

00528  
14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD A IONES DE LA  
CUTICULA DE *Agave tequilana* WEBER**

**TESIS MANCOMUNADA**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO DE ALIMENTOS**  
P R E S E N T A N :  
**BEATRIZ ADRIANA BAUTISTA MARTINEZ**  
**IRAK ALEJANDRO REYNAGA FONSECA**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2003.

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

**Presidente** Prof. Homero Hernández Montes  
**Vocal** Profa. María de los Ángeles Martínez Olmedo  
**Secretario** Dr. Antonio Peña Díaz  
**1er sup.** Profa. Leticia Gil Vieyra  
**2do sup.** Profa. Verónica Espinosa Cruz

**Sitio donde se desarrolló el tema:** Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Laboratorio 306, Edificio Ote.  
Ciudad Universitaria  
México, D.F.

**Asesor del tema**

  
\_\_\_\_\_


**Supervisor técnico y coasesor**

  
\_\_\_\_\_

**Sustentantes**

Bautista Martínez Beatriz A.  
Beatriz Adriana Bautista Martínez

  
\_\_\_\_\_

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo profesional.  
NOMBRE Bautista Martínez Beatriz A.  
Reynaga Fonseca Irak A.  
FECHA 27 Nov. 03  
FIRMA: 

B

Este trabajo se realizó dentro del proyecto "Estudio de la permeabilidad de la cutícula de *Agave tequilana* Weber", financiado por la Compañía: Industrias Vinícolas Pedro Domecq, S.A. De C.V. mediante un convenio con la UNAM, a través del Instituto de Fisiología Celular. Dentro del proyecto recibimos una beca, por la cual manifestamos nuestro agradecimiento a la Empresa y a la UNAM.

**Para que pueda ser he de ser otro,  
salir de mí, buscarme entre los otros,  
los otros que no son si yo no existo,  
los otros que me dan plena existencia.**

**Octavio Paz**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darnos la oportunidad de tener una vocación y de llegar a ser profesionistas.

Al Instituto de Fisiología Celular por brindarnos un espacio para poder desarrollar este trabajo.

Al Dr. Antonio Peña por ser paciente, amable y sencillo con nosotros, lo admiramos por ser un gran líder.

A Fernando por guiarnos siempre por el buen camino, por los regaños, por los ratos agradables, por las buenas ideas que suele tener y sobre todo por compartir sus conocimientos con nosotros y brindarnos su amistad.

Al los profesores Homero Hernández Montes y Ma. De los Ángeles Martínez Olmedo por la revisión del presente trabajo.

Al laboratorio 306 oriente y 206 sur del IFC, por permitimos el uso de su equipo y material.

Al Dr. Jesús Gracia Fadrique del laboratorio 104 Edif. B de la Facultad de Química y en especial a Alma Miriam Novelo por su ayuda en las determinaciones de tensión superficial.

Al Dr. Federico García Jiménez del Instituto de Química así como a María del Pilar Fernández y a Jesabel del Laboratorio de Análisis Físicos y Químicos del Ambiente del Instituto de Geografía de la UNAM, por su ayuda en este trabajo.

A Fernando, Lina, Juan Carlos, Martha, Norma, Carlos, Gloria, Criselda, Catalina, Adriana, José Luis, Rocío y Juan del IFC por su ayuda y amistad.

## **DEDICATORIAS**

**Bety**

A mis Papás Lola y Chucho por enseñarme a ser constante y luchar por lo que quiero, pero sobre todo por darme su apoyo, amor y comprensión durante toda mi vida. Los quiero mucho.

A mi hermana Sandra que aunque piense diferente a mi, siempre me apoya y me ayuda en los momentos más difíciles.

A Chuchito que aún siendo tan pequeño me enseña a disfrutar de la vida.

A mis tíos Eva Bautista, Mari, Guille, Lupe, Memo, Eva Martínez, Marjo y en especial a mi tía Corina por el apoyo que siempre nos ha dado a todos.

A Alejandro Reynaga por su apoyo tanto a Irak como a mí.

A Daniel y Rosario por ser como mis hermanos y tener dos preciosos niños que nos alegran la vida.

A Lupita por darme siempre su confianza, cariño y consejos. Te extrañamos mucho.

A Mariana Pedraza por ser mi amiga incondicional y estar conmigo siempre a pesar de la distancia. A Juan, por brindarme su amistad y su sentido del humor durante tantos años.

A mis amigos de la facultad en especial a Mariana Saucedo, Gina, Areli, Irak, Paco, Miguel, Lilí, Ana, Paris, Luz, Marisol, Clausen y Mileta, por la amistad y el apoyo que encontré en ustedes durante la carrera.

A mis maestros, que me inculcaron en gusto por las ciencias y en especial por la química.

**A los Psicotrópicos : Héctor, Horacio, Beto, Rober, Changuito, Jaime y Pedro por los momentos tan divertidos e inolvidables que pasamos con la música.**

**A Irak por estar siempre conmigo y llenar el espacio que faltaba en mi vida. Te Amo.**



## **Irak**

**A mi Papá por el apoyo en todo sentido y por haberme enseñado que la vida no es fácil.**

**A mi hermano Daniel por creer en mi y aunque él no lo sepa, por ser un ejemplo de alguien que no se da por vencido nunca.**

**A mis sobrinos Chany y Cesar por darme siempre ratos de felicidad y a Chayo por el apoyo en los momentos difíciles.**

**A mamá Lola y papá Chucho por darme un segundo hogar, hacerme sentir como de la familia y por toda la ayuda que he recibido de su parte, gracias.**

**A Bety, Claus y Mileta, por hacer mi estancia en la facultad un tanto más agradable, sobre todo cuando era época de exámenes.**

**A mis amigos de la secundaria, de la prepa y de la facultad, en especial a Edson por la gran amistad que nos ha unido siempre. A Juan y Mariana que aún después de todo siguen con nosotros.**

**A mi Bety por compartir todo conmigo y apoyarme incondicionalmente, te quiero.**

**Y a mi Mamá por todo lo que represento para mí, por que a pesar de todo siempre estuvo donde la necesite, sin esperar nunca nada a cambiό,**

**Espero nunca haberte fallado...**

**lamento que sea demasiado tarde.**

## ÍNDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>Agave tequilero: <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul</b> .....	4
Situación actual de la industria tequilera.....	4
Norma Oficial.....	5
Clasificación taxonómica.....	9
Descripción botánica.....	10
<b>Zonas de plantación y condiciones de desarrollo</b> .....	11
<b>Labores agrícolas</b> .....	13
<b>Permeabilidad</b> .....	16
<b>Estructura de la cutícula</b> .....	16
<b>Metabolismo y estomas</b> .....	20
<b>Uso de tensoactivos en la aplicación de compuestos por vía foliar</b> .....	24
<b>OBJETIVOS</b> .....	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	28
<b>Material biológico</b> .....	28
<b>Material de laboratorio</b> .....	29
<b>Reactivos</b> .....	39
<b>Metodología</b> .....	30
<b>Conteo de estomas</b> .....	30
<b>Medición del grosor de la cutícula</b> .....	31
<b>Pruebas de permeabilidad</b> .....	31

Tensión superficial.....	32
Área.....	32
pH.....	32
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>Densidad estomática y grosor cuticular.....</b>	<b>33</b>
<b>Método para medir la permeabilidad.....</b>	<b>39</b>
<b>Permeabilidad a los iones.....</b>	<b>43</b>
<b>Permeabilidad con tensoactivos y sus parámetros fisicoquímicos.....</b>	<b>47</b>
<b>Difusión de los iones hasta el mesófilo.....</b>	<b>57</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>64</b>

## RESUMEN

En los agaves, al igual que en otras plantas la cutícula es un sistema que evita la evaporación del agua de la planta, ya que provee a las hojas una membrana extracelular protectora que actúa como barrera de permeabilidad a la pérdida de agua y a la aplicación de compuestos por vía foliar. Existen estudios de permeabilidad de cutículas de algunas plantas y árboles que demuestran las propiedades de la cutícula a diferentes compuestos y su velocidad de penetración (Kerstiens, 1996; Niederl y cols, 1998). Sin embargo para *A. tequilana* no existe información sobre la permeabilidad de la cutícula. La necesidad de un estudio de permeabilidad a través de las hojas surge de los problemas actuales en cuanto a la pérdida de iones causada por el lavado excesivo de los suelos en las zonas denominadas de origen donde se da el cultivo de *A. tequilana* (Valenzuela, 1994). Para realizar las pruebas de permeabilidad se utilizaron fragmentos circulares de la hoja (FCH) de un año, provenientes de plantas de cultivos de tejidos vegetales de la parte del cogollo por el haz (parte adaxial de la hoja). Se realizaron las pruebas de permeabilidad utilizando:  $^3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$ ,  $^{22}\text{NaCl}$ ,  $^{86}\text{RbCl}$  y  $^{45}\text{CaCl}_2$ . Un tubo Eppendorf cortado por la mitad y sellado con un elastómero de silicona de nombre comercial Oranwash<sup>®</sup> resultó ser el dispositivo ideal para contener la solución marcada y evitar fugas, con un área de  $0.66\text{ cm}^2$ . Los resultados obtenidos sobre la permeabilidad a distintos iones sugieren que la permeabilidad a los iones es prácticamente nula con respecto a la observada para el agua marcada con tritio, que llega a alcanzar una incorporación de hasta  $1\text{ mmol}\cdot\text{cm}^{-2}$  a las 8 horas de aplicada. Para favorecer la incorporación de los iones, se utilizaron 5 agentes tensoactivos comerciales, cada uno aplicado por separado a cada solución de estudio en la dosis recomendada en la etiqueta, con un periodo de exposición de 5 horas. Se encontró que el Full-Extensor<sup>®</sup> (poliéter de polimetil siloxano) es el que más favorece la penetración de los iones. Con base en esto se realizaron pruebas para ratificar la incorporación a lo largo del FCH, observando que los iones se difunden hasta el mesófilo en distintas proporciones y esto comprueba que atraviesan la cutícula.

## ANTECEDENTES

### **El agave tequilero: *Agave tequilana* Weber variedad azul.**

Los usos del agave son tan diversos como las necesidades y capacidades del hombre. Las distintas especies de agave y los productos obtenidos de ellas han tenido una enorme influencia económica, social y cultural en la historia de México. Entre las bebidas que se destilan de los agaves está el tequila, originario del estado de Jalisco. El agave tequilero enfrenta hoy una crisis productiva por su excesiva explotación, la disminución de la calidad de los suelos ocasionada por el lavado excesivo, así como la afectación y pérdida de plantas por la presencia de plagas y enfermedades, resultado de la escasa investigación y desarrollo de la tecnología (Valenzuela, 1994; Nobel, 1998).

### *Situación actual de la industria tequilera*

El agave azul, a diferencia de otros cultivos, requiere de ocho a diez años para su maduración fisiológica y la formación de los azúcares fermentables que contiene la piña, que son necesarios para obtener el aguamiel, materia prima de partida para la elaboración del tequila (Valenzuela, 1994; Nobel, 1998.). Por esta razón se ha generado una escasez de materia prima, que se presenta de manera cíclica; la crisis de abasto que afecta hoy la producción de tequila y que persistirá en los próximos años, no sólo se debe a las plagas y heladas que dañaron los plantíos en 1997, sino al ciclo previo de sobreproducción del agave que ocasionó la desaparición de muchos millones de plantas, a una actividad agrícola intensa que no permitió la rotación de cultivos, a un sistema inadecuado de fertilización del suelo y a la falta de un control de plagas efectivo (Consejo Regulador del Tequila, 2002).

Después de que por muchas décadas fue considerado como popular, a principios de los años noventa, el tequila logró consolidarse como una de las bebidas con más demanda, tanto a nivel nacional como internacional. El auge tequilero de los noventa incentivó la producción de agave; el exceso de oferta originó problemas de comercialización y finalmente el abandono de las plantaciones y la pérdida de las reservas necesarias para hacer frente a la creciente demanda de la industria. La menor disponibilidad de agave azul empezó a sentirse a principios del 2002 y sus precios aumentaron significativamente. Actualmente, el tequila se exporta a países como Estados Unidos, Alemania, Canadá, España, Japón, Gran Bretaña, Australia, Italia y Suiza y su competitividad ha disminuido en los últimos meses por los aumentos en los precios; se empieza a sentir la presión de algunos sectores de la industria para reducir el contenido de agave de la norma para la fabricación de tequilas mixtos, para mantener así sus volúmenes de producción, su precio y su presencia en el mercado nacional e internacional. Esta modificación, sin embargo afectaría la imagen del producto, ya que será fundamental mantener la denominación de origen y el posicionamiento del producto (CRT, 2002).

#### *Norma Oficial*

La Norma Oficial Mexicana (NOM) permite la elaboración de tequila a partir de 51% de azúcares propios de agave y 49% de otras fuentes, principalmente fructosa de maíz, porcentajes que fueron ratificados por la NOM 006-SCFI-1994 emitida por la SECOFI en 1994 y publicada el 14 de agosto de 1997 en el Diario Oficial de la Federación. La norma establece la zona en donde podrá ser cultivado el agave como materia prima para la fabricación del tequila. No se prohíbe el cultivo de *A. tequilana* Weber azul en otras

zonas, sino que se señalan aquellas de las cuales se podrá extraer para que el producto sea considerado como tequila, que es lo que respalda la calidad del producto en México y el exterior.

