



Proanthocyanidins and enzymatic activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruit during ripening

Proantocianidinas y actividad enzimática en fruto de mamey zapote (*Pouteria sapota*) durante su maduración

Torres-Rodríguez, A.¹, Salinas-Moreno, Y.^{2*}, Valle-Guadarrama, S.³, Soto-Hernández, R. M.⁴, Alía-Tejagal, I.⁵

¹Universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez, Posgrado en Ingeniería Agroalimentaria. Av. Universidad Tecnológica No. 1000, Tierra Negra, 73080. Xicotepec de Juárez, Puebla, Mexico.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Laboratorio de Calidad de Cultivos para Uso Humano y Pecuario. Km 8 Carretera Tepatitlán-Lagos. C.P. 47600. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. México.

³Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Carretera México-Texcoco, Km.38.5 Chapingo, C.P. 56230, México.

⁴Fitoquímica, Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, C.P. 56230, Mexico.

⁵Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Cite this paper/Como citar este artículo: Torres-Rodríguez, A., Salinas-Moreno, Y., Valle-Guadarrama, S., Soto-Hernández, R. M., Alía-Tejagal, I. (2019). Proanthocyanidins and enzymatic activity in mamey sapote (*Pouteria sapota*) fruit during ripening. *Revista Bio Ciencias* 6 e565. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e565>



ABSTRACT

The fruit of mamey sapote (*Pouteria sapota*) has high content of soluble phenolic compounds that have not been characterized and some of these compounds are the substrate of enzymes related with flesh browning fruit. The objectives were: *i*) to study the proanthocyanidins in mamey sapote fruit, *ii*) to determine the activity of the polyphenol oxidase and peroxidase, and *iii*) to evaluate their changes during the ripening process. The proanthocyanidins were quantified by butanol/HCl, DMAC (4 - (dimethylamino) cinnamaldehyde) and vanillin methods. The characterization was done by HPLC. Enzymatic activity was determined by spectrophotometry methods. The proanthocyanidin (PAs) content showed a reduction with fruit ripeness progress. With DMAC method the reduction was of 2.8 times from preclimacteric stage (CS) to horticultural maturity (HM); the content with vanillin

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 18th 2018.

Accepted/Aceptado: May 5th 2019.

Available on line/Publicado: May 10th 2019.

RESUMEN

El fruto de zapote mamey (*Pouteria sapota*) tiene alto contenido de compuestos fenólicos solubles que no han sido caracterizados y algunos de estos compuestos son sustrato de enzimas relacionadas con pardeamiento de pulpa. Los objetivos fueron: *i*) estudiar las proantocianidinas en el fruto de mamey zapote, *ii*) determinar la actividad de la polifenol oxidasa y la peroxidasa, y *iii*) evaluar sus cambios durante el proceso de maduración del fruto. Los métodos de análisis fueron: butanol/HCl, DMAC (4 - (dimetilamino) cinamaldehído), vainillina y cromatografía líquida de alta resolución. La actividad enzimática se determinó por métodos de espectrofotometría. El contenido de proantocianidinas (PAs) mostro una reducción al avanzar la maduración del fruto. Con el método DMAC la reducción fue de 2.8 veces al pasar de la etapa de preclimaterio (CS) a la madurez hortícola (HM); con el método de vainillina la reducción fue de 1.6 veces desde CS a HM. En madurez hortícola, los contenidos de PAs fueron 124,8 mg equivalentes de catequina/100 g de peso fresco y de 322,4 mg equivalentes de proantocianidina B2/100 g de peso fresco por los métodos DMAC y vainillina, respectivamente. Las proantocianidinas monoméricas (catequina, epicatequina y epicatechin 3-galato) no

*Corresponding Author:

Yolanda Salinas Moreno. Laboratorio de Calidad de Cultivos para Uso Humano y Pecuario, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 8 Carretera Tepatitlán-Lagos. C.P. 47600. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. México. E-mail.: yolasm@gmail.com.

method was reduced 1.6 times from CS to HM. At HM, PAs content was of 124.8 mg equivalent of catechin/100 fresh weight and of 322.4 mg equivalent of proanthocyanidin B2/100 g fresh weight, for DMAC and vanillin methods, respectively. The monomeric PAs (catechin, epicatechin and epicatechin-3 gallate) did not change ($p>0.05$) during the ripening process. The enzymatic activity of peroxidase increases at the end of ripening process and was related with flesh browning. The mamey zapote is an important source of oligomeric proanthocyanidins.

KEY WORDS

Pouteria sapota, tropical fruit, condensed tannins, enzymatic activity.

Introduction

Pouteria sapota (Jacq. H. E. Moore & Stearn) is a tropical species that produces a fruit with sweet, soft, and slightly fibrous flesh, which shows a reddish-orange color due to the presence of carotenoids (Alia-Tejacal *et al.*, 2005a; Zou *et al.*, 2012). In Mexico, the fruit of *P. sapota* is called mamey zapote and its cultivated area is about 1336 ha (SIAP, 2016); the consumption is mainly in fresh stage or processed into milkshakes, ice cream or desserts.

P. sapota belongs to the climacteric type of fruit. During the ripeness process of climacteric fruit, four stages are defined according to the respiration rate and ethylene production (preclimacteric, climacteric rise, climacteric peak and postclimacteric) and changes in the chemical composition and texture of the flesh occurred throughout the whole process (Watada *et al.*, 1984; Torres-Rodríguez *et al.*, 2011).

The flesh of this fruit contains a high amount of total soluble phenolics (TSP), which diminish with ripening (Torres-Rodríguez *et al.*, 2011). In TSP fraction, flavanols as catechin, epicatechin, galocatechin, and catechin 3-O-gallate have been identified, in addition to gallic (Torres-Rodríguez *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2004), syringic, *p*-hydroxybenzoic, and *p*-coumaric acids (Yahia *et al.*, 2011).

There are no reports of proanthocyanidins (PAs) in *P. sapota*, although in matured fruit, a slight astringency may

cambiaron ($p>0.05$) durante el proceso de maduración. La actividad de la peroxidasa incrementó al final de la etapa de maduración y se asoció con pardeamiento de pulpa. El fruto de zapote mamey es una fuente importante de proantocianidinas oligoméricas.

PALABRAS CLAVE

Pouteria sapota, frutos tropicales, taninos condensados, actividad enzimática.

Introducción

Pouteria sapota (Jacq. H. E. Moore & Stearn) es una especie tropical que produce un fruto de pulpa dulce, suave y ligeramente fibrosa, de color anaranjado rojizo debido a la presencia de carotenoides (Alia-Tejacal *et al.*, 2005a; Zou *et al.*, 2012). En México, el fruto de *P. sapota* se denomina zapote mamey y su área cultivada es de cerca de 1336 ha (SIAP, 2016); el consumo se realiza principalmente en fresco o en forma de licuados, helados o postres.

P. sapota pertenece a los frutos tipo climatéricos. El proceso de maduración de los frutos climatéricos consta de cuatro etapas (preclimaterio, incremento de climaterio, pico climatérico y postclimaterio), definidas de acuerdo con su tasa de respiración y producción de etileno, con cambios en la composición química y textura de la pulpa durante todo el proceso de maduración (Watada *et al.*, 1984; Torres-Rodríguez *et al.*, 2011).

La pulpa de este fruto contiene grandes cantidades de fenoles solubles totales (TSP), los que disminuyen con la maduración (Torres-Rodríguez *et al.*, 2011). En la fracción de TSP se han identificado flavanoles del tipo catequina, epicatequina, galocatequina y catequin 3-O galato, además de los ácidos gálico (Torres-Rodríguez *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2004), siríngico, *p*-hidroxibenzoico y *p*-cumárico (Yahia *et al.*, 2011).

No existen reportes publicados sobre proantocianidinas (PAs) en *P. sapota*, aunque en el fruto maduro se puede detectar una ligera astringencia. Esta astringencia podría estar asociada con la presencia de PAs, que son oligómeros o polímeros de poli hidroxil flavan 3-ols, con unidades de epicatequina (procianidinas) o epi galocatequina (prodelfinidinas) (Schofield *et al.*, 2001). Su estructura polifenólica y particular grado de polimerización le confiere a

be detected. This astringency could be associated with the presence of PAs, which are oligomers or polymers of polyhydroxy flavan-3-ols with units of epi-catechin (procyanidins) and epi-gallocatechin (prodelphinidins) (Schofield *et al.*, 2001). Their polyphenolic structure and particular degree of polymerization, confers to PAs, biological activities beneficial to human health (Silva *et al.*, 2009; Hellström & Mattila, 2008). The consumption of PAs of high molecular weight has been associated with the reduction of different types of cholesterol (Zou *et al.*, 2012) and with a low damage to the vascular tissue, by atherosclerosis (Gorinstein *et al.*, 2011). In addition, studies with animals have allowed qualify the PAs as promising compounds to prevent the development of degenerative diseases of the nervous system (Lee *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012).

