



UNIVERSIDAD DE LA SABANA

Facultad de Ingeniería

INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN AGROINDUSTRIAL

**“ESTUDIO DE LA MORFO - ESTRUCTURA DE DOS
VARIETADES MEXICANAS DE AGAVE (*Agave
angustifolia* HAW. Y *Agave tequilana* WEBER)
CARACTERIZADAS MEDIANTE MICROSCOPIA
ÓPTICA, TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES Y
CONCEPTOS DE DIMENSIÓN FRACTAL”**

P R E S E N T A:

LAURA MARGARITA SÁNCHEZ GALINDO

Tesis de grado para optar al título de
Ingeniero de Producción Agroindustrial

Director

Dr. ANTONIO JIMENÉZ APARICIO

Asesor

Dra. Luz Indira Sotelo Díaz

UNIVERSIDAD DE LA SABANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN AGROINDUSTRIAL
CHÍA PUENTE DEL COMÚN

2010

El trabajo de Tesis de grado: **“ESTUDIO DE LA MORFO - ESTRUCTURA DE DOS VARIETADES MEXICANAS DE AGAVE (*Agave angustifolia* HAW. Y *Agave tequilana* WEBER) CARACTERIZADAS MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA, TRATAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES Y CONCEPTOS DE DIMENSIÓN FRACTAL”** se realizó en el *Laboratorio de Microscopía e Imagenología* perteneciente al Departamento de Biotecnología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (México), bajo la Dirección del *Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio*; fungiendo como Asesor Interno por la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana, (Chía, Cundinamarca, COLOMBIA) la *Dra. Luz Indira Sotelo Díaz*.

Este trabajo forma parte del Proyecto financiado por los Fondos Mixtos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) y el Gobierno del Estado de Morelos, **“Desarrollo de procesos transferibles para la elaboración de fructanos (polisacáridos de alto valor comercial) a partir de agave producido en el Estado de Morelos”**, con registro CONACYT – FOMIX 80576.

La Sustentante, *Laura Margarita Sánchez Galindo* contó con una beca- estancia del Proyecto FOMIX, en el CeProBi-IPN (México) para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero darle las gracias a Dios y a Fomix por la oportunidad que me dieron de hacer parte de este proyecto. A mi familia por ser las primeras personas que me han apoyado siempre. A Martha y al Doc por haberme apoyado y ayudado desinteresadamente durante mi estancia en México. Al personal de Ceprobi y de la Universidad de La Sabana por haber compartido su conocimiento conmigo y encaminarme por lo que realmente es mi pasión. A los amigos (Kathe, Ale, Dulce, Cinthia, Vane, Alejo, Aristi, Tote, Isra, Fer) que en esos lugares encontré, porque hicieron más agradable e inolvidable esta etapa de formación en mi vida y porque de todos he aprendido mucho. Y a ti Bonito, por haberme brindado tu apoyo, comprensión y amor a pesar de tantas cosas que hemos vivido.

Muchísimas Gracias

DEDICATORIA

Les dedico este trabajo a mis padres por haberme dado todo su amor, apoyo y comprensión, a lo largo de mi vida, se merecen esto y mucho más de mí. A mi hermano, para que no olvide que siempre que uno se propone algo lo puede lograr... no abandones tus sueños, solo cree en ti mismo. Y a ti Bonito, para que nunca olvides que este es el final de una etapa, pero el comienzo de otra mejor.

¡Los amo!

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN	14
II. MARCO DE REFERENCIA	17
2.1 Agave.....	17
2.1.1. <i>Agave tequilana</i> Weber.....	20
2.1.2 <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	21
2.1.3 Inulina	22
2.2. Morfoestructura.....	24
2.3 Tratamiento digital de Imágenes (TDI).....	27
2.3.1 Descriptores morfométricos	28
2.4 Dimensión Fractal	31
2.4.1 Propiedades de los fractales.....	33
2.4.2 Métodos de medición de la dimensión fractal	33
2.4.3 Antecedentes de la caracterización estructural de Agave por medio de TDI y conceptos de dimensión fractal	36
III. JUSTIFICACIÓN	38
V. OBJETIVOS	40
5.1 Objetivo general.....	40
5.2 Objetivos específicos	40
VI. MATERIALES Y METODOS	42
6.1 Materiales.	42
6.1.1 Material Biológico.....	42
6.1.2 Material de laboratorio	43
6.2. Equipos	43
6.2.1 Equipo de laboratorio.....	43
6.2.2 <i>Equipo de cómputo</i>	44
6.2.3 Software	44
6.3 Metodología	44

