

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**EFFECTO DEL PROCESO FERMENTATIVO DE DERIVADO DE PIÑA
Y PULPA DE CAFÉ EN LA FIBRA DE JONOTE (*Trema micrantha*)**

T E S I S

para obtener el diploma en:

Especialista en Biotecnología

P R E S E N T A:

SOFÍA GABRIELA GUTIÉRREZ PÉREZ

Directores

Dra. Paz Alejandra Quintanar Isaías

Dr. Sergio Huerta Ochoa

México, D. F. noviembre, 2011

México D. F. a 14 de Diciembre del 2011

El lector designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la idónea
comunicación de resultados

**EFFECTO DEL PROCESO FERMENTATIVO DE DERIVADO DE PIÑA Y PULPA DE
CAFÉ EN LA FIBRA DE JONOTE (*Trema micrantha*)**

que presentó

SOFÍA GABRIELA GUTIÉRREZ PÉREZ

Directores

Dra. Paz Alejandra Quintanar Isaías

Dr. Sergio Huerta Ochoa

Lector

Dr. José David Sepúlveda Sánchez

RESUMEN

El papel amate se ha producido durante más de treinta años utilizando sosa cáustica para el ablandamiento de las fibras de la corteza de jonote colorado (*Trema micrantha*). Esta investigación propone el uso de fermentos de frutas, como pulpa de café y piña, para sustituir parte del proceso de ablandamiento. El desarrollo de consorcios microbianos puede, de alguna manera, ser responsable de este ablandamiento. Se colectó pulpa de café en los predios de Xolotla, Pahuatlán, Puebla, y la piña se compró en los mercados. Las cortezas de jonote se obtuvieron directamente de los artesanos. Se prepararon los fermentos y se introdujeron las fibras. Las fibras se mantuvieron por quince días en esos caldos y se tomaron muestras de los mismos a diferentes tiempos. Los resultados sugieren que los consorcios desarrollados no son degradadores de lignina ni de celulosa. Las comparaciones entre las UFCs muestran que el tipo de fermento es la variable más importante en su desarrollo. Las características histoquímicas sugieren que el fermento de pulpa de café es menos agresivo con las paredes gelatinosas que el de piña, y al compararlo con fibras de papel elaborado con sosa, se observan grandes diferencias de composición química, principalmente en la pared gelatinosa. Cumplido el tiempo de fermentación, las cortezas se cocieron en ceniza. Las pruebas histoquímicas de esta fase sugieren que el efecto del cocido no es significativo. Por otro lado, se obtuvieron imágenes con MEB para comprobar presencia o ausencia de consorcios microbianos asociados directamente a las paredes celulares.

ABSTRACT

The amate paper has been produced for more than thirty years using caustic soda for the softening of fibers of the crust of the red jonote (*Trema micrantha*). This research proposes the use of fruits ferments, such as coffee and pineapple's pulp to replace part of the softening process. The development of microbial process can be responsible for this softening. Coffee's pulp was collected in the towns of Xolotla, Pahuatlán, Puebla and the pineapple was bought in the markets. The crusts of jonote were obtained directly from the craftsmen. The ferments were prepared and were used with the fibers. The fibers stayed fifteen days in the broths and samples were taken at different times. The results suggest that the microorganisms in the ferments are not involved in the process to degrade lignin or cellulous. The comparisons between the UFCs show that the type of ferment is the most important variable in its development. Histochemistry's characteristics suggest the coffee pulp ferment is less aggressive to the gelatinous wall that the pineapple pulp, and that there are many important differences between them and the fibers of paper made with caustic soda, especially the chemical composition of the gelatinous wall. When the fermentation is finished, the crusts were cooked in ashes. The histochemistry's tests suggest the effect of this process is weak. Images with SEM were obtained to verify the presence or absence of microbial consortium associated directly to the cell walls.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Abstract	ii
Índice general	iii
Índice de figuras	v
Introducción	1
Antecedentes	4
1.1. Papel	5
1.2. <i>Trema micrantha</i> . Extracción de fibra de jonote	6
1.3. Fibras vegetales	6
1.4. Pared celular y lignina	7
1.4.1. Propiedades de la lignina	8
1.4.2. Hongos degradadores de la lignina	9
1.5. La pulpa de café	11
1.5.1. Posibles usos	12
1.5.2. Composición química y microbiológica	13
1.6. Fermento de piña (tepache)	13
1.6.1. Características fisicoquímicas y microbiológicas	14
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo general	17
2.2. Objetivos particulares	17
3. Hipótesis	17
4. Materiales y métodos	18
4.1. Floema secundario del jonote, <i>Trema micrantha</i>	18
4.2. Pulpa de café y piña	18
4.3. Agua de San Pablito	18
4.4. Elaboración del fermento	19
4.5. Preparación de la fibra	19
4.6. Pruebas de laboratorio	19
4.7. Medición del pH y de la temperatura	20
4.8. Preparación de medios de cultivo e inoculación	20
4.9. Análisis microbiológico	20

4.10. Histoquímica	21
4.10.1. Tinciones histoquímicas	22
4.10.1.1. Azul de Lacmoid	22
4.10.1.2. Azul de toluidina	22
4.10.1.3. Ácido tánico+cloruro férrico	23
4.10.1.4. Lugol	23
4.10.2. Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido	23
5. Resultados	24
5.1. Microbiología general	24
5.2. Histoquímica	25
5.2.1. Fibras control	25
5.2.2. Fibras después de 15 días de fermento	25
5.2.3. Fibras hervidas	26
5.3. Microscopía Electrónica de Barrido	26
5.4. Experiencias adicionales a esta investigación	27
6. Discusión	28
7. Conclusiones	30
8. Perspectivas	31
9. Bibliografía	32
 Anexo I. Propuesta de encuesta en campo.	 35
Anexo II. Manual para la elaboración de Papel Amate	36
Anexo III. Oficio de conformidad de la solicitud de patente	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Jonote. A. Corteza externa. B. Corteza interna	38
Figura 2. Hoja de papel amate elaborada con jonote	38
Figura 3. Mapa de la región de Pahuatlán, Puebla, México	38
Figura 4. Tipos celulares. A. Madera de latifoliadas. B. Madera de gimnospermas. C. Floema secundario o corteza interna de latifoliadas	39
Figura 5. Corteza interna almacenada	39
Figura 6. Ultraestructura y composición de la pared secundaria	40
Figura 7. Muestreo del agua en el manantial Agua de Machete	40
Figura 8. Calibrando con el potenciómetro HANNA	41
Figura 9. Diagrama de flujo de metodología del estudio microbiológico	41
Figura 10. Frotis teñidos con GRAM. Microscopía de luz	42
Figura 11. Cultivos de microorganismos. A. Medio EMB. B. Medio PDA. C. Medio MRS.	42
Figura 12. Crecimiento de las UFCs y el tipo de medio de cultivo. A. Fermento de pulpa de café. B. Fermento de piña	42
Figura 13. Fibra jonote. Control (sin tinción). Secciones transversales y Longitudinales de las fibras. (40 X, 100 X)	43
Figura 14. Fibras jonote. Control (azul de toluidina). A, C, D. Secciones transversales. B. Sección longitudinal transversal. La pared secundaria se tiñe de turquesa y la pared gelatinosa de lila	43
Figura 15. Fibras de jonote, 15 días en fermento (Azul de Lacmoid). A-B. Pulpa de café. Secciones transversales. C-D. Piña. Sección transversal y longitudinal	44
Figura 16. Fibras de jonote, 15 días en fermento (Azul de toluidina). A-B. Pulpa de café. Secciones transversales. C-D. Piña. Secciones transversales	44
Figura 17. Fibras de jonote, 15 días en fermento (Lugol). A-B. Pulpa de café. Secciones transversales. C-D. Piña. Secciones transversales	45
Figura 18. Fibras de jonote, hervidas (Azul de Lacmoid). A-B. Pulpa de café. Secciones longitudinal y transversal. C-D. Piña. Secciones transversales	45
Figura 19. Fibras de jonote, hervidas (Azul de toluidina). A-B. Pulpa de café. Secciones longitudinal y transversal. C-D. En piña.	

Secciones transversales	46
Figura 20. Fibras de jonote, hervidas (Lugol). Secciones transversales.	
A-B. Pulpa de café. C-D- En piña	46
Figura 21. Fibras de jonote (Microscopía Electrónica de Barrido, 1000 X).	
A. Fibras control. B. Fibras en pulpa de café, sumergidas durante 15 días en el fermento. C. Fibras hervidas con ceniza	47

Efecto del proceso fermentativo de derivado de piña y pulpa de papel en la fibra de jonote
(*Trema micrantha*)

INTRODUCCIÓN

El papel se define como una hoja delgada que se hace con pasta de fibras vegetales. Según la Real Academia Española, el origen etimológico deriva del latín “papyrus” el cual se desarrolló en Egipto en el año 3000 a.C. con la planta papiro.

A través de la historia el papel es un bien cultural que se ha desarrollado de la mano de la humanidad. Ha sido elaborado con innumerables materiales naturales vegetales, principalmente de fibras de tallos de gramíneas, como el arroz o el trigo. También se han usado por siglos el cáñamo, el lino y el algodón.

Estas fibras tienen como característica ser fácilmente manejables y poseer poco o nada del polímero endurecedor de paredes celulares como la lignina. El uso de la madera como fuente de fibra se implementó cuando se incrementaron los requerimientos del papel en la civilización moderna: la invención de la imprenta, los libros y el proceso de masificación de la lectura asociada a la educación de millones de personas. Para abastecer el volumen de fibras para el papel demandado por estos servicios, se implementaron tecnologías que permitieron usar a la madera de pinos y otras latifoliadas, las que tienen fibras hasta de 1 cm de longitud. Este papel se conoce en la industria papelería como papel Kraft, debido al proceso en el que se incorporan reactivos ácidos y básicos para descomponer o destruir el polímero lignina y liberar a la fibra que está formada básicamente por celulosa.

Este proceso deja a la nueva fibra completamente blanda. Además, dentro del proceso se emplean compuestos organoclorados para aclarar la fibra y dejar una pasta manipulable y blanca. Esta alternativa es absolutamente contaminante y ha dejado secuelas desafortunadas e irreparables a nuestros ecosistemas, sobre todo a los bosques de pino-encino de nuestro país. Lo anterior ha empujado a los tecnólogos del papel a la búsqueda, tanto de procesos no contaminadores, como de nuevas materias primas.

El biopulpeo es un proceso que ha comenzado a implementarse en la industria del papel, sin embargo, sólo para fases intermedias (González Suárez, 2008). En este proceso se han identificado, como los aspectos más importantes, la determinación de microorganismos eficaces y selectivos, el modo de inoculación en la madera y la forma de hacer progresar la deslignificación biológica (Carbajo, 2004). Actualmente ha surgido la inquietud por encontrar nuevas fuentes de abastecimiento de fibras. Tal es el caso de McLaughlin (2000) quien mostró que el papel hecho con fibras de *Hesperaloe funifera* (Agavaceas) tiene fibras excepcionalmente largas y delgadas, las cuales producen una pulpa muy resistente para hacer papel.

Como se ha mencionado, el problema para la manufactura de papel es la presencia de lignina en las paredes celulares de las fibras. La presencia de este polímero reduce las posibilidades de encontrar materia prima adecuada que pueda procesarse de manera sustentable, es decir, que la obtención del producto final esté libre de sustancias químicas contaminantes para el ambiente y la salud de los papeleros. El caso que se ocupa en esta investigación se refiere a la artesanía “papel amate”, que es elaborada con corteza del árbol *Trema micrantha* (jonote colorado) y que se caracteriza por poseer suficiente cantidad de lignina en las paredes de sus fibras, pero no para volverla muy dura (Figura 1). Esta artesanía originalmente se elaboraba con fibras de la corteza de algunas higueras (Sahagún, 1969). Las fibras eran tan blandas que solo bastaba con remojarla en los ríos para suavizarla. Se lavaba y sobre una tabla de madera se extendían las fibras blandas y blancas y se machacaban con piedras especiales (Quintanar *et al.*, 2010).

Debido a la gran demanda que sufrió esta artesanía por los años setenta del siglo pasado (López, 2003), los árboles de higuera escasearon, si no es que se extinguieron. Los papeleros del amate buscaron otras cortezas para sustituir a las tradicionales. Lo anterior llevó al uso de la corteza del jonote, pero a la introducción de la sosa cáustica como agente reactivo ablandador. Contaminadora por naturaleza, corrosiva, empleada para eliminar sarro, destapar cañerías y remover desperdicios orgánicos e inorgánicos (metales, pinturas, etc.), la sosa cáustica ha sido la compañía diaria durante los últimos 40 años de los únicos herederos de la tradición papelería mesoamericana. Sus abuelos fueron los inventores de los códices en donde se escribió nuestra cultura. Ahora son destruidos, en su salud, su entorno natural y en su tradición. El papel amate actual, lejos

de ser una tradición limpia, se ha convertido en una mercancía occidental, de producción semi-industrial, sucia y de impacto negativo en todos los sentidos (Figura 2).

En este trabajo se presenta un estudio biotecnológico, histoquímico y morfológico de las fibras de la corteza de esta especie durante los procesos fermentativos de la pulpa de café y de piña. Los resultados están dirigidos a comprender el impacto que tienen los medios fermentativos propuestos, en comparación con lo que le ocurre a las fibras sometidas con sosa cáustica.

