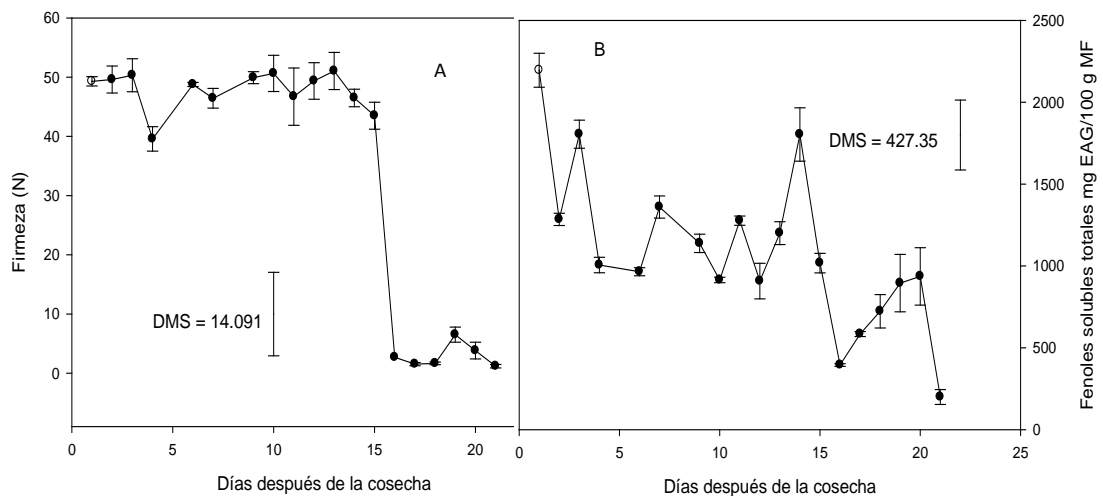
## **2.6 Análisis estadísticos**

Con los datos de contenido de fenoles y PAs obtenidos con los distintos métodos se realizaron análisis de regresión lineal simple y correlaciones de Pearson. Los datos de PAs por HPLC se analizaron bajo un modelo completamente al azar, se hizo un análisis de varianza comparaciones entre las dos etapas del proceso de maduración del fruto. En todos los casos los análisis se realizaron empleando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc. 2002).



## II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de maduración del fruto zapote mamey a la temperatura de almacenamiento de 12 °C monitoreado en función de la firmeza de su pulpa mostró dos etapas bien definidas (**Figura 13**). La primera (etapa 1) tuvo una duración de 15 días bajo las condiciones de almacenamiento usadas y se caracterizó por valores elevados de firmeza que variaron entre 39.6 y 49.3 N. En la segunda etapa, que duró sólo seis días (etapa 2), la firmeza cayó drásticamente entre el día 15 y 16, con valores entre 2.7 y 1.2 N, que es la que comúnmente presentan los frutos en madurez comercial (Alia *et al.*, 2005) (**Figura 13**).



**Figura 13.** Firmeza del fruto y contenido de fenoles solubles totales (FST) durante almacenamiento a 12°C de zapote mamey (*Pouteria sapota*). La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

El comportamiento de la firmeza en los frutos almacenados a 12 °C fue parecido al descrito por Alia *et al.* (2005b) en frutos almacenados a 15°C. La fuerte caída de la firmeza del fruto ocurrió entre las etapas fisiológicas de climaterio y posclimaterio descritas por Arenas *et al.* (2003).