6.3.1 Tratamiento del material vegetal.....	45
6.3.2 Tratamiento digital de imágenes.....	49
6.3.3 Análisis estadístico.....	50
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
7.1 Arreglo microestructural.....	52
7.1.1 Hoja.....	53
7.1.2 Tallo.....	58
7.2 Morfometría.....	61
7.2.1. Hoja.....	61
7.2.2 Tallo.....	68
VIII. CONCLUSIONES.....	72
IX. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.....	74
X. BIBLIOGRAFÍA.....	75
XI ANEXOS.....	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales tipos de células presentes en varios sistemas de tejidos y regiones vasculares de las plantas.....	26
Tabla 2. Área celular promedio (μm^2) en cortes de hoja.....	61
Tabla 3. Perímetro celular promedio (μm) en cortes de hoja.....	62
Tabla 4. Diámetro de Feret celular promedio (μm) en cortes de hoja.....	63
Tabla 5. Longitud máxima celular promedio (μm) en cortes de hoja.....	64
Tabla 6. Factor de compacidad celular promedio en cortes de hoja.....	65
Tabla 7. Factor de forma celular promedio en cortes de hoja.....	66
Tabla 8. Valores (promedio) de Dfp y Dfa para hojas.....	67
Tabla 9. Valores de los descriptores morfométricos del tallo.....	68
Tabla 10. Valores de Dfp y Dfa para tallo.....	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Agave tequilana</i> Weber.....	20
Figura 2. <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	21
Figura 3. Molécula de inulina.....	23
Figura 4. Cortes transversales de: <i>Agave atrovirens</i> Karw y <i>Yucca</i> sp.....	26
Figura 5. Método de conteo de cajas para la evaluación de la dimensión fractal, en el que los objetos son medidos a diferentes escalas.....	34
Figura 6. Ejemplo de objetos cuya Df_C se encuentra entre 1 y 1.5.....	35
Figura 7. Ejemplo de objetos cuya Df_A se encuentra entre 1.5 y 2.0.....	35
Figura 8. Rosetas y pencas de <i>Agave</i> utilizada como material biológico.....	42
Figura 9. Diagrama de flujo del trabajo experimental.....	45
Figura 10. Forma de realización de los cortes tanto en el tallo como en las hojas.....	46
Figura 11. Micrográficas de hojas (microscopio estereoscópico, 10X).....	52
Figura 12. Corte Transversal de hoja 4X.....	53
Figura 13 Corte Tangencial de hoja 4X.....	54
Figura 14. Corte Radial de hoja observado con epi-fluorescencia con Filtro w-blue10X.....	55
Figura 15. Rafidios 10x.....	56
Figura 16. Estomas (corte radial) presentes en <i>A. angustifolia</i> Haw.....	57
Figura 17. Disposición espacial de los tejidos en cortes (4X) transversales y radiales.....	58
Figura 18. Cortes (10X) de tallo mostrando haces vasculares.....	59
Figura 19. Cortes (10X) de tallo mostrando la disposición de los haces vasculares en el colénquima y la epidermis	60
Figura 20. Forma de las células de las hojas.....	67
Figura 21. Forma de las células del tallo.....	70

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	Área (mm ²)
ADF	Análisis de la dimensión Fractal
AP	Área Proyectada (µm ²)
C	Colénquima
CAM	Metabolismo del ácido crasuláceo (Crassulacean Acidic Metabolism por sus siglas en inglés)
CV	Cambium vascular
DF	Dimensión Fractal (Adimensional)
Df	Diámetro de Feret (Adimensional)
Df_a	Dimensión fractal de área (Adimensional)
Df_c	Dimensión fractal de contorno (Adimensional)
Df_p	Dimensión fractal de perímetro (Adimensional)
E	Esclerénquima
EP	Epidermis
Es	Estomas
F	Floema
FAA	Formol acetato alcohólico
Fc	Factor de compacidad
Fe	Factor elíptico
FE	Fibras Extraxiliares
Ff	Factor de forma
FT	Fibras Transitorias
FX	Fibras del Xilema
HV	Haces Vasculares
L	Longitud Característica (µm)
LM	Longitud máxima (µm)
Lm	Longitud mínima (µm)
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
mm	Milímetro
mm²	Milímetro Cuadrado
MO	Microscopía Óptica
P	Parénquima
Pm	Perímetro
Rd	Radio del objeto
R	Rafidios
T	Traqueidas
TDI	Tratamiento Digital de Imágenes
V	Volumen (µm ³)
v/v	Concentración volumen a volumen
X	Xilema
B	Beta
δ_{ef}	Coefficiente de difusión efectiva