De esta forma, la norma establece que el agave puede ser cultivado en los estados de Jalisco, Guanajuato, Nayarit, Tamaulipas y Michoacán.

Además la norma permite la reducción del contenido de alcohol proveniente de agave en el tequila hasta en un 51% como ya se había mencionado, debido a la enorme demanda que se ha generado en México y el resto del mundo.

De acuerdo con el porcentaje de los azúcares provenientes del agave, se distinguen dos categorías de tequila. La primera, **Tequila 100% de agave**, se define como el producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído dentro de las instalaciones de la fábrica, derivado de la molienda de las cabezas maduras de agave, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas, y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no. Para que este producto sea considerado como "Tequila 100% de agave" o "Tequila 100% puro de agave", debe ser embotellado en la planta de envasado que controle el propio fabricante, que deberá estar ubicada dentro de la zona de denominación de origen. La segunda categoría **Tequila** se define como producto que se obtiene de la destilación y rectificación de mostos, en cuya formulación se han adicionado hasta una proporción no mayor del 49% de azúcares distintos a los derivados de la molienda, extraídos dentro de las instalaciones de la fábrica, de las cabezas maduras del agave, previa o posteriormente hidrolizadas o cocidas y sometidos a fermentación alcohólica con levaduras, cultivadas o no, en el sentido de que no están permitidas las mezclas en frío.

La denominación de origen ha tomado un papel jurídico a nivel internacional, encauzada a evitar que los nombres de algunos productos que tienen prestigio o reconocimiento, sean utilizados en forma genérica por cualquier persona, empresa, gobierno, etc. Esto permite a los consumidores tener la seguridad de que el producto adquirido cumple con las expectativas de calidad y características del producto elegido, es por ello que el CRT ha elaborado un documento en donde explica las características de la etiqueta que ostenta el producto embotellado, la cual debe incluir datos importantes como el número de autorización del destilador, siglas de la NOM, % de alcohol volumen, y si es 100% agave, debe de tener el símbolo de denominación de origen entre otros (Fig. 1). Con esto se acepta que el nombre tequila sea aplicado solamente al aguardiente potable obtenido por la destilación de *A. tequilana* que se produce en el municipio de Tequila y otras regiones de Jalisco, y protege al tequila contra la elaboración de imitaciones procedentes de otros países.





Fig. 1. Características de la etiqueta que debe de ostentar el producto embotellado (Academia Mexicana del Tequila, 2003).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Clasificación taxonómica.*

*A. tequilana* pertenece al reino vegetal y al subreino de las fanerógamas. Su familia es la *Agavaceae* y está integrada por ocho géneros, entre los cuales se encuentra el género *Agave*. De esta Familia en el continente americano se encuentran 273 especies descritas desde el norte de Dakota hasta Bolivia y Paraguay. México cuenta con 205 especies, de las cuales 151 son endémicas.

A su vez *A. tequilana* se incluye en la sección *Rigidae*, a la cual pertenecen una gran cantidad de especies fibreras y mezcaleras de México; este grupo se puede reconocer por la forma de sus hojas angostas y muy rígidas. La Fig. 2 muestra la clasificación propuesta por Cronquist en 1981.

Reino	Vegetal
División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Monocotiledoneae</i>
Orden	Liliales
Familia	<i>Agavaceae</i>
Género y especie	<i>Agave tequilana</i>

Fig. 2 Clasificación taxonómica de *A. tequilana* Weber (Granados, 1993)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### *Descripción botánica*

*A. tequilana* Weber es una planta surculosa; esto se refiere al renuevo a partir de un tallo viejo, que se extiende radialmente, de 1.2 a 1.8 metros de altura. Su tallo es grueso, corto, de 30 a 50 cm. de altura al madurar. Las hojas de 90 a 120 cm. son lanceoladas (de base más o menos amplia, atenuada hacia el ápice), acuminadas (ápice de hoja con márgenes rectos que terminan en un ángulo menor a los 45 grados) y de fibras firmes, casi siempre rigidamente estiradas, cóncavas, de ascendentes a horizontales. Lo más ancho de las hojas se encuentra hacia la mitad y son angostas y gruesas hacia la base, generalmente de color verde azulado. El borde de las hojas es recto a ondulado o repando (tipo de margen con entradas escasas, graduales e irregulares); los dientes suelen ser de tamaño regular y espaciados irregularmente, en su mayoría de 3 a 6 mm de largo a la mitad de la hoja. Los ápices de los dientes son delgados, curvos o de orientación curvada, desde poca altura de la base piramidal. Los dientes son de color café claro a oscuro, de 1 a 2 cm. de separación; rara vez son largos. La espina suele ser corta, de 1 a 2 cm. de largo, pocas veces larga achatada o abiertamente surcada de arriba; su base es ancha, café oscura decurrente o no decurrente. La inflorescencia es una panícula (muy ramificada) de 5 a 6 metros de altura y densamente ramosa a lo largo; es larga y difusa, de flores verdes y estambres rosados. Las flores son de 68 a 75 mm de largo con bracteolas (bráctea secundaria generalmente sobre el pedicelo) sobre los pedicelos (soporte individual de una flor que forma parte de una inflorescencia) de 3 a 8 mm de longitud. El ovario es de 32 a 38 mm de largo, cilíndrico con cuello corto, inconstricto, casi terminado en punta sobre la base. El tubo floral es de 10 mm de ancho, en forma de embudo y surcado. Los pétalos son desiguales, de 25 a 28 mm de longitud por 4 mm de ancho, lineales y erectos, pero rápidamente flojos en la floración, cambiando entonces a cafésosos y secos. Los

filamentos miden de 45 a 50 mm de largo, doblados hacia adentro junto al pistilo, insertos de 7 a 5 cerca de la base del tubo. El fruto es una cápsula ovalada que termina gradualmente en una punta rígida y aguda (Valenzuela, 1994).

#### **Zonas de plantación y condiciones de desarrollo.**

El agave tequilero se ha convertido en un cultivo importante, principalmente en el estado de Jalisco, debido a que la demanda de tequila aumentó a partir de la obtención de la denominación de origen; este incremento fue paralelo a la disminución de la superficie cultivada de agave debido entre otras causas al bajo precio de las piñas entre los años de 1996-1998 y a distintas plagas que atacaron los cultivos tales como el piojo harinoso, el picudo del agave, y algunas especies de hongos que atacan principalmente al cogollo (CRT, 2002).

Por lo tanto, el interés en establecer nuevas zonas de cultivo ha ido aumentando; además de las zonas tradicionales de cultivo, se han utilizado otras con ambientes más calidos o más fríos. Pero se sabe que la temperatura puede influir en procesos fisiológicos básicos como la fotosíntesis y la respiración (Ruiz-Corral y cols., 2002), estos procesos son importantes, pues determinan la cantidad de azúcares que se forman en las hojas y que posteriormente se transportan y se almacenan en las piñas.

El óptimo desarrollo de *A. tequilana* se da en aquellas regiones donde la temperatura no desciende de los  $-7^{\circ}\text{C}$ , ya que las temperaturas menores a esta causan daños severos en la planta. Además deben tener la cualidad de que la temperatura por la noche oscile entre los  $12-16^{\circ}\text{C}$  y por el día entre  $22-26^{\circ}\text{C}$ , ya que a estas temperaturas son mayores los valores de asimilación de  $\text{CO}_2$  aproximadamente de  $700 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ , importantes para

tener una mayor ganancia de carbono y llevar a cabo de una manera optima el proceso de fotosíntesis (Ruiz-Corral y cols., 2002).

La región cultivada con mayor antigüedad corresponde a Tequila Jalisco; aunque en la región de los Altos es donde surgió la actividad agroindustrial del agave tequilero, ambas regiones conforman dos núcleos geográficos separados con sistemas de producción de agave muy diferentes en cuanto a condiciones ambientales, como el clima y los suelos. En realidad las plantaciones de agave no siguen estrictamente una distribución bajo los límites municipales; se estima que el agave tequilero se cultiva en bajos porcentajes en municipios del sur de Jalisco en municipios como Tonaya y Venustiano Carranza, Tlajomulco y Jocotepec. Dentro de ese bajo porcentaje se encuentran las plantaciones de los estados de Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas (Fig. 3).

La norma establece que el agave puede ser cultivado en todo el estado de Jalisco con 124 municipios, en 7 municipios de Guanajuato, 8 de Nayarit, 11 de Tamaulipas y 29 de Michoacán.

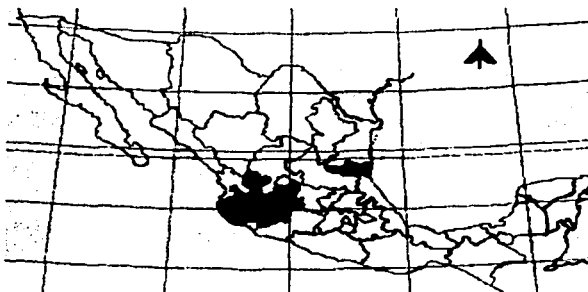


Fig.3 En el mapa se observan las zonas permitidas por la norma y que están contempladas por la denominación de origen (CRT, 2002)

#### **Labores agrícolas.**

La productividad de un sistema de cultivo se determina basándose en el costo de inversión, en relación con la aplicación de fertilizantes, abonos, herbicidas, insecticidas, la introducción de maquinaria, el periodo de tiempo de acuerdo con las características del cultivo en el cual se obtiene la cosecha y el rendimiento del producto principal, así como de los productos secundarios. En el sistema agavero, el uso de fertilizantes, abonos, herbicidas e insecticidas, en la zona de cultivo de *A. tequilana* es irregular y suele depender de la tecnología que utilice el agricultor, ya que para algunos el agave no necesita de estos compuestos para su buen desarrollo; no obstante los cultivos que pertenecen a las industrias manejan con mayor regularidad estos productos (Granados, 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En cualquier sistema de producción de agave se requiere un mantenimiento anual en el que se atiendan aspectos básicos como el laboreo de suelos, podas, fertilización y aplicación de abonos, prevención y control de plagas y enfermedades y control de malezas, utilizando para ello un control químico y un control manual.

Las labores agrícolas manuales de mantenimiento del cultivo requieren de aprendizaje y capacitación específica (Valenzuela, 1994).

Inicialmente los herbicidas en el agave se utilizaron bajo el criterio de experiencias personales, y las recomendaciones carecían de fundamentos sólidos de investigación. Esto trajo como consecuencia resultados de campo no deseables y creó un ambiente de confusión y desconfianza en el uso de estos productos entre los productores de agave.

Actualmente el control químico se ha generalizado entre los productores de agave por representar ventajas económicas comparadas con el control manual o mecánico; sin embargo, el uso de herbicidas y fertilizantes en el cultivo del agave puede ser delicado cuando los productos utilizados se aplican fuera de las recomendaciones técnicas. Es por ello que el productor debe estar consciente de que no existen herbicidas completamente selectivos al agave tequilero y que es muy importante que seleccione un producto cuya efectividad haya sido probada, ya que muchas veces estos compuestos no logran cumplir la función deseada, simplemente porque no logran librar las barreras medioambientales.

Es notable la falta de investigación de productos químicos dirigidos a los cultivos de *A. tequilana*. Hasta ahora no existe ningún producto dirigido específicamente para este cultivo (Vademécum Agrícola, 2002.); existen sólo unos pocos para el género *Agave*, lo cual refleja la carencia de investigaciones en esta planta enfocadas al desarrollo de la industria del Tequila. En los últimos 20 años han sido mínimas (Fig. 4) en comparación con las investigaciones que hasta 1996 se han realizado en el maíz. Cabe mencionar que

en cuanto a las exportaciones de productos mexicanos como el propio maíz, este deja un ingreso más bajo que el tequila (tabla 1), contradiciendo la prioridad en investigaciones que se le ha dado a otros productos de origen alimentario.

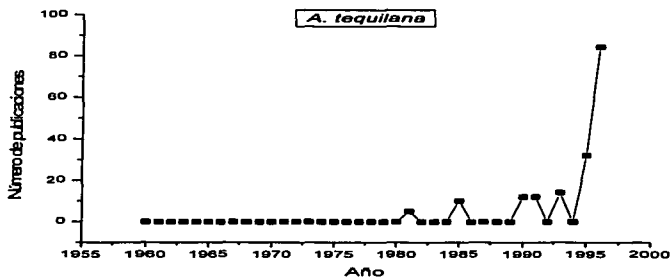


Fig. 4. Número de investigaciones publicadas de *A. tequilana* reportadas hasta 1996. (Australian New Crops , 2003).

Tabla 1. Algunos de los principales productos exportados en México durante Enero 2003 (Bancomext, 2003).

