

(S8-P107)

LA APLICACIÓN DE POLIAMINAS MANTIENE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA GRANADA

F. GUILLÉN⁽¹⁾, P. J. ZAPATA⁽¹⁾, D. MARTÍNEZ-ROMERO⁽¹⁾, M. SERRANO⁽²⁾, D. VALERO⁽¹⁾

⁽¹⁾Dept. Tecnología Agroalimentaria

⁽²⁾Dept. Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior de Orihuela (Universidad Miguel Hernández). Ctra. Beniel km. 3,2 03312 Orihuela (Alicante), Spain. E-mail: fabian.guillen@umh.es Tfn: 966749656; Fax: 966749677

Palabras Clave: granada – poliaminas - actividad antioxidante – polifenoles – antocianinas - ácido ascórbico

RESUMEN

Frutos de granada se trataron con putrescina o espermidina mediante infiltración a vacío y se almacenaron a 2°C durante 60 días. Cada dos semanas se tomaron muestras y se almacenaron 3 días más a 20°C para estudiar la vida útil. Los tratamientos fueron efectivos en mantener la concentración de ácido ascórbico, fenoles totales, y antocianinas en los arilos, con valores significativamente superiores a los frutos control. Además la aplicación de putrescina o espermidina incrementó la actividad antioxidante total de los arilos. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que establece una relación positiva entre la aplicación exógena de poliaminas y su papel en el mantenimiento de las propiedades funcionales de los frutos en general, y de la granada en particular.

THE APPLICATION OF POLYAMINES MAINTAINS THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF POMEGRANATE.

ABSTRACT

Pomegranate fruits were treated with putrescine or spermidine at 1 mM by pressure infiltration and then stored at 2°C for 60 days. Samples were taken bi-weekly and further stored 3 days at 20°C for shelf life study. The treatments were effective on maintaining the concentration of ascorbic acid, total phenolic compounds and total anthocyanins in arils at higher levels than in control samples. In addition, the polyamine application increased the levels of total antioxidant activity (TAA). To our knowledge, this is the first report showing a close relationship between polyamine treatment and increase in total antioxidant activity, through maintenance of total phenolic compounds.

INTRODUCCIÓN

Los frutos de granada (*Punica granatum L.*) se producen en muchos países en el área mediterránea. Normalmente se consumen las semillas de las granadas en fresco (arilos). Los arilos contienen alrededor de un 80% de zumo y un 20% de semilla. El zumo es rico en varios nutrientes, principalmente azúcar, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales (Al-Maiman y Ahmad, 2002), aunque en distintos estudios se han indicado las amplias variaciones que se dan en cuanto al contenido de estos nutrientes dependiendo de la variedad (Fadavi, *et al.*, 2005). Además también se han descrito compuestos en estos frutos que presentan propiedades

antioxidantes, anticancerígenas así como un efecto protector frente a la arterioesclerosis (Aviram *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2006).

Está ampliamente documentado que en post-cosecha se dan importantes pérdidas de calidad en estos frutos, si bien el principal problema se manifiesta en una deshidratación y pardeamiento tanto de la piel como de los arilos, problemas que incrementan a temperaturas inferiores a 5°C (Elyatem y Kader, 1984). Sin embargo, si almacenamos a temperaturas mayores provocamos una reducción de la vida útil, debido a la aceleración del proceso de maduración, a la deshidratación y a la incidencia de podredumbres, por lo que se hace necesario el almacenamiento a bajas temperaturas. También se han descrito pérdidas en antocianinas y ácido ascórbico (Miguel *et al.*, 2004; Martí *et al.*, 2001) que reducirían la actividad antioxidante a lo largo del almacenamiento de estos frutos (Gil *et al.*, 1996; Artés *et al.*, 2000).

Las poliaminas endógenas de estos frutos (putrescina, espermidina y espermina) están implicadas en muchos procesos del desarrollo. La aplicación de poliaminas exógenas en frutos, ha conseguido mejorar la vida útil de los mismos (Valero *et al.*, 2002). Así, la aplicación exógena de putrescina (normalmente bajo infiltración a vacío) disminuyó el ablandamiento y retrasó los cambios de color en limón, melocotón, albaricoque y ciruela (Valero, *et al.*, 1998; Martínez-Romero, *et al.*, 2000, 2002; Serrano *et al.*, 2003), retrasando el proceso de maduración de los frutos, posiblemente debido a las características antisenescentes que muestran estas poliaminas.

