

# **EFFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES POSTCOSECHA EN LA COMPOSICIÓN DE CAROTENOIDES Y VITAMINA C EN FRUTOS DE POMELO ROJO (*Citrus paradisi* cv. STAR RUBY)**

Marta Pascual, Joanna Lado<sup>1</sup>, Lorenzo Zacarías<sup>1</sup>, M<sup>a</sup>Jesús Rodrigo<sup>1</sup>

**RESUMEN:** El contenido en carotenoides y vitamina C en los frutos cítricos son importantes atributos de calidad organoléptica y nutricional. La conservación refrigerada y el tratamiento con etileno son prácticas postcosecha habituales en estos frutos. En este estudio se ha comprobado que los frutos de pomelo Star Ruby (SR) almacenados hasta 8 semanas a 12°C alcanzan concentraciones de carotenoides totales en la piel entre 3-4 veces superiores a las de frutos mantenidos a 2°C. A 12°C se produjo una acumulación de los carotenos lineales previos al licopeno y una disminución de los carotenoides derivados de éste. El contenido en vitamina C en la piel también se incrementó ligeramente en los frutos conservados a 12°C. En la pulpa, sin embargo no se observaron cambios significativos en los contenidos de estos compuestos a ninguna de las temperaturas ensayadas. En los frutos de pomelo SR la ausencia de luz (tapado) durante su desarrollo aumenta los carotenoides en la piel. Además, la aplicación postcosecha de etileno estimuló la acumulación de carotenoides en la piel, entre 1,5 y 2 veces respecto a los tratados con aire, tanto en frutos tapados como no tapados. La concentración de licopeno se incrementó considerablemente por la aplicación de etileno en los frutos tapados. En la piel de los frutos tapados, sin embargo, se produjo una menor acumulación de vitamina C y el tratamiento con etileno no afectó a este metabolito en ningún tipo de fruto. Por otro lado, en la pulpa tampoco se detectó un efecto claro del etileno en el contenido de carotenoides y de vitamina C.

**PALABRAS CLAVE:** pomelo Star Ruby, carotenoides, etileno, vitamina C, frutos cítricos, postcosecha

**ABSTRACT:** The content of carotenoids and vitamin C in citrus fruits are important attributes of organoleptic and nutritional quality. Common postharvest practices are storing these fruits in a refrigerated area and ethylene treatments. In this study, it was found that the grapefruit Star Ruby (SR), stored up to 8 weeks at 12°C reaches total higher concentrations of carotenoids in the skin. It reaches between 3-4 times higher than in fruit kept at 2°C. An accumulation of the linear carotenes was produced at 12°C prior to the lycopene and a decrease of the carotenoids that were derived from the lycopene. The content of vitamin C in the skin also increased slightly in the fruit stored at 12°C. However, in the flesh, no significant changes were observed in the contents of these compounds at any of the tested temperatures. In the grapefruit SR, the absence of light (it was covered) for

---

<sup>1</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos CSIC. Av. Agustín Escardino 7, Paterna (Valencia) 46980

its development increased skin carotenoids. In addition, postharvest application of ethylene stimulated the accumulation of carotenoids in the skin, between 1,5 and 2 times than those treated with air, both covered and non-covered fruit. The lycopene concentration was significantly increased by the application of ethylene in covered fruit. In the skin of the fruits covered, however, there was less accumulation of vitamin C and ethylene treatment did not affect this metabolite in any fruit. Furthermore, in the pulp either ethylene effect was detected in carotenoids and vitamin C content.

**KEYWORDS:** Star Ruby grapefruit, carotenoids, ethylene, vitamin C, citrus fruits, postharvest

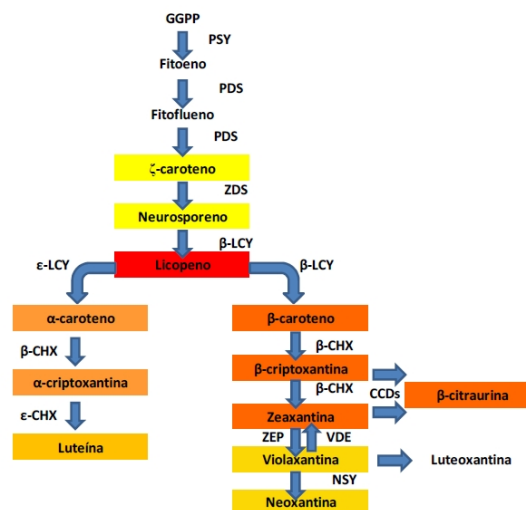
**RESUM:** El contingut en carotenoides i vitamina C en els fruits cítrics són importants atributs de qualitat organolèptica i nutricional. La conservació refrigerada i el tractament amb etilè són pràctiques postcollita habituals en aquests fruits. En aquest estudi s'ha comprovat que els fruits d'aranja Star Ruby (SR) emmagatzemats fins a 8 setmanes a 12°C aconseguen concentracions de carotenoides totals a la pell entre 3-4 vegades superiors a les de fruits mantinguts a 2°C. A 12°C es va produir una acumulació dels carotens lineals previs al licopè i una disminució dels carotenoides derivats d'aquest. El contingut en vitamina C a la pell també es va incrementar lleugerament en els fruits conservats a 12°C. A la polpa, però no es van observar canvis significatius en els continguts d'aquests compostos a cap de les temperatures assajades. En els fruits d'aranja SR l'absència de llum (tapats) durant el seu desenvolupament augmenta els carotenoides a la pell. A més, l'aplicació postcollita d'etilè va estimular l'acumulació de carotenoides en la pell, entre 1,5 i 2 vegades respecte als tractats amb aire, tant en fruits tapats com no tapats. La concentració de licopè es va incrementar considerablement per l'aplicació d'etilè en els fruits tapats. A la pell dels fruits tapats, però, es va produir una menor acumulació de vitamina C i el tractament amb etilè no va afectar a aquest metabòlit en cap tipus de fruit. D'altra banda, a la polpa tampoc es va detectar un efecte clar del etilè en el contingut de carotenoides i de vitamina C.

**PARAULES CLAU:** Aranja 'Star Ruby', carotenoides, etilè, vitamina C, fruits cítrics, postcollita.

## INTRODUCCIÓN

El pomelo rojo ‘Star Ruby’ (*Citrus paradisi*) es una variedad de pomelo de tamaño medio que se caracteriza por presentar tonalidades rosadas o rojas en la piel y pulpa de color rojo intenso (Agustí, 2000). Su carácter subtropical condiciona en gran medida el área de cultivo, por lo que la exportación es de gran importancia comercial. España se situaba en el 2011 como el cuarto exportador de pomelos a la Unión Europea, detrás de USA (Florida), Israel y Turquía. En la temporada 2009-2010 se exportaron más de 43.300 toneladas a la UE y 2.300 a otros países. Dentro de las variedades de pomelo rojo, ‘Star Ruby’ (SR) junto con ‘Rio Red’ son las de mayor importancia comercial en España (<http://www.ailimpo.com/>).

El color de los frutos cítricos es uno de los principales atributos de calidad comercial y un factor determinante en la aceptación por los consumidores (Lado et al., 2013). Los compuestos responsables del color de los frutos cítricos son los carotenoides, que confieren tonalidades que abarcan desde el amarillo al rojo intenso (Gross, 1987). Desde el punto de vista químico, los carotenoides son isoprenoides C<sub>40</sub>, siendo una de sus características más importantes la presencia de numerosos dobles enlaces conjugados en la parte central de la molécula que actúa como cromóforo (Britton, 1995). En las plantas, la biosíntesis de carotenoides se produce en los plastidios, bien en los cloroplastos en los tejidos fotosintéticos, o en los cromoplastos, en los tejidos coloreados. En la Figura 1 se representa un esquema general de la ruta de biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos, indicando las enzimas responsables de cada etapa (Rodrigo et al., 2013).



**FIGURA 1.** Esquema general de la biosíntesis de carotenoides en frutos cítricos. GGPP (geranilgeranil pirofosfato), PSY (fitoeno sintasa), PDS (fitoeno desaturasa), ZDS (ζ-caroteno desaturasa), β-LCY (β-licopeno ciclasa), ε-LCY (ε-licopeno ciclasa), β-CHX (β-caroteno hidroxilasa), ε-CHX (ε-caroteno hidroxilasa), ZEP (zeaxantina epoxidasa), VDE (violaxantina de-epoxidasa), NSY (neoxantina sintasa), CCDs (dioxigenasas de corte de carotenoides).

