

Caracterización micrográfica del fruto de *Punica granatum* y su importancia en el control de calidad botánica

Leila A. Gimenez^{1*}, Beatriz G. Varela², Nilda D. Vignale¹, Alberto A. Gurni¹

1. Universidad Nacional de Jujuy. Facultad de Ciencias Agrarias. San Salvador de Jujuy, República Argentina.

2. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Farmacobotánica. Buenos Aires, República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: gimenezleila94@gmail.com

Resumen

Punica granatum L., "granada", es una fruta tropical que se consume tanto fresca como procesada, y su cáscara en infusiones. El presente trabajo tiene por objetivo definir los caracteres micrográficos de valor diagnóstico para efectuar el control de calidad botánico de productos alimenticios y farmacobotánicos derivados de esta fruta, incorporando valor agregado. Se aplicaron las técnicas micrográficas de raspado, disociado fuerte, observación con luz polarizada y reacciones histoquímicas para la caracterización de lípidos, cristales y aleurona. Los elementos diagnósticos estuvieron representados por esclereidas isodiamétricas solitarias y agrupadas, drusas y cristales cúbicos, granos de almidón simples de formas variadas, que constituyen una referencia complementaria en ausencia de tratamiento térmico sobre la materia prima, esclereidas columnares, gotas lipídicas y granos de aleurona pertenecientes a las semillas. Se trata de caracteres indispensables para verificar el carácter genuino de productos derivados de granada.

Micrographic characterization of *Punica granatum* fruit and its importance in botanical quality control

Summary

Punica granatum L., "pomegranate", "granada", is a tropical fruit that is consumed both fresh and processed and its peel in infusions. The objective of this work is to define the micrographic characters of diagnostic value that will make it possible to carry out the botanical quality control of food and pharmacobotanical products derived from this fruit, incorporating added value. The micrographic techniques of scraping, hard dissociation, observation with polarized light and histochemical reactions to characterize lipids, crystals and aleurone were applied. The diagnostic elements were represented by solitary and grouped isodiametric sclereids, druses and cubic crystals, simple starch grains of various shapes which constitute complementary reference in the absence of thermic treatment on the raw material; and columnar sclereids, lipid drops and aleurone grains belonging to the seeds. These are essential characters to verify the genuine nature of products derived from pomegranate.

Introducción

Punica granatum L. (Punicaceae), "granada", es una fruta de zonas cálidas y áridas. Originaria de los alrededores de Irán hasta el norte del Himalaya en la India, se estableció en toda la región del Mediterráneo, incluida Armenia, por lo que es una fruta nativa de Persia cuyo origen se remonta a los primeros años del Neolítico (Hurrell y col., 2010; Pochettino, 2015).

Actualmente se encuentra cultivada en varias partes de Latinoamérica, entre ellas en el territorio argentino (López-Mejías y col., 2010; Mondragón y Juárez, 2008), donde crece sin dificultad en el centro y norte del país,

aunque hasta fines de los noventa no existían cultivos comerciales. Según la FAO (2010), a partir del período 2008/2009, se comienza a implantar a gran escala en las provincias de Catamarca, Córdoba, Salta, San Juan y San Luis (Molina, 2016). Es una planta que presenta porte arbustivo y puede crecer desde 2 a 5 metros de altura, con copa extendida; su follaje es perenne y el tronco posee la corteza escamosa, otorgándole un aspecto ornamental. Crece en lugares húmedos, en bordes o interior de selvas pero se logra adaptar a otros climas; fructifica de diciembre a marzo (Hurrell y col., 2010; Pochettino, 2015).

Palabras clave: "granada" - *Punica granatum* - micrografía - caracteres diagnósticos.

Key words: "pomegranate" - *Punica granatum* - micrography - diagnostic characters.

