

## Physical properties and microscopic structure of the *Agave salmiana* cuticle (mixiote)

### Propiedades físicas y estructura microscópica de la cutícula de *Agave salmiana* (mixiote)

Lorena Vargas-Rodríguez<sup>1\*</sup>; María I. García-Vieyra<sup>1</sup>; Brandon I. León-Bata<sup>2</sup>; Paulina Lozano-Sotomayor<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato. Departamento de Ingeniería Agroindustrial y CA de Ciencia y Tecnología Agroindustrial. Campus Celaya-Salvatierra. Priv. de Arteaga s/n, Centro Salvatierra, Gto. C. P. 38900.

<sup>2</sup>Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Salud e Ingenierías. Campus Celaya-Salvatierra. Priv. de Arteaga s/n, Centro Salvatierra, Gto. C. P. 38900.

<sup>3</sup>Universidad de Guanajuato. División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Química. Campus Guanajuato. Cerro de la venada s/n Pueblito de Rocha, Guanajuato Gto. C. P. 36250.

\*Corresponding author: vargaslorena2016@outlook.com; lvargas@ugto.mx tel. (466) 6633413. Ext. 8610.

#### Abstract

The objectives of this study were to describe the structure of the mixiote leaves or agave cuticles, as well as their water permeability and sterilization resistance. For this, fresh cuticles from *Agave salmiana* leaves (thickness = 0.114 mm, density = 7.2 mg·cm<sup>-3</sup>) were analyzed by means of Scanning Electron Microscopy. The images revealed tetracytic-type stomata averaging 30-52 μm in length and 64 stomata mm<sup>-2</sup> in density. The water permeability of the cuticle shows a linear behavior. Water diffusion through the cuticle is greater from the outer side than from the inner one. It was observed that the *A. salmiana* cuticle is a material that withstands moist heat when sterilized under pressure conditions (121 °C and 15 lb in<sup>-2</sup> for 15 min). Results suggest that the *A. salmiana* cuticle has wide-ranging potential for industrial use.

**Keywords:** Cuticle, permeability, stomatal density.

#### Resumen

Los objetivos del trabajo fueron describir la estructura de las hojas mixioteeras o cutículas de agave, así como su permeabilidad al agua y resistencia a la esterilización. Para ello, cutículas de hojas de *Agave salmiana* (grosor = 0.114 mm; densidad = 7.2 mg·cm<sup>-3</sup>) se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido. Las imágenes revelaron una densidad promedio de 64 estomas·mm<sup>-2</sup>. Los estomas son de tipo tetracítico con longitudes de 30 a 52 μm. La permeabilidad de la cutícula al agua mostró comportamiento lineal. La difusión de agua a través de la cutícula es mayor desde el lado externo que desde el lado interno. La cutícula de *A. salmiana* es un material que resiste calor húmedo al esterilizarse en condiciones de presión (121 °C y 15 lb in<sup>-2</sup> durante 15 min). Los resultados sugieren que la cutícula de *A. salmiana* tiene perspectivas amplias para uso industrial.

**Palabras clave:** Cutícula, permeabilidad, densidad estomatal.



## Introduction

Agave cuticles (“mixiotes”) are detached from maguey leaves and marketed by members of indigenous groups in the states of Mexico, Hidalgo and Querétaro. Traditionally, these cuticles are used in the preparation of a typical pre-Hispanic dish called ‘mixiote.’ The cuticles are also used to wrap freshly-cooked, hand-made corn tortillas in order to preserve them longer by reducing the perspiration (‘sweat’) of the product, as occurs with polyethylene bags. These uses can be supported in the structure and permeability of the maguey cuticle to water.

The cuticle of agave leaves is the superficial membrane of the epidermis. The cuticle, in general, is an important structure in the plant-environment interface (Kunst, Jetter, & Samuels, 2008). The cuticle protects the plant from environmental biotic and abiotic stressors (Suh et al., 2005).

The anatomy of plant cuticles consists of a cutin-based lipid matrix. Cutin is found in a proportion varying between 40 and 80 % of the cuticle’s total weight and is a polymer made up of fatty acids linked by ester-like bonds (Suh et al., 2005). In this polymer, fatty acids esterified in long chains with 16-18 carbon atoms have been identified (Heredia, 2003; Suh et al., 2005; Bessire et al., 2007); in addition, a waxy component has been identified at intra- and epicuticular levels (Taiz & Zeiger, 2006). Derived from this chemical nature, the cuticle as a waxy outer layer can reduce plant water loss (Taiz & Zeiger, 2006); however, water loss depends on the abundance of pores or ostioles (depending on the plant species and organ in the plant). Ostioles are elements of a larger structure called a stoma (stomatal complex), whose functions consist of regulating gas exchange and transpiration. However, the available technical-scientific information on the anatomy, water permeability and use of mixiote leaves or agave cuticles is scarce.

Based on the above, the aim of this work was to generate knowledge about the structure, water permeability and sterilization resistance of the agave cuticle (mixiote) that could serve as preliminary evidence for its potential future use in industry.

