

(S3-P128)

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN EN LA SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE CAROTENOIDES EN FRUTOS CÍTRICOS

LOURDES CARMONA ⁽¹⁾, LORENZO ZACARÍAS ⁽²⁾ y M. JESÚS RODRIGO ⁽³⁾

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, (CSIC) Apdo. Postal 73, 46100-Burjassot, Valencia, ESPAÑA. Teléfono: (34) 963 90 00 22. Fax: (34) 963 63 63 01

⁽¹⁾ lcarmona@iata.csic.es

⁽²⁾ lzacarias@iata.csic.es

⁽³⁾ mjrodrigo@iata.csic.es

Palabras clave: *Citrus sinensis* – color - cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) - tratamiento poscosecha

RESUMEN

El efecto de las diferentes condiciones de conservación postcosecha en las modificaciones cualitativas y cuantitativas de carotenoides en los frutos cítricos es muy poco conocido. El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar el efecto de la temperatura de conservación (2 y 12 °C) en el contenido y la composición de carotenoides en el flavedo y pulpa de naranjas (*Citrus sinensis* cv. Navelina) recolectadas en diferentes estadios de maduración. El almacenamiento a 12 °C promovió de forma significativa la coloración externa de los frutos, mientras que a 2 °C apenas lo modificó. El análisis de la evolución del contenido y la composición de carotenoides mediante HPLC-PDA mostró que, durante el almacenamiento a 2 °C no se produjeron cambios relevantes ni en el flavedo ni en la pulpa. Sin embargo, a 12 °C, el aumento de color estuvo acompañado de un importante aumento en la concentración de carotenoides, en ambos estadios. Este incremento se produjo principalmente en la concentración de β -criptoxantina, β -citraurina y violaxantina en el flavedo y de β -criptoxantina y violaxantina. Durante el almacenamiento a 12 °C también se produjo un aumento de los carotenoides lineales incoloros fitoeno y fitoflueno, tanto en el flavedo como en la pulpa, lo que indica que el efecto de esta temperatura se ejerce desde las etapas más tempranas de la ruta biosíntesis de carotenoides. El efecto del almacenamiento a 12 °C sobre el color y el contenido de carotenoides fue más intenso en los frutos recolectados en un estado de maduración menos avanzado (virando de color).

Keywords: *Citrus sinensis*-colour-high performance liquid chromatography (HPLC)-postharvest treatment.

ABSTRACT

The effect of postharvest storage conditions on qualitative and quantitative carotenoid composition in citrus fruits is not well known. The objective of this work has been to characterize the effect of storage temperature (2 y 12 °C) on the content and composition of carotenoids in the flavedo and pulp of orange fruits (*Citrus sinensis* cv. Navelina) at different maturation stages. Exposition of Navelina fruits at 12 °C promoted external coloration, whereas at 2 °C peel color of fruits was hardly modified. Evolution of the carotenoid content and composition in the flavedo and pulp of fruits stored at 2 °C and 12 °C was determined by

HPLC-PDA. In general, results showed that carotenoid content and composition did not change in the peel and pulp of fruits during postharvest storage at 2 °C. Interestingly, the increase of color observed in the peel of Navelina fruits stored at 12 °C was accompanied by an increment of total carotenoid content in both maturation stages. The increase of carotenoid content at 12°C was mainly due to β -cryptoxanthin, β -citraurin and violaxanthin in the flavedo, and to β -cryptoxanthin and violaxanthin in the pulp. On the other hand, the significant increase of colorless carotenoids phytoene and phytofluene in flavedo and pulp of fruits stored at 12°C, suggests that the effects of exposition of fruits at 12 °C stimulates carotenoid biosynthesis at the initial steps of the pathway. The effect of storage at 12 °C observed in color and content of carotenoids was more evident in the less mature fruits.