En varios países, la demanda del fruto ha ido incrementando tanto al estado fresco como procesado en la elaboración de zumos, jugos envasados, deshidratados, mermeladas, granadina, condimento alimentario y la cáscara para el tratamiento de la diarrea (López-Mejías y col., 2010; Hurrell y col., 2010; Pochettino, 2015).

El objetivo fundamental de la producción agrícola se encuentra dirigido a ofrecer calidad, y el sector de frutas tropicales no es ajeno a dichos requisitos.

Sustentado en la multidimensionalidad del concepto de calidad el presente trabajo contribuye en la faceta de la calidad botánica, definida como la certificación de la presencia de la especie botánica (completa o partes de ella) en el producto alimenticio derivado (Vignale y Gurni, 2003). En este producto, la especie en cuestión se utiliza como materia prima durante su elaboración, en concordancia con el texto del rótulo y con las especificaciones de la normativa vigente en cada país (Varela y col., 2009). En Argentina, el Código Alimentario Argentino (C.A.A., 2017) contiene las pautas regulatorias de todos los alimentos del territorio.

El C.A.A. también expresa la importancia del control de calidad como un servicio para la mejora de los agroproductos derivados y de sus procesos de elaboración, los cuales deben responder a los estándares respectivos establecidos, con el único fin de proteger a los consumidores a través de la fiabilidad del producto (Folgar, 1996).

Para comprender el propósito del análisis de la calidad de un alimento de origen vegetal es necesario conocer el camino que conduce a la identificación de las plantas. Se trata de una tarea que requiere disponer de un trozo de material con hojas, flores y frutos, en el que se estudian los caracteres de valor diagnóstico brindados por la exomorfolología y se confronta la observación, a ojo desnudo o con el auxilio de la lupa, con los dilemas que integran las claves de determinación disponibles en la bibliografía (Vignale y Gurni, 2003).

Cuando una parte o un trozo o un órgano de una planta se procesa para obtener un producto destinado a la alimentación humana, generalmente experimenta acciones mecánicas o tratamientos térmicos que provocan la desaparición de dichos caracteres exomorfológicos reproductivos y vegetativos (Vignale y Gurni, 2009), tal como ocurre en la preparación de jugos, mermeladas o la cáscara trozada de frutos de "granada" (Pochettino, 2015). En dichas circunstancias especiales, la definición de calidad botánica requiere del complemento fundamental expresado por los únicos caracteres de naturaleza botánica que se mantendrán presentes. Estas son las referencias anatómicas, en cuya observación el instrumental óptico requerido será el microscopio, en sustitución de la lupa anteriormente mencionada.

La situación se supera aplicando el método micrográfico y seleccionando las técnicas apropiadas a la naturaleza del material original, concluyendo en la definición de

los caracteres de valor diagnóstico, variables en función del órgano vegetal empleado como materia prima para cada especie (Cañigual y col., 1998; Vignale y Gurni, 2009; Gurni, 2014).

Estos indicadores micrográficos constituyen la herramienta requerida para certificar la presencia de una especie en productos elaborados y, en coherencia con ello, abordar el control de calidad botánico que deriva en la definición de su carácter genuino o, eventualmente, en la detección de contaminación o adulteración (Flores y Vignale, 2010; Rivas y col., 2009; Varela y col., 2009; Vignale, 2002).

Estudios anatómicos preexistentes revelan en el fruto de la especie en estudio, esclereidas de formas variadas y granos de almidón simples y en la semilla la presencia de células esclerenquimáticas, aleurona y gotas lipídicas (Winton y Winton, 1939).

Los objetivos del presente trabajo consisten en analizar frutos de *Punica granatum* mediante la aplicación de las técnicas micrográficas de raspado, disociación fuerte y pruebas histoquímicas, para definir los caracteres de valor diagnóstico requeridos en las prácticas de control de calidad botánico de productos alimenticios y medicinales elaborados con dicha materia prima.