La diversidad del color de la piel (flavedo) y la pulpa de los frutos de las diferentes especies y variedades de cítricos se debe a las diferencias en el contenido y composición de carotenoides (Gross, 1987). En general, la biosíntesis de carotenoides es más activa en la piel que en la pulpa y, como consecuencia, se acumula una mayor cantidad de carotenoides en la piel (Gross, 1987). Los frutos de pomelo rojo deben su coloración característica principalmente a la acumulación del caroteno rojo licopeno y, en menor proporción, a otros carotenoides anaranjados como el  $\beta$ -caroteno (Alquézar, 2008; Gross, 1987). Además, estos frutos también acumulan cantidades importantes de fitoeno y fitoflueno, que al ser carotenos incoloros no afectan a la coloración del fruto. En general, los carotenos (fitoeno, fitoflueno y licopeno) representan entre el 60 y 90% de los carotenoides totales en los frutos de pomelo rojo. Dentro de las distintas variedades de este pomelo, la variedad SR es una de las que alcanza tonalidades rojas más intensas (Rouseff et al., 1992), y en diferentes trabajos se ha determinado que la concentración de carotenoides totales oscila entre 40-60 y 15-50  $\mu\text{g/g}$  en la piel y la pulpa, respectivamente (Xu et al., 2006; Fanciullino et al., 2006).

Además de la importancia de los carotenoides en la calidad organoléptica de los frutos, estos compuestos también son relevantes en la calidad nutricional, ya que muchos de ellos tienen actividad provitamina A (principalmente,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina) y una elevada capacidad antioxidante. El licopeno es el que mayor capacidad antioxidante presenta debido a la presencia de 11 dobles enlaces conjugados y ausencia de grupos cíclicos en los extremos, que le confieren una mayor capacidad para desactivar radicales libres y capturar oxígeno singlete respecto a otros carotenoides (Omoni y Aluko, 2005; Clinton, 1998). Estudios epidemiológicos han relacionado una ingesta regular de licopeno en la dieta y su acumulación en determinados órganos o tejidos con la reducción del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer de próstata o cáncer de tracto gastrointestinal (Rafi et al., 2013). Muchos estudios hacen referencia a que la variedad SR sobresale por tener una mayor cantidad de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante que otras variedades (Gorinstein et al., 2005).

Así mismo, la coloración del fruto está altamente influenciada por diferentes factores exógenos y condiciones ambientales, entre las que destacan la temperatura y la luz (Casas y Mallent, 1988; Alquézar et al., 2008a). En los frutos cítricos, es conocido el efecto positivo de la luz en el cambio de color, potenciando la acumulación de carotenoides (revisado en Alquézar et al., 2008a). Sin embargo, algunos estudios indican que en el pomelo rojo SR los frutos localizados en el interior de la copa del árbol, donde reciben menor incidencia lumínica, presentan una coloración roja más intensa y mayor contenido en carotenoides (Alquézar, 2008; Lado et al., 2013). La acumulación de licopeno en el pomelo rojo parece deberse a un bloqueo en la ruta de biosíntesis de carotenoides, en concreto en la transformación de licopeno en  $\beta$ -caroteno por la enzima  $\beta$ -licopeno ciclasa-2 ( $\beta$ -LCY2), lo que provoca la acumulación de carotenos anteriores a este paso (fitoeno, fitoflueno y licopeno) y una menor acumulación de xantofilas (Alquézar et al., 2009, 2013).

Por otro lado, la vitamina C, en forma de ácido ascórbico (AAs) o dehidroascórbico (DHA), es un compuesto hidrosoluble que no se acumula en el organismo y, por tanto, es necesario mantener un consumo regular que asegure un aporte nutricional adecuado (Lee y Kader, 2000). Los frutos cítricos, debido a su alto consumo tanto en fresco como en zumo, son una de las principales fuentes de esta vitamina (Cruz-Rus et al., 2012). En la industria alimentaria también se utiliza para la prevención del pardeamiento enzimático, pérdida de aromas y sabores, o para extender la vida útil del producto. Otros usos del AAs son en la elaboración de suplementos vitamínicos, en la alimentación animal o en la industria cosmética (Hancock, 2009). Estudios realizados en tejidos de distintas variedades de frutos cítricos revelan que el contenido en AAs en el flavedo oscila entre 130-374 mg/100 g, que es mayor que en la pulpa (20-70 mg/100 g) (Sinclair, 1984; Martí et al., 2009; Bermejo et al., 2011, Alós et al., 2014). Además de factores endógenos, las condiciones climáticas de crecimiento en el árbol también influyen en el contenido de AAs en los frutos y, en general, cuanto menor intensidad lumínica recibe el fruto durante su desarrollo y maduración, menor es su contenido en vitamina C (Harris, 1975).

Los frutos cítricos una vez recolectados son habitualmente sometidos a diversas condiciones postcosecha, dependiendo del destino o finalidad comercial, que pueden afectar de forma importante al contenido de carotenoides y, por tanto, a la pigmentación externa e interna del fruto, y también de AAs, entre otros parámetros de calidad. Una de las condiciones mejor estudiadas en los frutos cítricos es el efecto de las bajas temperaturas de conservación y su efecto en diferentes compuestos bioactivos. En naranjas 'Navelina', los frutos almacenados a 12°C durante un periodo prolongado (5 a 7 semanas) desarrollaron mayor color en la piel y pulpa, debido a un incremento en la concentración de carotenoides, incluyendo la  $\beta$ -criptoxantina y el apocarotenoide  $\beta$ -citaurina, que son los responsables del color más intenso en la piel de los frutos (Carmona et al., 2012). Por otro lado, a 2°C no se detectaron cambios significativos en la composición de los carotenoides ni en el color de los frutos (Carmona et al., 2012). En mandarinas 'Ortanique' o 'Satsumas', sin embargo, no se observaron cambios importantes en los carotenoides de los frutos conservados a 5-8°C (Cohen et al., 1990; Matsumoto et al., 2009). La temperatura de conservación recomendada para los pomelos es superior a 10°C (Schirra et al., 1992), pero en los tratamientos cuarentenarios contra la mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*) los países importadores exigen periodo de 17 días a  $\leq 2^\circ\text{C}$  (Jatosti, 1997). Los frutos de pomelo son, entre los cítricos, de los más sensibles a desarrollar daños por frío durante la conservación a bajas temperaturas. Estos daños se manifiestan como picados, hendiduras y ennegrecimiento en la piel que deprecian considerablemente la calidad comercial de los frutos (Lafuente y Zacarías, 2006). Por tanto, es de interés conocer cómo afectan las diferentes temperaturas de conservación al color y al contenido en carotenoides en estos frutos.

Generalmente, en todas las frutas y hortalizas las elevadas temperaturas y periodos prolongados de vida postcosecha disminuyen el contenido en vitamina C (Adisa, 1986; Lee y Kader, 2000). Sin embargo, en algunos

cultivos sensibles al frío se producen mayores pérdidas de vitamina C a bajas temperaturas (Lee y Kader, 2000). En general, el contenido en vitamina C disminuye en los frutos cítricos durante el almacenamiento a elevadas temperaturas, sin embargo, las pérdidas respecto a otro tipo de vegetales son menores debido a que el AAs es más estable en las condiciones ácidas presentes en los cítricos (Nagy, 1980).

Por otro lado, los tratamientos de desverdizado con etileno son una práctica habitual en los frutos cítricos de maduración temprana, ya que alcanzan un valor óptimo de maduración interna pero la piel presenta coloración verde característica de frutos inmaduros, no aceptable comercialmente (Porat, 2008). Este tratamiento estimula la síntesis de carotenoides y la degradación de clorofilas en el flavedo, haciendo que el fruto adquiera las tonalidades naranja-rojizas óptimas para su comercialización (Rodrigo y Zacarías, 2007; Chaudhary, 2012). Sin embargo, la mayoría de estudios indican que la desverdización con etileno no parece afectar la síntesis de carotenoides en la pulpa (Matsumoto et al. 2009).