ANTECEDENTES

El papel amate es una artesanía que involucra dos rasgos artesanales importantes. El primero es el soporte, elaborado en la Sierra Norte de Puebla, en la comunidad de San Pablito, Pahuatlán, Puebla. El segundo consiste en las pinturas que elaboran sobre el papel los artesanos del estado de Guerrero, México (Figura 3).

El proceso artesanal de elaboración del papel amate, se ha modificado a través del tiempo y de los usos y costumbres de la comunidad, pero sobre todo del mercado en el cual se distribuyen y venden sus artesanías. Cabe mencionar que, debido a su calidad y al valor agregado que tiene, se exporta a otros continentes, es decir, se ha modificado hasta satisfacer otras necesidades y volúmenes de producción. Por esta razón, esta artesanía se puso en riesgo cuando a finales de la década de 1970 su demanda se incrementó, trayendo consigo la sobre explotación de las higueras, o sea, del árbol tradicional. Por lo que, al disminuir la población de los árboles que proporcionaban el recurso, se introdujeron nuevas especies. Esta situación también introdujo un material difícil de ablandar, por lo que se comenzó el uso del hidróxido de sodio (NaOH), lo cual dio lugar a la ventaja de la disminución del tiempo requerido para el ablandamiento de las fibras de la corteza. Sin embargo, el desconsiderado uso de este componente químico ha traído consigo mayores desventajas y perjuicios para la salud y el ambiente.

La sosa elimina los cementantes naturales de origen polifenólico y la lignina de las paredes celulares en un lapso de tiempo muy corto, después se lava por horas hasta “eliminarla” de la fibra, lo que nunca ocurre. Este químico, además de los daños ya mencionados, ofrece un papel de baja calidad y, debido al proceso de elaboración, el papel amate empieza a dejar de considerarse como una artesanía. Así que mientras más pronto se tengan propuestas de elaboración limpia, la comunidad, su artesanía y su tradición tendrán mayor oportunidad de seguir vigentes (Quintanar *et al.*, 2009).

Debido a esto, en el presente estudio se pretende determinar los beneficios de la fermentación sumergida de pulpa de café y de piña para el ablandamiento de la corteza del jonote, aportando de esta manera un proceso biológico que permita nuevamente la elaboración completamente artesanal de dicho papel.

1.1. Papel

La pulpa y el papel se fabrican principalmente a partir de células vegetales. Estas son unidades estructurales huecas, que consisten típicamente en una pared celular rodeando una cavidad, llamadas fibras (Figura 4). Las plantas o partes de plantas que se utilizan para fabricar papel son aquéllas que contienen cantidades adecuadas de estas fibras. Las maderas más utilizadas para fabricación de pulpas celulósicas son las coníferas, aunque en los últimos años ha habido una expansión importante de latifoliadas (Figura 4A). Estrictamente las coníferas no tienen fibras sino elementos celulares que se conocen como traqueidas (Figura 4B). Estas células son más delgadas de pared y con mayor cavidad que las que presentan las latifoliadas (Figura 4C).

Una característica importante para el uso de traqueidas o fibras es la cantidad de celulosa y lignina que poseen. Dependiendo de esto ha sido el desarrollo de los procedimientos mecánicos y químicos. Estos han influido directamente para la producción de papel, la disponibilidad y rendimiento de la materia prima, el bajo costo y la variedad en las propiedades de calidad de las fibras procedentes de las distintas especies de madera. Aunque la madera suministra alrededor del 93% de los requerimientos mundiales de fibras vírgenes, las fuentes no maderables, especialmente el bagazo, pajas de cereales y bambú, suministran el resto y, aproximadamente, un tercio de todos los productos papeleros son reciclados como “fibras secundarias”.

Lo anterior sitúa a los procesos tecnológicos para deslignificar en sustanciales para el desarrollo de esta industria. Estos procesos evidencian la necesidad del uso de químicos voraces que prácticamente destruyen los componentes de las paredes celulares de las fibras, meta sustancial para esta industria. Existen otros productos de papel que provienen de fibras no maderables y que han sido esenciales en el desarrollo comunitario o local. El uso de materiales vegetales, tales como la corteza interna de árboles, está bien representando en nuestro país desde la época prehispánica.

1.2. *Trema micrantha*. Extracción de fibra de jonote

El árbol de jonote colorado (*Trema micrantha*) pertenece a la familia Cannabaceae. Este árbol está distribuido desde México hasta Brasil y el Caribe. En los cafetales se considera de vital importancia pues ofrece sombra a las plantas de café. La altitud en la que se encuentra va desde el nivel del mar hasta los 1500 msnm. Su madera se usa como leña, pero además ofrece buenas características para el uso en el oficio de la carpintería. Sin embargo, el uso en esta última es escaso.

1.3. Fibras vegetales

El material que ocupa este ensayo se refiere a la corteza interna de árboles, como higueras, jonotes, brujo, cuerillo y xalamas. Actualmente estos árboles son desfundados completamente de su corteza y limpiados de la cáscara (Figura 5). Esta corteza interna es el tejido responsable de suministrar a toda la planta los productos derivados de la fotosíntesis, desde el follaje hasta la raíz, por ello su posición en el árbol, siempre externa a la madera. Este tejido se conoce como floema secundario y está formado por células especializadas en el transporte de carbohidratos y reforzado por un sistema mecánico muy elástico de fibras (Quintanar *et al.*, 2004). Este sistema mecánico rara vez es más rígido que las fibras de la madera. Esto se debe a que la planta invierte más energía en su sistema central de conducción de agua y minerales y el mecánico. Por ello, la proporción de madera (al centro) y floema (hacia afuera) es de 3 ó 4 a 1.

El floema puede poseer fibras sin lignificación, como ocurre con las que emplearon los antiguos papeleros (Quintanar *et al.*, aceptado 2010). Estas fibras sólo se limpiaban en los ríos (Sahagún, 1969) y se dejaban por varias horas. El resultado era un machacamiento muy fácil y el resultado era un papel blanco y firme. El uso de nuevas especies implicó meter fibras con lignina. Estas fibras son más rígidas, menos maleables y, aunque se hidraten, es difícil conseguir las mismas propiedades que las de las especies tradicionales. La lignina sólo se puede liberar o lavar empleando agentes corrosivos o usando medios hidrolíticos.

1.4. Pared celular y lignina

La palabra lignina proviene del término latino *lignum*, que significa madera, por lo que a las plantas que contienen gran cantidad de lignina se las denomina leñosas. Generalmente, en la industria del papel, la parte aprovechable de los árboles, rica en fibras, es la zona leñosa o madera, que es la parte central del árbol. La pared celular de las fibras que se emplea para hacer el papel generalmente está formada por celulosa. Este carbohidrato está ensamblado glucosa-glucosa formando cadenas lineales. El primer nivel de organización de este polímero se conoce como micela. Varias micelas conforman una microfibrilla. Las microfibrillas de celulosa están formando las paredes primarias de todas las células vegetales. Algunas células como las fibras tienen la característica, por su función mecánica, de formar otra pared celular, esto es, la pared secundaria. La pared secundaria está formada por microfibrillas que son un conjunto determinado de microfibrillas organizadas dentro de esta nueva pared en tres zonas: S1, S2 y S3. Tanto la S1 como la S3, tienen ángulos microfibrilares (con respecto al eje de la fibra) de entre 30 y 45 grados. Los ángulos microfibrilares de la S2 son más bien paralelos al eje de las fibras.

Las microfibrillas de celulosa están estabilizadas por enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares y rodeadas por polisacáridos hemicelulósicos (manano y xilano) que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes, los cuales la hacen extremadamente resistente a la hidrólisis química y biológica. La pared celular además de estar formada por el polímero celulosa, presenta también otro tipo de moléculas conformadas por carbohidratos no celulósicos. Estos se conocen como hemicelulosas y pectinas. Estos se arman dentro de las vesículas del Aparato de Golgi, mientras que las de celulosa se secretan hacia fuera de la membrana plasmática de la célula viva en crecimiento, y hacia dentro cuando se forma la pared secundaria.

La hemicelulosa y la pectina actúan como fibrillas de polímero creando una estructura rígida que consolida la pared de la célula de la planta. También forman los enlaces covalentes que se cree están implicados en la limitación del crecimiento de la célula y la reducción de la biodegradabilidad de la pared celular. La lignina es un polímero que está formado por compuestos de tipo aromático. Conforme se van secretando las paredes primarias y secundarias, la lignina se va depositando entre las microfibrillas de manera

amorfa, es decir, que va formando una matriz que contiene a las microfibrillas. Hay dos tipos de enlaces covalentes que se han identificado entre los polisacáridos y la lignina: los puentes de ácido diferúlico; el otro tipo es el enlace éster entre la lignina y el ácido glucurónico unidos a moléculas de xilano. (Figura 6)

La ultraestructura y química de los enlaces de todos estos polímeros explican el porqué de la dificultad de su separación molecular. La cantidad depositada de lignina en la pared de fibras depende de cada especie arbórea. Lo anterior explica por qué las fibras de los amates tradicionales contengan fibras más bien celulósicas.

El polímero lignina es entonces un componente de la madera o xilema y del floema o corteza interna. Está asociada a funciones que son esenciales para la vida de las plantas. Por ejemplo, posee un importante papel en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos. Principalmente proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células de la madera, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones y flexiones. Los tejidos lignificados resisten el ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas dentro de la pared celular.

1.4.1. Propiedades de la lignina

La lignina es un material con carácter hidrofóbico y, como tal, su presencia dentro de la industria papelera en las pastas inhibe la absorción de agua, el hinchamiento de la fibra y dificulta el refinado. Por otro lado, la lignina es termoplástica, lo cual ofrece una ventaja en los procesos de obtención de pastas de alto rendimiento. La elevación de temperatura ablanda la lignina, debilita los enlaces y facilita el proceso de desfibrado.

El pH óptimo para la actividad de las celulasas producidas por bacterias abarca un amplio rango, el cual influye condiciones ácidas y alcalinas, como por ejemplo:

Microorganismo	Respiración	pH óptimo
<i>Bacillus subtilis</i>	Aerobias	5-7
<i>Bacillus macerans</i>	Aerobias	6
<i>Bacillus sp.</i>	Aerobias	9
<i>Clostridium thermocellum</i>	Anaerobias	7

(Howard *et al.*, 2003)

La lignina, por su origen, es un material biodegradable. Esta propiedad está vinculada con organismos capaces de hidrolizar sus estructuras moleculares para cambiar sus propiedades, que permitan reintegrarse a los ciclos biológicos de los nutrientes. Dentro de estos ciclos biológicos, la lignina no es la única que se degrada, sino se acompaña también de las moléculas de celulosa, hemicelulosas y pectinas. Dentro de los factores que intervienen en la degradación de las paredes celulares vegetales están los bióticos y abióticos. Los primeros pueden ser hongos y bacterias principalmente, y los segundos, la temperatura, el pH, el contenido de humedad del sustrato y la humedad relativa del ambiente. También la intensidad luminosa puede influir en el proceso de deterioro.

1.4.2. Hongos degradadores de la lignina

En general se conoce que los hongos lignolíticos actúan sobre el material madera. Sin embargo, poco o nada se tiene reportado sobre la corteza interna. El modo de actuación de los hongos degradadores de la madera y las rutas de degradación de la lignocelulosa siguen aún sin ser bien comprendidas. Un caso particular se puede encontrar en la información, aparentemente contradictoria, existente referente a la función de los taninos de las plantas. Se considera que los taninos y los polifenoles presentes en la corteza de los árboles poseen propiedades antifúngicas. No obstante, se ha observado en ocasiones que el crecimiento de los hongos y el resultado de experimentos de biopulpeo son más favorables cuando el hongo está en contacto con la corteza del árbol o con algunos de sus componentes (Villar, 2008).

Lo anterior puede ocurrir debido a que, a través del floema, la planta transporta azúcares derivados de la fotosíntesis y otros productos del metabolismo primario disueltos en sus elementos de tubo criboso, desde las hojas a otras regiones de la planta. Esto hace que el floema sea un tejido rico en carbohidratos y accesible por su posición en el árbol a ser atacado. Por ello recurre a un sistema de protección conocido como peridermis y rico en taninos, polifenoles y súber.

Los macromicetos, ascomicetos y basidiomicetos, son dos clases de hongos con aparato vegetativo formado por células conocidas como hifas tabicadas o anastomosadas, de gran capacidad reproductiva y con gran cantidad de enzimas

hidrolíticas (Alexander, 1980). Su estrategia sexual reproductiva le permite conservar su fase micelial en condiciones poikilohídricas que se desarrolla pronto al encontrar cantidades adecuadas de contenido de humedad en el sustrato de degradación. En este micelio quedan en estado latente sus esporas conocidas como ascosporas o basidiosporas.

Ambos grupos tienen una alta actividad saprófita pues descomponen principalmente la celulosa y la lignina de todo el cuerpo de la planta: raíces, tallos, ramas, hojas y frutos. Los basidiomicetos que descomponen la madera han sido clasificados en dos grupos, los hongos de la podredumbre blanca y la café, de acuerdo con su capacidad para degradar la lignina de compuestos de madera. Los hongos blancos son capaces de degradar lignina, produciendo una zona coloreada alrededor del micelio en placas de agar que contienen taninos u otros sustratos fenólicos. La coloración es causada por fenol oxidasas secretadas extracelularmente, mientras que los hongos cafés no pueden llevar a cabo la degradación de la lignina y por lo tanto no producen dicha coloración. Sin embargo, estos basidiomicetos son conocidos como responsables de numerosos decaimientos de paredes celulares de la madera, ya que digieren componentes celulolíticos sin remoción de lignina.

