



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO



INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Evaluación de las propiedades físicas, químicas y microestructurales de frutos de *Parmentiera edulis* D.C. (cuajilote), así como la extracción y caracterización de microfibras de celulosa a partir de sus fibras lignocelulósicas.

TESIS

**Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

P R E S E N T A:

M. en C. MACARIO VICENTE FLORES

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. NORMA GÜEMES VERA

CO-DIRECTOR:

Dr. JOSÉ JORGE CHANONA PÉREZ (IPN)

ASESORES:

Dr. JAVIER PILONI MARTINI

Dr. SERGIO SOTO SIMENTAL

TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO, OCTUBRE 2020



COORDINACION DE POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: **“Evaluación de las propiedades físicas, químicas y microestructurales de frutos de *Parmentiera edulis* D.C. (cuajilote), así como la extracción y caracterización de microfibras de celulosa a partir de sus fibras lignocelulósicas”**, que desarrolla el estudiante M. C. A. Macario Vicente Flores.

Asistentes:

Dra. Norma Güemes Vera

Dr. Jose Jorge Chanona Pérez

Dr. Sergio Soto Simental

Dr. Javier Piloni Martini

Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a el estudiante M. C. A. Macario Vicente Flores, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de doctorado respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 01 de octubre del 2020.

Dra. Norma Guemes Vera

Dr. José Jorge Chanona Pérez

Dr. Sergio Soto Simental

Dr. Javier Piloni Martini



Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda
Aquetzalpa, Tulancingo de Bravo, Hidalgo,
México; C.P. 43600
Teléfono: +52 (771) 71 72000 ext. 2460, 2461
icap@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), pero en especial al Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) y el Instituto Politécnico Nacional (IPN) por el apoyo académico y la oportunidad de prepararme en sus aulas y laboratorios.

A la Dra. Norma Güemes Vera y el Dr. Jorge Chanona Pérez, por la dirección del presente trabajo, por sus valiosos conocimientos y sus sabios consejos, pero, sobre todo, por su paciencia, motivación y apoyo, brindándome la confianza para lograr los objetivos planteados.

A mis asesores por sus observaciones y sugerencias en la realización de la presente investigación, acompañados siempre de un trato cordial y amable, que hicieron muy grata la convivencia en esta etapa.

A los profesores y personal del Área Académica de Ingeniería Agroindustrial.

A quienes estuvieron en los momentos de alegría y permanecieron en los de aflicción, me complace contar con ustedes y llamarlos amigos.

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza y la paciencia para sobreponerme en los momentos más difíciles y por darme el don de la vida, así como sabiduría para salir adelante.

A mis padres Lucas Vicente Reyes y Evarista Flores de la Cruz por darme la vida y guiarme en mi camino que falta mucho por recorrer, por transmitirme su fortaleza, su dedicación y por las grandes enseñanzas de los principios y valores, y, más por el gran apoyo y la oportunidad que me han dado para concluir esta etapa muy importante de mi vida.

A mis hermanas y hermano por brindarme su gran apoyo y depositar en mí su confianza incondicional y darme las palabras de aliento para lograr esta meta.

A mi pareja Alma Linda por estar siempre conmigo apoyándome y motivándome a lograr esta meta en la vida.

A mis amigos y amigas que me mostraron la verdadera amistad y que fueron una familia que vivió conmigo durante la estancia de mi vida por las aulas y laboratorios de la universidad (UAEH e IPN).

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a lograr mi objetivo, al hacer que mi estancia universitaria fuera más cómoda.

A TODOS MIL GRACIAS

Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	MARCO TEÓRICO	4
2.1	<i>Parmentiera edulis</i> D. C. (cuajilote).....	4
2.1.1	Investigaciones realizadas con <i>Parmentiera edulis</i>	6
2.2	Fuentes de fibras lignocelulósicas	8
2.3	Composición de fibras lignocelulósicas	10
2.4	Celulosa	12
2.5	Aplicaciones de celulosa.....	14
2.6	Técnicas de microscopía y espectroscopia aplicadas a la caracterización de materiales lignocelulósicos.....	15
3	JUSTIFICACIÓN.....	22
4	OBJETIVOS.....	23
4.1	Objetivo general.....	23
4.2	Objetivos específicos	23
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1	Materia prima.....	24
5.2	Caracterización fisicoquímica de los frutos	24
5.3	Caracterización microestructural de los frutos	25
5.3.1	Microscopía óptica o de luz (MO).....	25
5.3.2	Microscopía confocal de barrido laser (CLSM).....	26
5.3.3	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)	26
5.4	Aislamiento de fibras lignocelulósicas	27
5.5	Tratamiento alcalino y aislamiento de microfibras de celulosa.....	27
5.6	Caracterización de fibras y microfibras de celulosa	28
5.6.1	Composición química y morfología	28

5.6.2	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	28
5.6.3	Difracción de rayos X (DRX).....	28
5.6.4	Nanoindentación de fibras nativas.....	29
5.6.5	Nanoindentación con microscopía de fuerza atómica (AFM).....	29
5.7	Análisis estadístico	30
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1	Descripción general de la fruta.	31
6.2	Caracterización fisicoquímica.....	31
6.3	Caracterización microestructural	37
6.4	Caracterización de fibras.....	48
6.5	Propiedades micromecánicas de las fibras.....	49
6.6	Difracción de Rayos X (DRX) de las fibras	51
6.7	Caracterización fisicoquímica y microestructural de fibras y microfibras de celulosa de frutos de cuajilote.....	53
6.7.1	Composición química de fibras nativas.....	53
6.7.2	Morfología por FE-SEM y CLSM de fibras y microfibras	56
6.7.3	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	58
6.7.4	Difracción de Rayos X (DRX)	60
6.7.5	Propiedades micromecánicas y morfología de superficie por AFM	62
7	CONCLUSIONES.....	65
8	BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>Parmentiera edulis</i> en fructificación (a); cuajilote en etapa inmaduro (b) y cuajilote en etapa maduro (c).....	5
Figura 2. Etapas de desarrollo de frutos de cuajilote desde la flor hasta la madurez del fruto.	5
Figura 3. Micrografía de fibras lignocelulósicas obtenidas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.....	9
Figura 4. Estructura de la cadena de celulosa.....	13
Figura 5. Representación esquemática de las zonas amorfas y cristalinas en cadenas de celulosa.	14
Figura 6. Interconversiones del polimorfismo de la celulosa.....	14
Figura 7. Imágenes de microscopía de luz de fibras de agave y <i>Thespesia populnea</i>	17
Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de fibras de <i>Juncus effusus</i> L. (a y b) y <i>Agave tequilana</i> (c y d).	19
Figura 9. Imágenes de microscopía confocal de barrido laser de fibras de agave (a y b) fluorescencia en color azul de celulosa y en color verde la lignina. Autofluorescencia de estructuras de células del endospermo de semillas de <i>Ricinus communis</i> (c y d).	20
Figura 10. Frutos de <i>Parmentiera edulis</i> , inmaduro (a) y maduro (b). Secciones transversales del fruto c y d. Exocarpio (ex), mesocarpio (me), endocarpio (en), fibras (fi), semillas (se).	32
Figura 11. (a) Sección transversal del fruto de <i>Parmentiera edulis</i> en estado inmaduro, bajo microscopía óptica. Aspecto general de partes de la fruta; (b) Exocarpio (ex), capa de colénquima (col) y parte de mesocarpio (me); (c) mesocarpio con fibras de esclerénquima (sc); (d) fibras de esclerénquima (sc); (e) endocarpio (en) con semilla; (f) semilla (se). pc, células parenquimatosas; co, cotiledón; t, testa; mt, mesotesta; et, endotelio; ve, epidermis ventral del cotiledón; de, epidermis dorsal del cotiledón. Barras a, c y e = 100 µm, barras b, d y f = 10 µm.	38
Figura 12. (a) Sección transversal del fruto de <i>Parmentiera edulis</i> en etapa madura, bajo microscopía óptica. Aspecto general de parte de la fruta; (b) Capa de exocarpio (ex) colénquima (col) y parte de mesocarpio (me); (c) mesocarpio con fibras de esclerénquima (sc); (d) fibras de esclerénquima (sc); (e) endocarpo (en) con semilla; (f) semilla (se). pc,	

células parenquimatosas; co, cotiledón; t, testa; mt, mesotesta; et, endotelio; ve, epidermis ventral del cotiledón; de, epidermis dorsal del cotiledón. Barras a, c y e = 100 μm , barras b, d y f = 10 μm 39

Figura 13. Imágenes transversales de CLSM de frutos maduros (a, c y e) y maduros (b, d y f) de *Parmentiera edulis*, donde la fluorescencia de la lignina se muestra por el color verde, la celulosa en el azul y las clorofilas en rojo. ex: exocarpio; is: espacio intercelular, pc: células parenquimatosas, sc: fibras de esclerenquima, se: semilla, ch: clorofilas, t: testa, co: cotiledón. Barras ayb = 50 μm , barras c y d = 100 μm , barras e y f = 200 μm 42

Figura 14. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de una sección transversal del fruto de *Parmentiera edulis* durante la etapa inmadura (a, b, e, f, i, j) y madura (c, d, g, h, k, l). ex.: exocarpio, col: capa de colénquima, pc: células parenquimatosas, sc: fibras de esclerénquima, ml: lámina media, lu: lumen celular. Barras a, e, c, g = 100 μm , barras b, f, d, h = 10 μm , barras i, k = 10 μm y barras j, l = 1 μm 46

Figura 15. Imágenes de fibras de fruta inmadura (a) y madura (d) de *Parmentiera edulis* e imágenes CLSM de fibras de fruta inmadura (b y c) y fruta madura (e y f). El color verde corresponde a la lignina y el azul a la celulosa. sp: septos o tabiques. 49

Figura 16. Imágenes de microscopía de luz después del análisis de indentación. Sección transversal de fibras crudas de fruto inmaduro (a) y fruto maduro (b), sección longitudinal de fibras crudas de fruto inmaduro (c) y fruto maduro (d). RII: indica la impresión residual de indentación. 51

Figura 17. Difracción de Rayos X para las fibras nativas del fruto inmaduro y maduro de *Parmentiera edulis*. 53

Figura 18. Imágenes del aspecto general de las fibras crudas de *P. edulis* (a), fibras con tratamiento alcalino (b) y fibras blanqueadas (c). Imágenes FE-SEM de fibras crudas (d), fibras con tratamiento alcalino (e) y microfibras simples de celulosa (f). Imágenes CLSM de fibras crudas (g), fibras con tratamiento alcalino (h) y microfibras simples de celulosa (i), el color verde corresponde a la fluorescencia de lignina y el azul a la celulosa. Barras d, e y f = 10 μm . Barras g, h y i = 20 μm 58

Figura 19. Grafica de FTIR de los espectros de las bandas de muestras de fibras nativas, fibras tratamiento alcalino y microfibras simples de celulosa. 60

Figura 20. Patrones de difracción de Rayos X de las muestras de fibra nativa, fibras con tratamiento alcalino y microfibras de celulosa y el índice de cristalinidad (CI %). 61

Figura 21. Imágenes 2D (a, d y g) y 3D (c, f y i) de microscopia de fuerza atómica (AFM), así como también la distribución del Módulo de Young expresado en histogramas de frecuencia (b, e y h) de las muestras de fibra nativa (a-c), fibras con tratamiento alcalino (d-f) y microfibras de celulosa (g-i). Dentro de los histogramas se encuentran los valores promedio del Módulo de Young (E) y debajo de las imágenes 3D los valores promedios de la Rugosidad (Ra) de cada muestra indentada por AFM. 64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de diferentes fuentes de fibras lignocelulósicas. 11

Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos de frutos de *Parmentiera edulis* en dos etapas de madurez. 36

Cuadro 3. Parámetros morfométricos de células de frutos de *Parmentiera edulis* en dos etapas de madurez..... 47

Cuadro 4. Composición química de fibras de frutos de *Parmentiera edulis* y otras fuentes de fibras lignocelulósicas 55

RESUMEN

El árbol cuajilote (*Parmentiera edulis* D.C.) produce frutos fibrosos con un alto contenido de compuestos lignocelulósicos. Sin embargo, esta fruta y sus fibras apenas se han estudiado. Por este motivo, se realizó un estudio integral de su arquitectura celular, propiedades fisicoquímicas, micromecánicas y estructurales en dos etapas de madurez. Se usaron pruebas fisicoquímicas, microscopía de luz, confocal y electrónica, microindentación y difracción de rayos X para la caracterización de la fruta y sus fibras. El análisis químico mostró que las frutas inmaduras tienen el mayor contenido de celulosa (42.17%), pero en las frutas maduras el contenido de celulosa disminuye (32.76%) mientras que el contenido de lignina aumenta de 35.26 a 40.79%, causado por la lignificación de las fibras de esclerénquima. Los estudios microestructurales y micromecánicos en las diferentes regiones del fruto proporcionaron información relevante sobre su arquitectura celular, distribución de compuestos lignocelulósicos y su papel en las propiedades micromecánicas de sus fibras. El engrosamiento de la pared celular de las fibras de esclerénquima fue causado por la lignificación celular de las frutas maduras. Según los estudios fisicoquímicos y estructurales, las fibras de cuajilote son comparables a otras fibras obtenidas de cultivos ricos en compuestos lignocelulósicos. El estudio actual proporcionó nuevos conocimientos sobre la arquitectura celular de la fruta y los criterios para seleccionar la etapa de maduración adecuada para la extracción de celulosa o lignina. Además, se obtuvo información sobre las propiedades micromecánicas de sus fibras y qué disposición estructural podría ser más conveniente para el refuerzo mecánico de materiales biodegradables.

ABSTRACT

The cuajilote (*Parmentiera edulis D.C.*) tree produces fibrous fruits with a high content of lignocellulosic compounds. However, this fruit and their fibers have been scarcely studied. For this reason, an integral study of their cellular architecture, physicochemical, micromechanical and structural properties in two maturity stages were carried out. Physicochemical tests, light, confocal and electron microscopy, microindentation and X-ray diffraction were used for the characterization of fruit and their fibers. Chemical analysis showed that the unripe fruits have the highest cellulose content (42.17%), but in ripe fruit the cellulose content decreases (32.76%) while lignin content increases from 35.26 to 40.79%, caused by the lignification of the sclerenchyma fibers. Microstructural and micromechanical studies in the different regions of the fruit provided relevant information about its cellular architecture, distribution of lignocellulosic compounds and its role in the micromechanical properties of their fibers. The thickening cell wall of sclerenchyma fibers was caused by the cellular lignification of the ripe fruits. According to the physicochemical and structural studies, cuajilote fibers are comparable to other fibers obtained from crops rich in lignocellulosic compounds. The current study provided new knowledge about the cellular architecture of fruit and criteria for selecting the ripening stage adequate for the extraction of cellulose or lignin. Furthermore, information regarding the micromechanical properties of their fibers and which structural arrangement could be more convenient for mechanical reinforcement of biodegradable materials was obtained.

1 INTRODUCCIÓN

El árbol de *Parmentiera edulis* D.C. se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales de México a lo largo de la costa del Pacífico y el Golfo de México, con su hábitat natural llegando hasta El Salvador y Honduras (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Pennington & Sarukhán, 1998). En primavera y verano, el árbol produce frutos cilíndricos y surcados longitudinalmente, con tamaños que varían de 5 a 23 cm de longitud y de 2 a 6,5 cm de diámetro, dependiendo de su etapa de madurez (Martínez-Torres & Diego-Pérez, 2006; Torres-Rivera, 2018). La fruta de *P. edulis* ha adquirido varios nombres coloquiales, pero "cuajilote" es el nombre más utilizado. Los árboles tienen un alto rendimiento (aproximadamente 300 kg de fruta por árbol) y es fácil de cultivar (Álvarez-Olivera, Calzada-Almas, & Batista-Cruz, 2010; Angón-Galván, 2006).

La corteza, las flores y los frutos de este árbol se han utilizado para tratar algunas enfermedades como la diabetes, la gonorrea, los resfriados y la hidropesía reportados en la literatura (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Cáceres et al., 1995; Gómez et al., 2016; Hernandez-Galicia et al., 2002). Otros estudios han reportado algunas propiedades de la fruta, específicamente la cuantificación de algunos de sus macronutrientes y micronutrientes (Angón-Galván, 2006; Torres-Rivera, 2018), pero la información recopilada aún es escasa.

La caracterización fisicoquímica, estructural y micromecánica proporcionaría información útil para el uso industrial de esta fruta y sus fibras. Para aprovechar al máximo los compuestos estructurales de la fruta (celulosa y lignina) es importante conocer la arquitectura celular de las fibras lignocelulósicas. Estas fibras se extraen principalmente de desechos agroindustriales, pero la búsqueda de nuevas fuentes alternativas como plantas, frutos y raíces son de creciente interés. Por lo tanto, este estudio de una nueva fuente de celulosa y lignina y la mejor manera de explotar estas sustancias podría proporcionar información nueva e importante (García, Gandini, Labidi, Belgacem, & Bras, 2016).

Las propiedades de las fuentes de material lignocelulósico varían ampliamente dependiendo de la composición fisicoquímica, la estructura celular, la temporada de cultivo, la región

geográfica, la edad de la planta y la etapa de madurez de la fruta, entre otros factores (Binoj, Raj, Sreenivasan, & Thusnavis, 2016). Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios relacionados con estos temas, comenzando con la caracterización fisicoquímica en diferentes etapas de madurez que proporcionará información valiosa sobre el potencial de la planta como fuente de materiales lignocelulósicos (Sanjay et al., 2018). Además, las técnicas de microscopía en combinación con análisis de imágenes, microindentación y difracción de rayos X (DRX) proporcionarán información importante sobre la estructura celular, la distribución y la abundancia relativa de los biopolímeros en los materiales vegetales y la disposición cristalina de sus componentes estructurales, así como nuevos datos sobre la dureza y rigidez de las fibras (Hernández-Hernández et al., 2014; Marin-Bustamante et al., 2018; Wu et al., 2010). Esta información podría ser útil para determinar si la materia prima de la fruta es una fuente adecuada de celulosa y lignina, mientras que estos estudios también podrían proporcionar criterios para elegir la etapa de maduración más adecuada para la extracción de sus biopolímeros (Szymanska-Chargot, Chylinska, Gdula, Koziol, & Zdunek, 2017). La importancia actual de la búsqueda de fuentes alternativas de biopolímeros estructurales como la celulosa y la lignina es que existe un interés creciente en su uso en el refuerzo de biomateriales ecológicos (Azeredo, Rosa, & Mattoso, 2017; Lei & Feng, 2020; Sanjay et al., 2019). En este sentido, varios cultivos como zanahoria, pepino, manzana (Szymanska-Chargot et al., 2017), *Agave tequilana* (Espino et al., 2014), cáscara de coco (Fahma, Iwamoto, Hori, Iwata, & Takemura, 2011), hojas de piña (R. M. dos Santos et al., 2013), entre otras, se han utilizado como fuente para obtener celulosa. Estos polímeros tienen varias aplicaciones como nanocompuestos en el refuerzo de materiales en la industria del embalaje, termoplásticos sostenibles, para material en campos médicos, industria del papel, electrónica o biomasa para biorefinería, entre otras industrias (Charpentier Alfaro & Méndez Arias, 2020; Klemm et al., 2018; Lei & Feng, 2020; Mondal, 2017). Si bien la lignina se usa con frecuencia por sus propiedades adhesivas, se mezcla con otros polímeros para mejorar la plasticidad y la adhesión de los materiales (Bajwa, Pourhashem, Ullah, & Bajwa, 2019; Faruk & Sain, 2016).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización fisicoquímica, estructural y micromecánica de la fruta cuajilote y sus fibras en la etapa inmadura y madura,

utilizando técnicas de microscopía, análisis de imágenes, microindentación y DRX. En consecuencia, este trabajo proporciona información valiosa e inédita sobre los frutos de *P. edulis* con respecto a su arquitectura celular, propiedades fisicoquímicas, micromecánicas y estructurales en diferentes etapas de madurez. Sobre la base de la información obtenida, se propone que esta fruta puede ser una fuente alternativa de compuestos lignocelulósicos dependiendo de la etapa de maduración, donde la celulosa o la lignina se pueden extraer selectivamente de sus fibras con mayores beneficios. Finalmente, el estudio actual podría proporcionar pautas para la caracterización de otros cultivos lignocelulósicos, donde la etapa de madurez es un criterio importante para la extracción de estos biopolímeros.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 *Parmentiera edulis* D. C. (cuajilote)

El árbol de *Parmentiera edulis* es originario de México y el Norte de América Central. Es conocida comúnmente como: pepinocat o tzon tesa nion (maya), chote, pepino de árbol, tzote (huasteca) y cuajilote (mixteca). Se encuentra desde el sur de Tamaulipas y San Luis Potosí hasta la Península de Yucatán en la vertiente del Golfo y desde el centro de Sinaloa hasta Chiapas, en el área del Pacífico, con su hábitat natural llegando hasta El Salvador y Honduras (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Pennington & Sarukhán, 1998). Forma parte del bosque tropical caducifolio adaptándose a regiones cálidas y húmedas de América Central. Cultivado en lugares con una altitud de 2 a 2240 msnm y precipitaciones anuales superiores a 1500 mm, teniendo rendimientos de producción altos aproximadamente de 1000 a 2000 frutos en todo el año (Álvarez-Olivera et al., 2010; Angón-Galván, 2006).

La propagación de *Parmentiera edulis* es muy sencilla y cuando este árbol llega a su madurez, produce frutos en dos temporadas al año, en primavera y verano, obteniendo rendimientos altos de producción de fruto, aproximadamente 300 Kg por árbol (Álvarez-Olivera et al., 2010). Presenta grandes propiedades agronómicas, se adapta a una gran variedad de condiciones climáticas, posee alto rendimiento de producción y facilidad de cultivo. Los pobladores de la región de la mixteca lo han consumido como alimento crudo, hervido y sancochado atribuyéndole propiedades medicinales. El árbol tiene una altura de 4 a 12 metros, con tronco grueso y corteza agrietada, hojas divididas con espinas, sus flores salen del tronco o de los extremos de las ramas y originan frutos alargados (Figura 1) (Angón-Galván, 2006; Martínez-Torres & Diego-Pérez, 2006; Torres-Rivera, 2018).

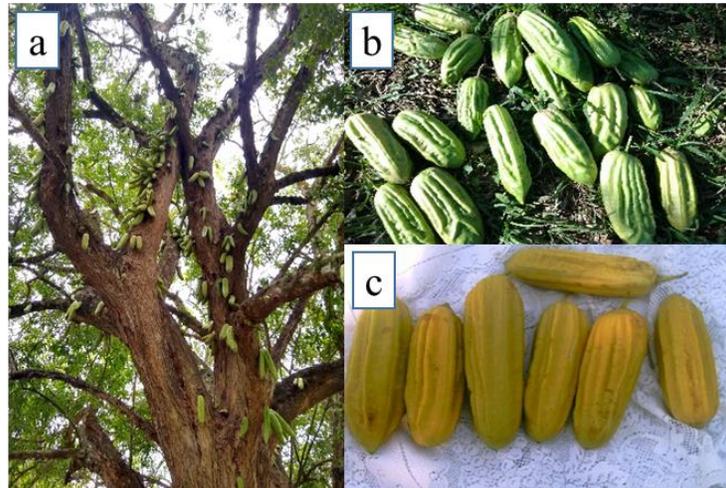


Figura 1. Árbol de *Parmentiera edulis* en fructificación (a); cuajilote en etapa inmaduro (b) y cuajilote en etapa maduro (c).

Fuente: propias y adaptado de: Angón-Galván, (2006).

Las flores son grandes, verdosas-blancas y los frutos son surcados de color amarillo de 5-15 cm de longitud y de 3-5 cm de diámetro, el tiempo de desarrollo del cuajilote, de una flor a un fruto maduro es de 40 días aproximadamente (Angón-Galván, 2006).

El fruto es una baya de color verde-amarillo cuando no está en su estado de maduración y de café-rojizo cuando el fruto está maduro. Es de forma cilíndrica, alargada u oblonga, de 10 a 16 cm de largo y de 2 a 6.5cm de ancho, con numerosos surcos longitudinales, siempre estriados, sésiles o colgantes de las ramas (Figura 2). La pulpa es de color blanquecino con numerosas semillas de color marrón. Su sabor se asemeja a la caña de azúcar.



Figura 2. Etapas de desarrollo de frutos de cuajilote desde la flor hasta la madurez del fruto.

Fuente: Adaptado de: Angón-Galván, (2006) y Villar-Herrera, (2011).

El fruto es parecido al cacao se puede consumir crudo o preparado de diferentes formas atribuyéndole propiedades medicinales (Pérez-Gutiérrez, Pérez-González, Zavala-Sánchez, & Pérez-Gutiérrez, 1998). Como actividades hipoglucemiante y antigonorreica; además se le asignan otros usos como son el alivio del dolor de cabeza, de la sordera, para tratar cálculos biliares, en la diarrea, en el empacho, en la hidropesía y para purificar la sangre (Cáceres et al., 1995; Gómez et al., 2016; Hernandez-Galicia et al., 2002; Perez et al., 2000).

Los pobladores de la región Mixteca consumen el fruto de *Parmentiera edulis* como alimento en forma cruda, hervida y algunos consumen el fruto completo y otros solamente desechan la parte fibrosa interna (Pérez-Gutiérrez et al., 1998). También se ha reportado su consumo por decocción en agua en algunas regiones (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005).

2.1.1 Investigaciones realizadas con *Parmentiera edulis*

El árbol de *Parmentiera edulis* en el suroeste de México ha llegado a tener gran importancia al formar parte de las especies arbóreas de la región, ocupando lugares importantes como especie leñosa perenne, forrajera por los frutos usados en la ganadería bovina. Se encuentra principalmente en los potreros por ser un árbol de sombra para el ganado, usado como fuente de leña, cercas vivas, usos en la medicina tradicional, así como su utilización para la confección de herramientas agrícolas, catalogado como un árbol de usos múltiples (Pinto, 2001).

Un estudio realizado en el país de Cuba, sobre la etnobotánica y propagación de *P. edulis*, se constató que esta especie de árbol se encuentra distribuido en diferentes provincias del país, el cual es utilizado como arbolara para animales de granja, usando los frutos como forraje para animales. Considerándolo una especie prometedora para forraje, por lo cual se han desarrollado diferentes estudios para planear una gran distribución de la planta para su cultivo y desarrollo en diferentes condiciones edafoclimáticas (Álvarez-Olivera et al., 2010). Así como también, en Guatemala se desarrolló un estudio para determinar la actividad antigonorreica de diferentes plantas, en el cual extractos etanólicos de frutos de *P. edulis* poseían esta actividad, ya que se observó la actividad inhibitoria contra la cepa de *Neisseria gonorrhoeae* procedente de pacientes sintomáticos (Cáceres et al., 1995).

Pérez-Gutiérrez et al. (1998) realizaron estudios farmacológicos y determinaron la actividad hipoglucemiante de extractos clorofórmicos de frutos de *P. edulis* suministrándolos a ratones diabéticos, comprobando que la dosis de 300 mg/Kg disminuía los niveles de glucosa sanguínea hasta un 43.75%. Este mismo grupo de investigación con ayuda de métodos espectroscópicos, realizó la identificación del compuesto encargado de la actividad que reducía los niveles de glucosa, determinando que fue el guaianólido lactusin-8-O-metilacrilato que estaba presente en los extractos del fruto de *P. edulis* (Perez et al., 2000).

Con respecto, a la caracterización fisicoquímica, solo evaluaciones parciales se han realizado de algunos componentes químicos o nutrimentales y algunos aspectos físicos sobre el fruto de *P. edulis*. Donde, se ha reportado que estos frutos poseen una alta humedad que va de 84-87%, fibra cruda de 3.11-4.25%, extracto etéreo de 0.03-0.04%, proteína 0.33-0.42%, minerales o cenizas 0.49-0.62% y carbohidratos 8.69-10.63%. así como vitamina C en concentraciones de 23-29.8 mg/100 g, elementos como Fe, Zn y Cu (Angón-Galván, 2006). El fruto se ha utilizado como forraje, pero un estudio sobre la degradación ruminal de esta materia prima, se demostró que la materia seca degradable de los frutos maduros es mayor que los frutos en estados inmaduros, pero esta materia seca es de baja disponibilidad ruminal que no podría sustituir a los forrajes tropicales, pero puede ser una opción de complemento en la alimentación en las épocas de sequía (García-Castillo et al., 2008). También se ha evaluado la posible aplicación de los frutos en otros productos, para fortalecer las propiedades nutrimentales en productos de la industria alimentaria, como en productos de panadería aplicando estos frutos en forma de harina para hacer algunas formulaciones, pero conociendo la composición de los frutos obteniendo valores de humedad de 85.14%, 14.86% de materia seca parcial, 4% en cenizas, 3.46% de proteína, 9.46% de carbohidratos, extracto etéreo 3.84%, fibra cruda hasta un 18.36%. así como la presencia de elementos como: Na, K, Mg, Fe, Zn, Mn y Cu (Villar-Herrera, 2011).

Sin embargo, son pocos los estudios realizados a este fruto, los cuales se han llevado a cabo con el enfoque de ser utilizado como una fuente de alimento por sus propiedades o como una alternativa en la medicina tradicional para el tratamiento de algunos padecimientos ya antes mencionados, pero aun esta información es escasa. No obstante, este tipo de materia prima como los cuajilotes al ser un fruto con alto contenido de fibras lignocelulósicas y no tener un

aprovechamiento de este material, podría considerarse como una fuente alternativa de obtención de biopolímeros (celulosa o lignina). Por lo tanto, para aprovechar los diferentes compuestos estructurales de la fruta son necesarios análisis fisicoquímicos más completos y estudios microestructurales para conocer la arquitectura celular presente en estas fibras lignocelulósicas y ser considerada una nueva fuente alternativa de celulosa o lignina, ya que las propiedades de las diferentes fuentes de material lignocelulósico varían ampliamente por varios factores como: composición fisicoquímica, la estructura celular, la temporada de cultivo, la región geográfica, la edad de la planta y la etapa de madurez de la fuente.

2.2 Fuentes de fibras lignocelulósicas

Considerando la búsqueda de nuevos biomateriales y nuevas tecnologías basadas en los conceptos de sostenibilidad ambiental, ha llevado en aumento la investigación científica y el desarrollo de nuevos productos en el campo de la celulosa y nanocelulosa, aprovechando principalmente nuevas fuentes alternativas a partir de fibras lignocelulósicas, tales investigaciones son realizadas en los últimos años por la industria, diferentes centros de investigación y las áreas afines de las universidades, considerando y evaluando nuevas fuentes. En este campo de investigación las fibras vegetales o lignocelulósicas se definen como células individuales o elementos estructurales de las plantas que forman parte del tejido esclerenquimático, dando fuerza y forma a los tejidos de los tallos, ramas y raíces, pero también las encontramos en tejidos blandos como hojas, flores o frutos (van Dam & Gorshkova, 2003). Estas estructuras se caracterizan por tener una pared celular gruesa y tener un prominente lumen al centro de cada célula, proporcionando integridad mecánica a los tejidos de las plantas (Figura 3).

Las características importantes para las fibras están determinadas por la cantidad y la distribución de los componentes químicos en varias capas de la pared celular, en este sentido la celulosa como el componente más importante de los vegetales ha sido la materia prima polimérica considerada como un material desafiante para la creciente demanda de los productos biocompatibles y amigables con el medio ambiente (García et al., 2016; Nechyporchuk, Belgacem, & Bras, 2016).

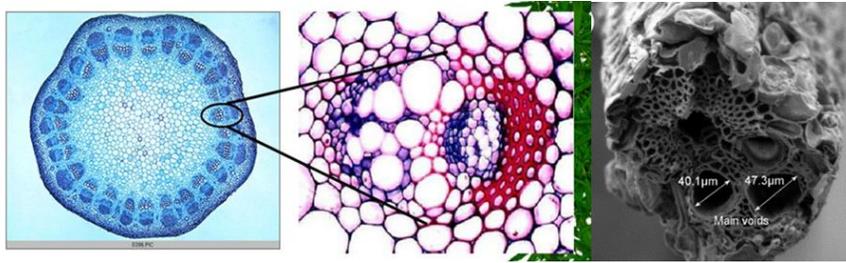


Figura 3. Micrografía de fibras lignocelulósicas obtenidas por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.

Fuente: Adaptado de: Maache, Bezazi, Amroune, Scarpa, & Dufresne, (2017).

Desde hace mucho tiempo atrás la celulosa se ha venido obteniendo principalmente de fuentes lignocelulósicas como la madera (dura y blanda), el algodón como celulosa pura y de otras fibras de ámbito industrial textil (lino, cáñamo, yute, etc.) (Sanjay et al., 2018). Cabe señalar que la madera es actualmente la fuente industrial de celulosa más importante, dentro de ellas hay dos clasificaciones la madera dura y blanda, que van depender de sus características anatómicas, de esta forma la madera dura también llamada latifoliada y conocidas por contener fibras cortas que las hacen más densas y difícilmente penetrables, es obtenida de árboles superiores como: eucaliptos, sauces, álamos, abedules, acacias, etc. Mientras que, la madera blanda va a contener fibras largas y se obtendrán principalmente de la familia de las coníferas de árboles como el pino, abeto, araucaria, etc. (Dufresne, 2012; Faruk & Sain, 2016).

La clasificación de las fibras lignocelulósicas naturales pueden variar, según la literatura, se ha reportado que pueden clasificarse en seis tipos básicos cuando se habla de celulosa de origen vegetal: fibras de líber (yute, lino, cáñamo, ramio y kenaf), fibras de hoja (abacá, sisal, piña), fibras de semilla (bonote, algodón y kapok), fibras del núcleo (kenaf, cáñamo, yute), hierbas y fibras de caña (trigo, maíz y arroz) y todas las demás (madera, raíces frutos, etc.) (Faruk, Bledzki, Fink, & Sain, 2012; Faruk & Sain, 2016). También podemos encontrar la siguiente clasificación que tiene una descripción más dirigida a la procedencia del material vegetal y el principal uso de las mismas, siendo así, fuentes primarias (fibras textiles o papel, madera para construcción, cultivos para obtención de bioetanol), fuentes secundarias; serán todos aquellos subproductos o residuos agroindustriales no procesados y terciarios; los

desechos del uso, transformación y conversión de la biomasa celulósica: pulpa, bagazo, residuos de alimentos, etc. (Adel et al., 2016; García et al., 2016; Keijsers, Yilmaz, & Van Dam, 2013). Sin embargo, aún falta darle ese valor agregado y llevar a la escala de la industrialización de los diferentes materiales lignocelulósicos, se ha encontrado que los principales usos de los residuos agrícolas y forestales son de bajo valor agregado, satisfaciendo solamente en las necesidades agrícolas (alimento de ganado, fertilización de suelo, entre otras), en el mejor de los casos y con las nuevas tendencias científicas y tecnológicas deberían ser considerados un fuente optima de celulosa, sostenible y renovable, ya que se encuentran en una amplia disponibilidad (Faruk et al., 2012; García et al., 2016; Kallel et al., 2016).

2.3 Composición de fibras lignocelulósicas

Con respecto, a los materiales ya mencionados como fuentes de celulosa van a tener en común los mismos constituyentes de sus estructuras, pero variando según el tipo de vegetal, así de esta forma, las células vegetales conformadas por paredes celulares que serán matrices extracitoplasmáticas la cual no será una simple membrana homogénea, sino tratándose de una estructura compleja de capas delgadas y gruesas que juegan un papel muy importante para mantener la forma y la rigidez de las diferentes plantas que en conjunto formaran las numerosas fibras lignocelulósicas (Abdul Khalil et al., 2016; Ng et al., 2015). Estas fibras van a poseer en su composición tres tipos de polímeros principalmente, es decir, celulosa, lignina y hemicelulosa (Abdul Khalil et al., 2016). Cabe señalar, que la composición y el contenido de estos tres polímeros va a variar debido a las diferentes especies vegetales, tipos y la fuente de las fibras lignocelulósicas (Cuadro 1) (Phanthong et al., 2018). Además, en estas fibras habrá otros componentes no estructurales como ceras, pectinas, sales inorgánicas y sales nitrogenadas (Ganapathy, Sathiskumar, SenthamaraiKannan, Saravanakumar, & Khan, 2019).