Materiales y Métodos

Materiales

El material (fruto) analizado procede de muestras comerciales adquiridas en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, y se comparó con material de referencia proveniente de la cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Método

1. Análisis exomorfológico: comparación de las características de morfología externa del fruto con la información bibliográfica de la especie en estudio (Hurrell y col., 2010).

2.- Análisis micrográfico: se fundamenta en el análisis de los caracteres anatómicos y de los productos del metabolismo celular como referencia identificatoria (D'Ambrógio de Argüeso, 1986; Gurni, 2014).

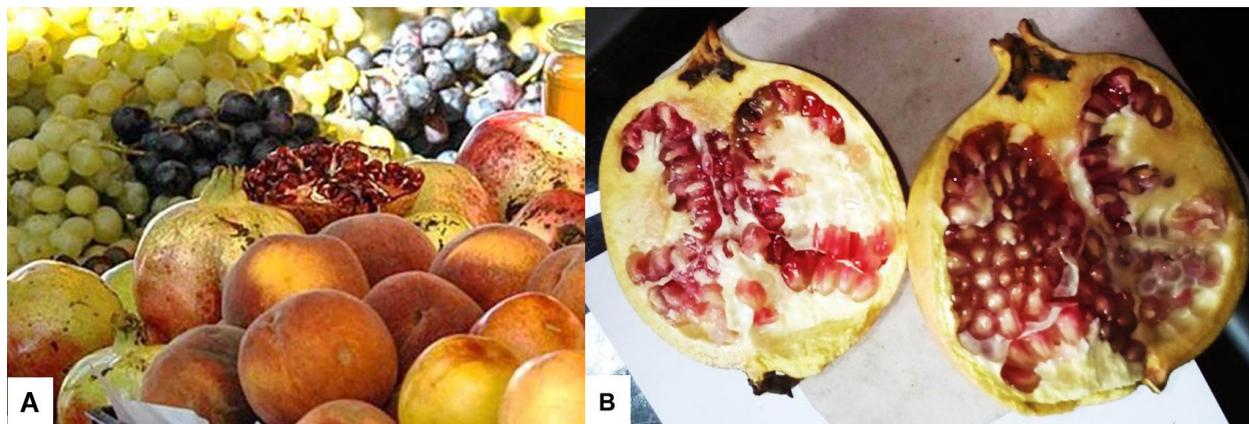
Técnicas

Raspado

Se practica sobre el material fresco usando una hoja de afeitar para raspar, y luego se coloca el raspado entre porta y cubreobjetos con unas gotas de agua para su observación al microscopio óptico.

Observación con luz polarizada

Los gránulos de almidón muestran dentro de su estructura

Figura 1.- *Punica granatum* L.

A: frutos de granada en el mercado. **B:** corte longitudinal del fruto mostrando semillas con arilo rojo distribuidas en dos planos.

por la birrefringencia observada, la *cruz de malta*, en la parte media de los gránulos; éste es el punto de desarrollo durante la biosíntesis conocido como hilium.

Disociado fuerte (según Boodle)

Esta técnica se indica para tejidos con células de paredes gruesas. El material de estudio se calienta con solución acuosa de hidróxido de potasio al 10 %, y se mantiene a ebullición, durante 10 min, se lava repetidas veces con agua y luego se deposita en un vaso de precipitado y se cubre con una solución de ácido crómico al 25 % y se deja actuar a temperatura ambiente durante 30 a 60 min, se repite el lavado hasta que quede lo más claro posible (Gattuso y Gattuso, 1999).

Reacciones histoquímicas

Caracterización de lípidos

Se realiza con solución saturada alcohólica de Sudán III que se deja actuar durante 2-3 min; los lípidos toman una coloración roja.

Caracterización de cristales de oxalato de calcio (cristales verdaderos) y de carbonato de calcio

Se utiliza HCl 2N, en este caso ambos compuestos se disuelven, aunque las concreciones de CaCO_3 producen CO_2 observándose un desprendimiento gaseoso. Se coloca una porción del material de estudio sobre un portaobjetos, se agregan 2-3 gotas de solución, se coloca el cubreobjetos y se observa con el microscopio óptico (Gattuso y Gattuso, 1999).