Entre los basidiomicetos que causan la podredumbre blanca de la madera, se encuentran las especies con las características más adecuadas para ser utilizadas en diferentes procesos biotecnológicos, incluidos los de biodescontaminación. Los hongos ligninolíticos más eficaces se encuentran entre los basidiomicetos. Para ello, cuentan con una batería de enzimas extracelulares, oxidasas y peroxidasas, que contribuyen, en determinadas condiciones, a despolimerizar la compleja estructura de la lignina para posibilitar el ataque de los polisacáridos que constituyen una importante fuente de energía.

La complejidad estructural de la lignina hace que estas enzimas se caractericen por mecanismos de acción no específicos que oxidan los anillos aromáticos que constituyen dicho polímero. Las enzimas que participan en este proceso son: lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa dependiente de manganeso (MnP) y lacasa, una fenoloxidasas que contiene principalmente cobre (Villar, 2008). Existen otras enzimas

asociadas con las anteriores en la degradación de lignina de una manera indirecta: glioxal oxidasa y superóxido dismutasa que producen H_2O_2 .

El basidiomiceto *Pleurotus sp.* es un hongo biotransformador de sustratos lignocelulósicos. En los mecanismos ligninolíticos la enzima lacasa juega un papel importante en la biodegradación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas. (Iketa, 2004). A pesar de que en la naturaleza la pudrición y fermentación son procesos biológicos inseparables de los ciclos de los elementos, la industria papelera no ha podido separarse del uso de sustancias químicas. La naturaleza nos muestra que cualquier polímero de origen biológico, es susceptible de degradación. También nos muestra que para ello está inevitablemente separada de organismos y, por lo tanto, los tiempos que tarda en reincorporar todos los nutrientes al suelo son de cifras naturales, no industriales. Por lo anterior, es un reto poder plantear que los conocimientos sobre los procesos de fermentación y pudrición naturales pueden ser una respuesta a necesidades de la industria papelera.

Las fermentaciones que ocurren de frutos en las comunidades vegetales son muy comunes y el caso de la pulpa de café toma relevancia, dadas las características de este producto. En el campo se observó que la pulpa de este fruto puede corroer metales en un tiempo corto. Esto fue una propiedad que resaltó dentro de la búsqueda de una solución sustentable para ablandar las fibras de papel amate.

1.5. La pulpa de café

La cereza del café está conformada por un exocarpo (piel), un mesocarpo externo (pulpa), un mesocarpo interno (mucílago) y un endocarpo fibroso (pergamino) que rodea al grano (Urbajena *et al.*, 1997).

La industria cafetalera procesa grandes cantidades del fruto del café y se generan elevados volúmenes de residuos agro-industriales tales como la pulpa de café (Ramírez-Martínez *et al.*, 2000). En México el proceso del fruto se realiza generalmente mediante el llamado “Beneficio Húmedo del Café”, donde se consumen grandes cantidades de agua y casi el 80% del fruto se considera de poco o nulo valor económico y, por consiguiente, es considerado como un residuo.

Cuando la pulpa de café se expone al aire, ya sea fresca o ensilada, cambia de un color rojo a uno marrón oscuro. Este cambio de color se ha atribuido a reacciones de empardamiento enzimático causados por la oxidación de los polifenoles o quinonas, las que a su vez se combinan con aminoácidos libres y proteínas para dar complejos moleculares de coloración oscura. En un estudio realizado en la pulpa de café fresca, se concluye que la población microbiana presente en ésta, inmediatamente después de la operación de despulpado, está constituida en su mayoría por levaduras. Sin embargo, el número de bacterias aumenta considerablemente cuando la pulpa es expuesta a la intemperie para ser secada (Gaime-Perraud, 1993). Los residuos sólidos que se generan contienen cantidades apreciables de lignina, celulosa, hemicelulosa, azúcares, sodio, potasio, fósforo, entre otros, lo que hace que a la pulpa se le pueda dar diversos usos en función de los fines propuestos por un determinado contexto social.

Los desechos producidos por el beneficiado del café se consideran potencialmente contaminantes, ya que la pulpa contiene compuestos tóxicos y antinutricionales tales como la cafeína y los polifenoles (Pérez, 2008). En beneficios locales de bajos niveles de producción, con frecuencia la pulpa es dispuesta en grandes montículos donde se deja hasta su total descomposición, sin obtener algún provecho de este subproducto, además de que constituye una fuente importante de lixiviados. La pulpa representa el mayor desecho producido durante el despulpado del fruto de café, proceso que separa el grano del epicarpio (pulpa) y parte del mesocarpio o mucílago (Urbaneja *et al.*, 1997).

1.5.1. Posibles usos

La composición química de la pulpa de café hace posible su utilización como materia prima para la obtención de diferentes productos, por ejemplo en alimento para animales (Cabezas *et al.*, 1978; Bressani y Braham, 1980). Se ha propuesto como fuente de enzimas (Favela *et al.*, 1989). Martínez-Carrera *et al.* (1989) lo han propuesto como sustrato para la producción de hongos comestibles y para la producción de probióticos (Tapia *et al.*, 1989). Bertrand y Rapidel (1999) lo estudiaron para considerarlo como abono orgánico, alimento para animales y combustible. También se ha utilizado en algunos estudios como soporte en medio sólido para la obtención de enzimas de interés comercial (Pandey *et al.*, 2000).

De las propuestas más ambiciosas y sobre la cual aún se realizan estudios, es la destoxificación de la pulpa a fin de lograr un producto apto para consumo en animales rumiantes y/o monogástricos (Barreto, 2001).

1.5.2. Composición química y microbiológica

La pulpa de café fresca contiene entre 80 y 85% de agua en peso y está constituida principalmente por hidratos de carbono, proteínas, compuestos fenólicos, cafeína, materias grasas y minerales (Barreto, 2001). En la pulpa de café, la celulosa es el principal constituyente de la fracción conocida como fibra cruda. Contiene carbohidratos, entre los que se encuentran: celulosa 17.7%, sustancias pépticas 6.5%, azúcares reductores 12.4% y no reductores 2% (Elías, 1978). La composición química de la pulpa de café varía de acuerdo a diferentes factores tales como la variedad del cultivo, la composición del suelo, la etapa de madurez del fruto, las prácticas culturales y los tratamientos aplicados (Barreto-Castro, 2001).

Gaime-Perraud (1993) encontró que la pulpa de café fermentada por *Pleurotus spp.* presenta potencialidades para la producción de enzimas ligninolíticas. En este estudio se encontró que el sustrato tenía una gran carga de microorganismos, tales como bacterias, levaduras y hongos. La densidad de estos microorganismos puede variar entre 10⁵ y 10⁸ microorganismos por gramo de materia seca, dependiendo de la variedad del café, el orden geográfico y el tipo de tratamiento aplicado a la cereza de café.

Los consorcios referidos en ese estudio se desarrollaron rápidamente gracias al elevado contenido de humedad (80-85%). La acción incontrolada de los microorganismos endógenos puede afectar su calidad nutricional, por ello fue importante lograr la rápida estabilización del medio (Perraud-Gaime, 1993).

1.6. Fermento de piña (tepache)

Moreno Terrazas (2005) ha brindado gran cantidad de datos referentes a las características microbiológicas, bioquímicas y fisicoquímicas durante el proceso de elaboración y fermentación del tepache. Es una bebida ácida con bajo contenido alcohólico, donde pueden participar diversos grupos microbianos, entre los que resaltan

las levaduras y las bacterias lácticas. Como parte del proceso de fermentación se genera una gran variedad de compuestos volátiles que dan sabor y aroma al tepache y que hacen a la bebida un producto muy aromático, al parecer independientemente de la cantidad de fruta que contenga.

Si la fermentación de la piña se prolonga demasiado tiempo, adquiere un sabor agrio acre desagradable, debido a la formación de ácido acético. Y si se prolonga por más de dos semanas, se produce el vinagre de tíbicos. Los tíbicos, también conocidos como microbiogelas, son macrocolonias muy estables de bacterias y levaduras asociadas simbióticamente, dispuestos en dos capas de polisacáridos. En la capa interna se acumula el CO₂ que se produce durante la fermentación. Los tíbicos se desarrollan en sustratos azucarados o jugos de diversas frutas, y se considera que los constituyentes microbianos varían según el sustrato en el que se desarrollan.

Los tíbicos están constituidos por una matriz de polisacáridos, generalmente dextranas, dispuestos en dos capas. En la externa se encuentran las bacterias y levaduras, y en la interna, se presenta una estructura esponjosa debido a la acumulación de CO₂ producido durante la fermentación. Son macrocolonias compuestas principalmente por bacterias y levaduras en asociación simbiótica muy estable.

1.6.1. Características fisicoquímicas y microbiológicas

Moreno (2005) hace referencia que dentro de las bacterias acéticas, de manera predominante, se aisló al género *Acetobacter* con 21 aislados, y sólo se obtuvieron dos de *Gluconobacter*. Estas bacterias son consideradas como microorganismos que aparecen en fermentaciones láctico-alcohólicas o alcohólicas avanzadas como signo de alteración. Otra explicación de la coexistencia de las bacterias acéticas con los otros grupos microbianos, es que durante la elaboración del tepache se conserva parte de la fruta a lo largo de varias fermentaciones, por lo que es factible que las bacterias acéticas provenientes de la fruta puedan convivir con las bacterias lácticas, y con las levaduras en el producto final en diferentes tiempos de fermentación.

Tradicionalmente, los microorganismos han sido clasificados e identificados principalmente por medio de criterios morfológicos y fisiológicos, como por ejemplo:

- Forma de las células
- Modo de reproducción
- Temperatura máxima de desarrollo
- Tolerancia a desarrollarse en diversos compuestos
- Aprovechamiento de diversas sustancias

Los métodos bioquímicos también ofrecen datos importantes para la caracterización, aunque algunas veces son incorrectos. Un complemento a esta información morfo-fisiológica puede confirmar la identidad de un microorganismo con métodos moleculares de tipificación genética.

Los ácidos propanoico, buta, repta, octa, noa, deca, dodeca, tetradeca y octadecanoico fueron detectados en todas las bebidas analizadas en el tepache. El microorganismo que con mayor frecuencia se pudo aislar en este fermento fue *Sacaromyces cerevisiae*, por lo que es probable que la formación de estos compuestos en el tepache pueda ser atribuida a esta levadura, aunque también es factible que hayan intervenido otras especies de levaduras.

ASPECTO FISICOQUÍMICO DE MUESTRAS CON 60h DE FERMENTACION	%
Ácido láctico	0.15 a 0.49
pH	3.22 a 3.66
Ácido acético	0.21 a 0.04
Etanol	0.14 a 0.62
Proteína	0.018 a 0.28

Tabla comparativa de características fisicoquímicas y de microorganismos (tomado de Moreno, 2005).

Algunos ésteres de ácidos grasos han sido detectados en la piña y son de los principales compuestos que le dan a este fruto un aroma afrutado característico. En el caso del tepache, los dos ésteres son derivados de ácidos como el acético y el propiónico, los cuales pudieron generarse como parte de la acción de las levaduras. Se ha visto que la generación de ésteres se da como consecuencia de cambios metabólicos que generan las levaduras en fermentaciones prolongadas como la del vino.

De todos los grupos presentes en el fermento de la piña, se puede observar que ninguno de ellos es degradador lignocelulolítico. Por lo general, el tipo de microbiota que actúa en la descomposición de aeróbica de la lignina, a temperaturas moderadas, incluye una variedad de hongos superiores. La mayoría de estos hongos también utilizan la celulosa. De la misma manera, hay bacterias aerobias capaces de llevar a cabo alguna degradación de la lignina (Alexander, 1980).

2. OBJETIVOS

2.1. General

Elaborar un proceso biotecnológico durante la manufactura artesanal del papel amate, que permita obtener fibras de jonote con características que satisfagan a los artesanos.

2.2. Particulares

1. Determinar características bioquímicas y fisicoquímicas generales de las fermentaciones sumergidas de pulpa de café y de piña.
2. Identificar, en términos generales, a los microorganismos presentes en la corteza de jonote y en las fermentaciones sumergidas de pulpa de café y de piña, a través de morfología colonial y al microscopio.
3. Evaluar el aporte biotecnológico del fermento al proceso de manufactura limpia.
4. Elaborar papel amate libre de hidróxido de sodio.
5. Participar en los talleres de “Transferencia de tecnología limpia para la elaboración de papel amate” en la comunidad de San Pablito, Pahuatlán, Puebla, impartidos por el Fondo Nacional para el Fomento de las Artesanías (FONART) durante los meses de septiembre a diciembre de 2010.

3. HIPÓTESIS

Las fermentaciones de pulpa de café y de piña (tepache) favorecerán el ablandamiento de la corteza, permitiendo, durante la elaboración de papel amate, un proceso libre de compuestos químicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Floema secundario del Jonote, *Trema micrantha*.

Los artesanos papeleros compran las tiras de corteza a los jonoteros, quienes son los recolectores de la corteza y los responsables de suministrar este recurso a la comunidad de San Pablito. Los jonoteros despellejan los árboles, y las tiras que obtienen las disponen en paquetes y así lo venden. Los artesanos los compran húmedos, por lo que tienen que desarmar los paquetes y dejar secar las tiras de corteza al sol. Después las almacenan bajo techo. Allí pueden estar por meses.