Recientemente, hemos demostrado que la aplicación exógena de poliaminas retrasó el proceso de maduración en granada mediante una reducción del ablandamiento, del incremento de la relación °Brix/Acidez y de las pérdidas de peso (Mirdehghan, *et al.*, en prensa). Además, el tratamiento con poliaminas retrasó los síntomas de daño por frío (pardeamiento de la piel e incremento de la salida de electrolitos). Sin embargo atendiendo a la bibliografía consultada, no existe información disponible sobre el efecto de las poliaminas sobre los compuestos químicos relacionados con las propiedades funcionales de los arilos. Sobre este aspecto, el objeto de este trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación de putrescina o espermidina mediante infiltración a vacío sobre los compuestos con propiedades funcionales (ácido ascórbico, fenoles totales, antocianinas totales y actividad antioxidante total) de granadas almacenadas a 2°C seguidas de un almacenamiento posterior a 20°C durante 3 días más.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Vegetal y Diseño Experimental

Los frutos de granada (*Punica granatum* L. cv. Mollar de Elche) se recolectaron en una finca comercial en Orihuela (Alicante). Esta variedad está considerada de recolección tardía. Los frutos se recolectaron en un estado de madurez comercial y transportados inmediatamente al laboratorio donde se descartaron los frutos que presentaban daños o defectos. Con los frutos restantes se elaboraron 3 lotes de 125 frutos cada uno. En cada lote se realizaron los tratamientos por quintuplicado en grupos de 25 frutos. En cada lote se realizó un tratamiento con putrescina 1mM o espermidina 1mM o bien con agua destilada (lotes control). Los tratamientos se realizaron mediante infiltración a vacío de igual forma que en trabajos anteriores (Valero, *et al.*, 1998; Martínez-Romero, *et al.*, 2000, 2002; Serrano *et al.*, 2003) sumergiendo los frutos en 20 litros de solución que contenía además Tween-20 (2g L⁻¹) como agente tensioactivo no iónico. Se aplicó una presión de vacío de 0,05 bares durante 4 minutos a 25°C. Tras el tratamiento los frutos se secaron sobre papel Kraft. A excepción de los frutos seleccionados como día 0 todos los frutos restantes se almacenaron en una cámara a 2°C en permanente oscuridad y con una humedad relativa del 90%. El muestreo se realizó tras 0, 15, 30, 45 y 60 días de almacenamiento en frío, momento en el que 25 frutos de cada lote

(5 por cada replicación) se colocaron en una cámara a 20°C durante 3 días con el objetivo de estudiar su vida útil. Tras este último almacenamiento se extrajeron cuidadosamente los arilos, se homogeneizaron las muestras y se congelaron en nitrógeno líquido, almacenándose a -20°C hasta realizar los análisis.

Actividad Antioxidante Total, Fenoles Totales y Ácido Ascórbico

Se recogieron 5 gramos de arilos que se homogeneizaron en 10 mL de Tampón fosfato 50mM pH=7,8 y se centrifugó a 15000 r.p.m durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se usó para la cuantificación de la Actividad Antioxidante Total (AAT) y de Fenoles Totales por duplicado (Serrano *et al.*, 2005). La determinación de la AAT se realizó mediante el sistema enzimático compuesto por la sal diamónica 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS), la enzima peroxidasa "horse radish sigma" y como sustrato oxidante se utilizó peróxido de hidrógeno. Así, los radicales ABTS* son generados y monitorizados a 414 nm. El descenso de absorbancia tras la adición del extracto de arilos fue proporcional a la AAT de la muestra. Se realizó una curva de calibrado usando ácido L-ascórbico (0-20 nmol) de Sigma (Poole, Dorset, United Kingdom), y los resultados se expresaron como miligramos de ácido ascórbico equivalente 100g⁻¹. La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante el uso del agente Folin-Ciocalteu y los resultados fueron expresados como miligramos de ácido gálico equivalente 100g⁻¹.

El ácido ascórbico se cuantificó por duplicado utilizando el mismo extracto mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sistema de elución consistió en una fase móvil de ácido fosfórico 0,1% en condiciones isocráticas con un flujo de 0,5 mL min⁻¹ usando una columna de 30 cm x 7,8 mm (Supelcogel C-610H, Supelco Park, Bellefonte, United States), y la detección se realizó por medida de absorbancia a 210 nm. Se realizó una curva estándar de ácido L-ascórbico puro (Sigma, Poole, Dorset, United Kingdom) para la cuantificación y los resultados se expresaron como miligramos de ácido ascórbico 100g⁻¹. El tiempo de retención fue de 14,29 minutos.

