

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE RAYOS X A DOSIS MODERADAS SOBRE LOS COMPONENTES BIOACTIVOS DE MANDARINAS 'CLEMENULES'

Cristina Rojas-Argudo⁽¹⁾, Lluís Palou⁽¹⁾, Antonio Cano⁽²⁾, Miguel Angel del Río⁽¹⁾, Ma Carmen González-Mas⁽²⁾, Almudena Bermejo⁽²⁾

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Tecnología Poscosecha, Apartado Oficial, 46113 Moncada. España. crojas@ivia.es, teléfono: 34 963424000, fax: 34 963424001.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Departamento de Citricultura, Apartado Oficial, 46113 Moncada, España, teléfono: 34 963424000, fax: 34 963424001.

Palabras clave: cítricos - ionización - vitamina C - flavanonas - antioxidante

RESUMEN

Los cítricos son reconocidos por sus propiedades beneficiosas para la salud, principalmente debido a su alto contenido en vitamina C y a otros componentes bioactivos, la mayoría de ellos con actividad antioxidante. Las tecnologías poscosecha, además de extender la vida útil de las frutas y hortalizas, deben asegurar su calidad nutricional hasta llegar al consumidor. Entre las tecnologías poscosecha, la ionización con rayos X a dosis moderadas se presenta como una herramienta eficaz con gran potencial para extender la vida útil de frutas y hortalizas. En el caso de los cítricos españoles, también puede ser un tratamiento cuarentenario eficaz contra la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Con el propósito de evaluar el efecto del tratamiento con rayos X sobre los componentes bioactivos de mandarinas 'Clemenules' (*Citrus reticulata* Blanco), éstas se trataron con rayos X a 0, 195 y 395 Gy y se almacenaron a 20°C o 5°C durante 14 o 30 días respectivamente. Durante estos periodos se analizaron la capacidad antioxidante (método DPPH) y la vitamina C total y los flavonoides mayoritarios (hesperidina y narirutina) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En general, los tratamientos ionizantes empleados no ejercieron efecto en los parámetros analizados, por lo que su utilización no deteriora la calidad nutricional y funcional de mandarinas 'Clemenules'.

EFFECT OF X-IRRADIATION AT MODERATE DOSES ON BIOACTIVE COMPOUNDS OF 'CLEMENULES' MANDARINS

Key words: citrus - ionizing- vitamin C - flavanones - antioxidant

ABSTRACT

Citrus fruit are an important source of vitamin C as well as health-promoting compounds, most of them with antioxidant properties. Treatments applied on citrus would preserve these bioactive compounds ensuring its benefits to the consumer. Among the postharvest technologies, X-irradiation at moderate doses may be a useful tool for extending the shelf life of fruits and vegetables. Moreover, this treatment may be used as a quarantine treatment against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. In this work, 'Clemenules' mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) were irradiated with X-rays at 0, 195 and 395 Gy in order to evaluate the effect of ionizing radiation on fruit nutritive and functional properties. Mandarins were stored at 20°C or 5°C, for 14 or 30 days, respectively. During storage, the content of flavonoids and vitamin C total were measured by HPLC as well as total antioxidant capacity using the DPPH method. The application of X-rays at the experimental doses did not affect the bioactive parameters analyzed; therefore this technology preserves the health benefits of citrus.

INTRODUCCIÓN

Los consumidores demandan productos con alta calidad nutricional y funcional, lo que está facilitando la aparición en el mercado de

alimentos funcionales en los que se añaden compuestos nutricionales o con funciones protectoras para la salud (componentes funcionales). Las mandarinas constituyen una

importante fuente natural de compuestos bioactivos, caracterizándose por un alto contenido en ácido ascórbico o vitamina C y flavonoides (principalmente hesperidina y también naringina). Asimismo contienen carotenoides con actividad pro-vitamina A (β -caroteno, α -caroteno, y β -criptoxantina) o antioxidante (zeaxantina y luteína).