INTRODUCCIÓN

El color de la piel y de la pulpa de los frutos cítricos son atributos importantes para definir su calidad. En la comercialización de estos frutos para su consumo en fresco se relaciona, generalmente, su color externo con la madurez interna, sin embargo, dichos procesos son independientes (Pascual *et al.*, 1993; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). El color característico de las naranjas y mandarinas se debe principalmente a los pigmentos carotenoides, que son una importante familia de compuestos isoprenoides (Gross, 1987). Además, algunos carotenoides, como el β -caroteno y la β -criptoxantina, presentes en la pulpa de los frutos cítricos tienen una importante actividad provitamina A (Olson, 1989; van den Berg *et al.*, 2000; Meléndez-Martínez *et al.*, 2005a). En los últimos años, el interés por estos compuestos se ha incrementado considerablemente, debido al papel que se les ha atribuido en la prevención de diferentes enfermedades (Olson, 1989; Fraser y Bramley, 2004). Por tanto, el contenido y composición de carotenoides en la piel y en la pulpa de frutos de naranjas y mandarinas tiene una gran importancia, tanto en la calidad comercial como en la calidad nutricional.

Durante la maduración de los frutos cítricos, el color de la piel varía como resultado de los cambios coordinados entre el contenido y composición de carotenoides y la degradación de las clorofilas (Gross, 1987). Los tratamientos postcosecha también pueden influir en el color de los frutos. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran que el curado térmico de los frutos puede provocar una pérdida del color en el flavedo y que este efecto se puede revertir mediante la aplicación del etileno (Carmona *et al.*, 2006). La conservación a bajas temperaturas es la técnica más utilizada hoy en día para alargar la vida postcosecha y preservar la calidad de los frutos cítricos. Además, el almacenamiento a temperaturas inferiores a 2 °C es un requisito exigido en los tratamientos de cuarentena para la exportación de frutos a Japón y EEUU. Sin embargo, los frutos de determinadas variedades de cítricos son sensibles a desarrollar daños por frío cuando se almacenan a temperaturas inferiores a 10° C, lo que deprecia su valor comercial y genera importantes pérdidas económicas. Actualmente, se desconoce el efecto de la temperatura de conservación en la biosíntesis y acumulación de carotenoides, tanto en la piel como en la pulpa de los frutos cítricos. Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido el estudio del efecto del almacenamiento a 2° y 12°C en la acumulación y composición de carotenoides en la piel y la pulpa de frutos de naranja Navelina recolectados en dos estadios de maduración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de conservación postcosecha

Se utilizaron frutos de naranja de la variedad Navelina, (*Citrus sinensis* L. Osbeck) procedentes de una parcela comercial (Llíria, Valencia). Los frutos recolectados eran

similares en tamaño y no presentaban defectos en la piel. Una vez cosechados se midió el color de la piel en todos los frutos, usando un colorímetro Minolta (CR-300), como se describe en Rodrigo y Zacarías (2007). El color del flavedo se expresa como el cociente de los parámetros Hunter a/b , cuyos valores son negativos para frutos verdes y positivos para frutos naranjas. Se cosecharon frutos de naranja Navelina en dos estadios de coloración: 1) virando, con un cociente a/b de -0,11, y 2) frutos que presentaban una coloración externa más avanzada, con un a/b de 0,44. Los frutos se almacenaron en cámaras a 2° y 12 °C durante 7 semanas. A lo largo del almacenamiento se midió regularmente el color y cada semana se tomó muestra del flavedo (parte externa coloreada de la piel del fruto) y de la pulpa, se congeló en nitrógeno líquido, se trituró y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Los datos de color de los frutos se expresan como la media \pm DE de 30 réplicas.

Determinación del índice de madurez

Los frutos se exprimieron con un exprimidor rotatorio y el zumo se filtró a través de un tamiz. El contenido en sólidos solubles totales, expresado como °Brix, se determinó depositando una alícuota del zumo en un refractómetro digital (Atago). La acidez del zumo se valoró titulando 5 mL de zumo con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador y expresando la acidez como porcentaje de ácido cítrico. El índice de madurez se calculó como el cociente entre el contenido en sólidos solubles totales y el porcentaje de acidez.