RESUMEN

En México, el género *Agave* tiene áreas de distribución muy amplias y es de gran importancia económica y cultural. En el Estado de Morelos, se destaca la presencia de las especies *A. angustifolia* Haw y *A. tequilana* Weber. Sin embargo, a pesar de las grandes ganancias económicas que produce, se ha invertido poco en investigación para la diversificación de los usos de estas especies. En este trabajo se recurrió al Tratamiento Digital de Imágenes acoplado a la microscopía óptica (TDI-MO) y conceptos de Dimensión Fractal (DF), con el fin de establecer las posibles diferencias morfo-estructurales de las células y tejidos del tallo y de las hojas y lograr la medición de microestructuras de órganos y tejidos vegetales para conocer si existen diferencias morfo-estructurales entre las dos especies de agave producidas en el Estado de Morelos. Para esto se tomaron muestras de cuatro posiciones distintas de la planta y se realizaron cortes transversales, tangenciales y radiales.

Se observó que las plantas en las hojas, presentan tres tipos de tejido: *fundamental*, *vascular* y *dérmico*. Para ambas especies, los cortes transversales presentaron un tejido heterogéneo con grandes cantidades de fibras del esclerénquima agrupadas en forma de herradura; tejidos vasculares constituidos por xilema y floema que poseen membranas engrosadas debido al alto contenido de lignina. En los cortes radiales y tangenciales se observó la presencia de gran cantidad de fibras alrededor de los haces vasculares y células parenquimatosas.

En el tallo para ambas especies se observó que en los cortes radiales, tangenciales y transversales, pareciese no haber una disposición espacial particular de las células en los tejidos, a diferencia de lo observado en las hojas, y está constituido por tejido vascular, fundamental dérmico y meristemático.

Las imágenes se caracterizaron morfométricamente, evaluándoles los descriptores dimensionales de área, perímetro, longitud máxima y diámetro de Feret, así como los factores adimensionales de forma y de compacidad. Estos demostraron para ambas plantas, que no hay diferencias significativas en cuanto a la posición de la cual se tome la muestra, pero si en cuanto al corte realizado dentro de una misma planta. Adicionalmente, si se comparó entre los cortes y se encontró que existen diferencias significativas entre las células de una planta y otra.

Se determinó la naturaleza fractal de las células de ambas especies y se obtuvieron diferencias significativas al momento de hacer un corte del mismo tipo en ambas especies.

Se concluyó que el arreglo microestructural es similar para ambas especies, en cuanto a su patrón de formación. Sin embargo, los parámetros morfométricos y de dimensión fractal de las células y tejidos, evidencian las diferencias morfoestructurales entre *Agave tequilana* Weber y *Agave angustifolia* Haw al realizar diferentes cortes. Los resultados coadyuvaran a entender mejor las relaciones estructura – función, y diseñar operaciones que permitan obtener productos diversos, como la inulina, y de esta manera, tratar de buscar alternativas en la industria del agave que permitan tener otras perspectivas económicas a futuro.

ABSTRACT.

In Mexico, the plant of Agave has a very extensive area of distribution and it is a matter of great importance in the economic and cultural aspects. In the State of Morelos species of *A. angustifolia* Haw and *A. tequilana* Weber stands out of the others. However, in spite of the biggest economic profits they produce, just a little amount of money has been invested in the researches of the diverse uses of this species. In this work it was used the Digital Treatment of Images (DTI) joined to Optical Microscopy (OM) and concepts of Fractal Dimension (FD), to establish the possible morpho-structural differences of the cells and tissues of stems and leaves to achieve the measurement of microstructures of organ and vegetal tissues and if there are morpho-structural differences between the two species produced in the State of Morelos. In order to do this, four samples of different positions of the plant were taken and it was realized transversal, tangential and radials cuts.