Bajo estas condiciones de almacenamiento, se recogieron las tiras de corteza en diversos talleres de la comunidad de San Pablito. Por otro lado, se recolectaron varios kilogramos de ceniza procedente de las cocinas de los talleres. Con este material se realizó esta investigación.

4.2. Pulpa de café y de piña

La pulpa de café utilizada se obtuvo del beneficio “Conde” localizado en la comunidad de Xolotla, dentro del municipio de Pahuatlán, estado de Puebla, México. La pulpa recolectada se obtuvo fresca, después de haber sido despulpado el grano del café. Se empacó en botes de 60L con tapa semi-hermética para su traslado. La piña se compró en los mercados. Se lavó y se preparó en pequeñas porciones, incluyendo la cáscara.

4.3. Agua de San Pablito

El agua empleada para elaborar los fermentos se recolectó de los manantiales de Agua de Machete (Figura 7). La selección del agua se hizo así pues es la que los papeleros ñaños utilizan. Este agua es rica en minerales (Quintanar *et al.*, 2010).

4.4. Elaboración del fermento

La pulpa de café recolectada en los beneficios se lavó perfectamente para eliminar tierra y basura. De esa pulpa se pesaron 4 Kg (peso húmedo) y se dejaron dentro en un recipiente con 8 L del agua obtenida. Del mismo modo, se pesaron 4 Kg de piña lavada y partida en trozos, incluyendo la cáscara y se sumergieron en 8 L del agua recolectada en la región de San Pablito.

Durante 15 días se mantuvieron ambas preparaciones, con eventual agitación manual, y se midieron diariamente el pH y la temperatura.

4.5. Preparación de la fibra

Las tiras de jonote se lavaron para quitar basura, tierra y animales. Se pesaron 500 g y se partieron en porciones de medio metro. Estas porciones se introdujeron en los fermentos de pulpa de café y de piña preparados 15 días antes.

4.6. Pruebas de laboratorio

Esta fase consistió en realizar las pruebas microbiológicas de los caldos fermentados en diferentes lapsos del tiempo que duró la fermentación total. De la misma manera, se hicieron las pruebas histoquímicas y anatómicas de la corteza en los diferentes estadios del proceso completo.

1. Ensayos microbiológicos. Toma de muestra de caldos.

Consistieron en tomar muestras de los caldos fermentados preparados con 15 días de anticipación. Para observar el incremento de las poblaciones microbiológicas por tiempo y por fermento (de pulpa de café y de piña), la muestra de los caldos se tomó de la siguiente manera:

1. Día 0 del control. Caldo con corteza de jonote en agua.
2. Día 16 sólo del fermento. Primer día del caldo con corteza de jonote.
3. Día 23 del fermento. Esto corresponde a los 7 días del caldo con corteza de jonote.

4. Día 27 del fermento. Día 11 del caldo con corteza de jonote.
5. Día 30 del fermento. Día 15 del caldo con corteza de jonote.

4.7. Medición del pH y temperatura

Para todos los caldos fermentados (tratamientos y tiempo) se tomaron el pH y la temperatura. Se empleó un potenciómetro Combo pH & EC, HANNA Instruments, modelo HI98129. El aparato se calibró previamente con soluciones amortiguadoras a pH de 4.0 y 7.0 (Figura 8).

4.8. Preparación de medios de cultivo e inoculación

Los medios de cultivo se elaboraron de acuerdo al modo de preparación de los productos de Sigma-Aldrich; fueron de los de agar papa dextrosa PDA, agar azul de metileno y eosina, EMB y agar de MRS, los cuales se emplean para favorecer el crecimiento de hongos y levaduras, enterobacterias y lactobacilos, respectivamente.

El diseño experimental se planeó para observar el efecto de la temperatura, el pH, la disolución del caldo y el tiempo del fermento con corteza en el crecimiento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los tratamientos consideraron tres diluciones por caldo a partir del día 16 de cada fermento, de acuerdo con la toma de muestra señalada en la sección anterior. Con estos volúmenes conocidos se inoculó cada caja de Petri, conteniendo un medio de cultivo con dos repeticiones por disolución, como se muestra en la figura 9. Las diluciones de los caldos se prepararon en tubos con solución de NaOH al 1% para controlar la población. Todas las cajas se metieron a incubar a 36 °C de 24 a 48 horas.

4.9. Análisis microbiológico

En las cajas de Petri se reconocieron las unidades formadoras de colonias (UFC). El reconocimiento fue a dos niveles: el general, que consistió en contar todas las colonias desarrolladas, y el específico, que consistió en seleccionarlas de acuerdo con su tamaño, forma y coloración. Posteriormente, de cada colonia en particular se elaboró un frotis que se tiñó de acuerdo con el protocolo de Gram (Brock, 1993). A partir de aquí se

reconocieron, a través de un análisis de microscopía de luz, los tipos de organismos que reaccionaron al Gram (+) y Gram (-) (Figura 10).

La cantidad de UFCs por dilución se calculó de la siguiente manera:

$$\text{UFC} = \text{No. de colonias} / [(1/\text{volumen inoculado}) (1/\text{dilución})]$$

La identificación microbiológica se realizó de acuerdo con Prado (comunicación personal, 2011) (Figura 11). Los caracteres morfológicos de las levaduras se determinan mediante su descripción microscópica. Su forma puede ser de esférica a ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular e incluso alargada. La mayoría se reproducen asexualmente por gemación polar; algunas otras por fisión.

Con los datos obtenidos del número de colonias de UFC se elaboraron las gráficas del efecto de las variables estudiadas: tiempo (días), tipo de medio de cultivo, pH, temperatura y tipo de fermento. Asimismo, se hicieron pruebas de correlación de Pearson entre las variables, así como análisis de varianza de una sola vía y regresiones. El objetivo de estos análisis fue el determinar si había diferencias significativas entre tratamientos, pH, fermentos y temperaturas, así como para conocer en qué porcentaje estaban relacionadas las variables físicas o del medio con el crecimiento de las UFCs. Se utilizó el programa estadístico Stata 7.0 (StataCorp 2001).

4.10. Histoquímica

En esta fase se hicieron pruebas comparativas de la corteza de jonote para vislumbrar las condiciones de las paredes celulares de las fibras obtenidas de los experimentos de los caldos. Se obtuvieron muestras de fibras del control en el día cero y del último día (día 30). Las fibras restantes que experimentaron las condiciones de los fermentos de pulpa de café y de piña del día 30, se lavaron y se cocieron en ceniza. Esto se hizo para simular una reacción básica, pero no contaminante. Las fibras cocidas restantes se lavaron y se machacaron para elaborar un papel. Se tomaron muestras de fibras de corteza del cocido y del papel derivado de este proceso. Por otro lado, se tomaron muestras de papel elaborado con sosa cáustica.

Todas las muestras de fibras, desde el control hasta los dos tipos de papel, se fijaron en FAA (Formaldehído Alcohol Ácido acético 10%:50%:5% + 35% agua) por 48 horas. Se lavaron con agua destilada y se infiltraron en una solución de polietilenglicol al 4% y se sometieron al vacío. Cada muestra se partió en dos porciones. De una porción se obtuvieron secciones transversales, y de la otra, tangenciales. Estas secciones se elaboraron en un crióstato Leica Modelo CME 1349521x. A -20 °C y se montaron en portaobjetos.

4.10.1. Tinciones histoquímicas

Las tinciones histoquímicas se realizaron de acuerdo con los protocolos de los siguientes reactivos, basado en Krishnamurthy (1988) y Ruzin (1999):

4.10.1.1. Azul de Lacmoid (Cheadle *et al.*, 1953)

Las secciones transversales y tangenciales de todas las muestras frescas se tiñeron directamente para contrastar la calosa de las placas cribosas. Estas se tiñen de azul y el resto de los componentes químicos de las paredes celulares se tiñen de color pardo claro. Las placas cribosas son estructuras características de los elementos de tubo criboso (ETC) que son las células responsables de la conducción de la savia elaborada. El estado de estas placas indica si existe un impacto sobre el polisacárido calosa durante la fermentación, y el cocido para el caso del papel limpio y el impacto de la sosa cáustica para el caso del papel actual.

4.10.1.2. Azul de toluidina (O'Brien *et al.*, 1964; Fischer, 1985)

Debido a que la lignina presenta enlaces dobles, es una molécula muy fuerte que absorbe los rayos ultravioleta, por lo que puede distinguirse fácilmente de otros componentes de la pared celular que no absorben esos rayos. Los taninos son glucósidos que contienen polihidroxifenoles o sus derivados. Químicamente, son compuestos incoloros, no cristalinos, que pueden formar soluciones coloidales en agua. Por ello, muestran a la lignina y a los taninos principalmente de color turquesa. La celulosa se tiñe de azul intenso cuando la lignina se presenta en cantidades bajas y las pectinas se revelan de color lila. De acuerdo con Krishnamurthy (1988), la reacción exacta de este método no se

conoce, aunque es muy usado en tinciones diferenciales de paredes celulares gelatinosas o en fibras para reacciones de madera. Las paredes gelatinosas con pectina se tiñen de guinda o morado, tinción que muestra que el colorante ha sulfatado y carboxilado a los polisacáridos.

4.10.1.3. Ácido tánico + cloruro férrico (Foster, 1934)

Los polifenoles son compuestos aromáticos con grupos hidroxilos ligados directamente a los núcleos. Su clasificación depende de la cantidad de grupos hidroxilos presentes, por lo que la presencia de polifenoles puede identificarse a través del número de reacciones que ocurren. Esto incluye el uso de cloruro férrico. Para identificar la presencia de polifenoles en las fibras, se tiñeron los cortes con ácido tánico, después se les agregó cloruro férrico. Los pectatos de calcio se deberán teñir de negro o azul oscuro. Es una excelente tinción para la lámina media, materiales pécticos y para las células de la pared primaria.

4.10.1.4. Lugol (Haridass y Suresh Kumar, 1985)

El lugol reacciona a la lignina de color amarillo, a la celulosa de color rojizo y los almidones de color gris azulado. Esta tinción revela la lignificación y estado del metabolismo de las células de reserva. Generalmente el almidón se convierte en gomas de origen polifenólico.

4.10.2. Análisis de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Este análisis se realizó para corroborar la presencia o ausencia de consorcios microbianos en la superficie de las fibras. Para el estudio de las muestras de jonote en el MEB, se seleccionaron para su observación los estadios control, fermentados y hervidos. Se obtuvieron porciones pequeñas de las muestras seleccionadas, se fijaron en una solución de glutaraldehído al 5% en amortiguador de fosfatos a pH 7.3, se posfijaron en tetraóxido de osmio al 2% en amortiguador de fosfatos, y deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes desde el 30% hasta etanol absoluto, se procesaron en un desecador de punto crítico y se cubrieron con carbón y oro. Se tomaron imágenes a diferentes ampliaciones mediante un Microscopio Electrónico de Barrido Marca Jeol Modelo JSM-5900LV.

5. RESULTADOS

5.1. Microbiología general

En los cultivos en placas de agar es difícil diferenciar a nivel macroscópico las colonias de levaduras de las colonias bacterianas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas; la mayoría de las colonias son blancuzcas, aunque algunas tienen un color crema o rosado. Algunas estructuras pueden asociarse a ciertos géneros o especies: levaduras, elementos miceliales (con o sin otras estructuras asociadas).

Se determinó que las UFCs eran de manera general microorganismos tales como bacterias y algunas enterobacterias, las cuales, en las cantidades que se encuentran presentes dentro de los caldos, no son dañinas para la salud. Con ayuda del microscopio se observaron cadenas de lactobacilos y también algunas esporas; en la observación macroscópica se pudo encontrar sin lugar a dudas la presencia de hongos filamentosos. Con la identificación general realizada de esta manera, se pudo encontrar que, de acuerdo con la Figura 12A, las colonias que compitieron con mayor agresividad fueron las identificadas como lactobacilos y, en segundo lugar, las enterobacterias, cuya densidad de población es notoriamente mayor que la de los hongos y levaduras. En la Figura 12B se aprecia que el caldo de este fermento favorece sustancialmente al desarrollo de hongos y levaduras.

De acuerdo con los análisis estadísticos de correlaciones, se observa que el pH de los fermentos es significativamente diferente ($p < 0.05$), y que la diferencia se explica en un 43%. Esto es, la materia que fermenta es cualitativamente distinta. La piña mostró un pH de 3.35 y la pulpa de café de 5.2. También se observó que el desarrollo de las UFC que crecen en los diferentes tipos de fermentos presenta una diferencia significativa ($p < 0.05$).

De acuerdo con los análisis de varianza de una sola vía y las regresiones, se aprecia que únicamente hubo relaciones significativas ($p < 0.05$) entre las UFCs y el tipo de fermento, y se relacionan en un 19%.

5.2. Histoquímica

5.2.1. Fibras control

La corteza de jonote presenta fibras con dos tipos de paredes: una pared secundaria con contenidos de lignina y una interna de tipo gelatinoso que contiene pectinas. También se observa que presenta una gran densidad de elementos de tubo criboso (ETC), y células de reserva de tipo parenquimático (Figura 13).