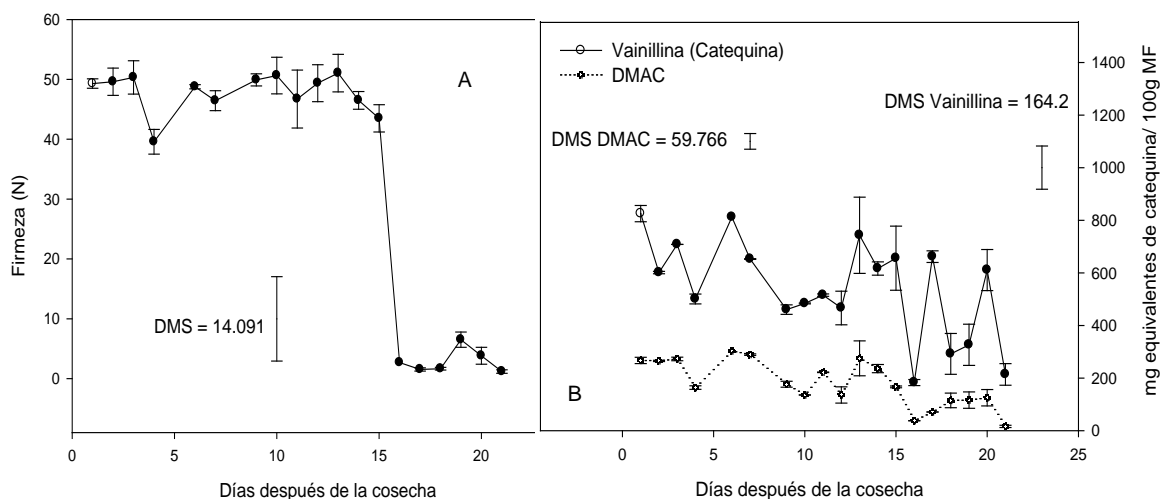
El contenido de fenoles solubles totales (FST), determinado por el método de Folin-Ciocalteu mostró valores de 2,195.5 a 1,017.6 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100 g de muestra fresca (MF), para los días 1 y 15 de almacenamiento, respectivamente (**Figura 13**). Durante este periodo la firmeza los frutos se mantuvieron sin mayores cambios. A los 16 días de almacenamiento (DA) los FST fueron de 395.3 mg EAG/ 100 g MF. Este cambio equivale a una reducción aproximada de 2.1 veces en relación al inicio del almacenamiento, dato que es inferior a lo informado por Alia-Tejacal *et al.* (2002), quienes reportan una reducción de 3.2 veces en el contenido de FST en frutos de mamey almacenados a temperatura ambiente al pasar de madurez fisiológica (MFI) a madurez comercial (MC).

En la segunda etapa del proceso de maduración los valores de FST mostraron una ligera recuperación a partir de los 16 días de almacenamiento y hasta el día 20, fecha en la cual se ubicaron en 936.5 para luego volver a caer a niveles de 199.7 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> de MF. Los valores de FST en MFI y MC obtenidos en el presente trabajo son parecidos a los informados por Saucedo *et al.* (2001), que informaron un contenido de 1.53 % en frutos en MFI y de 0.21 % en MC, pero resultan elevados con los informados por Alia-Tejacal *et al.* (2005a) que mencionan valores de 1,653 y de 646 mg EAG kg<sup>-1</sup> MF para las mismas etapas de maduración. La información publicada sobre el contenido de FST en frutos de sapote mamey varía en función del estado de madurez del fruto en que se

realiza la determinación, el origen, el tipo de fenoles monitoreados y las condiciones particulares del método de cuantificación (Saucedo *et al.*, 2001; Alia-Tejacal *et al.*, 2005a). Dentro de esto último, el disolvente empleado en la extracción parece tener un efecto importante. Se señala el uso tanto de metanol acuoso acidificado (Ma *et al.*, 2004, Torres-Rodríguez *et al.*, 2011), como de acetona acuosa acidificada (Yahia *et al.*, 2011). En cada caso el tipo de fenoles extraídos y la cantidad, difieren por efecto del disolvente.

El método de Folin-Ciocalteu no es específico para fenoles, ya que otros compuestos como azúcares reductores y aminoácidos pueden también reaccionar. El sapote mamey es un fruto dulce, con valores de entre 20 – 30 °Brix, por lo que estos azúcares podrían estar contribuyendo a los elevados valores de FST obtenidos con este método. Otro factor que pudo haber contribuido a los elevados valores de FST es el almacenamiento de los frutos a bajas temperatura (12°C), condición que favorece una mayor concentración (Alia *et al.*, 2002).