Con los antecedentes, el principal objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de dos condiciones postcosecha de interés; la temperatura de conservación (2°C y 12°C) y el tratamiento con etileno, en la acumulación de carotenoides y el contenido de vitamina C en la piel y la pulpa de frutos de pomelo rojo 'Star Ruby'.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y tratamientos postcosecha**

Dada la estacionalidad de los frutos cítricos, al inicio de este trabajo ya se disponía en el laboratorio de Fisiología y Biotecnología Postcosecha (IATA-CSIC) del material vegetal necesario para llevar a cabo los análisis pertinentes. A continuación se describen los experimentos postcosecha y el material vegetal utilizado en este trabajo.

*Experimento 1.* Frutos de pomelo rojo (*Citrus paradisi*) de la variedad Star Ruby (100 frutos) se recolectaron en el mes de noviembre de una parcela comercial situada en el término de Lliria, con un índice de color externo (a/b) de 0,21 e interno de 1,36 y se transportaron inmediatamente a las instalaciones de la planta piloto del IATA-CSIC. Los frutos se dividieron en dos lotes y se almacenaron durante 8 semanas a 2°C (lote 1) y 12°C (lote 2). En el momento de la cosecha, a las 3 y 8 semanas de conservación se tomaron muestras de flavedo y pulpa, que se congelaron y trituraron en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

*Experimento 2.* Frutos de la misma variedad de pomelo rojo (40 frutos) del Banco de Germoplasma de IVIA (Moncada) se taparon en el mes de Julio con bolsas de plástico negras dejando la parte inferior de la misma abierta a fin de favorecer la aireación, pro evitando la exposición directa a la luz. Los frutos control (no tapados) y los tapados se recolectaron en el mes de diciembre y se dividieron cada uno de ellos en dos lotes. Uno de los lotes

(20 frutos) se mantuvo en atmósfera de aire a 20°C y una HR del 90% durante 6 días, mientras que el segundo lote se expuso a una corriente continua de etileno (5  $\mu\text{L/L}$ ) durante el mismo periodo. A los 2 y 6 días de tratamiento se determinó el color externo de los frutos y se tomaron muestras de flavedo y la pulpa. Las muestras se trituraron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

### **Extracción y cuantificación de pigmentos: carotenoides y clorofilas**

La extracción se realizó a partir de 0,5 g de flavedo y 1,5 g de pulpa siguiendo el procedimiento descrito por Rodrigo et al. (2003) y Alquezar et al. (2008). Brevemente, los carotenoides y clorofilas se extrajeron con metanol, y posteriormente con una mezcla de Tris-HCl (pH 7) y cloroformo. Las diferentes fases orgánicas combinadas se llevaron a sequedad con rotavapor a 40°C y el residuo seco se redisolvió en una mezcla de acetona/éter de petróleo/éter etílico para la determinación de clorofilas totales usando las ecuaciones descritas en Smith y Benítez (1955). Posteriormente, los extractos se saponificaron y los carotenoides se extrajeron repetidamente con una mezcla de éter de petróleo / éter etílico. El extracto de carotenoides totales concentrado se llevó a completa sequedad y se mantuvo en atmósfera de  $\text{N}_2$  a -20°C hasta el momento del análisis. Todos los procesos se realizaron en ausencia de luz para evitar la degradación e isomerización de carotenoides.

### **Separación, identificación y cuantificación de carotenoides por HPLC-PDA**

El extracto de carotenoides totales se disolvió en metanol/acetona/cloroformo (3:2:5) y una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  se inyectó en un sistema de HPLC con bomba cuaternaria acoplado a un detector de fotodiodos (PDA) (Waters). La separación de carotenoides se realizó utilizando una precolumna y columna YMC C<sub>30</sub>, en un gradiente ternario de metanol/agua/metil *tert*-butil éter, según las condiciones descritas por Rodrigo et al. (2003) y Alquezar et al. (2008). La identificación de cada carotenoide se llevó a cabo mediante comparación de los tiempos de retención y de los espectros de absorción respecto a los indicados en la literatura o de los estándares puros disponibles (Rodrigo et al., 2003, 2004). Para la cuantificación se utilizaron curvas de calibrado de fitoeno, fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, luteína,  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina y 8- $\beta$ -apocarotenal (Rodrigo et al., 2006; Alquézar et al., 2008; Rodrigo et al., 2013). El contenido de carotenoides totales se expresó como la suma de los individuales.

### **Análisis de ácido ascórbico (AAs) y dehidroascórbico (DHA)**

El contenido en AAs se determinó siguiendo el protocolo descrito para frutos cítricos (Alós et al., 2014). En resumen, la extracción consistió en la homogeneización de 0,5 de tejido (pulpa o flavedo) usando 5 mL de ácido

metafosfórico al 2%, posteriormente se centrifugó a 4500 rpm a 4°C durante 10 min. Para las muestras de flavedo se realizó una dilución 1:3 con el sobrenadante y ácido metafosfórico 2%, mientras que para las muestras de pulpa se tomó todo el volumen del sobrenadante. El sobrenadante se filtró a través de una columna C18 Sep Pak y seguidamente se diluyó con ácido metafosfórico 2% (1:4, v/v) y se inyectaron 20 µl en un sistema HPLC (Dionex) con software Chromeleon (Dionex) que consta de una columna Ultrabase C18 y un detector de fotodiodos (PDA). La fase móvil consistió en metanol: agua pH 2,5 (15:85, v/v) a un flujo de 0,2 mL/min y la temperatura de la columna se fijó a 35°C. El área del pico cromatográfico (longitud de onda a 248 nm) correspondiente a AAs (7,5 min) se cuantificó mediante una curva de calibrado realizada con AAs disueltos en ácido metafosfórico al 2% abarcando concentraciones entre 1 y 100 µg/mL. El resultado final se expresó en mg de AAs/100 g de peso fresco.

Por otro lado, se tomaron 250 µL del extracto al que se añadió 125 µL de 200 mM DTT preparado en 400 mM Tris-HCl con el objetivo de reducir el DHA de la muestra para su cuantificación. Tras 15 minutos de incubación con DTT, la reacción se detuvo con la adición de 125 µl de ácido ortofosfórico 8,5%, y se procedió a su análisis según está descrito anteriormente.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Efecto de la temperatura de conservación postcosecha sobre el contenido y composición de carotenoides y ácido ascórbico en frutos de pomelo rojo Star Ruby**

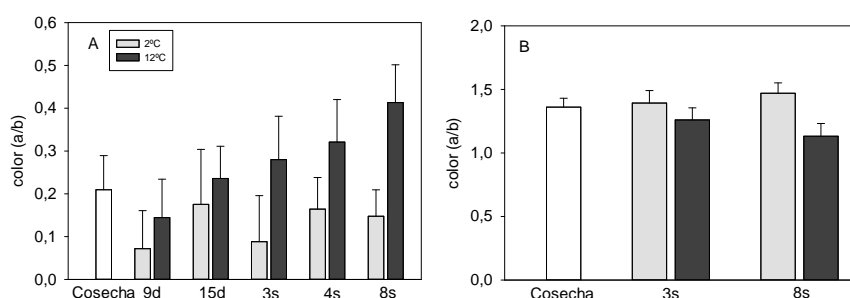
Con el objetivo de determinar la influencia de la temperatura de conservación en la acumulación de carotenoides y el contenido en AAs en frutos de pomelo rojo SR, se cosecharon frutos en el mes de Noviembre y se almacenaron a 2°C y 12°C durante 8 semanas. En la Figura 2 se muestra la apariencia de los frutos al inicio y al finalizar el período de conservación. En el momento de la cosecha, la piel de los frutos presentaba zonas verdes y coloreadas (naranja/amarillo) y tras 8 semanas a 12°C alcanzaron una coloración rojiza uniforme en toda la superficie del fruto, mientras que los almacenados a 2°C presentaron los síntomas característicos del daño por frío (Schirra 1992; Lafuente y Zacarías, 2006), que se localizaron en las zonas verdes de la piel. La coloración de la pulpa no presentó cambios significativos tras el almacenamiento tanto a 2 como a 12°C.