Cuadro 1. Composición química de diferentes fuentes de fibras lignocelulósicas.

Biomasa	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Cenizas (%)	Ceras (%)
Algodón	90	6	-	-	0.4
Caña de azúcar	69.4	21.1	4.4	0.6	5.5
Jute	60	22.1	15.9	1	-
Paja de arroz	59.1	18.4	5.3	13.7	6.3
Bagazo de Agave	45.5	19	18.7	6.8	-
Cascara de cebada	31.8	20.7	14.9	5.8	-
Hojas de piña	36.3	22.9	27.5	8.7	-
Fibras de aloe vera	60.2	14.2	13.7	-	1.5
<i>Coccinia grandis</i> .L	62.35	13.42	15.61	4.38	0.79
<i>Thespesia populnea</i>	70.12	12.64	16.34	1.80	0.76

Fuente: Espino et al., (2014); Kathirselvam, Kumaravel, Arthanarieswaran, & Saravanakumar, (2019); Senthamaraikannan & Kathiresan, (2018).

En este punto, hablaremos de algunas características principales de la lignina y la hemicelulosa, mientras que de la celulosa se trata una sección más adelante. La lignina va a representar aproximadamente 10-25% en peso de la biomasa lignocelulósica seca, va a ser un heteropolímero amorfo que consiste de tres unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil y sinapyl) que contienen grupos metoxilo en sus estructuras químicas y unidos por diferentes tipos de enlaces, favoreciendo esto a presentar un alto grado de variabilidad estructural que fomenta a que la degradación sea resistente (Dos Santos, Da Silva, Erdociaa, Gatto, & Labidi, 2015; Faruk & Sain, 2016; Kai et al., 2016). Así mismo, la lignina va a dar soporte estructural (rigidez) a la planta, impermeabilidad, dureza y resistencia contra ataques

microbianos y a la descomposición de las fibras. Es el segundo polímero natural más abundante en la tierra después de la celulosa (Faruk & Sain, 2016; Phanthong et al., 2018).

El tercer polímero la hemicelulosa que va a ser igualmente un heteropolímero compuesto por cadenas cortas, lineales y ramificadas constituidas por monómeros de pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (manosa, glucosa, galactosa, etc.), representa un 20-35% en la biomasa lignocelulósica (Dufresne, 2012; Phanthong et al., 2018; Zabed, Sahu, Boyce, & Faruq, 2016). Los tipos comunes de hemicelulosa son los xilanos y glucomananos, el xilano lo vamos a encontrar en la composición de las maderas duras, algunos cultivos agrícolas, mientras que el glucomanano presente principalmente en las maderas blandas (Peng & She, 2014). Este polímero se va adherir a las fibrillas de celulosa a través de puentes de hidrogeno e interacciones de Van der Waals, y el entrecruzamiento de enlaces con la lignina, de esta forma su inclusión se va a relacionar en dar más resistencia en la estructura de la pared celular de los vegetales (Peng & She, 2014; Phanthong et al., 2018). Además, es un polímero de peso molecular más bajo que la celulosa y su constitución de las ramificaciones con cadenas cortas de azúcares, lo hacen un compuesto fácilmente hidrolizable (Farhat et al., 2018).

2.4 Celulosa

La celulosa es el polímero natural y renovable más abundante sobre la tierra, es el componente básico de la estructura de las plantas, siendo aproximadamente el 40% de la materia vegetal (Dufresne, 2012; Mondal, 2017). Se obtiene básicamente por procesos de fotosíntesis de las plantas para sintetizar celulosa, polisacárido que consiste en un aproximado de 3000 unidades de glucosa y que se produce a razón de 1.5×10^{12} toneladas por año, aproximadamente (Klemm et al., 2018; Ruiz-Palomero, Soriano, & Valcárcel, 2017). Este biopolímero fue descubierto en el año de 1838 por Payen, quien le acuñó el nombre que hasta hoy en día se le conoce. Aunque, los trabajos experimentales en materia química para comprender su composición y estructura química tuvieron lugar entre los años 1920 a 1940 (Dufresne, 2012; Klemm, Heublein, Fink, & Bohn, 2005).

La celulosa es un polisacárido lineal que forma cadenas largas, que consiste de unidades repetidas de D-glucopiranosil- β -1,4-D-glucopiranososa (Figura 4), en estas cadenas encontraremos, grupos funcionales metilo e hidroxilos, debido a la ausencia de ramificaciones en las cadenas conlleva a poseer una estructura bien empaquetada u ordenada

(Hokkanen, Bhatnagar, & Sillanpää, 2016; Klemm et al., 2005). Lo que le dará la característica de ser un polímero semicristalino, por tener regiones cristalinas y amorfas (Figura 5) (Dufresne, 2012; Klemm et al., 2005).

La estructura va a contener dos tipos de grupos hidroxilo, el hidroxilo primario va a estar en el grupo metilo (-CH₂OH) en el C-6 y los hidroxilos secundarios (-OH) van a estar presentes en los C-3 y C-4, van a conferirle un carácter hidrofílico, por lo tanto la celulosa no se disuelve en agua y en disolventes comunes debido a los fuertes enlaces que existen por los puentes de Hidrogeno entre las cadenas de celulosa, así como también la presencia de las fuerzas de van der Waals, lo que conducen a la existencia de amplias regiones cristalinas (Hokkanen et al., 2016; Klemm et al., 2005; Phanthong et al., 2018).

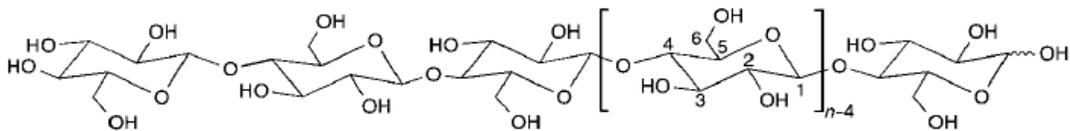


Figura 4. Estructura de la cadena de celulosa

El grado de cristalinidad (cantidad relativa de zonas altamente ordenadas) depende de la materia prima, de los pre-tratamientos sufridos por la muestra y de los procesos de aislamiento empleados en la producción de la misma (Figura 5) (Faruk et al., 2012). Debido a la orientación de las moléculas de glucosa y las redes por los puentes de Hidrogeno, va a resultar en el polimorfismo de la celulosa, los cuales dependerán de la fuente de la biomasa lignocelulósica y del método de tratamiento (Dufresne, 2012; Klemm et al., 2005; Phanthong et al., 2018). Como resultado, existe en varias modificaciones cristalinas, que difieren en las dimensiones de la unidad de célula y, posiblemente, en la polaridad de la cadena. Las posibles transiciones entre los diferentes polimorfos de celulosa (Klemm et al., 2005), existen cuatro tipos polimorfos de celulosa: I, II, III y IV; que pueden interconvertirse (Figura 6). La celulosa I, también llamada celulosa nativa debido a que es la forma encontrada en la naturaleza, es una mezcla de fases (I α y I β) dependiendo de su origen; I α se produce en algas y bacterias, y la I β es el componente principal de plantas superiores y tunicados (Dufresne, 2012).

La celulosa II, celulosa regenerada, se obtiene por mercerización con hidróxido de sodio acuoso de la celulosa I. La mayor diferencia entre estas dos formas de celulosa es el acomodo de sus átomos, ya que la celulosa II tiene empaquetado antiparalelo mientras que la celulosa I tiene dirección paralela. Al tratar la celulosa con amoníaco líquido o con ciertas aminas permite la preparación de la celulosa III formando dos alomorfos, si se parte de celulosa I (III_I) o de celulosa II (III_{II}). El tratamiento de celulosa III con glicerol a alta temperatura forma la celulosa IV dependiendo si se parte de celulosa III_I formando celulosa IV_I o de celulosa III_{II} formando IV_{II} (Dufresne, 2012; Klemm et al., 2005; Phanthong et al., 2018).

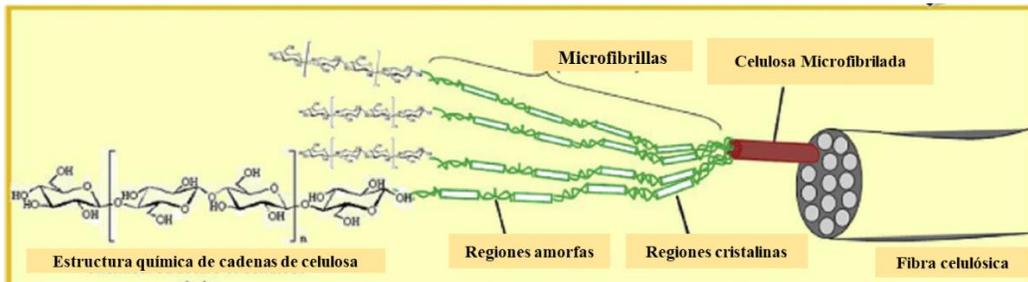


Figura 5. Representación esquemática de las zonas amorfas y cristalinas en cadenas de celulosa.

Fuente: adaptado de: Ng et al. (2015).

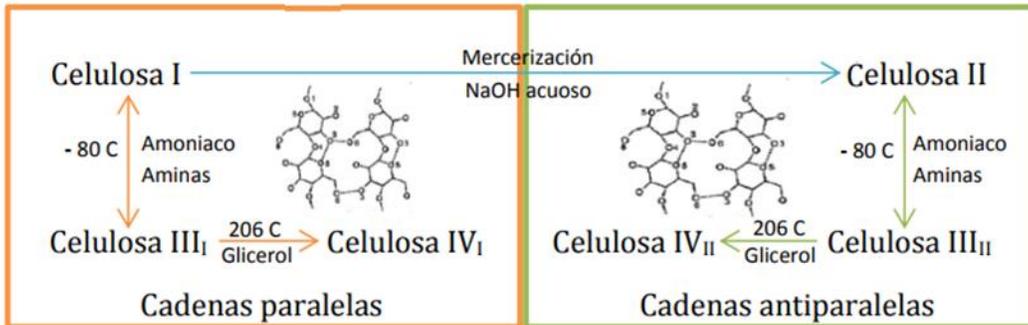


Figura 6. Interconversiones del polimorfismo de la celulosa.

Fuente: adaptado de: Dufresne, (2012).

2.5 Aplicaciones de celulosa

Actualmente, la celulosa en sus presentaciones como celulosa microcristalina o en tamaño nano como nanocelulosa, debido a sus características prometedoras y sus exitosas

aplicaciones en el campo de nanotecnología, se ha comercializado rápidamente en todo el mundo, gracias a sus diferentes propiedades de baja densidad, no tóxica, alta resistencia, transparencia, amigable con el ambiente por ser biodegradable, su dimensión micrométrica y nanométrica le permite tener mayor área de superficie, por lo tanto puede tener una gran interfaz en las matrices con otros polímeros. Las principales aplicaciones se han llevado a cabo en el reforzamiento de materiales del área médica, envases y embalajes, industria del papel, electrónica y membranas o como biomasa para la biorefinería, entre otras industrias (Klemm et al., 2005; Lei & Feng, 2020; Mondal, 2017; Ruiz-Palomero et al., 2017).

El uso de este material de bajo costo, renovable y biodegradable contribuye a la sostenibilidad ambiental al reducir los índices de contaminación de desechos no biodegradables y los balances de gases de efecto invernadero. El papel como reforzamiento de composites y nanocomposites es principalmente proporcionar rigidez y resistencia. Además, de beneficiar en otras propiedades como la resistencia al calor o conducción y la corrosión. En los últimos años, se ha experimentado con biopelículas con la incorporación de nanocelulosa, proporcionando buenas propiedades de barrera para materiales líquidos y gaseosos, que se encuentran en correlación o dependen de la morfología de la nanocelulosa. La morfología de las fibrillas mejora la penetración y la longitud de difusión, lo que mejora los atributos de barrera de la biopelícula (Bai et al., 2015; Xu et al., 2017; Misra et al., 2018).

Con respecto, al uso de la celulosa o nanocelulosa en la industria alimentaria se ha utilizado por su elevada área de superficie y relación de aspecto, buen comportamiento reológico, absorción de agua y la ausencia de propiedades citotóxicas y genotóxicas que facilitan su uso en aplicaciones alimentarias (Szakal et al., 2014; Gómez et al., 2016). Se ha reportado su utilización como agente estabilizador (emulsiones), como un ingrediente alimentario funcional (como fibra dietética y reducción de valor calórico de alimentos) y en envases alimentarios, siendo esta última donde se destacan más investigaciones (Andrade et al., 2015; Gómez et al., 2016).

2.6 Técnicas de microscopía y espectroscopia aplicadas a la caracterización de materiales lignocelulósicos

Actualmente, existen diversidad de trabajos en los que se ha tenido como objetivo la caracterización fisicoquímica y estructural de nuevas fuentes de fibras vegetales que sean

aprovechadas como una fuente alternativa para la producción de biomateriales como celulosa, hemicelulosa o lignina. Sin embargo, la gran diversidad de materias primas son diferentes tanto en características físicas, composición química y su arquitectura celular o microestructural, que es todo un reto para llegar a determinar si una fibra vegetal es idónea y cumple con las características y propiedades deseables para considerarla como una fuente alternativa de compuestos útiles en las diferentes industrias para la producción principalmente de celulosa o lignina.

Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estas investigaciones, comenzando con la caracterización fisicoquímica de la materia prima, evaluando propiedades físicas (largo, diámetro, densidad, etc.), composición química (celulosa, hemicelulosa, lignina, ceras y cenizas), las cuales van a depender de diferentes factores como el tipo de fuente vegetal, la temporada, región geográfica, edad o madurez de la planta, entre otros factores (Binoj et al., 2016; Kathirselvam et al., 2019). Además, otras herramientas indispensables para la evaluación de los diferentes materiales vegetales son las técnicas de microscopia y el análisis de imagen para evaluar la morfología y arquitectura celular, como el uso de microscopia óptica o de luz (MO), microscopia electrónica ya sea de barrido o transmisión (SEM y TEM por sus siglas en ingles), microscopia confocal de barrido laser (CLSM, por sus siglas en ingles), así como el uso de espectroscopias para evaluar cambios estructurales como la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en ingles), difracción de rayos X (DRX) y otras técnicas complementarias como la microscopia de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en ingles) y la microindentación para evaluar propiedades mecánicas y morfológicas principalmente. Estas técnicas de microscopia y espectroscopia serán explicadas brevemente en los siguientes párrafos para su mejor entendimiento sobre su aplicación en los diferentes materiales lignocelulósicos.

La microscopia de luz u óptica es una de las herramientas para la visualización general y rápida de las muestras, son de los instrumentos más utilizados para una observación de las estructuras hasta la escala de unos cuantos micrómetros, pero debido a su distancia focal permite la visualización de muestras de gran tamaño, diferente a otras técnicas microscópicas (Hoppert, 2003). Otra ventaja que se ha tenido sobre esta técnica, es que la preparación de muestras es rápida y no hay grandes alteraciones de estas. Y debido al uso de luz visible

como medio de imagen tampoco induce a cambios en la muestra. Así como la diversidad de tinciones para tener un mejor panorama estructural de las muestras. Otro dato importante es que estos equipos dan buena estabilidad mecánica, permitiendo su funcionamiento en condiciones ambientales variables y su fácil operación (Hoppert, 2003; Perea-Flores et al., 2011). El uso de la microscopía de luz en la caracterización de materias primas lignocelulósicas ha sido importante como una primera visualización de la morfología y arquitectura celular de estos materiales como es el caso de fibras de agave (Figura 7 a-b) donde Hernández-Hernández et al. (2014) reportaron el uso de la microscopía de luz para realizar la evaluación de la reducción del grosor de las fibras después de un proceso de pulpeo, realizando las mediciones mediante el análisis de imagen, también mencionan que fue una técnica útil para esta evaluación proporcionando información importante sobre la morfología de las fibras después del proceso de deslignificación. Además, esta técnica de microscopía se ha aplicado en otras fuentes vegetales como *Thespesia populnea* (Kathirselvam et al., 2019) (Figura 7 c-d), fibras de cáscara de fruta de *Areca Catechu L.* (Binoj et al., 2016), semillas de *Ricinus communis* (Perea-Flores et al., 2011), por mencionar algunas.

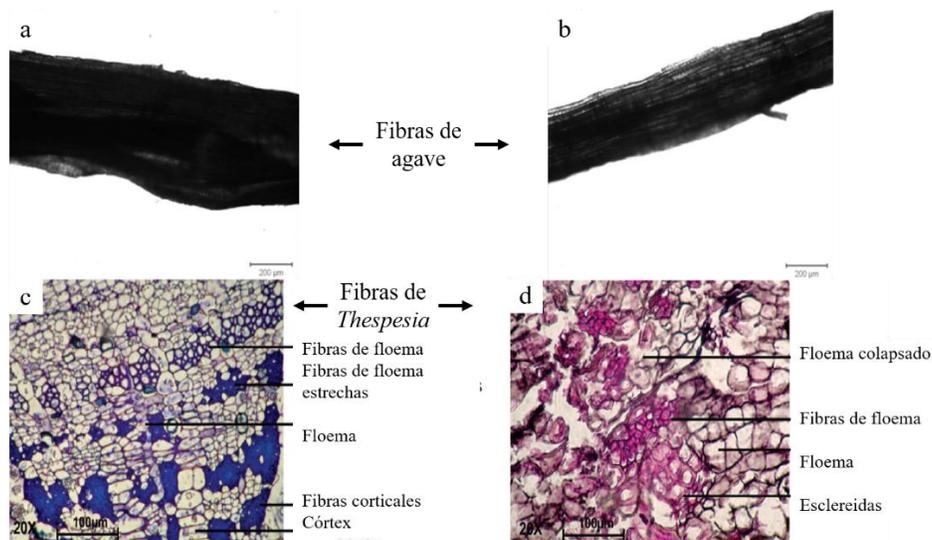


Figura 7. Imágenes de microscopía de luz de fibras de agave y *Thespesia populnea*.

Fuente: adaptado de: Hernández-Hernández et al. (2014) y Kathirselvam et al. (2019).

Con respecto, a la microscopía electrónica se encuentran dos importantes sistemas que proporcionaran de igual manera datos morfológicos y analíticos, o hasta la ultra estructura y mapeo elemental de las muestras (Perea-Flores, 2011). Estos sistemas son la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en ingles) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en ingles), describiremos brevemente algunas características solamente del SEM, este equipo constara de una columna donde se generaran los haz de electrones, la cámara donde el haz interaccionara con la muestra y su sistema de detectores que colectaran las diferentes señales del barrido realizado a la muestra para posteriormente con el sistema de visión del equipo se construya la imagen a partir de las señales (Cárdenas-Pérez, 2016). En SEM las muestras requieren de una preparación especial como un buen secado de estas, el equipo trabaja a alto vacío y las muestras deben ser cubiertas con medios conductivos como oro o carbono para su mejor conductividad. El equipo opera entre 1 kV y 30 kV para emitir los haces de electrones ya sean primarios o secundarios para caracterizar las topografías de las estructuras de las muestras, rasgos de la morfología de forma y tamaño de las estructuras, así como sus componentes inmersos en las matrices celulares. El haz de electrones puede interaccionar con los átomos de las muestras, generando rayos X característicos, los cuales ayudan a la identificación y cuantificación de elementos químicos en las muestras, esto a través del detector conocido como espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS, por sus siglas en inglés) (Cárdenas-Pérez, 2016; Hoppert, 2003; Perea-Flores, 2011).

El uso de la microscopía electrónica de barrido se ha utilizado principalmente para visualizar las diferentes morfologías y estructuras de muestras de diferentes fuentes vegetales y fibras lignocelulósicas como: fibras de agave (Hernández-Hernández et al., 2014), fibras de *Juncus effusus* L. (Maache et al., 2017) (Figura 8 a-b), espinas de nopal (Marin-Bustamante et al., 2018), fibras de *Agave tequilana* (Espino et al., 2014) (Figura 8 c-d), *Ficus religiosa* (Moshi et al., 2020), *Saccharum spontaneum* (Devnani & Sinha, 2019), *Thespesia populnea* (Kathirselvam et al., 2019), entre otras.

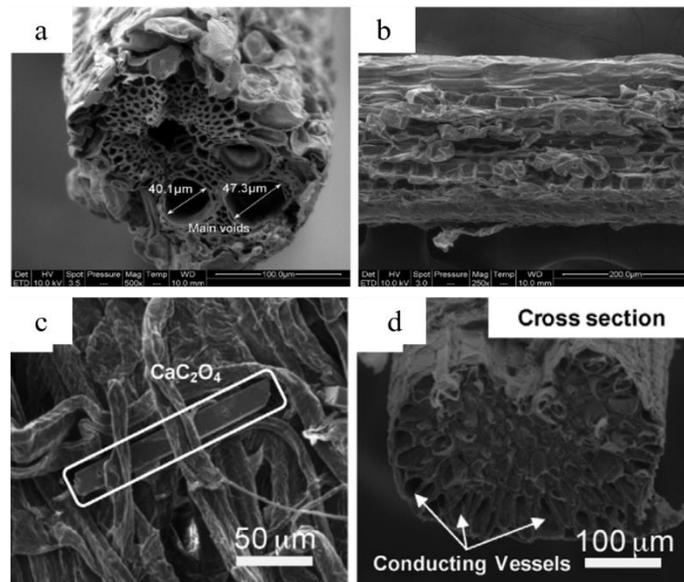


Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de fibras de *Juncus effusus* L. (a y b) y *Agave tequilana* (c y d).

Fuente: adaptado de: Maache et al. (2017) y Espino et al. (2014).

Una de las técnicas de microscopía para identificar y caracterizar la distribución de componentes específicos de la composición química de materiales biológicos en este caso componentes lignocelulósicos se ha utilizado la microscopía confocal de barrido laser (CLSM, por sus siglas en inglés). Se fundamenta principalmente en la utilización de una fuente de luz que consta de varios laser cubriendo las longitudes de onda del espectro visible (400-700 nm), aprovechando la autofluorescencia o el marcaje de las muestras mediante fluorocromos selectivos para cada componente en especial a visualizar (Cárdenas-Pérez, 2016; Perea-Flores et al., 2011). La fluorescencia es la propiedad que tienen cierto tipo de moléculas de absorber luz a una determinada longitud de onda y emitir esta luz a una longitud de onda mayor. Algunas muestras emiten esta fluorescencia de forma natural al incidir un rayo de luz específica a lo que se le llama autofluorescencia, algunos ejemplos de compuestos son las clorofilas, lignina, etc. Sin embargo, algunas muestras deben ser teñidas o marcadas con compuestos llamados fluorocromos. Mediante este equipo podemos obtener información de diferentes planos focales creando imágenes en 2 y 3 dimensiones, así como observaciones en tiempo real (Cárdenas-Pérez, 2016; Hernández-Hernández et al., 2014).

Algunos de los trabajos donde se ha utilizado CLSM, ha sido para observar el proceso de deslignificación de las fibras de agave para la obtención de celulosa (Hernández-Hernández et al., 2014) (Figura 9 a-b), visualizar la estructura y distribución de compuestos químicos en materiales como semillas de *Ricinus communis* (Perea-Flores et al., 2011) (Figura 9 c-d), distribución de celulosa-hemicelulosa y lignina de las estructuras de espinas de nopal (Marin-Bustamante et al., 2018), cambios en la microestructura de las paredes celulares de madera (Jiang, Wang, Zhang, & Wolcott, 2017), entre otros estudios.

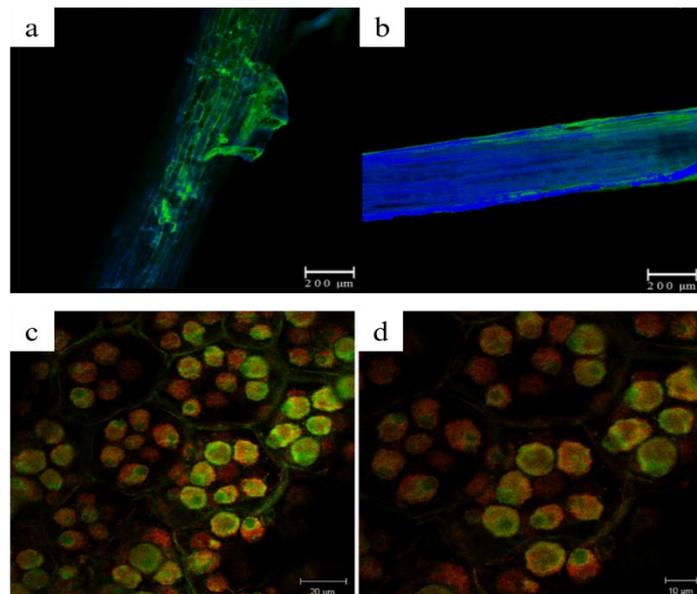


Figura 9. Imágenes de microscopia confocal de barrido laser de fibras de agave (a y b) fluorescencia en color azul de celulosa y en color verde la lignina. Autofluorescencia de estructuras de células del endospermo de semillas de *Ricinus communis* (c y d).

Fuente: adaptado de: Hernández-Hernández et al. (2014) y Perea-Flores et al. (2011).

Además, de las microscopias ya mencionadas las investigaciones de nuevas fuentes de biopolímeros se han apoyado en la utilización de otras técnicas como la microscopia de fuerza atómica (AFM) y la microindentación, estos instrumentos se han utilizado principalmente para realizar mediciones de propiedades mecánicas a escala micrométrica y nanométrica (Oliver & Pharr, 1992). Evaluando propiedades de los biomateriales como su dureza (H), módulo de Young (E) (Barrera, Méndez-Méndez, Arzate-Vázquez, Calderón-Domínguez, & Ribotta, 2019; Marin-Bustamante et al., 2018). Además, con el AFM podemos obtener imágenes de altura y determinar parámetros cuantitativos de la rugosidad

de la superficie a través de parámetros de altura, la rugosidad media (Ra) y la raíz cuadrada de rugosidad (Rq) (Barrera *et al.*, 2013). Algunos trabajos donde se han reportado el uso de estas técnicas son en evaluaciones de propiedades mecánicas y la microestructura de espina de nopal (Marin-Bustamante *et al.*, 2018), propiedades mecánicas en cáscara de nuez (Nicolás-Bermúdez *et al.*, 2018), la rugosidad en fibras de *Saccharum spontaneum* (Devnani & Sinha, 2019) y *Ficus religiosa* (Moshi *et al.*, 2020), etc.

Algunas de las imágenes de microscopía pudieran analizarse por medio de técnicas de procesamiento de imágenes; y de este modo se obtienen las características físicas (tamaño y morfología) y propiedades de superficie (rugosidad y heterogeneidad). Descriptores de análisis de imágenes, tales como la dimensión fractal, que proporcionan un parámetro numérico de la morfología y la textura de los objetos con estructuras complejas e irregulares, y los parámetros fractales se han aplicado para explicar los cambios en la estructura de los materiales durante o como consecuencia de su procesamiento, así como también factores de forma y tamaño (área, perímetro, diámetro de Feret, relación de aspecto, circularidad o redondez) muy utilizados para describir las diferentes estructuras celulares de muestras biológicas (Pérez-Nieto *et al.*, 2009; Perea-Flores *et al.*, 2011). Por lo tanto, cuando las técnicas de microscopía y análisis de imágenes se usan juntos, se convierten en una herramienta aún más poderosa para evaluar la microestructura y los efectos inducidos por el procesamiento de los biomateriales (Barrera *et al.*, 2013).

Finalmente, existen otras técnicas complementarias para realizar una caracterización más completa y poder evaluar los cambios estructurales de composición de las diferentes muestras al haberles realizado todo un procesamiento de tratamientos físicos y químicos o evaluar la purificación de las mismas. Dentro de estas técnicas mencionaremos espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman y difracción de rayos X (DRX). FTIR y Raman son técnicas no destructivas, que se basan en especificidades moleculares en la vibración de los diferentes grupos funcionales que componen a la muestra en análisis y generando los espectros correspondientes, para evaluar los cambios químicos en las muestras (Perea-Flores, 2011). Mientras que el uso de difracción de rayos X evalúa la cristalinidad de las diferentes muestras (Segal, Creely, Martin, & Conrad, 1959).

3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la búsqueda de nuevas fuentes alternativas para el aprovechamiento de biopolímeros como celulosa y lignina principalmente esta en incremento cada año, estos compuestos se encuentran principalmente en la composición química de las paredes celulares de las diferentes plantas vegetales, presentes en raíces, tallos o troncos, ramas, hojas, flores y frutos. En este sentido, los frutos de *Parmentiera edulis* al poseer la característica de ser frutos muy fibrosos y no tener un aprovechamiento de este material lignocelulósico, lo coloca como una fuente importante para ser considerado como una fuente alternativa de producción de celulosa o lignina. Además, en este tipo de materias primas es importante conocer las diferentes características físicas, composición química y la arquitectura celular o microestructural, así como propiedades mecánicas o la cristalinidad de los productos resultantes.

Sin embargo, la información sobre *P. edulis* es escasa y limitándose a caracterizaciones fisicoquímicas parciales o su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de algunos padecimientos. Por tal motivo, en el presente trabajo se pretende generar nuevos conocimientos sobre estos frutos, llevando acabo una evaluación más completa, realizando la caracterización fisicoquímica y microestructural de los frutos en diferentes estados de maduración que proporcionaran información valiosa sobre el potencial de esta materia prima como fuente de compuestos lignocelulósicos. De esta manera, la información será útil para determinar las características y propiedades de las fibras lignocelulósicas, así como la aplicación de un proceso de obtención de celulosa evaluando sus características fisicoquímicas, morfológicas y estructurales, para determinar su uso en aplicaciones futuras. De este modo, los hallazgos sobre el potencial de estas fibras lignocelulósicas de estos frutos, generan un valor agregado para este cultivo y promueven el cultivo extensivo de la planta de *P. edulis*. Así como el uso del biopolímero de celulosa para aplicaciones futuras, como la obtención de productos como celulosa microcristalina o nanocelulosa la cual por sus diferentes características y propiedades se ha aplicado principalmente en el reforzamiento de materiales compuestos. Contribuyendo en el uso de materiales de bajo costo, procedentes de fuentes renovables y biodegradables que contribuyen en la sostenibilidad del medio ambiente.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades fisicoquímicas y características microestructurales de frutos y microfibras de celulosa de *Parmentiera edulis* mediante técnicas de microscopía y espectroscopía para conocer la arquitectura celular, así como sus propiedades fisicoquímicas y micromecánicas para futuras aplicaciones.

4.2 Objetivos específicos

- Analizar fisicoquímicamente los frutos de *Parmentiera edulis* en dos etapas de maduración para conocer sus propiedades físicas y composición químico proximal.
- Caracterizar microestructuralmente los frutos de *Parmentiera edulis* en dos etapas de maduración mediante técnicas de microscopía y análisis de imagen para conocer la arquitectura celular.
- Determinar el proceso de extracción de fibras lignocelulósicas de frutos de *Parmentiera edulis* a través de técnicas químico-mecánicas para la obtención de microfibras simples de celulosa.
- Caracterizar las fibras nativas y microfibras simples de celulosa de frutos de *Parmentiera edulis* por medio de técnicas de microscopía y espectroscopía para conocer la microestructura, así como sus propiedades fisicoquímicas y micromecánicas.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materia prima.

Los frutos de cuajilote se cosecharon de árboles en los potreros privados del municipio de Venustiano Carranza, Puebla, México (20° 30' 18.72" de latitud N, 97° 40' 8.04" de longitud W y una elevación promedio de 136 m con el punto más alto 500 msnm). Los frutos se recolectaron manualmente de aproximadamente 15 árboles en función de su etapa de madurez a través de la percepción visual del color con la ayuda de la experiencia personal de los agricultores durante los meses de verano de junio y agosto de 2018. Se evaluaron un total de 30 frutos para cada etapa de madurez, con frutos que tenían un color verde clasificado como inmaduro (cinco semanas después de la antesis) y frutos amarillos clasificados como maduros (6-7 semanas después de la antesis), (Angón-Galván, 2006).

5.2 Caracterización fisicoquímica de los frutos

Se evaluaron el peso fresco, el diámetro, la longitud y el color de la cáscara de las frutas. El peso se midió en una balanza digital (OHAUS Model Scout Pro SP2001, E.U.A.). El diámetro del fruto se midió en la parte ecuatorial del fruto con un calibrador vernier (Neiko 01407A, E.U.A.) y la longitud se midió desde los extremos apical y basal del fruto con una cinta métrica (Magalhães et al., 2019). El color de la piel se determinó utilizando un espectrofotómetro (Minolta CM-508d), utilizando el espacio de color CIE L*a*b* (iluminante D65 y ángulo estándar de 10°). Las diferencias de color (ΔE) se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

Donde $\Delta L^* = L^* - L_0^*$; $\Delta a^* = a^* - a_0^*$; $\Delta b^* = b^* - b_0^*$; color inicial del parámetro (L_0^* , a_0^* and b_0^*) corresponden a los valores obtenidos de frutos inmaduros (Arzate-Vázquez et al., 2011). Además, se obtuvieron Chroma (C^*) y el ángulo Hue (h^*) con $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ y $h^* = \tan^{-1} b^*/a^*$ (Sun, Singh, Tokala, & Heather, 2019).

Se obtuvieron sólidos solubles totales (TSS), firmeza (F) y acidez titulable (TA) para evaluar la etapa de maduración de las frutas. Para TSS se utilizó un refractómetro digital (PR-101ATAGO PALETTE, E.U.A.), de acuerdo con el método 932.12 (AOAC, 1995). El

método AOAC, (1995) 942.15 se usó para determinar TA, expresando el valor obtenido como % de ácido cítrico (usando el factor miliequivalente de 0.064). La firmeza de las frutas se midió usando un texturómetro (CT3 Brookfield, E.U.A.) equipado con una celda de carga de 10 kg, velocidad constante de 0.5 mm/s, una carga de activación de 0.01 N, usando la sonda TA39 para la penetración. Se evaluaron seis puntos diferentes en la fruta, con una profundidad de penetración máxima de 9 mm (De Oliveira Alves Sena et al., 2019). El índice de maduración (RPI) de los frutos se calculó utilizando la ecuación 2. El RPI se usa generalmente para evaluar la etapa de madurez de las frutas (Vélez-Rivera et al., 2014) y, por lo tanto, este parámetro se usó como referencia para indicar la etapa de maduración del cuajilote.

$$RPI = \ln \left(100 \times F \times \frac{TA}{TSS} \right) \quad (2)$$

Además, los métodos AOAC (AOAC, 2007) se utilizaron para complementar la caracterización química de los frutos en ambas etapas de madurez: humedad: (920.36, 2007), cenizas: (942.05, 2007), extracto etéreo: método soxhlet (954.02, 2007), fibra cruda: (991.43, 2007), proteína (N x 6.25) por el método Kjeldahl (954.01, 2007) y carbohidratos se calcularon por las diferencias porcentuales. Se utilizaron los métodos de la Asociación Técnica de la Industria de la Pulpa y el Papel (TAPPI, 2002), para evaluar celulosa, hemicelulosa (T257 om-09) y lignina de Klason (T222 om-11). Todas las determinaciones se obtuvieron de 4 repeticiones de 5 frutas para cada etapa de madurez, excepto la firmeza y el color que se obtuvieron de 6 repeticiones.