El contenido de proantocianidinas (PAs) por los métodos de vainillina y DMAC, durante el proceso de maduración de los frutos, se muestra en el **Figura 14**. Se observó el mismo patrón que el de los FST, en lo se refiere una disminución en el contenido al pasar el fruto de inmaduro a maduro, pero en este caso los valores de PAs fueron inferiores a los FST.

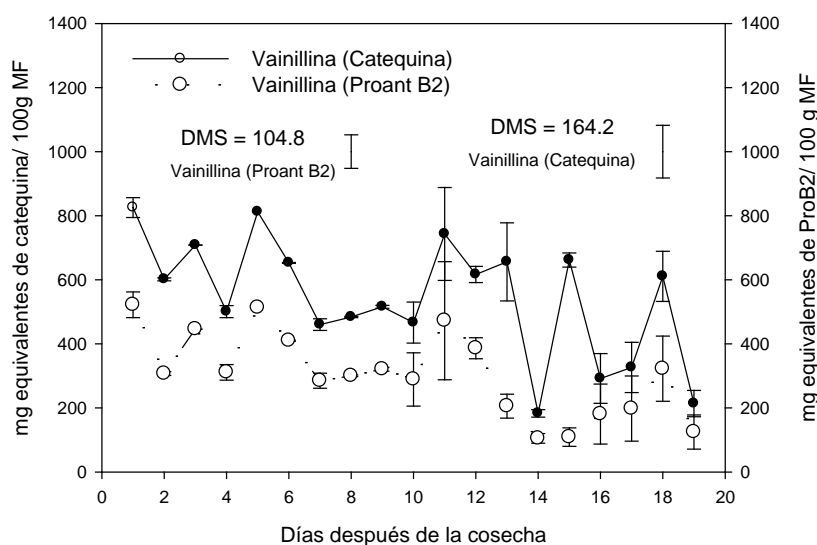


**Figura 14.** Proantocianidinas por los métodos de Vainillina y DMAC en frutos de zapote mamey durante su proceso de maduración a 12°C. La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$

De los métodos de PAs aplicados, el de vainillina presentó valores más elevados que el de DMAC, y mayor variación durante el proceso de maduración estudiado. Las diferencias en contenido pueden ser atribuidas a la afinidad de cada reactivo por determinado tipo de PAs. El de vainillina tiene mayor afinidad por PAs con grupos hidroxilo meta orientados (Hageman *et al.*, 1997) y por oligómeros, en tanto que el reactivo DMAC es más afín hacia monómeros de flavan -3-ols. Ninguno de los dos métodos es específico para taninos condensados (proantocianidinas poliméricas), ya que cualquier monómero de flavanol reacciona en el ensayo (Schofield *et al.*, 2001).

Tomando en cuenta que el método de DMAC posee mayor afinidad hacia monómeros de flavan -3-ols, podría decirse que estos compuestos se encuentran en menor proporción que las PAs oligoméricas y poliméricas, en los compuestos fenólicos del fruto de mamey.