Principales productos exportados no petroleros			
Enero 2003			
Producto	Tequila	Manteca de cacao	Maíz
Monto (millones de dólares)	41	1	1
Numero de publicaciones (reporte 1996)	88	16	980

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### **Permeabilidad.**

El término permeabilidad implica la existencia de una membrana selectiva hacia algunos compuestos, que permite o no su paso hacia el otro lado de ella. La aplicación de los compuestos químicos en los cultivos es un proceso complejo, ya que en algunos de los casos se requiere que difundan hacia el interior de la planta, entendiéndose como difusión en las plantas al mecanismo mediante el cual una molécula penetra la cutícula (Bukovac y Petracek, 1993). La cutícula en las plantas es una membrana que impide el paso de sustancias hacia el interior de las hojas por la estructura compleja que la compone y las ceras que la rodean; a su vez los estomas de las hojas actúan como poros mediante los cuales las sustancias pueden penetrar bajo ciertas condiciones; sin embargo, para *A. tequilana* no hay estudios concretos sobre la fisiología de la cutícula y los estomas, ni sobre sus implicaciones tecnológicas.

### **Estructura de la cutícula.**

La cutícula (Fig. 5) es una capa extracelular protectora que cubre a las hojas y forma una interfase entre el interior de las hojas y el medio externo, por lo que actúa como una barrera de permeabilidad (Kerstiens, 1996).

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

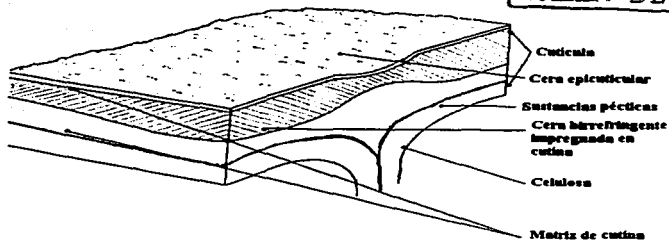


Fig. 5. Esquema de la epidermis y las capas que conforman la cutícula (Flores-Vindas, 1999).

Esta estructura se compone de una capa lipídica extracelular que actúa como una interfase entre la célula epidérmica vegetal y el medio externo. Consta de una matriz insoluble de biopolímeros llamada cutina, que está entrelazada mediante ácidos grasos hidroxilados de cadena larga y tiene embebidos compuestos solubles en solventes orgánicos conocidos como ceras. (Reina y Borraz, 2003).

La matriz insoluble de biopolímeros es una red tridimensional compuesta por ceras y microfibrillas de polisacáridos; cuando el polímero lipofílico es un poliéster de ácidos grasos hidroxi o epoxi de cadena de 16 a 18 carbonos es llamado cutina. Los ácidos grasos son principalmente una mezcla de ácido palmítico hidroxilado (C16) y ácido oleico (C18), y cuando no se hidroliza por calentamiento con  $\text{BF}_3$ /metanol (el cual rompe los enlaces éster de la cutina) es llamado cután. La composición relativa de cutina y cután en la matriz polimérica lipídica varía entre 0 y 100%. (Kerstiens, 2001)

Las ceras que se encuentran en la superficie externa de la cutícula se denominan ceras epicuticulares, y forman una película lisa cristalina muy delgada como polvo blanco que

sirve de protección para el organismo; por su naturaleza contribuyen a la regulación de la transpiración, y la manera como se encuentran en el tejido epidérmico tiende a favorecer la conservación de un medio estable en temperatura y humedad (Villagrán, 1939). La forma de cristalización de las ceras epicuticulares depende de su composición, del estado de desarrollo de la planta y del efecto directo o indirecto de contaminantes ambientales como el ozono, la lluvia ácida o las partículas de polvo (Reina y Borraz, 2003).

Las ceras restantes, y posiblemente la mayor fracción de las ceras totales son llamadas ceras intracuticulares, que se encuentran embebidas en el polímero de cutina. La composición de las ceras cuticulares es muy variable entre los distintos grupos filogenéticos, diferentes especies e individuos, y entre los distintos estados de crecimiento de un mismo individuo; su biosíntesis se lleva a cabo en las células epidérmicas mediante diferentes rutas bioquímicas que se regulan como respuesta a los factores ambientales como la humedad relativa, humedad de la tierra e intensidad luminosa. Sus principales componentes son cadenas de n-alcanos, alcoholes primarios y secundarios, aldehídos, cetonas impares entre 12 y 37 carbonos, ácidos grasos de cadena larga en las ceras epicuticulares y corta en las intracuticulares, y largas cadenas de ésteres con 30-72 carbonos. Algunas cutículas también poseen compuestos cíclicos tales como triterpenos pentacíclicos, flavonoides y ácidos derivados del ácido hidroxicinámico. Las ceras cuticulares pueden ser extraídas con solventes orgánicos como cloroformo y analizadas por cromatografía de capa fina y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (Kolattukudy, 2001).

La importancia de la composición química de las ceras epicuticulares radica en la estrecha relación que existe con la morfología y ultraestructura de las mismas. De este modo, la presencia de unos u otros componentes determina la aparición de estructuras de

muy distintas morfologías (hélices, túbulos, cintas, varillas o placas) ya sean de tipo cristalino o amorfo. Así, los hidrocarburos y alcoholes primarios cristalizan en forma de placas, los alcoholes secundarios, cetonas y beta-dicetonas lo hacen como túbulos, los aldehídos cristalizan en forma de varillas y los dioles como cintas; por el contrario los triterpenos dan lugar a estructuras mayoritariamente amorfas (Reina y Borraz, 2003).

Debido al tamaño relativamente grande de las moléculas que componen la cutícula y su naturaleza altamente hidrofóbica, les proporciona a las plantas una barrera importante a la pérdida de agua, evitando su evaporación y la pérdida de sustancias del interior de la hoja, además de actuar como barrera física contra la penetración de patógenos e insectos y la absorción y difusión de compuestos aplicados exógenamente (Casado y Heredia, 2001); la cutícula juega por tanto un papel importante en la adaptación de las plantas al medio ambiente en donde se desarrollan. La cutícula de las plantas no se conoce con claridad, en parte porque la morfología y la composición química pueden variar de especie a especie y en las distintas etapas de desarrollo de los individuos. Para la cutícula de *A. tequilana*, no se han descrito las características estructurales ni se conocen reportes de la composición química de otras especies de agave solo se conoce la estructura morfológica de *A. cochelaris* y *A. lehmani jacobi*, en los cuales se observa que están totalmente recubiertos por una gruesa capa de cutina, desarrollada de igual forma en el haz y en el envés, y su cutícula llega a medir de 25  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de espesor (Villagrán, 1939).

### **Metabolismo y estomas**

Las plantas en general fijan dióxido de carbono en presencia de luz solar; en estas condiciones, los estomas, poros microscópicos, de las hojas se abren, y comienza el intercambio de gases con el medio, incluyendo vapor de agua; este intercambio representa una pérdida importante de agua para las plantas. En el caso de los agaves, estos evolucionaron en condiciones de poca humedad y forzosamente tuvieron que modificar su metabolismo para impedir que el agua almacenada se perdiera fácilmente, de tal manera que los estomas se abren durante la noche para tomar dióxido de carbono y disminuir la salida de agua.

Una de las características más importantes de este tipo de metabolismo es que el dióxido de carbono es fijado en la oscuridad en forma de ácidos orgánicos, por lo que la acidez de los tejidos aumenta durante la noche y es por esto que se le conoce como metabolismo del ácido crasuláceo, o metabolismo CAM (Valenzuela, 1994).

Como se mencionó anteriormente, para facilitar el intercambio de gases de las hojas con sus alrededores, los estomas deben abrirse, pero además las moléculas se impulsan por un gradiente de concentración que les permite entrar o salir de los tejidos celulares; en general se mueven hacia regiones de menor concentración, mediante el fenómeno conocido como difusión.

La tasa de difusión aumenta a medida que aumenta la diferencia de concentración entre dos regiones, la concentración de vapor de agua dentro de los tallos y de las hojas de los agaves está esencialmente saturada, y aumenta con la temperatura. Gracias a que los estomas permanecen cerrados durante las horas de luz y con temperaturas alrededor de los 30°C, la diferencia de concentración entre el tejido y el medio provoca la difusión

fuera de la planta; este proceso es conocido como transpiración. En la noche, con una temperatura de 10°C las partículas difunden lentamente a través de los poros estomáticos, por lo que la pérdida de agua es menor, siendo este un sistema muy ventajoso aplicado por los agaves para conservar el agua (Nobel, 1998).

Los estomas o poros estomáticos son estructuras formadas por dos células especializadas llamadas células guarda, oclusivas o estomáticas (con forma de riñón). Entre estas células existe un espacio intercelular llamado ostiolo o poro estomático, los cambios de turgencia en estas células regulan la apertura de los estomas. Las células que se encuentran en contacto directo con los estomas se llaman células auxiliares adyacentes o subsidiarias, cuya función es coadyuvar a las funciones de los estomas (Arzate-Fernández, 2001). Cuando se produce la apertura, el estoma alinea su cámara subestomática con los tejidos del mesófilo y con esto se crea un portal a través del cual se da el intercambio de gases entre las células de las hojas y el medio ambiente, por lo que los estomas juegan un papel importante en la permeabilidad de compuestos aplicados por vía exógena (Flores-Vindas, 1999). Los estomas se encuentran en las partes aéreas de prácticamente toda la flora terrestre; aunque con frecuencia se encuentran en las hojas, también pueden encontrarse en tejidos como tallos, frutos y partes de inflorescencias. Pueden localizarse en las dos caras de la hoja o pueden estar restringidos en la superficie inferior de las hojas. Las hojas que tienen estomas en ambas caras se denominan anfistomáticas, las que los tienen en la superficie inferior se denominan hipoestomáticas. La función específica de los estomas es regular el intercambio de gases de la planta con su medio; por lo tanto los estomas desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la homeostasis de la planta. En los agaves, la pérdida de agua tiene lugar principalmente a través de los estomas (Fig. 6).



**Fig. 6. Estoma de *A. tequilana* Weber**

Por su naturaleza, los estomas han estado implicados en el proceso de absorción foliar; sin embargo, se desconocen los mecanismos. Algunos estudios revelan que la penetración foliar es mayor en superficies con mayor densidad estomática (Holloway y cols., 1994) por lo que los estomas podían proveer vías directas para la penetración.

Además de la cutícula y los estomas, existen otros factores que pueden influir en la permeabilidad de un compuesto aplicado por vía foliar, como el estado físico del compuesto, el punto de fusión, y su naturaleza. Existe un modelo que describe los factores que influyen en la penetración cutánea por compuestos que involucran una serie de pasos implicados en la penetración de un compuesto sólido sobre una superficie permeable (Holloway y cols., 1994):

- 1) El compuesto sólido debe de estar en solución
- 2) Se debe aplicar sobre la superficie; en el caso de las plantas sobre la cutícula

- 3) Debe librar la barrea medioambiental (evaporación, remoción por lavado, fotodescomposición)
- 4) Debe moverse hasta el punto donde va a actuar

Las reglas empíricas que rigen dicha penetración son:

- 1) Los solutos no polares son absorbidos mejor que los polares
- 2) Los agentes lipoidales penetran más fácilmente que los no lipídicos
- 3) Los sólidos con bajo punto de fusión son más fácilmente absorbidos que los de alto punto de fusión y los líquidos a su vez son más fácilmente absorbidos que los anteriores.

Estas generalizaciones pueden aplicarse de igual forma a la penetración foliar (Holloway y cols., 1994), por lo que se deben de tomar en cuenta como factores que influyen en la permeabilidad.

Para las hojas intactas, el modelo de penetración foliar de compuestos orgánicos diluidos en soluciones acuosas puede describirse en cuatro pasos (Kerstiens, 1996):

- 1) Absorción en la superficie
- 2) Disolución en las ceras y/o en la cutina que forman una barrera al transporte
- 3) Difusión a través de la barrera de transporte de ceras y de la matriz polimérica adyacente
- 4) Transferencia o desorción del soluto de la membrana cuticular hacia el apoplasto de la pared celular.

Aunados a estos modelos se han descrito las rutas de penetración de algunos solutos; Hamilton y cols. (1982) mencionan que las ceras epicuticulares son la principal barrera a la difusión de agua, gases y solutos que atraviesan la cutícula, en la que las zonas cristalinas no son permeables, pero las amorfas que las separan vertical y horizontalmente



permiten la difusión de las moléculas. Aunque el paso es muy difícil, estas zonas amorfas son denominadas poros acuosos y se cree que esta es una de las dos vías existentes para la difusión de sustancias a través de la cutícula y la cual es específica para sustancias polares, como en el caso de la difusión de  $^{36}\text{Cl}$  (Schönherr, 2000), la otra vía se da por dominios lipofílicos para sustancias hidrofóbicas como los herbicidas (Kerstiens, 1996).

#### **Uso de tensoactivos en la aplicación de compuestos vía foliar.**

Una vez conocidas las barreras de permeabilidad, sabemos que para favorecer la entrada de compuestos aplicados por vía foliar, habría que seguir un riguroso sistema de control de aplicación de químicos en las plantas, dado que se deben respetar las condiciones en que mejor una planta con metabolismo CAM difunde los compuestos al interior. El uso de fertilizantes, herbicidas e insecticidas aplicados vía foliar en las plantas es efectivo cuando el compuesto logra pasar la barrera cuticular de la planta y penetrar al interior, trasladándose al sitio en donde va a cumplir su función. Existen numerosas formulaciones de compuestos que utilizan agentes tensoactivos que ayudan al proceso cumpliendo diferentes funciones, ya sea mediante la humectación, penetración, activación, o emulsificación. Los efectos de los coadyuvantes químicos en las plantas son muy complejos, ya que dependen de la composición de la membrana cuticular y del compuesto que se quiera aplicar (Holloway y cols., 1994).