It was observed that the plants show three kinds of tissues in their leaves: *fundamental*, *vascular* and *dermic*. For both species, the transversal cut shows a heterogeneous tissue with great amounts of fibers of sclerenchyma grouped seeming like a horseshoe. Vascular tissues are constituted by xylem and phloem with thick membranes because of its big content of lignin. In the radial and tangential cuts it was observed the presence of a great amount of fibers around the vascular bundles and parenchymatoses cells.

For both species in the stem it was observed that in radial, tangential and transversal cuts, it seemed not to be any particular spatial disposition of the cells in the tissues, unlike what it was seen on the leaves, which is constituted by vascular, fundamental, dermic and mersitematic tissues.

The images were characterized morpho-metrically. It was evaluated the dimensional descriptors of area, perimeter, maxim length and Feret diameter, the same as the adimensional factors of shape and compactness. Those factors show that, for both species, there are no significant differences in the position in which the samples are taken, but there are significant differences in the way the cuts are done. In addition there are significant differences between each descriptor for cells of both species.

It was determined the fractal nature of the cells in both species, and it was found some significant differences at the moment in which a cut of the same type was done in both species

It was concluded that the microstructural arrangement is similar for both species, in regard to its pattern of formation. Nevertheless, the morphometrical parameters and the fractal dimation of the cells and tissues, show the morphostructural differences between *Agave tequilana* Weber and *Agave angustifolia* Haw, at the moment in which the cuts are made. The results will help to understand much better the relationships between structures and functions, and will also design operations that allow obtaining diverse products like inulin, and thus, it will be possible to look for some alternatives in the industry of agave that also allow having other economical perspectives in the future.

I. INTRODUCCIÓN

En México, el género agave tiene una amplia distribución, se encuentra en más del 75% del territorio (Valenzuela Zapata, 2003); está formado por 136 especies y sus taxones tienen áreas de distribución muy amplias. Se encuentran en las zonas áridas y semiáridas del centro y norte del país, pero su numerosidad disminuye drásticamente hacia las zonas húmedas y cálidas del sur (García, 2007).

El alto grado endémico de especies que existe en México se debe a la heterogeneidad del territorio y las propiedades intrínsecas de cada taxón, tales como su diversidad genética, tolerancia ecológica, capacidad de dispersión, germinación de sus semillas, así como a sus interacciones bióticas con otros organismos (García, 2007).

Los agaves han tenido gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos que los han aprovechado durante años, fueron las primeras plantas aprovechadas en Mesoamérica para alimentarse; asimismo, se han utilizado como, medicina, refugio, decoración, fibras duras, combustible, abono, construcción de vivienda, entre otros. Sin embargo, se destaca su uso frecuente en la industria del tequila y el mezcal. Con todo ello, el agave debería promover esquemas de organización adecuados que involucren a todos los agentes de la cadena productiva, para que se mantenga como un bien con grandes perspectivas en el futuro (ASERCA, 2003). Sin embargo, a pesar de las grandes ganancias económicas que produce, se ha invertido poco en investigación para la diversificación de los usos de estas especies.

La función de un producto depende de las relaciones estructura - función (Russ, 2005); por lo que aproximarse a estas relaciones, ofrece información detallada

sobre diversos aspectos, tales como cambios a nivel bioquímico y fisicoquímico; eventos en los que se involucran fenómenos de transporte y resistencia estructural a los diferentes procesos de transformación a los que es sometido.

El estudio de las relaciones estructura – función, ha sido enfocado usualmente a las interacciones fisicoquímicas y bioquímicas de las estructuras que componen los materiales; en este caso, órganos y tejidos vegetales. No obstante, la arquitectura de las microestructuras que los componen, tiende a ser compleja y de hecho, no ha sido suficientemente estudiada, tanto con relación a su organización natural (protectorados), como con relación a los cambios que experimentan cuando son procesados (Cocho y Miramontes, 2000).