5.3 Caracterización microestructural de los frutos

5.3.1 Microscopía óptica o de luz (MO)

Para la microscopía óptica (MO), se seccionaron tres frutas para cada etapa de madurez de manera transversal y longitudinal en cubos de aproximadamente 1.0 cm, ubicados en las regiones de exocarpio, mesocarpio y endocarpio. Estos cubos se prepararon para su corte histológico utilizando la técnica de parafina (Raman et al., 2018), utilizando un centro de inclusión de tejidos (KD-BM II, Kedee, China) y se cortaron secciones con un micrótopo (RM 2235, Leica, Alemania). Las secciones se colocaron en un baño de agua con gelatina histológica para la adhesión del tejido en los portaobjetos de vidrio. Se eliminó la parafina,

primero a 58 °C durante 48 h, luego con xilol (100%) y las muestras se hidrataron en una serie de etanol (96, 70 y 25%) durante 20 min. Luego, las secciones se tiñeron con reactivo de Schiff y se usó azul de toluidina (0,5%) para proporcionar evidencia de los polisacáridos y compuestos lignocelulósicos, respectivamente, en la microestructura en general (Casoti, Manfron, & de Oliveira, 2016). Después, las secciones se montaron en los portaobjetos de vidrio con una gota de medio de montaje Entellan y finalmente las muestras se visualizaron con un microscopio óptico (Eclipse Ti-U, Nikon, Japón).

5.3.2 Microscopía confocal de barrido laser (CLSM)

Se observaron cortes de secciones transversales (1 mm de grosor) de frutas inmaduras y maduras, explorando el exocarpio, el mesocarpio y el endocarpio con un microscopio confocal de barrido láser (CLSM, por sus siglas en inglés, LSM 710 NLO, Carl Zeiss, Alemania). Las muestras se tiñeron con una solución blanca M2R de calcofluor (0,05%) durante 30 segundos y luego se lavaron durante 5 minutos para evidenciar celulosa-hemicelulosa. La lignina y los pigmentos fotosintéticos (clorofilas) se monitorearon aprovechando la autofluorescencia de estos compuestos. Las longitudes de onda de excitación utilizadas fueron 488 nm para lignina, 405 nm para la celulosa-hemicelulosa y clorofilas (Hilda M. Hernández-Hernández et al., 2014). En el caso de las fibras nativas, la tinción se realizó utilizando un método similar con calcofluor durante 5 minutos para celulosa-hemicelulosa, mientras que, para lignina, se usó safranina al 0,01% durante 1 minuto y luego se lavó con agua destilada (Bond, Donaldson, Hill, & Hitchcock, 2008). El modo de exploración se estableció en planos espectrales, generando automáticamente la separación de los canales según lo reportado por Hernández-Hernández et al., (2014). Las imágenes fueron adquiridas por el software ZEN (Carl Zeiss, Alemania), en 8 bits, color RGB y almacenadas en formato TIFF a 1024 × 1024 píxeles.

5.3.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

Para la caracterización microestructural mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM, por sus siglas en inglés), se obtuvieron cubos de 1,0 cm de áreas del exocarpio, mesocarpio y endocarpio en ambas etapas de madurez y se fijaron en glutaraldehído-formaldehído (4% y 2,5% en fosfato- solución salina tamponada) durante 72 h. Posteriormente, la deshidratación se realizó con una serie de etanol (30 a 100%) durante

40 minutos cada uno y un punto crítico de secado (Quorum, K850, Reino Unido). Las muestras se montaron en portamuestras de aluminio, colocándolas en cinta de carbono de doble cara y se recubrieron con carbono en un pulverizador catódico con una capa de recubrimiento de carbono (SPI Supplies, E.U.A.) y luego se observaron en un FE-SEM (JEOL, JSM-7800F, Japón) a 20 kV utilizando un detector de electrones retrodispersados (BED). El análisis de imagen se realizó utilizando el software ImageJ 1.52a (National Institutes of Health, E.U.A.), para obtener parámetros de tamaño y forma como área, perímetro, diámetro de Feret, relación de aspecto (AR) y redondez para cada tipo de célula en las diferentes regiones de la fruta (exocarpio, colénquima, mesocarpio y fibras de esclerénquima) realizando el análisis de aproximadamente 300 células para cada región (M. J. Perea-Flores et al., 2011).

5.4 Aislamiento de fibras lignocelulósicas

Los frutos de cuajilote en etapas inmaduras y maduras se seccionaron longitudinalmente, eliminando el endocarpio y después se procesaron en una máquina despulpadora de frutas (JERSA, México) para obtener solo las fibras lignocelulósicas. Posteriormente, las fibras se secaron a 50 °C en un horno durante 24 h y se molieron en un molino mecánico (GRINDER multifunción de alta velocidad, HC-2000Y, China). Finalmente, las fibras se tamizaron para obtener tamaños homogéneos en una malla 20 (estándares de E.U.A.).

5.5 Tratamiento alcalino y aislamiento de microfibras de celulosa

Las fibras nativas previamente extraídas y molidas se lavaron en agua caliente (80 °C durante 3 h), con el objetivo de eliminar la suciedad y parte de los polisacáridos solubles en agua, luego se filtraron y se secaron en un horno a 50 °C durante 24 h (Szymanska-Chargot et al., 2017). Posteriormente, las fibras se desgrasaron por reflujo con etanol-tolueno en un aparato Soxhlet durante 6 h. El tratamiento alcalino de las fibras se realizó con una solución de NaOH al 5% durante 2 h a 80 °C, esta etapa se repitió dos veces. Las fibras se filtraron y neutralizaron con agua destilada y se secaron a 50 °C durante 24 h (Vijay et al., 2019). Este tratamiento alcalino tiene el propósito de purificar la fibra al eliminar la hemicelulosa y parte de la lignina. El último paso fue blanquear las fibras pretratadas a través del método convencional de clorito, según lo reportado por Siqueira, Oksman, Tadokoro, & Mathew,

(2016), utilizando NaClO_2 (1.7%) en un tampón acético (pH 4.5) a 80 °C por 2 h. Después del blanqueo, los materiales se lavaron con agua destilada hasta que se alcanzó un pH neutro.

Las muestras obtenidas del anterior proceso fueron etiquetadas como fibras nativas, fibras con tratamiento alcalino y microfibras simples de celulosa, para determinar su composición química y ser analizadas con diferentes técnicas de microscopía y espectroscopía.

5.6 Caracterización de fibras y microfibras de celulosa

5.6.1 Composición química y morfología

La composición química de las fibras nativas se determinó de acuerdo con la Asociación Técnica de la Industria de la Pulpa y el Papel (TAPPI, 2002), para evaluar el contenido de cenizas (T211 om-85), extractos (T207 cm-08), celulosa y hemicelulosa (T257 om-09) y lignina de Klason (T222 om-11). Todas las determinaciones se obtuvieron por triplicado.

La morfología de las muestras de fibras nativas, fibras con tratamiento alcalino y microfibras simples de celulosa se realizó a través de FE-SEM y CLSM de acuerdo a las características de la técnica mencionada en el apartado 5.3.

5.6.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de fibras no tratadas y tratadas se realizaron utilizando un FTIR acoplado a un espectrómetro Micro-raman (T64000, Horiba Scientific, E.U.A). Para el análisis, las muestras se molieron finamente y se colocaron en un portamuestras de cristal. Los espectros FTIR se registraron en el rango de 4000-400 cm^{-1} (a temperatura ambiente) y las mediciones se realizaron por triplicado.

5.6.3 Difracción de rayos X (DRX)

El análisis DRX de las muestras de fibra nativa de fruto inmaduro y maduro, así como también de las muestras obtenidas por el tratamiento alcalino y las microfibras simples de celulosa se realizó con un difractómetro (Rikagu MiniFlex 600, Tokio, Japón). Las mediciones se realizaron entre 10° y 70° (2 θ), 0.01° a 3 s/paso, fuente de radiación de $\text{CuK}\alpha$, 15 mA y 40 kV. El índice de cristalinidad (IC) se estimó utilizando el método descrito por Segal, Creely, Martin, & Conrad, (1959), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$CI \% = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad (3)$$

Donde I_{002} es la intensidad máxima en 002 de la red de difracción a $2\theta = 22^\circ$ and I_{am} es la intensidad de los componentes amorfos a $2\theta = 18^\circ$.

5.6.4 Nanoindentación de fibras nativas

Se prepararon fibras de frutos de cuajilote inmaduro y maduro para evaluar sus propiedades micromecánicas de secciones transversales y longitudinales, como lo reportado por Marin-Bustamante et al. (2018). Se obtuvieron las propiedades micromecánicas con un nanoindentador (TTXNHT, CSM Instruments, Suiza) con un penetrador de diamante Berkovich equipado con un microscopio óptico (Olympus, Japón con lentes objetivo de 5x y 100x) que obtuvo imágenes de las impresiones residuales de indentación (IRI). Las mediciones se realizaron utilizando una carga máxima de 10.0 mN, velocidad de carga y descarga de 20 mN / min con pausas de 10 s. Las curvas de nanoindentación se analizaron con el software de indentación v4.16 (CSM Instruments) provisto con el equipo para obtener la dureza (H) y el módulo elástico (E) de las fibras (Oliver & Pharr, 1992).

5.6.5 Nanoindentación con microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los cambios en las propiedades micromecánicas y la rugosidad de la superficie de las muestras de fibra nativa, fibra con tratamiento alcalino y microfibras de celulosa fueron evaluadas utilizando un microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés, Bioscope Catalyst ScanAsyst, Bruker, E.U.A.). Las muestras para indentación se seleccionaron aleatoriamente con características homogéneas y se colocaron longitudinalmente sobre un portamuestras de cristal equipado con cinta doble cara. La indentación se llevó a cabo utilizando sondas NP-10 (Bruker, <http://www.brukerafmprobes.com>) que contenían una viga voladiza en forma de V con punta en geometría piramidal de 20 nm de radio para realizar las pruebas. La calibración del cantiléver fue repetida tres veces y el promedio del rango constante del resorte (k) fue 285.85 N/m. La calibración fue realizada sobre la superficie de un portaobjetos de vidrio, considerando la indentación (δ) de este material como cero. Para realizar las mediciones del módulo de Young (E) de las muestras, matrices de 15 x 15 fueron indentadas, utilizando el método “point and shoot” de acuerdo a lo reportado por Nicolás-Álvarez et al. (2019). El promedio de la calibración de sensibilidad a la deflexión fue de 46.44 nm/v. La nanoindentación fue calculada utilizando curvas de fuerza de acuerdo a la ecuación (4):

$$\text{indentacion } (\delta) = Z - d \quad (4)$$

Donde δ es la indentación, Z es el movimiento (z-dirección), y d es la deflección inicial del cantiléver. Después, la gráfica de fuerza (nN) versus indentación (nm) se utilizó para determinar el módulo de Young (E) usando el modelo de Hertz-Sneddon de acuerdo a la ecuación (5):

$$F = \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1-\nu^2)} \tan(\alpha) \delta^2 \quad (5)$$

Dónde F corresponde a la fuerza, E es el módulo de Young de la muestra, ν es la constante de Poisson, α es el ángulo medio del nanoindentador y δ corresponde a la distancia de indentación (nm).

Para obtener el E de cada muestra de fibras no tratadas y tratadas, las curvas de fuerza se analizaron utilizando el software de análisis NanoScope v1.4 (Bruker, USA, 2018). El E se calculó usando el 90% de la curva en el modelo de Hertz-Sneddon donde se mostró el mejor ajuste. Los valores fueron obtenidos de 600 curvas de fuerza analizadas y representando los valores en los rangos obtenidos para observar la distribución del E .

5.7 Análisis estadístico

Para todos los resultados, se calculó el promedio aritmético y la desviación estándar. La comparación estadística se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SigmaPlot v12.0 (Systat Software, Inc., E.U.A.).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Descripción general de la fruta.

La estructura general del fruto cuajilote, tanto en la etapa inmaduro como maduro, se puede observar en la Figura 10a y 10b, respectivamente. El fruto que se muestra es una baya, cilíndricamente alargada con surcos longitudinales. El color es un verde intenso cuando no está maduro y luego amarillo con manchas rojizas en su etapa madura, aptas para el consumo. Las Figuras 10c y 10d muestran las secciones transversales de la fruta inmadura y madura, respectivamente. En ambas etapas, el exocarpio (epicarpio) consiste en una capa delgada de piel. Cuando la fruta está en una etapa inmadura, consiste en una piel verde-amarilla, que luego se convierte en una piel amarilla con manchas rojizas cuando está madura. La parte interna de la fruta tiene un mesocarpio carnoso con una abundante presencia de fibras de diferentes tamaños, distribuidas por todo el mesocarpio, estas fibras son más marcadas cuando la fruta está madura. El área del endocarpio muestra una gran cantidad de semillas pequeñas.

6.2 Caracterización fisicoquímica

El cuadro 2 presenta los parámetros fisicoquímicos de los frutos durante su etapa inmaduro y maduro, presentando resultados relacionados con las mediciones físicas, los parámetros de color y madurez, la composición química y el contenido de compuestos lignocelulósicos. Los promedios de los parámetros físicos como el peso fresco, la longitud y el diámetro no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 2), lo que puede atribuirse al hecho de que las dimensiones de los frutos en ambas etapas fueron similares. Los valores de longitud y diámetro obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Andrade-Cetto & Heinrich (2005), quienes encontraron que el cuajilote puede crecer hasta tamaños de hasta 15 cm de longitud y aproximadamente 6.5 cm de diámetro. También se ha reportado que estas frutas son cilíndricas a oblongas con surcos longitudinales de tamaños variables relacionados con los factores ambientales donde se desarrolla el cultivo. Este es el caso de las frutas analizadas del área suroeste de México, donde los tamaños variaron de 8 a 16 cm de longitud y un diámetro de 3 a 6.5 cm (Angón-Galván, 2006; Martínez-Torres & Diego-Pérez, 2006).

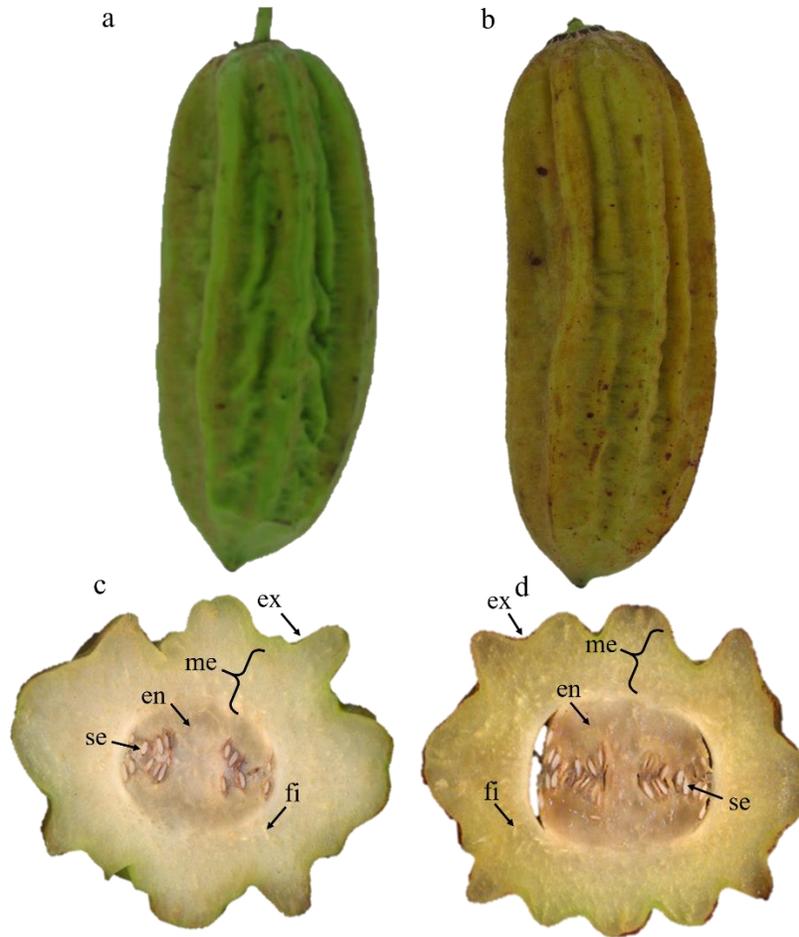


Figura 10. Frutos de *Parmentiera edulis*, inmaduro (a) y maduro (b). Secciones transversales del fruto c y d. Exocarpio (ex), mesocarpio (me), endocarpio (en), fibras (fi), semillas (se).

En general, el color de las frutas está asociado con la maduración y tiene una gran influencia en el atractivo del producto (Magalhães et al., 2019). El color de los frutos se puede visualizar en la Figura 10a y b. Mientras cuantitativamente, el análisis del color de la piel de frutos inmaduros mostró una mayor luminosidad que en frutos maduros (Cuadro 2), el cambio de color se midió con los parámetros de a^* y b^* en ambas etapas de madurez. En frutos inmaduros, los valores a^* y b^* se encontraron en la región del color verde en el espacio de color CIELAB, mientras que los valores de los frutos maduros correspondieron a la región del color amarillo-marrón en el espacio de color CIELAB (Cuadro 2) (Fairchild, 2013). En el caso de ΔE , este parámetro integra los tres parámetros principales de color (L^* , a^* y b^*) y la diferencia de cambio de color de fruto inmaduro a maduro fue 6.22 unidades, lo que indica

un cambio drástico del color de la fruta durante la maduración, como los valores que oscilan de 2 a 10 son notablemente perceptibles (Fairchild, 2013).

Con respecto al parámetro h° , este disminuyó de 104.40° en frutos inmaduros a 76.61° en frutos maduros, lo que indica el cambio en el tono del cuajilote (en este rango de grados, el verde corresponde a $\sim 120^\circ$ y el amarillo a $\sim 60^\circ$). Por lo tanto, los frutos pasaron de verde intenso en su etapa inmadura a un color amarillo-marrón con manchas rojas en su etapa madura. Además, el Chroma disminuyó de 41.47 ± 2.38 en frutos inmaduros a 35.59 ± 2.17 en frutos maduros, lo que indica que el color de los cuajilotes en su fase madura se volvió menos brillante e insaturado que las frutas inmaduras.

Estos cambios en los parámetros de color pueden deberse principalmente a la degradación de los pigmentos (clorofilas) en la piel del fruto (Ayour, Sagar, Alfeddy, Taourirte, & Benichou, 2016). Es importante mencionar que no hay reportes sobre el uso del espacio de color CIELAB para la determinación del color de este fruto. Cuando diferencias significativas se encontraron, las variaciones del color de la piel se pudieron asociar con los cambios en la fruta de una etapa fisiológica inmadura a una etapa madura y adecuada para el consumo. Se ha reportado que los consumidores generalmente asocian el color de la piel en frutos con el grado de madurez, como el verde para la fruta inmadura y la coloración amarilla para la fruta madura, lo que significa que el análisis del color del fruto podría usarse como un indicador de calidad, frescura y grado de madurez (Magalhães et al., 2019). En este caso, los frutos inmaduros regeneran regularmente la clorofila, pero este pigmento disminuye una vez que comienza la etapa de maduración causando la pérdida de coloración verde, lo que conduce a una coloración predominantemente amarillo-marrón debido a los carotenos y la degradación de la clorofila a feofitinas (Ayour et al., 2016; Kingston, 1992).

Mientras que la AT no mostró diferencias significativas, se puede observar que hay una disminución en la concentración de ácido cítrico del 23.80% a medida que el fruto madura (Cuadro 2). Estos cambios a menudo están relacionados con ácidos orgánicos que tienden a disminuir con la maduración de la fruta. Además, estos ácidos se usan como sustrato durante la respiración y se transforman en sacáridos (Magalhães et al., 2019).

Con respecto a los SST, se observaron diferencias significativas entre las muestras, y se registró un aumento en los frutos maduros, con valores de 11.28 para frutos inmaduros y

13.06 en frutos maduros, el incremento en los azúcares fue alrededor de un 15.78% (Cuadro 2). La maduración de la fruta conduce a un aumento de los sólidos solubles que consisten principalmente en sacáridos relacionados con la disminución de los ácidos orgánicos, mientras que las reservas de almidón se convierten en hexosas (Do Nascimento et al., 2006). Los SST puede usarse como un parámetro indirecto del contenido de azúcar, ya que es un factor de calidad importante que está estrechamente relacionado con el sabor o la dulzura de las frutas.

La firmeza mostró diferencias significativas (Cuadro 2), se puede observar que hay una disminución en este parámetro de 57.8% a medida que la fruta madura. Esto puede explicarse por la degradación enzimática de la pared celular de la fruta que causa su ablandamiento, lo que cambia los componentes estructurales de las frutas durante la maduración (Ezura & Hiwasa-Tanase, 2010). Se producen cambios en los componentes debido a la despolimerización de las pectinas y al aumento de otros compuestos solubles en agua, lo que provoca un ablandamiento en el tejido y disminuye la firmeza (Deng, Wu, & Li, 2005). La evaluación de RPI arrojó valores de 4.38 para frutos inmaduros y 3.41 en frutos maduros. El RPI mostró diferencias significativas en los frutos de cuajilote (Cuadro 2), el RPI en el presente estudio fue importante para establecer la etapa de maduración de la fruta, mostrando una buena correlación basada en los parámetros involucrados para su cálculo. Se observó que los valores obtenidos en frutos de cuajilote muestran una tendencia como en otras frutas como el mango, fluctuando entre 8.2 (etapa inmadura, mango verde) y 2.7 (etapa madura, mango amarillo) durante su almacenamiento a temperatura ambiente (Vélez-Rivera et al., 2014).

Los resultados de la caracterización química proximal se muestran en el Cuadro 2. La humedad, las cenizas, el extracto etéreo y las proteínas mostraron diferencias significativas entre los frutos inmaduros y maduros, mientras que los valores de fibra cruda y carbohidratos, no se encontraron diferencias significativas, con valores reportados como porcentaje en base húmeda. Los frutos inmaduros presentaron una gran cantidad de humedad y mostraron un ligero aumento en los frutos maduros (Cuadro 2). Este ligero aumento de la humedad en los frutos maduros puede explicarse por los frutos no climatéricas que alcanzan su tamaño y peso máximos cuando hay un mayor nivel de humedad relativa en el medio ambiente (Ezura & Hiwasa-Tanase, 2010). La mayor concentración de cenizas se encontró en los frutos verdes

(Cuadro 2), lo que representa el contenido total de minerales. Se ha dicho que las frutas tropicales y subtropicales, como el cuajilote, son ricas en minerales esenciales, y estos se usan continuamente en los procesos metabólicos durante la maduración de la fruta (Barea-Álvarez et al., 2016).

Del mismo modo, los extractos etéreos fueron más altos en frutos inmaduros, mientras que los frutos maduros disminuyeron su contenido (Cuadro 2). Los estudios mencionan que la mayoría de las frutas contienen extractos grasos, principalmente en la cáscara y las cutículas, que disminuyen durante el proceso de maduración (Lara, Belge, & Goulao, 2014). El contenido de proteína en los cuajilotes maduros presentó un valor de 2.73% mientras que en los frutos inmaduros fue de 1.78%, similar a los valores encontrados en el estudio realizado por Angón-Galván (2006). Otro componente principal de la fruta son los carbohidratos, este valor más alto se observó en frutos inmaduros, mientras que en los frutos maduros su valor disminuyó, lo que puede deberse al hecho de que los carbohidratos se acumulan en las células de los frutos inmaduros y se usan gradualmente durante su crecimiento y maduración (Do Nascimento et al., 2006).

Con respecto, a los compuestos lignocelulósicos en el fruto maduro, el contenido de hemicelulosa y lignina fue mayor que en el fruto inmaduro, mientras que también hubo un menor contenido de celulosa en la fruta madura, con una diferencia significativa en el contenido de celulosa observado entre las diferentes etapas de madurez (Cuadro 2). La disminución en el contenido de celulosa probablemente se debió al aumento en el contenido de lignina en la fruta madura causado por el engrosamiento de los tejidos vasculares de la pared celular provocado por el crecimiento natural, la madurez y senescencia de las frutas (Cosgrove, 2005). El contenido de celulosa en el fruto de cuajilote (42.2% en fruto inmaduro y 32.8% en fruto maduro) fue comparable a lo que se ha reportado en otras materias primas como zanahorias (54.9%) (Szymanska-Chargot et al., 2017) y manzanas (32,4%) (Melikoğlu, Bilek, & Cesur, 2019). Con respecto al contenido de lignina, el cuajilote alcanzó el 35.13% en una etapa inmadura y el 40.8% en una etapa madura que es más alta en comparación con las zanahorias (13.7%) o los pepinos (18.1%) (Szymanska-Chargot et al., 2017) que probablemente podría deberse a que su sistema de haces vasculares está menos desarrollado y lignificado que el cuajilote.

Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos de frutos de *Parmentiera edulis* en dos etapas de madurez.

Parámetro	Fruta inmadura	Fruta madura	Método
Peso fresco (g)	407.85 ± 102.80 ^a	413.10 ± 100.85 ^a	
Longitud (cm)	16.71 ± 2.06 ^a	17.89 ± 2.36 ^a	Magalhães et al. (2019)
Diámetro (cm)	6.48 ± 0.97 ^a	6.82 ± 0.92 ^a	
L*	52.26 ± 4.33 ^a	48.76 ± 2.35 ^b	
a*	-10.30 ± 0.72 ^a	8.17 ± 1.71 ^b	Barragán-Iglesias et al., (2018)
b*	40.17 ± 2.40 ^a	34.59 ± 2.30 ^b	
ΔE	-	6.92 ± 1.84	Arzate-Vázquez et al. (2011)
C*	41.47 ± 2.38 ^a	35.59 ± 2.17 ^b	Sun et al. (2019)
h°	104.40 ± 1.12 ^a	76.61 ± 3.08 ^b	
TSS (%)	11.28 ± 0.62 ^a	13.06 ± 0.68 ^b	AOAC (1995)
TA (%)	0.21 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.04 ^a	
F (N)	42.91 ± 1.08 ^a	24.84 ± 2.80 ^b	De Oliveira Alves Sena et al. (2019)
RPI (-)	4.38 ± 0.11 ^a	3.41 ± 0.33 ^b	Vélez-Rivera et al. (2014)
Humedad (%)	83.83 ± 0.13 ^a	84.83 ± 0.38 ^b	
Ceniza (%)	0.68 ± 0.04 ^a	0.54 ± 0.03 ^b	
Extracto etéreo (%)	0.15 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^b	AOAC (2007)
Fibra cruda (%)	3.17 ± 1.01 ^a	2.86 ± 0.09 ^a	
Proteína (%)	1.78 ± 0.31 ^a	2.73 ± 0.37 ^b	
Carbohidratos (%)	10.37 ± 1.46 ^a	8.92 ± 0.64 ^a	D*
Celulosa (% bs)	42.17 ± 4.07 ^a	32.76 ± 0.39 ^b	
Hemicelulosa (% bs)	20.94 ± 2.28 ^a	25.13 ± 4.58 ^a	TAPPI (2002)
Lignina (% bs)	35.26 ± 3.41 ^a	40.79 ± 2.28 ^a	

Cada grupo representa la media (±) y la desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P <0.05), bs= base seca. D* = determinado por la diferencia.

6.3 Caracterización microestructural

Las Figuras 11 y 12 muestran imágenes de MO de la microestructura de la sección transversal del fruto cuajilote con los tejidos estructurados en tres regiones: exocarpio, mesocarpio y endocarpio. La región del exocarpio (Figura 11a-b y 12a-b) en ambas etapas de madurez muestra una capa delgada de células epidérmicas ligeramente alargadas, así como una región de alrededor de 3 a 5 capas de células de colénquima subepidérmicas. El mesocarpio (Figura 11c-d y 12c-d) forma la parte más carnosa y comestible de la fruta, que consiste principalmente en capas de células parenquimatosas. La colénquima ocupa una posición periférica y forma una capa gruesa debajo de la piel de las frutas como parte del exocarpio, separada por una sola capa de células, mientras que el parénquima está en la parte más profunda. Las células de colénquima tienen forma ovoide alargada con pocos espacios intercelulares y compactadas, mientras que las células del parénquima son más grandes con una forma poliédrica y espacios intercelulares más grandes.

Una característica principal de este fruto son las grandes cantidades de fibras de esclerénquima de diferentes tamaños distribuidas por todo el mesocarpio, que son evidentes en ambas etapas de madurez (Figura 11c y 12c). Además, se observa una pared celular engrosada y lignificada en la fruta madura que podría deberse al envejecimiento del tejido de la fruta (Figura 11d y 12d), donde el proceso de lignificación es común, como se ha informado para Tobimatsu et al. (2014).

El endocarpio es la región más interna de la fruta (Figura 11e y 12e), generalmente es blanda y rodea una gran cantidad de semillas pequeñas. Esta parte es más compacta cuando la fruta está en una etapa inmadura, mientras que en la fruta madura el endocarpio puede estar ligeramente separado del mesocarpio. Con respecto a las semillas, se ha reportado que tienen una forma ovalada y miden aproximadamente 4 mm de largo, 3 mm de ancho y 0.8 mm de espesor, comprimidas dorsiventralmente, con un color marrón oscuro (Torres-Rivera, 2018). Las semillas no tienen endospermo, que según la literatura es una característica típica de la familia *Bignoniaceae*, ya que son semillas exalbuminosas con poco o ningún endospermo, con una ligera presencia de endotelio (Casoti et al., 2016; Lohmann & Taylor, 2014). Los cotiledones son grandes (Figura 11e-f y 12e-f), con células epidérmicas ventrales alargadas tangencialmente, mientras que la epidermis dorsal del cotiledón tiene forma septada, y las

células cotiledóneas en el centro de la semilla aparecen en forma redondeada. Además, las semillas tienen mesotesta unida a las células parenquimatosas, así como una testa lignificada.

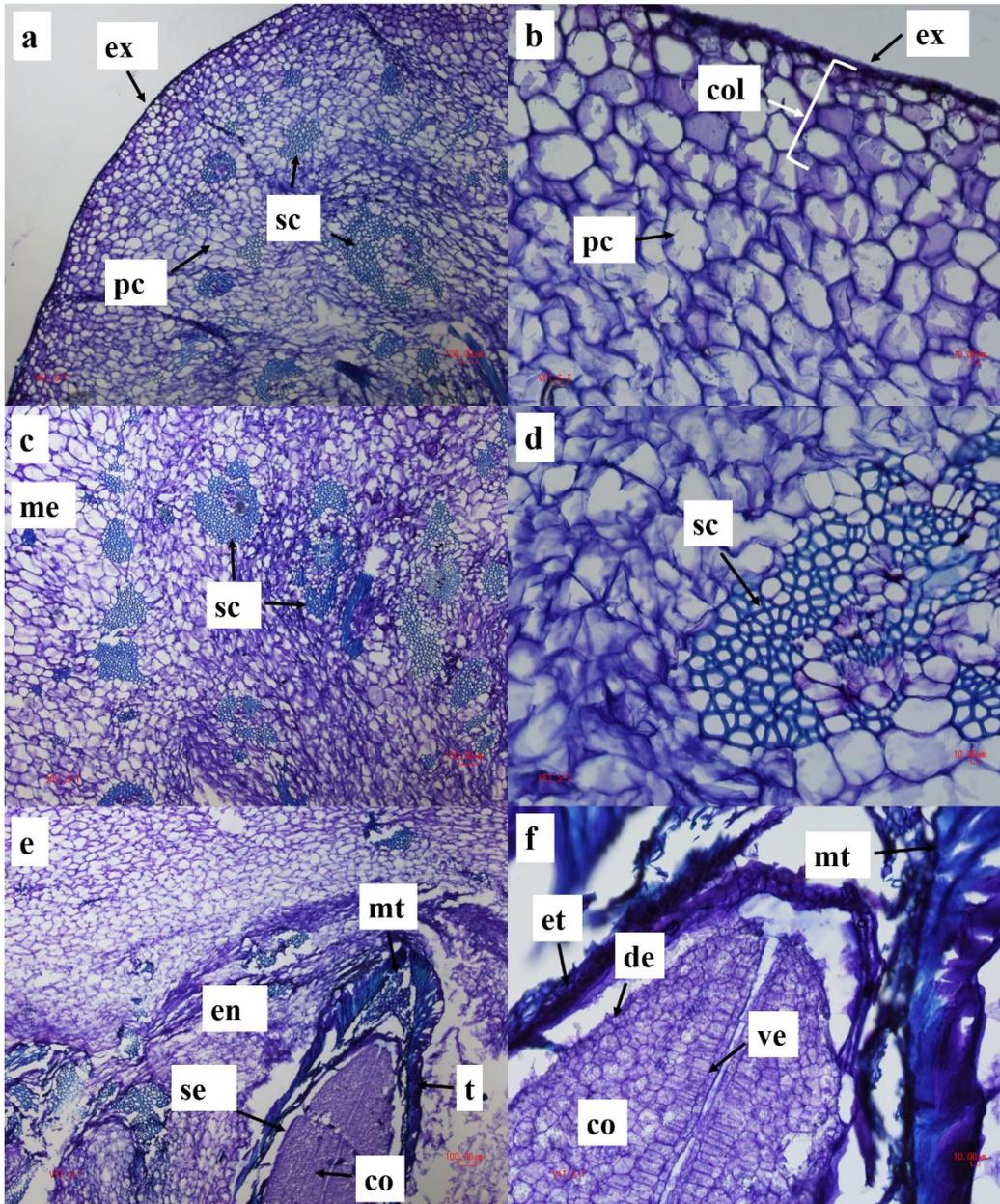


Figura 11. (a) Sección transversal del fruto de *Parmentiera edulis* en estado inmaduro, bajo microscopía óptica. Aspecto general de partes de la fruta; (b) Exocarpo (ex), capa de colénquima (col) y parte de mesocarpo (me); (c) mesocarpo con fibras de esclerénquima (sc); (d) fibras de esclerénquima (sc); (e) endocarpo (en) con semilla; (f) semilla (se). pc, células parenquimatosas; co, cotiledón; t, testa; mt, mesotesta; et, endotelio; ve, epidermis ventral del cotiledón; de, epidermis dorsal del cotiledón. Barras a, c y e = 100 μ m, barras b, d y f = 10 μ m.