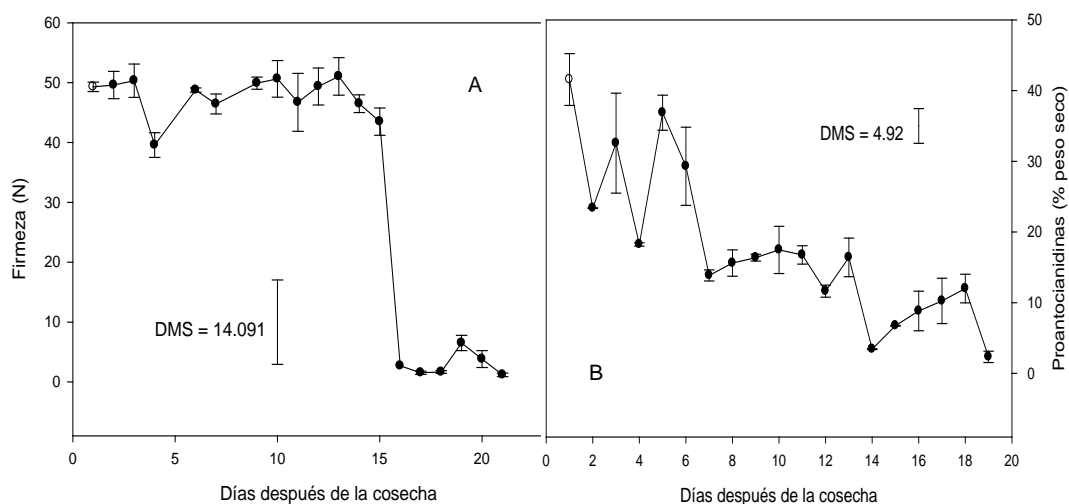
El contenido de PAs por el método de vainillina mostro un patrón similar cuando los resultados se expresaron en función tanto de catequina como de proantocianidina B2 (ProB2). Sin embargo, al emplear catequina como estándar se obtuvieron valores más elevados que cuando se utiliza ProB2 (**Figura 15**). La sobre estimación del contenido de proantocianidinas al usar catequina con el método de vainillina ha sido informado previamente por otros autores (Hummer y Schreier, 2008).



**Figura 15.** Proantocianidinas por el método de vainillina utilizando como estándares catequina y ProB2 en frutos de zapote mamey durante su maduración a 12°C. La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

El método del butanol/HCl tiene la ventaja de ser confirmativo de la presencia de taninos condensados (Schofield *et al.*, 2001), de manera que se puede decir que una fracción importante de los FST en sapote mamey son proantocianidinas (PAs) o taninos condensados. La dinámica de estos compuestos durante el proceso de maduración de los frutos de zapote mamey se muestra en la **Figura 16**. Se aprecian tres etapas; una primera entre los días 1 y 9 de almacenamiento, en la que las PAs muestran gran variabilidad. A

los 9 días se presentó una caída importante en la concentración de estos compuestos, con una ligera recuperación hacia el día 13, para volver a decrecer y presentar sus niveles más bajos a los 16 días, que coincide con una caída drástica en la firmeza del fruto, y posteriormente a los 21 días, que es cuando el fruto alcanza su madurez plena.



**Figura 16.** Dinámica de los taninos condensados en frutos de zapote mamey durante su maduración bajo temperatura de 12°C. La barra dentro de cada figura representa al valor de la DMS a una  $p \leq 0.05$ .

Estos cambios están relacionados con el metabolismo de las PAs durante el proceso de maduración de los frutos. Los enlaces interflavanil carbono – carbono de las proantocianidinas pueden ser hidrolizados bajo condiciones de acidez ligera, hacia compuestos intermediarios, que posteriormente se transforman en antocianinas (Roux, 1992) En frutos como zapote mamey, en los que no hay acumulación de antocianinas, la hidrólisis de las PAs conduce a una reducción de la astringencia de los frutos al avanzar su maduración. Los valores de PAs en la madurez comercial de los frutos son en todos los casos superiores a los reportados para manzana y uva (Hellström y Mattila, 2008).

Se presentaron correlaciones elevadas entre el método de Folin-Ciocalteu y los métodos usados para cuantificar las PAs. La mayor correlación se observó entre DMAC y Vanillina ( $r=0.9029$ ) calculados los valores con proantoB2, en tanto que las más bajas se tuvieron entre Folin-Ciocalteu y el método de la vainillina utilizando como estándar la catequina ( $r=0.6884$ ) y entre DMAC y el método del butanol ácido ( $r=0.696$ ) (**Cuadro 4**). En el caso particular de esta última correlación, se explica por la afinidad que cada método tiene por determinado tipo de PAs. DMAC tiene mayor afinidad por PAs monoméricas y oligoméricas en tanto que el del butanol ácido es específico para PAs poliméricas o taninos condensados.