## Materials and methods

### Raw material

Agave cuticles (mixiotes) of *Agave salmiana* on the sun-exposed side were manually collected. The selection consisted of young, healthy, 3-year-old leaves, arranged on the plant in row 4 of the rosette (number 8 being the heart). The leaves used in the study were obtained from *Agave salmiana* located in the gardens of the University

## Introducción

Las cutículas de agave (“mixiotes”) son desprendidas de las hojas de maguey y comercializadas por integrantes de grupos indígenas en los estados de México, Hidalgo y Querétaro. Tradicionalmente, esas cutículas se usan en la preparación del platillo típico prehispánico llamado ‘mixiote’. Las cutículas se usan también para envolver tortillas de maíz hechas a mano y recién cocidas, con el propósito de conservarlas durante más tiempo reduciendo la transpiración (‘sudado’) del producto, como ocurre con las bolsas de polietileno. Esos usos pueden estar soportados en la estructura y la permeabilidad de la cutícula de maguey al agua.

La cutícula de hojas de agave es la membrana superficial de la epidermis. La cutícula, en general, es una estructura importante en la interfase planta-ambiente (Kunst, Jetter, & Samuels, 2008). La cutícula protege a la planta de agobios bióticos y abióticos ambientales (Suh et al., 2005).

La anatomía de las cutículas vegetales consiste de una matriz lipídica con base en cutina. Esta última, se encuentra en una proporción que varía entre 40 y 80 % del peso total de la cutícula y es un polímero constituido por ácidos grasos unidos mediante enlaces tipo éster (Suh et al., 2005). En este polímero, han sido identificados ácidos grasos esterificados en cadenas largas con 16-18 átomos de carbono (Heredia, 2003; Suh et al., 2005; Bessire et al., 2007); además, un componente céreo ha sido identificado a niveles intra y epicuticular (Taiz & Zeiger, 2006). Derivado de esa naturaleza química, la cutícula como capa externa cerosa puede reducir la pérdida de agua de la planta (Taiz & Zeiger, 2006); no obstante, la pérdida de agua depende de la abundancia de poros u ostiolas (según la especie vegetal y órgano en la planta). Los ostiolas son elementos de una estructura mayor denominada estoma (complejo estomático), cuyas funciones consisten en la regulación del intercambio gaseoso y transpiración. Sin embargo, la información técnico-científica disponible sobre la anatomía, permeabilidad al agua y uso de las hojas mixiotes o cutículas de agave es escasa.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue generar conocimiento sobre la estructura, permeabilidad al agua y resistencia a la esterilización de la cutícula de agave (mixiote) que pueda ser evidencia preliminar para su uso potencial en la industria en el futuro.

## Materiales y métodos

### Materia prima

Fueron colectadas de forma manual cutículas de agave (mixiotes) de *Agave salmiana* del lado expuesto a los rayos solares. La selección consistió de hojas jóvenes y sanas

of Guanajuato in the city of Salvatierra, Gto., Mexico, whose coordinates are latitude: 20.212139; longitude: -100.877308.

The agave leaves selected to detach the cuticle were washed with distilled water using a squirt bottle; they were then dried with cotton. The material was immersed in distilled water inside a plastic container for transport and kept refrigerated for conservation.

### Stomatal structure by Scanning Electron Microscopy

In order to visually appreciate the stomata, segments of *A. salmiana* cuticles detached from both sides (outer and inner) of the agave leaves (after cleaning) and others refrigerated in water for one year were examined using a Carl Zeiss-brand 'Field Emission' Scanning Electron Microscope (SIGMA-HDVP model). The samples were gold coated for 2 minutes using JEOL-brand FINE-COAT ION SPUTTER JFC-1100 equipment. The samples were processed under 'high vacuum' (HV) conditions using an AsB (Angle selective backscattered) detector. This work involved a voltage of 5.00 kV.

### Water permeability of the *Agave salmiana* cuticle

Tests of cuticle permeability to deionized water allowed estimating the volume per unit time ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ) at 22 °C that flowed from one side to the other, considering the direction from both sides (inner and outer). The tests were made with fresh cuticles recently detached from agave leaves (FC) and after being stored (SC) for one year in distilled water at refrigeration temperature. For this, a tube with an internal diameter of 1 cm and a 4-ml column was used (that is, the cuticle at one end of the tube as a cap and attached with insulating tape). Special care was taken not to confuse the side that was in direct contact with the water. A maximum volume of 10 ml of water diffused through the cuticles was considered in each test. The tests were performed in triplicate. Subsequently, the average water volume values per unit time (1, 2, 3, 4 and 5 min) were estimated.

### Sterilization

In order to identify sterilization effects, 10  $\text{cm}^2$  *A. salmiana* cuticle cuts were placed in distilled water inside a 125-ml Erlenmeyer flask with a cotton plug. Cuticle cuts were then placed in a pot at 15  $\text{lb}\cdot\text{in}^{-2}$  steam pressure and 121 °C for 15 minutes. Trials were conducted in triplicate.

## Results and discussion

### Stomatal structure by Scanning Electron Microscopy

The recently-detached *A. salmiana* agave cuticles (mixiotes) had a thickness of 0.114 mm and a density of

con edad de 3 años, dispuestas en la planta en la fila 4 de la roseta (siendo el número 8 el cogollo o corazón). Las hojas empleadas en el estudio se obtuvieron de *Agave salmiana* ubicadas en los jardines de la Universidad de Guanajuato, sede Salvatierra, cuyas coordenadas son latitud: 20.212139; longitud: -100.877308.