La vitamina C se encuentra en los cítricos principalmente en su forma reducida como ácido ascórbico aunque también puede existir una pequeña proporción como ácido dehidroascórbico, el cual también posee actividad biológica por lo que para determinar la vitamina C total es necesario tener en cuenta ambos ácidos. El ácido ascórbico es relativamente estable en los frutos cítricos debido a su bajo pH en relación a otras frutas; sin embargo, durante la manipulación poscosecha se pueden producir cambios en su contenido en función de los tratamientos a los que se someta la fruta y las condiciones de almacenamiento. En este sentido, Lee y Kader (2000) revisaron los factores poscosecha que afectan a los contenidos de vitamina C, estableciendo que la temperatura es el factor con mayor peso y que las pérdidas de vitamina C se aceleran al utilizar altas temperaturas y largos almacenamientos. También las deshidrataciones intensas y las magulladuras y otros daños mecánicos producidos durante la confección de los frutos pueden alterar el contenido de vitamina C así como el resto de componentes bioactivos. Asimismo, los cambios nutricionales que pueden tener lugar en el fruto durante el período poscosecha pueden variar según el cultivar. Rapisarda et al. (2001) no detectaron pérdidas de vitamina C en naranjas cv. 'Tarocco' almacenadas a 8 y 22°C durante 85 y 106 días, respectivamente; sin embargo, sí observaron una acusada reducción en naranjas 'Moro' durante los primeros 50 días de almacenamiento.

La medida de la capacidad antioxidante total evalúa conjuntamente los compuestos antioxidantes, teniendo en cuenta las posibles sinergias entre los diferentes componentes bioquímicos. Existen varios métodos para evaluar la capacidad antioxidante de las frutas, entre ellos, el método que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH \cdot) resulta sencillo y ha sido utilizado en la evaluación de

la capacidad antioxidante de frutas, entre ellas los cítricos (Sánchez-Moreno et al., 2003). El DPPH \cdot en su forma radicalaria tiene una coloración violeta intenso y absorbe a 515 nm, por lo que la absorbancia a dicha longitud de onda disminuirá al reaccionar con los antioxidantes presentes en las frutas.

Como se ha comentado anteriormente, la aplicación de los diferentes tratamientos poscosecha puede alterar los componentes funcionales de los cítricos, por lo que es necesario evaluar el impacto sobre la calidad nutricional y funcional de las nuevas tecnologías poscosecha.

Entre las tecnologías poscosecha, las radiaciones ionizantes a dosis moderadas se han mostrado eficaces como tratamientos cuarentenarios contra plagas y prolongando en general la vida útil de frutas y hortalizas (Kader, 1986). Patil (2004) discute los beneficios de las irradiaciones como tratamientos inductores de los componentes funcionales de las frutas y hortalizas. Los cítricos y la fruta fresca en general presentan mayor tolerancia a la aplicación de radiaciones ionizantes que las hortalizas y flores cortadas y se considera, en general, que dosis de rayos gamma inferiores a 1000 Gy no son fitotóxicas (Kader, 1986). Sin embargo la mayor o menor sensibilidad a manifestar daños varía según la especie de fruta irradiada (Alonso et al., 2002a). Las irradiaciones se han mostrado efectivas como alternativa al tratamiento cuarentenario por frío contra *Ceratitis capitata* (Alonso et al., 2002b). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha establecido con fines cuarentenarios una dosis mínima de energía absorbida de 100 Gy (USDA, 2006), aunque se estima que esta dosis puede superarse entre 2-3 veces cuando se aplica esta tecnología a escala comercial (Boylston et al., 2002).

La irradiación con rayos X ha sido mucho menos estudiada que otras como los rayos gamma o los electrones acelerados. El poder de penetración de los rayos X es parecido al de los rayos gamma y muy superior al de los electrones acelerados, por lo que pasan a través del envase y el producto sin dejar residuo alguno (McLaughlin, 1999).

El presente estudio fue realizado con objeto de evaluar el efecto del tratamiento con

rayos X sobre los componentes bioactivos de las mandarinas 'Clemenules' y observar si afecta a la calidad nutricional y funcional de las mismas.

Materiales y Métodos

Material Vegetal y Tratamientos aplicados.

Mandarinas clementinas 'Clemenules' (*Citrus reticulata* 'Blanco') con madurez comercial (índice de madurez y de color 7,45 y 4,24, respectivamente) se seleccionaron eliminando los frutos dañados. Posteriormente se formaron lotes de 100 frutos en cajas de cartón (40 x 29 x 27 cm) y se transportaron hasta la planta de irradiación de la empresa BGM (Bruchsal, Alemania) ($5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) para ser sometidos a las siguientes dosis de radiaciones ionizantes con rayos X: 0 (control, no irradiado), 200 y 400 Gy. Las dosis reales aplicadas se midieron colocando films dosimétricos radiocrómicos (Gafchromic® HD-810, International Specialty Products, Wayne, NJ, USA) en cada caja irradiada (3 cajas por dosis) a tres alturas diferentes y registrando las lecturas con un espectrofotómetro a 560 nm. Los valores reales medidos fueron 195 ± 8 Gy para la dosis fijada de 200 Gy (rango 182,9-207,6 Gy) y 395 ± 25 Gy para la dosis fijada de 400 Gy (rango: 363,3-440,4 Gy).