Antocianinas Totales

Se adaptó el método descrito por García-Viguera *et al.* 1999 a estos frutos. 5 gramos de arilos se homogeneizaron en 10 mL de metanol y se dejaron 1 h a -18°C. Los extractos así obtenidos fueron centrifugados a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una columna C18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA). La columna C18 Sep-Pak fue previamente acondicionada con 5 mL de metanol, 5 mL de agua ultrapura y con 5mL de HCl 0,01 N. Tras la aplicación de la muestra, la columna fue lavada con 5mL de agua ultrapura y luego se eluyó con MeOH acidificado (HCl 0,01%). La absorbancia de la fracción obtenida se midió a 520nm. El método dio un porcentaje de recuperación del 90%. El contenido en antocianinas totales fue calculado usando cianidina-3-glucósido y los resultados obtenidos como la media de dos determinaciones fueron expresados como mg 100g⁻¹ de peso fresco.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de las determinaciones analíticas fueron objeto de un análisis de la varianza (ANOVA). Las fuentes de variación fueron almacenamiento y tratamiento. La comparación de las medias se realizó usando el test de Tuckey para examinar si las diferencias fueron significativas a $p < 0,05$.

Para conocer los compuestos que contribuyeron a la AAT, se realizaron regresiones lineales entre los parámetros funcionales, teniendo en cuenta para ello los datos de todos los días de muestreo (tanto en frutos control como tratados). Todos los análisis se interpretaron con SPSS software package v. 12.0 de Windows (2001).

RESULTADOS

Actividad Antioxidante Total (AAT)

En los arilos, la AAT incrementó durante el almacenamiento, principalmente tras 15 días a 2°C más 3 días a 20°C comparado con el día 0 más 3 días a 20°C (Figura 1) Este incremento inicial de AAT fue mayor en los arilos tratados con putrescina y con espermidina que el obtenido en los arilos control. Los niveles de AAT permanecieron mayores a lo largo del almacenamiento en los frutos tratados con respecto a los frutos control, si bien estas diferencias fueron mayores entre los arilos de los frutos tratados con espermidina que fueron los frutos que mayor nivel de AAT mostraron a lo largo de todo el experimento ($69,75 \pm 4,51$ mg equiv. ác. ascórbico 100 g^{-1}) comparado con la AAT observada en los frutos controles ($53,33 \pm 2,33$ mg equiv. ác. ascórbico 100 g^{-1}).

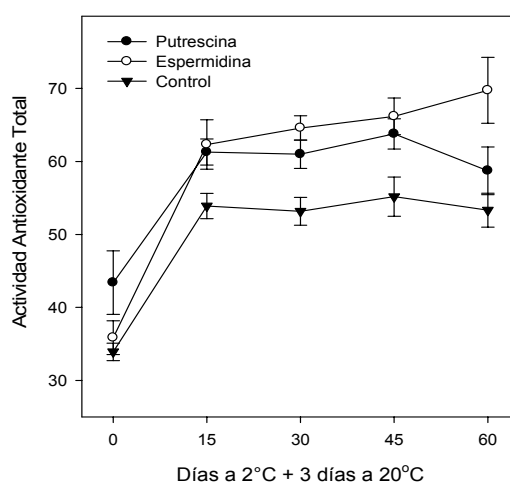


Figura 1: Efecto del tratamiento con poliaminas sobre la Actividad Antioxidante Total (mg equiv. ácido ascórbico 100 g^{-1}) en arilos de granada durante almacenamiento en frío (2°C) + 3 días a 20°C

Fenoles Totales

Los resultados obtenidos revelaron que los tratamientos realizados con poliaminas incrementaron el contenido en fenoles totales (Figura 2). En este caso, también fueron los arilos de los frutos tratados con espermidina los que mayores valores obtuvieron ($139,16 \pm 4,12$ mg equiv. ác. gálico 100 g^{-1}) comparados con los valores obtenidos en los arilos de los frutos tratados con putrescina ($128,78 \pm 2,29$ mg equiv. ác. gálico 100 g^{-1}), si bien fueron los arilos correspondientes a los frutos controles los que menor concentración de fenoles totales mostraron ($83,34 \pm 1,15$ mg equiv. ác. gálico 100 g^{-1}). Durante el almacenamiento, los arilos tratados presentaron mayores concentraciones de fenoles totales que los controles, aunque al final los niveles fueron muy similares en ambos casos, arilos tratados y controles.