On the other hand, two of the main enzymes related with fruit browning, are polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) (Luo and Xie, 2012). No published reports were found on the relationship of the activity of these enzymes and the browned flesh of MS that could be observed in fruit at consumption maturity or at over ripened fruit. Since there are no reports about analysis of PAs in mamey sapote and only few reports about enzymatic activity during ripening of mamey sapote fruit, and given the important biological activities attributed to these polyphenols, the objectives of this study were: *i*) to study proanthocyanidins (PAs) in mamey sapote fruit, *ii*) to determine the activity of the polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD), and to evaluate their changes during the ripening process

Materials and Methods

Plant material

Two hundred mamey sapote fruits were collected at Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico (14° 56' 20" N; 92° 10' 05" W) at physiological maturity, using as harvest index the presence of a pink-orange tonality in flesh, which was verified by making an incision near the apex. Transportation of fruits to the experimental site, at Texcoco, Mexico (19° 29' 23" N, 98° 53' 37" W), was carried out by land, using plastic boxes. Within 20 h after harvest, fruits were stored at 12 °C, which is a temperature that can extend the postharvest life of mamey sapote fruits without chilling injury (Alia-Tejacal *et al.*, 2005b).

las PAs actividades biológicas benéficas a la salud humana (Silva *et al.*, 2009; Hellström & Mattila, 2008). El consumo de PAs de alto peso molecular se ha asociado con la reducción de los diferentes tipos de colesterol (Zou *et al.*, 2012) y con menor daño al tejido vascular por aterosclerosis (Gorinstein *et al.*, 2011). Además, estudios con animales han permitido calificar a las PAs como compuestos prometedores para prevenir el desarrollo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso (Lee *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012).

Por otro lado, la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD) son dos de las principales enzimas relacionadas con el pardeamiento de la fruta (Luo and Xie, 2012). No se encontraron informes publicados sobre la relación de la actividad de estas enzimas y el pardeamiento de la pulpa que se puede observar en el fruto maduro o muy maduro de zapote mamey. Dado que no hay informes sobre el análisis de PAs en zapote mamey, solo pocos reportes sobre la actividad enzimática de PPO y POD durante la maduración de este fruto, y dadas las importantes actividades biológicas atribuidas a las PAs, los objetivos de este estudio fueron: *i*) estudiar las proantocianidinas (PAs) en el fruto de mamey sapote, *ii*) determinar la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD), y evaluar sus cambios durante el proceso de maduración.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se obtuvieron 200 frutos de zapote mamey de un huerto ubicado en Tuxtla Chico, Chiapas, México (14° 56' 20" N; 92° 10' 05" W). Los frutos se encontraban en madurez fisiológica al momento del corte, lo que se aseguró mediante el índice de cosecha, a través de la presencia de una tonalidad rosa-naranja en la pulpa, que se verificó haciendo una incisión cerca del ápice del fruto. El transporte de los frutos al sitio experimental en Texcoco, México (19° 29' 23" N, 98° 53' 37" W), se llevó a cabo por tierra, utilizando cajas de plástico. Dentro de las 20 h posteriores a la cosecha, los frutos se almacenaron a 12 °C, que es una temperatura que puede prolongar la vida postcosecha del zapote mamey sin causar daños por frío (Alia-Tejacal *et al.*, 2005b).

Firmeza del fruto

Cada tercer día, se tomaron tres frutos de forma aleatoria de la cámara de almacenamiento para evaluar la firmeza de su pulpa (FF) que se midió con un analizador de textura (Stable Micro Systems, TA-XT2i, UK). Al fruto se le removió la cáscara en dos puntos de su región ecuatorial, con

Fruit firmness

Every three days, three fruits were randomly taken from the storage chamber in order to evaluate flesh firmness (FF) which was measured with a texture analyzer (Stable Micro Systems, TA-XT2i, UK). The fruit was peeled at two points of its equatorial region and with a conical element of 2.6 cm at the base, an angle of 75°, and a rounded tip, the lectures were taken under a routine where the fruit flesh was deformed up to 4 mm at a 3 mm s⁻¹ velocity. FF was expressed in newtons (N). Thereafter, a sample of flesh was taken from each fruit to be placed in liquid nitrogen to freeze and store at -20 ° C for subsequent evaluation of phenolic compounds and enzymatic activity.

Extraction of phenolic compounds (proanthocyanidins)

Fifteen grams of frozen flesh were ground in a domestic blender, using a small volume container. One gram of the homogenized material was weighed and mixed with 20 mL of solvent (acetone:water:acetic acid, 75.0:24.5:0.5 v/v/v) in an Erlenmeyer flask (Prior *et al.*, 2010). The mixture was placed in an ultrasonic bath (Branson (Model 2510, USA) for 30 min and shaken on a horizontal equipment (Gyratory shaker, model G10, USA) for one additional hour. The sample was centrifuged (Universal 32, Hettich Zentrifugen, Germany) at 2200 × g for 10 min at 20 °C, and the supernatant was recovered, filtered with Whatman No. 1 paper, and brought to a volume of 20 mL with the extraction solvent. This extract was divided into two equal volumes; one of them was concentrated at 40 °C in a rotary evaporator (Heidolph, Laborata 4010, Germany), brought to 10 mL with distilled water, and subjected to liquid-liquid extraction with 15 mL of ethyl acetate. The organic phase was recovered and the liquid-liquid extraction repeated for three times. The collected organic phases were pooled and concentrated to dryness in a rotary evaporator. The residue was re-suspended in 2 mL of methanol grade HPLC and used for the HPLC-DAD analysis. The other volume of 10 mL was used for quantitation of phenolic compounds by several methods.

Quantification of total soluble phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method

The colorimetric method of Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) was used. A standard curve of gallic acid (Sigma, MN) was prepared to express the concentration of phenols in mg gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of fresh tissue (FM).

un elemento cónico de 2.6 cm de base redondeada y en un ángulo de 75°. Se tomaron las lecturas bajo una rutina en la que la pulpa del fruto se deformó hasta 4 mm a una velocidad de 3 mm s⁻¹. La firmeza de la pulpa (FF) se expresó en newtons (N). Posteriormente, se tomó una muestra de pulpa y se colocó en nitrógeno líquido para luego almacenarse a -20 ° C para las evaluaciones subsecuentes de compuestos fenólicos y actividad enzimática.

Extracción de compuestos fenólicos (proantocianidinas)

Una muestra de 15 g de pulpa congelada se molió en una licuadora doméstica (Man LMU 9013, Mexico) equipada con un recipiente de volumen reducido. Se pesó 1 g de la muestra homogeneizada y se mezcló con 20 mL de solvente (acetona:agua:ácido acético, 75.0:24.5:0.5 v/v/v) en un matraz Erlenmeyer (Prior *et al.*, 2010). La mezcla se colocó en un baño de ultrasonido (Branson, Model 2510, USA) por 30 min, posteriormente se colocó en un agitador horizontal (Gyratory shaker, model G10, USA) por una hora. La muestra se centrifugó (Universal 32, Hettich Zentrifugen, Germany) a 2200 x g por 10 min a 20 °C, y el sobrenadante fue recuperado (filtrado con papel Whatman No. 1) y ajustado a un volumen de 20 mL con el solvente de extracción. Este extracto se dividió en dos volúmenes iguales; uno se concentró en un rotaevaporador (Heidolph, Laborata 4010, Germany) a 40 °C hasta 2 mL y se ajustó con agua destilada a un volumen de 10 mL para luego realizar tres extracciones líquido-líquido con 15 mL de acetato de etilo en cada caso, con recuperación de la fase orgánica. Las fases orgánicas colectadas se juntaron y se concentraron a sequedad en un rotaevaporador. El residuo se re-suspendió en 2 mL de methanol grado HPLC y se utilizó para los análisis de compuestos fenólicos por HPLC-DAD. El otro volumen de 10 mL se usó para la cuantificación de compuestos fenólicos por diversos métodos.

Cuantificación de compuestos fenólicos solubles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se usó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) y el ácido gálico (Sigma, MN) para elaborar la curva patrón y poder expresar la concentración de fenoles solubles totales en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de peso fresco (FW).