Caracterización de aleurona

Se utiliza solución acuosa de ácido pícrico al 1 %, con la cual las proteínas constituyentes de la aleurona se tiñen de color amarillo. Se coloca el material en polvo con el reactivo entre porta y cubreobjetos y se observa al microscopio.

Resultados

Punica granatum Fruto

1.- Análisis exomorfológico

Conocido como balausta, dentro de la clasificación de los frutos, es una baya de color amarillo a rojo intenso, procedente de un ovario ínfero con carpelos dispuestos en dos estratos, con el pericarpo y el interior dividido en cavidades que alojan numerosas semillas con "arilo" rojo, rosa o blanco, traslúcido, pulposo, dulce y jugoso (Figura 1 A-B). Mide aproximadamente entre 5-15 cm de diámetro y su peso oscila entre 100 a 500 g (Hurrell y col., 2010; López-Mejías y col., 2010; Pochettino, 2015).

2.- Análisis micrográfico

Raspado

Se identificaron en el epicarpo, mesocarpo y endocarpo cristales cúbicos y drusas (Figura 2 A) y en el arilo de la semilla granos de almidón simples y compuestos, céntricos de forma irregular con hendidura birradiada sin estrías.

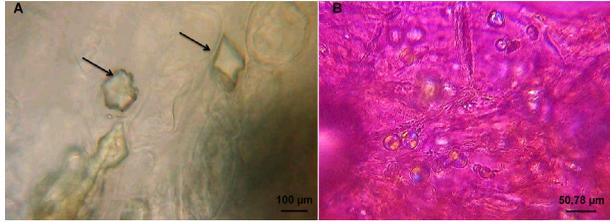
Observación con luz polarizada

Se observó en los granos de almidón la formación de la típica *cruz de malta* con los colores amarillo y azul (Figura 2 B).

Disociado fuerte

En el fruto se observaron esclereidas isodiamétricas solitarias y agrupadas, con paredes brillantes a la luz polarizada (Figura 3 A-B), y fibras largas y estrechas (Figura 3 C). En la semilla se observaron esclereidas columnares en dos estratos (Figura 3 D).

Figura 2.- Raspado



A: cristales cúbicos y drusas. **B:** granos de almidón simples de forma irregular con hendidura birradiada expuestos a la luz polarizada. A: 20x; B: 40x.

Reacciones histoquímicas

En el pericarpo se confirmó la presencia de cristales (verdaderos) de oxalato de calcio (Figura 4 A-B) y en las semillas, gotas de lípidos que se tornaron de color rojo (Figura 4 C) y granos de aleurona que obtuvieron un color amarillo pálido (Figura 4 D).

Discusión y conclusiones

Se verifica en el fruto de “granada” la presencia de esclereidas, fibras y granos de almidón simples, estos últimos pertenecientes al arilo, a diferencia de la bibliografía donde están indicadas como parte de las semillas. Se identificó para las semillas las esclereidas columnares, aleurona y gotas lipídicas (Winton y Winton, 1939). El presente estudio permitió identificar en el pericarpo cristales cúbicos y drusas, información inédita que también asume relevancia en futuros trabajos de controles de calidad.

Como algunos de los productos de esta especie que son comercializados (jugos, licuados, congelados, entre otros), no llevan un tratamiento térmico, los granos de almidón constituyen una referencia micrográfica aplicable en el análisis de calidad botánica. Cuando se necesita cocción (salsas, mermeladas, granizados, ponches, entre

otros) como parte del proceso, el calor provoca la desnaturalización del almidón impidiendo en consecuencia su visualización, instancia a partir de la cual pierden su valor diagnóstico.