**Cuadro 4.** Correlaciones de Pearson entre los valores de fenoles obtenidos con los diferentes métodos utilizados.

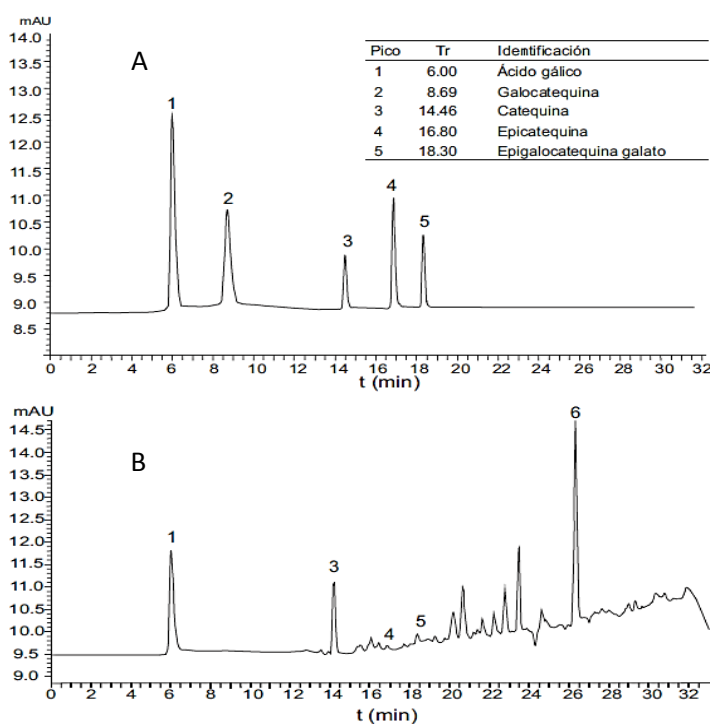
	F-C	DMAC	VAINCAT	VAINPROB2	BUT
F-C	1.00000	0.80141 (.0001)	0.68838 0.0011	0.78856 <.0001	0.77449 <.0001
DMAC		1.00000	0.79230 <.0001	0.90293 <.0001	0.69601 0.0009
VAINCAT			1.00000	0.78566 <.0001	0.76649 0.0001
VAINPROB2				1.00000	0.70145 0.0008
BUT					1.00000

\*F-C: Folin-Ciocalteu); DMAC: 4-Dimetilaminocinalmadehído; VAINICAT: Vanillina bajo el estándar catequina; VAINICAT : Vanillina bajo el estándar Proantocianidin B2 y BUT: Butanol/HCl.

### 3. 1 Análisis de proantocianidinas por HPLC

Del extracto fenólico de zapote mamey, únicamente se analizó por HPLC la fracción de menor polaridad, que fue la obtenida por extracciones líquido-líquido con

acetato de etilo. Bajo el protocolo de análisis utilizado se logró una buena separación de la mezcla de estándares (**Figura 17 A**). En el cromatograma de la muestra se identificaron únicamente cinco picos: ácido gálico, catequina, epicatequina, epicatequingalato y el pico 6 que fue tentativamente identificado como un dímero de catequina, de acuerdo con su espectro obtenido en UV. Sin embargo, el perfil de fenoles obtenido resulta más complejo que el reportado por Ma *et al.* (2004), particularmente en la zona de tiempo de retención entre los 20 y 26 minutos. Yahia *et al.* (2010) informaron la presencia de un dímero de epicatequina en el fruto de zapote mamey. En ninguna de las muestras analizadas durante el proceso de maduración de los frutos se encontró galocatequina, que sí fue identificada y con un contenido importante por Ma *et al.* (2004) en zapote mamey.



**Figura 17.** Cromatogramas por HPLC de la mezcla de estándares de flavanoles (A) y de la fracción de acetato de etilo del extracto fenólico del fruto de zapote mamey en madurez comercial (B).