Una vez aplicados los tratamientos y transportada de vuelta a las instalaciones del IVIA la fruta se almacenó en dos condiciones diferentes: a 20°C y 70-75% humedad relativa (HR) y a 5°C , 90-95 HR, durante 30 días.

Transcurrido cada tiempo de almacenamiento (7 y 14 días a 20°C o 30 y 60 días a 5°C), se formaron 3 lotes de 5 frutos para cada condición de almacenamiento y dosis. Se separaron los gajos de cada lote formado que se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta el momento de análisis. Se determinó los contenidos en vitamina C total, hesperidina y narirutina y la capacidad antioxidante total, como se describe a continuación.

Instrumentación y Metodología. El análisis y cuantificación del ácido ascórbico, hesperidina y narirutina se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un equipo Alliance (Waters, USA) equipado con un módulo de separación 2695,

un detector de fotodiodos 2996 y una columna termostaticada Tracer Excel $5\ \mu\text{m}$ C18 ODS B (250 x 0.46 mm, Teknokroma, Barcelona).

La extracción del ácido ascórbico total se realizó mediante la homogeneización de las muestras en presencia de acetato de etilo con 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) con la finalidad de eliminar los compuestos liposolubles presentes en las muestras. Así, alícuotas de 15 g de pulpa se homogeneizaron con 10 mL acetato de etilo (0,04% BHT) usando un Polytron 3100 (Kinematica AG, Suiza) durante 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente el homogeneizado fue centrifugado durante 30 min a 12.000 rpm a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf Iberica, Madrid). A 1 mL del sobrenadante acuoso obtenido se adicionaron 200 μL de una solución de 1,4-ditio-DL-treitol (DTT) 20 mg/mL, y se mantuvo en oscuridad y temperatura ambiente durante 2 horas para reducir el ácido dehidroascórbico a ascórbico. Tras filtrar a través de una membrana de nylon de $0,45\ \mu\text{m}$, la muestra fue inyectada en el equipo cromatográfico.

La elución del ácido ascórbico se llevó a cabo mediante una fase isocrática de 95:5 agua:metanol, ambos solventes conteniendo 0,5% ácido acético, 10 mM pentano sulfonato sódico y 0,09% trietilamina. Se utilizó un flujo de 1 mL/min, el tiempo de retención fue de 3,8 min y la cuantificación se realizó a 253 nm mediante calibración externa con patrón.

Para la extracción de flavonoides, alícuotas de 15 g de pulpa se homogeneizaron con 10 mL de dimetilsulfóxido:metanol (1:1 v/v) durante 1 minuto a temperatura ambiente utilizando un homogenizador Polytron 3100 (Kinematica AG, Suiza). El homogeneizado se centrifugó durante 30 min, a 12.000 rpm y a 4°C . El sobrenadante se filtró a través de membrana de nylon de $0,45\ \mu\text{m}$ y se usó para el análisis cromatográfico.

La elución de los flavonoides se llevó a cabo mediante una fase en gradiente compuesta por 0,6% ácido acético (Fase A) y acetonitrilo (Fase B). El gradiente usado fue el siguiente: durante los 2 min iniciales se mantuvo el 90% de la fase A, en 18 min se pasó a 50% de esa fase A y luego en 5 min se pasó de nuevo al 90% de la fase A, para finalmente mantener esta fase durante 5 min,

dejando el cromatógrafo preparado para la siguiente inyección. El flujo se mantuvo a 1 mL/min. Los tiempos de retención para los flavonoides fueron 11,51 min y 11,92 min para narirutina y hesperidina, respectivamente. La cuantificación se realizó a 285 nm usando una calibración externa con patrones de los flavonoides.

Para evaluar la actividad antioxidante de las muestras de mandarinas irradiadas y no irradiadas se utilizó el método de captura de radicales libres del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH[•]) en disolución con metanol (Brand-Williams et al., 1995) que mide la reducción de la absorbancia a 515 nm de soluciones de DPPH[•] al reaccionar con antioxidantes.