La presencia de la lignina se corroboró con la tinción de azul toluidina y lugol. Las paredes secundarias se tornaron de un turquesa medianamente intenso (++). La pared gelatinosa mostró un contenido de pectinas abundante (+++), corroborado por la metacromasia que permite el azul de toluidina, otorgando un color lila (Figura 14). Esta estructura no tuvo reacción con el lugol.

5.2.2. Fibras después de 15 días de fermento

Las fibras estudiadas después de experimentar las condiciones de pH, temperatura y tipo de fermento, a lo largo de 15 días, mostraron los siguientes cambios: con la tinción azul de Lacmoid se observa la presencia de calosa en las estructuras especializadas de los elementos de tubo criboso (ETC). Estas estructuras presentan un estado conservado en apariencia. Sin embargo, desde este momento se puede encontrar que el fermento de la piña es más agresivo que el de la pulpa de café ya que, la pared interna se observa con menos material gelatinoso y la cantidad de calosa presente es menor que la encontrada en las fibras que estuvieron sumergidas con la fermentación de la pulpa de café (Fig. 15).

Con la tinción con azul de toluidina se observa que en el fermento de pulpa de café, las intensidades de la tinción muestran que la lignina de las paredes secundarias reacciona en un nivel (++) y las pectinas de la pared gelatinosa (+++) (Fig. 16 A y B) y, son similares a los resultados del control en la misma reacción. Sin embargo, en las fibras sumergidas en el fermento de la piña se observa que la lignina de las paredes secundarias conserva su intensidad de reacción (++) del mismo modo que en el control, mientras que las pectinas de la pared gelatinosa disminuyen notablemente el colorido de la reacción (+). (Fig. 16 C y D)

En la reacción con lugol se aprecia que ha habido un lavado de lignina (+), pues cuando la celulosa está sin lignina, tiene una reacción rojo brillante. Las paredes gelatinosas se han lavado (-). Asimismo se observa que no hay reconocimiento de infección por microorganismos. (Figura 17).

En ninguna de las fibras sumergidas en los fermentos se aprecian colonias de microorganismos, estructuras reproductoras o fases morfológicas de hongos o levaduras.

5.2.3. Fibras hervidas

La cocción con ceniza es la última fase del proceso, con la tinción de azul de Lacmoid se aprecia que las calosas se remueven mejor dentro de las condiciones del fermento de piña (Fig. 18).

Por otro lado, con el azul de toluidina se observó que la lignina de las paredes de las fibras sometidas al fermento de pulpa de café, se han lavado (+), y la pared gelatinosa se ha conservado (+). En contraste con las fibras procedentes del fermento de la piña, se observa que la lignina se ha mantenido, aunque con poca presencia (+) y la pared gelatinosa no reacciona (-) (Fig. 19).

Las tinciones con lugol mostraron que después de este proceso el intenso color rojo en el caso de las fibras sumergidas en pulpa de café, sugiriendo que hay una considerable disminución de lignina (-). Sin embargo, con las fibras sumergidas en piña hay secciones en las que no se encuentra dicha coloración. Por otro lado, en ambos casos la pared gelatinosa ha sido lavada en su totalidad, en pulpa de café (--) y en piña (---). (Figura 20).

5.3. Microscopía Electrónica de Barrido

Los resultados del análisis de esta fase muestran que no existe invasión o crecimiento de microorganismos asociado a la estructura de las fibras o de las células que conforman el tejido. La presencia de estos microorganismos hubiera sugerido digestión de lignina y celulosa, y posiblemente hubiera repercutido en el estado morfológico de las fibras (Fig.

21 A, B, C). También permitió ver cómo las paredes de las fibras van abriendo su entrecruzamiento con el proceso de cocción.

5.4. Experiencias adicionales a esta investigación

Durante la estancia en la comunidad de San Pablito se tuvo la oportunidad de trabajar directamente con los artesanos, realizando esfuerzos compartidos para interrelacionar sus experiencias, costumbres y tradiciones con los conocimientos técnicos derivados de esta investigación, teniendo siempre un resultado favorable para ambas partes.

También se realizó una encuesta de satisfacción que pretende aplicarse a los artesanos en enero de 2012, para identificar su nivel de satisfacción con el proceso en general planteado en esta investigación (Anexo I). El Fondo Nacional para el Fomento de las Artesanías, en convenio con esta casa de estudios, a través del Laboratorio de Anatomía y Tecnología de la Madera y la Dra. Alejandra Quintanar Isaías, del plantel Iztapalapa, ofreció talleres de Transferencia de la Tecnología Limpia para la elaboración del papel amate, en la comunidad de San Pablito. Además, se realizó un folleto tipo cartel con diagramas de flujo, en el cual se representaron los procedimientos propuestos, entregándose a cada participante en el taller general (Anexo II).

Finalmente, se tuvo participación en la implementación o creación de un “Proceso limpio de ablandamiento de fibras de corteza de árbol para elaboración de papel amate”, en trámite de aceptación de patente por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), otorgando todos los derechos patrimoniales a la Universidad Autónoma Metropolitana.

6. DISCUSIÓN

De acuerdo con Gaime-Perraud (1993), el sustrato de la pulpa de café es rico en cantidad y variedad de microorganismos. De los resultados en esta investigación se concluye que al finalizar la fermentación se encontró una mayor abundancia de lactobacilos; sin embargo, no hay evidencia clara que esto haya influido en la degradación de las fibras del jonote. Por otro lado, según lo reportado por Moreno (2005), dentro de los fermentos de la piña se pueden encontrar mayoritariamente bacterias acéticas, las cuales influyen directamente sobre el valor del pH del fermento, pero sugiere una vez más que la diversidad microbiana presente no influye sobre la destrucción física de las fibras.

Los resultados obtenidos, así como la literatura citada y consultada, sugieren que con la identificación microbiológica se muestra que los microorganismos que crecieron en los diferentes fermentos y medios de cultivo son principalmente desmanteladores de carbohidratos provenientes de azúcares simples, lo que sugiere que su metabolismo no está asociado a la hidrólisis de celulosa y/o lignina. Esto, junto con los resultados reflejados en el análisis estadístico, confirma que el tipo de producto a fermentar tendrá condiciones inherentes, los cuales podrán influir en el desarrollo de los microorganismos, independientemente de factores como la temperatura y la agitación. Esto significa que existen características de los fermentos que no se aprecian en el diseño experimental o que faltó otro tipo de ensayos que nos proporcionaran mayor información. Es decir, la relación entre el tipo de fermento, el valor de su nivel de acidez y el tipo de microorganismos que se desarrollen, son parte del sistema. En este estudio, el tipo de fermento y el valor del pH han sido los más significativos para el objetivo principal de esta investigación.

Los resultados que se obtuvieron, con las reacciones histoquímicas, demostraron, sin lugar a dudas, que la hipótesis propuesta al inicio de esta investigación ha sido correcta, es decir, conforme la fermentación de las pulpas ocurría, las fibras se fueron ablandando, permitiendo un mayor manejo de la fibra para la elaboración de papel y ofreciendo un proceso de elaboración limpio.

Las imágenes obtenidas con la microscopía electrónica nos permitieron constatar que en las fibras se mantienen ausentes microorganismos o cuerpos extraños a su

morfología, a pesar de haber estado expuestas durante un tiempo prolongado en los caldos de fermento. Además, la MEB nos permitió observar cómo las fibras van expandiendo sus fibras entrecruzadas después del proceso de cocción, sugiriéndonos que es posible que sea mayor el área de contacto con los caldos del fermento, cuando previamente se ha realizado un proceso mecánico.

7. CONCLUSIONES

Desde el punto de vista estructural, la fibra, célula larga, es el elemento más útil, el que más contribuye a la resistencia del papel. Una fibra larga puede tener más puntos de enlace con otras fibras y, por consiguiente, quedar más fuertemente asida en la estructura que una fibra corta. Esto era ya conocido desde la época prehispánica para la elaboración de lo que actualmente se conoce como papel amate.

Sin embargo, también es bien conocido en la industria papelera que se necesitan componentes agresivos para la deslignificación y para la eliminación de gomas. Pero es importante recalcar que en el objeto de estudio que nos atañe, la elaboración no corresponde a nivel industrial y que se tiene en juego la tradición de la cultura ña'ñu-otomí, su salud y su ambiente. Por esta razón, se concluye con gran satisfacción que es posible realizar la elaboración del papel amate actual sin el uso de la sosa cáustica.

Los dos fermentos propuestos y utilizados ofrecieron resultados aceptables y libres de desechos tóxicos, además el proceso puede llevarse en campo sin mayores complicaciones. En definitiva, con las pruebas histoquímicas realizadas a los papeles amate elaborados con el proceso limpio y con el proceso que incluye la sosa cáustica, se encuentran grandes diferencias en los tejidos de dichos papeles, lo cual enfatiza que el proceso que incluye al químico nunca la elimina, por más lavados que se hagan, razón por la cual un papel elaborado con esta técnica tendrá un tiempo de vida mucho menor que el papel elaborado con el proceso que en este trabajo se aplica.

8. PERSPECTIVAS

- Para estudios posteriores relacionados con los estudios microbiológicos de los caldos de fermentos, se recomienda la identificación específica de los microorganismos presentes, a través del estudio de sus rutas metabólicas, con lo que se puedan encontrar las mejores condiciones de cultivo, así como las condiciones ambientales que permitan mantener al caldo fermentivo durante un tiempo más prolongado.
- Es posible proponer el uso de otras frutas con características similares a las utilizadas en esta investigación, preferentemente de las mismas que se tengan en la región de San Pablito, ofreciendo mayor diversidad, no limitando a los artesanos por la temporada estacional o por la cercanía con las zonas cafetaleras, y ampliando la posibilidad de alternativas para una elaboración siempre limpia.
- Integrar procesos de destrucción mecánica sobre las cortezas nos ofrecerá una menor resistencia, es decir, las partes del proceso (fermentación y cocción con ceniza), podrán tomar menos tiempo, convirtiéndose en un proceso más eficiente.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M. (1980). *Introducción a la microbiología del suelo*. México: Agt Editor S. A.
- Bancroft, J. D. (1975). *Histochemical techniques*. Inglaterra: Butterworths.
- Barreto, M. (2001). *Utilización de pulpa de café como complemento en dietas para crías de tilapia, Oreochromis niloticus*. México: UAM-I.
- Brock. T. (1993). *Microbiología*. Ed. Prentice Hall.
- Carbajo, J. M.; Sepúlveda, J. D.; Olmos, A.; Quintanar, A.; Revilla, E.; González, A. E.; Huerta, S. y Villar, J. C. (2004). *Seguimiento mediante microscopía óptica y electrónica del ataque de hongos basidiomicetos a Pinus radiata en condiciones aplicables al biopulpeo*. III Congreso Iberoamericano de investigación en celulosa y papel. España.
- Cullen, D. (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Journal Biotechnology* 53: 273-289
- Dávila, G. Vázquez, R. (2001). *Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales*. Instituto de Biotecnología. México: UNAM.
- Elías, L. G. (1978). *Composición química de la pulpa de café y otros subproductos*. In, *Pulpa de café: composición, tecnología y utilización*. Braham, J. E. y Bressani, R. (Eds), INCAP, 19-29.
- Field, J. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 97-103
- Gahan, P. B. (1984). *Plant Histochemistry and Cytochemistry*. EUA: Academic Press.
- Gaime-Perraud. (1993). Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. *Micol. Neotrop. Apl.* 6: 95-103
- Gaitán, D. (2007). *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en composta generados en un cultivo de crisantemo*. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology*. 24: 23-63
- Iketa, K; Buchanan, I.; Smith, D. (2004). Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidase and laccases for waste treatment. *Journal Environmental Engineering and Science*. 3: 1-19

- Kamada, F. (2002). Mineralization of aromatic compounds by brown -rot basidiomycetes- mechanisms involved in initial attack of the aromatic ring. *Journal of Society for General Microbiology*. 148: 1939-1946
- Krishnamurthy, K. V. (1988). Manual de Técnicas Histoquímicas.
- Linares S, M. J., Solís, C. (2001). *Revista Iberoamericana de Micología. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica*. España: Capítulo 11. Identificación de levaduras.
- López, B. R. (2003). The endurance of Mexican Amate Paper: exploring additional dimensions to the sustainable development concept.
- Madigan, M. (2003). *Biología de los microorganismos*. Argentina: Prentice Hall.
- McLaughlin, S. (2000). Properties of Paper Made from Fibers of *Hesperaloe funifera* (Agavaceae). *Economic Botany*. 54: 192-196
- Moreno, R. (2005). *Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisiológicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de tepache*. México: UAM-I.
- Nava, J. (2003). *Fermentación de pulpa de café con Penicillium commune a nivel laboratorio y semi-piloto*. México: UAM-I.
- Pennington T. y Sarukhán. J. (2005). *Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Pérez, G. (2008). *Producción de enzimas tipo feruloil esterasa por fermentación en medio sólido en pulpa de café*. México: UAM-I.
- Pérez, J. (1996). *Utilización de residuos florales en la elaboración de papel manual*. Colombia: Universidad Nacional.
- Pérez, J. (2002). Biodegradation and Biological Treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol* 5: 53-63
- Quintanar I., A.; Jarquin P., B; Jacobo V., M.; Jaramillo P., A; Gutiérrez P., S. y Flores H., N. (2010) *Tecnología limpia para la manufactura de papel amate*. Temas Selectos de Ciencias Biológicas. México. Capítulo arbitrado de libro.
- Quintanar I., A.; Jarquin P., B.; Jaramillo P., A; Gutiérrez P., S.; Sepúlveda S., J. y Jacobo V., M. (2009-2010) Informe Final "Producción Sustentable de Papel Amate en San Pablito: manufactura limpia con base en procesos enzimáticos derivados de biopulpeo para el ablandamiento de fibras" en convenio con FONART-UV-UAM. México.