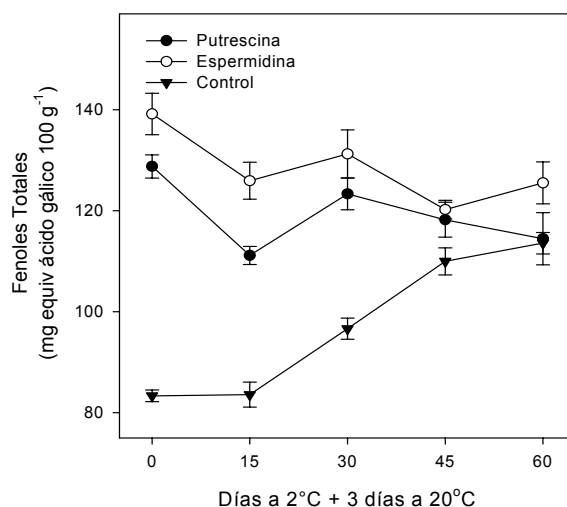


Figura 2: Efecto del tratamiento con poliaminas sobre el contenido en Fenoles Totales (mg equiv. ácido gálico 100 g⁻¹) en arilos de granada durante almacenamiento en frío (2°C) + 3 días a 20°C

Antocianinas Totales

Los niveles de antocianinas totales permanecieron significativamente superiores en los arilos tratados con respecto a los controles (Figura 3). La concentración de antocianinas totales no cambió durante el almacenamiento de los frutos no tratados con poliaminas, mientras que se observó un ligero incremento en aquellos arilos correspondientes a los frutos tratados con espermidina (desde 164,63 ± 7,08 a 229,86 ± 7,47 mg equiv. cianidina-3-glucósido 100g⁻¹).

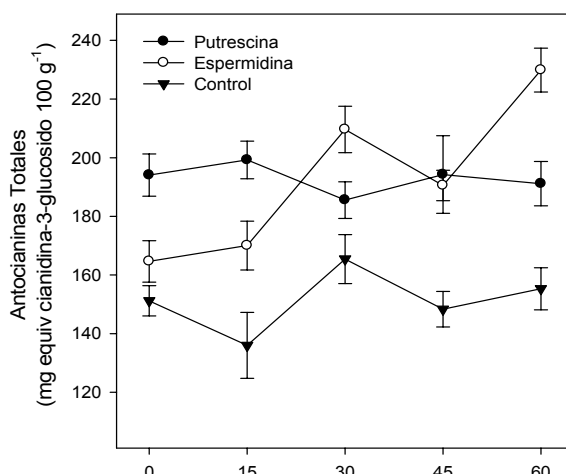


Figura 3: Efecto del tratamiento con poliaminas sobre el contenido en Antocianinas Totales (mg equiv. cianidina-3-glucósido 100 g⁻¹) en arilos de granada durante almacenamiento en frío (2°C) + 3 días a 20°C

Ácido Ascórbico

El efecto de los tratamientos con poliaminas sobre el contenido en ácido ascórbico fue el de mantener niveles ligeramente superiores no significativos en los arilos de los frutos tratados (Figura 4). Estas diferencias fueron disminuyendo a medida que avanzaba el almacenamiento de los frutos.

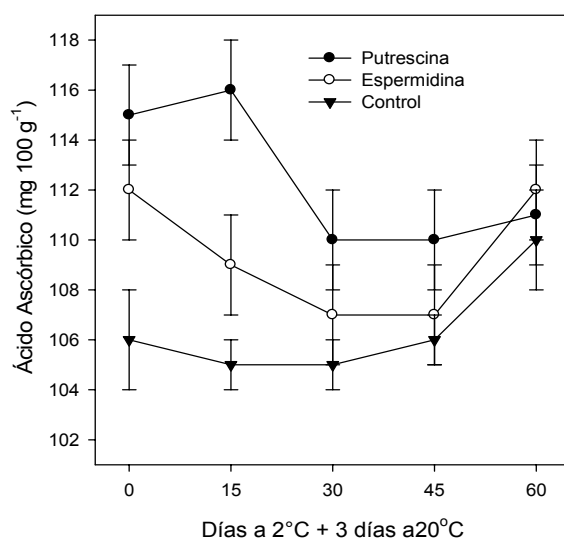


Figura 4: Efecto del tratamiento con poliaminas sobre el contenido en Ácido Ascórbico ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) en arilos de granada durante almacenamiento en frío (2°C) + 3 días a 20°C

Correlaciones

Las regresiones realizadas entre la AAT y el contenido en fenoles totales, antocianinas y ácido ascórbico, revelaron que la AAT solamente estuvo correlacionada con los fenoles totales tanto en los frutos controles como en los tratados ($r^2 > 0,70$). Por el contrario no se obtuvo ninguna correlación en el caso del ácido ascórbico.