En el **Cuadro 5** se presentan los datos para las etapas 1 y 2 de maduración. De los distintos fenoles identificados durante el proceso de maduración, el mayor contenido y variación se observó en el pico 6 (dímero de catequin/epicatequina), que mostró un incremento gradual a lo largo del proceso, con valores en la etapa 2 que casi duplicaron los de la etapa 1. El ácido gálico, catequina y epicatequina también presentaron un contenido mayor en la etapa 2, pero estos compuestos no mostraron un incremento gradual, sino que los valores elevados se presentaron cuando el fruto alcanzó su madurez de consumo. La epigalocatequina, por su parte, presentó un valor menor en la etapa 2 con respecto a la etapa 1.

**Cuadro 5.** Contenido de fenoles en dos etapas de maduración del fruto de zapote mamey en la fracción de acetato de etilo obtenida del extracto fenólico y analizada por HPLC.

ETAPA DE MADURACIÓN	AG	CAT	EPIGCAT	EPICAT	P6
1	3.91 ± 2.1	3.34 ± 1.5	0.72 ± 0.7	2.38 ± 0.8	28.95 ± 13.1
2	6.76 ± 3.3	4.78 ± 3.4	0.58 ± 0.4	3.04 ± 2.2	46.38 ± 15.3

\*AG: Ácido gálico, CAT: Catequina, EPIGCAT: Epigalocatequina 3-G, EPICAT: Epicatequina, P6: Pico 6; Datos expresados en  $\mu\text{M/g}$  muestra fresca.

El análisis por HPLC de la fracción de AcOEt hidrolizada, de muestras de las etapas 1 y 2 del proceso de maduración de los frutos no mostró presencia de quercetina, pero si se observó miricetina. Estos resultados confirman lo reportado por Ma *et al.* (2004) en el sentido de que el fruto de zapote mamey tiene derivados de este flavonol, y no derivados de quercetina como lo señalan Alia *et al.* (2005).

### III. CONCLUSIONES

Los fenoles solubles totales del fruto de zapote mamey son predominantemente proantocianidinas (PAs), cuyo contenido decrece durante el proceso de maduración. El contenido de PAs monoméricas (PAsM) y oligoméricas es menor que el de las PAs poliméricas. Las PAs extractables en el fruto maduro de zapote mamey fueron de 322.4 y 124.8 mg/100 g MF mediante los métodos de Vainillina y DMAC, respectivamente; con el método del butano ácido el contenido ascendió a 712.3 mg/100 g de MF. Dentro de las PAsM se presentó un compuesto de baja polaridad que fue identificado tentativamente como un dímero de catequina, el cual mostró un incremento creciente en su contenido durante el proceso de maduración del fruto. Los valores de PAs en zapote mamey son superiores a los informados para frutos como manzana y uva, por lo que puede considerarse como una fuente de PAs importante, con los beneficios reconocidos que el consumo de alimentos con este tipo de fenoles proporciona a la salud humana.

#### IV. LITERATURA CITADA

- Alia-Tejacal, I., Colinas, M.T.L., Martínez, M.T.D. y Hernández, R.M.S. 2002. Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) durante postcosecha. Revista Chapingo, Serie Horticultura, 8:263-281.
- Alia-Tejacal, I., R. M. Soto-Hernández, M. T. Colinas-León, M. T. y Martínez-Damián M. T.. 2005a. Análisis preliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). Revista Chapingo, Serie Horticultura, 11:225-231.
- Alia-Tejacal, I., Colinas, M.T.L., Martínez, M.T.D. y Hernández, R.M.S. 2005b. Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and stearn). I. Comportamiento de volátiles, firmeza y azúcares totales. Rev. Fitotecnia Méx. 28, 17–24.
- Arenas O, M.L, Evangelista L. S, Arana E. R, Jiménez A. A.R, Dávila O. A. 2003. Softening and biochemical changes of zapote fruit (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stearn) at different development and ripening stages. J. Food biochemistry. 27, pp. 91-1007
- Ayakago, I., T. Akagi, D. Potter, M. Yamada, A. Sato, K. Yonemori, A. Kitajima, K. Inoue. 2009. Molecular identification of 1-Cys peroxiredoxin and