**FIGURA 2.** Apariencia externa e interna de frutos de pomelo SR en el momento de la cosecha (Noviembre) y después de 8 semanas de conservación a 2°C y 12°C.

Después de 8 semanas de conservación el color de la piel de los frutos, determinado como parámetro Hunter *a/b*, fue significativamente mayor en aquellos mantenidos a 12°C (Fig. 3A), mientras que en la pulpa no se observaron diferencias importantes entre las dos temperaturas de conservación (Fig. 3B). El cambio de color de la piel de naranjas y mandarinas a temperaturas refrigeradas intermedias (10-12°C) se atribuye a una estimulación de la biosíntesis y acumulación de carotenoides (Carmona et al., 2012). Además, las temperaturas nocturnas alrededor de 10°C y diurnas de 20°C son las óptimas para inducir el cambio de color durante la maduración natural de los frutos cítricos (Wheaton y Stewart, 1973; Carmona et al., 2012; Mesejo et al., 2012). Los resultados de este trabajo son acordes con los de Chaudhary et al. (2014) en frutos de pomelo SR donde se establece que 11°C es la temperatura mínima para evitar la aparición de daños por frío y el desarrollo de podridos durante un periodo de almacenamiento de al menos 8 semanas



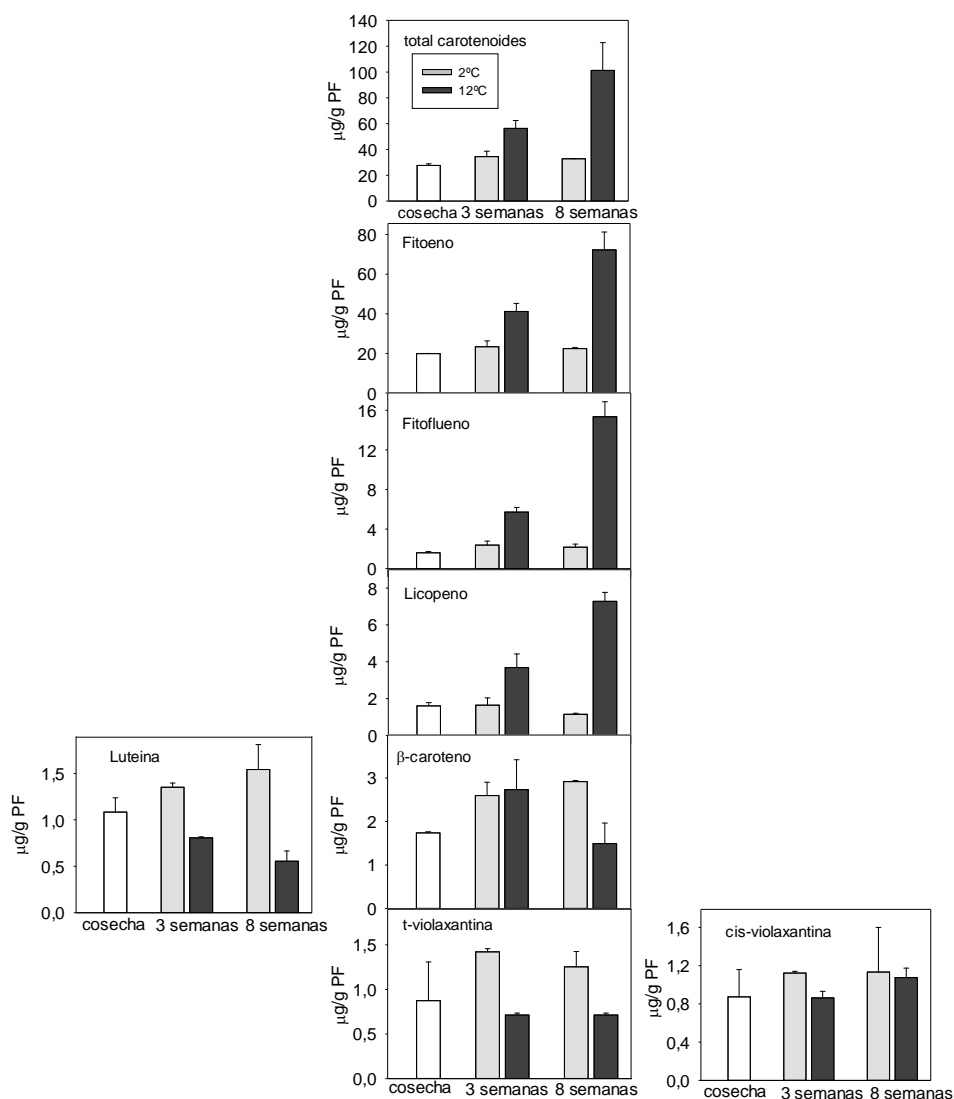
**FIGURA 3.** Cambios en el color de la piel (A) y de la pulpa (B) de frutos de pomelo SR (cosechados en noviembre) durante 8 semanas de conservación a 2°C y 12°C (d,días; s, semanas). El color se expresa como la relación de los parámetros Hunter *a/b*. Los datos corresponden a la media  $\pm$  ds de al menos 10 frutos.

La coloración de los frutos cítricos está determinada fundamentalmente por dos familias de pigmentos, las clorofilas y los carotenoides, cuya

composición y concentración varía a lo largo del desarrollo y maduración del fruto, y puede verse afectada de forma importante durante la vida postcosecha de los cítricos (Rodrigo et al., 2013). Con el objetivo de estudiar el efecto de la temperatura de conservación sobre estos pigmentos se determinó la concentración de clorofilas y de carotenoides totales e individuales en las muestras de piel y pulpa descritas anteriormente. La concentración de clorofilas en la piel en el momento de la cosecha fue de 22,7  $\mu\text{g/g}$  PF, manteniéndose relativamente similar (25,3  $\mu\text{g/g}$  PF) después de 3 semanas a 2°C y disminuyendo a 12°C (9  $\mu\text{g/g}$  PF). No se detectaron concentraciones apreciables de clorofilas en la piel de los frutos almacenados 8 semanas ni en la pulpa, de acuerdo con la tonalidad amarillenta-naranja o rojiza de estos tejidos.

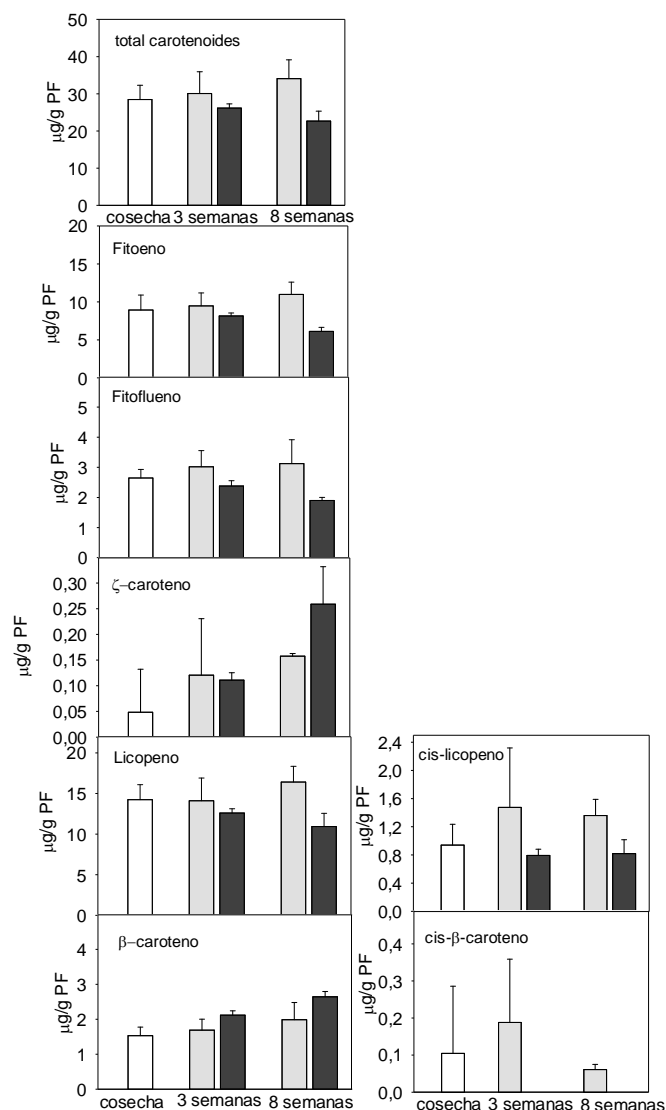
El análisis de la concentración de carotenoides totales en el flavedo mostró un aumento significativo (3-4 veces) en los frutos almacenados a 12°C con respecto a los de 2°C o los iniciales (Fig. 4). Este efecto es similar al descrito en naranjas 'Navelina' y 'Palmer Navel' almacenadas a temperaturas similares (Van Wyk et al., 2009; Carmona et al. 2012). En mandarinas Satsuma también se ha descrito un aumento de carotenoides con la temperatura de almacenamiento (Matsumoto et al., 2009), mientras que en mandarinas 'Or' almacenadas a temperaturas inferiores a 8°C se produjo una importante reducción de la coloración (Tietel et al., 2011).