Las hojas de agave seleccionadas para desprender la cutícula se lavaron con agua destilada usando una piceta; luego fueron secadas con algodón. El material se sumergió en agua destilada dentro de un recipiente plástico para su traslado y se mantuvo en refrigeración para su conservación.

### Estructura estomática mediante Microscopia Electrónica de Barrido

Con el propósito de apreciar visualmente los estomas, segmentos de cutículas de *A. salmiana* desprendida de ambas caras (externa e interna) de las hojas de agave (después de la limpieza) y otros refrigerados en agua durante un año fueron examinados mediante un Microscopio Electrónico de Barrido, modelo SIGMA-HDVP, 'Field Emission' de la marca Carl Zeiss. Las muestras se recubrieron con oro durante 2 minutos mediante el equipo FINE-COAT ION SPUTTER JFC-1100 de la marca JEOL. Las muestras se procesaron en condiciones de 'gran vacío' (HV) usando el detector de electrones retrodispersos AsB (Angle selective backscattered). Este trabajo involucró voltaje de 5.00 kV.

### Permeabilidad de la cutícula de *Agave salmiana* al agua

Pruebas de permeabilidad de la cutícula al agua desionizada permitieron estimar el volumen por unidad de tiempo ( $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a 22 °C que fluyó de un lado a otro, al considerar la dirección desde ambas caras (interna y externa). Las pruebas se hicieron con cutículas frescas recién desprendidas de hojas de agave (CF) y después de estar almacenada (CA) durante un año en agua destilada a temperatura de refrigeración. Para ello, fue usado un tubo con diámetro interno de 1 cm y 4 ml de columna. Es decir, la cutícula en un extremo del tubo a modo de tapa y unida con cinta de aislar. Se tuvo cuidado especial para no confundir el lado que estuvo en contacto directo con el agua. Fue considerado en cada ensayo un volumen máximo de 10 ml de agua difundida a través de las cutículas. Los ensayos se practicaron por triplicado. Posteriormente, los valores promedio de volumen de agua por unidad de tiempo (1, 2, 3, 4 y 5 min) fueron estimados.

### Esterilización

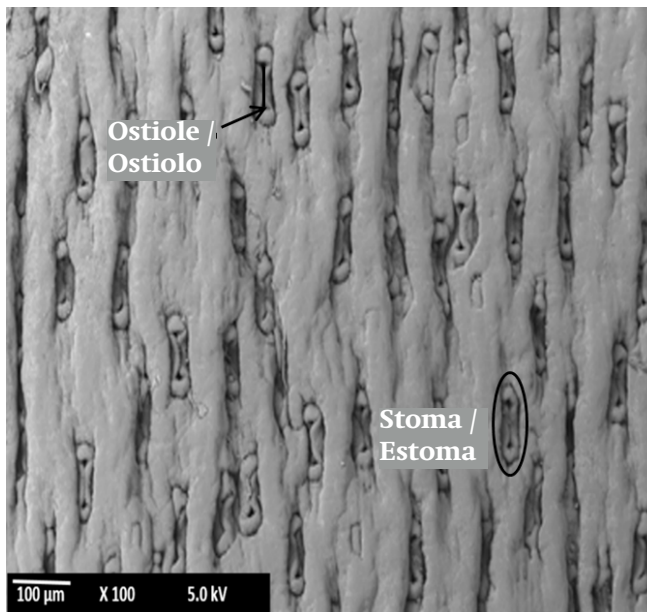
Con el fin de identificar los efectos de esterilización, cortes de cutícula de *A. salmiana* de 10  $\text{cm}^2$  fueron colocados en agua destilada dentro de un matraz

7.2 mg·cm<sup>-2</sup>. This waxy material had, on average, 33.42 % moisture, determined by drying to constant weight at 45 °C. The outer side of the cuticles (examined with the Scanning Electron Microscope at a scale of 100 μm) allowed observing regularly distributed tetracytic-type stomata; the average density was 64 stomata·mm<sup>-2</sup>. This number of stomata is greater than that estimated in *Agave mapisaga* cuticles (20-50 stomata·mm<sup>-2</sup>) by Nobel (1994).

The estimated average density of 64 stomata·mm<sup>-2</sup> in the agave cuticle is greater than that reported for *Agave atrovirens*, 22, 29 and 30 stomata·mm<sup>-2</sup> (Bernardino-Nicanor, Mora-Esscobedo, Montañez-Soto, Filardo-Kerstupp, & González-Cruz, 2012), and *Opuntia ficus-indica* variety 'Atlixco', 28 parasitic-type stomata·mm<sup>-2</sup> (Vargas-Rodríguez, Pérez-Nieto, Arroyo-Figueroa, Gallegos-Alvarez, & Flores-Rodríguez, 2017). The low stomatal density, in the particular cases of agave and nopal, is a characteristic that can be associated with the environmental factors of arid and semi-arid habitats, in which the plants of these species grow and develop in order to make efficient use of water.

The stomata seen on the outer side of a sun-exposed *A. salmiana* cuticle look sunken (typical of xerophytic plants); their ostioles have an average length of 52 μm (Figure 1). The stomata are aligned in rows.

The outer side of the cuticle showed insufficient detail for the identification of its waxes; Domínguez, Heredia-



**Figure 1.** SEM micrograph of the outer side of a sun-exposed fresh cuticle detached from an *Agave salmiana* leaf.

**Figura 1.** Micrografía SEM del lado externo de cutícula fresca expuesta al sol desprendida de una hoja de *Agave salmiana*.