Proantocianidinas mediante el método de butanol/HCl

Se utilizó el método de Porter *et al.* (1986) con un volumen de 500 µL de extracto que se colocó en tubos de

Proanthocyanidins Method of butanol/HCl

The method of Porter *et al.* (1986) was used with a volume of 500 μL of extract that was placed in test tubes with bakelite stopper. The butanol/HCl method confirms the presence of condensed tannins or proanthocyanidins, when an intense red color is developed by heating the sample, because oxidation of the leucoanthocyanins (Schofiel *et al.*, 2001). For running the test, 3 mL of concentrated butanol/HCl solution (95:5 v/v) (JT Baker S.A. de C.V., Mexico) were mixed with 100 μL of ferric reagent (2 % ammonium ferric sulphate in 2 N HCl). The tubes were sealed and placed in a boiling water bath at 92 °C for 60 min. Thereafter, the absorbance of the sample was read at 550 nm in a spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 25, USA) that was adjusted to zero with the blank prepared with all the solvents and 500 μL of solvent extraction. Sorghum flour (Dykes & Rooney, 2006) and calyces of jamaica were used as positive and negative control tests, respectively. In both cases the extraction of PAs was prepared out as did with mamey sapote flesh. Due to the lack of chemical standards of condensed tannins adequate for mamey sapote fruit, the results are reported as values of absorbance.

Method of DMAC (4 - (dimethylamino) cinnamaldehyde)

The DMAC colorimetric method (Wallace & Giusti, 2010) was used, placing 2380 μL of methanol HPLC grade in test tubes with an aliquot of 20 μL of the extract of phenols and 100 μL of DMAC reagent prepared at 2 % in 6 N sulphuric acid in methanol. Methanol HPLC grade was used as blank. A standard curve with catechin (Sigma, MN) solubilized in the solvent used for extracting PAs. The PAs concentration was expressed in mg of catechin equivalents (CE) per 100 g fresh weight (FW).

Method of vanillin

The method proposed by Sun *et al.* (1998) was used. A volume of 2500 μL of vanillin 1 % was placed in test tubes with 1000 μL of extract. Thereafter, 2500 μL of 8 % HCl solution was added and tubes were shaken on a vortex for 20 s and centrifuged at 2200 \times g for 10 min. The reaction was allowed to stabilize for 10 min in darkness. A standard curve of proanthocyanidin B2 (Fluka, MN) were prepared. The standard was solubilized in the solvent used for extracting PAs. The concentration of PAs was expressed as mg of proanthocyanidin B2 equivalents (PB2E) per 100 g ^{FW}.

vidrió con tapón de baquelita. El método de butanol/HCl es confirmativo de la presencia de taninos condensados o proantocianidinas (PAs), al presentarse un color rojo intenso cuando la muestra es calentada, debido a la oxidación de las leucoantocianidinas (Schofiel *et al.*, 2001). Para correr el ensayo, 3 mL de una solución concentrada de butanol/HCl (95:5 v/v) (JT Baker S.A. de C.V., México) se mezclaron con 100 μL de reactivo férrico (sulfato férrico de amonio al 2 % en HCl 2 N). Los tubos se cerraron y se colocaron en baño de agua a 92 °C por 60 min. Posteriormente, se leyó la absorbancia de las muestras a 550 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda 25, USA) el cual se ajustó a cero de absorbancia con un blanco preparado con todos los reactivos, pero sustituyendo el extracto por solvente de extracción. Harinas de sorgo (Dykes & Rooney, 2006) y de cálices de jamaica se usaron como controles positivo y negativo, respectivamente en la prueba. En ambos casos la extracción de PAs se realizó de la misma forma que en el caso de la pulpa del zapote mamey. Debido a que no existe en el mercado un estándar químico de taninos condensados adecuado para zapote mamey, los resultados se expresan como valores de absorbancia.

Método de DMAC (4 - (dimetilamino cinamaldeído)

El método colorimétrico DMAC (Wallace & Giusti, 2010) se utilizó para lo cual se colocaron 2380 μL de metanol grado HPLC en tubos de ensayo que contenían una alícuota de 20 μL de extracto y 100 μL del reactivo DMAC preparado al 2 % en ácido sulfúrico al 6 N en metanol. Se utilizó metanol grado HPLC como blanco. Se elaboró una curva estándar con catequina (Sigma, MN) solubilizada en el mismo solvente usado para la extracción de PAs. La concentración de PAs se expresó en mg equivalentes de catequina (CE) por 100 g de peso fresco (FW).

Método de vainillina

Se utilizó el método propuesto por Sun *et al.* (1998). Un volumen de 2500 μL de vainillina al 1 % se colocó en tubos de vidrio con 1000 μL de extracto. Posteriormente, se agregaron 2500 μL de HCl al 8 % y se agitaron en vórtex por 20 s para luego centrifugarlos a 2200 \times g por 10 min. La reacción se dejó estabilizar por 10 min en oscuridad. Se preparó una curva estándar de proantocianidina B2 (Fluka, MN) solubilizada en el solvente utilizado en la extracción de PAs. La concentración de PAs fue expresada como mg equivalentes de proantocianidina B2 (PB2E) por 100 g de peso fresco (FW).

Proanthocyanidins analysis by HPLC-DAD

A high-performance liquid chromatograph (HPLC; PerkinElmer Series 200, USA) was used with an UV-DAD detector, that was controlled by a computer through the TotalChrom™ software. For the analysis of the ethyl acetate fraction, a Phenomenex Luna C₁₈ analytical column (250 x 4.6 mm, 5 mm) was employed. The method described by Cabrera *et al.* (2003) was used. The mobile phase was acetic acid (0.1 %) in water (A) and methanol (B), with flow rate of 1 mL min⁻¹. The composition of the mobile phase started with 100 % A for 1 min, increased linearly to 63 % B in 27 min, returning to initial conditions in 5 min. The detection was performed at 280 (catechins) and 360 nm (flavonols). The column temperature was set at 25 °C. An injection volume of 10 µL was used. Samples were filtered through a nylon membrane of 0.45 µm (Millipore™) before they were injected in the equipment. All solvents were HPLC grade. Standard curves of gallic acid, catechin, epicatechin, galocatechin, and epigallocatechin-3-gallate (Sigma-Aldrich, MN) were prepared at concentrations of 5 to 20 ppm. The curves were run at 280 nm and had R² values higher than 0.997. The identification of the peaks was performed through comparison of pure standards retention times and the UV spectra obtained.

Enzymatic activity

Forty grams of flesh of mamey sapote fruit were mixed with 50 mL of cold acetone (15 °C). The mixture was homogenized in a domestic blender (Man LMU 9013, Mexico) for 1 min and filtrated with vacuum to separate the solid phase, which was named acetone powder. This procedure was repeated until the powder took a white color. Finally, the acetone powder was allowed to dry at room temperature and was stored at 20°C for subsequent evaluation. The methods of Lamikanra (1995) and Flurkey & Jen (1978) were applied to evaluate polyphenol oxidase (PPO; EC. 1.14.18.1) and peroxidase (POD; EC. 1.11.1.7) enzyme activities, respectively, both with 0.2 g of acetone powder that were mixed with 5 mL of Tris-HCl 100 mM pH 7.1 (TH) that contained polyvinylpyrrolidone (1 %). Homogenization was applied (Ultra Turrax T25 equipment, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) for 30 s and centrifugation (Sorvall centrifuge RC-5B, GMI, USA) for 20 min at 10000 x g and 4°C. To evaluate PPO, an assay was performed with 2 mL of supernatant that were mixed in a quartz cell with 3 mL of catechol 60 mM dissolved in TH. The change of

Análisis de proantocianidinas por HPLC-DAD

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC; PerkinElmer Series 200, USA) con un detector de UV con arreglo de diodos, controlados por una computadora mediante el programa TotalChrom™. Para el análisis de la fracción de acetato de etilo se empleó una columna analítica Phenomenex Luna C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 mm), bajo el protocolo 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⁻¹. La composición de la fase móvil inició con 100 % de A por 1 min, que incrementó linealmente a 63 % de B en 27 min, regresando a las condiciones iniciales en 5 min. La detección se realizó a 280 nm para catequinas y a 360 nm para flavanoles. La temperatura de la columna se mantuvo en 25 °C. Se usó un volumen de inyección de 10 µL. Las muestras se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45 µm (Millipore™) antes de inyectarse al equipo. Todos los solventes fueron grado HPLC. Se prepararon curvas estándar de ácido gálico, catequina, epicatequina, galocatequina y epigallocatequina 3-galato (Sigma-Aldrich, MN) en concentraciones entre 5 a 20 ppm. Las curvas se corrieron a una longitud de onda de 280 nm y presentaron valores de R² mayores de 0.997. La identidad de los picos se efectuó mediante la comparación de los tiempos de retención y espectros de UV con estándares comerciales.