Como se menciona en la introducción, el pericarpo coriáceo se utiliza para la elaboración de infusiones para tratar problemas gastrointestinales (Pochettino, 2015). Así, los resultados obtenidos aportan caracteres útiles para realizar el análisis de control de calidad en la etapa de comercialización formal e informal.

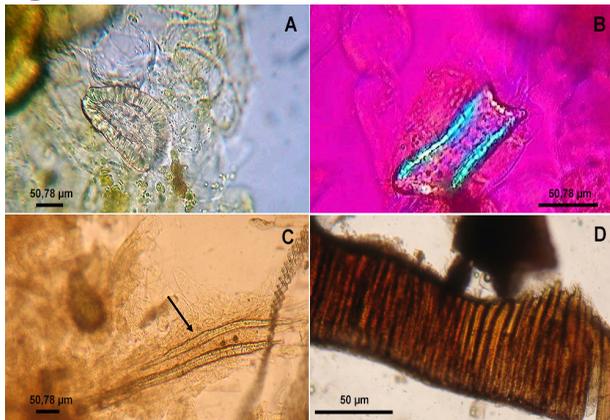
Se concluye que los siguientes caracteres micrográficos responden como elementos de valor diagnóstico:

1. en epicarpo, mesocarpo y endocarpo, las esclereidas agrupadas y solitarias isodiamétricas, las fibras alargadas de paredes gruesas y extremos aguzados y los cristales verdaderos cúbicos y en forma de drusas.
2. en semilla arilada, los granos de almidón simples y compuestos céntricos sin estrías perceptibles de formas variadas (arilo) y las esclereidas columnares, gotas lipídicas y aleurona (semillas).

La aplicabilidad de los caracteres propuestos se extiende al campo de la bromatología que está orientada al compromiso de ofrecer alimentos genuinos y seguros a la población.

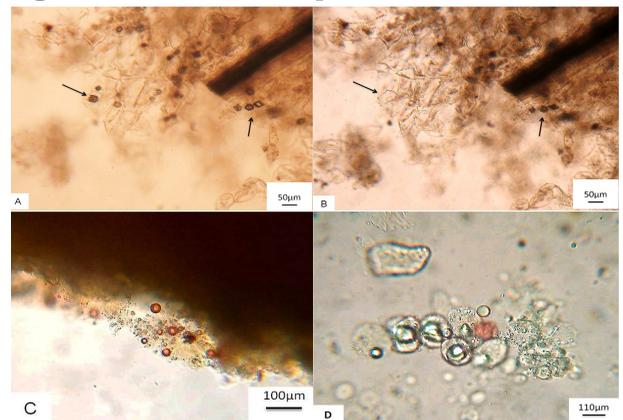
Se trata de resultados disponibles para su aplicación inmediata; la puesta en práctica de las técnicas micrográficas, las observaciones a realizar y su correcta interpretación son relativamente simples. Los elementos requeridos, a nivel de instrumental óptico y materiales, son los que, en general, integran cualquier Laboratorio de Microscopía de instituciones que pueden llevar adelante los controles enunciados, siempre y cuando estén a cargo de profesionales capacitados en la especialidad.

Figura 3.- Disociado Fuerte



A: esclereida isodiamétrica solitaria de pared gruesa. **B:** esclereidas en presencia de luz polarizada. **C:** fibras. **D:** esclereidas columnares. A: 40x; B-C: 20x; D: 10x.

Figura 4.- Reacción histoquímica



A-B: cristales en presencia de HCl. **C:** gotas lipídicas. **D:** aleuronas. A-B: 10x; C-D: 20x.