En cuanto a la composición y proporción relativa de los diferentes carotenoides individuales, la acumulación de carotenos lineales (fitoeno, fitoflueno y licopeno) aumentó en la piel de frutos durante el almacenamiento a 12°C (Fig. 4). Por otro lado, los carotenoides derivados del licopeno ( $\beta$ -caroteno y xantofilas) disminuyeron a esta temperatura, lo que sugiere una mayor reducción de la capacidad  $\beta$ -licopeno ciclasa, responsable de la conversión de licopeno en  $\beta$ -caroteno, en los frutos de pomelo SR en estas condiciones (Alquezar et al., 2009, 2013). De forma similar, en naranjas 'Navelina' el almacenamiento a 12°C también estimuló la acumulación de los carotenos fitoeno y fitoflueno, xantofilas y sus derivados apocarotenoides coloreados (Carmona et al., 2012). En los frutos almacenados a 2°C no se detectaron cambios significativos en el contenido y composición de carotenoides tras 3 y 8 semanas de almacenamiento, tal como se ha descrito en mandarinas 'Satsuma' almacenadas a 5°C (Matsumoto et al., 2009). También se detectaron en la piel otros carotenoides característicos de tejidos verdes, aunque en menor proporción, como el  $\beta$ -caroteno, la luteína y la violaxantina, que fueron en general, menores en los frutos almacenados a 12°C respecto a 2°C (Fig. 4). También, se detectaron trazas de  $\alpha$ -caroteno y la presencia de  $\zeta$ -caroteno en los frutos almacenados a 12°C (datos no mostrados).



**FIGURA 4.** Concentración de carotenoides totales y de los principales carotenoides individuales identificados en la piel de frutos de pomelo rojo SR, en el momento de la cosecha (Noviembre) y después de 3 y 8 semanas de conservación a 2°C (barras grises) y 12°C (barras negras).

Estos resultados parecen indicar que a 12°C existe una estimulación de la biosíntesis y acumulación de carotenos lineales hasta el licopeno, y que el bloqueo en la conversión de licopeno en  $\beta$ -caroteno, que existe en los pomelos rojos (Alquézar et al. 2009, 2013), se mantiene a 12°C, ya que a esta temperatura se acumulan los carotenoides anteriores de la ruta de biosíntesis (fitoeno, fitoflueno y licopeno) y disminuye la concentración xantofilas, que se forman a partir del licopeno (Fig. 4).



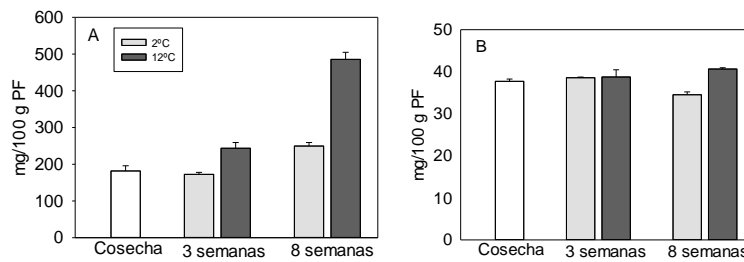
**FIGURA 5.** Concentración de carotenoides totales y de los principales carotenoides individuales identificados en la pulpa de frutos de pomelo rojo SR, en el momento de la cosecha (Noviembre) y después de 3 y 8 semanas de conservación a 2°C (barras gris claro) y 12°C (barras gris oscuro).

Los cambios en carotenoides individuales observados en la pulpa no fueron tan importantes como los descritos en la piel. El contenido total no presentó diferencias importantes entre los frutos recién cosechados y los almacenados a 2°C y 12°C (Fig. 5). En mandarinas Satsumas también se ha descrito que los carotenoides totales en la pulpa no se modifican e incluso se reducen durante el almacenamiento a 5°C (Matsumoto et al., 2009). Sin embargo, en naranjas Navelina se ha descrito un aumento en la proporción de xantofilas en la pulpa (principalmente β-criptoxantina, violaxantina y anteraxantina) tras 5 semanas de almacenamiento a 12°C respecto a 2°C (Carmona et al., 2012), sugiriendo que el efecto de la temperatura en la

pulpa de los frutos cítricos puede ser dependiente de la especie. Entre los carotenoides individuales identificados destacó el licopeno, que fue el más abundante (aproximadamente entre 10 y 15  $\mu\text{g/g}$  PF), seguido del fitoeno (entre 10 y 5  $\mu\text{g/g}$  PF). El fitoflueno y  $\beta$ -caroteno también se detectaron en cantidades destacables (Fig. 5). Otros carotenoides minoritarios identificados en la pulpa fueron un isómero cis del licopeno y el  $\zeta$ -caroteno.

El contenido en AAs es un parámetro de calidad nutricional importante en los frutos cítricos, los cuales se encuentran entre los diez primeros frutos con mayor aporte de AAs a la dieta (Crus-Ruz et al., 2012). Puesto que el DHA puede convertirse fácilmente en AAs en el organismo humano, es importante medir los dos compuestos para determinar la actividad de la vitamina C en frutas y hortalizas (Lee y Kader, 2000). En el presente estudio, se determinaron niveles bajos de DHA (15-19 mg/100 g) en la piel de los frutos de pomelo SR. En cambio, no se detectó la presencia de DHA en la pulpa (datos no mostrados). El almacenamiento a 12°C provocó un aumento de la acumulación de AAs en la piel (Fig. 6A), mientras que no se detectaron cambios en la pulpa (Fig. 6B). A 2 °C el contenido de AAs permaneció prácticamente constante tanto en la piel como en la pulpa. Estos resultados son similares a los descritos en pomelos almacenados a temperatura ambiente o a 9 °C, en los que no se registraron cambios en el contenido de AAs (Chebrolu et al., 2012). Es interesante mencionar que en la piel de los frutos la concentración en AAs fue mayor a 12°C que a 2°C, siendo estos últimos frutos los que manifestaron síntomas de daño por frío (Fig. 2). La presencia de daño por frío se ha relacionado con una disminución acelerada del contenido de AAs, y este fenómeno se puede producir incluso antes de que se manifiesten los síntomas visibles de daño (Miller y Heilman, 1952). Izumi et al. (1984) estudiaron el efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento sobre el contenido de AAs en diferentes cultivos sensibles al frío y observaron que el contenido en AAs disminuyó solamente en los frutos sometidos a la temperatura que produjo daño de frío, indicando una relación entre la sensibilidad o la manifestación de los daños por frío y el contenido de AAs.

En la pulpa de los pomelos no se apreciaron diferencias en el contenido de AAs durante la conservación a 2°C y 12°C (Fig. 6B). Chaudhary et al. (2014) estudiaron la variación del contenido en AAs en zumo de pomelo rojo SR durante 16 semanas de almacenamiento a 2°C y 11°C. La concentración de AAs a las 4 primeras semanas de almacenamiento no sufrió variaciones significativas en concordancia con nuestros resultados. Sin embargo, a las 8 semanas se produjo una leve disminución en los frutos almacenados a 12°C. En el presente trabajo se ha observado una ligera disminución de la concentración de AAs en la pulpa de los frutos almacenados a 2°C respecto a los almacenados a 12°C (Fig. 6B).