Los agentes tensoactivos, llamados también surfactantes o agentes de superficie activa, son especies químicas con una naturaleza o estructura polar-no polar (anfifílicos), con tendencia a localizarse "convenientemente" en la interfase, formando una capa monomolecular adsorbida en la interfase (Young, 1951).

Las soluciones de tensoactivos resultan activas al colocarse en forma de capa monomolecular adsorbida en la superficie entre las fases hidrofílicas e hidrofóbicas. Esta ubicación "impide" el tráfico de moléculas que van de la superficie al interior de líquido en busca de un estado de menor energía, disminuyendo así, el fenómeno de tensión superficial ( $\gamma$ ). Otra propiedad de los tensoactivos consiste en que en solución diluida se comportan como electrolitos normales, pero a una cierta concentración bien definida, ocurren cambios fisicoquímicos como un cambio brusco de tensión superficial, de conductividad ó de presión osmótica, etc. (Unda, 2003).

En general, los surfactantes agrícolas se clasifican de acuerdo a su acción en:

**Humectantes:** que aumentan la capacidad de un líquido para humedecer, logrando con ello mayor cubrimiento y penetración de la mezcla aplicada.

**Emulsificantes:** que estabilizan la dispersión coloidal proveniente de la mezcla de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles.

**Dispersantes:** que reducen la adhesión entre partículas y mantienen la estabilidad de las suspensiones, minimizando la formación de grumos y sedimentos.

Algunos surfactantes por sus características físicas pueden ser considerados como "adherentes", que pueden aumentar la capacidad de una mezcla para permanecer por más tiempo sobre una superficie, aún bajo condiciones desfavorables, propiedades derivadas todas de su efecto "Hipotensor" y que en mayor o menor grado pueden presentar (Jiménez y Macarulla, 1989).

### **Efectos de humectación.**

Cuando una pequeña cantidad de un líquido se coloca sobre una superficie plana como la superficie de una hoja, la forma de la gota dependerá de su naturaleza y de las interacciones de las dos fases (la del líquido y la de la hoja). Si hay repulsión, el líquido tenderá a formar un glóbulo, con un ángulo de contacto elevado (mayor a  $90^\circ$ ) entre su superficie y la tangente de su curvatura, lo que resulta que el sólido no se humecta; por el contrario si la adhesión entre la gota de líquido y el sólido es favorable, el ángulo de contacto resultará pequeño (menor de  $90^\circ$ ), la gota se extiende, y se dice que el sólido es mojado por el líquido (Unda, 2003).

Se obtiene un ángulo de contacto cero cuando las fuerzas de atracción entre el líquido y el sólido (fuerzas de adhesión) son iguales o mayores que entre los que hay entre el líquido y el líquido (fuerzas de cohesión) y el ángulo de contacto tomará un valor determinado cuando la cohesión en el líquido sea mayor que la cohesión del sólido. De hecho, podemos decir que el sólido es tanto más mojado, cuanto más agudo sea el ángulo, es decir cuando sea mucho menor a  $90^\circ$ , y viceversa. Para el caso de la penetración foliar este principio es importante porque influye en el contacto entre la solución y la hoja para después penetrar al interior (Unda, 2003).

En el caso extremo de humectación perfecta o mojado total, el ángulo de contacto tendría un valor de cero; por el contrario la humectación nula implica un ángulo de  $180^\circ$  aunque estos valores no se alcanzan en la práctica (Fig. 7).

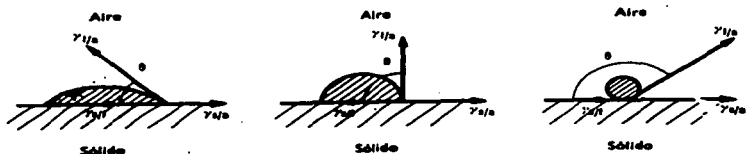


Fig. 7. Efecto de la humectación sobre una superficie plana (Unda, 2003)

Este fenómeno se representa mediante la ecuación de Young

$$\gamma_{l/g} \cos\theta + \gamma_{s/l} = \gamma_{s/g}$$

Donde

$\gamma_{l/g}$  =tensión superficial en la interfase líquido-gas

$\theta$  =ángulo de contacto

$\gamma_{s/l}$  = tensión superficial en la interfase sólido-líquido

$\gamma_{s/g}$  = tensión superficial en la interfase sólido-gas

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Mientras que la química de las superficies y su morfología determinan las propiedades del mojado y el grado de retención de la sustancia asperjada, la estructura química de la membrana cuticular influye en la penetración transcúticular. Algunos surfactantes específicos también pueden aumentar la penetración no sólo por un incremento de la interacción del penetrante con la cutícula, sino también por la plastificación de las ceras y el polímero de cutina (Bukovac y Petracek, 1993; Bukovac, 1997).

Hasta la fecha no existe ninguna investigación sobre la permeabilidad de la cutícula de la especie de *A. tequilana* y sólo existe un reporte acerca de sus características estructurales que son factores clave en dicha permeabilidad (Hernández y cols., 2002).

## **OBJETIVOS**

El presente estudio se realizó para obtener información acerca de la permeabilidad en la cutícula de *A. tequilana* Weber a soluciones acuosas primeramente iónicas, como la base para estudios posteriores con moléculas de mayor complejidad como hormonas de crecimiento o plaguicidas. Se plantearon los siguientes objetivos:

Encontrar la mejor zona de estudio en la planta para realizar una caracterización de la cutícula de *A. tequilana* Weber que consiste en el conteo de los estomas y la medida del grosor de la cutícula en la parte basal, media y apical de las hojas de edades de 1, 2, y 4 años.

Establecer un método para la realización de las pruebas de permeabilidad

Realizar un estudio cuantitativo de la permeabilidad de la cutícula en las hojas de *A. tequilana* Weber a agua marcada con tritio ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ) y iones en solución entre los cuales están:  $^{22}\text{NaCl}$ ,  $^{86}\text{RbCl}$ ,  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  y  $^{45}\text{CaCl}_2$  utilizando distintos tiempos de exposición, y diferentes agentes tensoactivos comerciales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico.**

Se realizó el conteo de estomas y la medición del grosor de cutícula con plantas de *A. tequilana* Weber obtenidas a partir de cultivo de tejidos vegetales (CTV) o un año, así

como plantas silvestres, de dos años y cuatro años de edad; se utilizaron hojas del cogollo (hojas centrales que forman un ángulo de 90°), de la parte intermedia (forman un ángulo de 45°) y de la periferia (las que están totalmente horizontales), los cortes se hicieron en la parte basal, media y apical, tanto por el haz como por el envés. Las plantas se mantuvieron en macetas de 30 x 20 centímetros con medio Peat Moss-agrolita-tierra cactus en proporción 2:2:1 con una intensidad promedio de luz (Flujo fotosintético de fotones) de  $783.26 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$  mantenidas en un invernadero a temperaturas entre los 14-33 °C y humedad relativa de 60-80%. Para las pruebas de permeabilidad se utilizaron de la 1ª a la 3ª hojas del cogollo de plantas obtenidas a partir de CTV de un año de edad.

#### **Material de laboratorio.**

- Microscopio de fluorescencia Nikon Modelo EFD-3
- Cámara digital Panasonic GP-KR222
- Contador de centelleo Beckman LS 600 SC
- Tensiómetro de DuNoüy marca Cenco, Cat. No. 70535
- Potenciómetro HANNA Instruments microprocessor pHMeter pH 210
- Tubos Eppendorf de 1ml cortados por la mitad
- Microtomo de mano
- Micropipetas automáticas SOCOREX 2, 20, 200, 1000  $\mu\text{l}$
- Viales de centelleo de 20 ml

#### **Reactivos.**

- Naranja de acridina 10mM
- Solución Murashigue y Skoog de Sigma-Aldrich (mezcla de sales del medio MS)

-Polímero de silicona de nombre comercial Oranwash®

-Líquido de centelleo que en su composición es:

-Triton X-100 25.7%

-Etilen-Glicol 3.7%

-Etanol 10.6%

-Xileno 60%

-PPO (feniloxazol) 3g/L

-Sales de los iones marcados en solución: Se prepararon las soluciones de los cloruros para cada ión a concentración 10mM y se agregó la marca radiactiva de tal manera que 20µl de esa solución en 10ml de líquido de centelleo dieran alrededor de 40000 CPM. Las soluciones que se prepararon fueron las siguientes:

-Agua marcada con  $^3\text{H}$

-Cloruro de sodio marcado con  $^{36}\text{Cl}$

-Cloruro de sodio marcado con  $^{22}\text{Na}$

-Cloruro de rubidio marcado con  $^{86}\text{Rb}$

-Cloruro de calcio marcado con  $^{45}\text{Ca}$

-Soluciones de tensoactivos no iónicos comerciales: Cada solución se preparó de acuerdo a la dosis recomendada en la etiqueta de los tensoactivos (ver tabla 4), los cuales se agregaron en la solución de estudio.

### **Metodología.**

#### *Conteo de estomas.*

Se utilizaron fragmentos de cutícula aislada, por desprendimiento de la hoja, se tiñeron con una solución de naranja de acridina 10 mM por 5 min. Posteriormente los

fragmentos se enjuagaron con solución de Murashige y Skoog. Una vez montada la preparación en el portaobjetos se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon EFD-3 equipado con una cámara de video, y se tomaron 10 campos por preparación, guardando las imágenes en formato bmp para posteriormente contar el número de estomas por campo. Los datos obtenidos se analizaron mediante prueba de t a un nivel de confianza de 0.05%.

#### *Medida del grosor de la cutícula.*

Mediante un microtomo de mano se realizaron cortes transversales de las hojas de 20  $\mu\text{m}$  de grosor, a un cm. del borde de la hoja; posteriormente se tiñeron los cortes con una solución de naranja de acridina 10 mM; los cortes se enjuagaron con la solución de Murashige y Skoog y se montaron en portaobjetos, se realizó la observación en el microscopio de fluorescencia y se tomaron 10 imágenes del grosor por el haz y 10 por el envés a 400 aumentos, las imágenes se guardaron como archivos de tipo bmp y posteriormente se transformaron a archivos TIFF mediante el programa Corel Draw. Se midió el grosor de la cutícula en micrómetros abriendo las imágenes en el programa Imagequant. Los datos obtenidos se analizaron mediante una prueba de t a un nivel de confianza de 0.05%.

#### *Pruebas de permeabilidad.*

Para realizar las pruebas de permeabilidad fue necesario diseñar una metodología que nos permitiera poner en contacto las soluciones de estudio con la cutícula y posteriormente medir su difusión. El método utilizado se reporta en la parte de resultados.



### *Tensión Superficial.*

Se prepararon soluciones de los agentes tensoactivos comerciales en agua a diferentes concentraciones y se midió su tensión superficial mediante el método del desprendimiento del anillo con una balanza de Du Noüy.

El método del anillo consiste en medir la fuerza que se requiere para desprender un anillo horizontal de alambre de platino (de radio  $R$ ) de la superficie de un líquido. En la teoría elemental la fuerza  $P$  ha de ser dos veces el producto de la longitud del anillo por la tensión superficial, esto es  $P = 4\pi R\gamma$ . Para mayor precisión, la fuerza de retención se debe multiplicar por un factor de corrección  $F$  que varía desde 0.75 a 1.1 y depende de las dimensiones del anillo. En este caso el factor de corrección  $F$  fue de 0.98, por lo que los valores obtenidos de  $\gamma$  para cada solución se multiplicaron por este factor de corrección.

### *Área*

La medida del área de expansión de cada solución con tensoactivo, se obtuvo al colocar una gota de dicha solución sobre la superficie de una hoja de *A. tequilana* de la parte del cogollo, tomando fotografías con una cámara digital, que se analizaron mediante el programa Imagequant, el cual reporta el área en  $\text{mm}^2$ .

### *pH*

Para medir el pH de las soluciones con el tensoactivo, se utilizó un potenciómetro marca HANNA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Densidad estomática y grosor cuticular.

La tabla 2 muestra en primer lugar la densidad estomática por  $\text{mm}^2$  (Fig. 8) de las plantas obtenidas a partir de 1 año, 2 años y 4 años. Para las hojas de 1 año se encontró que las hojas de la parte del cogollo son las que tienen un mayor número de estomas, siendo casi del doble con respecto a las hojas de la periferia. Con respecto a las hojas intermedias no es muy notable la diferencia en las partes apical e intermedia, a excepción de la parte basal, donde el número de estomas es de 21 por su parte adaxial (haz) y 13 por su parte abaxial (envés), comparado con 46 por la parte adaxial y 49 por la parte abaxial para las hojas del cogollo. La densidad estomática máxima osciló entre 50 y 60 estomas por  $\text{mm}^2$ . Las hojas de las plantas de 2 años mostraron también en el cogollo una mayor densidad estomática que las hojas intermedias y periféricas de la planta.



Fig. 8. Muestra los poros estomáticos de *A. tequilana* en un  $\text{mm}^2$ .