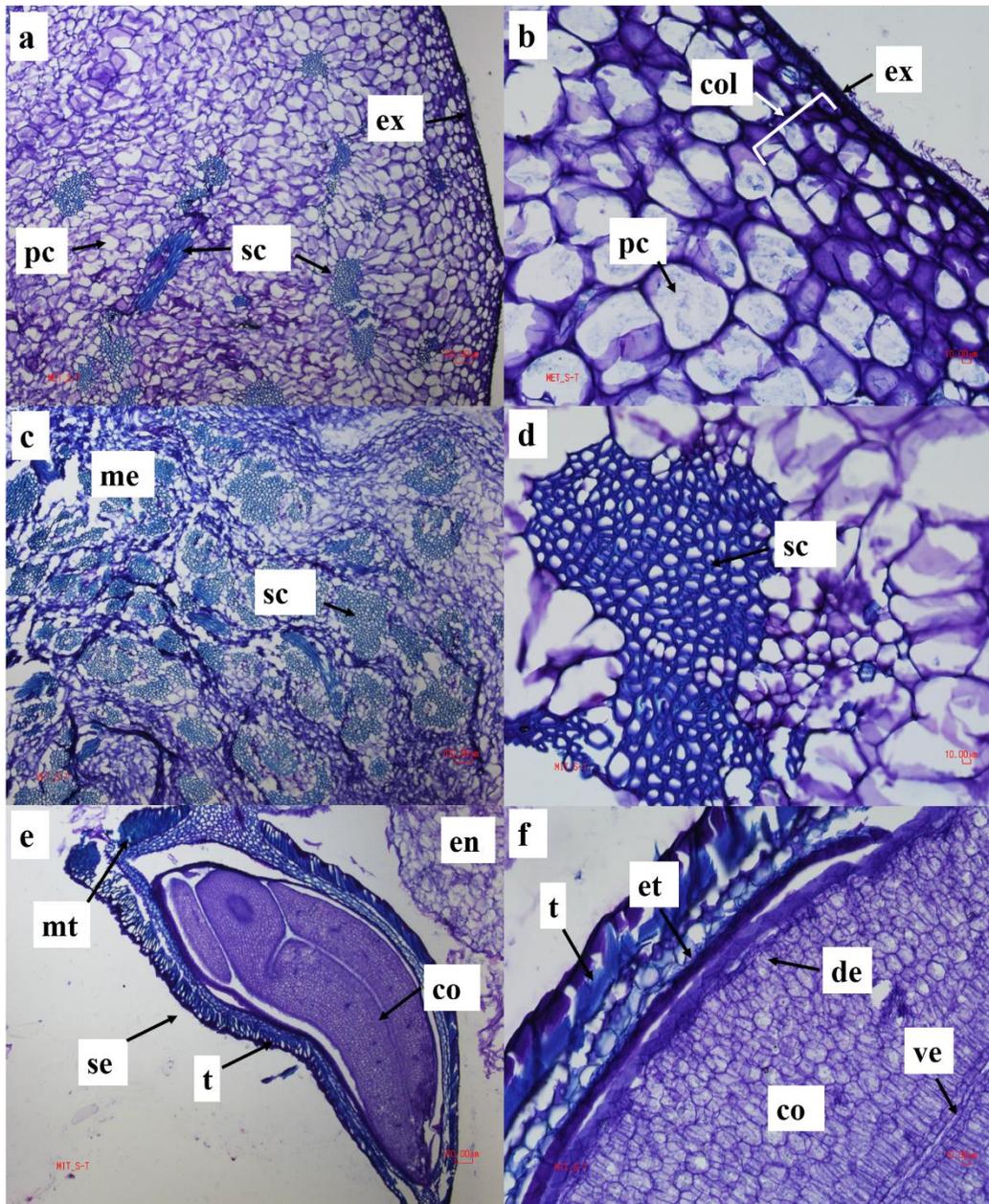


Figura 12. (a) Sección transversal del fruto de *Parmentiera edulis* en etapa madura, bajo microscopía óptica. Aspecto general de parte de la fruta; (b) Capa de exocarpo (ex) colénquima (col) y parte de mesocarpo (me); (c) mesocarpo con fibras de esclerenquima (sc); (d) fibras de esclerenquima (sc); (e) endocarpo (en) con semilla; (f) semilla (se). pc, células parenquimatosas; co, cotiledón; t, testa; mt, mesotesta; et, endotelio; ve, epidermis ventral del cotiledón; de, epidermis dorsal del cotiledón. Barras a, c y e = 100 μ m, barras b, d y f = 10 μ m.

La Figura 13 muestra imágenes CLSM de sección transversal del cuajilote en etapa inmadura (Figura 13a, 13c y 13e) y maduras (Figura 13b, 13d y 13f), donde se pueden observar las regiones de exocarpio, mesocarpio y endocarpio. Las estructuras celulares del tejido se tiñeron con calcofluor para identificar celulosa-hemicelulosa (color azul), mientras que la presencia de lignina (color verde) y clorofilas (color rojo) se observó por autofluorescencia. La figura 13a muestra una fluorescencia intensa (color verde) en la parte más externa del exocarpio. Esta coloración puede estar relacionada con la presencia de lignina y clorofilas u otros compuestos presentes en la capa delgada que podrían ser ceras naturales compuestas principalmente de triterpenoides presentes en la cáscara de la fruta (Zarrouk, Pinheiro, Misra, Fernández, & Chaves, 2018). Con respecto a la fruta madura (Figura 13b), la fluorescencia es más intensa en la capa más externa (color verde), que es más gruesa. Esto podría estar relacionado con la lignificación de las paredes celulares de la piel de la fruta, causada por el proceso de desarrollo y maduración de los frutos (Ruiz et al., 2015).

En frutos inmaduros se observó que las células del parénquima en la región del mesocarpio se tiñeron principalmente de azul (celulosa y hemicelulosa) y, en menor medida, de verde (lignina) que corresponden a los compuestos lignocelulósicos presentes en la estructura celular de las paredes (Figura 13a y 13c). También se observó que las células en el fruto inmaduro son más uniformes, compactas y con paredes más delgadas que las células del parénquima en las frutas maduras (Figura 13a y 13b). En el fruto inmaduro, las paredes más delgadas permitieron observar compuestos de lignina (color verde) dentro de las paredes celulares de las células del parénquima. Además, cuando la fruta está madura, se observa una expansión de las células del parénquima con paredes más gruesas, lo que hace que los compuestos de lignina estén completamente ocultos (Figura 13b). Además, las clorofilas (teñidas de rojo) en las células del parénquima fueron más abundantes en el fruto inmaduro que en el tejido del parénquima del fruto maduro. La concentración de las clorofilas fue más abundante en las regiones externas (exocarpio y mesocarpio externo) y disminuyó gradualmente hacia las regiones internas (endocarpio) en ambas etapas de maduración del fruto (compárese con la Figura 13a-13d). La disminución en las clorofilas observadas podría deberse al proceso de maduración y degradación de los pigmentos en las frutas. Sin embargo, además de la clorofila, otros compuestos naturales dentro de las matrices celulares podrían tener autofluorescencia entre 492–597 nm (región verde-amarilla), como es el caso de los

compuestos fenólicos libres, alcaloides, terpenoides carotenoides y algunas capas de cera (Talamond, Verdeil, & Conéjéro, 2015; Veraverbeke, Van Bruaene, Van Oostveldt, & Nicolai, 2001).

Las Figuras 13c y 13d muestran la estructura celular de la región del mesocarpio formada principalmente por células parenquimatosas y fibras de esclerénquima. Al observar las imágenes CLSM, la fluorescencia de las fibras del esclerénquima era evidente con su luz estrecha característica llamada lumen, mientras que sus paredes secundarias estaban lignificadas. Además, la distribución de la celulosa-hemicelulosa (color azul) y la lignina (color verde) se puede ver en los tejidos maduros e inmaduros. Sin embargo, en el tejido maduro, las fibras de esclerénquima mostraron lúmenes más pequeños que en el tejido inmaduro, lo que puede deberse al engrosamiento de las paredes celulares causado por el proceso de lignificación de las fibras de esclerénquima durante la maduración de la fruta (Tobimatsu et al., 2014).

Finalmente, las Figuras 13e y 13f muestran la región del endocarpio donde se encontraron las semillas del fruto en su mayor parte en ambas etapas de madurez. Las imágenes CLSM de las semillas mostraron que las diferentes partes de la semilla están compuestas principalmente de celulosa-hemicelulosa (color azul) y lignina (color verde). La fluorescencia más alta para los compuestos lignocelulósicos se observó en la capa externa de la semilla, la testa que protege a los cotiledones. Los cotiledones se encuentran dentro de las semillas y pueden ser ricos en nutrientes de reserva, como almidón, aceites y proteínas (Esan, Omoba, & Enujiugha, 2018). Además, se observó fluorescencia que es identificable por un color verde a amarillo (492-597 nm) que podría estar relacionado con la presencia de otros compuestos en la matriz celular de la semilla. Algunos de estos compuestos podrían estar relacionados con la presencia de taninos, betaxantinas, ácido clorogénico, flavinas, alcaloides y compuestos fenólicos libres (García-Plazaola et al., 2015).

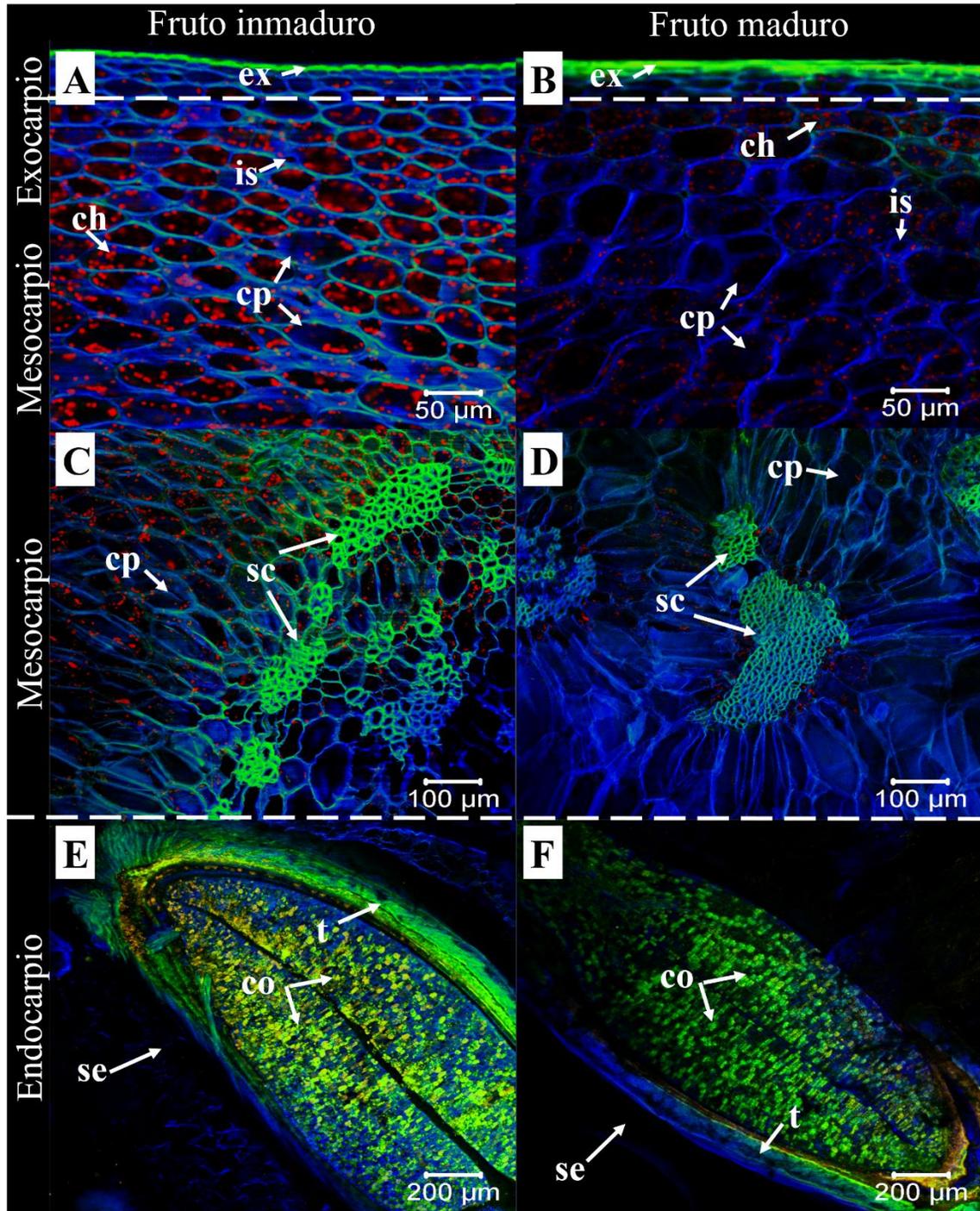


Figura 13. Imágenes transversales de CLSM de frutos maduros (a, c y e) y maduros (b, d y f) de *Parmentiera edulis*, donde la fluorescencia de la lignina se muestra por el color verde, la celulosa en el azul y las clorofilas en rojo. ex: exocarpio; is: espacio intercelular, pc: células parenquimatosas, sc: fibras de esclerenquima, se: semilla, ch: clorofilas, t: testa, co: cotiledón. Barras ayb = 50 μm , barras c y d = 100 μm , barras e y f = 200 μm .

Las células vegetales tienen arquitecturas complejas y heterogéneas, que dependen del tipo de célula asociada con su función celular (Knox, 2008). En el caso de *P. edulis*, los tejidos del fruto están compuestos por varios tipos de células. La microestructura de frutos inmaduros y maduros observada bajo FE-SEM se muestra en la Figura 14, donde se pueden ver las paredes celulares de diferentes tipos de células de las regiones del epicarpio y mesocarpio. Se realizó un análisis morfométrico de las células y los resultados se presentan en el Cuadro 3 de dos maneras: por tipo de célula en cada región y por etapa de madurez. En general, cuando se comparan los diferentes tipos de células por etapa de madurez, existen diferencias significativas en los parámetros de tamaño, como el área, el perímetro y el diámetro de Feret en las células epicarpio, colénquima y mesocarpio. En el caso del perímetro en las fibras del esclerénquima en frutos inmaduros y maduros, no se encontraron diferencias. Con respecto a los parámetros de AR y redondez, no hubo diferencias significativas entre todos los tipos de células.

Los valores del área de células epidérmicas mostraron un aumento del 23.23% (Cuadro 3). Se observaron tendencias similares en el perímetro y el diámetro de Feret, con incrementos de 19.32% y 12.85%, respectivamente (Cuadro 3). Las células epidérmicas en los tejidos inmaduros tenían una forma más circular que las células en los tejidos maduros, que adquieren una forma ovoide más alargada (Figura 14b y 14d). Los cambios en el tamaño y la forma de las células epidérmicas están relacionados con el crecimiento del fruto y los fenómenos de expansión celular. También se han reportado cambios similares en la morfología del pericarpio de las frutas de mora (*Rubus* spp.) durante la maduración (Zhang, Xiong, Yang, & Wu, 2019).

Con respecto a las células de colénquima, se encontraron diferencias significativas entre las frutas inmaduras y maduras en los parámetros de área, perímetro y diámetro de Feret (Cuadro 3). Se observó una ligera disminución en el tamaño celular cuando la fruta madura, con una disminución del área del 17.26%, el perímetro del 6.11% y el diámetro del Feret 6.80% (Cuadro 3). Además, la forma de estas células cambió con la maduración y se alargaron ligeramente debido a la expansión de las células parenquimáticas del mesocarpio. Esto conduce a un aplanamiento de las células de colénquima a través de la presión aplicada por

el crecimiento de las células de mesocarpio. En consecuencia, AR aumentó de 1.59 a 1.62, mientras que la redondez disminuyó ligeramente (Figura 14a-b y 14c-d).

Las células parenquimatosas forman la estructura principal del mesocarpio y son las células más grandes que se pueden ver en la microestructura de la fruta (Figura 14a-b y 14c-d). Las células del mesocarpio tienen una forma poliédrica y son ligeramente alargadas, y su tamaño aumentó drásticamente cuando la fruta pasó de la etapa inmadura a la etapa madura (Cuadro 3). En este estudio, el área de células del parénquima mostró un aumento del 69.47% (Cuadro 2). El perímetro y el diámetro de Feret mostraron una tendencia similar, con estos valores aumentando en un 30.65% y 26.68%, respectivamente. El crecimiento del fruto causa expansión celular, y las células del parénquima se vuelven más redondas. Dado que los parámetros de redondez tienden a tener valores de 1 cuando los objetos se forman como un círculo perfecto, el AR disminuyó de 1.66 a 1.61, y la redondez aumentó ligeramente en la fruta madura. Se observaron informes similares de aumento del tamaño de las células parenquimatosas en las berenjenas, que muestran un aumento de entre 60-100% en las células de una berenjena bebé y las células de una berenjena madura comercialmente avanzada (Valerga et al., 2019).

Las fibras de esclerénquima son parte del tejido de soporte en las fibras de las plantas, tienen una pared secundaria engrosada y lúmenes prominentes estructurados por vasos espirales de fibrillas de celulosa junto con lignina (Cosgrove, 2005; Zhong & Ye, 2015). La estructura celular de las fibras del presente trabajo (Figura 13i-13l) es similar a otras fibras lignocelulósicas como el *Agave tequilana* (Espino et al., 2014), fibra de palma de durazno (Diaz, Silva, & D'Almeida, 2016) y *Juncus effusus* (Maache et al., 2017). En el caso de las fibras de esclerénquima, se encontraron diferencias significativas en el área de las células y el diámetro de Feret (Cuadro 3), cuando se compararon las dos etapas de madurez (Figura 14e y 14g), con estos parámetros disminuyendo a medida que avanzaba el proceso de maduración (17.59% y 5,66%, respectivamente).

Este comportamiento se debe al engrosamiento de las paredes celulares de las fibras del esclerénquima provocado por el crecimiento del fruto, lo que provoca una mayor lignificación de la pared celular y una reducción drástica de la luz celular (Figura 14f y 14h). Es posible observar este efecto ya que las mediciones con análisis de imagen del tamaño y la

forma de las células de las fibras del esclerénquima se realizaron mediante la binarización del lumen celular (Figura 14i y 14k). En general, el tamaño de las células de las fibras de esclerénquima no disminuye, porque el tejido vascular es rígido ya que tiene una función de soporte en los tejidos vegetales (Tobimatsu et al., 2014). En el caso de las células vegetales, se ha reportado que, durante el proceso de citocinesis, la pared celular primaria se forma principalmente por deposición de celulosa (Cosgrove, 2005). Además, durante la expansión celular y la maduración, la pared secundaria se refuerza con compuestos lignocelulósicos y polisacáridos no celulósicos que le dan su estructura final (Burton, Gidley, & Fincher, 2010). Esto se confirmó midiendo el grosor de la pared celular de las fibras de esclerénquima en frutos inmaduros y maduros (Figura 14j y 14l), lo que indicó que, en promedio, el grosor aumenta de 2.02 μm a 2.60 μm . Se encontraron diferencias significativas entre estos grosores, lo que significa que un 22.4% de engrosamiento de la pared celular secundaria fue causado por la deposición de lignina en el tejido vascular. Sin embargo, durante su desarrollo, las paredes celulares se engrosan asimétricamente en este caso (Figura 14l) con polímeros de alto peso molecular como celulosa, hemicelulosa (xilano y glucomanano), pectinas, ligninas y cantidades residuales de proteínas estructurales (Burton et al., 2010; Knox, 2008).

Con respecto al perímetro, no hubo diferencias significativas porque la distribución de los valores del perímetro de las fibras de esclerénquima en frutos inmaduros estaba extremadamente dispersa, ya que las formas de las células eran muy heterogéneas (Figura 14f, Cuadro 3). Por otro lado, las células de fibras de esclerénquima en la fruta madura (Figura 13h) tenían una distribución más estrecha de los valores del perímetro (Cuadro 3), causada por la lignificación de las paredes celulares cuando la fruta está madura. Finalmente, las células de fibras de esclerénquima mostraron pocos cambios en los valores de AR y redondez cuando se compararon las dos etapas de maduración. Observaciones similares fueron reportadas por Mohammad & Ding (2019) en frutos de *Carissa congesta* durante su desarrollo, estos autores reportaron que las células experimentan alargamiento y expansión a medida que la fruta se desarrolla, y la diferenciación en la forma y tamaño de las células se puede observar en las diferentes regiones de la estructura celular de la fruta (exocarpio, mesocarpio y endocarpio). Además, la presencia y el desarrollo de haces vasculares se dispersaron principalmente en el mesocarpio, como es el caso de este estudio.

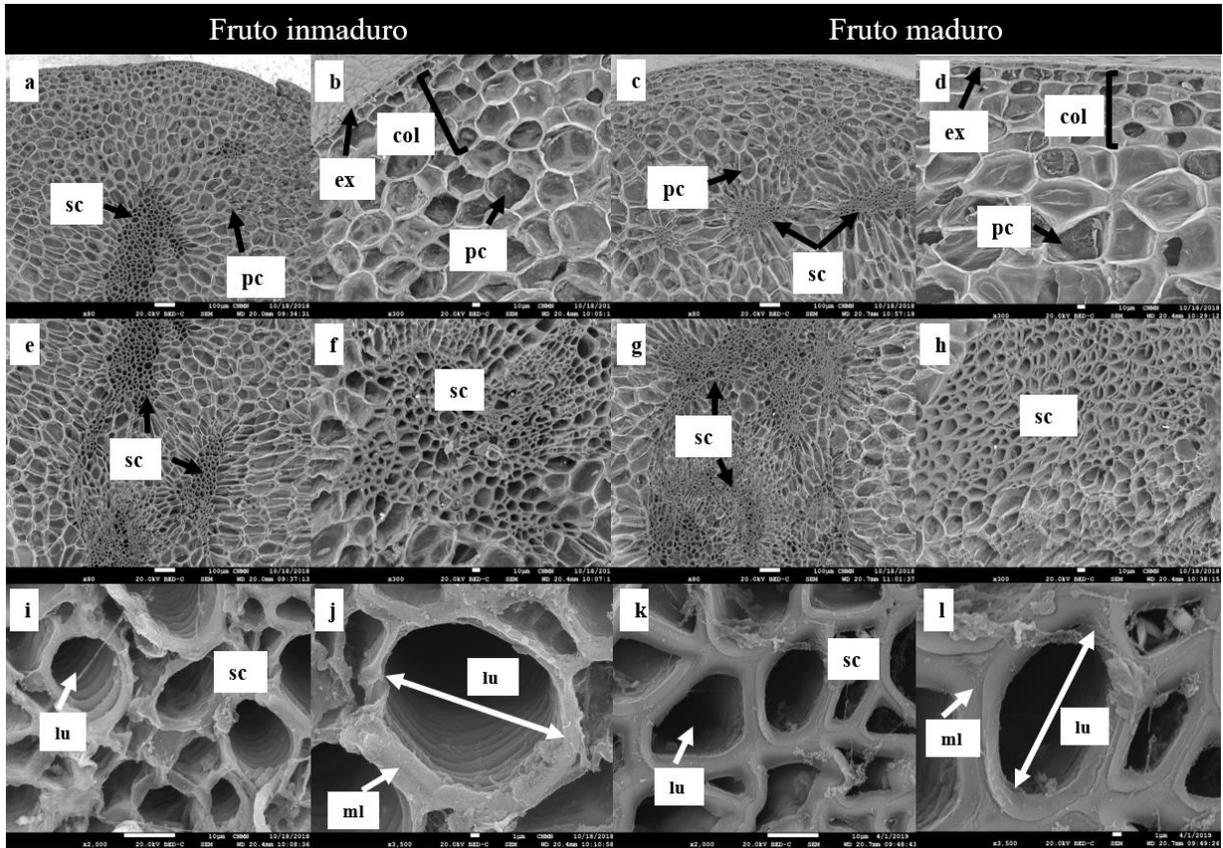


Figura 14. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de una sección transversal del fruto de *Parmentiera edulis* durante la etapa inmadura (a, b, e, f, i, j) y madura (c, d, g, h, k, l). ex.: exocarpi, col: capa de colénquima, pc: células parenquimatosas, sc: fibras de esclerénquima, ml: lámina media, lu: lumen celular. Barras a, e, c, g = 100 μm , barras b, f, d, h = 10 μm , barras i, k = 10 μm y barras j, l = 1 μm .

Cuadro 3. Parámetros morfométricos de células de frutos de *Parmentiera edulis* en dos etapas de madurez.

Parámetros morfométricos	Fruto inmaduro	Fruto maduro
Células exocarpio		
Área (μm^2)	55.08 \pm 22.16 ^a	67.87 \pm 23.48 ^b
Perímetro (μm)	32.40 \pm 7.98 ^a	38.66 \pm 9.26 ^b
F _D (μm)	12.52 \pm 3.05 ^a	14.13 \pm 2.94 ^b
AR (-)	1.85 \pm 0.53 ^a	1.88 \pm 0.63 ^a
Redondez (-)	0.57 \pm 0.14 ^a	0.58 \pm 0.16 ^a
Células Colénquima		
Área (μm^2)	610.83 \pm 305.94 ^a	504.35 \pm 264.20 ^b
Perímetro (μm)	116.18 \pm 34.77 ^a	109.08 \pm 39.41 ^b
F _D (μm)	36.88 \pm 9.26 ^a	34.37 \pm 9.51 ^b
AR (-)	1.59 \pm 0.44 ^a	1.62 \pm 0.44 ^a
Redondez (-)	0.66 \pm 0.15 ^a	0.65 \pm 0.15 ^a
Células mesocarpio		
Área (μm^2)	3427.61 \pm 1136.92 ^a	5808.97 \pm 2284.77 ^b
Perímetro (μm)	311.94 \pm 73.69 ^a	407.57 \pm 95.56 ^b
F _D (μm)	89.90 \pm 18.48 ^a	113.89 \pm 25.67 ^b
AR (-)	1.66 \pm 0.45 ^a	1.61 \pm 0.42 ^a
Redondez (-)	0.64 \pm 0.15 ^a	0.65 \pm 0.15 ^a
Células de fibras de esclerénquima		
Área (μm^2)	239.66 \pm 130.54 ^a	197.49 \pm 69.73 ^b
Perímetro (μm)	72.20 \pm 22.08 ^a	67.82 \pm 14.58 ^a
F _D (μm)	23.30 \pm 5.88 ^a	21.98 \pm 3.76 ^b
AR (-)	1.51 \pm 0.32 ^a	1.53 \pm 0.37 ^a
Redondez (-)	0.68 \pm 0.13 ^a	0.68 \pm 0.14 ^a

Cada grupo representa la media (\pm) y la desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$). F_D: Diámetro de Feret; AR: Relación de aspecto.

6.4 Caracterización de fibras

Las fibras extraídas de los frutos de *P. edulis* se muestran en las Figuras 15a y 15d. Se observó que las fibras en ambas etapas de madurez no mostraron diferencias a simple vista, mostrando la misma morfología y apariencia en color, ya que las fibras se obtuvieron usando las mismas condiciones de secado. Sin embargo, el uso de CLSM proporcionó información sobre compuestos estructurales y su distribución en materiales lignocelulósicos (Hernández-Hernández et al., 2016; Hernández-Hernández et al., 2014). Por lo tanto, bajo CLSM, se pueden observar diferencias en la distribución de celulosa y lignina (Figura 15b-c), donde las fibras muestran una alta fluorescencia debido a la presencia de celulosa-hemicelulosa (azul) y lignina (verde). Se observó la alineación de las fibrillas lignocelulósicas que comprenden la arquitectura y la morfología del haz de fibras (verde) con los tabiques o septos (azul) a lo largo de las fibras (Figura 15b-c). Las fibras en la fruta madura (Figura 15e-f) mostraron una disminución en la fluorescencia debido a la celulosa y un aumento en la fluorescencia debido a la lignina con respecto a las frutas inmaduras. En consecuencia, los septos fueron menos evidentes debido al proceso de lignificación incrustado en las células externas (septos) en las fibras maduras (Figura 15e-f). En general, el CLSM evidenció que el mayor contenido de celulosa se encontró en las fibras extraídas de las frutas inmaduras, mientras que el contenido de lignina fue abundante en las frutas maduras. Esto corresponde con los datos del análisis fisicoquímico (Cuadro 2) que es información valiosa cuando se extrae diferencialmente celulosa o lignina, dependiendo de la etapa de maduración de la fruta. Consecuentemente, el uso de celulosa como biopolímero podría ser un medio para obtener nanocelulosa, que tiene varias aplicaciones como nanocompuesto en el refuerzo de materiales de la industria del embalaje, así como materiales para el campo médico, industria del papel, la electrónica y las membranas (Klemm et al., 2018; Lei & Feng, 2020; Mondal, 2017). Además, la lignina podría usarse por sus propiedades adhesivas, como para mezclas con otros polímeros (polihidroxicanoatos, poliéster, ácido poliláctico, polioles y poliuretano, etc.) mejorando propiedades como la plasticidad y la adhesión (Bajwa et al., 2019; Faruk & Sain, 2016).

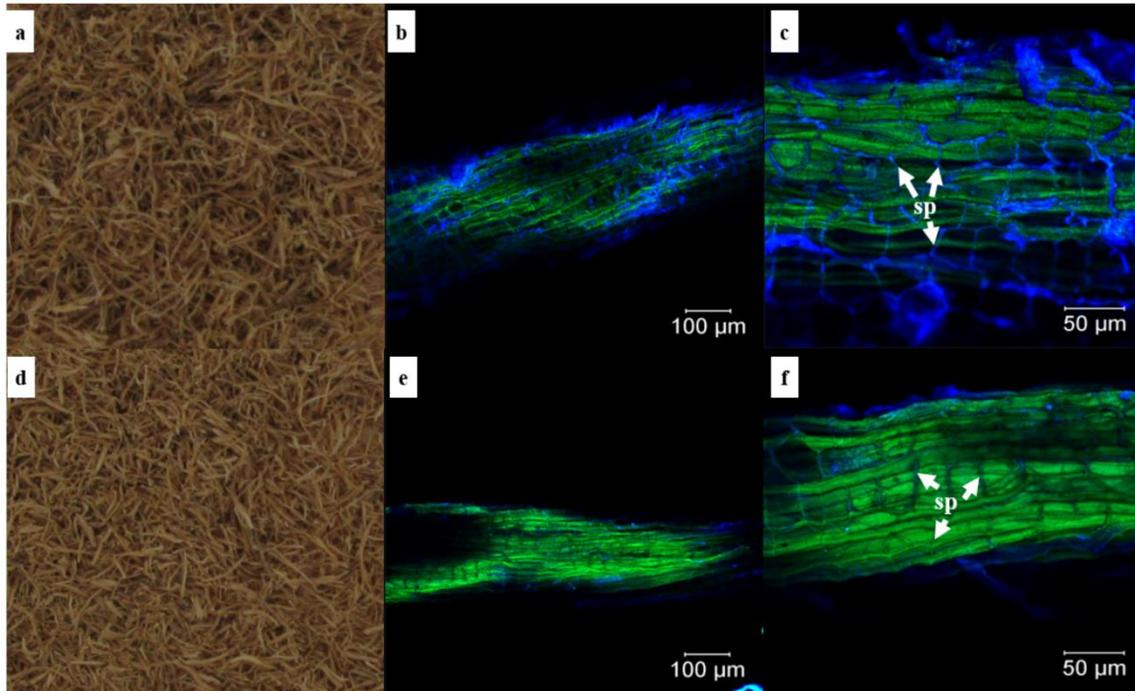


Figura 15. Figura 6 Imágenes de fibras de fruta inmadura (a) y madura (d) de *Parmentiera edulis* e imágenes CLSM de fibras de fruta inmadura (b y c) y fruta madura (e y f). El color verde corresponde a la lignina y el azul a la celulosa. sp: septos o tabiques.

6.5 Propiedades micromecánicas de las fibras

Para ilustrar la influencia de los cambios microestructurales en el tejido vascular (engrosamiento de la pared celular) del cuajilote en las propiedades micromecánicas de las fibras durante las diferentes etapas de maduración, las muestras fueron indentadas de forma transversal y longitudinalmente. Los valores de dureza (H) y módulo elástico o módulo de Young (E) de las fibras con indentación en regiones transversales y longitudinales se muestran debajo de las imágenes de microscopía óptica, donde también se pueden observar la impresión residual de indentación (RII) (Figura 16 a-d). Las propiedades micromecánicas de las fibras de *P. edulis* en la sección transversal (TS) en ambas etapas de madurez (Figura 16a y 16b) no mostraron diferencias significativas, con un valor de H de 0.209 GPa en ambas etapas de madurez, mientras que los valores de E fueron similares (alrededor de 6.5 GPa).

Los valores de H y E en las pruebas de indentación en la sección longitudinal (LS) de las fibras en ambas etapas de maduración (Figura 16c y 16d) mostraron diferencias significativas

entre ellos, y sus valores fueron más bajos que las fibras indentadas en TS. El valor de H de las fibras en las frutas inmaduras fue de 0.060 GPa, mientras que en las frutas maduras su H aumentó alrededor del 35%. Además, se observó una diferencia más significativa en los valores de E, donde las fibras de fruta inmadura arrojaron valores de 0.169 GPa, mientras que, en la fruta madura, los valores de E fueron hasta seis veces mayores que en las fibras de fruta inmadura. Los valores altos de H y E están asociados con materiales duros y rígidos, respectivamente, lo que significa que las fibras dispuestas longitudinalmente podrían usarse para un mejor reforzamiento de materiales o polímeros compuestos y aplicaciones de empaque y embalaje.

Como se evidenció a través de las imágenes FE-SEM (Figura 14 i-l) y CLSM (Figura 15 e-f), estas diferencias significativas en las propiedades micromecánicas de las fibras de esclerénquima obtenidas de frutos inmaduros y maduros están directamente relacionadas con el engrosamiento de la pared celular causado por el proceso de lignificación. Se ha reportado que un aumento en la dureza de las fibras vegetales está relacionado en parte con el contenido de cenizas (minerales), pero principalmente con el contenido de lignina que promueve el engrosamiento de la pared celular secundaria en este tipo de tejidos (Goudenhooff et al., 2018; Wu et al., 2010). Las propiedades micromecánicas de las fibras de fruta de *P. edulis* podrían compararse con otros materiales como las espinas de nopal (H = 0.31 GPa, E = 5.81 GPa) (Marin-Bustamante et al., 2018), células de piedra de cáscara de nuez (H = 0.26 GPa y E = 7.66 GPa) (Nicolás-Bermúdez et al., 2018), madera blanda (H = 0.34-0.53 GPa y E = 14.2-18 GPa) (Wu et al., 2010), tallo de soja (H = 0.48 GPa y E = 16.3 GPa) (Wu et al., 2010) y tallo de lino (H = 0.393 GPa y E = 17.4 GPa) (Keryvin et al., 2015). Los valores obtenidos en este estudio indican que las fibras de *P. edulis* tienen las propiedades micromecánicas requeridas para su uso en refuerzos de nanocompuestos. Esta información es útil para seleccionar la disposición estructural y la etapa de madurez más apropiadas de las fibras para mejorar las propiedades mecánicas de los biomateriales.

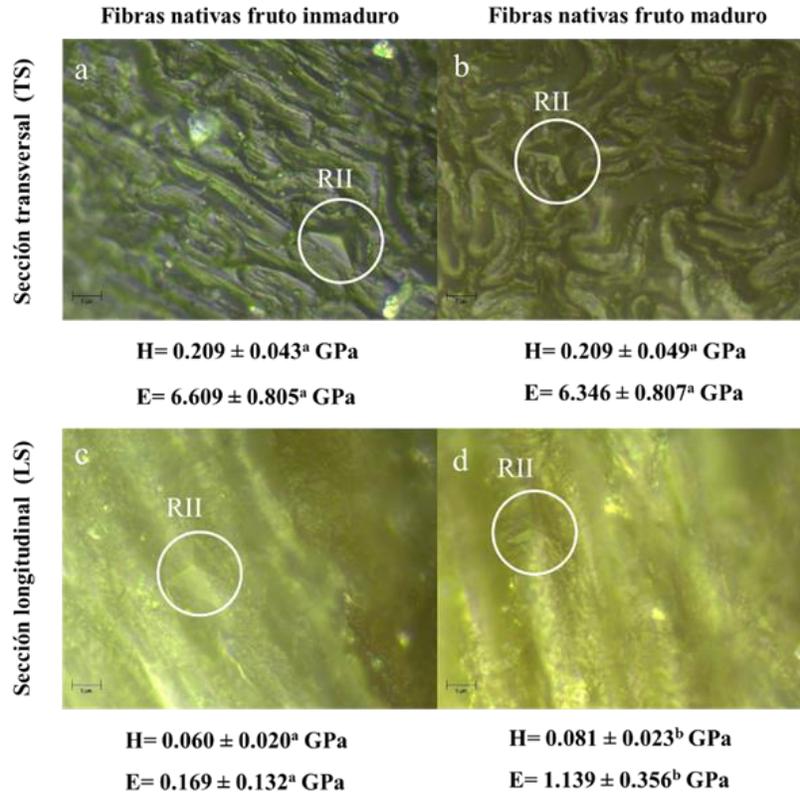


Figura 16. Imágenes de microscopía de luz después del análisis de indentación. Sección transversal de fibras crudas de fruto inmaduro (a) y fruto maduro (b), sección longitudinal de fibras crudas de fruto inmaduro (c) y fruto maduro (d). RII: indica la impresión residual de indentación.