- Ramírez-Martínez J. R., Pernia, R. D., Bautista, E. O. Clifford, M. N., Adams, M. R. (2000). Producción y caracterización de la pulpa de café ensilada. En: Pulpa de café ensilada. Editor Ramírez-Martínez, J. R. pp11-29
- Rezusta López, A. (2001). Revista Iberoamericana de Micología. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. España: Capítulo 3. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico.
- Ruzin, S. E. (1999). Plant microtechnique and microscopy. E.U.A. Capítulo 10.
- Sahagún, B. (1969) Historia general de la cosas de la Nueva España.
- Stata Corp. (2001). Statistical Software: Release 7.0 College Station, TX: Stata Corporation.
- Urbaneja G.; Ferrer, P. y Colina, S. (1997). Hidrólisis ácida y caracterización de carbohidratos de la Pulpa de Café. *Revista Facultad de Agronomía*. 14: 265-275
- V Tecnologías limpias para la producción de pulpa y papel de *Eucalyptus*. XX Jornadas Forestales de Entre Ríos. (2005)

ANEXO I
PROPUESTA DE ENCUESTA

La siguiente encuesta se elaboró bajo la asesoría del Dr. Héctor Escalona del Departamento de Biotecnología, DCBS.

Esta encuesta se aplicará en enero de 2012.

Para las siguientes preguntas, favor de contestar:

1. Completamente de acuerdo
2. Parcialmente de acuerdo
3. Ni acuerdo ni en desacuerdo
4. Parcialmente en desacuerdo
5. Completamente en desacuerdo

¿La fibra puede utilizarse para el papel con diseño? _____

¿Cuántas personas hacen papel en su casa o taller? _____

¿Cuánto dinero gasta al mes para la compra de sosa y leña? _____

¿Le parece más económico el proceso de fermentación? _____

¿Es fácil conseguir las frutas para preparar los fermentos? _____

¿Se usa menos agua en el proceso limpio? _____

¿Le parece desagradable el olor de los fermentos? _____

Para las siguientes preguntas favor de contestar:

1. Muy satisfecho
2. Medianamente satisfecho
3. Ligeramente satisfecho
4. Medianamente insatisfecho
5. Muy insatisfecho

¿Qué tanto le satisface la textura del papel? _____

¿Qué tanto le satisface el color del papel? _____

¿Qué tanto le satisface el olor del papel? _____

¿Qué tanto le satisface la calidad final del papel? _____

ANEXO II



OFICIO DE CONFORMIDAD DE LA SOLICITUD DE PATENTE



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

México, D.F., a 22 de noviembre de 2011

Dr. Enrique A. Medellín Cabrera
Director de Enlace con Sectores Productivos
Rectoría General
P r e s e n t e

Por este conducto manifiesto mi conformidad con la Descripción, Reivindicaciones y Dibujos relacionados con la solicitud de patente denominada **"PROCESO LIMPIO DE ABLANDAMIENTO DE FIBRAS DE CORTEZA PARA ELABORACIÓN DE PAPEL AMATE"**, mismos que me hizo llegar personal del Área de Propiedad Industrial a su cargo, vía correo electrónico, el día 18 de noviembre del presente año, los inventores son en el mismo orden:

1. Paz Alejandra Quintanar Isaías
2. María Berenice Jarquín Pacheco
3. Sofía Gabriela Gutiérrez Pérez
4. Marco Antonio Jacobo Villa

Sin más por el momento, reciba Ud. un cordial saludo.

Atentamente
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"


Dra. Paz Alejandra Quintanar Isaías
Laboratorio de Anatomía y Tecnología de la Madera
Área de Botánica Estructural y Sistemática Vegetal
Departamento de Biología
Unidad Iztapalapa

Recibido
22/Nov / 2011

J. J. J. J.

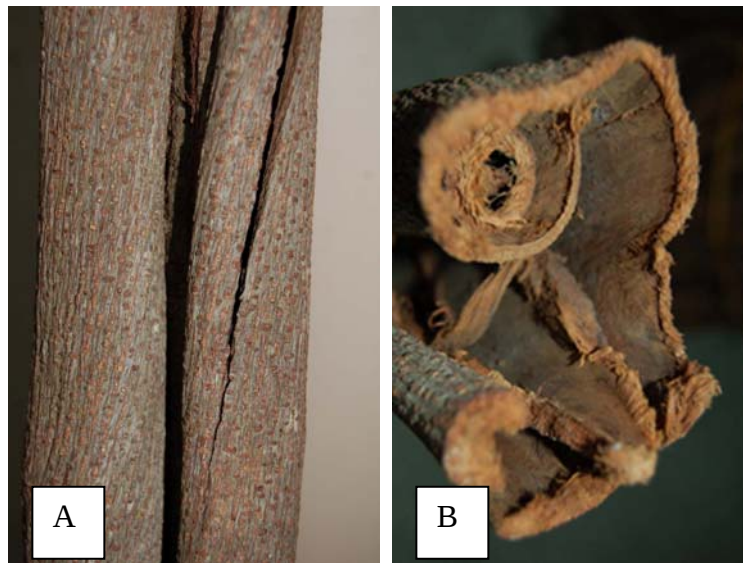


Figura 1. Jonote. A. Corteza externa. B. Corteza interna.



Figura 2. Hoja de papel amate elaborada con jonote.



Figura 3. Mapa de la región de Pahuatlán, Puebla, México

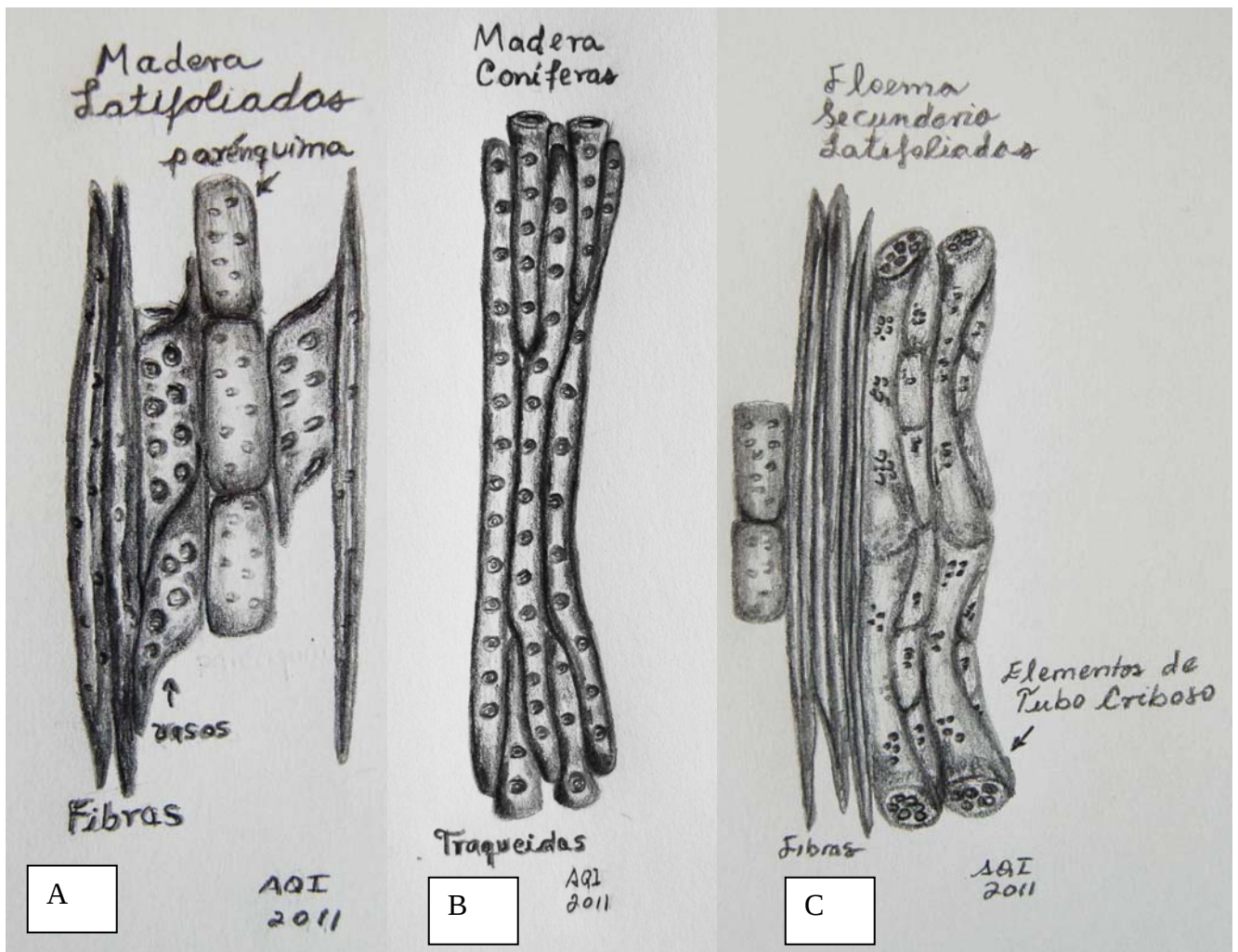


Figura 4. Tipos celulares. A. Madera de latifoliadas. B. Madera de Gimnospermas. C. Floema secundario o corteza interna de latifoliadas.



Figura 5. Corteza interna almacenada.

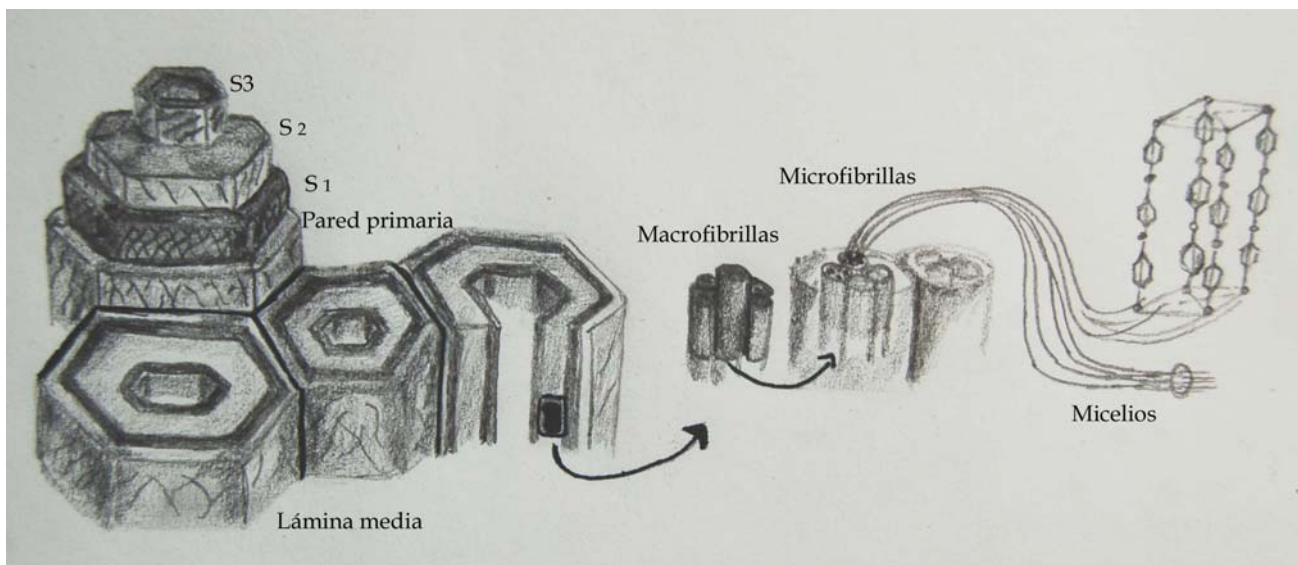


Figura 6. Ultraestructura y composición de la pared secundaria.



Figura 7. Muestreo del agua en el Manantial Agua de Machete.