- anthocyanidin/Xavonol 3-O-galactosyltransferase from proanthocyanidin-rich young fruits of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *Planta*, 209:841-855.
- Cabrera, C., R. Jiménez, M. C. López. 2003. Determination of tea components with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51:4427-4435.
- Castillo-Muñoz, N., S. Gómez-Alonso, E. García-Romero, I. Hermosín-Gutiérrez. 2010. *J. Food Composition Analysis*, 699-705.
- Dixon, R. A., D. Y. Xie, S. B. Sharma. 2005. Proanthocyanidins- a final frontier in flavonoid research?. *Tansley Review. New Phytologist*, 165:9-28.
- Goldstein, J., T. Smith. 1963. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry* 4:371-383.
- Hageman, A. E., Zhao, Y., Johnson, S. 1997. Methods for determination of condensed and hydrolysable tannins. In: *Antinutrients and Phytochemicals in Foods*. Fereidoon S.(ed). American Chemical Society. Washington DC. 24: 170-81.
- Hellström, J. K., P. H. Mattila. 2008. HPLC determinations of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant material. *J. Agric. Food Chem.* 56:7617-7624.
- Hummer, H., P. Schreier (2008). Analysis of proanthocyanidins. *Mol. Nutrit. Food Research*, 52:1381-1398.
- Ma, J., Yang, H., Basile, J.M., Kennelly, J.E. 2004. Analysis of polyphenolic antioxidants from fruit of three: *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5873–5878.
- Martínez M. A., Alía T. I., Valle G. A., Colinas L. Ma. T., López M. V., Bautista B. S., Andrade R. M., Villegas T. O. y Guillen S. D. 2008. Comportamiento de frutos

- de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en atmósferas con bajo O<sub>2</sub> y moderado CO<sub>2</sub>.  
Rev. Fitotec. Méx. Vol. 31 (Núm. Especial 3): 53 – 59.
- Porter, J. J., L. N. Hrstich, B. G. Chan. 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 1:223-230.
- Prior Ronald L, Ellen Fan, Hongping Ji, Amy Howell, Christian Nio, Mark J Payne y Jess Reed. 2010. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *J Sci Food Agric*; 90: 1473–1478.
- Roux, D.G., 1992. Introduction. in: Hemingway, R.W., Laks, P.E. (Eds.), *Plant Polyphenols*. Plenum Press, New York, pp. 7–39.
- Saucedo-Veloz, C., Martínez-Morales, A., Chávez-Franco, S. H. Y Soto-Hernández, R.M. 2001. Maduración de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jaq) H.E. Moore & Stearn). *Rev. Fitotec. Méx.* Vol 24 (2) pp. 231-234.
- SAS. Institute Inc. 2002.SAS/STAT® User's Guide, Version 9.0, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Schofield, P., D. M. Mbugna, A. N. Pell. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91:21-40.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. J. A. (1965).Colorimetry of total phenolics with Phosphomolybdic-phophotungstic acid reagents.*American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Sun, Baoshan., Ricardo-Da-Silva, J.M. And Spranger, I. 1998. Critical factors of vainillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem*; 46: 4267 – 4274.
- Torres-Rodríguez, A., Salinas-Moreno, Y., Valle-Guadarrama, S., and Alia-Tejacal, I. 2011. Soluble phenols and antioxidant activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruits in postharvest.*Food Research International* 44, pp.1956–1961.

- Wallace T. C. y Giusti M. M. 2010. Evaluation of Parameters that Affect the 4-Dimethylaminocinnamaldehyde Assay for Flavanols and Proanthocyanidins. *Journal of Food Science*. 75 (7), C619-C625.
- Wolfe, R. M., T. H. Terrill, J. P. Muir. 2008. Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. *J. Sci Food Agric*. 88:1060-1067.
- Yahia, E. M., Gutiérrez-Orozco, F and Arvizu, De L. C. 2011. Phytochemical and antioxidant characterization of mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) fruit. *Food Research International*. 44, pp. 2175–2181.