6.6 Difracción de Rayos X (DRX) de las fibras

El análisis DRX proporcionó evidencia adicional para explicar las diferencias en las propiedades estructurales y mecánicas de las fibras. La Figura 17 muestra los patrones de difracción de rayos X obtenidos para las fibras de los frutos durante sus respectivas etapas inmaduro y maduro. Ambos espectros se caracterizan por un pico alto a 22.6° en el plano (002), un pico menos intenso y más ancho que aparece a aproximadamente 16.4° correspondiente al plano $(101\bar{1})$, y se observó un pico más estrecho a 34.7° en el plano (040), confirmando la naturaleza semicristalina de las fibras del fruto. Este patrón de difracción es característico de la celulosa I (celulosa nativa) que se describe como una célula monoclinica con cadenas paralelas (Gardner & Blackwell, 1974). Sin embargo, la mala definición de los resultados del patrón de difracción se debe a la contribución a la intensidad difractada, de la celulosa amorfa y otros componentes como la lignina y la hemicelulosa (Maache et al., 2017). Por lo tanto, en el patrón de difracción de cuajilote maduro, el aumento máximo

correspondiente del plano reticular (002) está relacionado con un aumento en la cristalinidad del material, lo que fue confirmado por el índice de cristalinidad (CI). El CI mostró diferencias significativas entre ambas muestras, lo que podría atribuirse al proceso de maduración. Este proceso provoca una relajación de las fibras, provocada por la degradación enzimática de la hemicelulosa y otros polisacáridos incrustados en la celulosa de las regiones amorfas, exponiéndolos, lo que lleva a un aumento porcentual en la cristalinidad de las fibras del fruto maduro. Sterling (1961) mencionó que durante el proceso de maduración, podría ocurrir una eliminación de moléculas amorfas más pequeñas, así como micelas de celulosa más accesibles, lo que daría como resultado una mayor proporción de los cristalitas más grandes y un aumento en el índice de cristalinidad. Los valores de CI del trabajo actual son más altos que los obtenidos para otras fibras; *Juncus effusus* (33.4%) (Maache et al., 2017), *Cocos nucifera* (33.63%) (NagarajaGanesh & Muralikannan, 2016) y fibra de palma (19.9%) (Abdal-Hay, Suardana, Jung, Choi, & Lim, 2012), mientras que son similares a los reportados para residuos de fibras de hojas de agave (43.2%) (Hernández-Hernández et al., 2016) o *Ficus religiosa* (42.92%) (Moshi et al., 2020). Los altos valores de % de CI encontrados en las fibras de cuajilote sugieren que esta podría ser una fuente adecuada de celulosa, y fue remarcable que las fibras de la fruta madura corresponden con altos valores de % de CI, H y E, y en consecuencia con su composición química y arquitectura celular.

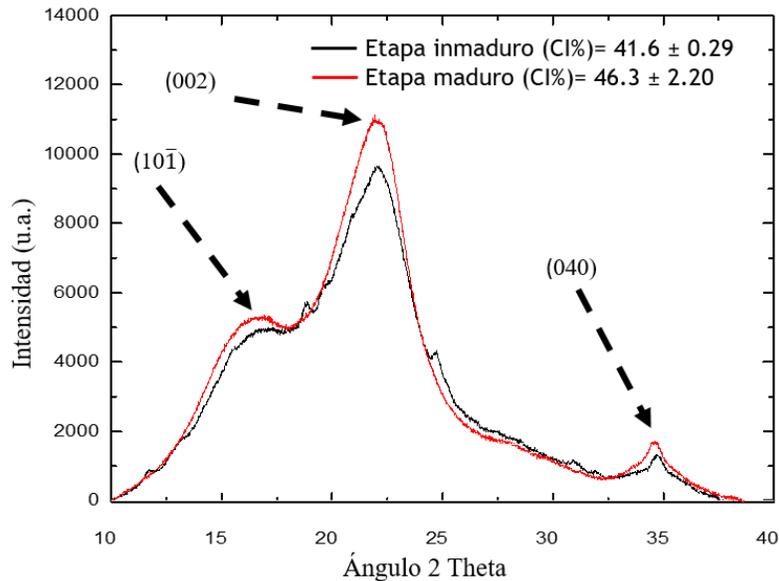


Figura 17. Difracción de Rayos X para las fibras nativas del fruto inmaduro y maduro de *Parmentiera edulis*.

6.7 Caracterización fisicoquímica y microestructural de fibras y microfibras de celulosa de frutos de cuajilote

6.7.1 Composición química de fibras nativas

De acuerdo con los resultados anteriores sobre las fibras nativas, se seleccionaron las fibras de los frutos inmaduros por su mayor contenido de celulosa y propiedades para continuar con posteriores análisis. De este modo, la composición química de las fibras crudas de *Parmentiera edulis* se muestra en el Cuadro 4, el componente principal fue celulosa con un valor de $40.45 \pm 1.09\%$, este resultado fue mayor que el obtenido de otras fuentes de fibra como *Mikania micrantha* Kunth (21.31%), *Tridax procumbens* (32%) y *Posidonia oceánica* (32.5%), así como el Cuadro 4 muestra que existen fuentes de fibras lignocelulósicas con un contenido de celulosa similar y mayor. Con respecto, a hemicelulosa las fibras de *P. edulis* mostraron un valor de $18.70 \pm 1.10\%$, que fue similar a otras fuentes de fibras (Cuadro 4). La lignina fue el segundo componente principal de las fibras de *P. edulis* mostrando un valor de $32.80 \pm 2.3\%$. El resultado fue mayor en comparación con varias fuentes de fibras

lignocelulósicas reportadas en la literatura como se muestra en el Cuadro 4. Otros componentes no celulósicos considerados amorfos en las fibras fueron cenizas y cera o extractos. En el caso de las fibras de *P. edulis*, el contenido de cenizas fue menor en comparación con otras fibras como se observa en el Cuadro 4, las cenizas son el contenido total de minerales, considerados como la fracción inorgánica en los diferentes vegetales. Las ceras o extractos tuvieron un alto valor en comparación con las diferentes fuentes de fibras lignocelulósicas presentadas en el Cuadro 4. En la literatura se ha reportado que los extractos o ceras siempre están presentes en la estructura de la fibra natural y la matriz polimérica, lo que facilita la unión interfacial de las fibras y sus componentes (Ganapathy et al., 2019; Kathirselvam et al., 2019).

Cuadro 4. Composición química de fibras de frutos de *Parmentiera edulis* y otras fuentes de fibras lignocelulósicas

Fuente de fibras	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Cenizas (%)	Extractivos (%)	Índice de cristalinidad (%)	Referencias
<i>Parmentiera edulis</i>	40.45 ± 1.09	18.70 ± 1.10	32.80 ± 2.3	1.15 ± 0.31	6.95 ± 1.8	41.51 ± 0.49	Este estudio
<i>Mikania micrantha</i> Kunth	21.31	14.61	20.67	9.11	-	11	Lim et al. (2018)
<i>Tridax procumbens</i>	32	6.8	3	-	0.71	34.46	Vijay et al. (2019)
<i>Posidonia oceanica</i>	32.5	23.3	28.2	6.4	6.5	45.05	Tarchoun, Trache, & Klapötke (2019)
Napier grass	47.1	31.2	21.6	-	-	-	Reddy et al. (2018)
Zanahoria	54.6	31.26	13.6	-	-	-	Szymanska-Chargot et al. (2017)
<i>Ficus religiosa</i>	55.58	13.86	10.13	4.86	0.72	42.92	Moshi et al. (2020)
Aloe vera fibras de cactus	60.2	14.2	13.7	-	1.5	52.6	A.N. & K.J. (2017)
<i>Coccinia grandis</i> L.	62.35	13.42	15.61	4.38	0.79	52.17	SenthamaraiKannan & Kathiresan (2018)
<i>Thespesia populnea</i>	70.12	12.64	16.34	1.80	0.76	48.17	Kathirselvam et al. (2019)

6.7.2 Morfología por FE-SEM y CLSM de fibras y microfibras

La Figura 18 a-c muestra imágenes de la apariencia visual macroscópica de fibras crudas de *P. edulis* (Figura 18a) después de cada etapa del proceso químico, fibras con tratamiento alcalino (Figura 18b) y fibras blanqueadas o microfibras de celulosa (Figura 18c). Los cambios de color muestran la efectividad del tratamiento químico hasta obtener fibras blanqueadas, desde un color marrón de las fibras crudas hasta un color blanco del producto final considerado como celulosa. La Figura 18 d-f muestra imágenes FE-SEM como una técnica exitosa para verificar los cambios en la morfología de la fibra. La figura 18d muestra la fibra cruda de *P. edulis* con una topografía muy rugosa, así como la alineación del conjunto de fibrillas lignocelulósicas helicoidales que forman la arquitectura del haz de fibras, la superficie longitudinal de la fibra presentaba una gran cantidad de impurezas relacionado con la presencia de azúcares de la fruta, ceras y restos de hemicelulosa o lignina. Para la eliminación de tales impurezas, un tratamiento químico es esencial para mejorar las propiedades de las fibras (Kathirselvam et al., 2019), de esta manera la Figura 18e muestra las fibras tratadas alcalinamente, después de esta etapa las fibras presentan una ruptura del haz vascular llamado desfibrilación, que muestra una eliminación de las diferentes impurezas superficiales y componentes no celulósicos que cementan las conexiones celulares de las fibrillas helicoidales, este hecho muestra una superficie más limpia, mejorando así la superficie de estas fibras. Observaciones similares fueron hechas por Ganapathy et al. (2019); Kathirselvam et al. (2019).

Kallel et al. (2016) reportan que este pretratamiento es muy importante para promover la desfibrilación y, posteriormente, mejorar la acción de los agentes blanqueadores. El blanqueo o la deslignificación realizada con un agente oxidante (NaClO_2) a las fibras desfibriladas se muestra en la Figura 18f, el blanqueamiento provocó la apertura de los haces de fibrillas, mostrando microfibras individuales helicoidales con formas más regulares y con superficies menos rugosas, así como una reducción de tamaño. Observaciones similares fueron hechas por Reddy et al. (2018) en fibras de pasto napier africano nativo. Otra técnica de microscopía que proporciona información sobre cambios en la morfología y distribución de componentes estructurales en materiales lignocelulósicos es la microscopia confocal a través de fluorescencia o autofluorescencia de los compuestos (Hernández-Hernández et al., 2014). La Figura 18 g-i muestra imágenes CLSM de los cambios en la distribución de celulosa-

hemicelulosa (color azul) y lignina (color verde) causadas por los diferentes tratamientos químicos para obtener microfibras de celulosa blanqueadas. La fibra cruda (Figura 18g) muestra una alta autofluorescencia causada por la lignina (verde), mientras que la fluorescencia debida a la presencia de celulosa-hemicelulosa (azul) fue mínima. Según los datos de composición química (Cuadro 4) los compuestos principales de las fibras de *P. edulis* fueron celulosa y lignina. La Figura 18h muestra los cambios microestructurales y de distribución de los compuestos, causados por la eliminación de impurezas y compuestos no celulósicos, ya que se puede observar que las fibras con tratamiento alcalino muestran una fluorescencia intensa debido a la mayor presencia de celulosa, mientras que la fluorescencia de la lignina disminuye, pero no se elimina por completo. La Figura 18i muestra las microfibras de celulosa simples blanqueadas, evidenciando que el proceso de deslignificación fue exitoso, observando una alta intensidad de la fluorescencia por celulosa y la desaparición total de la lignina. Observaciones similares se reportaron en fibras de agave (Hernández-Hernández et al., 2014).

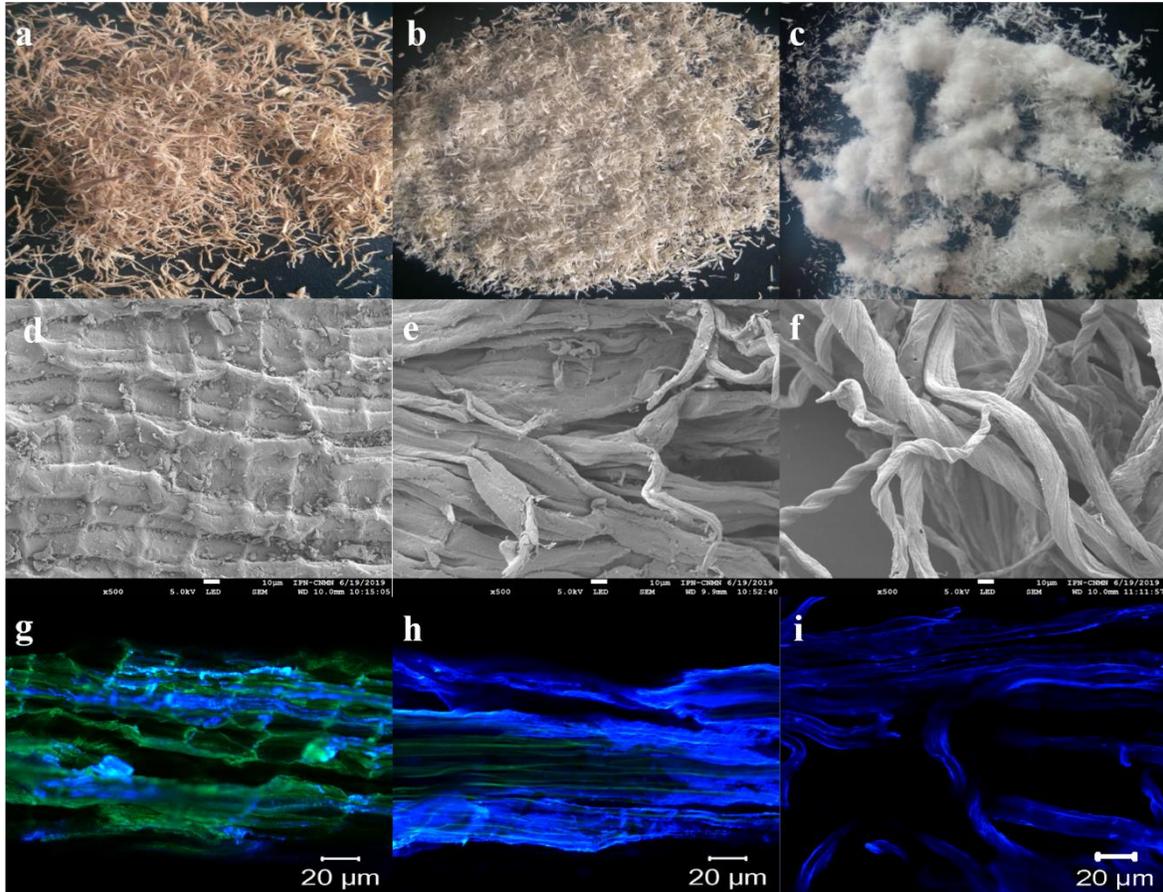


Figura 18. Imágenes del aspecto general de las fibras crudas de *P. edulis* (a), fibras con tratamiento alcalino (b) y fibras blanqueadas (c). Imágenes FE-SEM de fibras crudas (d), fibras con tratamiento alcalino (e) y microfibras simples de celulosa (f). Imágenes CLSM de fibras crudas (g), fibras con tratamiento alcalino (h) y microfibras simples de celulosa (i), el color verde corresponde a la fluorescencia de lignina y el azul a la celulosa. Barras d, e y f = 10 μm . Barras g, h y i = 20 μm .

6.7.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

FTIR es una técnica complementaria para evaluar los cambios químicos en los grupos funcionales de las muestras. La comparación entre los espectros de fibra nativa, fibra tratada alcalina y microfibras de celulosa se muestra en la Figura 19. Los espectros en las muestras mostraron los picos principales de los grupos funcionales de los componentes estructurales tales como celulosa, hemicelulosa y lignina presente en fibras vegetales. Un pico ancho a $3400\text{-}3290\text{ cm}^{-1}$ es característico del estiramiento de los grupos OH presentes en la α -celulosa de las muestras (Kathirselvam et al., 2019; Penjumras, Rahman, Talib, & Abdan, 2014). Un

pico a $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ muestra las vibraciones del estiramiento de los grupos CH y CH_2 presentes en la molécula de celulosa y hemicelulosa (Devnani & Sinha, 2019; Vijay et al., 2019). A $1740\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ en la fibra nativa y tratada aparece el pico que muestra la presencia del estiramiento de los grupos éster acetilurónico presentes en la hemicelulosa o grupos éster carboxílico de las unidades fenólicas de lignina (Kathirselvam et al., 2019; Tarchoun et al., 2019), mientras que en la muestra de microfibras de celulosa este pico desaparece, así como alrededor de 1600 cm^{-1} este pico está asociado con el agua absorbida en las muestras (A.N. & K.J., 2017; Devnani & Sinha, 2019; Fiore, Scalici, & Valenza, 2014). El pico $\sim 1430\text{-}1320 \text{ cm}^{-1}$ es característico de las flexiones de CH_2 de las cadenas de celulosa, también se conoce como la banda cristalina que se intensifica con las etapas de purificación de las fibras (Tarchoun et al., 2019). El pico a 1240 cm^{-1} que aparece en la fibra nativa es típico de la vibración C—O de los grupos arilo de la lignina, que disminuye o desaparecen por completo como resultado del tratamiento alcalino y el blanqueamiento de las fibras (Penjumras et al., 2014; Tarchoun et al., 2019). El pequeño pico a $\sim 1150 \text{ cm}^{-1}$ en las muestras de fibra tratada y blanqueada corresponde a los estiramientos de enlaces glucosídicos ($\beta\text{-}1,4$) de las unidades de D-glucosa de las cadenas de celulosa (Devnani & Sinha, 2019; Penjumras et al., 2014). El pico intenso a 1050 cm^{-1} está asociado con el estiramiento de C—O de los grupos éter e hidroxilo de celulosa (Kathirselvam et al., 2019; Ridzuan et al., 2016). El aumento del pico a $\sim 890 \text{ cm}^{-1}$ en la fibra tratada y blanqueada es característico de la mayor presencia de enlaces $\beta\text{-}1,4$ -glucosídicos entre los monosacáridos en la estructura de celulosa (Maache et al., 2017; Penjumras et al., 2014). El pico $\sim 620 \text{ cm}^{-1}$ encontrado en la región de la huella dactilar podría corresponder a las vibraciones de la estructura del anillo o la curvatura C—OH de la celulosa (Kathirselvam et al., 2019; Maache et al., 2017). FTIR muestra que los grupos funcionales de las moléculas de hemicelulosa y lignina se degradan y eliminan con el proceso químico llevado a cabo para obtener microfibras simples de celulosa, mostrando espectros similares a los obtenidos en otras fibras purificadas para obtener celulosa.

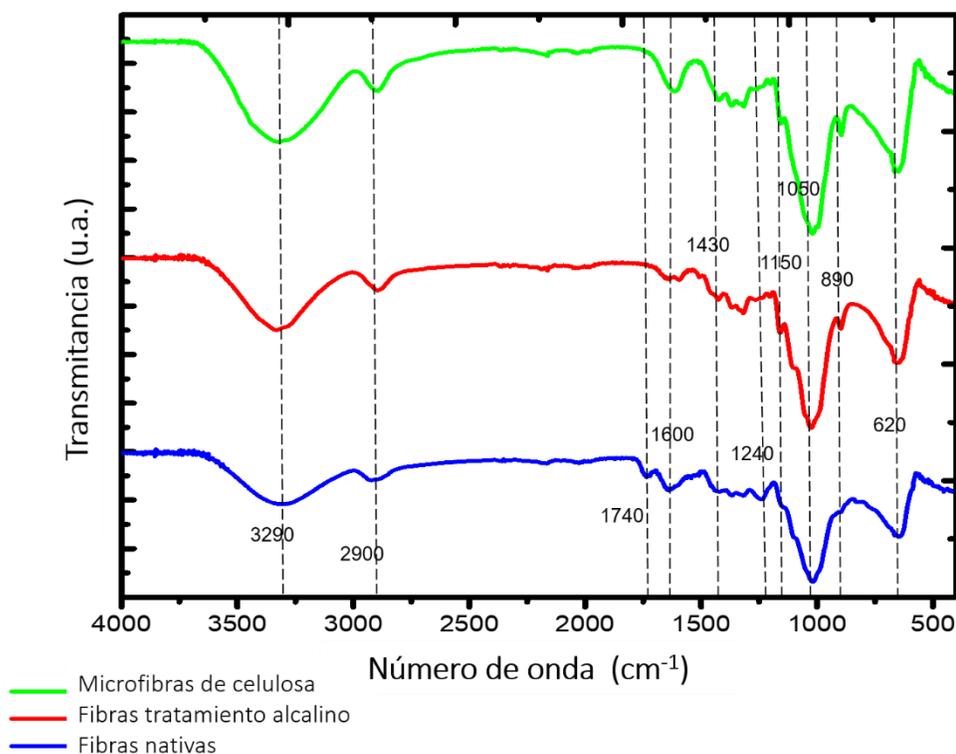


Figura 19. Grafica de FTIR de los espectros de las bandas de muestras de fibras nativas, fibras tratamiento alcalino y microfibras simples de celulosa.

6.7.4 Difracción de Rayos X (DRX)

La Figura 20 muestra los patrones de difracción de rayos X obtenidos de las muestras de fibra nativa de *P. edulis*, fibra tratada alcalina y microfibras de celulosa. Los patrones de difracción de las muestras se caracterizan por la detección de los picos principales de celulosa tipo I, que aparecen en 2θ a 16.2° , 22.4° y 34.7° , correspondientes a los planos 101, 002 y 040, respectivamente (Kathirselvam et al., 2019; Tarchoun et al., 2019). Estas características confirman la presencia de celulosa semicristalina tipo I, descrita como una celulosa monoclinica con sus cadenas paralelas (Gardner & Blackwell, 1974). Se ha reportado que las fibras nativas muestran patrones de difracción con una definición pobre, debido a que la composición de las fibras vegetales muestra una intensidad difractada por compuestos amorfos como la hemicelulosa y la lignina (Maache et al., 2017). De acuerdo con lo anterior, la fibra nativa presentó un bajo índice de cristalinidad (41.51%) pero es un resultado comparable con otras fibras vegetales como se observa en el Cuadro 4. Después del

tratamiento alcalino y el blanqueamiento, se confirma lo que se observó en FTIR, donde los picos característicos de los compuestos amorfos, como la hemicelulosa y la lignina, disminuyen o se eliminan, lo que lleva a una reorganización de las cadenas de celulosa y al aumento de la cristalinidad. Esto es evidente al observar que el pico a 22.4° se volvió más estrecho y agudo, el aumento en la cristalinidad da como resultado un valor de 59.24% para fibras con tratamiento alcalino, mientras que el índice de cristalinidad más alto se observó en microfibras de celulosa con un valor de 78.87%, estos resultados se atribuyen a que el proceso de extracción de microcelulosa fue exitoso y se verifica con las técnicas utilizadas, tales como CLSM, FTIR y DRX. El CI% de las microfibras de celulosa es comparable con otras fibras vegetales como *Posidonia oceánica* 74.23% (Tarchoun et al., 2019), *Kans grass* 76% (Devnani & Sinha, 2019), *Coccinia grandis* L. 57.64% (Senthamaraikannan & Kathiresan, 2018) o raíces aéreas del árbol de Banyan 76.35% (Ganapathy et al., 2019), por ejemplo.

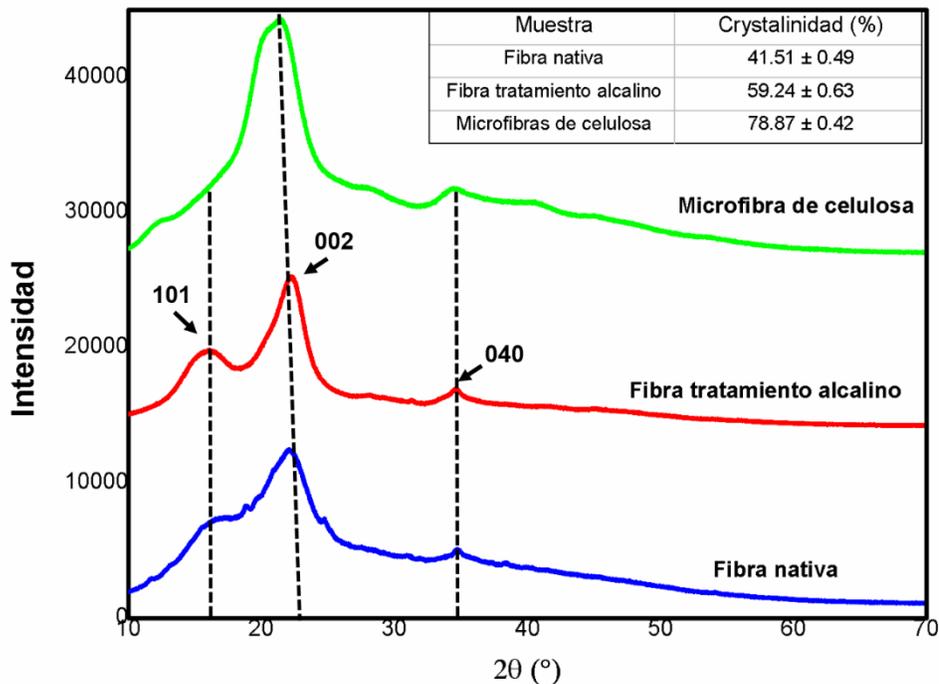


Figura 20. Patrones de difracción de Rayos X de las muestras de fibra nativa, fibras con tratamiento alcalino y microfibras de celulosa y el índice de cristalinidad (CI %).

6.7.5 Propiedades micromecánicas y morfología de superficie por AFM

Para mostrar los cambios en las propiedades micromecánicas y microestructurales provocado por el proceso de obtención de microfibras de celulosa las muestras de fibras y microfibras fueron indentadas de forma longitudinal por medio de AFM, obteniéndose los valores del Módulo de Young (E), así como también valores del perfil de rugosidad (Ra) de las muestras. En la Figura 21 se observan imágenes 2D y 3D de AFM de las muestras de fibra nativa (a y b), fibra tratada (c y d) y microfibras de celulosa (e y f). Las imágenes 2D (Figura 21a, c y e) muestran los puntos de indentación (cruces blancas) de un área de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, mientras que en las imágenes 3D (Figura 21b, d y f) evidencian la heterogeneidad de la topografía de la superficie de las muestras de fibras y microfibras. Esta topografía se evaluó por medio del perfil de rugosidad obteniéndose valores de $74.86 \pm 7.43 \text{ nm}$ para las fibras nativas siendo el valor más alto, las fibras con tratamiento alcalino sufren una disminución de 13.97% respecto a la fibra nativa, este hecho podría haber sido provocado por la desfibrilación que sufren las muestras de las fibras. Sin embargo, cuando las fibras son sometidas al proceso de purificación para obtener las microfibras de celulosa la rugosidad de estas muestras tiende a aumentar ligeramente, mejorando la rugosidad con un valor de $69.0 \pm 9.10 \text{ nm}$, los cambios de rugosidad en las muestras tienen una relación muy estrecha con la morfología, microestructura y composición química de las muestras. De esta manera, los resultados cambian con respecto a los tratamientos químicos, provocados por la eliminación de impurezas en las superficies, así como de hemicelulosa y lignina de la arquitectura celular de estos materiales (Moshi et al., 2020). Los resultados de este estudio son mayores a los reportados en otras fibras nativas y con tratamiento alcalino, en las cuales se reportan valores de 3.002 nm hasta 6.403 nm para fibras de *Thespesia populnea* (Kathirselvam et al., 2019), o las fibras de raíz de *Ficus religiosa* donde la rugosidad media fue de 7.979 nm hasta 16.149 nm (Moshi et al., 2020). En la literatura se ha mencionado que valores altos de rugosidad de este tipo de materiales son de gran interés al favorecer un mejor entrelazamiento entre las microfibras y la matriz de un material compuesto (Devnani & Sinha, 2019).

Con respecto, a los resultados del Módulo de Young para estos tres tipos de muestras se encontró que los valores de E tienden a incrementar con el proceso de purificación hasta obtener las microfibras de celulosa. La complejidad de la topografía de las muestras está relacionada a una amplia distribución del Módulo de Young, como pudo observarse en los

resultados obtenidos para las fibras nativas donde el valor del Módulo de Young tiene una amplia distribución que va de 1.145 GPa hasta los 65.677 GPa como se observa en el histograma de frecuencia para esta muestra (Figura 21b) y mostrando un valor de la media aritmética de 32.30 ± 18.49 GPa, mientras que en las fibras con tratamiento alcalino este valor aumenta al comenzar la distribución del Módulo de Young de 5.64 GPa hasta los 66.477 GPa (Figura 21e) pero el promedio de E fue de 26.03 ± 15.38 GPa, este hecho de incremento del Módulo, mejora aún más cuando las fibras tienen una mayor purificación donde se eliminan compuestos como hemicelulosa y lignina y se obtienen microfibras simples de celulosa, las cuales presentaron una mayor distribución del Módulo que se encontró entre 9.664 a 69.725 GPa (Figura 21h), mientras que el promedio de E fue de 26.98 ± 10.72 GPa. Sin embargo, estos resultados son comparables con los reportados en literatura y en donde se menciona también que tratamientos alcalinos mejoran las propiedades mecánicas al eliminar impurezas en las muestras, tal es el caso de fibras de *Acacia leucophloea* donde reportan valores para fibras nativas de 8.41-69.61 GPa y al sufrir un tratamiento alcalino de 5% en concentración este aumenta sus propiedades mecánicas del Módulo mostrando valores de 10.45 hasta 87.57 GPa (Arthanarieswaran, Kumaravel, & Saravanakumar, 2015). Otros trabajos que presentaron la misma tendencia de incrementar el Módulo fueron las fibras de *Saccharum spontaneum* (hierba Kans) donde el Módulo aumento de 8.91 a 9.88 GPa (Devnani & Sinha, 2019) y las fibras de raíz de *Ficus religiosa* mostrando valores de 5.11 GPa en fibras nativas y 8.02 GPa en fibras tratadas (Moshi et al., 2020). Las propiedades mecánicas de las fibras vegetales, así como sus productos como la celulosa pueden variar por diferentes factores como la composición química de los materiales en su microestructura celular de las capas de las paredes celulares, las fibras no son uniformes variando en tamaños, debido principalmente a la edad de la planta, sus condiciones de crecimiento y otros factores ambientales, también influyen los parámetros de los equipos de prueba. Además, en estos materiales la celulosa es el compuesto que desempeña un papel muy importante en las propiedades mecánicas provocado por la orientación lineal y su grado de polimerización de las mismas. Sin embargo, en el presente estudio se demuestra que la purificación de las fibras hasta obtener microfibras de celulosa mejora las propiedades mecánicas como el Modulo de Young, lo que indica que estas microfibras de celulosa poseen características y propiedades buenas para ser utilizadas como reforzamiento de materiales compuestos para la producción

de biomateriales. Finalmente, la celulosa de las fibras de frutos de *P. edulis* es una materia prima idónea que podría ser utilizada para obtener nanopartículas de celulosa o nanocelulosa (nanocristales o nanofibrillas) y mejorar sus propiedades micromecánicas hasta alcanzar valores de más de 100 GPa como lo reportado por Dufresne (2013).

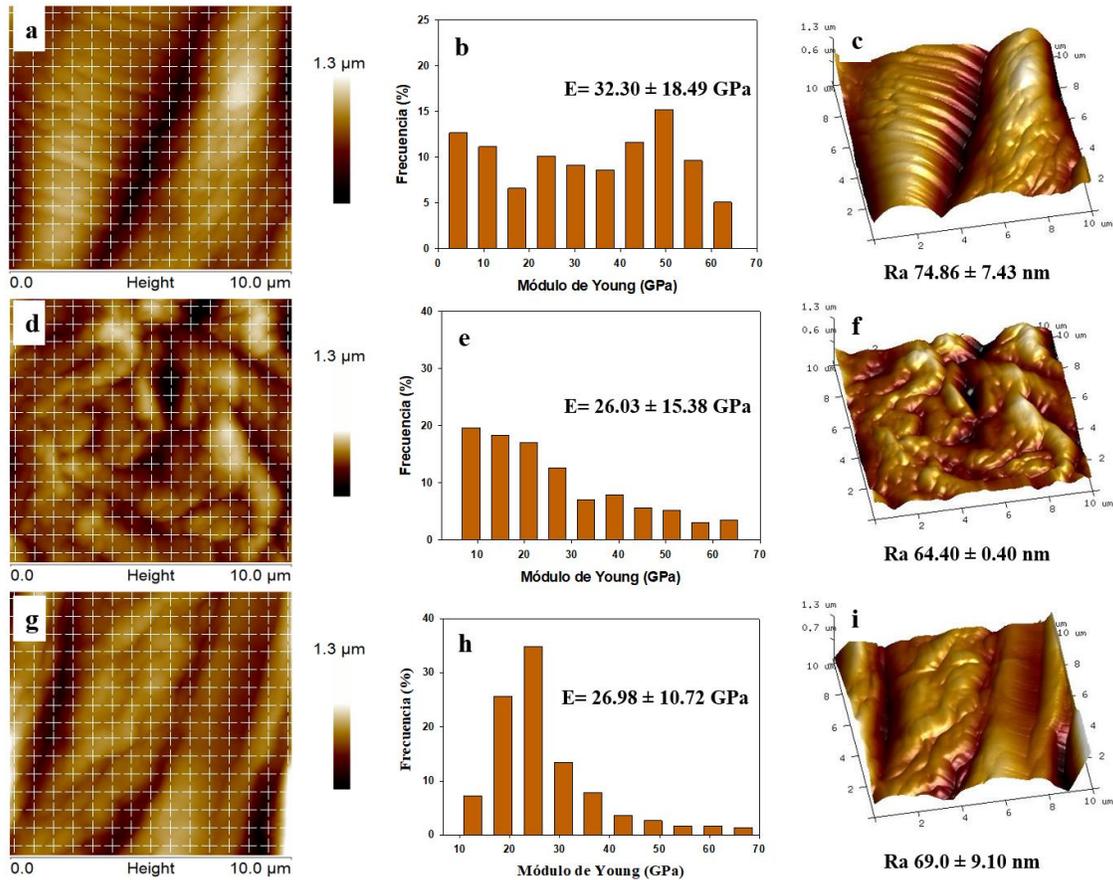


Figura 21. Imágenes 2D (a, d y g) y 3D (c, f y i) de microscopía de fuerza atómica (AFM), así como también la distribución del Módulo de Young expresado en histogramas de frecuencia (b, e y h) de las muestras de fibra nativa (a-c), fibras con tratamiento alcalino (d-f) y microfibras de celulosa (g-i). Dentro de los histogramas se encuentran los valores promedio del Módulo de Young (E) y debajo de las imágenes 3D los valores promedios de la Rugosidad (Ra) de cada muestra indentada por AFM.