Tabla 2. Promedio de la densidad estomática (número de estomas por mm<sup>2</sup>) de tres grupos de edad de *A. tequilana*

Hojas	Parte de la hoja	Cara	# estomas/ mm <sup>2</sup> 1 año	$\sigma$	#estomas/ mm <sup>2</sup> 2 años	$\sigma$	# estomas/ mm <sup>2</sup> 4 años	$\sigma$
Cogollo	Ápical	haz	<b>59.30</b>	±3.1	<b>104.4</b>	±4.7	<b>89.2</b>	±1.6
		envés	<b>46.60</b>	±4.3	<b>91.90</b>	±4.6	<b>79.70</b>	±4.7
	Media	haz	<b>50.08</b>	±4.6	<b>99.80</b>	±2.8	<b>93.50</b>	±2
		envés	<b>60.57</b>	±4.9	<b>96.90</b>	±3.5	<b>90.90</b>	±5.1
	Basal	haz	<b>46.83</b>	±3.7	<b>95.10</b>	±5.5	<b>71.90</b>	±3.6
		envés	<b>49.20</b>	±4.4	<b>92.30</b>	±4.8	<b>75.60</b>	±5.7
Intermedia	Ápical	haz	<b>50.38</b>	±3.7	<b>77.80</b>	±5.9	<b>80.70</b>	±3.6
		envés	<b>52.10</b>	±2.8	<b>78.16</b>	±1.9	<b>82.50</b>	±3.6
	Media	haz	<b>44.00</b>	±2.7	<b>81.70</b>	±3.4	<b>74.06</b>	±5.7
		envés	<b>47.50</b>	±2.9	<b>76.90</b>	±1.9	<b>73.30</b>	±4.2
	Basal	haz	<b>21.12</b>	±4.4	<b>66.19</b>	±3.5	<b>64.20</b>	±3.7
		envés	<b>13.15</b>	±1.9	<b>26.8</b>	±3.1	<b>57.00</b>	±2.0
Periferia	Ápical	haz	<b>28.20</b>	±2.7	<b>75.50</b>	±5.3	<b>70.70</b>	±2.8
		envés	<b>27.00</b>	±3.6	<b>76.30</b>	±4.3	<b>73.20</b>	±5.0
	Media	haz	<b>31.40</b>	±3.4	<b>64.12</b>	±4.5	<b>65.50</b>	±3.1
		envés	<b>28.20</b>	±2.7	<b>75.70</b>	±3.6	<b>38.80</b>	±3.0
	Basal	haz	<b>25.40</b>	±1.9	<b>47.40</b>	±3.8	<b>46.90</b>	±3.1
		envés	<b>17.70</b>	±2.2	<b>36.40</b>	±2.9	<b>50.00</b>	±3.1

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Comparando la densidad estomática presente en la parte adaxial y abaxial de los grupos de hojas estudiados, se encontraron diferencias pequeñas y sin significación estadística en la parte basal de las hojas de la periferia, en la parte basal de las hojas intermedias, así como en la parte apical de las hojas del cogollo, por lo que estas zonas son ambiestomáticas (aproximadamente igual número de estomas por la parte adaxial y abaxial).

Se encontró una clara tendencia de aumento de la densidad estomática de las hojas periféricas hacia las del cogollo. Finalmente, es importante señalar que, tal vez en contra de lo esperado, el número de estomas en las plantas de dos años es mayor en cada tipo de hoja y región de ella, de modo que como puede verse en la tabla, la cifra máxima alcanza cerca de 100 estomas por  $\text{mm}^2$ .

Para las hojas de 4 años también se observó una mayor densidad estomática en las hojas del cogollo, comparado con la densidad estomática presente en la parte intermedia de la planta; sin embargo, la tendencia al aumento de la periferia hacia el cogollo no es tan marcada.

Gentry y Sauck (1978) encontraron que el promedio de estomas por  $\text{mm}^2$  es de 40 para ambos lados de la hoja del género *Agave*. En términos más cuantitativos, el intervalo del número de estomas para las plantas de CTV va de 13 a 60 estomas por  $\text{mm}^2$ , para las hojas de 2 años de 36 a 104 estomas por  $\text{mm}^2$  y 38 a 93 estomas por  $\text{mm}^2$  para las hojas de 4 años. Estos intervalos no han sido reportados antes para *A. tequilana* Weber. Las diferencias en la densidad estomática nos indican que el organismo estudiado muestra una distribución heterogénea.

Tabla 3. Promedio del grosor de la cutícula ( $\mu\text{m}$ ) en los tres grupos de edad de *A. tequilana*.

Hoja	Parte de la hoja	Cara	Grosor $\mu\text{m}$ 1 año	$\sigma$	Grosor $\mu\text{m}$ 2 años	$\sigma$	Grosor $\mu\text{m}$ 4 años	$\sigma$
Cogollo	Ápical	haz	<b>8.0</b>	$\pm 0.74$	<b>9.35</b>	$\pm 1.34$	<b>34.23</b>	$\pm 3.95$
		envés	<b>10.37</b>	$\pm 1.23$	<b>12.16</b>	$\pm 4.80$	<b>42.11</b>	$\pm 5.38$
	Media	haz	<b>8.50</b>	$\pm 1.31$	<b>8.11</b>	$\pm 1.29$	<b>37.25</b>	$\pm 3.22$
		envés	<b>10.01</b>	$\pm 1.56$	<b>13.0</b>	$\pm 2.01$	<b>28.92</b>	$\pm 3.29$
	Basal	haz	<b>9.66</b>	$\pm 1.33$	<b>7.90</b>	$\pm 1.35$	<b>32.87</b>	$\pm 3.48$
		envés	<b>12.07</b>	$\pm 1.24$	<b>11.20</b>	$\pm 1.40$	<b>40.65</b>	$\pm 3.21$
Intermedia	Ápical	haz	<b>15.19</b>	$\pm 4.04$	<b>29.77</b>	$\pm 3.07$	<b>30.04</b>	$\pm 3.13$
		envés	<b>24.13</b>	$\pm 6.12$	<b>35.0</b>	$\pm 4.72$	<b>38.82</b>	$\pm 6.32$
	Media	haz	<b>25.51</b>	$\pm 3.64$	<b>27.64</b>	$\pm 3.20$	<b>28.78</b>	$\pm 3.25$
		envés	<b>25.22</b>	$\pm 4.23$	<b>37.51</b>	$\pm 5.62$	<b>41.81</b>	$\pm 3.58$
	Basal	haz	<b>34.15</b>	$\pm 5.51$	<b>28.30</b>	$\pm 5.11$	<b>32.51</b>	$\pm 4.13$
		envés	<b>27.87</b>	$\pm 6.97$	<b>37.51</b>	$\pm 4.80$	<b>41.21</b>	$\pm 5.86$
Periferia	Ápical	haz	<b>22.37</b>	$\pm 4.30$	<b>27.70</b>	$\pm 2.84$	<b>28.41</b>	$\pm 2.65$
		envés	<b>20.26</b>	$\pm 3.55$	<b>39.79</b>	$\pm 7.78$	<b>40.45</b>	$\pm 4.82$
	Media	haz	<b>12.82</b>	$\pm 2.49$	<b>28.01</b>	$\pm 5.36$	<b>34.4</b>	$\pm 4.29$
		envés	<b>18.57</b>	$\pm 5.00$	<b>45.94</b>	$\pm 7.55$	<b>45.31</b>	$\pm 6.18$
	Basal	haz	<b>18.22</b>	$\pm 3.22$	<b>27.33</b>	$\pm 5.56$	<b>44.89</b>	$\pm 6.63$
		envés	<b>17.02</b>	$\pm 5.25$	<b>36.77</b>	$\pm 4.87$	<b>41.26</b>	$\pm 4.15$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Otro elemento importante del estudio consiste en la medida del grosor de la cutícula en relación con la edad de las plantas (tabla 3). En cortes transversales se observó a través del microscopio de fluorescencia que la cutícula de la planta forma una capa uniforme por encima de las células de la epidermis (Fig. 9), que bordea incluso las cavidades supraestomáticas aunque no se aprecia en la figura.



Fig. 9. Muestra la cutícula de *A. tequilana*, capa uniforme que bordea las células de la epidermis.

Al medir el grosor de la cutícula se encontró que las plantas de 1 año obtenidas a partir de CTV, tienen la cutícula más delgada que las plantas de 2 y 4 años, como lo muestra la tabla 2. Estas plantas presentan un menor grosor cuticular en sus hojas del cogollo en la parte apical y a su vez el grosor fue menor en la parte adaxial de las hojas con un promedio de  $8.0 \mu\text{m} \pm 0.74$  comparado con  $10.37 \mu\text{m} \pm 1.23$  por la parte abaxial. Se observa que el grosor aumenta a medida que la planta crece; es decir, las plantas de 4 años son más gruesas de la cutícula que las de 2 años, y a su vez que las de 1 año, y

también aumenta de las hojas centrales hacia las hojas de la periferia, teniendo un mayor grosor en las partes basales de las hojas, por lo que las zonas apical y media de los tres grupos presentan un menor grosor. Algo que se observa también es que en general el grosor de los tres grupos de plantas es menor por el lado adaxial que por el abaxial para cada parte de la hoja. Hasta la fecha no se tienen reportes de estudios de cutícula de *A. tequilana* para estos grupos de edades; sin embargo, se conoce el grosor de la cutícula de otras especies como el de *A. americana* y *A. cochlearis* que presentan valores de 4 y 25  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Villagrán, 1939; Wattendorff y Holloway, 1980; Wattendorff y Holloway, 1984). En los resultados de la estructura se encontró que las hojas del cogollo en su parte apical presentaron un mayor número de estomas por  $\text{mm}^2$  y el menor grosor de la cutícula para los tres grupos de edades, así mismo en la parte apical por la parte adaxial en general presentan mayor número de estomas y menor grosor que por la abaxial. El mayor número de estomas y el menor grosor de la cutícula son factores importantes para la permeabilidad, como lo demuestran Wattendorff y Holloway (1980). Dadas las características de número de estomas y grosor cuticular encontrados anteriormente en las hojas de *A. tequilana*, se decidieron utilizar las hojas del cogollo de las plantas de 1 año por su parte apical del lado adaxial, definiéndola como la mejor zona de estudio para los experimentos de permeabilidad, para tener un mayor control de la densidad estomática y el grosor cuticular.

#### **Método para medir la Permeabilidad.**

Se diseñó un dispositivo para contener la solución marcada que se ponía en contacto con la hoja, utilizando un tubo Eppendorf de 1 ml cortado por la mitad y adherido a esta. Para adherirlo se ensayaron tres materiales, la grasa de silicón, la vaselina simple, y un

polímero adhesivo de silicón de nombre comercial Oranwash®. Con la grasa de silicón (Fig. 10) se obtiene una adhesión razonable, pero poco firme para experimentos largos, además de que se difunde en la hoja. Con la vaselina (Fig. 11) se observó que difunde hacia los lados del sitio donde se coloca, muy probablemente modificando, por su naturaleza hidrofóbica, la permeabilidad de la cutícula y por tal razón se eliminó como posibilidad para adherir los tubos. Por otra parte con el polímero de silicón (Fig. 12), se encontró que no difunde sobre la cutícula, además de que proporciona una buena adhesión, sin fugas, más adecuada para las medidas de larga duración, por lo que se le adoptó como el método para fijar los tubos. Se utilizaron discos de 10 mm de diámetro (cortados de la hoja con un sacabocados del número once) a los que denominamos fragmentos circulares de hoja (FCH), en ellos se pegaron los tubos Eppendorf para colocar las sustancias de estudio (Fig. 13).

Se realizaron pruebas iniciales con agua tritiada, ya utilizando los discos aislados de la hoja, con exposiciones del orden de minutos, y al encontrar que las velocidades de entrada son muy bajas, se cambió el sistema, utilizando tiempos del orden de horas.

En resumen, el método consistió en utilizar la tercera hoja a partir de la primera hoja erecta (Woodhouse y cols., 1980). Se utilizaron plantas de 1 año, listas para el trasplante al campo. Una vez acoplado el tubo se verificó la ausencia de fugas del tubo con el FCH, para lo cual se le agregaron 200 µl de agua destilada por una hora. Una vez verificada la ausencia de fugas se retiró el agua destilada y se colocaron 200 µl de la solución de estudio. Luego de análisis preliminares para definir las velocidades aproximadas del paso de las sustancias estudiadas, se diseñaron los experimentos, utilizando intervalos de exposición de 1 a 8 horas. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución de estudio y se



despegó el FCH del tubo y del silicón. Se secó con papel absorbente la superficie del FCH que estuvo en contacto con la solución, y los discos se colocaron en frascos que contenían 10 ml de líquido de centelleo.



Fig. 10. Difusión de la grasa de silicón en la hoja a las 3 horas de adhesión al tubo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Fig. 11. Difusión de la vaselina en la hoja a las 3 horas de adhesión al tubo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

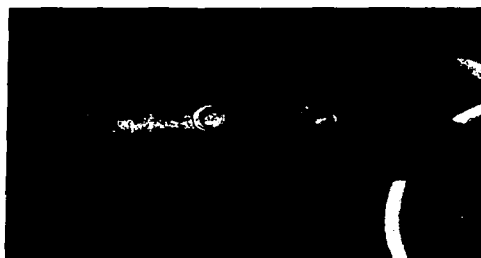


Fig. 12. Pruebas de unión de los tubos Eppendorf en las hojas, por medio de el elastómero de silicón Oranwash ® a las 3 horas de adhesión al tubo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

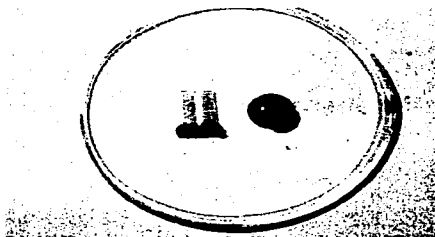


Fig. 13. FCH unido al tubo Eppendorf.