Actividad enzimática

Una muestra de 40 g de pulpa de zapote mamey se mezcló con 50 mL de acetona helada (15 °C). La mezcla se homogenizó en una licuadora doméstica por un minuto y se filtró con bomba de vacío para separar la fase sólida que se denominó polvo de acetona. Este procedimiento se repitió hasta que el polvo tomó un color blanco. Finalmente, el polvo de acetona se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó a 20 °C para su posterior evaluación. Los métodos de Lamikanra (1995) y Flurkey & Jen (1978) fueron aplicados para evaluar las actividades enzimáticas de la polifenol oxidasa (PPO; EC. 1.14.18.1) y la peroxidasa (POD; EC. 1.11.1.7). Para ambas enzimas, 0.2 g del polvo de acetona se mezclaron con 5 mL de Tris-HCl (TH) 100 mM de pH 7.1 que contenía polivinil pirridona al 1 %. La muestra se homogenizó con un equipo Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) por 30 s y se centrifugó (Sorvall centrifuge RC-5B, GMI, USA) por 20 min a 10,000 x g y a 4°C. Para evaluar la actividad enzimática de la PPO, se corrió un ensayo con 2 mL del sobrenadante que se mezcló con 3 mL de catecol 60 mM disuelto en TH. El cambio en la absorbancia se evaluó a 420 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 (Thermo Fisher Scientific Remel Inc., USA) empleando TH como blanco y celdas de cuarzo. En el caso

absorbance was evaluated at 420 nm with a Genesys 10 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Remel Inc., USA) using TH as blank. In the case of POD, 0.05 mL of supernatant were mixed with 2.6 mL of TH, 0.25 mL of guaiacol 0.1 M, and 0.1 mL of hydrogen peroxide 0.25 %. The change of absorbance was also evaluated at 470 nm for 3 min. Assays were conducted at 20 °C and the enzymatic activity was reported as U g⁻¹, where an enzymatic unit (U) was defined as 1 µmol of oboenzoquinone formed per min for PPO or 1 µmol of tetraguaiacol min⁻¹ for POD.

In addition to the enzymatic activity, the color of *P. sapota* fruit flesh was measured during the storage at 12 °C with the purpose of detecting enzymatic browning. The equipment used was a MiniScan XE Plus colorimeter (Hunter-Lab, model 45/0-L). The CieLab scale was used and the color parameters L*, a* and b* were obtained. Three fruits were analyzed for each sampling day.

Statistical analysis

A completely randomized design was used to perform an analysis of variance and routines of means comparison (Tukey, ≤ 0.05), with data of fruit firmness and phenolic compounds with the purpose of comparing the two stages of the maturation process (pre-climacteric and horticultural maturity). The experimental unit consisted of three fruits taken randomly on each sampling day from the storage. Pearson correlation analysis was performed with the data obtained from the variables analyzed. The statistical software SAS (SAS, 2002) was used.

Results and Discussion

Total soluble phenolics and PAs during fruit ripening

The mamey sapote fruit ripening at 12 °C was monitored as a function of the flesh firmness. It had two well defined stages. The first one (stage 1) had a duration of 15 days and was characterized by firmness values between 49.3 and 39.6 N. This stage is equivalent to the preclimacteric phase mentioned by Watada *et al.* (1984). The second one (stage 2), had a duration of six days. In this stage the firmness decreased drastically between days 15 and 16, to values of 2.7 -1.2 N (Figure 1). Although the respiration rate of fruit was not monitored in this study, Torres-Rodríguez

de la POD, 0.05 mL del sobrenadante se mezclaron con 2.6 mL de TH, 0.25 mL de guayacol 0.1 M, y 0.1 mL de peróxido de hidrógeno al 0.25 %. El cambio de absorbancia se midió a 470 nm por 3 min. Los ensayos se condujeron a 20 °C y la actividad enzimática fue reportada como U g⁻¹, donde una unidad enzimática (U) se definió como 1 µmol de benzoquinona formada por min para la PPO o 1 µmol de tetraguaiacol min⁻¹ para la POD.

Además de la actividad enzimática, se midió el color de la pulpa fresca del zapote mamey en cada fecha de muestreo de los frutos almacenados a 12 °C con el fin de detectar oscurecimiento enzimático. El equipo usado fue un colorímetro MiniScan XE Plus (Hunter-Lab, model 45/0-L) en la escala CieLab con el que se obtuvieron los parámetros de color L*, a* y b*. Se analizaron tres frutos por cada fecha de muestreo.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar para realizar un análisis de varianza y pruebas rutinarias de comparación de medias (Tukey, ≤ 0.05), con los datos de firmeza de fruto y compuestos fenólicos, con el fin de identificar diferencias entre los dos estados de madurez de los frutos (pre-climaterio y madurez hortícola). La unidad experimental constó de tres frutos que fueron tomados de manera aleatoria en cada fecha de muestreo, durante el almacenamiento. Con los datos de las diferentes variables analizadas se realizaron pruebas de correlación de Pearson. Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SAS (SAS, 2002).

Resultados y Discusión

Compuestos fenólicos solubles totales y proantocianidinas durante la maduración del fruto

La maduración del fruto de zapote mamey almacenado a 12 °C fue monitoreada como una función de la firmeza de la pulpa. La primera etapa dentro del proceso de maduración (estado 1) tuvo una duración de 15 días, y se caracterizó por presentar valores de firmeza entre 49.3 y 39.6 N. El estado 1 es equivalente a la fase de preclimaterio mencionada por Watada *et al.* (1984). La segunda etapa (estado 2), tuvo una duración de seis días; en esta etapa, la firmeza del fruto decreció drásticamente a valores de 2.7-1.2 N entre los días 15 y 16 (Figura 1). Aunque la tasa respiratoria del fruto no se midió en este estudio, Torres-Rodríguez *et al.* (2011) señalan que la fuerte

et al. (2011) mentioned that the sharp decrease in firmness coincides with the climacteric peak, in which the highest respiration rate is reached. In stage 2 the fruit was in horticultural maturity, according to that described by Watada *et al.* (1984). The fruit firmness profile was similar to that described by Alia-Tejagal *et al.* (2002) under storage at 15 °C. The content of total soluble phenols (TSP) ranged from 2,195.5 to 1,017.6 mg GAE 100 g⁻¹ FW between days 1 and 15 of storage (stage 1), respectively (Figure 1). Upon completion of 16 days of storage (DS) the TSP fell to 395.3 mg GAE 100 g⁻¹ FM. This change was equivalent to a reduction of approximately 2.1 times, relative to the content at the beginning of the storage. This reduction was lower than that reported by Alia-Tejagal *et al.* (2002) who observed a reduction of 3.2 times in the content of TSP in mamey sapote fruit stored at room temperature (20 °C and 50-60 % relative humidity) when they went through ripening.

The average TSP values at preclimacteric stage (stage 1) and horticultural maturity (stage 2) were similar to those found by Saucedo-Veloz *et al.* (2001) who reported 1.53 % for fruit at stage 1 and 0.21 % at stage 2, but they were lower than the values of 1653 and 646 mg GAE kg⁻¹ FM found by Alia-Tejagal *et al.* (2005a) for the same stages of maturation. In this regard, it has been reported that the content of TSP in mamey sapote fruit is affected by temperature (Alia-Tejagal *et al.*, 2002), ripeness degree (Saucedo-Veloz *et al.*, 2001), geographical origin (Torres-Rodríguez *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2004), and the process of extraction and solvent used (Yahia *et al.*, 2011).

The mamey sapote is a fruit with values of total soluble solids between 20 and 30 °Brix. Sugars accumulation occurs in the first two weeks after harvest (Torres-Rodríguez *et al.*, 2011) thus, the TSP quantified by the Folin-Ciocalteu method may have high interference of sugars, which also react in the assay (Singleton *et al.*, 1999). In plant tissues with high content of direct reducing sugars, it is convenient to remove them before to run Folin-Ciocalteu assay (Stratil *et al.*, 2007).