Muestras de gajos (50-75 g) descongeladas en baño de agua a 20±1°C durante 45 min, se homogeneizaron con un Polytron 3100 (Kinematic AG, Suiza) durante 1,5 min a 22.000 rpm. Posteriormente a 5 g del homogenizado de mandarinas se le añadieron 10 mL de metanol y se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 5 min. A partir del sobrenadante obtenido y filtrado se realizaron diluciones del sobrenadante obtenido con metanol con el fin de poder relacionar la disminución en la absorbancia del DPPH[•] con la concentración de la muestra. Seguidamente se mezcló en cubetas desechables 75 µL de cada una de las diluciones metanólicas de cada muestra con 2,925 mL de una solución metanólica de DPPH[•] (24 ppm) y se dejó reaccionar durante 40 min en oscuridad, a 23,5±1°C. Finalmente se midió la absorbancia a 515 nm con un espectrofotómetro Thermo UV1 provisto de siete portacubetas (Thermo Electron Corporation, UK).

La capacidad antioxidante se expresó como EC₅₀ que es la cantidad de muestra necesaria por gramo de DPPH que reduce al 50% los radicales libres de dicho reactivo (g homogenizado/g DPPH) (Sánchez-Moreno et al., 2003).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza utilizando el paquete estadístico Statgraphics plus 4.1. Las diferencias significativas entre las medias se establecieron a través de intervalos MDS (Mínima Diferencia Significativa) con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido en vitamina C total de las mandarinas osciló entre 30 y 50 mg/100g de gajos (Figura 1). La irradiación a las dosis aplicadas de 200 y 400 Gy no afectó a los contenidos en vitamina C, lo cual concuerda con lo reportado por diferentes autores para frutas irradiadas con rayos gamma. Moshonas and Shaw (1984) encontraron que 1000 Gy aplicados en pomelo no afectaron los niveles de vitamina C. El contenido en vitamina C de naranjas irradiadas en el rango 300-400 Gy no disminuyó en relación al control no irradiado, sin embargo sí se registraron pérdidas en el rango 500-600 Gy (Hu et al., 2004). Estos autores observaron una disminución de la vitamina C durante el almacenamiento en todos los tratamientos aplicados. Por otro lado, pomelos irradiados a dosis de hasta 700 Gy no afectaron a los contenidos en vitamina C de pomelos tempranos (Patil et al., 2004). Sin embargo cuando la irradiación se aplicó a pomelos tardíos los contenidos en vitamina C se redujeron con dosis superiores a 200 Gy transcurridos 35 días de almacenamiento. Mahrouz et al. (2002) observaron que la irradiación con dosis de 300 Gy no afectó el contenido en vitamina C, sin embargo reportaron que otros tratamientos con agua (aplicada tanto en caliente como en frío) y también el encerado disminuyeron los contenidos en vitamina C. Contrariamente, Abdellaoui et al. (1995) detectaron un aumento en los niveles de vitamina C en mandarinas irradiadas a 300 o 500 Gy previamente sumergidas en baño de agua caliente (53°C, 5 min).

En nuestro trabajo se detectó un incremento en los niveles de vitamina C después de 7 días de almacenamiento a 20°C. Mahrouz et al. (2002) también observaron un incremento en los contenidos de vitamina C en mandarinas irradiadas y también en las no irradiadas a los 15 días de almacenamiento. Sin embargo, este incremento no se produjo cuando las mandarinas se enceraron. En general, el almacenamiento produce una disminución de los contenidos en vitamina C o no produce cambios; la variabilidad biológica junto a cambios en el metabolismo secundario pudieron inducir este aumento en la vitamina C que se detectó en todos los tratamientos. Al

final del almacenamiento, tanto a 5 o 20°C no se observó pérdida de vitamina C respecto de la vitamina C inicial.