#### Permeabilidad a los iones.

La difusión de sustancias acuosas por la cutícula de las plantas siguen las leyes básicas de la difusión simple o transporte no mediado, a través de membranas lipofílicas. Los modelos de permeabilidad cuticular obtenidos de investigaciones en membranas cuticulares aisladas son válidos también para cutículas de hojas intactas (Kerstiens, 1996; Voet y Voet, 1992).

La permeabilidad en los experimentos fue calculada de acuerdo con las ecuaciones

$$(1) \quad Ni = \left( \frac{Mi}{Mc/Nc} \right)$$

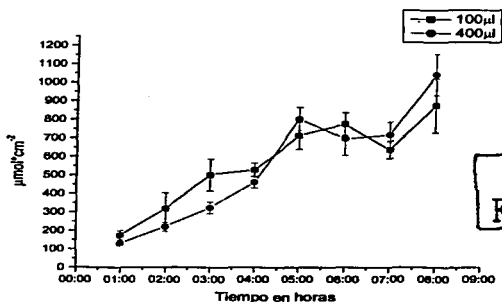
$$(2) \quad P = \frac{Ni}{A}$$

Donde Ni son los moles que se incorporan al FCH y Nc los moles de la marca control (mol), Mi es la marca que se incorpora en el FCH y Mc la marca del control en cuentas por minuto (CPM), P es la permeabilidad ( $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) y por último A es el área del FCH con un valor constante de  $0.66 \text{ cm}^2$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se realizaron pruebas para determinar si la cantidad de marca influiría en la permeabilidad de la cutícula, para lo que se montó el dispositivo tal como se describe en la metodología colocando 100 y 400  $\mu\text{l}$  de agua tritiada en el tubo Eppendorf.

La figura 14 indica que la entrada de  $^3\text{H}_2\text{O}$  no cambió con el volumen que se colocaba en el tubo sobre la cutícula. No obstante que hay alguna dispersión, los resultados muestran la validez del método; en este caso los datos no son diferentes significativamente, ya que no se modificó la radioactividad específica del  $^3\text{H}_2\text{O}$ , sino sólo el volumen.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 14 Incorporación de  $^3\text{H}_2\text{O}$  a través de la cutícula de *A. tequilana*, con dos diferentes volúmenes en el tubo Eppendorf.

Una vez determinado el volumen de marca a utilizar (200 $\mu$ l volumen suficiente para cubrir la superficie del FCH) se corrieron los experimentos con las sales de los iones  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{86}\text{Rb}^+$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , en forma de cloruros y  $^{36}\text{Cl}^-$  como NaCl todos ellos a una concentración de 10 mM y por un periodo de 8 horas con una cuenta total de  $4 \times 10^4$  CPM.

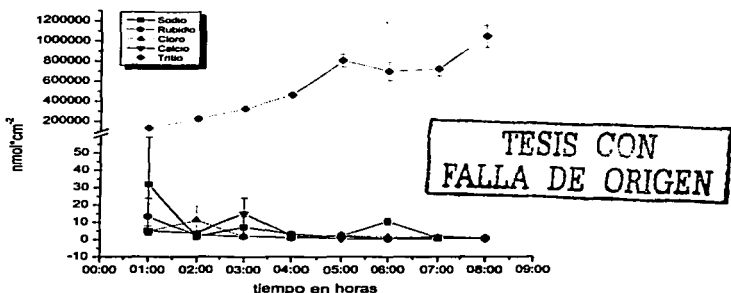


Fig. 15 Permeabilidad de la cutícula de *A. tequilana* a diferentes iones, se utilizaron 10 mM de concentración para todos los casos, con una carga total de  $4 \times 10^4$  CPM

La figura 15 resume los resultados obtenidos sobre la permeabilidad a los distintos iones y al  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Como se puede apreciar, la permeabilidad a los iones es mucho menor en comparación con el  $^3\text{H}_2\text{O}$  que presenta un valor de permeabilidad de  $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{cm}^{-2}$  para un periodo de exposición de 1 h, el agua se incluye en la gráfica como punto de referencia; el valor de la permeabilidad al  $^3\text{H}_2\text{O}$  es muy bajo comparado con la permeabilidad al  $^3\text{H}_2\text{O}$  que presenta la cutícula aislada de la especie *Jungla Regia* el cual es de  $2 \times 10^7 \text{ mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  (Niederl y cols., 1998), aunque por otro lado puede considerarse un valor normal comparado con la permeabilidad al  $^3\text{H}_2\text{O}$  aplicada por

aspersión para varias especies como *Sloanea woollsii* o *Ginkgo biloba*, que reporta un valor de  $0.0138 \text{ mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  y  $56.4 \text{ mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  respectivamente (Kerstiens, 1996). Probablemente la baja permeabilidad de *A. tequilana* es debida a que la cutícula por su naturaleza hidrofóbica forma una capa que evita el contacto con las soluciones hidrofílicas, lo que ocasiona un fenómeno que conocemos como tensión superficial ( $\gamma$ ) y que presentan estas soluciones al estar en contacto con la superficie de la hoja (Fig. 16); en esta imagen se observa que la sustancia es retenida formando una gota sobre la hoja con un ángulo de contacto casi de  $90^\circ$  por lo que esta no se moja y su área de contacto es muy pequeña. Al ser  $\gamma$  una fuerza que se opone al aumento del área, es probable que las fuerzas de adhesión sean menores que las fuerzas de cohesión propiciando que las moléculas de agua queden compactadas en una gota. La  $\gamma$  ocasiona que no haya la suficiente área de contacto entre las soluciones acuosas y la superficie hidrofóbica de la cutícula; recordando que las ceras epicuticulares son la principal barrera a la difusión de agua, gases y solutos que atraviesan la cutícula (Hamilton y cols., 1994), parece actuar como una barrera que impide la entrada de los iones e incluso del agua.



Fig. 16. Gota de agua sobre la superficie de una hoja de 1 año de *A. tequilana*

#### **Permeabilidad con tensoactivos y sus parámetros fisicoquímicos**

Con el propósito de eliminar la  $\gamma$ , se utilizaron agentes tensoactivos que permitieran el aumento del área de contacto, para facilitar la entrada de los iones en solución. Sabemos que estos agentes tienen la capacidad de abatir la  $\gamma$ , obteniendo un ángulo de contacto casi de cero, y en el caso de plantas existe ya en la industria una gran variedad de agentes de uso común de los cuales se escogieron al azar 5 de naturaleza no iónica: Full-Extensor<sup>®</sup>, Agrex F<sup>®</sup>, Inex A<sup>®</sup>, Impacto<sup>®</sup> y Agrex ABC<sup>®</sup> (tabla 4). Cabe mencionar que ninguno de estos agentes se utiliza en plantaciones de agave para ayudar a la penetración de sustancias de interés tales como hormonas de crecimiento (Vademécum Agrícola, 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Tabla 4. Tensioactivos utilizados, composición y dosis reportada por el fabricante.

Tensioactivo	Concentración utilizada	Formulación
Full-Extensor <sup>®</sup>	1 µl/ml	Políéter-polimetilsiloxano.....100% (equivalente a 1,019.21g del IA /litro ) coadyuvante no iónico
Agrex F <sup>®</sup>	3 µl/ml	Mezcla de agente tensioactivos no iónicos ..... 29.9 dioctil sulfa succinato,.....2.3 ingredientes inertes: Diluyentes y acondicionadores.....67.8
Agrex ABC <sup>®</sup>	4 µl/ml	Acidificante (ácido inorgánico).....25 % Ingredientes inertes: Diluyentes y acondicionadores.....75 %
Inex A <sup>®</sup>	4 µl/ml	Éter de polietilenglicol No menos de (Equivalente a 52 g de IA/Litro).....5.2 % Glicol con oxido de etileno No menos de (Equivalente a 206 g de IA/Litro)....20.6 % Dimetil polisiloxano No menos de (Equivalente a 18.5 g de IA/Litro)....1.85 % Ingrediente inertes : Diluyentes no mas de.....72.35 %
Impacto <sup>®</sup>	4 µl/ml	Esteres fosfóricos de alquil aril polietoxietanol y ácido fosfórico (Equivalente a 656 g de IA/Litro) no menos de .....55 % Ingredientes inertes: Componentes infectivos como reguladores del pH y acondicionadores de agua para aspersión no mas de .....45 %

Se utilizaron agentes tensioactivos de naturaleza no iónica porque no tienen carga electromagnética libre y ionizan muy poco en agua; además son químicamente inactivos en presencia de sales comunes. Esta característica permite mezclarlos con diversos compuestos, permaneciendo sin reaccionar químicamente con ellos, es decir inertes, por

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

lo que no se tiene el riesgo de que el agente reaccione con las soluciones en estudio e influya en la permeabilidad (Jiménez y Macarulla, 1989). En *A. tequilana* no hay reportes de uso de tensoactivos, por lo que se midieron algunos parámetros fisicoquímicos que se consideran de importancia y que están relacionados directamente con el efecto que ejercen sobre la sustancia y la superficie, los resultados se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de los distintos agentes tensoactivos utilizados, a la concentración recomendada de uso.

Tensoactivo	Clasificación	pH	$\gamma$ (Dina/cm)	Área de expansión en la hoja (cm)
Full Extensor <sup>®</sup>	No iónico	6.62	23.5	2.4
Inex A <sup>®</sup>	No iónico	6.61	29	1.8
Agrex ABC <sup>®</sup>	No iónico	3.06	30.7	Se forma gota
Agrex F <sup>®</sup>	No iónico	7.98	31.8	Se forma gota
Impacto <sup>®</sup>	No iónico	3.12	33.2	Se forma gota

Se corrieron los mismos experimentos con los iones en solución aplicando cada uno de los agentes tensoactivos mencionados en concentraciones de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La figura 17 muestra los resultados obtenidos en pruebas de permeabilidad para <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>, con cada uno de los tensoactivos, se aprecia que la entrada de la solución de <sup>45</sup>Ca en todos los casos es mayor, pero en particular dos de los agentes favorecieron la incorporación, Full-Extensor<sup>®</sup> e Inex A<sup>®</sup>, alcanzando valores de permeabilidad para <sup>45</sup>Ca de 9.5 nmol·cm<sup>-2</sup> y 6.3 nmol·cm<sup>-2</sup> respectivamente. El efecto se explica una vez que se obtuvieron los valores de  $\gamma$  de las soluciones con cada uno de los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

tensoactivos utilizados, Full-Extensor e Inex A muestran los valores mas bajos de  $\gamma$ , resultados que concuerdan con la cantidad de  $^{45}\text{Ca}$  que se incorporo en el FCH.

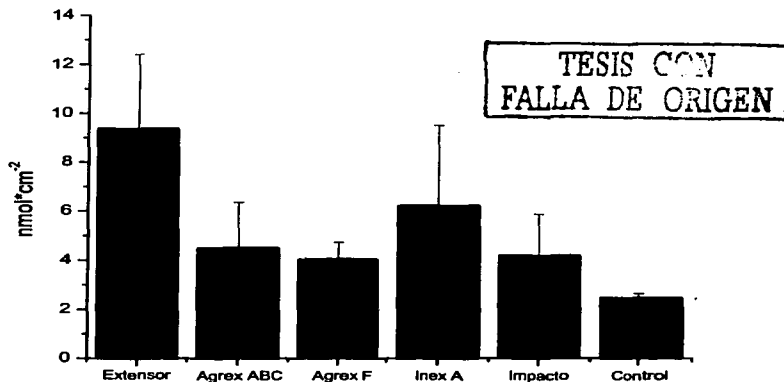


Fig. 17. Permeabilidad de la cutícula de *A. tequilana* en presencia de 5 tensoactivos comerciales con  $^{45}\text{CaCl}_2$ , a un tiempo de exposición de 5 horas.

Los dos tensoactivos mencionados están clasificados como surfactantes de silicón, reportados en la literatura como los únicos capaces de disminuir la  $\gamma$  de soluciones acuosas a valores aproximados a 20 Dinasc/cm teniendo como referencia el valor de la  $\gamma_{H_2O}$  de 72.8 Dinasc/cm (Schick y Hubbard, 1999). Al medir el efecto de la concentración de estos surfactantes sobre la  $\gamma$  del agua, en la figura 18 se observa que el Full-Extensor<sup>®</sup> es capaz de disminuir la  $\gamma$  hasta 23 Dinasc/cm e Inex A<sup>®</sup> a un valor de 29.1 Dinasc/cm a una concentración de 1  $\mu$ l/ml.