Erlenmeyer de 125 mL con tapón de algodón. Luego, los cortes de cutícula se introdujeron en olla a 15 lb in<sup>-2</sup> de presión de vapor y 121 °C durante 15 minutos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

## Resultados y discusión

### Estructura estomática mediante Microscopia Electrónica de Barrido

Las cutículas de agave (mixiotes) de *A. salmiana* recién desprendidas presentaron un grosor de 0.114 mm y una densidad de 7.2 mg·cm<sup>-2</sup>. Este material ceroso tuvo 33.42 % de humedad, en promedio, determinado mediante secado hasta peso constante a 45 °C. El lado externo de las cutículas (examinadas con Microscopio Electrónico de Barrido a una escala de 100 μm), permitió observar estomas del tipo tetracítico regularmente distribuidos; la densidad promedio fue de 64 estomas·mm<sup>-2</sup>. Esta cantidad de estomas es mayor que la estimada en cutículas de *Agave mapisaga* (20-50 estomas·mm<sup>-2</sup>) por Nobel (1994).

La densidad promedio estimada de 64 estomas·mm<sup>-2</sup> en la cutícula de agave es mayor que la consignada para *Agave atrovirens*, 22, 29 y 30 estomas·mm<sup>-2</sup> (Bernardino-Nicanor, Mora-Esscobedo, Montañez-Soto, Filardo-Kerstupp, & González-Cruz, 2012) y *Opuntia ficus-indica* variedad 'Atlixco', 28 estomas·mm<sup>-2</sup> de tipo paracítico (Vargas-Rodríguez, Pérez-Nieto, Arroyo-Figueroa, Gallegos-Alvarez, & Flores-Rodríguez, 2017). La densidad estomatal baja, en los casos particulares de agave y nopal, es una característica que puede estar asociada a factores ambientales de los hábitats áridos y semiáridos, en los cuales las plantas de esas especies crecen y se desarrollan con el fin de hacer un uso eficiente del agua.

Los estomas apreciados en el lado externo de la cutícula de *A. salmiana* tienen aspecto hundido (típico de plantas xerófitas); sus ostiolos tienen una longitud promedio de 52 μm (Figura 1). Los estomas están alineados en filas.

El lado externo de la cutícula presentó detalle insuficiente para la identificación de ceras; ello puede deberse a que el lienzo en que los estomas se establecen, corresponde al de las denominadas ceras intracuticulares, tal y como lo señalan Domínguez, Heredia-Guerrero & Heredia (2011). Estas ceras son una mezcla heterogénea de ácidos grasos de cadenas muy largas con entre 20 y 40 átomos de carbono (Reina-Pinto & Yephremov, 2009). Además, los ésteres de cera con 36 - 70 átomos de carbono han sido identificados (Reina & Yephremov, 2009).

Otros detalles revelados con la microscopia electrónica de barrido para el estudio de la cutícula de agave fueron los siguientes. El lado interno de la cutícula tiene

Guerrero & Heredia (2011) have indicated that the waxes are the material in which the stomata are established and correspond to the so-called intracuticular waxes. These waxes are a heterogeneous mixture of very long-chain fatty acids with between 20 and 40 carbon atoms (Reina-Pinto & Yephremov, 2009). In addition, wax esters with 36-70 carbon atoms have been identified (Reina & Yephremov, 2009).

Other details revealed with scanning electron microscopy for the study of the agave cuticle were as follows. The inner side of the cuticle has ostioles with a length of 30  $\mu\text{m}$  (Figure 2), while the outer side has ostioles with a length of 52  $\mu\text{m}$ ; therefore, the ostioles on the inner side are 22  $\mu\text{m}$  shorter than those on the outer side. On the inner side of the cuticle, the two guardian cells that make up the ostioles stand out, facing each other. In addition, an interesting aspect is that the dehydrated cuticle rolled up towards the inner face and allowed taking a micrograph (Figure 3) in which the structural contrast of both sides can be seen.

Bernardino-Nicanor et al. (2012) identified ostioles longer than those found in this study, reporting ostioles with lengths of 53.84, 77.77 and 140.51  $\mu\text{m}$  in 3-, 6- and 9-year-old *A. atrovirens* leaf cuticles, respectively; the difference can be associated to the fact that the agave species involved are different and to the ages involved. In addition, Vargas-Rodríguez et al. (2017) identified ostioles from 30 to 40  $\mu\text{m}$  in length in *O. ficus-indica*

ostiolos con 30  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 2), mientras que el lado externo tiene ostiolos con 52  $\mu\text{m}$  de longitud; entonces, los ostiolos del lado interno son 22  $\mu\text{m}$  menos largos que los del lado externo. En el lado interno de la cutícula destacan las dos células guardianes que conforman los ostiolos, una frente a la otra. Además, un aspecto interesante es que la cutícula deshidratada se enrolló hacia la cara interna y permitió tomar una micrografía (Figura 3) en la cual se puede apreciar el contraste estructural de ambos lados.