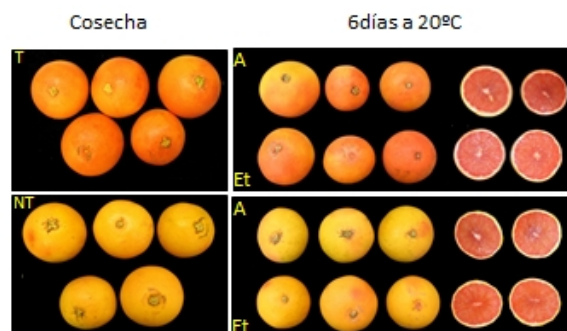


**FIGURA 6.** Cambios en el contenido en AAs en la piel (A) y la pulpa (B) de frutos de pomelo SR en el momento de la cosecha (Noviembre) y después de 3 y 8 semanas de conservación a 2°C (barras gris claro) y 12°C (barras gris oscuro).

## 2. Efecto del tratamiento postcosecha con etileno en frutos de pomelo rojo Star Ruby, tapados y no tapados durante el desarrollo en el árbol, sobre el contenido y composición de carotenoides y AAs.

El tratamiento con etileno a frutos cítricos es una práctica postcosecha habitual en variedades de maduración temprana. Sin embargo, su efecto sobre los pigmentos del pomelo rojo SR y el contenido de AAs es menos conocido (Porat, 2008). Por otro lado, estudios previos indican que la ausencia de luz, mediante tapado o embolsado, durante el desarrollo del fruto de pomelo rojo SR en el árbol, estimula la coloración externa y el contenido en carotenoides (Lado et al., 2014). Por tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto del tratamiento postcosecha con etileno sobre la acumulación de carotenoides y el contenido en AAs en frutos de pomelo rojo SR que habían sido previamente cultivados o no en ausencia de luz (tapados).

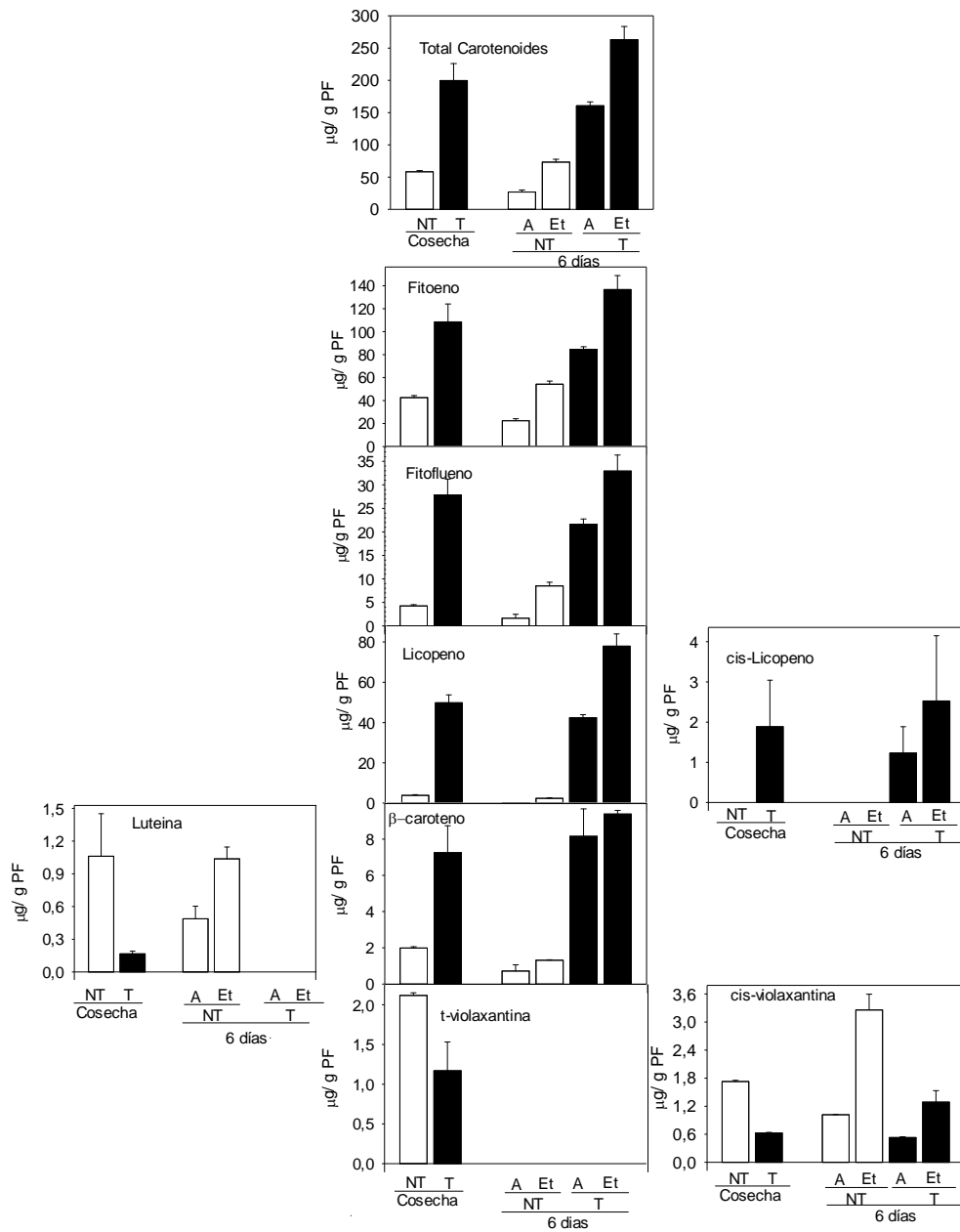
La Figura 7 muestra las diferencias en la coloración externa de frutos de pomelo SR tapados y no tapados y recolectados en el mes de Diciembre. Este tratamiento, sin embargo, no modificó la coloración interna del fruto. La exposición posterior de los frutos tapados y no tapados a etileno tampoco alteró sustancialmente el color respecto a los tratados en aire.



**FIGURA 7.** Apariencia y coloración externa e interna de frutos de pomelo SR tapados (T) y no tapados (NT), en el momento de la cosecha (Diciembre) y después de 6 días de tratamiento a 20°C y 90% HR en una atmósfera de aire (A) o de etileno (5 µL/L).