Extracción, identificación y cuantificación de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fotodiodos (HPLC-PDA)

Los carotenoides se extrajeron siguiendo la metodología desarrollada previamente en nuestro laboratorio (Rodrigo *et al.*, 2003). Los carotenoides se extrajeron con metanol y con una mezcla de Tris-HCl, pH 7, y cloroformo. Las diferentes fases orgánicas combinadas se llevaron a sequedad a 40 °C y el residuo seco se redisolvió en una mezcla de acetona/éter de petróleo/éter etílico. Posteriormente se saponificó el extracto y se extrajeron los carotenoides repetidamente con una mezcla de éter de petróleo/éter etílico. El contenido total de carotenoides se determinó midiendo la absorbancia a 450 nm, expresándose como μg de equivalentes de β -caroteno/g peso fresco. El extracto de carotenoides totales concentrado se llevó a sequedad y se mantuvo en atmósfera de N_2 a -20 °C hasta el momento del análisis.

Las muestras se disolvieron posteriormente en metanol/acetona y se inyectaron en un sistema HPLC con una bomba cuaternaria acoplada a un detector PDA (Waters). La separación de carotenoides se realizó utilizando una precolumna y columna YMC C30, en un gradiente ternario de metanol/agua/metil *tert*-butil éter según las condiciones descritas por Rouseff *et al.* (1996) y Rodrigo *et al.* (2003). La identificación de carotenoides se realizó mediante comparación de los tiempos de retención y de los espectros obtenidos, respecto a los indicados en la literatura en similares condiciones o de los estándares puros (Malachi *et al.*, 1974; Britton, 1995; Lee, 2001; Rodrigo *et al.*, 2004; Rodrigo y Zacarías, 2007). De cada muestra se realizaron un mínimo de dos extracciones independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución del color y del índice de madurez durante el almacenamiento de frutos de naranja Navelina a 2 °C y 12 °C

Durante el almacenamiento a 12 °C, los frutos de la naranja Navelina con un índice a/b inicial de -0,11 experimentaron un aumento considerable del color del flavedo, alcanzando un valor a/b de 0,67 después de las 3 primeras semanas. Posteriormente, el color del fruto se mantuvo relativamente estable (a/b 0,73) (Figura 1). En los frutos almacenados a 2 °C, sin embargo, el color sólo se incrementó ligeramente, llegando a un a/b de 0,13 al final del

almacenamiento. El aumento en la coloración de los frutos durante al almacenamiento a 12 °C también se produjo en los frutos de la naranja Navelina recolectados en un estado de maduración mas avanzado ($a/b = 0,44$) (Figura 1). En general, independientemente del estadio inicial en el que se cosecharon los frutos, el almacenamiento a 12 °C promovió de forma significativa la coloración de los mismos, aunque este cambio es más apreciable en los frutos con un estadio de maduración menos avanzado, mientras que, durante el almacenamiento a 2 °C el color no experimentó cambios importantes.

El índice de madurez de los frutos virando en el momento de la recolección fue de 6,17, respecto a 7,6 en los más coloreados. Este parámetro varió ligeramente a lo largo del almacenamiento a 12 °C en los frutos más coloreados, alcanzándose un índice de 8,7 a las 7 semanas de conservación, mientras que en los frutos virando se mantuvo constante a lo largo del almacenamiento (6,65). Por el contrario, el almacenamiento a 2 °C incrementó ligeramente el índice de maduración interna (7,55) en los frutos virando, mientras se mantuvo constante en los más coloreados (7,87).

Identificación de carotenoides por HPLC-PDA en el flavedo y la pulpa de frutos de naranja Navelina.

La identificación de los carotenoides en el flavedo y en la pulpa de naranjas Navelina se realizó mediante HPLC-PDA. Se identificaron un total de 20 carotenoides y el perfil característico de estos compuestos difirió entre el flavedo y la pulpa (Tabla 2). El apocarotenoide β -citraurina, que es uno de los carotenoides más abundante en la piel de naranjas, no se detectó en la pulpa, en concordancia con trabajos previos (Meléndez-Martínez *et al.*, 2003; Meléndez-Martínez *et al.*, 2005b; Xu *et al.*, 2006). Los carotenoides identificados como mutatoxantina, β -caroteno y ζ -caroteno, se detectaron exclusivamente en el flavedo. Sin embargo, en trabajos anteriores se ha descrito la presencia de estos carotenoides en zumo de naranja Valencia (Rouseff *et al.*, 1996; Wingerath *et al.*, 1996; Gama y Sylos, 2005). Se han detectado, además, 6 carotenoides denominados compuestos 1-6 (Tabla 2), que presentaron espectros típicos de carotenoides, pero a los que no se les pudo asignar ninguna identidad específica. Entre ellos, destacan los compuestos 3, 5 y 6 que se detectaron exclusivamente en la pulpa.