Bernardino-Nicanor, et al. (2012) identificaron ostiolos más largos que los evidenciados en el presente trabajo; ellos identificaron ostiolos con longitudes de 53.84, 77.77 y 140.51  $\mu\text{m}$  en cutículas de hojas de *A. atrovirens* de 3, 6 y 9 años, respectivamente; la diferencia puede asociarse a que las especies de agave involucradas son distintas y a las edades involucradas. Además, Vargas-Rodríguez et al. (2017) identificaron ostiolos de 30 a 40  $\mu\text{m}$  de longitud en cutículas de *O. ficus-indica*; esos ostiolos son parecidos en longitud a los apreciados en este trabajo, aun cuando las especies involucradas son de géneros diferentes.

#### Permeabilidad de la cutícula de *Agave salmiana* al agua

Los resultados de las pruebas de permeabilidad de la cutícula fresca de la hoja de *A. salmiana*, al considerar ambos lados, se muestran en el Cuadro 1 y la Figura 4,

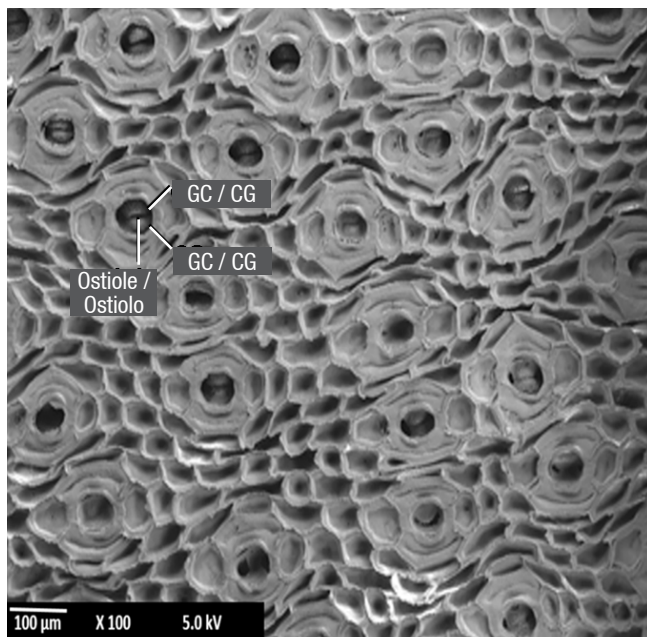


Figure 2. SEM micrograph of the inner side of a sun-exposed fresh cuticle detached from an *Agave salmiana* leaf. GC=Guardian cell.

Figura 2. Micrografía SEM del lado interno de cutícula fresca expuesta al sol, desprendida de una hoja de *Agave salmiana* CG=Célula guardián.

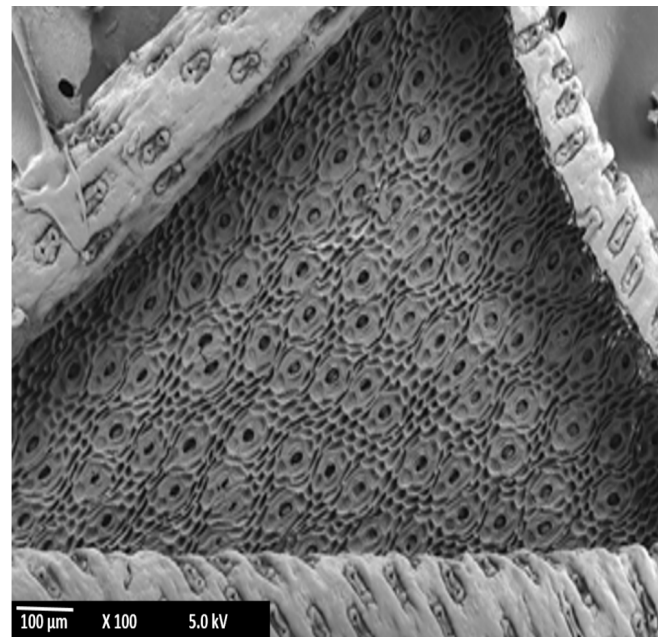


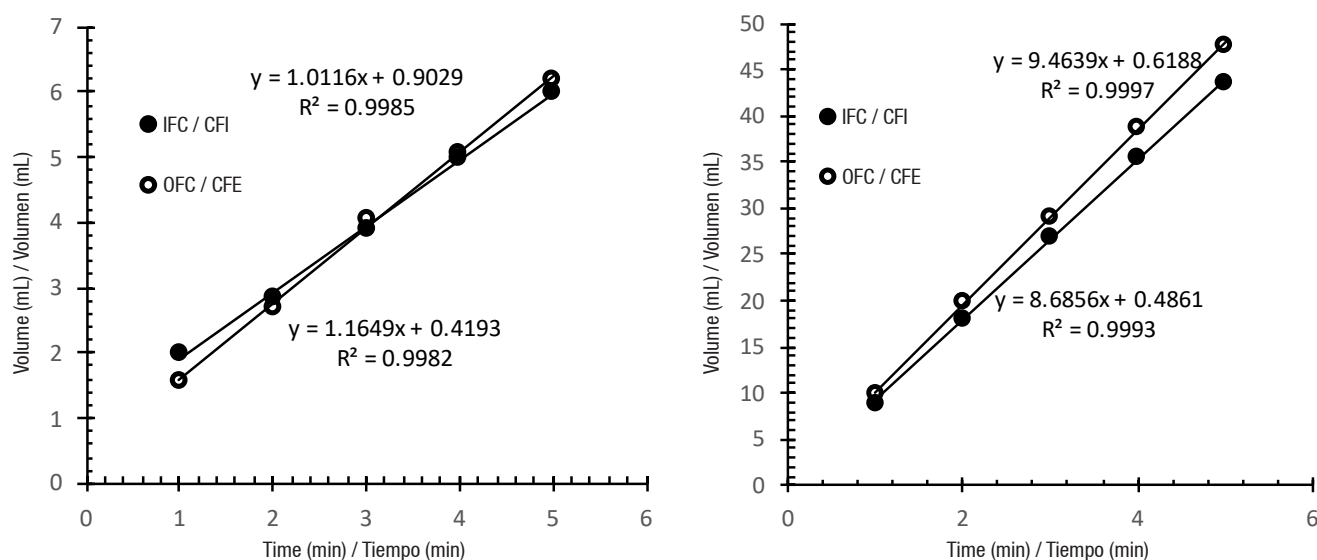
Figure 3. SEM micrograph of the sun-exposed outer and inner sides of a cuticle detached from an *Agave salmiana* leaf.