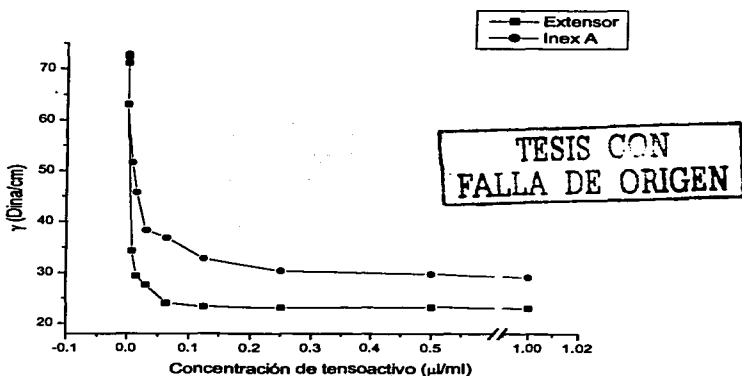


Fig. 18. Muestra el efecto de dos surfactantes de silicón no iónicos Full-Extensor<sup>®</sup> e Inex A<sup>®</sup> sobre la  $\gamma$  a diferentes concentraciones.

Como los resultados de la prueba anterior mostraron que Full-Extensor<sup>®</sup> e Inex A<sup>®</sup> son los agentes que permiten una mayor entrada de <sup>45</sup>Ca, se decidió realizar pruebas con estos dos tensoactivos para todos los iones marcados en solución (Fig. 19-21).

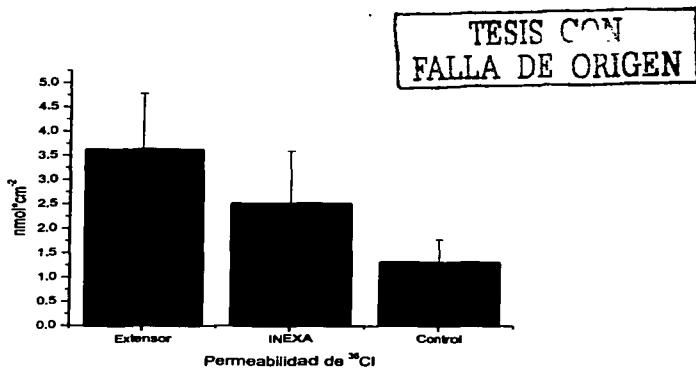


Fig. 19. Permeabilidad al <sup>36</sup>Cl utilizando Inex A<sup>®</sup> y Full-Extensor<sup>®</sup> según la concentración recomendada, con un periodo de exposición de 5 horas.

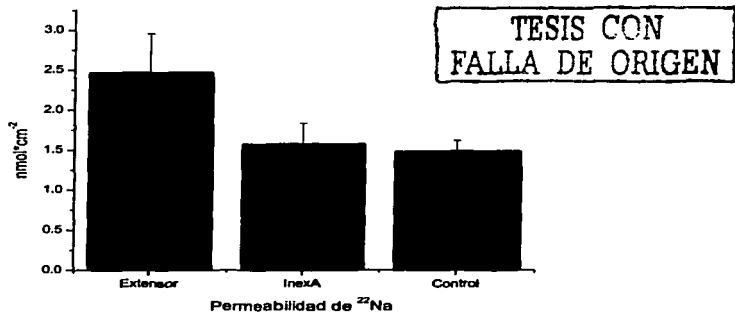


Fig. 20. Permeabilidad al <sup>22</sup>Na utilizando Inex A<sup>®</sup> y Full-Extensor<sup>®</sup> según la concentración recomendada, con un periodo de exposición de 5 horas.

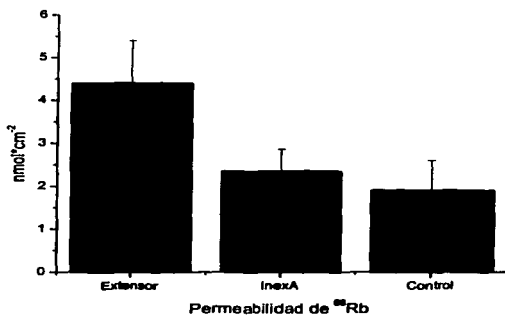


Fig. 21. Permeabilidad al <sup>86</sup>Rb utilizando Inex A<sup>®</sup> y Full-Extensor<sup>®</sup> según la concentración recomendada, con un periodo de exposición de 5 horas.

En estas pruebas se encontró la misma tendencia de entrada para los demás iones en estudio ( $^{22}\text{Na}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{86}\text{Rb}$ ) que para el  $^{45}\text{Ca}$  (tabla 6).

Tabla 6. Permeabilidad a los distintos iones en solución que presento la cutícula de *A. tequilana* Weber.

Ión en solución	Permeabilidad (nmol·cm <sup>-2</sup> )·5h	Permeabilidad c/ Extensor (nmol·cm <sup>-2</sup> )·5h	Permeabilidad c/ Inex A (nmol·cm <sup>-2</sup> )·5h
$^{45}\text{Ca}$	2.3	9.5	6.3
$^{36}\text{Cl}$	1.2	3.6	2.5
$^{22}\text{Na}$	1.4	2.4	1.9
$^{86}\text{Rb}$	2.0	4.5	2.5

Para el  $^{36}\text{Cl}$  de 1.2 nmol·cm<sup>-2</sup> que presentaba aumento a 2.5 nmol·cm<sup>-2</sup> con Inex A<sup>®</sup> y 3.6 nmol·cm<sup>-2</sup> con Full-Extensor<sup>®</sup>; para el  $^{86}\text{Rb}$ , el aumento fue de 2 nmol·cm<sup>-2</sup> que tenía el control, a 2.5 nmol·cm<sup>-2</sup> con Inex A<sup>®</sup> y a 4.5 nmol·cm<sup>-2</sup> con Full-Extensor<sup>®</sup>, para el  $^{22}\text{Na}$  de 1.6 nmol·cm<sup>-2</sup> se aumentó a 1.9 nmol·cm<sup>-2</sup> con Inex A<sup>®</sup> y a 2.4 nmol·cm<sup>-2</sup> con Full Extensor<sup>®</sup>, como se observa para el caso del  $^{36}\text{Cl}$ , el incremento con ambos tensoactivos es apreciable, sin embargo para el  $^{86}\text{Rb}$  y el  $^{22}\text{Na}$  el incremento con Inex A<sup>®</sup> no es tan apreciable como cuando se les agrega Full-Extensor<sup>®</sup>; esto puede deberse a que el Full-Extensor<sup>®</sup>, como se muestra en la tabla 4 es 100% un poliéter de polimetil siloxano, y el Inex A<sup>®</sup> sólo tiene en su composición 1.85% de dimetil polisiloxano. Los surfactantes de siloxanos consisten de un grupo siloxano metilado acoplado a uno o más grupos polares en el cual el grupo hidrofóbico es el silicio; estos pueden disminuir la tensión superficial a valores menores que los surfactantes hidrocarbonados debido a los grupos metilados que tienen en su estructura, pues estos grupos quedan atrapados en una red flexible causada por los enlaces -O-Si-O-Si-, generando una mayor actividad sobre la superficie por el acomodo de las moléculas con respecto a los surfactantes

hidrocarbonados. En la Fig. 22 se muestra el acomodo de los surfactantes hidrocarbonados y los surfactantes de siloxano; estos últimos tienen en su estructura metilos saturados que presentan una energía sobre la superficie de alrededor 20 Dinas/cm; este es el valor mas bajo de energía que se puede alcanzar usando surfactantes de siloxano (recordemos que con Full-Extensor<sup>®</sup> se alcanza un valor  $\gamma$  de 23.5 Dinas/cm y con Inex A<sup>®</sup>, de 29 Dinas/cm, lo cual es congruente con lo reportado en la literatura) los surfactantes hidrocarbonados constan de grupos hidrofóbicos alquilo o alquilarilo que contienen muchos grupos CH<sub>2</sub> en su estructura, los cuales se acomodan de forma apilada en la interfase aire-líquido, provocando una energía superficial de alrededor de 30 Dinas/cm o más; es por éso que al tener la flexibilidad inusual del enlace siloxano y al comparar las diferentes energías del grupo -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>, obtenemos los valores mas bajos de tensión superficial con los surfactantes de siloxano (Schick y Hubbard, 1999), permitiendo por esta razón la disminución a cero del ángulo de contacto.

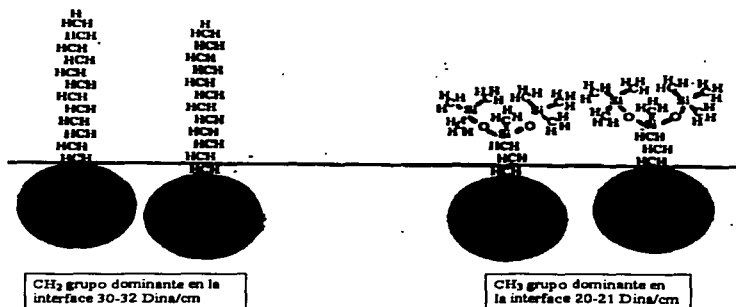


Fig. 22. Comparación de la superficie característica de un surfactante hidrocarbonado contra un surfactante de siloxano. (Holloway y cols., 1994).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



Los valores de  $\gamma$  son tan bajos que la solución difunde sobre la superficie de la hoja, disminuyendo el ángulo de contacto a cero hasta mojar completamente la superficie (Fig. 23).

Pese a que las hojas de *A. tequilana* siguen mostrando baja permeabilidad; probablemente la  $\gamma$  ya no es la responsable de esto, ya que el área ha aumentado gracias al efecto de los surfactantes de silicón empleados.



Fig. 23. En la fotografía se muestra la mancha que deja Full-Extensor<sup>®</sup> sobre la hoja después de 0.5min de aplicarse

TESIS CON  
FALLA DE CUBIERTA

Sabemos que la naturaleza hidrofóbica de la cutícula no cambió con el uso de los tensoactivos, los iones están hidratados por moléculas de agua que les impiden el contacto directo con la superficie, por lo que su entrada depende directamente de la baja interacción de la solución acuosa que ha presentado hasta el momento la cutícula (Jiménez y Macarulla, 1989).

#### **Difusión de los iones hasta el mesófilo.**

En las pruebas anteriores se cuantificó la cantidad de marca que hay en la rodaja completa, pero no sabíamos si la marca atravesaba la cutícula o sólo se quedaba adherida en la superficie, por lo que se realizaron experimentos bajo las mismas condiciones utilizando Full Extensor® e Inex A®. Se hizo una serie de cortes al FCH para quitar la epidermis junto con la cutícula y separar el mesófilo (como se muestra en la Fig. 24), con la finalidad de comprobar si las soluciones penetraban en la hoja.

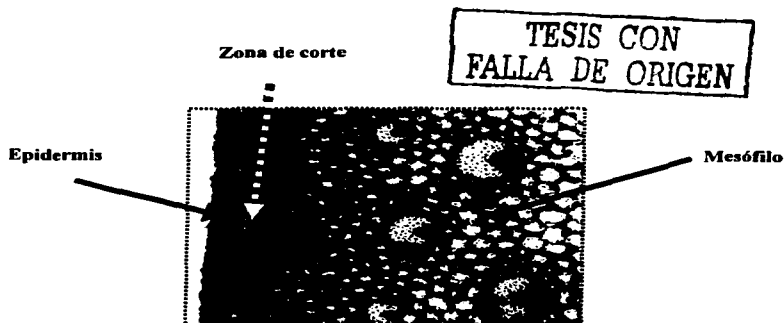


Fig. 24. Zona de corte hecha en el FCH, para comprobar la entrada de la marca al interior del fragmento.

Las figuras 25 y 26 muestran el porcentaje de incorporación de la marca radioactiva en los FCH de *A. tequilana* en un periodo de 5 horas de exposición de la solución en el tubo Eppendorf.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

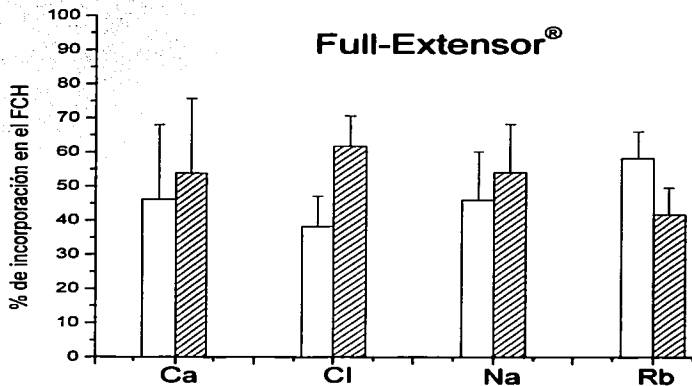


Fig. 25. Incorporación y distribución de los iones en los FCH de *A. tequilana* en presencia de Full Extensor®, las barras sombreadas representan al mesófilo y las blancas la cutícula.

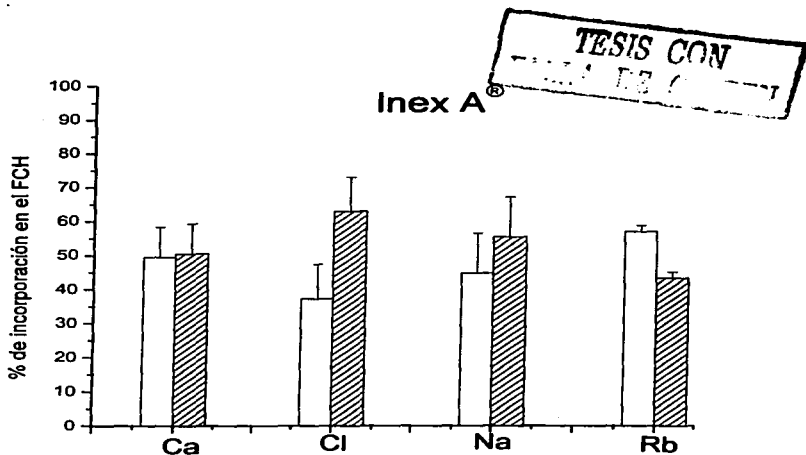


Fig. 26. Incorporación y distribución de los iones en los FCH de *A. tequilana* en presencia de Inex A<sup>®</sup>, las barras sombreadas representan al mesófilo y las blancas la cutícula.