Evolución del contenido y composición de carotenoides en frutos de naranja Navelina durante el almacenamiento a 2 °C y 12 °C

La conservación a 12 °C incrementó el contenido de carotenoides en la piel. Este efecto fue más acusado en los frutos recolectados en un estadio de maduración más avanzado ($a/b = 0,44$), donde al final del almacenamiento se triplicó la concentración inicial de carotenoides totales en la piel (Tabla 1). En los frutos cosechados en un estadio de maduración menos avanzado ($a/b = -0,11$) este efecto fue menor, duplicándose el contenido inicial al final del periodo de almacenamiento. Durante el almacenamiento a 12 °C también aumentó el contenido de carotenoides en la pulpa en ambos estadios, aunque este aumento fue ligeramente mayor en los frutos más maduros (Tabla 3). El contenido de carotenoides totales en la pulpa y en el flavedo de los frutos almacenados a 2 °C se mantuvo constante a lo largo de todo el periodo de almacenamiento (Tabla 1 y Tabla 3), independientemente del estadio de maduración de los frutos. Los carotenoides mayoritarios en la piel de los frutos cosechados con un $a/b = 0,44$ fueron violaxantina, β -criptoxantina, fitoeno y fitoflueno, y el apocarotenoide β -citraurina (Tabla 1). Los carotenoides incoloros fitoeno y fitoflueno fueron los que más aumentaron su contenido, 18 y 124 veces, respectivamente, durante las 7 semanas de almacenamiento a 12 °C. El contenido de estos carotenoides también aumentó durante el almacenamiento a 2 °C, aunque en menor proporción, el fitoeno aumentó 3,6 veces y el fitoflueno 21,2. El contenido de violaxantina, que es el carotenoide más abundante en el

flavedo de Navelina, se duplicó durante el almacenamiento a 12 °C, mientras que a 2 °C se mantuvo constante. La β -criptoxantina se incrementó 2 y 3 veces a lo largo del almacenamiento a 2 y 12 °C, respectivamente. La concentración del apocarotenoide β -citaurina aumentó 3,2 veces en el flavedo de los frutos almacenados a 12 °C, mientras que en el flavedo de frutos conservados a 2 °C disminuyó 1,5 veces su contenido inicial.

Los carotenoides mayoritarios en la pulpa, al igual que en el flavedo, fueron la violaxantina, el fitoeno, el fitoflueno y la β -criptoxantina (Tabla 3). El contenido de fitoeno en la pulpa, aumentó 22 veces a lo largo de la conservación a 12 °C, mientras que a 2 °C no varió. Por otro lado, el contenido de fitoflueno en pulpa se mantuvo constante tanto a 12 °C como a 2 °C. El carotenoide coloreado β -criptoxantina aumentó 14 veces durante las 7 semanas de almacenamiento a 12 °C, mientras que en los frutos a 2 °C incrementó aproximadamente 3 veces. El contenido de violaxantina aproximadamente se triplicó en los frutos a 12 °C, mientras que en los almacenados a 2 °C no se modificó.