Figura 3. Micrografía SEM de los lados externo e interno de cutícula, expuestas al sol desprendida de una hoja de *Agave salmiana*.

**Table 1. Water permeability characteristics of *Agave salmiana* cuticles.****Cuadro 1. Características de permeabilidad de cutículas de *Agave salmiana* al agua.**

Cuticle, flow condition / Cutícula, condición del flujo	Water volume to first minute (mL) / Volumen de agua al primer minuto (mL)	Times the lowest water volume / Veces el volumen de agua menor
Fresh, flow from the outer side / Fresca, flujo desde el lado externo	1.56	1
Fresh, flow from the inner side / Fresca, flujo desde el lado interno	1.99	1.28
Stored (1 year), flow from the outer side / Almacenada (1 año), flujo desde el lado externo	9.83	6.31
Stored (1 year), flow from the inner side / Almacenada (1 año), flujo desde el lado interno	8.78	5.64

\*Distilled water at 22 °C / \*Agua destilada a 22 °C



**Figure 4. Volume of water ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) at 22 °C that flowed through the *Agave salmiana* cuticle as a function of time (min), considering flow from both sides (inner I, or outer O). Fresh cuticle after detaching it from agave leaf (IFC or OFC, above) and cuticle stored in a refrigerator for 1 year in distilled water (ISC or OSC, below).**

**Figura 4. Volumen de agua ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) a 22 °C que fluyó a través de la cutícula de *Agave salmiana* en función del tiempo (min), al considerar el flujo desde ambos lados (interno I, o externo E). Cutícula fresca después de desprenderla de la hoja de agave (CFI o CFE, arriba) y cutícula almacenada en refrigerador durante 1 año en agua destilada (CAI o CAE, abajo).**

cuticles; those ostioles are similar in length to those seen in this study, even though the species involved are of different genera.

#### Water permeability of the *Agave salmiana* cuticle

Results of the permeability tests conducted on the fresh cuticle of *A. salmiana* leaves, when considering both sides, are shown in Table 1 and Figure 4, in terms of volumes diffused through the cuticles at different times. The amount of water diffused during the first minute was 1.56 mL, when the flow was from the outer to the inner side (Table 1), while the volume diffused was 1.99 mL when the flow was from the inner to the outer side.

en términos de volúmenes difundidos a través de las cutículas en diferentes tiempos. La cantidad de agua difundida durante el primer minuto fue de 1.56 mL, cuando el flujo fue del lado externo al interno (Cuadro 1); mientras que el volumen difundido fue de 1.99 mL, cuando el flujo fue del lado interno al externo.

El comportamiento del volumen de flujo a través de cutículas frescas con respecto al tiempo es lineal en ambas direcciones (Figura 4). Las pendientes de las rectas sugieren que el volumen difundido es menor desde el interior hacia el exterior que en sentido contrario ( $1.0116 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ,  $R^2 = 0.998$  versus  $1.1649 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ,  $R^2 = 0.998$ ). Entonces, el volumen de agua difundido, en general, es independiente del

The behavior of the flow volume through fresh cuticles with respect to time is linear in both directions (Figure 4). The slopes of the straight lines suggest that the diffused volume is less from the inside out than in the opposite direction ( $1.0116 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ,  $R^2 = 0.99$  versus  $1.1649 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $P < 0.01$ ,  $R^2 = 0.998$ ). Thus, the volume of water diffused, in general, is independent of the size of the pores or ostioles because those on the inner side have  $22 \mu\text{m}$ , a shorter length than those on the outer side. Therefore, this could be explained both by the function of the guardian cells and by the chemical composition of the cuticle on both sides.

The comparison of permeability between fresh cuticles recently removed from the leaf (FC) and those stored (SC) in water for one year in refrigeration is shown in Figure 4. The slopes of the straight lines are greater in the case of stored cuticles ( $9.4639$  and  $8.6856 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , for OSC and ISC, respectively) than the slopes in the case of fresh cuticles ( $1.1649$  and  $1.0116 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , for OFC and IFC, respectively). This implies, for example, that the water flow in the case of OSC is, in general, 8.12 times the water flow associated with OFC (Figure 4), although the permeability from the outer side to the first minute is 6.31 times greater than from the inner side (Table 1). The water permeability of plant cuticles can be explained by the amount of waxy material. Waxes function as barriers to the transport and diffusion of water (Heredia, 2003) due to their hydrophobic and adjuvant functions in the formation of a complex network of interstices (Trejo, Aragón, & Miranda, 2001). Therefore, the explanation for the fact that the flow is greater in the SC than in the FC may be that the SC reduced its amount of wax and, consequently, the capacity to stop the flow of water, due to being stored under refrigeration conditions.