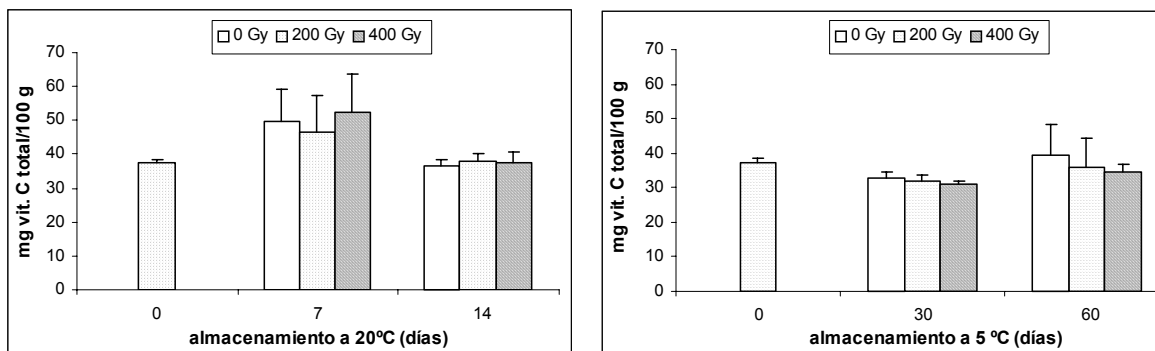


Figura 1. Contenido en vitamina C total en mandarinas 'Clemenules' irradiadas a 0, 200 y 400 Gy almacenadas a 20 (a) o a 5°C (b)

Valores expresados como mg vitamina C total/100 g gajos. Las barras verticales muestran la desviación estándar (n=3)

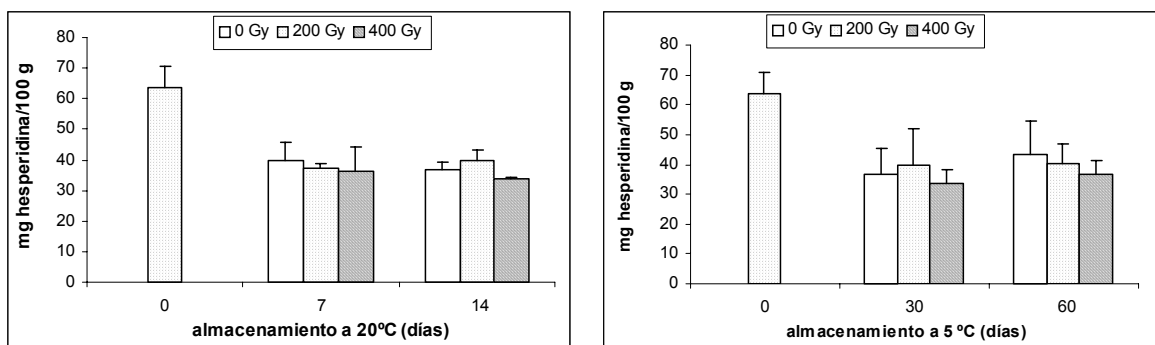


Figura 2. Contenido en hesperidina de mandarinas 'Clemenules' irradiadas a 0, 200 y 400 Gy almacenadas a 20 (a) o a 5°C (b)

Valores expresados como mg hesperidina/100 g gajos. Las barras muestran la desviación estándar (n=3)

La irradiación no afectó tampoco en general a los contenidos de las flavanonas medidas (Figuras 2 y 3). El contenido en hesperidina disminuyó bruscamente después del primer periodo de almacenamiento, tanto a 20°C como a 5°C, sin embargo no se detectaron diferencias entre tratamientos. Por otro lado el contenido en narirutina se mantuvo estable durante todo el almacenamiento y tampoco fue afectado por la irradiación (Figura 3). Del Caro et al. (2004) detectaron incrementos en estas flavanonas y de otros compuestos fenólicos durante el almacenamiento de cítricos como respuesta a situaciones de estrés o de daños en los frutos que aumentarían la actividad del enzima fosfoamonio liasa (PAL) que cataliza la síntesis de compuestos polifenólicos como los flavonoides. Situaciones de estrés producidas en las plantas debidas a irradiación, daños

mecánicos, deficiencias en nutrientes, tratamientos herbicidas y ataques de virus, hongos o plagas estimulan la síntesis de PAL (Chalker-Scott y Fuchigami, 1989). En nuestro trabajo la irradiación no afectó a los contenidos en los flavonoides analizados lo cual sería indicativo de que el nivel de irradiación no fue suficiente para aumentar la actividad del enzima PAL. Por otro lado, la disminución inicial en los contenidos en hesperidina de las mandarinas registrada después del primer período de almacenamiento tanto a 20 como a 5°C, podría deberse a su utilización como sustrato del metabolismo secundario en la síntesis de compuestos polifenólicos, por ejemplo de flavonas. Esta disminución de la concentración de hesperidina se observó tanto en las mandarinas irradiadas como en las no irradiadas.