Referencias bibliográficas

- Alimentación FAO (2010). Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas. Documentos de la FAO sobre productos básicos y Comercio. Proyecciones al año 2004: 95.
- Código Alimentario Argentino (2017) [en línea]. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. [Consulta: 28 de marzo de 2017].
- Cañigueral, S.; Vila, R.; Wichtl, M. (1998). Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para infusión y tisana. 1° Ed. Española. (Traducción de ed. original: Teedrogen: ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage). Milán. OEMF Internacional SRL. 605.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de técnicas en histología vegetal*. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 83.
- Folgar, O.F. (1996). ISO 9000 Aseguramiento de la Calidad. Ediciones. Macchi, Bs As.
- Flores, E.N.; Vignale, N.D. (2010). "Caracterización micrográfica de órganos vegetativos y reproductivos de interés etnobotánico de *Geoffroea decorticans* (Gil. ex Hook. et Arn.) Burkart (Fabaceae)" en Pochettino, M.L.; Ladio, A.; Arenas, P.M. (eds) *Tradiciones y transformaciones en etnobotánica*. CYTED, S.S. de Jujuy: 330-335.
- Gattuso, M.A.; Gattuso, S.J. (1999). *Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo*. 1° ed. Rosario. Universidad Nacional de Rosario. REUN. AUGM. UNESCO. RIPROFITO: 87.
- Gurni, A.A. (2014). "Técnicas histológicas en investigación" en Zarlavsky, G.E. *Histología vegetal. Técnicas simples y complejas*. 1° ed. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires: 13-18.
- Hurrell, J.A.; Ulibarri, E.A.; Delucchi, G.; Pochettino, M.L. (2010). *Frutas frescas, secas y preservadas*. 1° edición. LOLA, Buenos Aires: 301.
- López-Mejía O.A.; López-Malo A. y Palou E. (2010). "Granada (*Punica granatum* L.): una fuente de antioxidantes de interés actual". *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, San Andrés Cholula, Puebla. México, 4 (1): 64-73.
- Molina, N.A. (2016). *La producción de frutas tropicales: panorama mundial y en Argentina*. INTA. Corrientes. 1-19 [en línea] Disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/la-produccion-de-frutas-tropicales-panorama-mundial-y-en-argentina>. [Consulta: 15 de abril de 2017].
- Mondragón, J.C.; Juárez, C.S. (2008). *Granada Roja. Guía para su producción en Guanajuato*. INIFAP, Campo Experimental del Bajío. Celaya, Guanajuato, México.
- Pochettino, M.L. (2015). *Botánica Económica*. 1° ed. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires: 375.
- Rivas, M.A.; Gurni, A.A.; Vignale, N.D. (2009). "Caracterización micrográfica de *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae), un cultivo andino medicinal" en Vignale, N.D. y Pochettino, M.L. (eds) *Avances sobre plantas medicinales andinas*. CYTED, S. S. de Jujuy: 205-229.
- Varela, B.G.; Ganopol, M.J.; Bosco, P.; Agostinelli, L.; Gurni, A. A. (2009). "Presencia de salvado de cereal en "órganos" comercializados en la ciudad de Buenos Aires (Argentina)". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8(1): 305 – 307.
- Vignale, N.D. (2002). "Relevamiento y análisis exomorfológico y micrográfico de plantas medicinales de la puna y prepuna jujeñas, con especial referencia a la Reserva de Biósfera Laguna de Pozuelos, Jujuy, Argentina. Jujuy". *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires: 118.
- Vignale, N.D.; Gurni, A.A. (2003). "Micrografía de plantas medicinales andinas usadas como aditivos alimentarios en la provincia Jujuy (Argentina)". *Bol. Soc. Argent. Bot.* 38 (Supl.): 142.
- Vignale, N.D.; Gurni, A.A. (2009). "Parámetros micrográficos para identificar doce especies medicinales andinas de Asteraceae de la provincia de Jujuy Argentina" en Vignale, N.D. y Pochettino, M.L. (eds) *Avances sobre plantas medicinales andinas*. CYTED, S. S. de Jujuy: 129-204.
- Winton, A.L.; Winton, K.B. (1939). *The structure and composition of foods. vol. IV. Sugar, sirup, honey, tea, coffee, cocoa, spices, extracts, yeast, baking power*. John Wiley y sons INC., NewYork: 580.