Figura 8. Calibrando con el potenciómetro HANNA

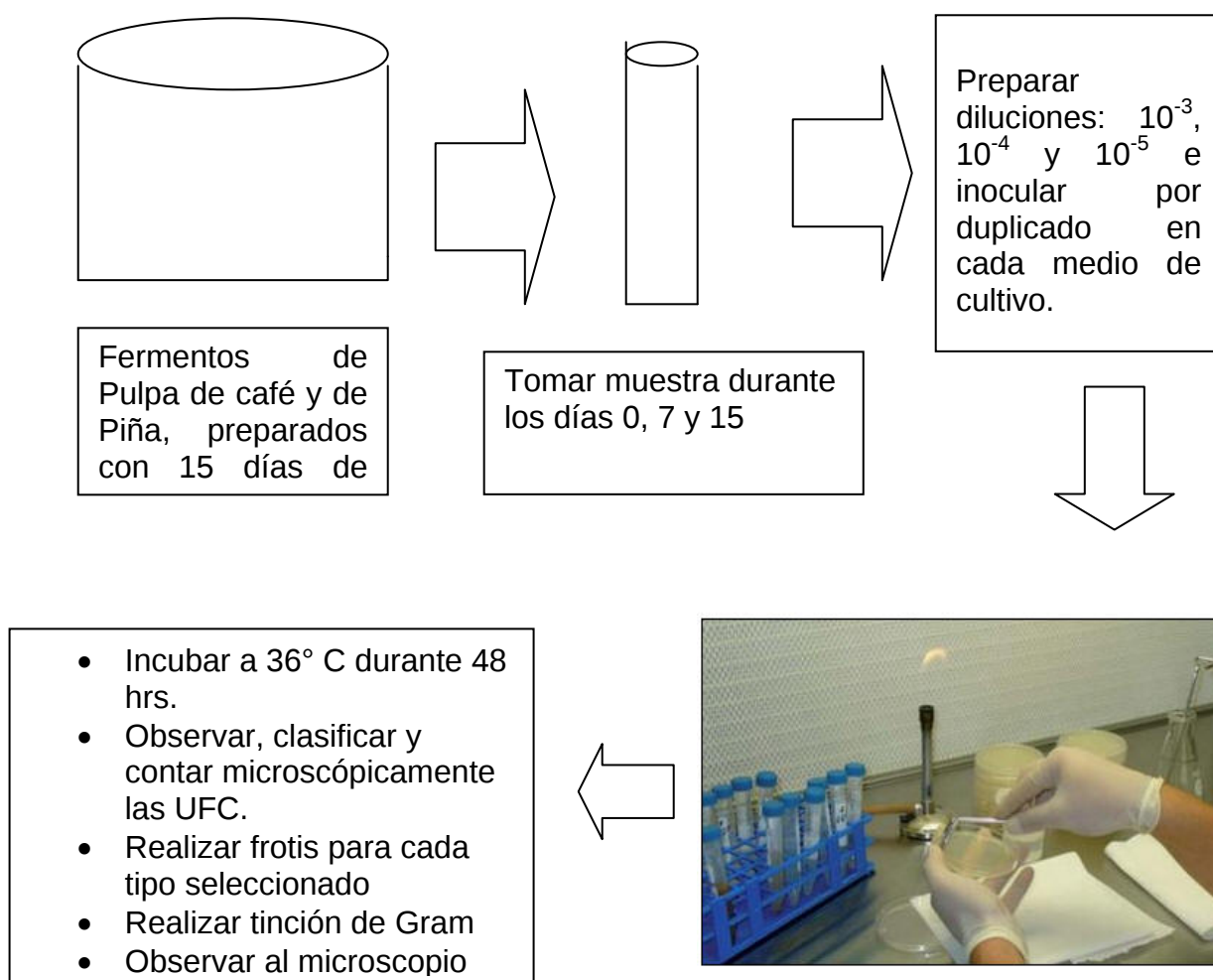


Figura 9. Diagrama de flujo de metodología del estudio microbiológico.

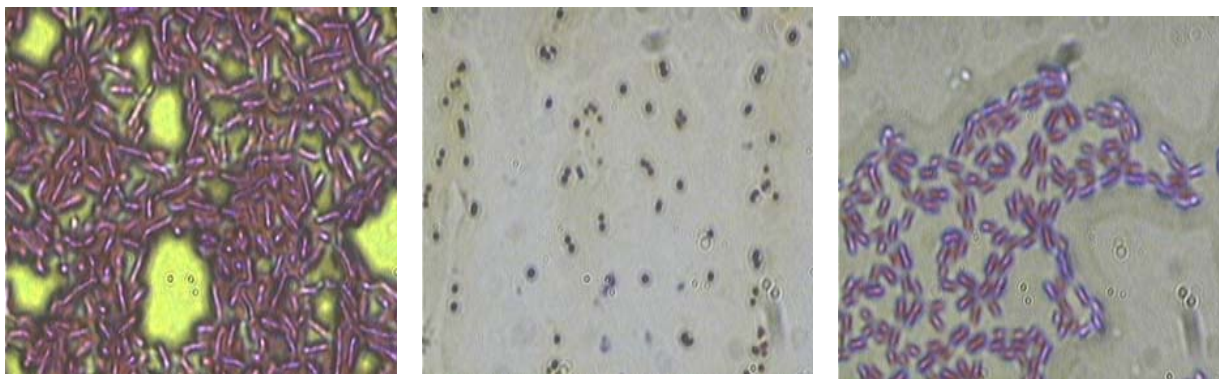


Figura 10. Frotis teñidos con Gram. Microscopía de luz.

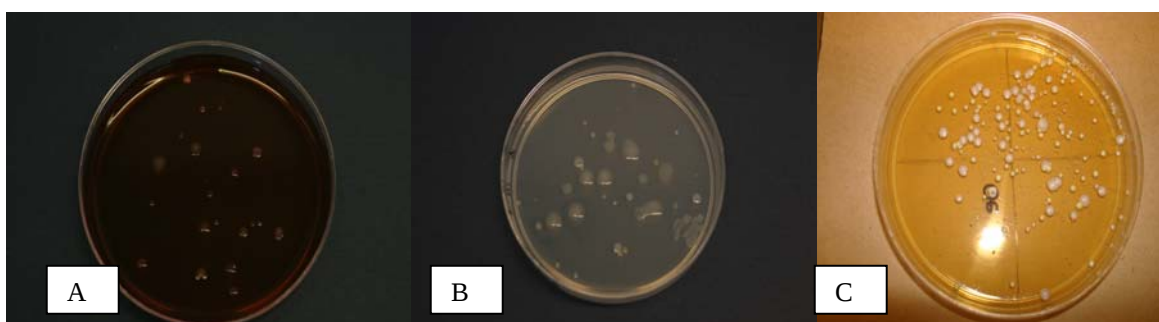


Figura 11. Cultivos de microorganismos.

A. Medio EMB. B. Medio PDA. C. Medio MRS.

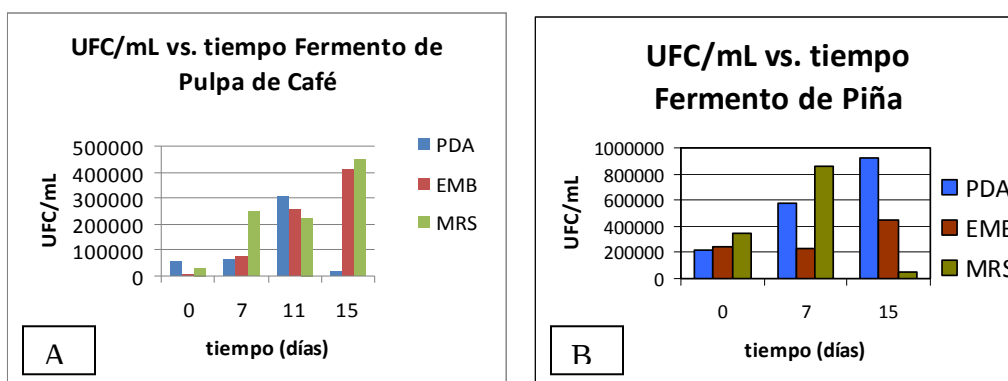


Figura 12. Crecimiento de las UFCs y el tipo de medio de cultivo.

A. Fermento de pulpa de café. B. Fermento de piña.

HIDRATACIÓN CONTROL

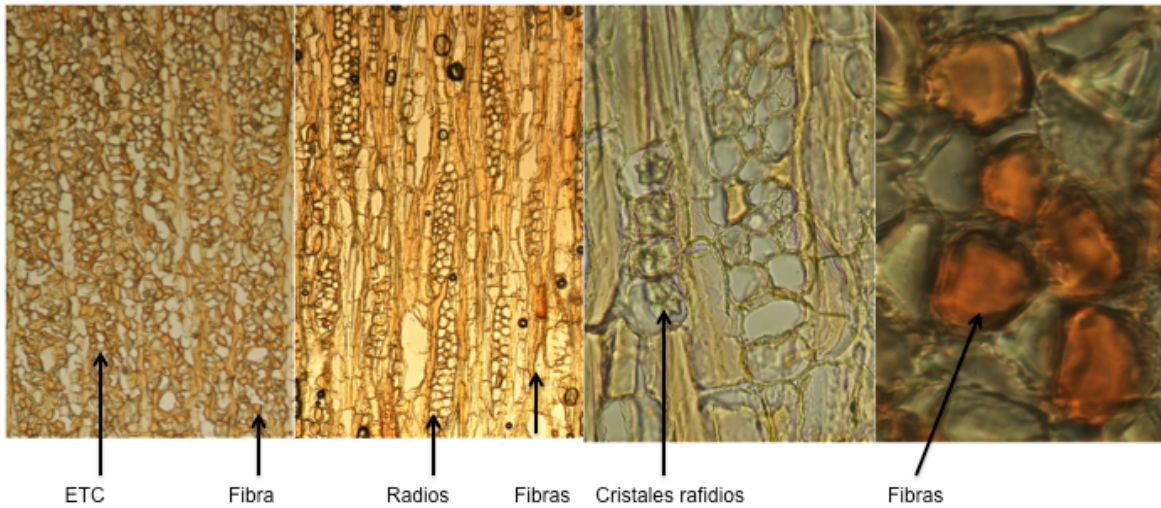


Figura 13. Fibra jonote. Control (sin tinción). Secciones transversales y longitudinales de las fibras. (40 X, 100 X).

Control Azul de Toluidina

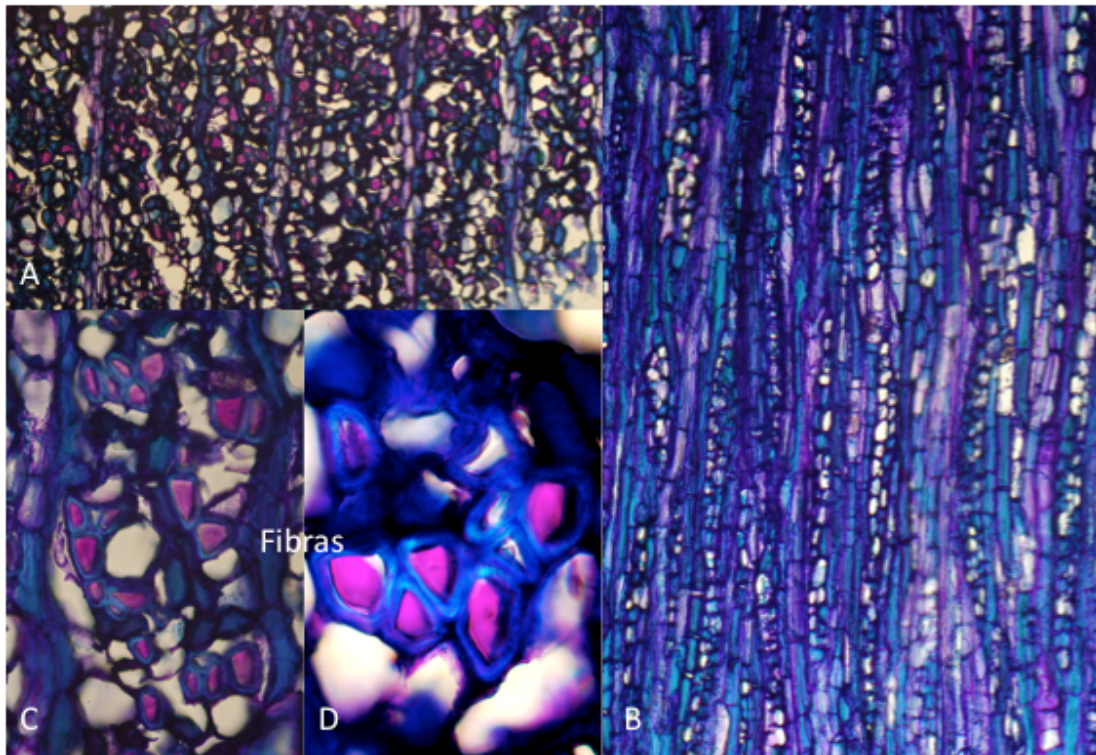


Figura 14. Fibras jonote. Control (Azul de Toluidina). A, C y D. Secciones

transversales. B. Sección longitudinal-tangencial. La pared secundaria se tiñe de turquesa y la pared gelatinosa de lila.

Fermento con Lacmoid

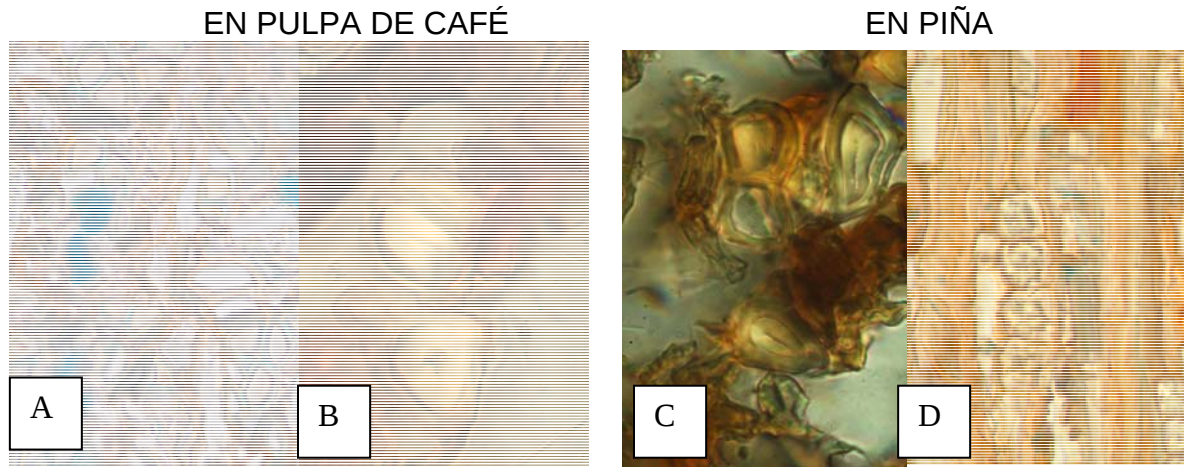


Figura 15. Fibras de jonote, 15 días en fermento (Azul de Lacmoid). A y B. Pulpa de café. Secciones transversales. C y D. En piña. Sección transversal y longitudinal-tangencial.