7 CONCLUSIONES

En este estudio, se determinó la caracterización fisicoquímica de los frutos de *P. edulis* en etapa inmadura y madura. La caracterización microestructural del cuajilote mediante técnicas microscópicas y análisis de imágenes proporcionó información relevante de los diferentes tipos de células de cada región que constituyen la estructura del exocarpio, mesocarpio y endocarpio del fruto en ambas etapas de madurez. Esto facilitó observar las diferencias en la forma y el tamaño de las células frutales durante la etapa inmadura y madura. La información cualitativa obtenida por CLSM sobre la distribución de celulosa y lignina en las fibras mostró relación con la composición química de la fruta, observando que en la fruta madura las fibras de esclerénquima tienden a lignificarse. Los resultados obtenidos en esta investigación proporcionan la información necesaria para un criterio de selección de frutos dependiendo de la etapa de madurez donde la celulosa o la lignina se pueden extraer con los principales beneficios de sus fibras, esta información es importante para el proceso de pulpeo de las fibras. Además, el conocimiento de las propiedades micromecánicas de las fibras puede ayudar con la selección adecuada de la orientación de las fibrillas y mejorar las propiedades mecánicas de futuras aplicaciones relacionadas con los materiales compuestos.

Además, con los resultados obtenidos por las etapas de madurez de los frutos, se seleccionó el fruto inmaduro para extraer las fibras lignocelulósicas y aprovechar su mayor contenido en celulosa, de esta manera se aplicó un proceso químico-mecánico que fue exitoso para aislar microfibras simples de celulosa con buenas propiedades fisicoquímicas y micromecánicas. También es importante señalar que las fibras nativas, fibras con tratamiento alcalino y las microfibras de celulosa presentaron características similares o superiores a otras fuentes de fibras lignocelulósicas y este hecho es de suma importancia para ser considerada una fuente potencial.

En vista del hecho de que el fruto de *P. edulis* es una materia prima prometedora para obtener biopolímeros, estos hallazgos sobre el contenido de celulosa y lignina serán muy útiles cuando se considera una fuente alternativa de celulosa y lignina para futuras aplicaciones, generando un valor agregado para este cultivo y promoviendo el cultivo extensivo de la planta *P. edulis*. La novedad de esta investigación se centró en la búsqueda de nuevas fuentes de celulosa del fruto de *P. edulis*, en función de sus propiedades fisicoquímicas, estructurales

y micromecánicas, y más allá de los usos medicinales de sus propiedades. Finalmente, la investigación futura debería centrarse en la producción de pasta para aislar la celulosa o nanocelulosa u otros biopolímeros como la lignina y evaluar sus posibles aplicaciones en el desarrollo de materiales biodegradables.

8 BIBLIOGRAFÍA

- A.N., B., & K.J., N. (2017). Characterization of alkali treated and untreated new cellulosic fiber from Saharan aloe vera cactus leaves. *Carbohydrate Polymers*, 174, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.065>
- Abdal-Hay, A., Suardana, N. P. G., Jung, D. Y., Choi, K. S., & Lim, J. K. (2012). Effect of diameters and alkali treatment on the tensile properties of date palm fiber reinforced epoxy composites. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 13(7), 1199–1206. <https://doi.org/10.1007/s12541-012-0159-3>
- Abdul Khalil, H. P. S., Davoudpour, Y., Saurabh, C. K., Hossain, M. S., Adnan, A. S., Dungani, R., ... Haafiz, M. K. M. (2016). A review on nanocellulosic fibres as new material for sustainable packaging: Process and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 823–836. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.06.072>
- Adel, A. M., El-Gendy, A. A., Diab, M. A., Abou-Zeid, R. E., El-Zawawy, W. K., & Dufresne, A. (2016). Microfibrillated cellulose from agricultural residues. Part I: Papermaking application. *Industrial Crops and Products*, 93, 161–174. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.043>
- Álvarez-Olivera, P. A., Calzada-Almas, E., & Batista-Cruz, C. (2010). Etnobotánica y propagación de *Parmentiera edulis* D. C., árbol de uso múltiple en Cuba. *Revista Forestal Baracoa*, 29, 77–86.
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>
- Angón-Galván, P. (2006). *Caracterización parcial del fruto de Parmentiera edulis*. Universidad Tecnológica de la Mixteca, México.
- AOAC. (1995). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (15th ed.). Gaithersburg, MD.
- AOAC. (2007). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18th ed.). Gaithersburg, MD.

- Arthanarieswaran, V. P., Kumaravel, A., & Saravanakumar, S. S. (2015). Physico-chemical properties of alkali-treated Acacia leucophloea fibers. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 20(8), 704–713. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2015.1081133>
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., de Perea-Flores, M. J., Calderón-Domínguez, G., Moreno-Armendáriz, M. A., Calvo, H., ... Gutiérrez-López, G. (2011). Image processing applied to classification of avocado variety hass (*Persea americana* Mill.) during the ripening process. *Food Bioprocess Technology*, 4(7), 1307–1313. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0595-6>
- Ayour, J., Sagar, M., Alfeddy, M. N., Taourirte, M., & Benichou, M. (2016). Evolution of pigments and their relationship with skin color based on ripening in fruits of different Moroccan genotypes of apricots (*Prunus armeniaca* L.). *Scientia Horticulturae*, 207, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.027>
- Azeredo, H. M. C., Rosa, M. F., & Mattoso, L. H. C. (2017). Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Industrial Crops and Products*, 97, 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.013>
- Bajwa, D. S., Pourhashem, G., Ullah, A. H., & Bajwa, S. G. (2019). A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact. *Industrial Crops and Products*, 139, 111526. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111526>
- Barea-Álvarez, M., Delgado-Andrade, C., Haro, A., Olalla, M., Seiquer, I., & Rufián-Henares, J. Á. (2016). Subtropical fruits grown in Spain and elsewhere: A comparison of mineral profiles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 48, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.02.001>
- Barrera, G. N., Méndez-Méndez, J., Arzate-Vázquez, I., Calderón-Domínguez, G., & Ribotta, P. D. (2019). Nano- and micro-mechanical properties of wheat grain by atomic force microscopy (AFM) and nano-indentation (IIT) and their relationship with the mechanical properties evaluated by uniaxial compression test. *Journal of Cereal Science*, 90, 102830. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102830>

- Binoj, J. S., Raj, R. E., Sreenivasan, V. S., & Thusnavis, G. R. (2016). Morphological, physical, mechanical, chemical and thermal characterization of sustainable indian Areca fruit husk fibers (*Areca catechu* L.) as potential alternate for hazardous synthetic fibers. *Journal of Bionic Engineering*, 13, 156–165. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(14\)60170-0](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(14)60170-0)
- Bond, J., Donaldson, L., Hill, S., & Hitchcock, K. (2008). Safranin fluorescent staining of wood cell walls. *Biotechnic and Histochemistry*, 83(3–4), 161–171. <https://doi.org/10.1080/10520290802373354>
- Burton, R. A., Gidley, M. J., & Fincher, G. B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 724–732. <https://doi.org/10.1038/nchembio.439>
- Cáceres, A., Menéndez, H., Méndez, E., Cohobón, E., Samayoa, B. E., Jauregui, E., ... Carrillo, G. (1995). Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 48(2), 85–88. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01288-O](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01288-O)
- Cárdenas-Pérez, S. (2016). *Estudio de las propiedades nanomecánicas a nivel celular de frutos climatericos y su correlacion con parametros fisicoquímicos, bioquímicos y microestructurales*. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Casoti, R., Manfron, M. P., & de Oliveira, J. M. S. (2016). Ovary and fruit morphology and anatomy of *Amphilophium crucigerum*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.006>
- Charpentier Alfaro, C., & Méndez Arias, J. (2020). Enzymatic conversion of treated oil palm empty fruit bunches fiber into fermentable sugars: optimization of solid and protein loadings and surfactant effects. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00724-y>
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- De Oliveira Alves Sena, E., da Silva, P. S. O., de Araujo, H. G. S., de Aragão Batista, M. C.,

- Matos, P. N., Sargent, S. A., ... Carnellosi, M. A. G. (2019). Postharvest quality of cashew apple after hydrocooling and cold room. *Postharvest Biology and Technology*, 155, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.002>
- Deng, Y., Wu, Y., & Li, Y. (2005). Changes in firmness, cell wall composition and cell wall hydrolases of grapes stored in high oxygen atmospheres. *Food Research International*, 38(7), 769–776. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.003>
- Devnani, G. L., & Sinha, S. (2019). Extraction, characterization and thermal degradation kinetics with activation energy of untreated and alkali treated *Saccharum spontaneum* (Kans grass) fiber. *Composites Part B: Engineering*, 166, 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.02.042>
- Diaz, J. P. V., Silva, F. D. A., & D’Almeida, J. R. M. (2016). Effect of Peach Palm Fiber Microstructure on its Tensile Behavior. *BioResources*, 11(4), 10140–10157. <https://doi.org/10.15376/biores.11.4.10140-10157>
- Do Nascimento, J. R. O., Júnior, A. V., Bassinello, P. Z., Cordenunsi, B. R., Mainardi, J. A., Purgatto, E., & Lajolo, F. M. (2006). Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.11.008>
- Dos Santos, P. S. B., Da Silva, S. H. F., Erdociaa, X., Gatto, D. A., & Labidi, J. (2015). Characterization of kraft lignin precipitated with different alcohols. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 469–474. <https://doi.org/10.3303/CET1543079>
- Dufresne, A. (2012). *Nanocellulose. From nature to high performance tailored materials* (W. de G. GmbH, Ed.). <https://doi.org/10.1515/9783110480412-003>
- Dufresne, A. (2013). Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Materials Today*, 16(6), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004>
- Esan, Y. O., Omoba, O. S., & Enujiugha, V. N. (2018). Biochemical and nutritional compositions of two accessions of *Amaranthus cruentus* seed flour. *American Journal of Food Science and Technology*, 6(4), 145–150. <https://doi.org/10.12691/ajfst-6-4-3>
- Espino, E., Cakir, M., Domenek, S., Román-Gutiérrez, A. D., Belgacem, N., & Bras, J.

- (2014). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of *Agave tequilana* and barley. *Industrial Crops and Products*, 62, 552–559. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.017>
- Ezura, H., & Hiwasa-Tanase, K. (2010). Fruit development. In E. C. Pua & M. R. Davey (Eds.), *Plant developmental biology-biotechnological perspectives* (Berlin Hei, Vol. 1, pp. 301–318). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02301-9>
- Fahma, F., Iwamoto, S., Hori, N., Iwata, T., & Takemura, A. (2011). Effect of pre-acid-hydrolysis treatment on morphology and properties of cellulose nanowhiskers from coconut husk. *Cellulose*, 18, 443–450. <https://doi.org/10.1007/s10570-010-9480-0>
- Fairchild, M. D. (2013). *Color appearance models* (3rd ed.; Wiley, Ed.). Oxford, England.
- Farhat, W., Venditti, R., Ayoub, A., Prochazka, F., Fernández-de-Alba, C., Mignard, N., ... Becquart, F. (2018). Towards thermoplastic hemicellulose: Chemistry and characteristics of poly-(ϵ -caprolactone) grafting onto hemicellulose backbones. *Materials and Design*, 153, 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.05.013>
- Faruk, O., Bledzki, A. K., Fink, H. P., & Sain, M. (2012). Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000-2010. *Progress in Polymer Science*, 37(11), 1552–1596. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.04.003>
- Faruk, O., & Sain, M. (2016). *Lignin in polimer composites* (1st ed.). Kidlington, Oxford: William Andrew/Elsevier.
- Fiore, V., Scalici, T., & Valenza, A. (2014). Characterization of a new natural fiber from *Arundo donax* L. as potential reinforcement of polymer composites. *Carbohydrate Polymers*, 106, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.016>
- Ganapathy, T., Sathiskumar, R., Senthamarai kannan, P., Saravanakumar, S. S., & Khan, A. (2019). Characterization of raw and alkali treated new natural cellulosic fibres extracted from the aerial roots of banyan tree. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.136>
- García-Castillo, C. G., Martínez-Tinajero, J. J., Montañez-Valdez, O. D., Sánchez-Orozco, L., Posada-Cruz, S., Izaguirre-Flores, F., & Martínez-Priego, G. (2008). Degradación

ruminal de la materia seca del fruto cuajilote (*Parmentiera edulis*). *Zootecnia Tropical*, 26(1), 1–8.

García-Plazaola, J. I., Fernández-Marín, B., Duke, S. O., Hernández, A., López-Arbeloa, F., & Becerril, J. M. (2015). Autofluorescence: Biological functions and technical applications. *Plant Science*, 236, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.010>

García, A., Gandini, A., Labidi, J., Belgacem, N., & Bras, J. (2016). Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. *Industrial Crops and Products*, 93, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.004>

Gardner, K. H., & Blackwell, J. (1974). The structure of native cellulose. *Biopolymers*, 13(10), 1975–2001. <https://doi.org/10.1002/bip.1974.360131005>

Gómez, C. C. E., Ordaz, C. P., San Martín, E. M., Pérez, N. H., Pérez, G. I., & Gómez, M. del C. G. (2016). Cytotoxic effect and apoptotic activity of *Parmentiera edulis* DC. hexane extract on the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(1), 015–022. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.600103>

Goudenhoofft, C., Siniscalco, D., Arnould, O., Bourmaud, A., Sire, O., Gorshkova, T., & Baley, C. (2018). Investigation of the mechanical properties of flax cell walls during plant development: The relation between performance and cell wall structure. *Fibers*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.3390/fib6010006>

Hernandez-Galicia, E., Aguilar-Contreras, A., Aguilar-Santamaria, L., Roman-Ramos, R., Chavez-Miranda, A. A., Garcia-Vega, L. M., ... Alarcon-Aguilar, F. J. (2002). Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 45, 118–124.

Hernández-Hernández, H. M., Chanona-Pérez, J. J., Vega, A., Ligeró, P., Mendoza-Pérez, J. A., Calderón-Domínguez, G., ... Farrera-Rebollo, R. R. (2016). Acetosolv treatment of fibers from waste agave leaves: Influence of process variables and microstructural study. *Industrial Crops and Products*, 86, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.043>

- Hernández-Hernández, Hilda M., Chanona-Pérez, J. J., Calderón-Domínguez, G., Perea-Flores, M. J., Mendoza-Pérez, J. A., Vega, A., ... Farrera-Rebollo, R. R. (2014). Evaluation of agave fiber delignification by means of microscopy techniques and image analysis. *Microscopy and Microanalysis*, 20(5), 1436–1446. <https://doi.org/10.1017/S1431927614012987>
- Hokkanen, S., Bhatnagar, A., & Sillanpää, M. (2016). A review on modification methods to cellulose-based adsorbents to improve adsorption capacity. *Water Research*, 91, 156–173. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.01.008>
- Hoppert, M. (2003). Microscopic Techniques in Biotechnology. In *Microscopic Techniques in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/3527602615>
- Jiang, J., Wang, J., Zhang, X., & Wolcott, M. (2017). Microstructure change in wood cell wall fracture from mechanical pretreatment and its influence on enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 97, 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.001>
- Kai, D., Tan, M. J., Chee, P. L., Chua, Y. K., Yap, Y. L., & Loh, X. J. (2016). Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chemistry*, 18(5), 1175–1200. <https://doi.org/10.1039/c5gc02616d>
- Kallel, F., Bettaieb, F., Khiari, R., García, A., Bras, J., & Chaabouni, S. E. (2016). Isolation and structural characterization of cellulose nanocrystals extracted from garlic straw residues. *Industrial Crops and Products*, 87, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.060>
- Kathirselvam, M., Kumaravel, A., Arthanarieswaran, V. P., & Saravanakumar, S. S. (2019). Assessment of cellulose in bark fibers of *Thespesia populnea*: Influence of stem maturity on fiber characterization. *Carbohydrate Polymers*, 212, 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.072>
- Keijsers, E. R. P., Yilmaz, G., & Van Dam, J. E. G. (2013). The cellulose resource matrix. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.110>
- Keryvin, V., Lan, M., Bourmaud, A., Parenteau, T., Charleux, L., & Baley, C. (2015).

- Analysis of flax fibres viscoelastic behaviour at micro and nano scales. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 68, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2014.10.006>
- Kingston, C. M. (1992). Maturity indices for apple and pear. In J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews* (Vol. 13, pp. 407–432). <https://doi.org/10.1002/9780470650509.ch10>
- Klemm, D., Cranston, E. D., Fischer, D., Gama, M., Kedzior, S. A., Kralisch, D., ... Rauchfuß, F. (2018). Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. *Materials Today*, 21, 720–748. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2018.02.001>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Knox, J. P. (2008). Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.001>
- Lara, I., Belge, B., & Goulao, L. F. (2014). The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.08.012>
- Lei, B., & Feng, Y. (2020). Sustainable thermoplastic bio-based materials from sisal fibers. *Journal of Cleaner Production*, 265, 121631. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121631>
- Lohmann, L. G., & Taylor, C. M. (2014). A new generic classification of tribe Bignoniaceae (Bignoniaceae) 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 99(3), 348–489. <https://doi.org/10.3417/2003187>
- Maache, M., Bezazi, A., Amroune, S., Scarpa, F., & Dufresne, A. (2017). Characterization of a novel natural cellulosic fiber from *Juncus effusus* L. *Carbohydrate Polymers*, 171, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.096>
- Magalhães, D. S., Ramos, J. D., Pio, L. A. S., Vilas Boas, E. V. de B., Pasqual, M., Rodrigues,

- F. A., ... Santos, V. A. dos. (2019). Physical and physicochemical modifications of white-fleshed pitaya throughout its development. *Scientia Horticulturae*, 243, 537–543. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.029>
- Marin-Bustamante, M. Q., Chanona-Pérez, J. J., Guemes-Vera, N., Arzate-Vázquez, I., Perea-Flores, M. J., Mendoza-Pérez, J. A., ... Casarez-Santiago, R. G. (2018). Evaluation of physical, chemical, microstructural and micromechanical properties of nopal spines (*Opuntia ficus-indica*). *Industrial Crops and Products*, 123, 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.030>
- Martínez-Torres, Z., & Diego-Pérez, N. (2006). Flora de Guerrero. Bignoniaceae. In U. Facultad de Ciencias (Ed.), *Flora de Guerrero* (1a ed.). Mexico: Las prensas de ciencias.
- Melikoğlu, A. Y., Bilek, S. E., & Cesur, S. (2019). Optimum alkaline treatment parameters for the extraction of cellulose and production of cellulose nanocrystals from apple pomace. *Carbohydrate Polymers*, 215, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.103>
- Mohammad, M., & Ding, P. (2019). Physico-textural and cellular structure changes of *Carissa congesta* fruit during growth and development. *Scientia Horticulturae*, 246, 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.024>
- Mondal, S. (2017). Preparation, properties and applications of nanocellulosic materials. *Carbohydrate Polymers*, 163, 301–316. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.050>
- Moshi, A. A. M., Ravindran, D., Bharathi, S. R. S., Indran, S., Saravanakumar, S. S., & Liu, Y. (2020). Characterization of a new cellulosic natural fiber extracted from the root of *Ficus religiosa* tree. *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.094>
- NagarajaGanesh, B., & Muralikannan, R. (2016). Physico-chemical, thermal, and flexural characterization of *Cocos nucifera* fibers. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 21(3), 244–250. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2016.1139359>
- Nechporchuk, O., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2016). Production of cellulose nanofibrils:

- A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*, 93, 2–25.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.016>
- Ng, H. M., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Hui, D., Low, C. Y., & Rahmat, A. R. (2015). Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. *Composites Part B: Engineering*, 75, 176–200.
<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2015.01.008>
- Nicolás-Álvarez, D. E., Andraca-Adame, J. A., Chanona-Pérez, J. J., Méndez-Méndez, J. V., Cárdenas-Pérez, S., & Rodríguez-Pulido, A. (2019). Evaluation of nanomechanical properties of tomato root by atomic force microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, 25, 989–997. <https://doi.org/10.1017/S1431927619014636>
- Nicolás-Bermúdez, J., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., Méndez-Méndez, J. V., Rodríguez-Castro, G. A., & Martínez-Gutiérrez, H. (2018). Morphological and micromechanical characterization of calcium oxalate (CaOx) crystals embedded in the pecan nutshell (*Carya illinoensis*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 566–570.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.008>
- Oliver, W. C., & Pharr, G. M. (1992). An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Materials Research Society*, 7(6), 1564–1583. <https://doi.org/doi:10.1557/jmr.1992.1564>
- Peng, P., & She, D. (2014). Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. *Carbohydrate Polymers*, 112, 701–720.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.068>
- Penjumras, P., Rahman, R. B. A., Talib, R. A., & Abdan, K. (2014). Extraction and characterization of cellulose from durian rind. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.034>
- Pennington, T. D., & Sarukhán, J. (1998). *Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies* (UNAM-FCE, Ed.). México: UNAM-FCE.
- Perea-Flores, M. de J. (2011). *Efecto del secado por lecho fluidizado en la estructura de semillas de Ricinus communis y en la extracción de su aceite como fuente alternativa*

de biocombustibles. Instituto Politécnico Nacional, México.

- Perea-Flores, M. J., Chanona-Pérez, J. J., Garibay-Febles, V., Calderón-Dominguez, G., Terrés-Rojas, E., Mendoza-Pérez, J. A., & Herrera-Bucio, R. (2011). Microscopy techniques and image analysis for evaluation of some chemical and physical properties and morphological features for seeds of the castor oil plant (*Ricinus communis*). *Industrial Crops and Products*, *34*, 1057–1065. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.015>
- Pérez-Gutiérrez, R. M., Pérez-González, C., Zavala-Sánchez, M. A., & Pérez-Gutiérrez, S. (1998). Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud Publica de Mexico*, *40*(4), 354–358.
- Perez, R. M., Perez, C., Zavala, M. A., Perez, S., Hernandez, H., & Lagunes, F. (2000). Hypoglycemic effects of lactucin-8-O-methylacrylate of *Parmentiera edulis* fruit. *Journal of Ethnopharmacology*, *71*(3), 391–394. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00212-3)
- Phanthong, P., Reubroycharoen, P., Hao, X., Xu, G., Abudula, A., & Guan, G. (2018). Nanocellulose: Extraction and application. *Carbon Resources Conversion*, *1*, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.004>
- Raman, V., Budel, J. M., Zhao, J., Bae, J. Y., Avula, B., Osman, A. G., ... Khan, I. A. (2018). Microscopic characterization and HPTLC of the leaves, stems and roots of *Fadogia agrestis* – an African folk medicinal plant. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, *28*, 631–639. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.07.006>
- Reddy, K. O., Maheswari, C. U., Dhlamini, M. S., Mothudi, B. M., Kommula, V. P., Zhang, J., ... Rajulu, A. V. (2018). Extraction and characterization of cellulose single fibers from native african napier grass. *Carbohydrate Polymers*, *188*, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.110>
- Ridzuan, M. J. M., Abdul Majid, M. S., Afendi, M., Aqmariah Kanafiah, S. N., Zahri, J. M., & Gibson, A. G. (2016). Characterisation of natural cellulosic fibre from *Pennisetum purpureum* stem as potential reinforcement of polymer composites. *Materials and Design*, *89*, 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2015.10.052>

- Ruiz-Palomero, C., Soriano, M. L., & Valcárcel, M. (2017). Nanocellulose as analyte and analytical tool: Opportunities and challenges. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 87, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.11.007>
- Ruiz, M. S., Yasuor, H., Ben-Gal, A., Yermiyahu, U., Saranga, Y., & Elbaum, R. (2015). Salinity induced fruit hypodermis thickening alters the texture of tomato (*Solanum lycopersicum* Mill) fruits. *Scientia Horticulturae*, 192, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.002>
- Sanjay, M. R., Madhu, P., Jawaid, M., SenthamaraiKannan, P., Senthil, S., & Pradeep, S. (2018). Characterization and properties of natural fiber polymer composites: A comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*, 172, 566–581. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.101>
- Sanjay, M. R., Siengchin, S., Parameswaranpillai, J., Jawaid, M., Pruncu, C. I., & Khan, A. (2019). A comprehensive review of techniques for natural fibers as reinforcement in composites: Preparation, processing and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 207, 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.083>
- Santos, R. M. dos, Flauzino Neto, W. P., Silvério, H. A., Martins, D. F., Dantas, N. O., & Pasquini, D. (2013). Cellulose nanocrystals from pineapple leaf, a new approach for the reuse of this agro-waste. *Industrial Crops and Products*, 50, 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.049>
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10), 786–794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>
- SenthamaraiKannan, P., & Kathiresan, M. (2018). Characterization of raw and alkali treated new natural cellulosic fiber from *Coccinia grandis*.L. *Carbohydrate Polymers*, 186, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.072>
- Siqueira, G., Oksman, K., Tadokoro, S. K., & Mathew, A. P. (2016). Re-dispersible carrot nanofibers with high mechanical properties and reinforcing capacity for use in composite materials. *Composites Science and Technology*, 123, 49–56.

<https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2015.12.001>

- Sterling, C. (1961). Physical state of cellulose during ripening of peach. *Journal of Food Science*, 26(2), 95–98. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2621.1961.tb00775.x>
- Sun, Y., Singh, Z., Tokala, V. Y., & Heather, B. (2019). Harvest maturity stage and cold storage period influence lemon fruit quality. *Scientia Horticulturae*, 249, 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.056>
- Szymanska-Chargot, M., Chylinska, M., Gdula, K., Koziol, A., & Zdunek, A. (2017). Isolation and characterization of cellulose from different fruit and vegetable pomaces. *Polymers*, 9(10), 495. <https://doi.org/10.3390/polym9100495>
- Talamond, P., Verdeil, J. L., & Conéjéro, G. (2015). Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules*, 20, 5024–5037. <https://doi.org/10.3390/molecules20035024>
- TAPPI. (2002). *Technical Association of the Pulp and Paper Industry* (T. Press, Ed.). Technology Park, Atlanta.
- Tarchoun, A. F., Trache, D., & Klapötke, T. M. (2019). Microcrystalline cellulose from *Posidonia oceanica* brown algae: Extraction and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.176>
- Tobimatsu, Y., Wouwer, D. Van De, Allen, E., Kumpf, R., Vanholme, B., Boerjan, W., & Ralph, J. (2014). A click chemistry strategy for visualization of plant cell wall lignification. *Chemical Communications*, 50(82), 12262–12265. <https://doi.org/10.1039/c4cc04692g>
- Torres-Rivera, J. A. (2018). *Parmentiera aculeata* (Kunth) Seem. In *Recursos arbóreos y arbustivos tropicales para una ganadería bovina sustentable* (pp. 87–95). Universidad Autónoma de Chapingo, Mexico: Universidad de Colima.
- Valerga, L., Darré, M., Zaro, M. J., Arambarri, A., Vicente, A. R., Lemoine, M. L., & Concellón, A. (2019). Micro-structural and quality changes in growing dark-purple eggplant (*solanum melongena* L.) as affected by the harvest season. *Scientia*

- Horticulturae*, 244, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.032>
- van Dam, J. E. G., & Gorshkova, T. A. (2003). Fiber Formation. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 87–96. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227050-9/00046-6>
- Vélez-Rivera, N., Blasco, J., Chanona-Pérez, J., Calderón-Domínguez, G., de Jesús Perea-Flores, M., Arzate-Vázquez, I., ... Farrera-Rebollo, R. (2014). Computer vision system applied to classification of “Manila” mangoes during ripening process. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), 1183–1194. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1142-4>
- Veraverbeke, E. A., Van Bruaene, N., Van Oostveldt, P., & Nicolai, B. M. (2001). Non destructive analysis of the wax layer of apple (*Malus domestica* Borkh.) by means of confocal laser scanning microscopy. *Planta*, 213(4), 525–533. <https://doi.org/10.1007/s004250100528>
- Vijay, R., Lenin Singaravelu, D., Vinod, A., Sanjay, M. R., Siengchin, S., Jawaid, M., ... Parameswaranpillai, J. (2019). Characterization of raw and alkali treated new natural cellulosic fibers from *Tridax procumbens*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.056>
- Villar-Herrera, S. L. (2011). *Evaluación nutrimental del fruto Parmentiera edulis para su posible utilizacion en la industria alimentaria*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Wu, Y., Wang, S., Zhou, D., Xing, C., Zhang, Y., & Cai, Z. (2010). Evaluation of elastic modulus and hardness of crop stalks cell walls by nano-indentation. *Bioresource Technology*, 101(8), 2867–2871. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.074>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 751–774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zarrouk, O., Pinheiro, C., Misra, C. S., Fernández, V., & Chaves, M. M. (2018). Fleshy fruit epidermis is a protective barrier under water stress. In *Water Scarcity and Sustainable Agriculture in Semiarid Environment*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813164->

0.00020-x

- Zhang, C., Xiong, Z., Yang, H., & Wu, W. (2019). Changes in pericarp morphology, physiology and cell wall composition account for flesh firmness during the ripening of blackberry (*Rubus* spp.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 250, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.015>
- Zhong, R., & Ye, Z. H. (2015). Secondary cell walls: Biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant and Cell Physiology*, 56(2), 195–214. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu140>

ANEXOS

RESEARCH ARTICLE

Study of cellular architecture and micromechanical properties of cuajilote fruits (*Parmentiera edulis* D.C.) using different microscopy techniques

Macario Vicente-Flores^{1,2} | Norma Güemes-Vera¹ | José Jorge Chanona-Pérez²  |
María de Jesús Perea-Flores³ | Israel Arzate-Vázquez³ | Aurora Quintero-Lira¹ |
Cinthia Erika Sánchez-Fuentes²

¹Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo, Hidalgo, Mexico

²Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, CDMX, Mexico

³Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías, Instituto Politécnico Nacional, CDMX, Mexico

Correspondence

Jorge J. Chanona-Pérez, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu Esq. Cda. Miguel Stampa s/n. C.P. 07738, Delegación Gustavo A. Madero, CDMX, Mexico.
Email: jorge_chanona@hotmail.com

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 239899 and 268660; Programa de Fortalecimiento de Instituciones Educativas-UAEH, Grant/Award Number: 2017-2018; Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, Grant/Award Number: 20180455, 20195158, 20195857, and 20200506

Abstract

The cuajilote (*Parmentiera edulis* D.C.) tree produces fibrous fruits with a high content of lignocellulosic compounds. However, this fruit and their fibers have been scarcely studied. For this reason, an integral study of their cellular architecture, physicochemical, micromechanical, and structural properties in two maturity stages were carried out. Physicochemical tests, light, confocal and electron microscopy, microindentation, and X-ray diffraction were used for the characterization of fruit and their fibers. Chemical analysis showed that the unripe fruits have the highest cellulose content (42.17%), but in ripe fruit the cellulose content decreases (32.76%) while lignin content increases from 35.26 to 40.79%, caused by the lignification of the sclerenchyma fibers. Microstructural and micromechanical studies in the different regions of the fruit provided relevant information about its cellular architecture, distribution of lignocellulosic compounds and its role in the micromechanical properties of their fibers. The thickening cell wall of sclerenchyma fibers was caused by the cellular lignification of the ripe fruits. According to the physicochemical and structural studies, cuajilote fibers are comparable to other fibers obtained from crops rich in lignocellulosic compounds. The current study provided new knowledge about the cellular architecture of fruit and criteria for selecting the ripening stage adequate for the extraction of cellulose or lignin. Furthermore, information regarding the micromechanical properties of their fibers and which structural arrangement could be more convenient for mechanical reinforcement of biodegradable materials was obtained.

KEYWORDS

lignocellulosic fibers, microindentation, microscopy techniques, sclerenchyma fibers, X-ray diffraction

1 | INTRODUCTION

Parmentiera edulis D.C. is distributed in the tropical and subtropical regions of Mexico along the Pacific coast and Gulf of Mexico, with its natural habitat reaching as far as El Salvador and Honduras (Andrade-

Cetto & Heinrich, 2005; Pennington & Sarukhán, 1998). In spring and summer, the tree produces cylindrical and longitudinally furrowed fruits, with sizes ranging from 5 to 23 cm in longitude and from 2 to 6.5 cm in diameter, depending on its maturity stage (Martínez-Torres & Diego-Pérez, 2006; Torres-Rivera, 2018). *P. edulis* fruit has

acquired several colloquial names, but "cuajilote" is the most frequently used name. The trees have a high yield (approximately 300 kg of fruit per tree), and is easy to cultivate (Álvarez-Olivera, Calzada-Almas, & Batista-Cruz, 2010; Angón-Galván, 2006). Bark, flowers and fruits of this tree have been used for treating some diseases such as diabetes, gonorrhoea, colds and dropsy reported in the literature (Andrade-Cetto & Heinrich, 2005; Cáceres et al., 1995; Gómez et al., 2016; Hernandez-Galicia et al., 2002). Other studies have reported some fruit's properties, specifically the quantification of some of its macronutrients and micronutrients (Angón-Galván, 2006; Torres-Rivera, 2018), but the information collected is still scarce. Physicochemical, structural, and micromechanical characterization would provide useful information for the industrial use of this fruit and their fibers. In order to make the best use of the fruit's structural compounds (cellulose and lignin) it is important to know the cellular architecture of the lignocellulosic fibers. These fibers are mostly extracted from agro-industrial waste, but the search for new alternative sources such as plants, fruits and roots are of increasing interest. Therefore, this study of a new source of cellulose and lignin and how best to exploit these substances could provide new and important information (García, Gandini, Labidi, Belgacem, & Bras, 2016).

The properties of the lignocellulosic material sources vary widely depending on the physicochemical composition, cell structure, crop season, geographical region, age of the plant, and fruit maturity stage, among other factors (Binoj, Raj, Sreenivasan, & Thusnavis, 2016). Thus, it is necessary to carry out studies related to these issues, starting with the physicochemical characterization at different maturity stages which will provide valuable information on the plant's potential as a source of lignocellulosic materials (Sanjay et al., 2018). Moreover, microscopy techniques in combination with image analysis, microindentation and X-ray diffraction (XRD) will yield important information about cellular structure, distribution and relative abundance of the biopolymers into plant materials and the crystalline arrangement of their structural components, as well as new data on the fibers' hardness and stiffness (Hernández-Hernández et al., 2014; Marin-Bustamante et al., 2018; Wu et al., 2010).

This information could be useful for determining whether the fruit's raw material is an adequate source of cellulose and lignin, while these studies could also provide criteria for choosing the most suitable ripening stage for the extraction of their biopolymers (Szymanska-Chargot, Chylinska, Gdula, Koziol, & Zdunek, 2017). The current importance of the search for alternative sources of structural biopolymers such as cellulose and lignin, it is that there is increasing interest in their use in the reinforcement of environmentally friendly biomaterials (Azeredo, Rosa, & Mattoso, 2017; Lei & Feng, 2020; Sanjay et al., 2019). In this sense several crops such as carrot, cucumber, apple (Szymanska-Chargot et al., 2017), *Agave tequilana* (Espino et al., 2014), coconut husks (Fahma, Iwamoto, Hori, Iwata, & Takemura, 2011), pineapple leaves (Santos et al., 2013), among others, have been used as a source for obtaining cellulose. These polymers have several applications as nanocomposites in the reinforcement of materials in the packaging industry, sustainable thermoplastics, for material in medical fields, the paper industry, electronics or biomass for biorefinery, among other industries (Charpentier Alfaro & Méndez Arias, 2020; Klemm

et al., 2018; Lei & Feng, 2020; Mondal, 2017). While lignin is frequently used for its adhesive properties, and it is mixed with other polymers to improve the plasticity and adhesion of materials (Bajwa, Pourhashem, Ullah, & Bajwa, 2019; Faruk & Sain, 2016).

Therefore, the aim of this work was to perform a physicochemical, structural and micromechanical characterization of the cuajilote fruit and its fibers at the unripe and ripe stage, using microscopy techniques, image analysis, microindentation and XRD. Consequently, this work provides valuable and unpublished information on the fruits of *P. edulis* with regards to its cellular architecture, physicochemical, micromechanical and structural properties at different maturity stages. On the basis of the information obtained, it is proposed that this fruit may be an alternative source of lignocellulosic compounds depending on the ripening stage, where cellulose or lignin can be extracted selectively from its fibers with greater benefits. Finally, the current study could provide guidelines for the characterization of other lignocellulosic crops, where the maturity stage is an important criterion for the extraction of these biopolymers.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Raw material

Cuajilote fruits were harvested from trees in the private orchards of the township of Venustiano Carranza, Puebla, Mexico (20°30'18.72" latitude N, 97°40'8.04" longitude W and an average elevation of 136 m with the highest point 500 m). The fruits were manually collected from approximately 15 trees based on their stage of maturity through visual perception of color with the help of the personal experience of the farmers during the summer months of June and August 2018. A total of 30 fruits were evaluated for each maturity stage, with fruits that had a green color classified as unripe (5 weeks after anthesis) and yellow fruits classified as ripe (6–7 weeks after anthesis).