### Sterilization

Resistance to steam sterilization showed that the cuticle did not disintegrate when cooled. In fact, the amount of degrees Brix (amount of solutes present in the solution) remained constant and with the same value as distilled water (control). The resistance of nopal (*Opuntia ficus indica* var. Atlixco) cuticles to heat was earlier reported by Vargas et al. (2017). The ignition temperature ( $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ) of that material may be due to the presence of calcium oxalate druses (identified by EDS-scanning electron microscopy on the inner side of the cuticle). In this study, the *A. salmiana* cuticles did not present calcium oxalate crystals. In this regard, Bernardino-Nicanor et al. (2012) cite Ilarslan et al. (2001) in referring to age as an important factor in the identification of calcium oxalate crystals, as it is easier to identify them in the early stages of plant development. In addition, Bernardino-Nicanor et al. (2012) determined raphides or styloids (calcium oxalate) in the epidermis of *A. Atrovirens*.

tamaño de los poros u ostiolos, porque los del lado interno tienen  $22 \mu\text{m}$ , menor longitud que los del externo. Por consiguiente, ello podría ser explicado tanto por la función de las células guardianes como por la composición química de la cutícula en ambos lados.

La comparación de la permeabilidad entre las cutículas fresca recién retirada de la hoja (CF) y almacenada (CA) en agua, durante un año en refrigeración es mostrada en la Figura 4. Las pendientes de las rectas son mayores en el caso de la cutícula almacenada ( $9.4639$  y  $8.6856 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , para CAE y CAI, respectivamente) que las pendientes en el caso de la cutícula fresca ( $1.1649$  y  $1.0116 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , para CFE y CFI, respectivamente). Esto implica, por ejemplo, que el flujo de agua en el caso de CAE es 8.12 veces el flujo de agua asociado a CFE en general (Figura 4), aunque la permeabilidad desde el lado externo al primer minuto es 6.31 veces mayor que desde el lado interno (Cuadro 1). La permeabilidad al agua de las cutículas vegetales puede ser explicada por la cantidad de material ceroso. Las ceras funcionan como barreras para el transporte y difusión de agua (Heredia, 2003) debido a sus funciones hidrofóbicas y coadyuvantes en la formación de una red compleja de intersticios (Trejo, Aragón, & Miranda, 2001). Entonces, la explicación de que el flujo sea mayor en la CA que en la CF puede ser que, la CA redujo su cantidad de cera y, por consiguiente, la capacidad de freno al flujo de agua, por el hecho de estar almacenada en condiciones de refrigeración.

### Esterilización

La resistencia a la esterilización con vapor de agua demostró que la cutícula no se desintegró cuando se enfrió. De hecho, la cantidad de grados Brix (cantidad de solutos presentes en la solución) se mantuvo constante y con el mismo valor que el agua destilada (control). La resistencia de cutículas de nopal *Opuntia ficus indica* var. Atlixco al calor, ya había sido reportada por Vargas et al. (2017). La temperatura de ignición ( $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ) de ese material puede deberse a la presencia de drusas de oxalato de calcio (identificadas por EDS-microscopía electrónica de barrido en el lado interno de la cutícula). En este estudio, las cutículas de *A. salmiana* no presentaron cristales de oxalato de calcio. En tal orden de ideas, Bernardino-Nicanor et al. (2012) citan a Ilarslan et al. (2001) para referirse a que la edad es un factor importante en la identificación de cristales de oxalato de calcio, debido a que es más fácil identificarlos en las primeras etapas del desarrollo de las plantas. Además, Bernardino-Nicanor et al. (2012) determinaron rafidios o estiloides (oxalato de calcio) en la epidermis de *A. Atrovirens*.

En general, la cutícula de *Agave salmiana* tiene características estructurales de porosidad que regulan la difusión de agua de manera lineal con respecto al

In general, the *Agave salmiana* cuticle has structural porosity characteristics that regulate the diffusion of water in a linear way with respect to time. This property and thermal resistance can be useful in the case of industrial use. For example, some specific applications for the manufacture of protective equipment requiring a natural membrane that allows transpiration could be developed. Such could be the case with gloves intended for prolonged use in operating rooms, although there is still a lack of knowledge about the process of molding and inhibition of the agave cuticle to the passage of microorganisms such as bacteria. However, in any potential use, the *Agave salmiana* cuticle can be mechanically reinforced as creativity allows. In that process, cuticle layers can be used to achieve greater thicknesses by interspersing adhesives, conditioning the material for hardening or another quality by involving various additives.

### Conclusions

Recently-detached *A. salmiana* cuticles (mixiotes) had a thickness of 0.114 mm and a density of 7.2 mg·cm<sup>-2</sup>. This waxy material had an average moisture content of 33.42 %. The ostioles on the outer side are longer (22 μm) than those on the inner one.