Con los experimentos realizados con los cuatro distintos iones, se comprobó que la marca no sólo se queda impregnada en la superficie de la cutícula como podría pensarse en un principio; en todos los casos atraviesa la zona de la epidermis y llega al mesófilo en distintas proporciones a las 5 horas de aplicada, tanto con Full-Extensor<sup>®</sup> como con Inex A<sup>®</sup>, esto para todos los iones. Llega a incorporarse en el mesófilo hasta un 60% de marca, como es el caso del <sup>36</sup>Cl, aunque en otros, como en el <sup>86</sup>Rb se alcanza a notar una incorporación menor en el mesófilo que en la cutícula, ocasionando que en 5 horas de exposición sólo se llegue a incorporar en el mesófilo alrededor de un 45%. La razón de las diferencias en la cantidad de incorporación hasta el mesófilo puede deberse a tres

NO SE PUEDE...  
 [illegible text]

causas distintas, primero las concentraciones de los iones en el interior de la planta afecta a la velocidad de penetración de estos hacia el interior de la cutícula, segundo las vías de difusión y la función que van a cumplir en la célula una vez que logran atravesar la cutícula y tercero la diferencia de potencial eléctrico en los dos lados de la cutícula. Por ejemplo, en el caso del calcio la entrada fue mayor que para los demás iones, de  $9.5 \text{ nmoles}\cdot\text{cm}^{-2}$  con Full-Extensor<sup>®</sup> y de este valor se incorpora alrededor de un 55% al mesófilo y el restante se queda adherido a la cutícula. En estudios que se han realizado con  $\text{Ca}^{2+}$  en plantas, se ha observado que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en las células guarda influye en la regulación de las señales de control de la apertura estomática (Kuchitsu y cols., 1997), razón por la cual la permeabilidad con  $^{45}\text{Ca}$  sea mayor que con los demás iones estudiados. El  $^{36}\text{Cl}$  presentó un porcentaje mayor de incorporación en el mesófilo que todos los demás iones ya que llegó a incorporarse hasta un 60% tanto con Full-Extensor<sup>®</sup> como con Inex A<sup>®</sup>. Para el  $^{22}\text{Na}$  el 50% de la marca se fue al mesófilo y para el caso del  $^{86}\text{Rb}$  solo el 40%, la desigual distribución de los iones, se atribuye a la diferencia de potencial eléctrico que se registra entre los dos lados de la cutícula, generado por estos mismos, además de las diferencias en la rapidez con que se desplazan a través de ésta (Jiménez y Macarulla, 1989), que a su vez depende como se había mencionado, de la envoltura acuosa; es decir, la hidratación y el diámetro de la envoltura acuosa es proporcional a la densidad de carga en la superficie del ión, por lo que el diámetro del  $\text{Na}^+$  es más pequeño y su densidad de carga en la superficie es mayor. La diferencia de radio de los iones, por ejemplo  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$  hidratados, tiene dos consecuencias importantes, la velocidad de difusión de las partículas en solución se reduce por el aumento de masa; es por eso que a las cinco horas la velocidad de difusión del  $\text{Na}^+$  o el  $\text{Rb}^+$  resulta menor que la velocidad de difusión del  $\text{Cl}^-$  o el  $\text{Ca}^{2+}$ . En el caso

particular de  $\text{Na}^+$  por las interacciones de las moléculas de agua con los poros de la membrana y las de las capas de hidratación, el  $\text{Cl}^-$  penetra a través de los poros más fácilmente que el  $\text{Na}^+$  (Jiménez y Macarulla, 1989).

Una vez que se encontró que los iones libran la barrera cuticular, cabe la posibilidad de que sean aprovechados en las hojas para el desarrollo de la planta, pueden ser incorporados directamente al metabolismo para desarrollar cada uno la función que le corresponde, siempre y cuando las cantidades que se incorporan sean las suficientes para llevar a cabo dicha función.

Con el presente estudio hemos logrado diseñar un método para estudiar la permeabilidad de la cutícula de *A. tequilana* a distintos iones; encontramos que la cutícula tiene baja permeabilidad al agua y es prácticamente nula para los iones marcados en solución, por lo que se hizo uso de surfactantes que permitieron disminuir la tensión superficial a tal grado que la permeabilidad mejoro notablemente, aunque la cantidad dentro de los FCH fue muy baja, constatamos mediante algunos cortes que la marca atravesó la barrera cuticular y se depositó hasta el mesófilo de los FCH. Estos resultados indican que las hojas del agave tequilero incorporan pequeñas cantidades de micronutrientes, que pueden ser utilizados en el metabolismo de la planta, ayudando de esta manera al desarrollo y sustento de la misma, surgiendo esto como una alternativa para el mejoramiento en los cultivos de *A. tequilana*; este estudio contribuye a investigaciones enfocadas al desarrollo de la industria del tequila.

## **CONCLUSIONES.**

- **La abundancia de los estomas es menor en las plantas de 1 año, y mayor en las plantas de dos años de edad, con una disminución ligera en las de cuatro años. El grosor de la cutícula aumenta con la edad de la planta.**
- **Las hojas del cogollo y las de la parte intermedia de las plantas de dos años de edad parecieran ser las más adecuadas para los estudios de la permeabilidad, pues cuentan con un mayor número de estomas, aunque un mayor grosor de la cutícula. Sin embargo, se considera que las plantas de un año son las más convenientes para realizar las pruebas de permeabilidad, dado que el interés de este estudio se enfoca en la aplicación de sustancias en plantas jóvenes, para la prevención de enfermedades y favorecer el crecimiento.**
- **La cutícula del agave muestra una permeabilidad baja al agua.**
- **La permeabilidad a los iones es prácticamente nula.**
- **Algunos agentes tensoactivos no iónicos comerciales favorecen la entrada de los iones, en especial el Full-Extensor® (poliéter de polimetilsiloxano).**
- **A menor valor de  $\gamma$ , hubo mayor incorporación de los iones de calcio, cloro, sodio y rubidio**

- **Los iones logran atravesar la barrera cuticular y difundirse hacia el mesófilo en los FCH cuando se les agrega un agente tensoactivo.**



## BIBLIOGRAFIA.

1. Arzate-Fernandez, A. 2001. Fisiología Vegetal Apuntes. Universidad Autónoma del Estado de Mexico, 1ª edic., México, pp18.
2. Buchanan, B.B. 2000. Biochemistry and molecular biology of Plants. American Society of Plants Physiologists , 1a edic., USA Maryland., pp 507-509.
3. Bukovac, M. 1997. The Plant Surface: A Defining Factor In Performance Of Plant Bioregulators. Acta Hort. 463, ISHS.
4. Bukovac M., Petracek P. 1993. Characterizing pesticide and surfactant penetration whit isolated plant cuticles. Pesticide Science.,37:179-194.
5. Bukovac, M., Whitmoyer, R., Reichard, D. 1983. Nature and effects of surfactants deposits on leaf surfaces. Abstr. Hort. Sci., 18:618-619
6. Casado, C. G., Heredia, A. 2001. Specific heat determination of plant barrier hydrophilic components: biological implications. Biochimica et Biophysica Acta 1511, 291-296.
7. Fernández, S., Osorio, S., Heredia, A. 1999. Monitoring and visualising plant cuticles by confocal laser scanning microscopy. Plant Physiol. Biochem. 37, 789-794.
8. Flores-Vindas, E. 1999. La planta, estructura y función. Libro Universitario Regional, 1ª edic., Vol. I, Costa Rica, Cap VI.
9. Gentry, H. Sauck, J. 1978. The stomatal complex in Agave: Group Deserticolae, Campaniflorae, Umbelliflorae. Proceedings of the California Academy of Sciences Vol XLI, 371-387.
10. Granados, D. 1993. Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, 1ª edic., Texcoco México, pp 39-43.
11. Hernández, R., López R., Ruiz, J., Benavides A. 2002. Ultraestructura Estomática en *Agave tequilana* Weber (Amaryllidaceae). XXXII Congreso de Investigación y Extensión. ITESM.
12. Holloway, P., Rees, S., Stock, D. 1994. Interactions between adjuvants agrochemicals and target organisms. Ernst Schering Research Foundation Workshop 12, Springer Verlag Berlin.
13. Jiménez, J., Macarulla, J. 1989. Físicoquímica Fisiológica. Mc Graw-Hill 6ª edic., Madrid, España, Cap 10.
14. Kerstiens, G. 1996. Plant cuticles an integrated functional approach. BIOS Scientific Publishers Environmental Plant Biology series. Oxford UK, Cap 4-6.

15. Kerstiens, G. 2001. Plant Cuticle. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, www.els.net.
16. Kerstiens, G. 1996. Cuticular Water permeability and its physiological significance Journal of experimental botany, vol. 47, No. 305, pp. 1813-1832.
17. Kolattukudy, P. 2001. Plant Cuticle and Suberin. Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group ,www.els.net.
18. Niederl, S., Kirsch, T., Riederer, M., Schreiber, L. 1998. Co-permeability of <sup>3</sup>H-labeled water and <sup>14</sup>C-labeled organic acids across isolated plant cuticles. Plant physiol .116: 117-123.
19. Nobel, P. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Trillas, 1ª edic., Mexico D.F., pp 95-110.
20. Ruíz, C., Pimienta, B., Zañudo, H. 2002. Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de *Agave tequilana* en el estado de Jalisco. Agrociencia 36:41-53.
21. Sargent, J. 1965. The penetration of Grow regulators into leaves. Annul Rev. Plant Physiol. 16:1-12.
22. Schick, M., Hubbard, A. 1999. Silicon Surfactants. Randan M. Hill, USA, Cap.1, Cap. 9.
23. Schönherr, J. 2000. Calcium chloride penetrates plant cuticles via aqueous pores. Planta 212:112-118.
24. Vademécum Agrícola IPE, 2002. Agroquímicos y semillas. Rezza Editores, 3ª edic., León Guanajuato, México.
25. Valenzuela, Z. 1994. El agave tequilero: su cultivo e industrialización. Monsanto. Agata México, Zapopan Jalisco.
26. Villagrán, P. 1939. Contribución al conocimiento de la Histología y citología del Maguey (agave), Anales del Instituto de Biología 10, 1-18.
27. Voet, D., Voet, J. 1992. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp 521.
28. Wattendorff, J., Holloway P. 1980. Studies on the Ultrastructure and Histochemistry of Plant Cuticles: The Cuticular membrane of *Agave americana* L. in situ. Ann. Bot. 46, 13-28.
29. Wattendorff, J., Holloway, P. 1982. Studies on the Ultrastructure and Histochemistry of Plant Cuticles: Isolated cuticular Membrane preparations of *Agave americana* L. and the effects of various extraction procedures. Ann. Bot. 49, 769-804,

30. Woodhouse, R., Williams, J., Nobel, P. 1980. Leaf Orientation, radiation interception and nocturnal acidity increases by the CAM plant *Agave deserti* (Agavaceae). *Amer J. Bot.* 67, 1179-1185.

31. Young, C.1951. *Agentes tensoactivos: Aspectos teóricos y aplicaciones industriales.* Aguilar., 1ª edic., Madrid España. Cap. 1.

#### Sitios consultados

1. Academia Mexicana del Tequila <http://www.acamextequila.com/amt3/index1024.html> (12-Marzo-2003).
2. Australian New Crops. Listing of Useful Plants of the World <http://www.newcrops.uq.edu.au/listing/agavetequilana.htm> (1-Agosto-2003)
3. Bancomext, <http://www.bancomext.com/Banc/publicaciones/secciones/2626/AnexoEstadenero2003.pdf> (3-Agosto, 2003).
4. Consejo Regulador del Tequila CRT <http://www.crt.org.mx/> (28-Feb-2003).
5. Kuchitsu, K., Ward, J., Ellisman, M., Shelle, I., Schroeder, J. 1997. Loading of Acetoxymethyl (AM) Ester Fluorescent dyes into the Cytoplasm Of Guard Cells of *Arabidopsis* and *Commelina* and Calcium Imaging Using Calcium Green-1. <http://www-biology.ucsd.edu/labs/schroeder/protocols/calcium.html> (2-Nov-2002).
6. NOM-006-SCFI-1994 Bebidas alcohólicas - Tequila - Especificaciones. (Contiene dos modificaciones) <http://www.economia.gob.mx>, (2003).
7. Reina, J., Borraz, Y., Ceras epicuticulares en el reino vegetal: química ultraestructura y aspectos evolutivos. <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS43/ceras.html> (26-julio-2003).
8. Unda T., Tensoactivos, Fenómenos de superficie y equilibrios de interfase <http://depa.pquim.unam.mx/~tunda/humectación.html> (13-mayo-2003).