By applying the butanol/HCl method to the acetone extracts of mamey sapote, the presence of polymeric PAs or condensed tannins in the fruit was confirmed, whose pattern during the ripening process was similar to that observed in TSP (Figure 2).

caída de la firmeza del fruto coincide con el pico climaterico, en el cual se alcanza la más alta tasa respiratoria. En la etapa 2 el fruto se encontraba en madurez hortícola, de acuerdo con lo descrito por Watada *et al.* (1984). El perfil de firmeza del fruto fue similar a lo descrito por Alia-Tejagal *et al.* (2002) para fruto almacenado a 15 °C. El contenido de compuestos fenólicos solubles totales (TSP) varió desde 2,195.5 hasta 1,017.6 mg GAE 100 g⁻¹ de peso fresco (FW) respectivamente, entre los días 1 y 15 de almacenamiento (estado 1) (Figura 1). Al alcanzarse 16 días de almacenamiento (DS) los TSP cayeron a 395.3 mg GAE 100 g⁻¹ FW. Este cambio equivale a una reducción de 2.1 veces, en relación al contenido al inicio del almacenamiento, que es inferior a la reportada por Alia-Tejagal *et al.* (2002) en frutos de zapote mamey almacenados a temperatura ambiente (20 °C y 50-60 % de humedad relativa) que fue de 3.2 veces.

Los valores promedio de los TSP en la etapa de preclimaterio (estado 1) y madurez hortícola (estado 2) fueron similares a los encontrados por Saucedo-Veloz *et al.* (2001) quienes reportaron 1.53 % para frutos en estado 1 y 0.21 % para el estado 2, pero fueron a su vez menores que los valores de 1653 y 646 mg GAE kg⁻¹ FW informados por Alia-Tejagal *et al.* (2005a) para los mismos estados de maduración del fruto. En este sentido, se ha reportado que los TSP en el fruto de zapote mamey son afectados por la temperatura de almacenamiento (Alia-Tejagal *et al.*, 2002), el grado de madurez (Saucedo-Veloz *et al.*, 2001), origen geográfico del fruto (Torres-Rodríguez *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2004), y el proceso de extracción de estos compuestos, así como el tipo de solvente empleado (Yahia *et al.*, 2011).

El zapote mamey es un fruto que presenta valores de sólidos solubles totales de entre 20 y 30 °Brix. La acumulación de azúcares en el fruto ocurre en las dos primeras semanas después de ser cosechado (Torres-Rodríguez *et al.*, 2011) así que, los TSP cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu podrían tener una alta interferencia por azúcares, que pueden tener reacción en el ensayo (Singleton *et al.*, 1999). En tejido vegetal con elevado contenido de azúcares reductores, conviene removerlos, antes de correr el ensayo de Folin-Ciocalteu (Stratil *et al.*, 2007).

Con la aplicación del método de butanol/HCl en el extracto de acetona del fruto de zapote mamey se pudo comprobar la presencia de proantocianidinas poliméricas o taninos condensados en el fruto, y cuyo patrón durante el proceso de maduración fue similar al mostrado por los TSP (Figura 2).

Los frutos inmaduros presentan comúnmente elevadas cantidades de taninos condensados, pues constituye

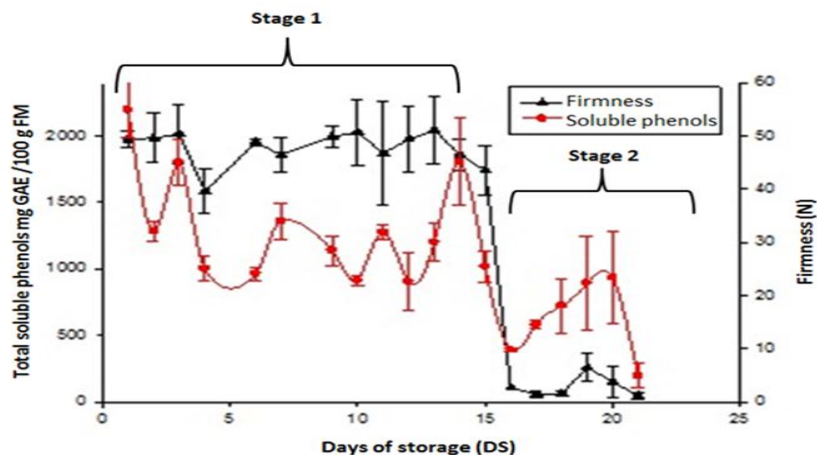


Figure 1. Total soluble phenols (TSP) and flesh firmness of fruit of mamey sapote during ripening at 12 °C. Bars represent standard deviation from the mean of three fruits.

Figura 1. Firmeza de la pulpa y compuestos fenólicos solubles totales (TSP) de fruto de zapote mamey durante su maduración a 12 °C. Las barras representan la desviación estándar de la media de tres frutos.

Immature fruits commonly have high amounts of condensed tannins as a tool of plants to safeguard the species survival. The content and types of these phenolic compounds decrease with fruit maturity. However, some fruits maintain high amounts of particular condensed

un mecanismo de las plantas para salvaguardar la preservación de la especie. El contenido de estos compuestos fenólicos decrece con la madurez del fruto. Sin embargo, algunos frutos mantienen elevadas cantidades de algún tipo de taninos condensados cuando el fruto alcanza

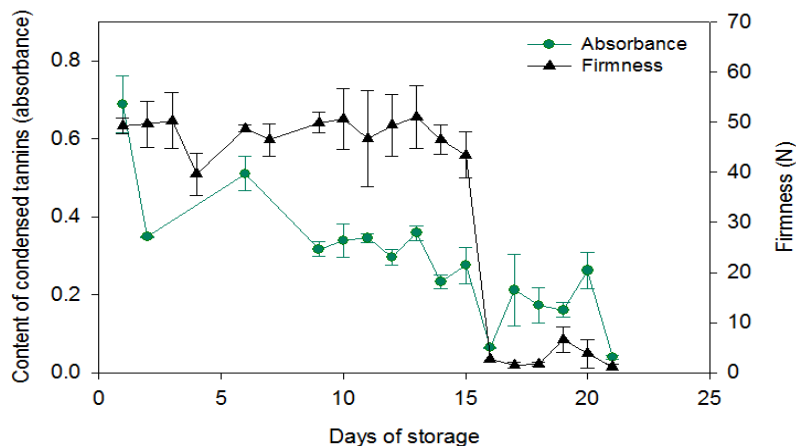


Figure 2. Condensed tannins content (absorbance) and firmness of the flesh in mamey sapote fruits during ripening at 12 °C. Bars represent the mean \pm standard deviation of $n = 3$.

Figura 2. Firmeza de la pulpa y contenido de taninos condensados (absorbancia) en fruto de zapote mamey durante su maduración a 12 °C. Las barras representan la desviación estándar de la media de tres frutos.

tannins at consumption maturity, which give them their particular taste and flavor.

The behavior of PAs by vanillin and DMAC methods showed the same pattern as that of the TSP, when fruits passed from preclimacteric stage (stage 1) to horticultural maturity (stage 2) through ripening, however the values of PAs were lower, and in general, they were less variable than TSP, particularly in the period between days 1 and 15 of storage. The values of PAs by the vanillin method were higher and more variable than that of DMAC (Figure 3).

The differences in the content of PAs between the two methods may be due to the predominance of different types of PAs in each maturity stages and to the particular affinity of each method for specific types of PAs. The DMAC method detects more accurately monomers of flavan-3-ols, and reacts only with terminal units, so it does not discriminate between monomers, dimers or trimers (Hummer & Schreier, 2008). Catechin and epicatechin react easily with the DMAC reagent in comparison with that of oligomeric PAs (Li *et al.*, 1996) which have more affinity for the vanillin reagent, especially that with *m*-oriented hydroxyl groups (Hageman *et al.*, 1997). Neither of both methods is specific for condensed tannins

su madurez de consumo hortícola, los que contribuyen a su sabor particular.

El comportamiento de las PAs cuantificadas por los métodos de vainillina y DMAC mostró el mismo patrón que los TSP, cuando los frutos pasaron del estado de preclimaterio (estado 1) a madurez hortícola (estado 2) durante su maduración. Sin embargo, los valores de PAs fueron más bajos y en general, menos variables que los TSP, particularmente en el periodo comprendido entre el día 1 y 15 de almacenamiento. Los valores de PAs por el método de vainillina fueron más altos y más variables que los obtenidos con el método DMAC (Figura 3).