2.2 | Physicochemical analysis

Fresh weight, diameter, length and peel color of fruits were evaluated. The weight was measured on a digital balance (OHAUS Model Scout Pro SP2001). Fruit diameter was measured in the equatorial part of the fruit with a Vernier caliper (Neiko 01407A) and the length was measured from the apical and basal ends of the fruit with a tape measure (Magalhães et al., 2019). The peel color was determined using a spectrophotometer (Minolta CM-508d), using CIE $L^*a^*b^*$ color space (D65 illuminant and standard angle of 10°). Color differences (ΔE) were calculated using the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

where $\Delta L^* = L^* - L_0^*$; $\Delta a^* = a^* - a_0^*$; $\Delta b^* = b^* - b_0^*$; the initial color parameters (L_0^* , a_0^* and b_0^*) correspond to the values obtained from unripe fruits (Arzate-Vázquez et al., 2011).

Total soluble solids (TSS), firmness (F) and titratable acidity (TA) were obtained to evaluate the ripening stage of fruits. For TSS a digital refractometer (PR-101ATAGO PALETTE) was used, according to method 932.12 (AOAC, 1995). The AOAC (1995) 942.15 method was used to determine TA, expressing the value obtained as % citric acid (using the milliequivalent factor of 0.064). The firmness of the fruits was measured using a texturometer (CT3 Brookfield) equipped with a load cell of 10 kg, constant speed of 0.5 mm/s, an activation load of 0.01 N, using the probe TA39 for the penetration. Six different points in the fruit were evaluated, with a maximum penetration depth of 9 mm (De Oliveira Alves Sena et al., 2019).

Additionally, AOAC (2007) methods were used to complement the chemical characterization of the fruits in both maturity stages: moisture: (920.36, 2007), ash: (942.05, 2007), ethereal extract: soxhlet method (954.02, 2007), raw fiber: (991.43, 2007), protein (N x 6.25) by Kjeldahl method (954.01, 2007) and carbohydrates were calculated by the percentage differences. Technical Association of Pulp and Paper Industry (TAPPI, 2002) methods were used to evaluate the cellulose and hemicellulose (T257 om-09) and Klason lignin (T222 om-11). All determinations were obtained from 4 replicates of 5 fruits for each maturity stage, except for firmness and color which were obtained from 6 replicates.

2.3 | Microstructural characterization

For light microscopy (LM), three fruits were sectioned for each stage of maturity in a transverse and longitudinal manner in approximately 1.0 cm cubes located in exocarp, mesocarp and endocarp regions. These cubes were prepared for their histological cut using paraffin technique (Raman et al., 2018), using tissue embedding center (KD-BM II, Kede, China) and sections measuring 16 μm thick were sliced with a microtome (RM 2235, Leica, Germany). The sections were placed in a water bath with histological gelatin for the adhesion of tissue on the glass slides. Paraffin was removed, first at 58°C for 48 hr, then using xylol (100%) and the samples were hydrated in a series of ethanol (96, 70, and 25%) for 20 min. Then, the sections were stained with Schiff's reagent and toluidine blue (0.5%) was used to provide evidence of the polysaccharides and lignocellulosic compounds, respectively, in the general microstructure (Casoti, Manfron, & de Oliveira, 2016). The sections were then mounted on the glass slides with a drop of Entellan mounting medium and finally the samples were visualized with light microscope (Eclipse Ti-U, Nikon, Japan).

Cross sections (1 mm thickness) of unripe and ripe fruits were observed, exploring the exocarp, mesocarp and endocarp with a confocal laser scanning microscope, (CLSM, LSM 710 NLO, Carl Zeiss, Germany). The samples were stained with a white M2R solution of calcofluor (0.05%) for 30 seconds and then washed for 5 min to show cellulose-hemicellulose. The lignin and photosynthetic pigments (chlorophylls) were monitored taking advantage of these compounds' autofluorescence. The excitation wavelengths used were 488 nm for lignin, and 405 nm for cellulose-hemicellulose and chlorophylls (Hernández-Hernández et al., 2014). In the case of raw fibers, staining

was performed using a similar method with calcofluor for 5 min for cellulose-hemicellulose, while for lignin, 0.01% safranin was used for 1 min and then washed with distilled water (Bond, Donaldson, Hill, & Hitchcock, 2008). The scanning mode was set to spectral planes, automatically generating the separation of the channels as reported by Hernández-Hernández et al. (2014). The images were acquired by the ZEN software (Carl Zeiss, Germany), in 8 bits, RGB color and stored in TIFF format at 1024 \times 1,024 pixels.

For microstructural characterization by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), 1.0 cm cubes were obtained from areas of the exocarp, mesocarp and endocarp at both stages of maturity and were fixed in glutaraldehyde-formaldehyde (4% and 2.5% in phosphate-buffered saline) for 72 hr. Subsequently, dehydration was performed with an ethanol series (30 to 100%) for 40 min each and critical point drying (Quorum, K850, UK). Samples were mounted in aluminum sample holders, fitted with double-sided carbon tape and coated with carbon in a cathodic sputtering with a module carbon coater (SPI Supplies) and then observed in a FE-SEM (JEOL, JSM-7800F, Japan) at 20 kV using backscattered electron detector (BED). Image analysis was performed using the ImageJ 1.52a software (National Institutes of Health) to obtain image parameters such as area, perimeter, Feret diameter, aspect ratio (AR) and roundness for each cell type in the different regions of the fruit (exocarp, collenchyma, mesocarp, and sclerenchyma fibers).

2.4 | Fiber isolation

Cuajilote fruits in unripe and ripe stages were sectioned longitudinally eliminating the endocarp which was then processed in a pulping machine (JERSA, Mexico) to obtain only the fibers. Afterwards, the fibers were dried at 50°C in an oven for 24 hr and ground in a mechanical mill (High-speed multifunction GRINDER, HC-2000Y, China). Finally, the fibers were sieved to obtain homogeneous sizes in a 20 mesh (US Standards).

2.5 | Indentation of fibers

Fibers of unripe and ripe cuajilote fruits were prepared to evaluate their micromechanical properties from transversal and longitudinal sections, as was reported by Marin-Bustamante et al. (2018). Micromechanical properties were obtained with a Nanoindentation Tester (TTXNHT, CSM Instruments, Switzerland) with a Berkovich diamond indenter equipped with an optical microscope (Olympus, Japan with 5 \times and 100 \times objective lenses) which obtained images of residual indentation impressions (RII). The measurements were made using a maximum load of 10.0 mN, loading and unloading speed of 20 mN/min with pauses of 10 s. Indentation curves were analyzed with indentation software v4.16 (CSM Instruments) provided with the equipment to obtain the hardness (*H*) and elastic modulus (*E*) of the fibers (Oliver & Pharr, 1992).

2.6 | X-ray diffraction (XRD)

The XRD analysis of fruit fiber samples was carried out using a diffractometer (Rikagu MiniFlex 600, Tokyo, Japan). The scans were performed between 10° and 70° (2θ), 0.01° at 3 s/step, radiation source of CuKα, 15 mA, and 40 kV. Crystallinity index (CI) was estimated using the method described by Segal, Creely, Martin, and Conrad (1959), according to the following equation:

$$CI\% = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \quad (2)$$

where I_{002} is the maximum intensity in 002 lattice diffraction at $2\theta = 22^\circ$ and I_{am} is the intensity by the amorphous components at $2\theta = 18^\circ$.

2.7 | Statistical analysis

For all results, the arithmetic average and standard deviation were calculated. Statistical comparison was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey test ($p < .05$). All statistical analysis was carried out using the SigmaPlot v12.0 software (Systat Software, Inc.).

3 | RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 | General description of the fruit

The overall structure of the cuajilote fruit in both maturity stages can be observed in Figure 1a,b. The fruit shown is a berry, cylindrically elongated with longitudinal grooves. The color is an intense green when unripe and then yellow with red spots in its ripe stage. Figure 1c,d shows the cross sections of the unripe and ripe fruit, respectively. In both sections, the exocarp consists of a thin layer of peel. Unripe fruit have a green-yellow peel, which then turns into a yellow peel with reddish spots when ripe. The inner part of the fruit has a fleshy mesocarp with an abundant presence of fibers of different sizes distributed throughout the mesocarp, and these fibers are more marked in ripe fruit. Moreover, the endocarp area shows a large amount of small seeds.

3.2 | Physicochemical characterization

Table 1 presents the physicochemical parameters of unripe and ripe fruits. The averages values of the physical parameters such as fresh weight, length and diameter did not show statistically significant

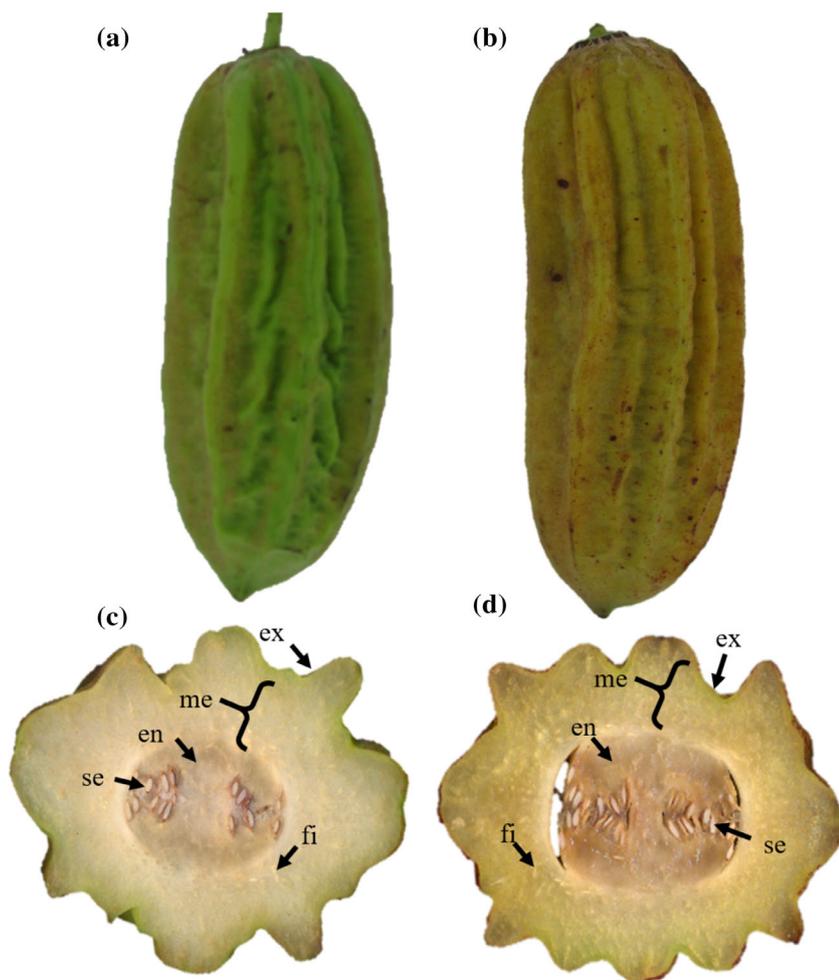


FIGURE 1 Fruits of *Parmentiera edulis*, unripe (a) and ripe (b). (c) and (d) cross sections of fruit. Exocarp (ex), mesocarp (me), endocarp (en), fibers (fi), seeds (se) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 1 Physicochemical parameters of *Parmentiera edulis* fruits in two stages of maturity

Parameter	Unripe fruit	Ripe fruit	Method
Fresh weight (g)	407.85 ± 102.80 ^a	413.10 ± 100.85 ^a	
Length (cm)	16.71 ± 2.06 ^a	17.89 ± 2.36 ^a	Magalhães et al. (2019)
Diameter (cm)	6.48 ± 0.97 ^a	6.82 ± 0.92 ^a	
<i>L</i> [*]	52.26 ± 4.33 ^a	48.76 ± 2.35 ^b	
<i>a</i> [*]	-10.30 ± 0.72 ^a	8.17 ± 1.71 ^b	Barragán-Iglesias et al. (2018)
<i>b</i> [*]	40.17 ± 2.40 ^a	34.59 ± 2.30 ^b	
DE	—	6.22 ± 1.84	Arzate-Vázquez et al. (2011)
TA (%)	0.21 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.04 ^a	AOAC (1995)
TSS (%)	11.28 ± 0.62 ^a	13.06 ± 0.68 ^b	
F (N)	42.91 ± 1.08 ^a	24.84 ± 2.80 ^b	De Oliveira Alves Sena et al. (2019)
Moisture (%)	83.83 ± 0.13 ^a	84.83 ± 0.38 ^b	
Ash (%)	0.68 ± 0.04 ^a	0.54 ± 0.03 ^b	
Ethereal extract (%)	0.15 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^b	AOAC (2007)
Raw fiber (%)	3.17 ± 1.01 ^a	2.86 ± 0.09 ^a	
Protein (%)	1.78 ± 0.31 ^a	2.73 ± 0.37 ^b	
Carbohydrates (%)	10.37 ± 1.46 ^a	8.92 ± 0.64 ^a	**
Cellulose (% db)	42.17 ± 4.07 ^a	32.76 ± 0.39 ^b	
Hemicellulose (% db)	20.94 ± 2.28 ^a	25.13 ± 4.58 ^a	TAPPI (2002)
Lignin (% db)	35.26 ± 3.41 ^a	40.79 ± 2.28 ^a	

Note: Each group represents the mean (±) and SD. Different letters in the same row indicate significant differences ($p < .05$). db, dry basis.

**Determined by difference.

differences (Table 1), which can be attributed to the fact that the dimensions of the fruits in both stages were similar. The length and diameter values obtained in this study are similar to those reported by Andrade-Cetto and Heinrich (2005). It has also been reported that these fruits are cylindrical to oblong with longitudinal grooves of variable sizes related to the environmental factors of where the crop is grown.

The color of the cuajilote fruits can be observed in Figure 1a,b. Quantitatively, the analysis of the color of the unripe fruits peel showed a greater luminosity (*L*^{*}) than in ripe fruits (Table 1) and the values *a*^{*} and *b*^{*} were found in the green region of the CIELab color space, while the values of the ripe fruits corresponded to the yellow-brown region (Table 1). In the case of ΔE , it changed from unripe to ripe fruit in 6.22 units, indicating a drastic color change in the fruit during maturation, as values that oscillate between 2 and 10 are perceptible (Fairchild, 2013).

These color changes may be due in large part to the degradation of the pigments (chlorophylls) in the fruit peel (Ayour, Sagar, Alfeddy, Taourirte, & Benichou, 2016). It is important to mention that there are no reports of the use of the CIELab color space for the determination of the fruit's color. Where significant differences were found, these variations in peel color can be associated with the changes in the fruit from an unripe physiological stage to a ripe, mature stage when it is then suitable for consumption. It has been reported that consumers usually associate the color of the peel with the degree of maturity,

such as green for unripe fruit and yellow for ripe fruit, meaning that analyzing the color of the fruit could be used as an indicator of quality, freshness and degree of maturity (Magalhães et al., 2019; Vélez-Rivera et al., 2014). In this case, the unripe fruits regularly regenerate chlorophyll, but this pigment decreases once the ripening stage starts, leading to the loss of green coloration. This results in the fruit having a predominantly yellow-brown coloration due to the carotenes and the degradation of chlorophyll to pheophytins (Ayour et al., 2016; Kingston, 1992).

While the TA did not show any significant differences, it can be observed that there is a 23.80% decrease in citric acid concentration as the fruit ripens (Table 1). These changes are often related to organic acids which tend to decrease with fruit maturation. Moreover, these acids are used as a substrate during respiration and are transformed into saccharides (Magalhães et al., 2019).

Regarding the TSS, significant differences were observed between the samples, and an increase was recorded in ripe fruits of 15.78% (Table 1). The fruit ripening leads to an increase in soluble solids consisting mainly of saccharides related to the decrease in organic acids, while the starch reserves are converted to hexoses (Do Nascimento et al., 2006).

Firmness showed significant differences (Table 1), as it can be observed that there is a 57.8% decrease in this parameter as the fruit ripens. This can be explained by the enzymatic degradation of the fruit's cell walls causing it to soften, thereby changing the structural

constituents of the fruits during ripening (Ezura & Hiwasa-Tanase, 2010). Changes occur in components due to the depolymerization of the pectins and the increase of other water-soluble compounds, which causes softening in the tissue and decreases firmness (Wongmetha, Ke, & Liang, 2015).

Chemical characterization results are shown in Table 1. Moisture, ash, ethereal extract, and protein showed significant differences between unripe and ripe fruits, whereas no significant differences were found in crude fiber and carbohydrates values. Both unripe and ripe fruits had high moisture content, with the ripe fruits presenting slightly higher values (Table 1). This slight increase in moisture in ripe fruits may be explained by fruits reaching their maximum size and weight when there is an increased level of relative humidity in the environment (Ezura & Hiwasa-Tanase, 2010). The highest ash concentration was found in the unripe fruits (Table 1), representing the total mineral content. It has been stated that tropical and subtropical fruits, such as the cuajilote, are rich in essential minerals, and these are used continually in the metabolic processes during fruit maturation (Barea-Álvarez et al., 2016).

Likewise, there was a high content of ethereal extracts in unripe fruits and a lower content in ripe fruits (Table 1). Studies mention that most fruits contain fatty extracts, mainly in the peel and cuticles, which decrease during the maturation process (Lara, Belge, & Goulao, 2014). The protein content in the fruits decreased with the ripening process, similar to the values found in the study carried out by Angón-Galván (2006). Another main component of fruit are carbohydrates. The highest value was observed in unripe fruits, while in ripe fruits its value decreased, which may be due to the fact that carbohydrates accumulate in the cells of unripe fruits and are used gradually during its growth and maturation (Do Nascimento et al., 2006).

With regard to lignocellulosic compounds in ripe fruit, hemicellulose and lignin content were higher than in unripe fruit, while there was also lower cellulose content in ripe fruit, with a significant difference in the cellulose content observed between the different maturity stages. The decrease in cellulose content was probably due to the increase lignin content in the ripe fruit caused by the thickening of the vascular tissues of cell walls brought about by natural growth, maturity and senescence of the fruits (Cosgrove, 2005). In both maturity stages, the cellulose content for the cuajilote fruit was comparable to what has been reported in other materials such as carrots (54.9%) (Szymanska-Chargot et al., 2017) and apples (32.4%) (Melikoğlu, Bilek, & Cesur, 2019). With regard to lignin content, the cuajilote reached 35.13% in an unripe stage and 40.8% in a ripe stage which is higher when compared with carrots (13.7%) or cucumbers (18.1%) (Szymanska-Chargot et al., 2017). These differences can be attributed to the fact that the cuajilote is a fibrous fruit with vascular bundles systems that are more lignified than the aforementioned plant materials.

3.3 | Microstructural characterization

Figures 2 and 3 show LM images of the microstructure of the cuajilote fruit cross section with the tissues structured in three regions:

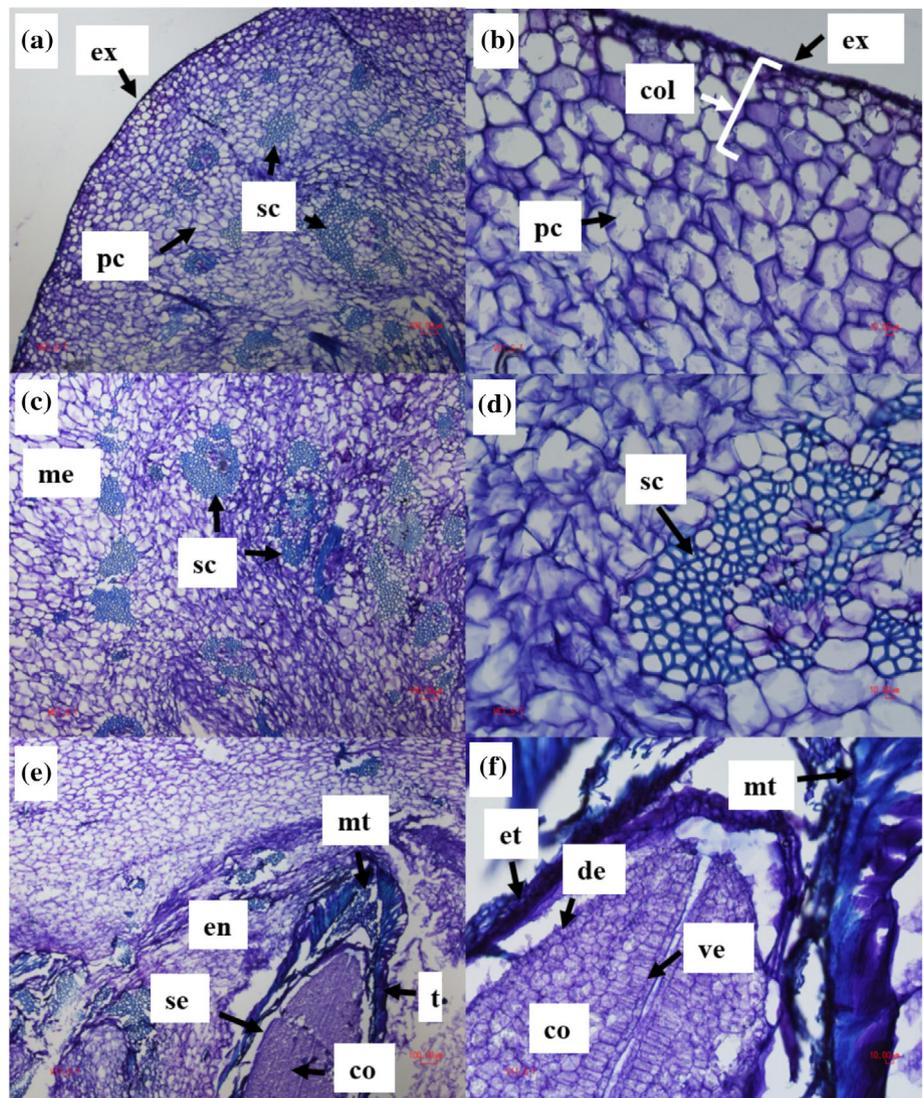
exocarp, mesocarp and endocarp. The exocarp region (Figures 2a,b and 3a,b) in both maturity stages shows a thin layer of slightly elongated epidermal cells, as well as a region of around 3 to 5 layers of subepidermal collenchyma cells. The mesocarp (Figures 2c,d and 3c,d) forms the fleshiest and edible part of the fruit, consisting mainly of layers of parenchymal cells. The collenchyma occupies a peripheral position and forms a thick layer under the peel of the fruits as part of the exocarp, separated by a single layer of cells, while the parenchyma is in the deepest part. Collenchyma cells are shaped as elongated ovoid with few intercellular and compacted spaces, while the parenchyma cells are larger with a polyhedral shape and larger intercellular spaces.

A main feature of this fruit is the large amounts of sclerenchyma fibers of different sizes distributed throughout the mesocarp which are evident in both stages of maturity (Figures 2c and 3c). Moreover, a thickened and lignified cell wall is observed in ripe fruit which could be due to the aging of the fruit tissue (Figures 2d and 3d), where the lignification process is common, as has been reported for Tobimatsu et al. (2014).

The endocarp is the innermost region of the fruit (Figures 2e and 3e) is usually soft and surrounds a large amount of small seeds. This part is more compact when the fruit is in an unripe stage, while in ripe fruit the endocarp may be slightly separated from the mesocarp. With regard to the seeds, it has been reported that they have an oval shape, and measure approximately 4 mm in length, are 3 mm wide and 0.8 mm thick, dorsoventrally compressed, with a dark brown color (Torres-Rivera, 2018). The seeds do not have an endosperm, which according to the literature is a typical characteristic of the *Bignoniaceae* family, as they are exalbuminosas seeds with little or no endosperm, with a slight presence of an endothelium (Casoti et al., 2016; Lohmann & Taylor, 2014). The cotyledons are large (Figures 2e,f and 3e,f), with tangentially elongated ventral epidermal cells, while the dorsal epidermis of the cotyledon is septately shaped, and the cotyledon cells in the center of the seed appear as a rounded shape. Additionally, the seeds have mesotesta attached to parenchymal cells as well as a lignified testa.

Figure 4 shows cross-sectional CLSM images of the cuajilote in unripe (Figure 4a,c,e) and ripe (Figure 4b,d,f) stages, where the exocarp, mesocarp and endocarp regions can be observed. The cell structures of the tissue were stained with calcofluor to identify cellulose-hemicellulose (blue color), while the presence of lignin (green color) and chlorophylls (red color) were observed by autofluorescence. Figure 4a shows an intense fluorescence (green color) in the outermost part of the exocarp. This coloration may be related to the presence of lignin and chlorophylls or other compounds present in the thin layer that could be natural waxes composed mainly of triterpenoids present in the fruit peel (Zarrouk, Pinheiro, Misra, Fernández, & Chaves, 2018). With respect to ripe fruit (Figure 4b), the fluorescence is more intense in the outermost layer (green color), which is thicker. This could be related to the lignification of the cell walls of the skin of the fruit, caused by the development and ripening process of the fruits (Ruiz et al., 2015).

FIGURE 2 (a) Cross section of *Parmentiera edulis* fruit in unripe state, under light microscopy. General appearance of part of fruit; (b) Exocarp (ex), collenchyma layer (col) and part of mesocarp (me); (c) mesocarp with sclerenchyma fibers (sc); (d) sclerenchyma fibers (sc); (e) endocarp (en) with seed; (f) seed (se). pc, parenchymal cells; co, cotyledon; t, testa; mt, mesotesta; et, endothelium; ve, ventral epidermis of cotyledon; de, dorsal epidermis of cotyledon. Bars (a), (c), and (e) = 100 μ m, bars (b), (d), and (f) = 10 μ m [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



In unripe fruit it was observed that the parenchymal cells in the mesocarp region were stained mainly blue (cellulose and hemicellulose) and to a lesser extent in green (lignin) which correspond to the lignocellulosic compounds present in the walls' cell structure (Figure 4a,c). It was also observed that the cells in the unripe fruit are more uniform, compact and with thinner walls than parenchyma cells in the ripe fruits (Figure 4a,b). In the unripe fruit, the thinner walls made it possible to observe lignin compounds (green color) inside the cell walls of the parenchyma cells. Additionally, when fruit is ripe, an expansion of the parenchyma cells with thicker walls is observed which results in the lignin compounds being completely hidden (Figure 4b). Furthermore, chlorophylls (stained in red) in parenchyma cells were more abundant in unripe fruit than in the parenchyma tissue of the ripe fruit. The concentration of the chlorophylls was more plentiful in the outer regions (exocarp and external mesocarp) and decreased gradually towards the inner regions (endocarp) for both fruit ripening stages (compare Figure 4a–d). The decrease in chlorophylls observed could be due to the ripening process and degradation of pigments in the fruits. However, in addition to chlorophyll, other

natural compounds within the cell matrices could have autofluorescence between 492 and 597 nm (green-yellow region), as is the case with free phenolic compounds, alkaloids, carotenoids terpenoids and some wax layers (Talamond, Verdeil, & Conéjéro, 2015; Veraverbeke, Van Bruaene, Van Oostveldt, & Nicolai, 2001).

Figure 4c,d shows the cellular structure of the mesocarp region formed mainly by parenchymal cells and sclerenchyma fibers. When viewing the CLSM images, the fluorescence of the sclerenchyma fibers was evident with their characteristic narrow lumen, while their secondary walls were lignified. Furthermore, the distribution of the cellulose-hemicellulose (blue color) and lignin (green color) can be seen in both unripe and ripe tissues. However, in ripe tissue the sclerenchyma fibers showed smaller lumens than in unripe tissue, which may be due to thickened cell walls caused by the lignification process of the sclerenchyma fibers during fruit ripening (Tobimatsu et al., 2014).

Finally, Figure 4e,f shows the endocarp region where the seeds of the fruit were found for the most part in both stages of maturity. CLSM images of the seeds showed that the different parts of the seed

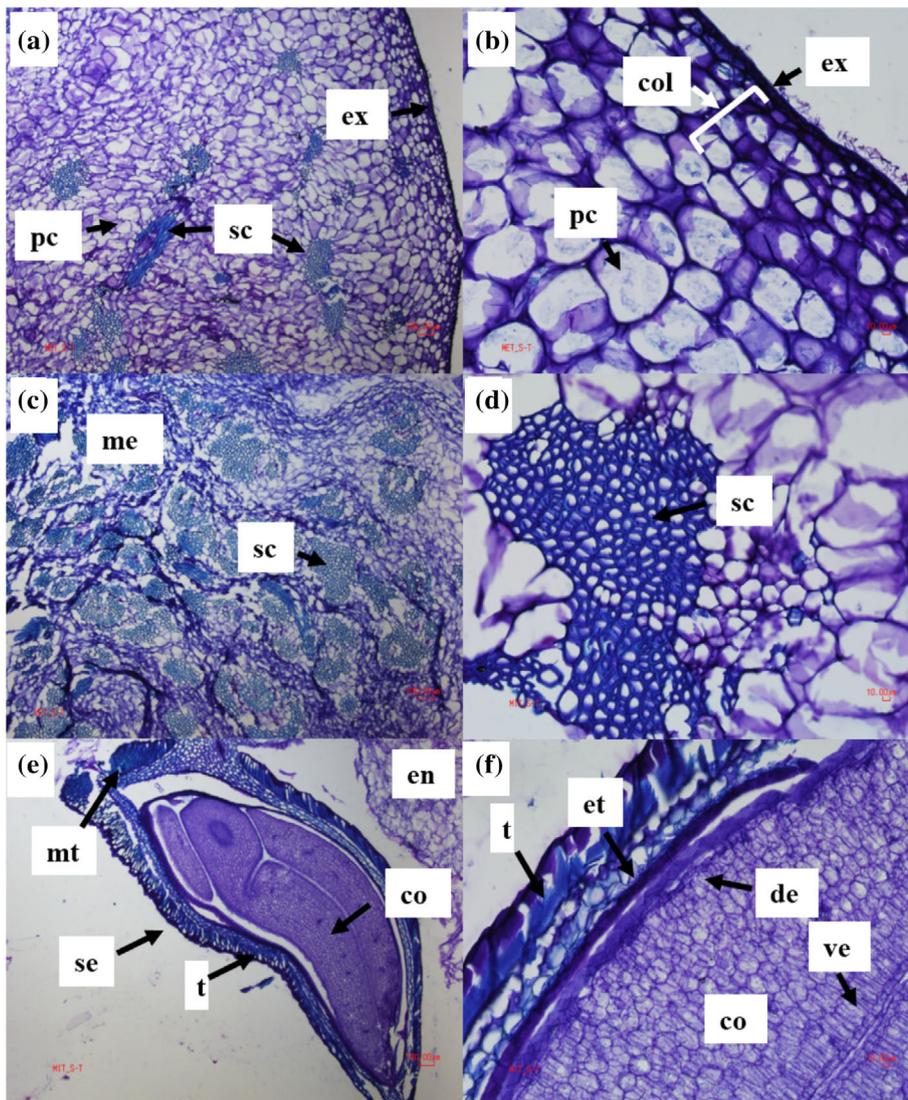


FIGURE 3 (a) Cross section of *Parmentiera edulis* fruit in ripe stage, under light microscopy. General appearance of part of fruit; (b) Exocarp (ex) collenchyma layer (col) and part of mesocarp (me); (c) mesocarp with sclerenchyma fibers (sc); (d) sclerenchyma fibers (sc); (e) endocarp (en) with seed; (f) seed (se). pc, parenchymal cells; co, cotyledon; t, testa; mt, mesotesta; et, endothelium; ve, ventral epidermis of cotyledon; de, dorsal epidermis of cotyledon. Bars (a), (c) and (e) = 100 μm , bars (b), (d), and (f) = 10 μm [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

are mainly composed of cellulose-hemicellulose (blue color) and lignin (green color). The highest fluorescence for lignocellulosic compounds was observed in the external layer of the testa seed which protects the cotyledons. Cotyledons are found inside the seeds and can be rich in reserve nutrients such as starch, oils and proteins (Esan, Omoba, & Enujiugha, 2018). In addition, fluorescence was observed and is identifiable by a green to yellow color (492–597 nm) which could be related to the presence of other compounds in the seed cell matrix. Some of these compounds could be related to the presence of tannins, betaxanthines, chlorogenic acid, flavins, alkaloids, and free phenolic compounds (García-Plazaola et al., 2015).

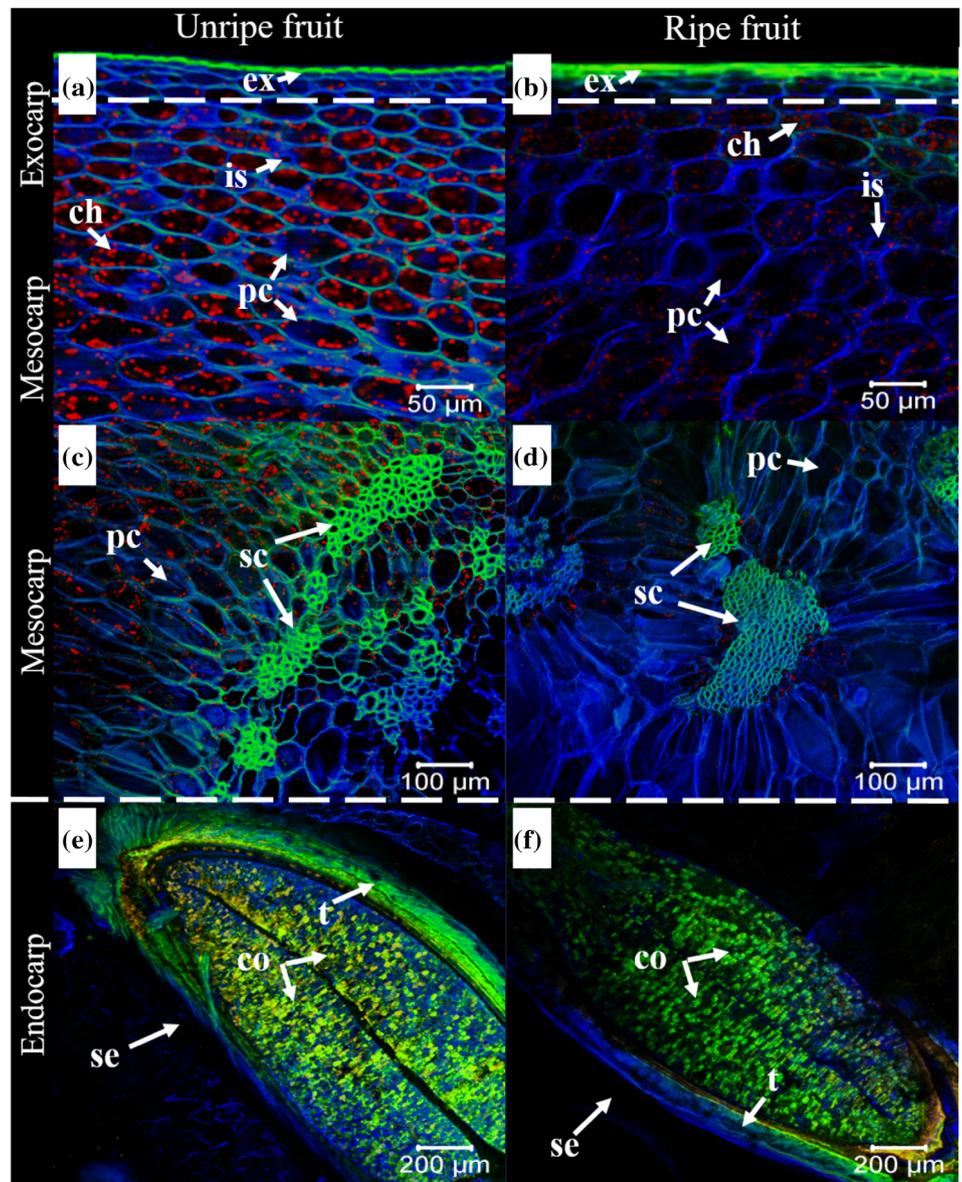
Plant cells have complex and heterogeneous architectures, which depend on the type of cell associated with their cellular function (Knox, 2008). In the case of *P. edulis*, the fruit tissues are comprised of several cell types. The microstructure of unripe and ripe fruits observed under FE-SEM is shown in Figure 5, where the cell walls of different cell types of the epicarp and mesocarp regions can be seen. A morphometric analysis of the cells was carried out and the results are presented in Table 2 in two ways: by cell type in each region and

by maturity stage. Overall, when the different cell types are compared by maturity stage, there are significant differences in the size parameters such as area, perimeter and Feret diameter in the epicarp, collenchyma and mesocarp cells. In the case of the perimeter in the sclerenchyma fibers in unripe and ripe fruits, no differences were found. With regard to AR and roundness parameters, there were no significant differences between all cell types.