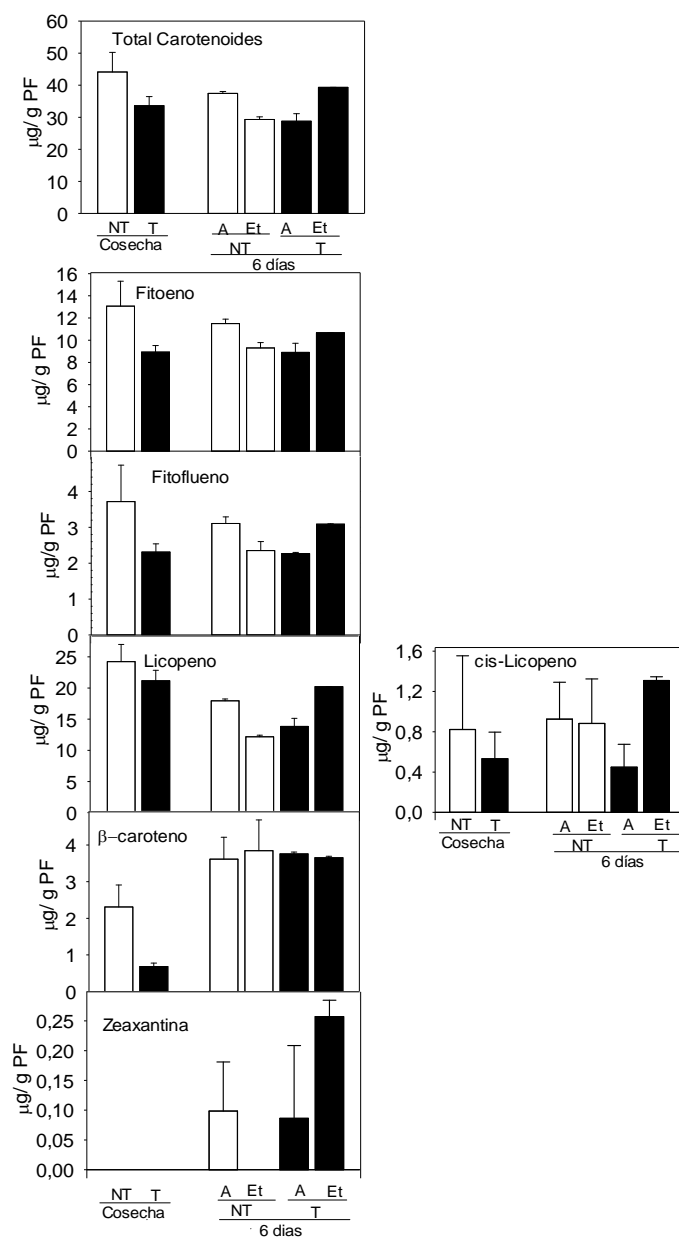
Con el objetivo de profundizar en el efecto del etileno sobre el contenido y composición de pigmentos, se analizaron el contenido en clorofilas y carotenoides totales e individuales. La concentración de clorofilas en los frutos no tapados recién cosechados fue de 19  $\mu\text{g/g}$  PF, mientras que para el resto de muestras el contenido fue despreciable. A pesar de no detectarse diferencias en la coloración externa de los frutos, el tratamiento con etileno estimuló la acumulación de carotenoides totales en la piel de ambos tipos de frutos. Así, los frutos tratados con etileno presentaron entre 1,5 y 2 veces más carotenoides totales que los frutos tratados en aire (Fig. 8). De forma similar, el tratamiento con etileno en mandarinas y naranjas estimula la acumulación de carotenoides y la transcripción de diferentes genes de su biosíntesis (Rodrigo y Zacarías, 2007; Alós et al., 2013). Sin embargo, este efecto del etileno se restringió únicamente a la piel, ya que no se detectaron cambios en el contenido de carotenoides en la pulpa (Fig. 9), de acuerdo con resultados descritos previamente (Porat et al., 2008).

El análisis de carotenoides individuales en la piel mostró que los carotenoides mayoritarios fueron fitoeno, fitoflueno, licopeno y  $\beta$ -caroteno. El tratamiento con etileno estimuló la acumulación de fitoeno, fitoflueno y xantofilas, principalmente *cis*-violaxantina, en la piel de los frutos tapados y no tapados (Fig. 8). Es interesante mencionar que en los frutos tapados también se produjo un aumento importante de la concentración de licopeno (2 veces) en respuesta al etileno (Fig. 8). Estos resultados son similares a los descritos en mandarinas Satsuma o naranjas Navelate, donde el etileno estimuló la acumulación de carotenoides lineales (fitoeno y fitoflueno) y xantofilas ( $\beta$ -criptoxantina, violaxantina) en la piel (Rodrigo y Zacarías, 2007; Matsumoto et al., 2009). Por otro lado, y al igual que ocurrió con los carotenoides totales, no se detectaron efectos consistentes del tratamiento con etileno sobre los carotenoides individuales en la pulpa (Fig. 9), al igual que se ha descrito en frutos de otras variedades de cítricos (Matsumoto et al., 2009).



**FIGURA 8.** Concentración de carotenoides totales y de los principales carotenoides individuales identificados en la piel de frutos de pomelo rojo SR, tapados (T) y no tapados (NT), en el momento de la cosecha (Diciembre) y después de 6 días de tratamiento a 20°C y 90% HR en una atmósfera de aire (A) o de etileno (5  $\mu\text{L/L}$ ).

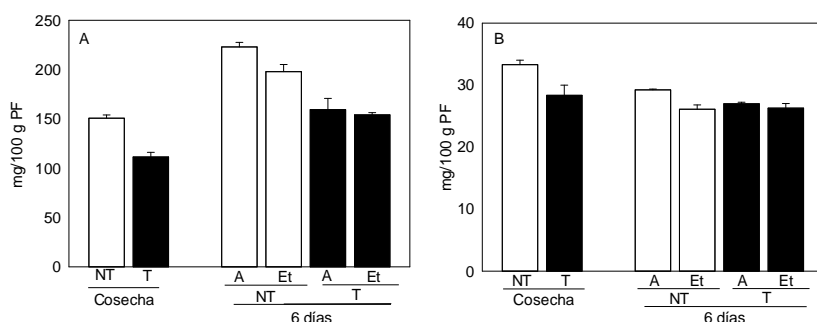




**FIGURA 9.** Concentración de carotenoides totales y de los principales carotenoides individuales identificados en la pulpa de frutos de pomelo rojo SR, tapados (T) y no tapados (NT), en el momento de la cosecha (Diciembre) y después de 6 días de tratamiento a 20 °C y 90% HR en una atmósfera de aire (A) o de etileno (5 µL/L).

La concentración de AAs en la piel y pulpa de frutos tapados y no tapados en el momento de la cosecha y tras el tratamiento postcosecha con etileno se muestra en la Figura 10A. La concentración de AAs en la piel fue en todos los casos ligeramente superior en frutos no tapados que en los tapados (Fig. 10A). A pesar de que la luz no es esencial para la formación del AAs en las plantas, la cantidad e intensidad lumínica que percibe el fruto

en el árbol influye de forma positiva en su acumulación de AAs (Harris, 1975; Lee y Kader, 2000). En la pulpa de los frutos no se observaron cambios importantes en la concentración de AAs tanto entre frutos tapados y no tapados (Fig. 10B). Durante el periodo postcosecha evaluado, el contenido de AAs en la piel de los frutos tapados y no tapados aumentó aproximadamente un 30% respecto al momento de la cosecha, tanto en presencia de etileno como de aire (Fig. 10A). En la pulpa, no se observaron cambios importantes o una ligera disminución en el contenido de AAs respecto a los valores en el momento de la cosecha, coincidiendo con resultados previos (Chaudhary et al., 2012). No se detectaron contenidos significativos de DHA (datos no mostrados).



**FIGURA 10.** Contenido en AAs en la piel (A) y la pulpa (B) de frutos de pomelo SR, tapados (T) y no tapados (NT), en el momento de la cosecha (Diciembre) y después de 6 días de tratamiento a 20°C y 90% HR en una atmósfera de aire (A) o de etileno (5 µL/L).

Estos estudios muestran que el tratamiento con etileno puede utilizarse en pomelo rojo SR como una estrategia interesante para inducir la acumulación de carotenoides en la piel de los frutos, aunque no se refleja directamente en un mayor índice de color, sin afectar negativamente a la calidad nutricional de la pulpa, ya que tanto los carotenoides como el AAs permanecieron prácticamente constantes.

## CONCLUSIONES

1. El almacenamiento prolongado de frutos de pomelo SR a 12°C aumenta el contenido de carotenoides lineales fitoeno, fitoflueno y licopeno en la piel y, al mismo tiempo, disminuye la concentración de xantofilas.
2. La conservación a 12°C incrementó igualmente el contenido en AAs en la piel de los pomelos SR.
3. A 2°C se produjeron daños por frío en la piel de los frutos. A esta temperatura no se modificó sustancialmente el contenido y la composición de carotenoides y se redujo el de AAs.
4. El tratamiento postcosecha con etileno durante 6 días no modificó, respecto al aire, la coloración externa de los frutos de pomelo SR, tanto en los frutos previamente tapados como los no tapados. Sin embargo, el etileno incrementó el contenido de fitoeno, fitoflueno y cis-violaxantina.