Cuticle water permeability tests made it possible to estimate that the filtered volume is greater from the inside to the outside than in the opposite direction. In general, the flow is quantitatively similar in both directions, i.e. from the inner side to the outer side and vice versa.

Resistance to steam sterilization demonstrated that the *Agave salmiana* cuticle did not disintegrate either during the thermal process or immediately thereafter.

Results suggest that the structural characteristics of the cuticle such as regulated porosity, water permeability and thermal resistance are indicators of its biotic functionality. Therefore, the *A. salmiana* cuticle can be used in industry as a natural membrane.

### Acknowledgments

The authors thank the Laboratorio de Microscopía Electrónica del Laboratorio Nacional de la Universidad de Guanajuato (LANCAPFEM) for the facilities provided to perform the microscopic analysis of the material.

tiempo. Esa propiedad y la resistencia térmica pueden ser útiles en el supuesto de uso industrial. Por ejemplo, algunas aplicaciones peculiares para la fabricación de equipo de protección que requiera una membrana natural que permita la transpiración podrían ser desarrolladas. Tal podría ser el caso de guantes para uso prolongado en quirófanos, aunque todavía se carezca de conocimiento sobre el proceso de moldeo e inhibición de la cutícula de agave al paso de microorganismos como bacterias. No obstante, en cualquier perspectiva de uso, la cutícula de *Agave salmiana* se puede reforzar mecánicamente según la creatividad lo permita. En ese proceso se pueden usar capas de cutícula para lograr grosores mayores intercalando adhesivos, acondicionando el material para endurecimiento u otra cualidad al involucrar aditivos diversos.

### Conclusiones

Las cutículas (mixiotes) de *A. salmiana* recién desprendidas, presentaron un grosor de 0.114 mm y una densidad de 7.2 mg·cm<sup>-2</sup>. Este material ceroso tuvo 33.42 % de humedad, en promedio. Los ostiolas del lado externo tienen mayor longitud (22 μm) que los del interno.

Las pruebas de permeabilidad de las cutículas al agua permitieron estimar que el volumen filtrado es mayor desde el exterior hacia el interior que en sentido contrario. En general, el flujo es cuantitativamente parecido en ambas direcciones, i.e. del lado interno al lado externo y viceversa.

La resistencia a la esterilización con vapor de agua demostró que la cutícula de *Agave salmiana* no se desintegró durante el proceso térmico, ni inmediatamente después.

Los resultados sugieren que las características estructurales de la cutícula como porosidad regulada, permeabilidad al agua y resistencia térmica son indicadores de su funcionalidad biótica. Por lo tanto, la cutícula de *A. salmiana* puede ser usada en la industria como membrana natural.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Laboratorio de Microscopía Electrónica del Laboratorio Nacional de la Universidad de Guanajuato (LANCAPFEM) por las facilidades brindadas para hacer el análisis microscópico del material.

*End of English version*

*Fin de la versión en español*

## References / Referencias

- Bernardino-Nicanor, A., Mora-Escobedo, R., Montañez-Soto, J. L., Filardo-Kerstupp, S., & González-Cruz, L. (2012). Microstructural differences in *Agave atrovirens* Karw leaves and pine by age effect. *African Journal of Agricultural Research*, 7(24), 3550-3559. doi:10.5897/AJAR11.1185.
- Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A. C., Humphry, M., Borel, S., MacDonald-Comber Petétot, J.,... & Nawrath, C. (2007). A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *The EMBO Journal*, 26(8), 2158-2168. doi:10.1038/sj.emboj.7601658.
- Chatterjee, S., Sarkar, S., Oktawiec, J., Mao, Z., Niitsoo, O., & Stark, R. E. (2012). Isolation and biophysical study of fruit Cuticles. *J. Vis. Exp.* (61), e3529. doi:10.3791/3529.
- Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J. A., & Heredia, A. (2011). The biophysical design of plant cuticles: an overview. *New Phytologist*, 189, 938-949. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03553.X.
- Heredia, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1620(1-3), 1-7. doi:10.1016/S0304-4165(02)00510-X.
- Kunst, L., Jetter, R., & Samuels, A. L. (2008). Biosynthesis and transport of plant cuticular waxes. *Annual Plant Reviews*, 23, 182-255. doi: 10.1002/9780470988718.ch5
- Nobel, P. S. (1994). *Remarkable Agaves and Cacti*. Oxford University Press, Oxford.
- Reina-Pinto, J. J., & Yephremov, A. (2009). Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(6), 540-549. doi:10.1016/j.plaphy.2009.01.004.
- Suh, M. Ch., Samuels, A. L., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J., & Beisson, F. (2005). Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in *Arabidopsis* stem epidermis. *Plant Physiology*, 139(4), 1649-1665. doi: 10.1104/pp.105.070805.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Universitat Jaume. Vol. 10. *Ciencias Experimentales*, 1338 pp, ISBN 8480216018, 9788480216012.
- Trejo, V., Aragón, N., & Miranda, P. (2001). Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(1), 01-05.
- Vargas-Rodríguez, L., Pérez-Nieto, A., Arroyo-Figueroa, G., Gallegos-Álvarez, M.M., & Flores-Rodríguez, E. (2017). Cuticle of prickly pear: structure and biological function. XXVI International Materials Research Congress, August 20-25, Cancún, Mexico.