DISCUSIÓN

Existe un amplio número de estudios que han revelado el fuerte efecto protector que tienen frutas y vegetales contra varios tipos de enfermedades. Así, el consumo de frutas se muestra beneficioso para nuestra salud debido al contenido en diversos compuestos con actividad antioxidante, que incluyen compuestos tales como el ácido ascórbico, flavonoides, y compuestos fenólicos tales como antocianinas (Tomás-Barberán y Espín, 2001). La variedad de granada analizada en este estudio (Mollar de Elche) es muy rica en estos compuestos comparando los datos obtenidos con otras variedades, principalmente, “Taifi”, “Wonderful” y “Ganesh”, las cuales muestran menores cantidades de ácido ascórbico y de fenoles totales (Al-Maiman y Ahmad, 2002; Gil y Tomás-Barberán, 2000; Nanda *et al.*, 2001). Durante el desarrollo y la maduración de la granada se ha observado que se producen incrementos en el contenido de antocianinas que van acompañados por descensos en el contenido de fenoles totales y ácido ascórbico (Kulkarny y Aradhya, 2005). Además el patrón no climatérico característico de la granada (Ben-arie *et al.*, 1984) indica que la fecha de recolección marca el grado de maduración junto con los niveles máximos de los compuestos funcionales (Al-Maiman y Ahmad, 2002). En granada la pérdida de ácido ascórbico tiene lugar bien durante el almacenamiento en frío o a temperatura ambiente (Nanda *et al.*, 2001) mientras que las antocianinas disminuyen en los arilos almacenados (Miguel *et al.*, 2004) o en los zumos (Pérez-Vicente *et al.*, 2004). Se han llevado a cabo pocos intentos para minimizar la pérdida de compuestos funcionales siendo efectivo el uso del envasado en atmósfera modificada en el retraso de la pérdida de antocianinas en frutos enteros de granada (Artés *et al.*, 2000) o arilos mínimamente procesados (Gil *et al.*, 1996).