El efecto de los factores ambientales en la carotenogénesis de los frutos cítricos se ha estudiado desde hace años (Casas y Mallent, 1988). En particular, se ha descrito que la rapidez con que se alcanza la coloración máxima de los frutos cítricos en campo depende de las diferencias de las temperaturas entre el día y la noche durante el periodo de cambio de color y que la temperatura óptima para la síntesis de los carotenoides β -criptoxantina, β -citaurina y violaxantina se sitúa entre 12 y 14 °C (Sonnen *et al.*, 1979; Casas y Mallent, 1988). Los resultados de este trabajo muestran que el almacenamiento postcosecha a 12 °C también estimula la coloración externa de los frutos de la naranja Navelina, debido a un aumento significativo en la concentración de la mayoría de los carotenoides (Tabla 1 y Tabla 3) lo que sugiere que el proceso de inducción y acumulación de carotenoides prosigue en los frutos separados del árbol y mantenidos a esa temperatura inductiva. Este incremento de carotenoides en el flavedo y en la pulpa fue más significativo en los frutos más coloreados que en los frutos virando de color. El contenido en β -citaurina, β -criptoxantina y violaxantina, aumentó de forma importante en la piel de los frutos tras el tratamiento a 12 °C, al igual que el fitoeno y el fitoflueno. Sin embargo, en la pulpa, el incremento más importante fue de la β -criptoxantina y la violaxantina, mientras que el aumento de los carotenoides incoloros lineales fue menos significativo. El aumento del contenido de fitoeno y fitoflueno, productos de las primeras etapas de la ruta de biosíntesis de carotenoides, durante el almacenamiento a 12 °C, parece indicar que la estimulación de la biosíntesis de carotenoides se produce desde las etapas más tempranas de la ruta. Durante la maduración de los frutos de los frutos cítricos, el aumento de color conlleva un aumento de la concentración de violaxantina y del apocarotenoide β -citaurina en el flavedo y de violaxantina y β -criptoxantina en la pulpa, además de otros carotenoides iniciales de la ruta (Rodrigo *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2004; Alquezar *et al.*, 2005). Los resultados de este trabajo demuestran que, la conservación de los frutos a 12 °C mimetiza los cambios en carotenoides que se producen durante la maduración de los frutos, ya que se alcanzan contenidos y distribuciones de estos compuestos similares a los que ocurren durante la maduración natural de los frutos en el árbol.

CONCLUSIONES

El análisis de la evolución del color, el contenido y la composición de carotenoides en los frutos de naranjas Navelina almacenados a 2° y 12 °C muestra que el tratamiento a 12 °C incrementó el contenido de la mayoría de los carotenoides presentes tanto en el flavedo como en la pulpa de naranja Navelina. Los carotenoides responsables del aumento del color de la piel en los frutos almacenados a 12 °C son fundamentalmente la β -criptoxantina y violaxantina, y el apocarotenoide β -citaurina, que confieren una tonalidad naranja-rojiza a los

frutos. El incremento de color en la pulpa se correlaciona con el aumento de la β -criptoxantina y violaxantina. Además, el almacenamiento a 12 °C incrementó el contenido de fitoeno y fitoflueno, productos de las primeras reacciones de la biosíntesis de carotenoides, lo que el efecto de la temperatura de conservación se produce desde las etapas iniciales de la ruta de biosíntesis. El almacenamiento a 2 °C, sin embargo, no produjo cambios significativos en el contenido y la composición de carotenoides.

AGRADECIMENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2003-01304 y AGL2006-09496 del Ministerio de Educación y Ciencia. L. Carmona disfruta de una beca FPI (MEC) y M.J. Rodrigo es contratada postdoctoral por el “Programa Ramón y Cajal” (MEC). Nuestro agradeciendo al apoyo técnico de Amparo Beneito.

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 2. Características cromatográficas y espectroscópicas de los carotenoides más relevantes identificados en el flavedo y pulpa de naranja Navelina (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

Observado			Literatura		
Carotenoide	λ_{max} (nm)	Peak ratio	λ_{max} (nm)	Peak ratio	Ref.
Compuesto 1	408,431,459	57			
Compuesto 2	405,428,456	74			
Compuesto 3 ^a	398,420,447	97			
<i>all-E</i> -violaxantina	411,437,468	92	416,438,467	87	Britton, 1995
β -Citaurina ^b	458	0	456	0	Malachi, 1974
(<i>9Z</i>)-Violaxantina	<i>cis</i> 326,410,434,463	95	<i>cis</i> 326,416,440,465	98	Britton, 1995
Compuesto 4 ^a	414,439,462	40			
Luteoxantina*	393,416,442	90	397,419,445	62	Lee, 2001
Luteína ^b	418,444,472	65	421,445,474	60	Britton, 1995
Compuesto 5 ^a	425,451	61			
Compuesto 6 ^a	424,446,467				
Zeaxantina	430,450,478	35	428,450,478	26	
Anteraxantina*	440,467	58	422,444,472	55	Britton, 1995
Mutatoxantina* ^b	424,448	74	409,427,457	50	Britton, 1995
α -Criptoxantina	419,445,473	72	421,445,475	60	Britton, 1995
Fitoeno	273,285,300	10	276,286,297	10	Britton, 1995
Fitoflueno	331,346,364	91	331,348,367	90	Britton, 1995
β -Criptoxantina	423,450,479	30	428,450,478	27	Britton, 1995
β -Caroteno ^b	426,451,478	31	425,450,477	25	Britton, 1995
ζ -Caroteno ^b	<i>cis</i> 295,376,397,423	75	<i>cis</i> 296,374,395,419	71	Cunnigham,1985