Las diferencias en el contenido de PAs entre los dos métodos podrían deberse a la predominancia de diferentes tipos de PAs en cada etapa de maduración y a la afinidad particular de cada método por un tipo específico de PAs. El método DMAC es más específico para monómeros de flavan-3-ols, y reacciona solamente con unidades terminales, por lo que no discrimina entre monómeros, dímeros o trímeros (Hummer & Schreier, 2008). La catequina y epicatequina reaccionan fácilmente con el reactivo del método DMAC en comparación a cómo lo hacen las PAs oligoméricas (Li *et al.*, 1996), las que tienen mucho mayor afinidad por el reactivo del método de vainillina, especialmente aquellas con grupos hidroxilo *m*-orientados. (Hageman *et al.*, 1997).

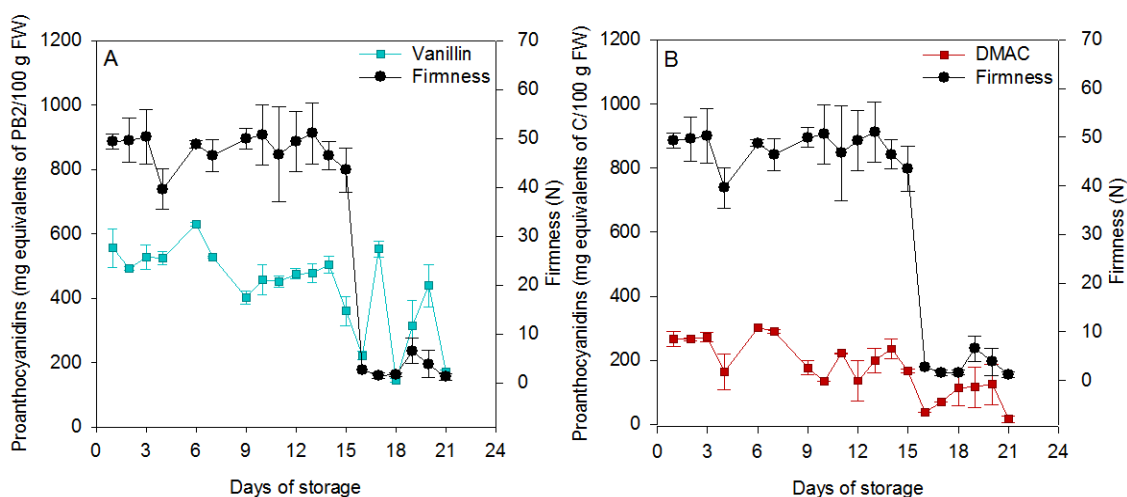


Figure 3. Proanthocyanidins content with the methods of vanillin (A) and DMAC (B) in mamey zapote fruits stored at 12 °C. Bars represent the mean \pm standard deviation of $n = 3$ fruit.

Figura 3. Contenido de proantocianidinas con los métodos de vainillina (izquierda) y DMAC (derecha) en fruto de zapote mamey durante su maduración a 12 °C. Las barras representan la desviación estándar de la media de tres frutos.

(proanthocyanidins polymer), since any monomer of flavanol reacts in the assay (Dykes & Rooney, 2006).

The values of PAs obtained with the DMAC method are similar to those reported for apple 'Red Delicious' (162 ± 10 mg 100 g⁻¹ fresh fruit) and red grapes (54 ± 4.2 mg 100 g⁻¹ of fresh fruit) (Hellström & Mattila, 2008). According to the values of PAs obtained with vanillin method, mamey sapote contains more PAs than the aforementioned fruits. In addition, the values of PAs found in mamey sapote were similar to those reported in the fruit of persimmon, that ranged from 61.2 to 91.5 mg of catechin equivalents per gram of dry weight (DW) with DMAC method, and from 3.15 to 4.03 mg of catechin equivalents per gram DW, with vanillin method (Zou *et al.*, 2012). It is noteworthy that in mamey sapote the content of PAs determined with the vanillin method is much higher than that with the DMAC method at ripening stage 2. This pattern is contrary to what has been reported for persimmon. These results suggest that in mamey sapote the oligomeric PAs, associated with diverse health benefits (Gorinstein *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2012;), could represent a rich source of these phytochemicals in fruit which are not commonly predominant in other fruit species in which monomeric PAs predominate as persimmon.

Table 1 summarizes the average results of dry matter, fruit firmness and phenolic compounds content for the two ripening stages studied. Dry matter of the flesh of mamey sapote fruit slightly increased with ripeness which means that it was less juicy. In stage 1, the fruit of mamey sapote had high values of TSP and PAs, but in horticultural maturity (stage 2) these values decreased significantly. From stage 1 to stage 2, TSP was reduced 2.1 times; PAs content determined by DMAC was reduced 2.8 times, while PAs with the vanillin method was reduced 1.6 times. Considering the specificity of DMAC and vanillin methods toward a particular type of PAs, these results mean that at horticultural maturity (stage 2), the mamey sapote fruit has predominance of oligomeric PAs. However, it is necessary to run new studies to determine the chemical structures of these compounds, and even more important, to evaluate their biological activities.

Proanthocyanidins analysis by HPLC

In the ethyl acetate fraction (EAF), the phenolic compounds identified were: gallic acid (GA), catechin (CAT), epicatechin (EPC), and epicatechin 3-gallate (EPCG). The contents of GA, CAT, EPC and EPCG did not show statistical differences ($p < 0.05$) between preclimacteric

Ninguno de estos dos métodos es específico para taninos condensados (proantocianidinas poliméricas), dado que cualquier monómero de flavanol reacciona en el ensayo (Dykes & Rooney, 2006). Los valores de PAs obtenidos con el método DMAC son similares a los reportados para manzana "Red Delicious" (162 ± 10 mg 100 g⁻¹ de fruta fresca) y uva roja (54 ± 4.2 mg 100 g⁻¹ de fruta fresca) (Hellström & Mattila, 2008). De acuerdo con los valores de PAs obtenidos con el método de vainillina, el fruto de zapote mamey contiene más PAs que los frutos antes mencionados. Además, los valores de PAs encontrados en zapote mamey son similares a los reportados en el fruto de persimmonio, que varían desde 61.2 hasta 91.5 mg equivalentes de catequina por gramo de peso seco (DW) con el método DMAC, y desde 3.15 hasta 4.03 mg equivalentes de catequina por gramo de DW, con el método de vainillina (Zou *et al.*, 2012). Cabe destacar que, en zapote mamey el contenido de PAs determinado con el método de la vainillina es mucho mayor que con el método DMAC, en la etapa de maduración 2. Este patrón es contrario a lo que se ha informado para persimmonio. Estos resultados sugieren que el zapote mamey podría representar una fuente rica de PAs oligoméricas, las cuales se asocian con diversos beneficios para la salud (Gorinstein *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2012), y que no son comunes en la mayoría de los frutos, ya que aún en el persimmonio las que predominan son las PAs monoméricas.

En la Tabla 1 se resumen los resultados promedio sobre materia seca, firmeza de fruto y compuestos fenólicos para los dos estados de maduración del fruto estudiados. La materia seca de la pulpa del zapote mamey se incrementa ligeramente con la maduración del fruto. En el estado 1, el fruto de zapote mamey presentó altos valores de TSP y PAs, pero en madurez hortícola (estado 2), estos valores decrecieron de forma significativa. Como se mencionó en párrafos anteriores, del estado 1 al 2, los TSP se redujeron 2.1 veces; el contenido de PAs determinado por DMAC fue reducido 2.8 veces, mientras que las PAs obtenidas con el método de vainillina fueron reducidas 1.6 veces. Considerando la especificidad de los métodos de DMAC y vainillina hacia un tipo particular de PAs, estos resultados significan que en madurez hortícola (estado 2), en el fruto de zapote mamey predominan PAs oligoméricas. Sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios para determinar la estructura química de estos compuestos, y más aún, evaluar sus actividades biológicas.

Análisis de proantocianidinas por HPLC-DAD

En la fracción de etil acetato (EAF) los compuestos fenólicos identificados fueron: ácido gálico (GA), catequina (CAT), epicatequina (EPC), y epicatequina 3-galato (EPCG). Los contenidos de estos compuestos fenólicos (GA, CAT, EPC

Table 1.
Dry matter, firmness of pulp, and content of phenolic compounds in mamey sapote fruit during ripening at 12 ± 1°C.

Tabla 1.
Materia seca, firmeza de pulpa y contenido de compuestos fenólicos en fruto de zapote mamey durante su maduración a 12 ± 1 °C.