En este trabajo, la aplicación de putrescina o espermidina fue efectiva en mantener la concentración de ácido ascórbico, el contenido de fenoles y antocianinas totales a mayores niveles en los frutos tratados que en los frutos control. Se observaron pequeños incrementos o pérdidas no significativas de estos compuestos durante el almacenamiento tras los tratamientos con poliaminas. Durante el almacenamiento de las granadas control la AAT y los fenoles totales incrementaron de acuerdo con trabajos previos (Mirdehghan *et al.*, 2006). No obstante para la mayoría de muestreos, la AAT y los fenoles totales permanecieron en mayores proporciones en los arilos tratados con poliaminas que en los controles. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el cual la aplicación de poliaminas inducía efectos beneficiosos manteniendo o incrementando la actividad potencial antioxidante de la granada durante el almacenamiento post-recolección. El mecanismo por el cual la putrescina o espermidina indujeron estos efectos aún se desconoce. No obstante, durante la última fase del desarrollo del fruto y de la maduración post-recolección se ha observado una reducción de los contenidos endógenos de putrescina y espermidina en un amplio rango de frutos (Valero *et al.*, 2002) los cuales se han asociado con la aceleración de los cambios relacionados con la maduración (color, textura, sabor y aroma) y la pérdida de calidad. Estos cambios fueron significativamente retrasados o reducidos por la aplicación de putrescina (Valero, *et al.*, 1998; Martínez-Romero, *et al.*, 2000, 2002; Serrano *et al.*, 2003) y por tanto efectivos en conseguir un aumento de la vida útil. En este sentido las pérdidas de ácido ascórbico y el aumento de la actividad ascorbato oxidasa durante el desarrollo, maduración y senescencia de pimiento y tomate se ha asociado con descensos en el contenido de poliaminas (Yahia *et al.*, 2001). Por el contrario la acumulación de poliaminas en tomates transgénicos aumentó el contenido de licopeno y la calidad del zumo (Mehta *et al.*, 2002). Así, está claro que la naturaleza antisenescente atribuida a las poliaminas (Valero *et al.*, 2002) debería ejercer un determinado papel en la integridad celular y por tanto evitarían el contacto entre sustratos y sus enzimas degradativos. Esto podría explicar parcialmente la mayor AAT en los arilos tratados a través de una reducción de las pérdidas de los compuestos fenólicos ya que la AAT se ha correlacionado con los fenoles totales. En otros cultivares de granada las antocianinas, el ácido ascórbico y los fenoles son responsables de la AAT sólo o en combinación (Kulkarni *et al.*, 2004), tal y como se ha observado en algunos frutos (Kalt *et al.*, 1999). El principal compuesto fenólico que contribuye a la AAT de la granada es punicalagina (Kulkarni *et al.*, 2004), mientras que delfinidina, cianidina y pelargonidina son antocianidinas que participan en la AAT de los arilos (Noda *et al.*, 2002). Por otra parte la mayor AAT encontrada en los arilos tras el tratamientos con poliaminas podría estar atribuida a la capacidad de las poliaminas para actuar como atrapadores efectivos de los radicales libres, tal y como se ha observado en algunos sistemas in Vitro. Además esta capacidad se ha correlacionado con el número de grupos aminos (Drolet *et al.*, 1986) y podrían explicar los mayores efectos de la espermidina (3 grupos aminos) sobre la putrescina (2 grupos amino) en incrementar la AAT de los arilos de granada. Recientemente se ha propuesto que las poliaminas podrían funcionar como antioxidantes protectores a través del ciclo superóxidodismutasa/ascorbato-glutation (Kim y Jin, 2006).

CONCLUSIONES

Mediante la aplicación de espermidina se obtuvieron los mejores resultados en términos de una mayor AAT mediante el mantenimiento del contenido de fenoles totales. No obstante se necesitan posteriores investigaciones para obtener un mejor conocimiento acerca de cómo las poliaminas afectan a las propiedades funcionales de los frutos en general y de granada en particular. Además la evaluación de los contenidos endógenos de poliaminas en los arilos tras la aplicación exógena de poliaminas confirmaría el incremento en estos

compuestos antisenescentes y su posible papel en incrementar los compuestos beneficiosos para la salud de la granada.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, L. S.; Seeram, N. P.; Aggarwal, B. B.; Takada, Y.; Sand, D.; Heber, D. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 2006, *54*, 980-955.
- Al-Maiman, S. A.; Ahmad, D. Changes in physical and chemical properties during pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit maturation. *Food Chem.* 2002, *76*, 437-441.
- Artés, F.; Villaescusa, R.; Tudela, J. A. Modified atmosphere packaging of pomegranate. *J. Food Sci.* 2000, *65*, 1112-1116.
- Aviram, M.; Dornfeld, L.; Rosenblat, M.; Volkova, N.; Kaplan, M.; Coleman, R. Pomegranate juice consumption reduced oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Amer. J. Clin. Nutr.* 2000, *71*, 1062-1076.
- Ben-Arie, R.; Segal, N.; Guelfat-Reich, S. The maturation and ripening of the 'Wonderful' pomegranate. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1984, *109*, 898-902.
- Drolet, G.; Dumbroff, E.B.; Legge, R.L.; Thompsom, J.E. Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry.* 1986, *25*, 367-371.
- Elyatem, S. M.; Kader, A. A. Post-harvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. *Sci. Hortic.* 1984, *24*, 287-298.
- Fadavi, A.; Barzegar, M.; Azizi, M. H.; Bayat, M. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci. Tech. Int.* 2005, *11*, 113-119.
- García-Viguera C.; Zafrilla, P.; Romero, F.; Abellá, P.; Artés, F.; Tomás-Barberán, F. A. Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature. *J. Food Sci.* 1999, *64*, 243-247.
- Gil, M I.; Artés, F.; Tomás-Barberán, F. A. Minimal processing and modified atmosphere packaging effects on pigmentation of pomegranate seeds. *J. Food Sci.* 1996, *61*, 161-164.
- Gil, M. I.; Tomás-Barberán, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000, *48*, 4581-4589.
- Gil, M. I.; Artés, F.; Tudela, J. A. Minimal processing and modified atmosphere packaging effects on pigmentation of pomegranate seeds. *J. Food. Sci.* 1996, *61*, 161-164.
- Kalt, W.; Forney, C. F.; Martin, A.; Prior, R. L. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1999, *47*, 4638-4644.
- Kim, H.S.; Jin, C.D. Polyamines as antioxidant protectors against paraquat damage in radish (*Raphanus sativus* L.) cotyledons. *J. Plant Biol.* 2006, *49*, 237-246.
- Kulkarni, A. P.; Aradhya, S. M. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chem.* 2005, *93*, 319-324.
- Kulkarni, A. P.; Aradhya, S. M.; Divakar, S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. *Food Chem.* 2004, *87*, 551-557.
- Martí, N.; Pérez-Vicente, A.; García-Viguera, C. Influence of storage and ascorbic acid addition on pomegranate juice. *J. Sci. Food. Agric.* 2001, *82*, 217-221.