*Identificado de forma tentativa.

^aIdentificado sólo en pulpa.

^bIdentificado sólo en flavedo.

Carotenoide	Contenido ($\mu\text{g g PF}^{-1}$)				
	0 Semanas	3 Semanas		7 Semanas	
		2° C	12° C	2° C	12° C
Fitoeno	1,26 \pm 0,10	0,64 \pm 0,24	4,39 \pm 2,09	4,50 \pm 0,53	22,89 \pm 4,07
Fitoflueno	0,05 \pm 0,05	0,06 \pm 0,04	0,85 \pm 0,40	1,06 \pm 0,17	6,21 \pm 0,78
Violaxantina*	20,89 \pm 1,68	21,36 \pm 1,83	23,42 \pm 3,49	19,00 \pm 0,23	36,86 \pm 1,64
β -Criptoxantina	0,33 \pm 0,08	0,31 \pm 0,03	0,46 \pm 0,04	0,93 \pm 0,20	0,76 \pm 0,28
β -Citaurina	1,20 \pm 0,50	0,42 \pm 0,15	2,29 \pm 0,29	0,78 \pm 0,04	4,42 \pm 0,09
Carotenoides Totales	32,00 \pm 2,00	31,60 \pm 0,70	44,65 \pm 4,45	35,75 \pm 0,45	91,85 \pm 4,05

*Isómeros *cis* y *trans*

Tabla 3. Evolución del contenido de los carotenoides mayoritarios en la pulpa de frutos de naranja Navelina cosechados con un color inicial $a/b = 0,44$, durante el almacenamiento a 2° y 12 °C

Carotenoide	Contenido ($\mu\text{g g PF}^{-1}$)				
	0 Semanas	3 Semanas		7 Semanas	
		2° C	12° C	2° C	12° C
Fitoeno	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	0	0,22 \pm 0,06
Fitoflueno	0	0,01 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01	0	0,05 \pm 0,01
β -Criptoxantina	0,19 \pm 0,01	0,69 \pm 0,02	1,73 \pm 0,31	0,56 \pm 0,05	2,70 \pm 0,11
Violaxantina	2,59 \pm 0,10	3,87 \pm 0,88	5,90 \pm 0,55	3,24 \pm 0,31	6,86 \pm 0,45
Carotenoides Totales	8,25 \pm 0,15	10,70 \pm 0,60	12,90 \pm 1,50	9,92 \pm 0,03	20,46 \pm 0,70