Fermento con Azul de Toluidina

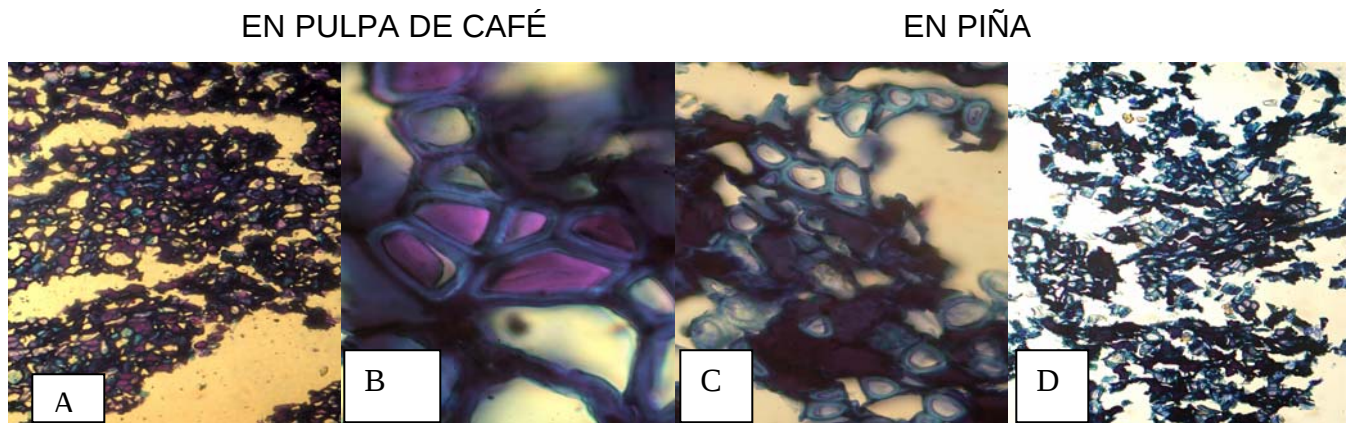


Figura 16. Fibras de jonote, 15 días en fermento (Azul de Toluidina). Secciones transversales. A y B. Pulpa de café. C y D. En piña.

Fermento con Lugol

EN PULPA DE CAFÉ

EN PIÑA

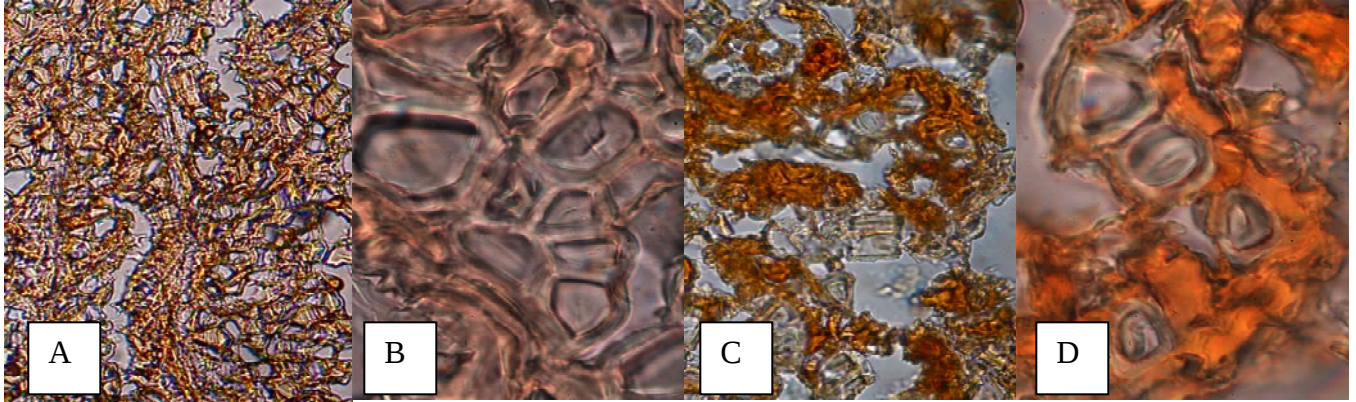


Figura 17. Fibras de jonote, 15 días en fermento (Lugol). Secciones transversales.

A y B. Pulpa de café. C y D. En piña.

Hervidas con Azul de Lacmoid

EN PULPA DE CAFÉ

EN PIÑA

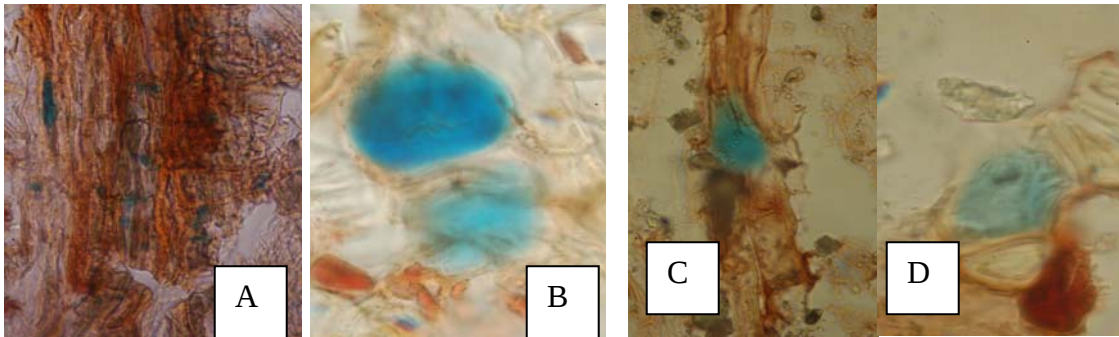


Figura 18. Fibras de jonote, hervidas (Azul de Lacmoid). A y B. Pulpa de café.

Secciones longitudinal y transversal. C y D. En piña. Secciones transversales.

Hervidas con Azul de Toluidina

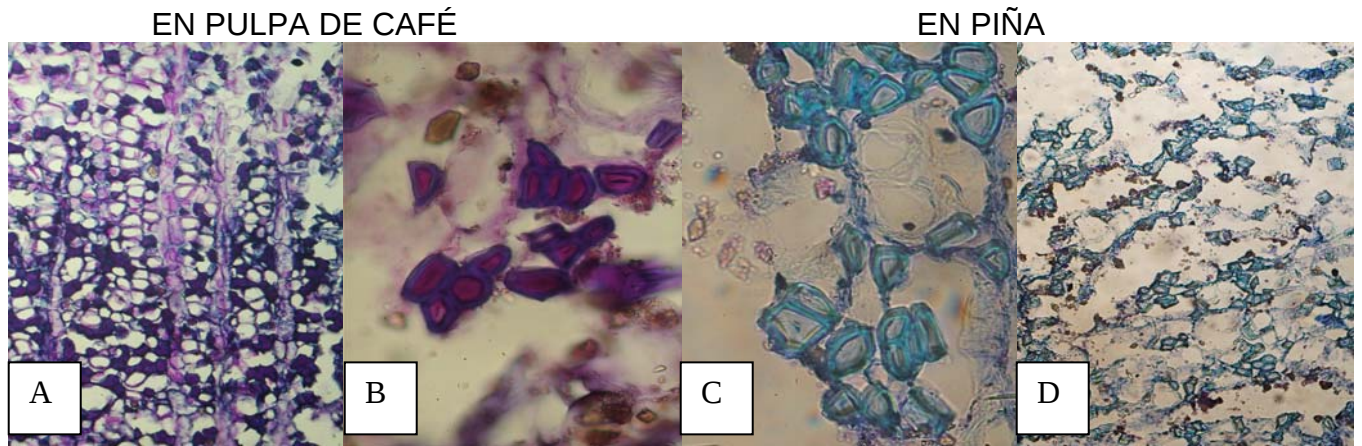


Figura 19. Fibras de jonote, hervidas (Azul de Toluidina). A y B. Pulpa de café. Secciones longitudinal y transversal. C y D. En piña. Secciones transversales.

Hervidas con Lugol

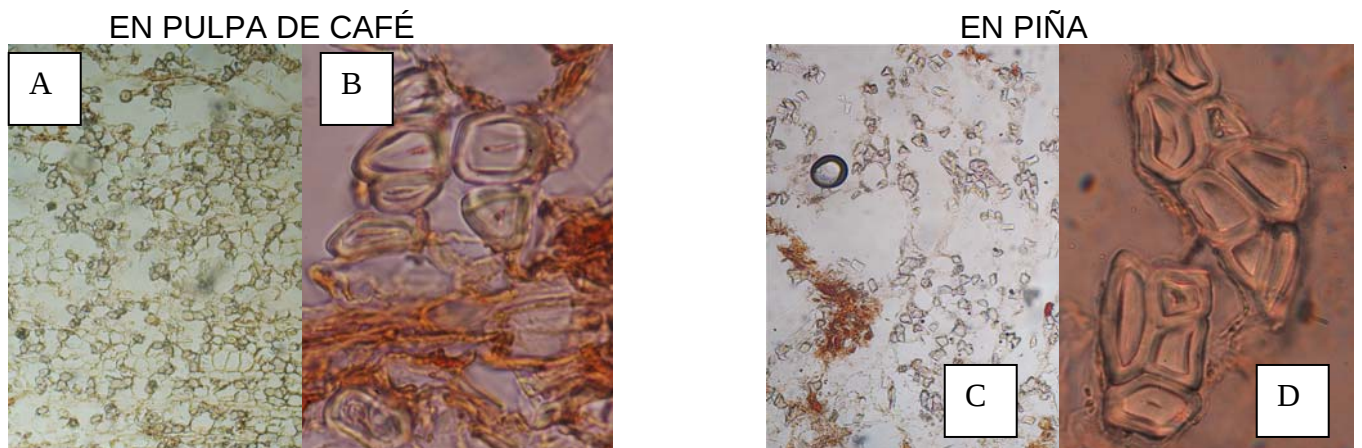


Figura 20. Fibras de jonote, hervidas (Lugol). Secciones transversales.

A y B. Pulpa de café. C y D. En piña.

Microscopía Electrónica de Barrido

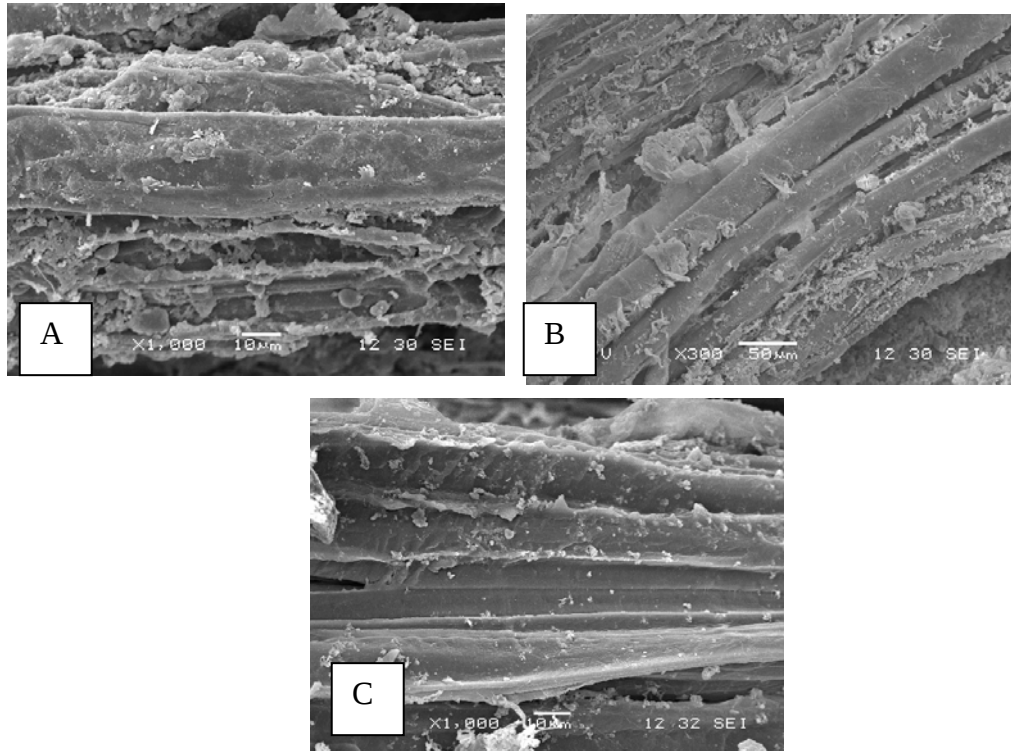


Figura 21. Fibras de jonote, (Microscopía Electrónica de Barrido, 1000 X). A. Fibras control. B. Fibras en pulpa de café, sumergidas durante 15 días en el fermento. C. Fibra hervida con ceniza