Ripening stages	% Dry matter	Firmness (N)	TSP [¶]	Proanthocyanidins (PAs)	
				DMAC [§]	Vanillin [‡]
Preclimacteric stage					
Stage 1 (1-15 days)	26.4±5.1	47.8 a	1298.0 a	223.5 a	486.0 a
horticultural maturity					
Stage 2 (16-21 days)	30.4±7.2	2.9 b	622.5 b	79.9 b	307.1 b
HSD		3.1	386.9	58.9	108.9

¶: TSP= total soluble phenols obtained with the Folin-Ciocalteu method (mg GAE 100 g⁻¹ FM). §: expressed in mg CE 100 g⁻¹ FW. ‡: expressed in mg PB2E 100 g⁻¹ FW. HSD: honest significant difference.

¶: TSP= fenoles solubles totales obtenidos con el método de Folin-Ciocalteu (mg GAE 100 g⁻¹ FM). §: expresados en mg CE 100 g⁻¹ peso fresco (FW). ‡: expresados en mg PB2E 100 g⁻¹ FW. HSD: diferencia significativa honesta.

stage (stage 1) and horticultural maturity (stage 2) (Table 2). However, a compound of low polarity and therefore with a high retention time, was observed in a high proportion in relation to the identified phenolic compounds. This compound, named P6, was the most abundant in the EAF and showed a gradual increase throughout the ripening process, with values in stage 2 that were almost double than those in stage 1 (Table 2). P6 was tentatively identified as a dimer of epicatechin/chatechin according to its UV spectrum and its retention time (26.5 min). Previously, Yahia *et al.* (2011) identified a dimer of epicatechin in fruit of mamey sapote through mass spectrometry analysis, which could be the compound, P6, identified in our study. None of the samples analyzed in this study contained galocatechin that was reported to be in high amounts in mamey sapote fruit cultivar Magaña (Ma *et al.*, 2004). The lack of information about the cultivar or genotype used in the majority of the studies on sapote mamey fruit makes it difficult to assess reliably a comparison of results.

One should note that with the exception of GA, the PAs CAT, EPC and EPGC quantified by HPLC would be preferentially determined by the DMAC method. The fact that total PAs analyzed by the DMAC method showed a

y EPCG) no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) entre los estados de preclimaterio (estado 1) y la madurez hortícola (estado 2) (Tabla 2). Sin embargo, un compuesto de baja polaridad y por tanto con un elevado tiempo de retención, se observó en proporción elevada con relación a los compuestos fenólicos identificados. Este compuesto, denominado como P6, mostró un incremento gradual a través del proceso de maduración, con valores en el estado 2 que fueron casi el doble de lo observado en el estado 1 (Tabla 2). El compuesto (P6) fue tentativamente identificado como un dímero de epicatequina/catequina, de acuerdo con su espectro de UV y su tiempo de retención (26.5 min). Previamente, Yahia *et al.* (2011), mediante la técnica de espectroscopía de masas, identificaron un dímero de epicatequina en el fruto maduro de zapote mamey, el cual podría corresponder al compuesto P6 observado en el presente estudio.

En ninguna de las muestras analizadas se presentó galocatequina, compuesto fenólico observado en grandes cantidades en la pulpa de zapote mamey cultivar Magaña por Ma *et al.* (2004). La falta de información sobre el cultivar o el genotipo utilizado en la mayoría de los estudios sobre el fruto de sapote mamey dificulta la comparación de resultados.

Debe notarse que, con excepción del GA, los compuestos CAT, EPC y EPGC, cuantificados por HPLC, son PAs

Table 2.
Content of phenolic compounds in two stages of fruit ripening of mamey sapote fruit analyzed by HPLC-DAD.

Tabla 2.
Contenido de compuestos fenólicos en dos estados de madurez de fruto de zapote mamey, analizados por HPLC-DAD.

Ripening stages	GA [†]	CAT	EPGC	EPC	P6
Preclimacteric stage					
Stage 1 (1 -15 days)	4.37 a	4.26 a	0.72 a	3.00 a	26.90 a
Horticultural maturity					
Stage 2 (16 - 21 days)	7.75 a	5.45 a	0.58 a	5.14 a	49.92 b
HSD	2.61	3.35	0.67	4.00	16.17

†:GA: gallic acid, CAT: catechin, EPGC: epicatechin 3-gallate, EPC: epicatechin, P6: Peak with retention time of 26.5 min; data is expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ FW. HSD: honest significant difference.

†:GA: ácido gálico, CAT: catequina, EPGC: epicatequín 3-galato, EPC: epicatequina, P6: Pico con un tiempo de retención de 26.5 min; dato expresado en $\mu\text{g g}^{-1}$ tejido fresco (FW); HSD: diferencia significativa honesta.

significant decrease during the transition from stage 1 to stage 2, might suggest that additional PAs compounds not quantified in the current work might be responsible for the observed changes.

Enzymatic activity

The activity of the PPO enzyme had a continuous increment during storage, rising from 61.6 (± 27.2) U g⁻¹ at preclimacteric stage (stage 1) to 182.2 (± 59.4) U g⁻¹ at horticultural maturity (stage 2). In the case of POD, the activity remained at a low value during stage 1, but showed a notable increment during stage 2, changing from 633.6 (± 183.9) U g⁻¹ at preclimacteric stage to 7235 (± 1139.3) U g⁻¹ at horticultural maturity (Figure 4). PPO catalyzes the conversion of phenols to o-diphenols through hydroxylation and conversion of o-dihydroxyphenols to o-quinones through oxidation, resulting in browning of plant tissue (4). POD is another oxidoreductase enzyme involved in plant tissue browning, since it also oxidizes diphenols as substrates (Mdluli, 2005), and could act synergistically with PPO due to formation of hydrogen peroxide during the PPO oxidation activity (Luo & Xie, 2012).

Of the color parameters monitored during the ripening process of mamey sapote fruit, only the luminosity

monoméricas, determinadas con el método DMAC. El hecho de que las PAs totales cuantificadas con el método DMAC decrecieran de manera significativa durante la transición del estado 1 al 2, podría sugerir que otras PAs no cuantificadas en el presente trabajo podrían ser las responsables de los cambios observados.

Actividad enzimática

La actividad enzimática de la PPO mostró un incremento continuo durante el almacenamiento y maduración del fruto, y cambió de 61.6 (± 27.2) U g⁻¹ en estado preclimaterico (estado 1) a 182.2 (± 59.4) U g⁻¹ en madurez hortícola (estado 2). En el caso de la POD, la actividad permaneció en bajos niveles durante el estado 1, pero con un notable incremento durante el estado 2, al cambiar de 633.6 (± 183.9) U g⁻¹ en estado de preclimaterio a 7235 (± 1139.3) U g⁻¹ en madurez hortícola (Figura 4). La PPO cataliza la conversión de fenoles a o-difenoles a través de la hidroxilación y conversión de o-hidroxifenoles a o-quinonas por medio de la oxidación, lo que resulta en oscurecimiento del tejido vegetal (Aydemir, 2004). La POD es otra enzima oxidoreductasa involucrada en el pardeamiento de tejido vegetal, ya que también oxida difenoles como sustrato (Mdluli, 2005), y podría actuar sinérgicamente con la PPO debido a la formación de peróxido de hidrógeno durante la actividad oxidativa de la PPO (Luo & Xie, 2012).

De los parámetros de color, medidos durante el proceso de maduración de los frutos de zapote mamey

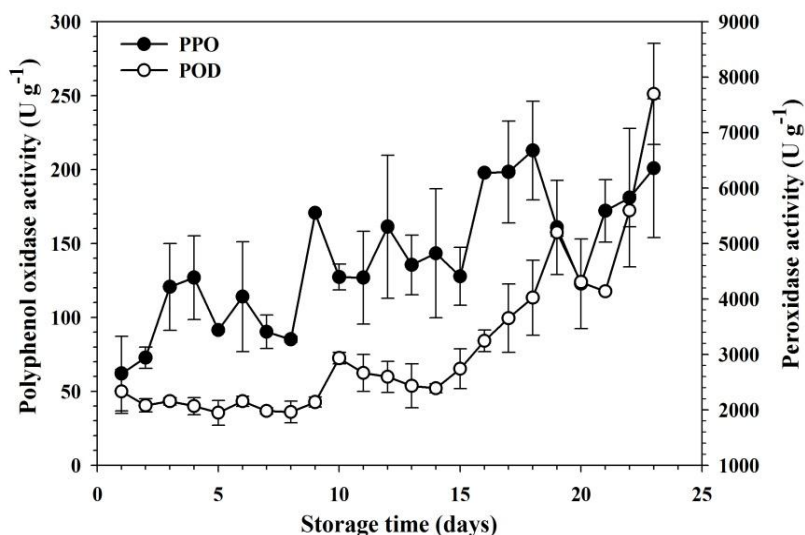


Figure 4. Variation in the activity of the polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) enzymes during the ripening process of mamey sapote fruit stored at 12 °C. Bars represent the mean \pm standard deviation of $n = 3$.