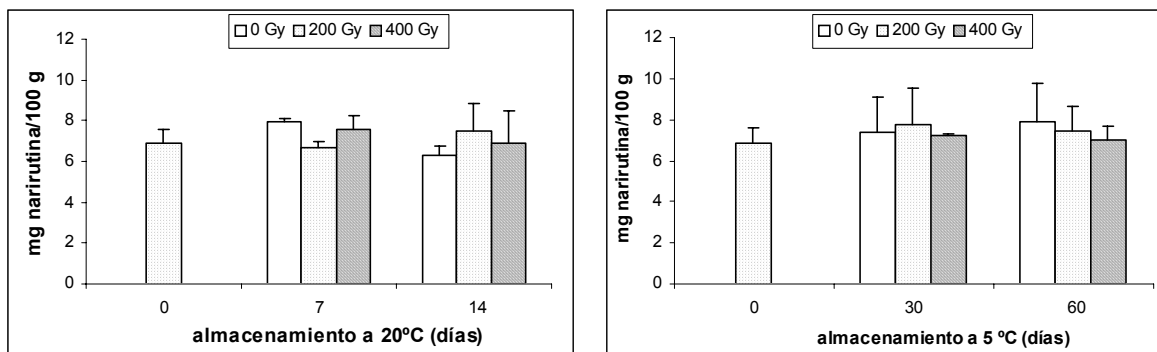


Figura 3. Contenido en naringutina de mandarinas 'Clemenules' irradiadas a 0, 200 y 400 Gy almacenadas a 20 (a) o a 5°C (b)

Valores expresados como mg naringutina/100 g gajos. Las barras muestran la desviación estándar (n=3)

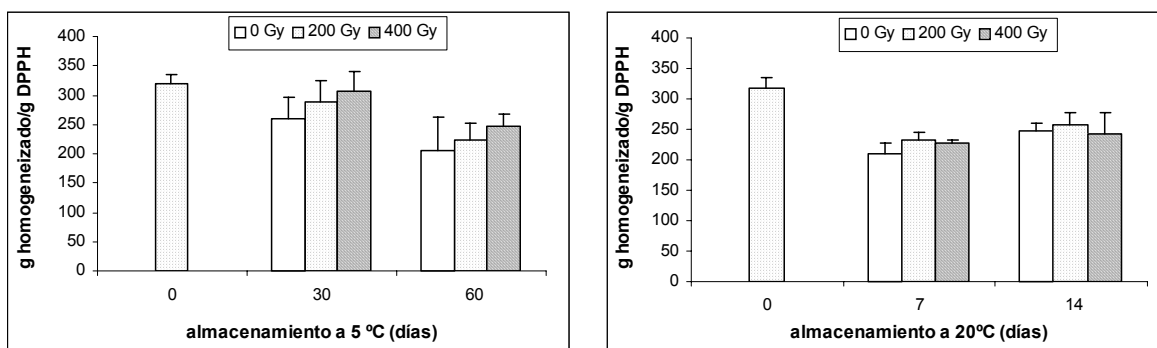


Figura 4. Capacidad antioxidante de las mandarinas 'Clemenules' irradiadas a 0, 200 y 400 Gy almacenadas a 20 (a) o a 5°C (b)

Valores expresados como EC₅₀ (g homogeneizado/g DPPH). Las barras verticales muestran la desviación estándar (n=3)

La capacidad antioxidante de las mandarinas irradiadas y no irradiadas se determinó mediante el método DPPH y se expresó como EC₅₀ que es la concentración de muestra necesaria para reducir al 50% el DPPH inicial (Sánchez-Moreno et al., 2003). Por tanto, un incremento de la EC₅₀ indica una disminución de la capacidad antioxidante ya que se necesita mayor cantidad de muestra para reducir al 50% la cantidad inicial del reactivo DPPH. La Figura 4 muestra los valores de EC₅₀ determinados para el control y las mandarinas irradiadas a 200 y 400 Gy. Las radiaciones ionizantes aplicadas no variaron la capacidad antioxidante de las muestras.