The values of the epidermal cell area showed an increase of 23.23% (Table 2). Similar trends were observed in the perimeter and Feret diameter, with increases of 19.32% and 12.85%, respectively (Table 2). The epidermal cells in unripe tissues were more circular shaped than cells in ripe tissues, which take on a more elongated ovoid shape (Figure 5b,d). The changes in size and shape of epidermal cells are linked to fruit growth and cellular expansion phenomena. Similar changes have also been reported in the pericarp morphology of blackberry fruits (*Rubus* spp.) during ripening (Zhang, Xiong, Yang, & Wu, 2019).

With regard to the collenchyma cells, significant differences between unripe and ripe fruits were found in the area, perimeter and

FIGURE 4 Cross-sectional CLSM images of unripe (a, c, and e) and ripe (b, d, and f) *Parmentiera edulis* fruit, where lignin fluorescence is shown by the green color, cellulose in the blue and chlorophylls in red. ex: exocarp; is: intercellular space, pc: parenchymal cells, sc: sclerenchyma fibers, se: seed, ch: chlorophylls, t: testa, co: cotyledon. Bars (a) and (b) = 50 μm , bars (c) and (d) = 100 μm , bars (e) and (f) = 200 μm [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



Feret diameter parameters (Table 2). A slight decrease in the cellular size was observed when the fruit matures, with the area decreasing by 17.26%, the perimeter 6.11% and Feret diameter 6.80% (Table 2). Furthermore, the shape of these cells changed with maturation and they elongated slightly due to the expansion of the mesocarp's parenchymatic cells. This leads to a flattening of the collenchyma cells through pressure applied by the growth of mesocarp cells. Consequently, AR increased from 1.59 to 1.62, while roundness decreased slightly (Figure 5a–d).

The parenchymal cells form the main structure of the mesocarp and are the largest cells that can be seen in the fruit's microstructure (Figure 5a–d). The mesocarp cells have a polyhedral shape and are slightly elongated, and their size increased drastically when the fruit transitioned from the unripe to the ripe stage (Table 2). In this study, the parenchyma cell area showed an increase of 69.47% (Table 2). The perimeter and Feret diameter showed a similar trend, with these values increasing by 30.65% and 26.68%, respectively. Fruit growth

causes cellular expansion, and the parenchyma cells became rounder in shape. Given that roundness parameters tend to have values of 1 when objects are shaped as a perfect circle, the AR decreased from 1.66 to 1.61, and roundness slightly increased in ripe fruit. Similar reports of increased parenchymal cell size were observed in eggplants, showing an increase of between 60 and 100% in the cells of a baby eggplant and the cells of an commercially advanced mature eggplant (Valerga et al., 2019).

Sclerenchyma fibers are part of the support tissue in the plant fibers, having a thickened secondary wall and prominent lumens structured by spiral vessels cellulose fiber along with lignin (Cosgrove, 2005; Zhong & Ye, 2015). The cellular structure of the fibers of the present work (Figure 5i–l) are similar to other lignocellulosic fibers such as *Agave tequilana* (Espino et al., 2014), peach palm fiber (Diaz, Silva, & D'Almeida, 2016), and *Juncus effusus* (Maache, Bezazi, Amroune, Scarpa, & Dufresne, 2017). In the case of sclerenchyma fibers, significant differences were found in the cells' area and

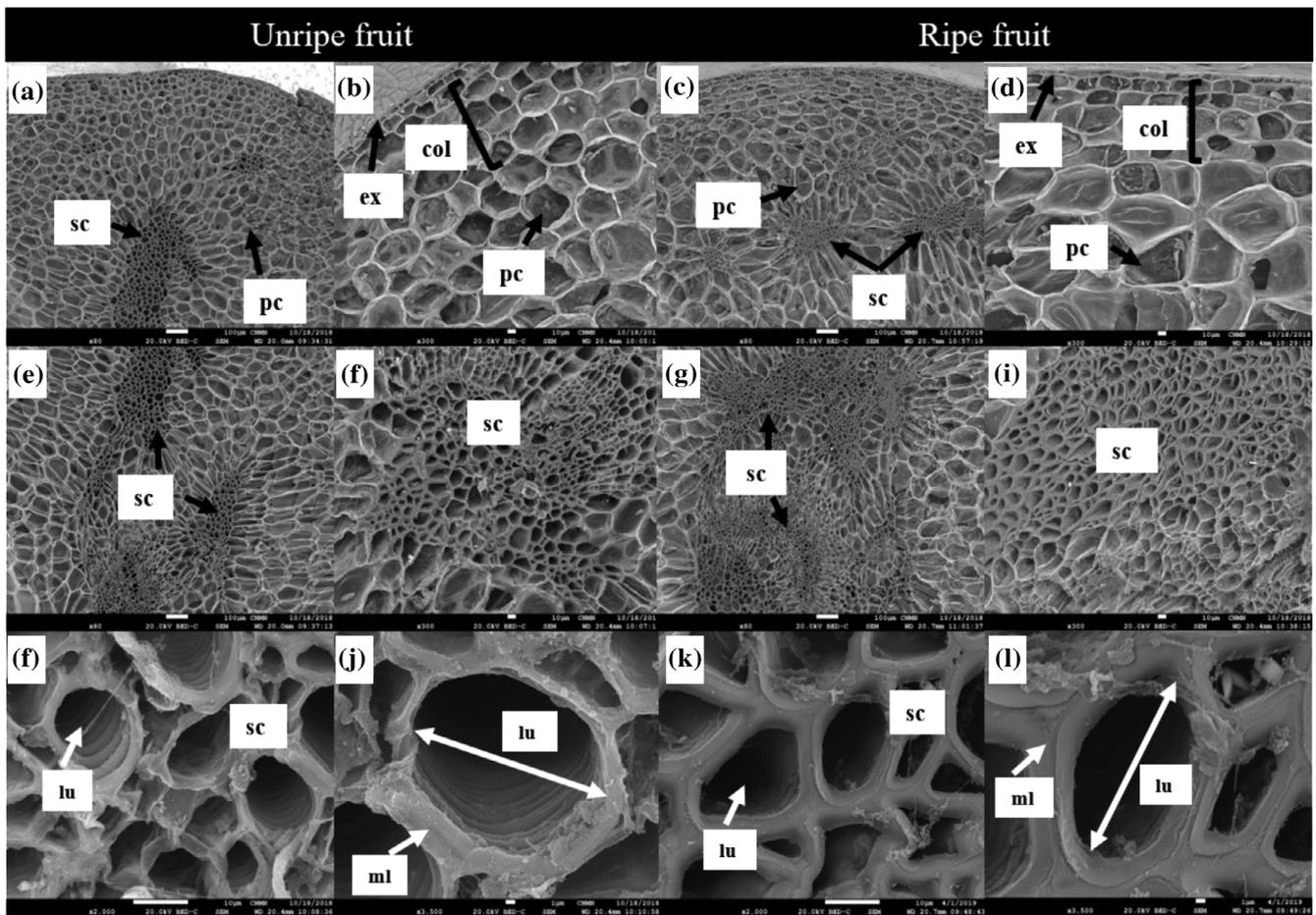


FIGURE 5 Field emission scanning electron microscopy images of a cross section of the *Parmentiera edulis* fruit during unripe (a, b, e, f, i, j) and ripe (c, d, g, h, k, l) stages. ex: exocarp, col: collenchyma layer, pc: parenchymal cells, sc: sclerenchyma fibers, ml: medial lamella, lu: cell lumen. Bars (a, e, c, g) = 100 μm , bars (b, f, d, h) = 10 μm , bars (i, k) = 10 μm and bars (j, l) = 1 μm

Feret diameter (Table 2) when the two maturity stages were compared (Figure 5e,g), with these parameters decreasing as the ripening process progressed (17.59% and 5.66%, respectively).

This behavior is due to the thickening of the sclerenchyma fibers cell walls brought about by the growth of the fruit, causing a greater lignification of the cell wall and a drastic reduction of the cell lumen (Figure 5f,h). It is possible to observe this effect as the measurements with image analysis of the sclerenchyma fibers cells' size and shape were performed by binarization of the cell lumen (Figure 5i,k). Overall, the size of sclerenchyma fibers cells does not decrease because the vascular tissue is stiff as it has a support function in the plant tissues (Tobimatsu et al., 2014). In the case of plant cells, it has been reported that during the cytokinesis process, the primary cell wall is formed mainly by cellulose deposition (Cosgrove, 2005). Additionally, during cellular expansion and ripening, the secondary wall is reinforced by lignocellulosic compounds and non-cellulosic polysaccharides which gives it its final structure (Burton, Gidley, & Fincher, 2010). This was confirmed by measuring the cell wall thickness of sclerenchyma fibers in unripe and ripe fruits (Figure 5j,l), which indicated that, on average, the thickness is increased from 2.02 μm to 2.60 μm . Significant differences were found between

these thicknesses, meaning that a 22.4% thickening of the secondary cell wall was caused by lignin deposition into the vascular tissue. However, during their development, the cell walls are asymmetrically thickened in this case (Figure 5l) with high molecular weight polymers such as cellulose, hemicelluloses (xylan and glucomannan), pectins, lignins and residual amounts of structural proteins (Burton et al., 2010; Knox, 2008).

With regard to the perimeter, there were no significant differences because the distribution of perimeter values of sclerenchyma fibers in unripe fruit was extremely dispersed, as the cells' shapes were widely heterogeneous (Figure 5f, Table 2). On the other hand, sclerenchyma fibers cells in ripe fruit (Figure 5h) had a narrower distribution of perimeter values (Table 2), caused by lignification of cell walls when the fruit is mature. Finally, the sclerenchyma fibers cells showed few changes in AR and roundness values when the two ripening stages were compared. Similar observations were reported by Mohammad and Ding (2019) in *Carissa congesta* fruits during their development. It was reported that the cells undergo elongation and expansion as the fruit develops, and the differentiation in the cells' shape and size can be observed in the different regions of the fruit's cellular structure (exocarp, mesocarp and endocarp). Furthermore, the

TABLE 2 Morphometric parameters of cells of *Parmentiera edulis* fruits in two stages of maturity

Morphometric parameters	Unripe fruit	Ripe fruit
<i>Exocarp cells</i>		
Area (μm^2)	55.08 \pm 22.16 ^a	67.87 \pm 23.48 ^b
Perimeter (μm)	32.40 \pm 7.98 ^a	38.66 \pm 9.26 ^b
F_D (μm)	12.52 \pm 3.05 ^a	14.13 \pm 2.94 ^b
AR (-)	1.85 \pm 0.53 ^a	1.88 \pm 0.63 ^a
Roundness (-)	0.57 \pm 0.14 ^a	0.58 \pm 0.16 ^a
<i>Collenchyma cells</i>		
Area (μm^2)	610.83 \pm 305.94 ^a	504.35 \pm 264.20 ^b
Perimeter (μm)	116.18 \pm 34.77 ^a	109.08 \pm 39.41 ^b
F_D (μm)	36.88 \pm 9.26 ^a	34.37 \pm 9.51 ^b
AR (-)	1.59 \pm 0.44 ^a	1.62 \pm 0.44 ^a
Roundness (-)	0.66 \pm 0.15 ^a	0.65 \pm 0.15 ^a
<i>Mesocarp cells</i>		
Area (μm^2)	3427.61 \pm 1136.92 ^a	5808.97 \pm 2284.77 ^b
Perimeter (μm)	311.94 \pm 73.69 ^a	407.57 \pm 95.56 ^b
F_D (μm)	89.90 \pm 18.48 ^a	113.89 \pm 25.67 ^b
AR (-)	1.66 \pm 0.45 ^a	1.61 \pm 0.42 ^a
Roundness (-)	0.64 \pm 0.15 ^a	0.65 \pm 0.15 ^a
<i>Sclerenchyma fibers cells</i>		
Area (μm^2)	239.66 \pm 130.54 ^a	197.49 \pm 69.73 ^b
Perimeter (μm)	72.20 \pm 22.08 ^a	67.82 \pm 14.58 ^a
F_D (μm)	23.30 \pm 5.88 ^a	21.98 \pm 3.76 ^b
AR (-)	1.51 \pm 0.32 ^a	1.53 \pm 0.37 ^a
Roundness (-)	0.68 \pm 0.13 ^a	0.68 \pm 0.14 ^a

Note: Each group represents the mean (\pm) and SD. Different letters in the same row indicate significant differences ($p < .05$).

presence and development of vascular bundles were mainly dispersed in the mesocarp, as is the case with this study.

3.4 | Characterization of fibers

The fibers extracted from the fruits of *P. edulis* are shown in Figure 6a,d. It was observed that the fibers in both stages of maturity showed no difference to the naked eye, showing the same morphology and appearance in color, as the fibers were obtained using the same drying conditions. However, the use of CLSM provided information on structural compounds and their distribution in lignocellulosic materials (Hernández-Hernández et al., 2014; Hernández-Hernández et al., 2016). Therefore, under CLSM, differences in the distribution of cellulose and lignin can be observed (Figure 6b,c), where the fibers show a high fluorescence due to the presence of cellulose-hemicellulose (blue) and lignin (green). The alignment of lignocellulosic fibrils that comprise the fiber bundle (green) architecture and morphology with septa (blue) along the fibers was observed (Figure 6b,c).

The fibers in the ripe fruit (Figure 6e,f) showed a decrease in fluorescence because of the cellulose and an increase in the fluorescence because of the lignin with regards to unripe fruits. Consequently, the septa were less evident due to the lignification process embedded in the external cells (septas) into the ripe fibers (Figure 6e,f). Overall CLSM evidenced that the highest cellulose content was found in the fibers extracted from unripe fruits, while lignin content was abundant in ripe fruits. This corresponds with the data from the physicochemical analysis (Table 1) which is valuable information when differentially extracting cellulose or lignin, depending on the fruit's ripening stage. Consequently, using cellulose as a biopolymer could be a means for obtaining nanocellulose, which has several applications as a nanocomposite in the reinforcement of packaging industry materials, as well as materials for the medical field, the paper industry, electronics and membranes (Klemm et al., 2018; Lei & Feng, 2020; Mondal, 2017). Furthermore, lignin could be used for its adhesive properties, such as for mixtures with other polymers (polyhydroxyalkanoates, polyester, polylactic acid, polyols, and polyurethane, etc.) improving properties such as plasticity and adhesion (Bajwa et al., 2019; Faruk & Sain, 2016).

3.5 | Micromechanical properties and X-ray diffraction of fibers

To illustrate the influence of microstructural changes (thickening cell wall) in the cuajilote's vascular tissue on the fibers' micromechanical properties during different stages of maturation, samples were transversely and longitudinally indented. The hardness (H) and elastic modulus (E) values of fibers indented in transversal and longitudinal regions are shown below the light microscopy images, where the residual indentation impressions (RII) can also be observed (Figure 7a-d). Micromechanical properties of the *P. edulis* fibers in transversal section (TS) in both stages of maturity (Figure 7a,b) showed no significant differences, with H value of 0.209 GPa in both maturity stages, while E values were similar (around 6.5 GPa).

The H and E values in the indentation tests in the longitudinal section (LS) of fibers in both ripening stages (Figure 7c,d) showed significant differences between them, and their values were lower than fibers indented in TS. The H value of the fibers in unripe fruit was 0.060 GPa, while in ripe fruit its H had increased to around 35%. Furthermore, a more significant difference was observed in E values, where the fibers of unripe fruit yielded values of 0.169 GPa, while in ripe fruit, the E values were up to six times greater than in the fibers from unripe fruit. High H and E values are associated with hard and stiff materials, respectively, meaning that the fibers arranged longitudinally could be used as composites for reinforced polymers and packaging applications. As was evidenced through FE-SEM (Figure 5i-l) and CLSM images (Figure 6e,f), these significant differences in the micromechanical properties of the sclerenchyma fibers obtained from unripe and ripe fruit are directly linked to the thickening of the cell wall caused by the lignification process. It has been reported that an increase in hardness in plant fibers are related in part to the ash

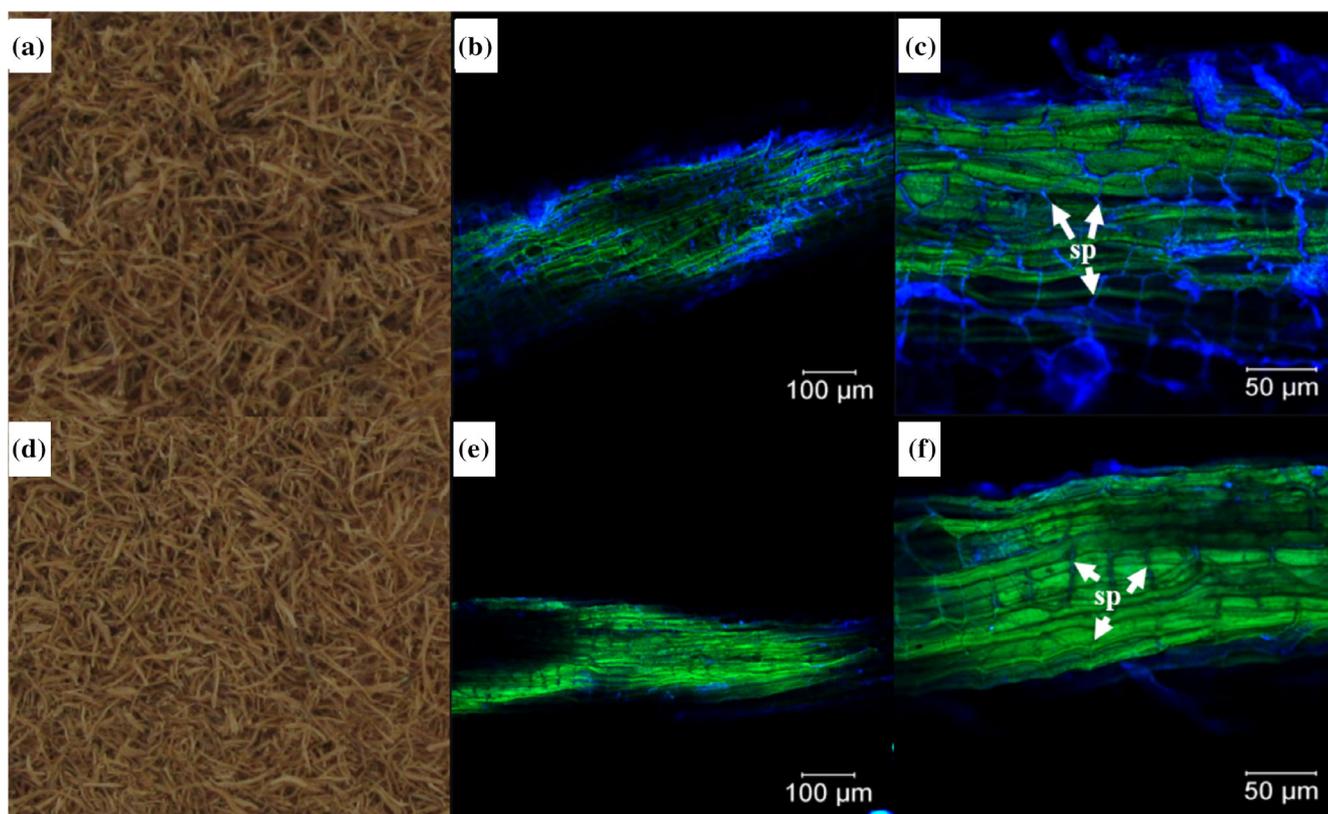


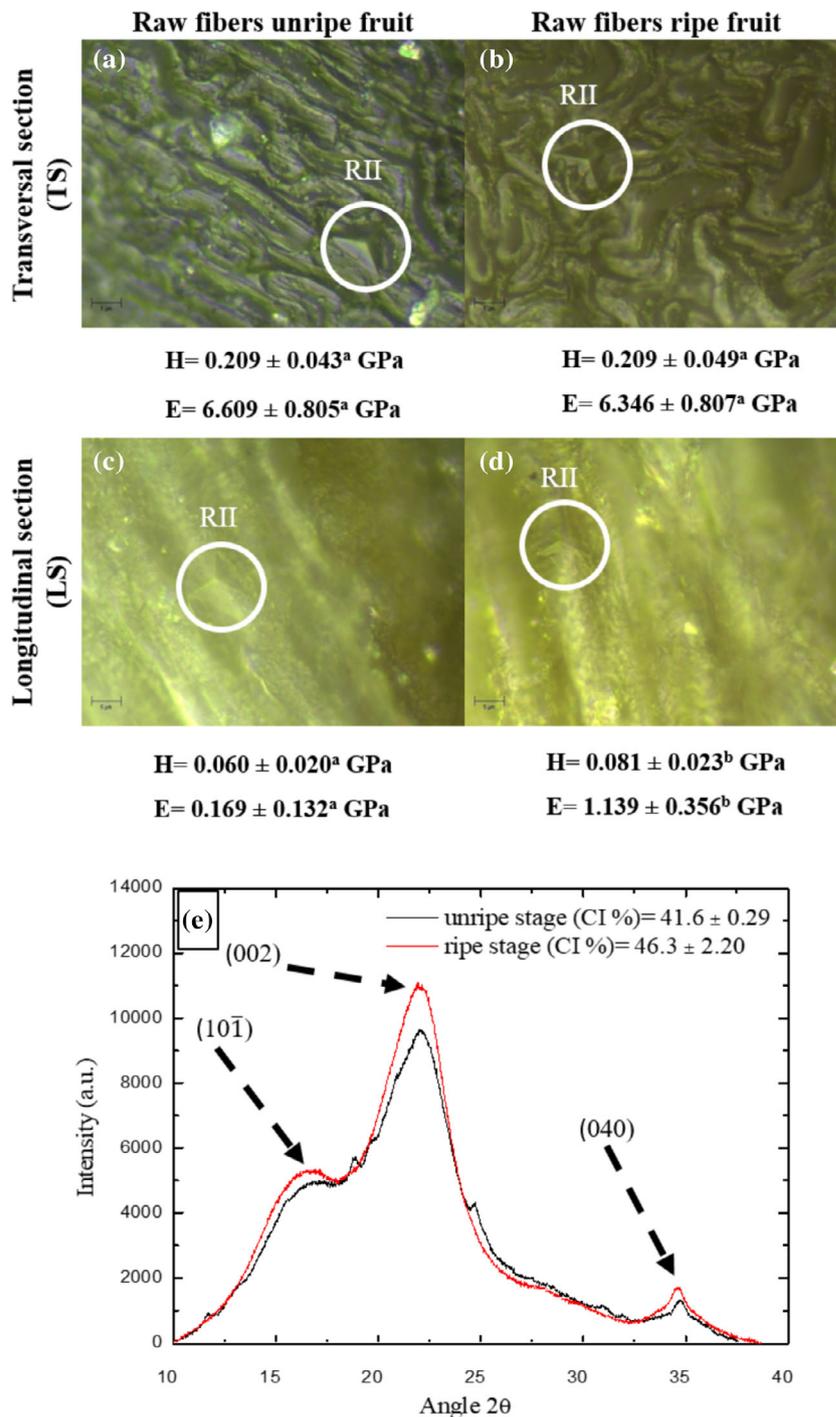
FIGURE 6 Images of fibers of unripe (a) and ripe (d) fruit of *Parmentiera edulis* and CLSM images of fibers of unripe fruit (b and c) and ripe fruit (e and f). The green color corresponds to lignin and blue to cellulose. sp: septa. Bars (b) and (e) = 100 μm , bars (c) and (d) = 50 μm [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

content, but mainly to the lignin content that promotes the thickening of the secondary cell wall in this type of tissues (Goudenhooff et al., 2018; Wu et al., 2010). The micromechanical properties of the *P. edulis* fruit fibers are comparable with other materials such as nopal spines ($H = 0.31$ GPa, $E = 5.81$ GPa) (Marin-Bustamante et al., 2018), pecan nutshell stone cells ($H = 0.26$ GPa and $E = 7.66$ GPa) (Nicolás-Bermúdez et al., 2018), softwood ($H = 0.34$ – 0.53 GPa and $E = 14.2$ – 18 GPa) (Wu et al., 2010), soybean stalk ($H = 0.48$ GPa and $E = 16.3$ GPa) (Wu et al., 2010) and flax stalk ($H = 0.393$ GPa and $E = 17.4$ GPa) (Keryvin et al., 2015). The values obtained in this study indicate that *P. edulis* fibers have the requisite micromechanical properties for use in nanocomposite reinforcements. This information is useful for selecting the fibers' most appropriate structural arrangement and maturity stage in order to improve the mechanical properties of biomaterials.

Further evidence to explain the differences in the fibers' structural and mechanical properties was provided by XRD analysis. Figure 7e shows the X-ray diffraction patterns obtained for the fruits' fibers during their respective unripe and ripe stages. Both spectra are characterized by a high peak at 22.6° in the plane (002), a less intense and wider peak which appears at approximately 16.4° corresponding to plane (10 $\bar{1}$), and a narrower peak was observed at 34.7° in the plane (040), confirming the semi-crystalline nature of the fruit fibers. This diffraction pattern is characteristic of cellulose I (native cellulose)

which is described as a monoclinic cell with parallel chains (Gardner & Blackwell, 1974). However, the poor definition of the diffraction pattern results is due to the contribution to the diffracted intensity, the amorphous cellulose and other components such as lignin and hemicellulose (Maache et al., 2017). Therefore, in the ripe cuajilote diffraction pattern, the peak corresponding (002) lattice plane increase is related to an increase in the material's crystallinity, which was confirmed by the crystallinity index. CI% showed significant differences between both samples which could be attributed to the ripening process. This process causes a relaxation of the fibers brought about by enzymatic degradation of hemicellulose and other polysaccharides embedded in the cellulose of the amorphous regions, thereby exposing them, leading to a percentage increase in the mature fruit fibers' crystallinity. Sterling (1961) mentioned that during the ripening process, a removal of smaller amorphous molecules could occur, as well as more accessible cellulose micelles, resulting in a higher proportion of the larger crystallites and an increase in the crystallinity index. The CI values of the current work are higher than those obtained for other fibers; *Juncus effusus* (33.4%) (Maache et al., 2017), *Cocos nucifera* (33.63%) (NagarajaGanesh & Muralikannan, 2016) and palm fiber (19.9%) (Abdal-Hay, Suardana, Jung, Choi, & Lim, 2012), while they are similar to those reported for fibers from waste agave leaves (43.2%) (Hernández-Hernández et al., 2016) or *Ficus religiosa* (42.92%) (Moshi et al., 2020). The high CI % values found in cuajilote fibers

FIGURE 7 Light microscope images of transversal and longitudinal section of fibers of the unripe and ripe fruit of *Parmentiera edulis* after indentation test, white circle indicates RII: residual indentation impression and below each image the hardness (H) values and elastic modulus (E), the super indices in the values of hardness and elastic modulus with different letters indicate significant differences ($p < .05$) and X-ray diffraction patterns for the fibers of the unripe and ripe fruit (e) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



suggest that this could be a suitable source of cellulose, and it was noteworthy that fibers from the ripe fruit correspond with high CI %, H and E values, and consequently with its chemical composition and cellular architecture.

4 | CONCLUSIONS

In this study, the physicochemical characterization of *P. edulis* fruits in unripe and ripe stages was determined. The microstructural

characterization of the cuajilote through microscopic techniques and image analysis provided relevant information of the different types of cells of each region that constitute the structure of the exocarp, mesocarp and endocarp of the fruit in both maturity stages. This facilitated the observation of differences in shape and size of fruit cells during the unripe and ripe stages. The qualitative information obtained by CLSM about the distribution of cellulose and lignin in the fibers showed links with the chemical composition of the fruit, observing that in ripe fruit the sclerenchyma fibers tend to lignify. The results obtained in this research provide the necessary information for

a criterion of fruit selection depending on the stage of maturity where the cellulose or lignin can be extracted with major benefits from its fibers, which is important information for the pulping process of the fibers. In addition, knowledge of the micromechanical properties of fibers can help with the appropriate selection of the orientation of the fibrils and improve the mechanical properties of future applications related to composite materials.

In view of the fact that the fruit of *P. edulis* is a promising raw material for obtaining biopolymers, these findings on the cellulose and lignin content will be very useful when considering an alternative source for cellulose and lignin for future applications, generating added value for this crop and promoting the extensive cultivation of the *P. edulis* plant. The novelty of this research focused on the search for new sources of cellulose from the fruit of *P. edulis*, based on its physicochemical, structural and micromechanical properties, and beyond its properties' medicinal uses. Finally, future research should focus on pulping to isolate cellulose or lignin and assess their potential applications in the development of biodegradable materials.

ACKNOWLEDGMENTS

Macario Vicente-Flores wishes to thank CONACyT, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) and Instituto Politécnico Nacional (IPN) from Mexico for the scholarship provided during his PhD studies, and the financial support provided by CONACyT projects (239899 and 268660), SIP-IPN (20180455, 20195158, 20195857, and 20200506) and PROFOCIE 2017-2018.

ORCID

José Jorge Chanona-Pérez  <https://orcid.org/0000-0002-5744-8522>

REFERENCES

- Abdal-Hay, A., Suardana, N. P. G., Jung, D. Y., Choi, K. S., & Lim, J. K. (2012). Effect of diameters and alkali treatment on the tensile properties of date palm fiber reinforced epoxy composites. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 13(7), 1199–1206. <https://doi.org/10.1007/s12541-012-0159-3>
- Álvarez-Olivera, P. A., Calzada-Almas, E., & Batista-Cruz, C. (2010). Etnobotánica y propagación de *Parmentiera edulis* D. C., árbol de uso múltiple en Cuba. *Revista Forestal Baracoa*, 29, 77–86.
- Andrade-Cetto, A., & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 325–348. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.019>
- Angón-Galván, P. (2006). *Caracterización parcial del fruto de Parmentiera edulis*. México: Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis of AOAC international* (15th ed.). Gaithersburg, MD: Author.
- AOAC. (2007). *Official methods of analysis of AOAC international* (18th ed.). Gaithersburg, MD: Author.
- Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J. J., de Perea-Flores, M. J., Calderón-Domínguez, G., Moreno-Armendáriz, M. A., Calvo, H., ... Gutiérrez-López, G. (2011). Image processing applied to classification of avocado variety hass (*Persea americana* Mill.) during the ripening process. *Food Bioprocess Technology*, 4(7), 1307–1313. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0595-6>
- Ayour, J., Sagar, M., Alfeddy, M. N., Taourirte, M., & Benichou, M. (2016). Evolution of pigments and their relationship with skin color based on ripening in fruits of different Moroccan genotypes of apricots (*Prunus armeniaca* L.). *Scientia Horticulturae*, 207, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.05.027>
- Azeredo, H. M. C., Rosa, M. F., & Mattoso, L. H. C. (2017). Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Industrial Crops and Products*, 97, 664–671. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.013>
- Bajwa, D. S., Pourhashem, G., Ullah, A. H., & Bajwa, S. G. (2019). A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact. *Industrial Crops and Products*, 139, 111526. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111526>
- Barea-Álvarez, M., Delgado-Andrade, C., Haro, A., Olalla, M., Seiquer, I., & Rufián-Henares, J. Á. (2016). Subtropical fruits grown in Spain and elsewhere: A comparison of mineral profiles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 48, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.02.001>
- Barragán-Iglesias, J., Méndez-Lagunas, L. L., Rodríguez-Ramírez J. (2018). Ripeness indexes and physicochemical changes of papaya (*Carica papaya* L. cv. Maradol) during ripening on-tree. *Scientia Horticulturae*, 236, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.012>
- Binoj, J. S., Raj, R. E., Sreenivasan, V. S., & Thusnavis, G. R. (2016). Morphological, physical, mechanical, chemical and thermal characterization of sustainable Indian Areca fruit husk fibers (*Areca catechu* L.) as potential alternate for hazardous synthetic fibers. *Journal of Bionic Engineering*, 13, 156–165. [https://doi.org/10.1016/S1672-6529\(14\)60170-0](https://doi.org/10.1016/S1672-6529(14)60170-0)
- Bond, J., Donaldson, L., Hill, S., & Hitchcock, K. (2008). Safranin fluorescent staining of wood cell walls. *Biotechnic and Histochemistry*, 83(3–4), 161–171. <https://doi.org/10.1080/10520290802373354>
- Burton, R. A., Gidley, M. J., & Fincher, G. B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 724–732. <https://doi.org/10.1038/nchembio.439>
- Cáceres, A., Menéndez, H., Méndez, E., Cohobón, E., Samayoa, B. E., Jauregui, E., ... Carrillo, G. (1995). Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 48(2), 85–88. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01288-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01288-0)
- Casoti, R., Manfron, M. P., & de Oliveira, J. M. S. (2016). Ovary and fruit morphology and anatomy of *Amphilophium crucigerum*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.006>
- Charpentier Alfaro, C., & Méndez Arias, J. (2020). Enzymatic conversion of treated oil palm empty fruit bunches fiber into fermentable sugars: Optimization of solid and protein loadings and surfactant effects. *Bio-mass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00724-y>
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
- De Oliveira Alves Sena, E., da Silva, P. S. O., de Araujo, H. G. S., de Aragão Batista, M. C., Matos, P. N., Sargent, S. A., ... Carnellosi, M. A. G. (2019). Postharvest quality of cashew apple after hydrocooling and cooled room. *Postharvest Biology and Technology*, 155, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.002>
- Diaz, J. P. V., Silva, F. D. A., & D'Almeida, J. R. M. (2016). Effect of peach palm fiber microstructure on its tensile behavior. *BioResources*, 11(4), 10140–10157. <https://doi.org/10.15376/biores.11.4.10140-10157>
- Do Nascimento, J. R. O., Júnior, A. V., Bassinello, P. Z., Cordenunsi, B. R., Mainardi, J. A., Purgatto, E., & Lajolo, F. M. (2006). Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.11.008>
- Esan, Y. O., Omoba, O. S., & Enujiugha, V. N. (2018). Biochemical and nutritional compositions of two accessions of *Amaranthus cruentus* seed flour. *American Journal of Food Science and Technology*, 6(4), 145–150. <https://doi.org/10.12691/ajfst-6-4-3>
- Espino, E., Cakir, M., Domenek, S., Román-Gutiérrez, A. D., Belgacem, N., & Bras, J. (2014). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of *Agave tequilana* and