- Martínez-Romero, D.; Serrano, M.; Carbonell, A.; Burgos, L.; Riquelme, F.; Valero, D. Effects of postharvest putrescine treatment on extending shelf life and reducing mechanical damage in apricot. *J. Food Sci.* 2002, *67*, 1706-1712.
- Martínez-Romero, D.; Valero, D.; Serrano, M.; Burló, F.; Carbonell, A.; Burgos, L.; Riquelme, F. Exogenous polyamines and gibberellic acid effects on peach (*Prunus persica* L.) storability improvement. *J. Food Sci.* 2000, *65*, 288-294.
- Mehta, R. A.; Cassol, T.; Li, N.; Handa, A. K.; Mattoo, A. K. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality and vine life. *Nat. Biotechnol.* 2002, *20*, 613-618.
- Miguel, G.; Fontes, C.; Antunes, D.; Neves, A.; Martins, D. Anthocyanin concentrations of 'Assaria' pomegranate fruits during different cold storage conditions. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004, *5*, 338-342.
- Mirdehghan, S. H.; Rahemi, M.; Serrano, M.; Guillén, F.; Martínez-Romero, D.; Valero, D. Prestorage heat treatment to maintain nutritive and functional properties during postharvest cold storage of pomegranate. *J. Agric. Food Chem.* 2006, *54*, 8495-8500.
- Mirdehghan, S.H.; Rahemi, M.; Castillo, S.; Martínez-Romero, D.; Serrano, M.; Valero, D. Pre-storage application of polyamines by pressure or immersion improves shelf life of pomegranate stored at chilling temperature by increasing endogenous polyamine levels. *Postharvest Biol. Technol.* In press.
- Nanda, S.; Rao, D. V. S.; Krishnamurthy, S. Effects of shrink film wrapping and storage temperature on the shelf life and quality of pomegranate fruits cv. Ganesh. *Postharvest Biol. Technol.* 2001, *22*, 61-69.
- Noda, Y.; Kaneyuki, T.; Mori, A.; Packer, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J. Agric. Food Chem.* 2002, *50*, 166-171.
- Pérez-Vicente, A.; Serrano, P.; Abellán, P.; García-Viguera, C. Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *J. Sci. Food Agric.* 2004, *84*, 639-644.
- Serrano, M.; Guillén, F.; Martínez-Romero, D.; Castillo, S.; Valero, D. 2005. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J. Agric. Food Chem.* 2005, *53*, 2741-2745.
- Serrano, M.; Martínez-Romero, D.; Guillén, F.; Valero, D. Effects of exogenous putrescine on improving shelf life of four plum cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 2003, *30*, 259-271.
- SPSS, VERSION 12.0 for Windows; SPSS Inc.: Chicago, IL, 2001.
- Tomás-Barberán, F. A.; Espín, J. C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.* 2001, *81*, 853-876.
- Valero, D.; Martínez-Romero, D.; Serrano, M. The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. *Trends Food Sci. Technol.* 2002, *13*, 228-234.
- Valero, D.; Martínez-Romero, D.; Serrano, M.; Riquelme, F. Influence of postharvest treatment with putrescine and calcium on endogenous polyamines, firmness, and abscisic acid in lemon (*Citrus lemon* L. Burm cv. Verna). *J. Agric. Food Chem.* 1998, *46*, 2102-2109.
- Yahia, E. M.; Contreras-Padilla, M.; González-Aguilar, G. Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. *Lebensm-Wiss u. Technol.* 2001, *34*, 452-457.