5. En los frutos tapados, el tratamiento con etileno aumentó considerablemente el contenido de licopeno en la piel.
6. La concentración de AAs en la piel fue superior en los frutos no tapados que en los tapados en el momento de la cosecha, y se incrementó en todos los casos a 20°C, tanto en aire como en etileno.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adisa, V. A. (1986). The influence of molds and some storage factors on the ascorbic acid content of orange and pineapple fruits. *Food Chemistry* 22(2), 139-146.
- Agustí, M. (2000). Citrucultura. Barcelona: Mundi-prensa.
- Alós, E., Distefano, G., Rodrigo, M. J., Gentile, A., Zacarías, L. (2013). Altered sensitivity to ethylene in "Tardivo", a late-ripening mutant of Clementine mandarin. *Physiologia Plantarum* 151(4), 507–521.
- Alós E., Rodrigo M. J, Zacarías L. (2014). Differential transcriptional regulation of L-ascorbic acid content in peel and pulp of citrus fruits during development and maturation. *Planta* 239, 1113–1128.
- Alquézar B. (2008). Caracterización bioquímica y molecular de la carotenogénesis en frutos cítricos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Alquezar, B., Rodrigo, M. J., Lado, J., & Zacarías, L. (2013). A comparative physiological and transcriptional study of carotenoid biosynthesis in white and red grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Tree Genetics & Genomes* 9(5), 1257-1269.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal* 9, 1551–1558.
- Casas, A., & Mallent, D. (1988). El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, de la variedad y de la temperatura. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 28(2), 184-201.
- Carmona, L., Zacarías, L., & Rodrigo, M. J. (2012). Stimulation of coloration and carotenoid biosynthesis during postharvest storage of 'Navelina' orange fruit at 12 C. *Postharvest Biology and Technology* 74, 108-117.
- Chaudhary, P. R. Jayaprakasha, G. K., Porat, R., & Patil, B. S. (2012). Degreening and postharvest storage influences 'Star Ruby' grapefruit (*Citrus paradisi*) bioactive compounds. *Food Chemistry* 135(3), 1667-1675.
- Chaudhary, P. R., Jayaprakasha, G. K., Porat, R., & Patil, B. S. (2014). Low temperature conditioning reduces chilling injury while maintaining quality and certain bioactive compounds of 'Star Ruby' grapefruit. *Food Chemistry* 153, 243-249.
- Chebrolu K. K., Jayaprakasha G. K., Jifon J., Patil B. S. (2012). Production system and storage temperature influence grapefruit vitamin C, limonoids and carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 7096–7103.
- Clinton, S. K. (1998). Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews* 56 (2), 35-51.
- Cohen, E., Shalom, Y., Rosenberger, I. (1990). Post-harvest behaviour of 'Ortanique' 'Topaz' tangor citrus fruit during long-term storage at various temperatures. *Scientia Horticulturae* 44, 235–240.
- Codoñer-Franch, P. y Valls-Bellés V., (2010). Citrus as functional foods. *Current Topics in Nutraceutical Research*. 8(4), 173-184
- Cruz-Rus E., Amaya I., Valpuesta V. (2012). The challenge of increasing vitamin C content in plant foods. *Biotechnology Journal* 7, 1110–1121.
- Dou, H., (2005). Influence of harvesting time and geographical location on susceptibility to peel disorders associated with four Florida grapefruit cultivars. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 80, 466–470.
- Fanciullino A. L., Dhuique Mayer C., Luro F., Casanova J., Morillon R., Ollitrault P., (2006). Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4397–4406.

- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Drzewiecki, J., Jastrzebski, Z., Tapia, M. S., & Trakhtenberg, S. (2005). Red Star Ruby (Sunrise) and blond qualities of Jaffa grapefruits and their influence on plasma lipid levels and plasma antioxidant activity in rats fed with cholesterol-containing and cholesterol-free diets. *Life Sciences* 77(19), 2384-2397.
- Gross J. (1987). Pigments in fruits. *Academic Press*, London.
- Hancock, R. D. (2009). Recent patents on vitamin C: opportunities for crop improvement and single-step biological manufacture. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 1(1), 39-49.
- Harris, R. S. (1975). Effects of agricultural practices on the composition of foods. In: Harris, R.S., Karmas, E. (Eds.), *Nutritional Evaluation of Food Processing*, 2nd edn. AVI, Westport, CT, pp. 33–57.
- Izumi, H., Tatsumi, Y., Murata, T. (1984). Effect of storage temperature on changes of ascorbic acid content of cucumber, winter squash, sweet potato and potato. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 31, 47–49.
- Jatosti, A., (1997). Possibilita` di esportazione degli agrumi verso il Giappone. *Essenze e Derivative dagli Agrumi*. LXVII1, 181–188.
- Kato M. (2012). Mechanism of Carotenoid Accumulation in Citrus Fruit. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 81, 219–233.
- Lado J, Rodrigo MJ, Zacarias L. (2013). Influencia de la luz en la coloración y maduración de los frutos cítricos. *Levante Agrícola. Especial Postcosecha* 2013, 179-185.
- Lado, J., Cronje, p., Alquézar, B., Page, A., Manzi, M., Gómez-Cadenas A., Stead A.A., Zacarías L. and Rodrigo, M.J. (2014). Fruit shading enhances colour, carotenes accumulation and chromoplast differentiation in Star Ruby grapefruit peel. Enviado, *Journal of Experimental Botany*.
- Lafuente M. T. y Zacarías L. (2006). Postharvest physiological disorders in citrus fruit. *Stewart Postharvest Reviews* 1:2.
- Lee, S. K., & Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 20(3), 207-220.
- Martí N., Mena P., Cánovas J. A., Micol V., Saura D., (2009) Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. *Natural products Communications* 4, 677-700.
- Matsumoto H., Ikoma Y., Kato M., Nakajima N., Hasegawa Y. (2009). Effect of postharvest temperature and ethylene on carotenoid accumulation in the Flavedo and juice sacs of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4724–4732.
- Mesejo C., Gambetta G., Gravina A., Martinez-Fuentes A., Reig C., Agusti M. (2012). Relationship between soil temperature and fruit colour development of “Clemenpons” Clementine mandarin (*Citrus clementina* Hort ex.Tan). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 520–525.
- Miller, E. V., & Heilman, A. S. (1952). Ascorbic acid and physiological breakdown in the fruits of the pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Science* 116 (3019), 505-506.
- Nagy, S. (1980). Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28(1), 8-18.
- Omoni, A. O., & Aluko, R. E. (2005). The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science & Technology* 16(8), 344-350.
- Porat R. (2008) Degreening of citrus fruit. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 2, 71–76.
- Porrás I., Brotons J. M., Conesa A., Manera F. J. (2014). Influence of temperature and net radiation on the natural degreening process of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) cultivars Rio Red and Star Ruby. *Scientia Horticulturae* 173 45–53.
- Rafi, M. M., Kanakasabai, S., Reyes, M. D., & Bright, J. J. (2013). Lycopene modulates growth and survival associated genes in prostate cancer. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24(10), 1724-1734.
- Rodrigo M. J., Marcos J. F., Zacarías L. (2004). Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6724–6731.

- Rodrigo, M. J., Zacarías, L. (2007). Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 43, 14–22.
- Rodrigo, M. J., Alquézar, B., Alós, E., Lado, J., & Zacarías, L. (2013). Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of Citrus fruit. *Scientia Horticulturae* 163, 46-62.
- Rouseff, R. L.; Sadler, G. D.; Putnam, T.J.; Davis, J.E. (1992). Determination of  $\beta$ -carotene and other hydrocarbon carotenoids in red grapefruit cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 47-51.
- Schirra, M.(1992). Behaviour of 'Star Ruby' grapefruits under chilling and non-chilling storage temperature. *Postharvest Biology and Technology* 2, 315–327.
- Sinclair W. B. (1984) Ascorbic acid (Vitamin C) in lemons and other citrus fruits. In: Sinclair WB, ed. The biochemistry and physiology of the lemon. *Oakland: University of California Publications*, 157-183.
- Tietel Z., Lewinsohn E., Fallik E., Porat R. (2012). Importance of storage temperatures in maintaining flavor and quality of mandarins. *Postharvest Biology and Technology* 64, 175–182.
- Van Wyk A. a., Huysamer M., Barry G. H. (2009). Extended low-temperature shipping adversely affects rind colour of 'Palmer Navel' sweet orange [*Citrus sinensis*] due to carotenoid degradation but can partially be mitigated by optimizing post-shipping holding temperature. *Postharvest Biology and Technology* 53, 109–116.
- Wheaton, T. A., & Stewart, I. (1973). Optimum temperature and ethylene concentrations for post harvest development of carotenoids pigments in Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 98, 337–340.
- Xu, C. J., Fraser, P. D., Wang, W. J., & Bramley, P. M. (2006). Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(15), 5474-5481.