* Isómeros *cis* y *trans*

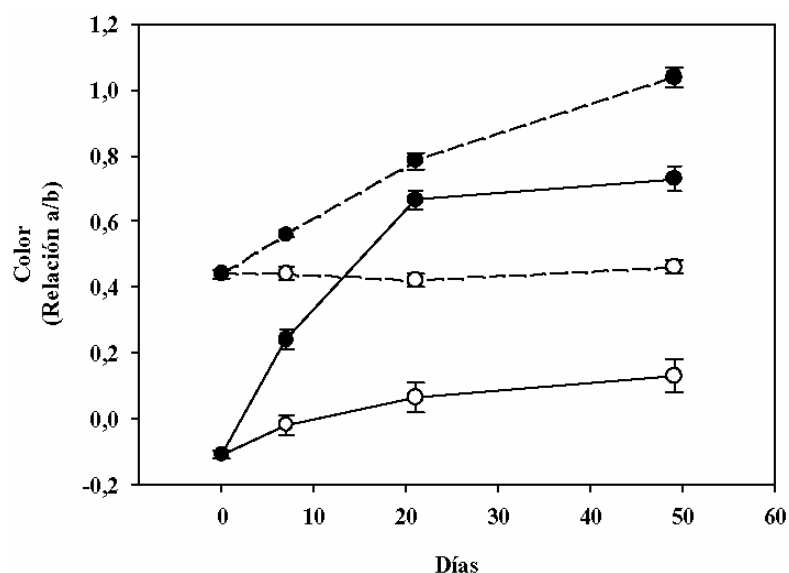


Figura 1: Evolución del color (relación a/b) en la piel de los frutos de la naranja Navelina durante el almacenamiento a 12 °C (●) y a 2 °C (○) en dos estadios de maduración diferentes, frutos virando de color (línea continua) y frutos coloreados (línea discontinua).

BIBLIOGRAFÍA

- Alquézar, B., Rodrigo, M. J., y Zacarías, L. 2005. Molecular characterization of Cara Cara, a red-flesh mutant of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *The 14th international symposium carotenoids*. Eds. Hashimoto, H. Edimburg. 9: 147.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9: 1551-1558.
- Carmona, L., Zacarías, L., y Rodrigo, M. J. 2006. Efecto del acondicionamiento térmico en el color y acumulación de carotenoides en la piel de frutos cítricos. *Innovaciones fisiológicas y tecnológicas de la maduración y post-recolección de frutas y hortalizas*. Eds. Valero, D. y Serrano, M. 49-52.
- Casas, A. y Mallent, M. 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 los Alimentos*, 28: 184-202.
- Cunningham, F. X. y Schiff, J. A. 1985. Photoisomerization of ζ -carotene stereoisomers in cells of *Euglena-Gracilis* mutant W3Bul and in solution. *Photochemistry and Photobiology*, 42: 295-307.
- Fraser, P. D. y Bramley, P. M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43: 228-265.
- Gama, J. J. T. y Sylos, C. M. 2005. Major carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice: Identification and quantification by HPLC. *Food Research International*, 38: 899-903.
- Gross, J. 1987. *Pigments in fruits*. London: Academic Press
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H. y Yano, M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*, 134: 824-837.
- Lee, H. S. 2001. Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara cara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2563-2568.
- Malachi, T., Gross, J., Lifshitz, A. y Skalarz, B. 1974. Flavedo carotenoid pigments of the ripe Washington-Navel orange. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 7: 330-334.
- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. y Heredia, F. J. 2005a. Identification of zeinoxanthin in orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6362-6367.
- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. y Heredia, F. J. 2005b. Color and carotenoid profile of Spanish Valencia late ultrafrozen orange juices. *Food Research International*, 38: 931-936.
- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. y Heredia, F. J. 2007. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, 101: 1145-1150.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. y Heredia, F. J. 2003. A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4219-4224.
- Olson, J. A. 1989. Provitamin-A function of carotenoids: the conversion of β -carotene into vitamin-A. *Journal Nutritional*, 119: 105-108.
- Pascual, M., Mallent, M. D. y Cu nat, P. 1993. Study of the Naveline oranges carotenoids. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33: 179-196.
- Rodrigo, M. J., Marcos, J. F., Alf rez, F., Mallent, M. D. y Zacarías, L. 2003. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany*, 54: 727-738.

- Rodrigo, M. J., Marcos, J. F. y 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. y 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.
- Rouseff, R., Raley, L. y Hofsommer, H. J. 1996. Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2176-2181.
- Sonnen, H., Lenz, F. y Gross, J. 1979. Einfluss der wüzeltemperatur auf die carotenoidentwicklung in fruchtschalen vom *Citru unshiu* (Marc.) und *Citrus madurensis* (Lour.). *Gartenvauwissenschaft*, 4: 49-52.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S. y Stahl, W. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 880-912.
- Wingerath, T., Stahl, W., Kirsch, D., Kaufmann, R. y Sies, H. 1996. Fruit juice carotenol fatty acid esters and carotenoids as identified by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2006-2013.
- Xu, C. J., Fraser, P. D., Wang, W. J. y Bramley, P. M. 2006. Differences in the carotenoid content of ordinary citrus and lycopene-accumulating mutants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5474-5481.