La capacidad antioxidante de las mandarinas aumentó después del almacenamiento respecto del valor inicial (disminución de la EC₅₀). Este aumento fue más brusco después del primer período de almacenamiento a 20°C (Figura 4a), lo cual se correlaciona con el mayor contenido en

vitamina C total medido en los tres tratamientos (0, 200 y 400 Gy) en ese mismo período. En cítricos a diferencia de lo observado en otras frutas, se considera que la vitamina C es el componente que contribuye mayoritariamente a la capacidad antioxidante (del Caro et al., 2004). Asimismo, la capacidad antioxidante aumentó ligeramente al finalizar el almacenamiento a 5°C (disminución de los valores EC₅₀) debido probablemente a la concentración de componentes por la pérdida de agua que se produce después de un almacenamiento largo (Figura 4b).

CONCLUSIONES

Las radiaciones ionizantes con rayos X a las dosis aplicadas (200 y 400 Gy) en mandarinas 'Clemenules' no disminuyen los contenidos en vitamina C total, hesperidina ni naringutina, ni tampoco la capacidad antioxidante de las mandarinas clementinas por lo que su utilización como método

cuarentenario y en otras posibles aplicaciones no merma la calidad nutricional ni funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdellaoui, S., Lacroix, M., Jobin, M., Boubekri, C., Gagnon, M. 1995. Effect of gamma-irradiation combined with hot-water treatment on the physicochemical properties, vitamin C content and organoleptic quality of clementines. *Sciences des Aliments*, 15(3): 217-235.
- Alonso, M., del Río, M.A., Jacas, J.A., 2002a. Respuesta del híbrido de mandarina 'Ellendale' infestado con *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) al tratamiento con atmósfera insecticida y calor. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 28, 427-433.
- Alonso, M., del Río, M.A., Jacas, J.A., 2002b. Ionización con electrones acelerados como tratamiento de cuarentena contra *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 28, 419-426.
- Boylston, T.D., Reitmeier, C.A., Moy, J.H., Mosher, G.A., Taladriz, L. 2002. Sensory quality and nutrient composition of three Hawaiian fruits treated by X-irradiation. *Journal of Food Quality*, 25: 419-433.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
- Chalker-Scott, L., Fuchigami, L.H. 1989. The role of phenolic compounds in plant stress response. En: *Low-Temperature Stress Physiology in Crops*; Paul, H.L., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, p 27-40.
- del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., Agabbio, M. 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84 (1): 99-105.
- Hu, M.Y., Liu, X.Q., Lo, X.M. Hou, R.H., Weng, Q.F. 2004. Irradiation as a quarantine treatment against citrus rust mite (*Phyllocoptruta oleivora*). Irradiation as a phytosanitary treatment of food and agricultural commodities. IAEA-TEC-DOC-1427 p. 127-132.
- Kader, A.A. 1986. Potential applications of ionizing radiation in postharvest handling of fresh fruits and vegetables. *Food Technology*, 40(6):117-121.
- Lee, K. y Kader, A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20: 207-220.
- Mahrouz, M., Lacroix, M., D'Aprano, G., Oufedjikh, H., Boubekri, C., Gagnon, M. 2002. Effect of gamma-irradiation combined with washing and waxing treatment on physicochemical properties, vitamin C, and organoleptic quality of Citrus clementina Hort. ex. Tanaka. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25): 7271-7276.
- McLaughlin, W.L. 1999. Gamma-ray sources vs. X-ray or electron beams for quarantine treatment. En: *Proc. Workshop The use of Irradiation as Quarantine Treatment of Food and Agricultural Commodities*. Moy, J.H., Wong, L. (Eds.). Honolulu, HI, USA, p. 78-89.
- Moshonas, M.G. y Shaw, P.E. 1984. Effects of low-dose gamma irradiation on grapefruit products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32: 1098-1101.
- Patil, B.S. 2004. Irradiation applications to improve functional components of fruits and vegetables. *American Chemical Society Symposium. Series 875*. En: "Irradiation of Food and Packaging: Recent Developments". Komolprasert, V. Morehouse, K. (Eds.). Washington, p.117-137.
- Patil, B.S., Vanamala, J., Hallman, G. 2004. Irradiation and storage influence on bioactive components and quality of early and late season 'Rio Red' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Postharvest Biology and Technology*, 34 (1): 53-64.
- Rapisarda, P., Bellomo, S.E., Intelisano, S. 2001. Storage temperature effects on blood orange fruit quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(7): 3230-3235.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative

contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juice. *Journal of the Food Science and Agriculture*, 83:430-439.

USDA [United States Department of Agriculture]. 2006. Treatments for fruits and vegetables: final rule. *Federal Register* 71, 4451-4464.