Figura 4. Variación de la actividad de las enzimas polifenoloxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) durante el proceso de maduración de fruto de zapote mamey almacenado a 12 °C. Las barras representan la desviación estándar de la media de tres frutos.

showed changes during the ripening process. This variable exhibited a reduction from day 15 of storage (data not showed) that coincided with the increase in POD activity.

almacenados, únicamente la luminosidad mostró cambios. Esta variable mostró una reducción a partir del día 15 de almacenamiento (datos no mostrados), que coincide con el incremento de la actividad de la POD.

Conclusions

The degree of maturity of the mamey sapote based in flesh firmness of the fruit is related to the content and type of proanthocyanidins. According to the results obtained by DMAC and vanillin analytical methods, zapote mamey is an important source of proanthocyanidins, with predominance of the oligomeric type. Of the enzymes analyzed during the maturation process, the polyphenol oxidase gradually increased its activity, while the peroxidase detonated its activity from the fall of the firmness of the fruit. A significant inverse correlation ($r = -0.4385$) was observed between the content of total soluble phenols and the activity of the

Conclusiones

El grado de madurez del zapote mamey basado en la firmeza de la pulpa del fruto está relacionado con el contenido y el tipo de proantocianidinas. De acuerdo con los resultados obtenidos por los métodos analíticos de vainillina y DMAC, el zapote mamey es una fuente importante de proantocianidinas, con predominio del tipo oligomérico. De las enzimas analizadas durante el proceso de maduración, la polifenol oxidasa incrementó su actividad gradualmente, mientras que la peroxidasa detonó su actividad con la caída de la firmeza del fruto. Se observó una correlación inversa significativa ($r = -0.4385$) entre el contenido de fenoles solubles totales

polyphenol oxidase but the correlation with peroxidase was not significant.

y la actividad de la polifenol oxidasa, pero la correlación con la peroxidasa no fue significativa.

References

- Alia-Tejagal, I., Colinas-León, M. T., Martínez-Damián, M. T. and Soto-Hernández, R. H.M. (2005a). Análisis preliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8: 225-231. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2004.04.025>
- Alia-Tejagal, I., Colinas-León, M. T., Martínez-Damián, M. T. and Soto-Hernández, R. M. (2005b). Daños por frío en zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and stearn). II. Cambios en fenoles totales y actividad enzimática. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28: 25–32.
- Alia-Tejagal, I., Colinas-León, M. T., Martínez-Damián, M. T. and Soto-Hernández, R. M. (2002). Factores fisiológicos, bioquímicos y de calidad en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) durante poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 8: 263-281. https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/33308482/cd350f9cdb9a0ddabd70af5219f84e87.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DFACTORES_FISIOLOGICOS_BIOQUIMICOS_Y_DE_C.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190625%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4-request&X-Amz-Date=20190625T172419Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=f93769f2684ea2086ff91375527d66d6c6dfc56b9ef237ed6c849594b45ded097
- Aydemir, T. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry* 87: 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.017>
- Cabrera, C., Giménez, R. and López, M. C. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4427-4435. <https://doi.org/10.1021/jf0300801>
- Dykes, L. & Rooney, L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 44: 236-251. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2006.06.007>
- Flurkey, W. H. & Jen, J. J. (1978). Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. *Journal of Food Science*, 43: 1826-1828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb07424.x>
- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Jesion, I., Namiesnik, J., Drzewiecki, J., Park, Y. S., Ham, S. K., Giordani, E. and Trakhtenberg, S. (2011). Influence of two cultivars of persimmon on atherosclerosis indices in rats fed cholesterol-containing diets: Investigation in vitro and in vivo. *Nutrition*, 27: 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.08.015>
- Hageman, A. E., Zhao, Y. and Johnson, S. (1997) Methods for determination of condensed and hydrolysable tannins. In: Antinutrients and Phytochemicals in Foods, ed. by Fereidoon S. American Chemical Society, Washington DC, pp. 170-81. <https://doi.org/10.1021/bk-1997-0662.ch012>
- Hellström, J. K. & Mattila, P. H. (2008). HPLC determinations of extractable and un-extractable proanthocyanidins in plant material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7617-7624. <https://doi.org/10.1021/jf801336s>
- Hummer, W. & Schreier, P. (2008). Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition Food Research*, 52: 1381-1398. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700463>
- Lamikanra, O. (1995). Enzymatic browning of Muscadine grape products. In: Enzymatic Browning and its Prevention. Lee, C. L. and J. R. Whitaker, eds., ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington D.C. pp. 166-177.
- Lee, A. Y., Chon, E. J. and Yokozawa, T. (2010). Oligomeric proanthocyanidins improve memory and enhance phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 in senescence-accelerated mouse prone/8. *British Journal of Nutrition*, 103:479–489. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992005>
- Li Y. G., Tanner G. and Larkin P. (1996). The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *Journal of Science Food and Agriculture*, 70: 89–101. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199601\)70:1<89::AID-JSFA470>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199601)70:1<89::AID-JSFA470>3.0.CO;2-N)
- Luo, Y. W. & Xie, W. H. (2012). Influence of polyphenol oxidase, peroxidase and organic acids on the in vitro iron bioavailability in faba bean flour. *CyTA Journal of Food*, 10: 123–127. <https://doi.org/10.1080/19476337.2011.597513>

- Ma, J., Yang, H., Basile, M. J. and Kennelly, E. J. (2004). Analysis of polyphenolic antioxidants from fruit of three: *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5873–5878. <https://doi.org/10.1021/jf049950k>
- Mdluli, K. M. (2005). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). *Food Chemistry*, 92: 311-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.026>
- Porter, L., Hrstich, J. L. N. and Chan, B. G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 1: 223-230. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)
- Prior, R. L., Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M. J. and Reed, J. (2010). Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9): 1473–1478. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3966>
- Saucedo-Veloz, C., Martínez-Morales, A., Chávez-Franco, S. H. and Soto-Hernández, R. M. (2001). Maduración de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq) H.E. Moore & Stearn). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 24: 231-234. <https://www.redalyc.org/pdf/610/61024213.pdf>
- SAS. Institute Inc. (2002). SAS/STAT® User's Guide, Version 9.0, SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Schofield, P., Mbugna, D. M. and Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 21-40. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). (2016). Producción agrícola ciclo perenes. Mamey. <http://www.siap.gob.mx/> [Last checked February 2016].
- Silva, C. A. M., Simeoni, L. A. and Silveira, D. (2009). Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. *Brazilian Journal of Pharmacology*, 19: 501-509. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300025>
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture* 16: 144-58. <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144.short>
- Stratil, P., Klejdus, B. and Kuban, V. (2007). Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta*, 71: 1741-1751. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.08.012>
- 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: 1956–1961. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.045>
- Sun, B., Ricardo-Da-Silva, J. M. and Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4267–4274. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>
- Wang, J., Ho, L., Blount, J., Janle, E. M., Gong, B., Pan, Y., Nagana, G. G. A., Raftery, D., Arrieta-Cruz, I., Sharma, V., Cooper, B., Lobo, J., Simon, J. E., Zhang, C., Cheng, A., Qian, X., Ono, K., Teplow, D. B., Pavlides, C., Dixon, R. A. and Pasinetti, G. M. (2012). Brain-targeted proanthocyanidins metabolites for Alzheimer disease treatment. *Journal of Neuroscience*, 32: 5144-5150. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6437-11.2012>
- Wallace, T. C. & Giusti, M. M. (2010). Evaluation of parameters that affect the 4-dimethylaminocinnamaldehyde assay for flavanols and proanthocyanidins. *Journal of Food Science*, 75: C619-C625. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01734.x>
- Watada, A. E., Herner, R. C., Kader, A. A., Roman, R. J. and Staby, G. L. (1984). Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *HortScience* 19: 20-21.
- Yahia, E. M., Gutiérrez-Orozco, F. and Arvizu-de León, C. (2011). Phytochemical and antioxidant characterization of mamey (*Pouteria sapota* Jacq. H.E. Moore & Stearn) fruit. *Food Research International*, 44: 2175–2181. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.029>
- Zou, B., Li, C. M., Chen, J. Y., Dong, X. Q., Zhang, Y. and Du, J. (2012). High molecular weight persimmon tannin is a potent hypolipidemic in high-cholesterol diet fed rats. *Food Research International*, 48: 970-977. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.024>