La estructura de los tejidos y órganos vegetales es producto de una auto-organización celular que sigue un cierto patrón o disposición, que actualmente ha sido reconocido como de origen fractal (Kenkel y Walker, 1996). Tales estructuras, conocidas como fractales naturales o pseudo-fractales, generalmente eran analizadas y medidas utilizando los conceptos de la geometría Euclidiana tradicional; los cuales durante muchos años fueron útiles para tal efecto. Sin embargo con la aparición de más y mejores herramientas computacionales y de microscopía, así como el tratamiento digital de imágenes, han permitido tener nueva información acerca de las relaciones estructura – función (Aguilera y Stanley, 1999).

Con el fin de lograr la medición de microestructuras de órganos y tejidos vegetales, el Tratamiento Digital de Imágenes (TDI) acoplado a la microscopía óptica (MO) o electrónica (MEB, MET), resulta ser una herramienta muy versátil ya que permite procesar e interpretar los objetos presentes en una imagen digital; este aspecto resulta de mayor relevancia cuando se trabaja en conjunto con conceptos de la Dimensión Fractal (DF) para traducir a valores numéricos la complejidad de la morfología. El valor agregado que tienen estas herramientas es

que no son destructivas y pueden proporcionar información en tiempo real (Jiménez, 2005).

En este trabajo, se plantea utilizar el TDI - MO para conocer si existen diferencias morfo-estructurales entre dos especies de agave (*A. tequilana* Weber y *A. angustifolia* Haw. cv.), producidas en el Estado de Morelos (México); para ello se propuso utilizar cortes (transversales, radiales y tangenciales) del tallo y de las hojas. Los resultados podrán coadyuvar a entender mejor las relaciones estructura–función, con el fin de diseñar operaciones que permitan obtener productos diferentes a las bebidas alcohólicas tradicionales, tales como la extracción de inulina y de esta manera, tratar de buscar alternativas en la industria del agave que permitan tener otras perspectivas económicas a futuro.

II. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Agave

El género Agave, cuyo significado es "noble" o "admirable" fue dado a conocer por Carlos Linneo en 1753, se cree que se lo puso debido a la talla que pueden alcanzar las rosetas y la inflorescencia de alguna de sus especies (Esguiarte y González, 2007). Está compuesto por plantas pertenecientes a una extensa familia botánica llamada Agavaceae. Son originarias del continente americano, siendo México el lugar con la mayor concentración, riqueza y diversidad de especies nativas, y es allí donde se les conoce con los nombres comunes de "maguey" o "mezcal". En la actualidad se reportan 136 especies, 26 subespecies y 7 formas para la parte continental de Norte América (Valenzuela, 2003).

Los agaves son plantas vasculares xerófilas puesto que se adaptan a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas; poseen estrategias para sobrevivir en estos ambientes, principalmente por el metabolismo del ácido crusaláceo (CAM) que permite obtener ganancias netas de carbono con una pérdida mínima de agua y a acumularla en tejidos especializados junto con los carbohidratos de reserva (García, 2007). Este tipo de metabolismo se caracteriza por que los estomas se mantienen abiertos durante la noche para absorber CO₂, en tanto que en el día los estomas permanecen cerrados para evitar la pérdida de humedad (CAPCA, 2009). Requieren temperatura promedio de 20°C, generalmente a una altitud entre 1,500 y 2,000 msnm. Las condiciones del suelo en el que se desarrollan son arcillosas, permeables y con abundancia de elementos derivados del basalto y con presencia de hierro (ASERCA, 2003).

Estas plantas forman una gran roseta de hojas gruesas y carnosas, generalmente terminadas en una afilada aguja en el ápice y, frecuentemente, también con márgenes espinosos y tallo leñoso, robusto y muy corto. Su crecimiento es muy lento, la maduración demora de 8 a 10 años y florecen sólo una vez emitiendo un largo tallo de casi 10 m de altura que nace del centro del tallo, con numerosos grupos de flores tubulares. La planta muere tras desarrollar el fruto pero por lo general produce retoños en su base (hijuelos). La reproducción se puede dar por vía sexual o asexual, la primera se logra por la polinización de algunos animales principalmente los murciélagos nectarívoros y la segunda por medio de semillas o más eficientemente, mediante rizomas, es decir trasplantando los hijuelos que brotan de la raíz de la planta (Valenzuela, 2003).

Los agaves son aprovechables antes de la floración, por lo que se les inhibe la reproducción sexual cortando el eje floral, para obtener el almacén rico de polisacáridos de sus tallos y base de las hojas (AGROPRODUCE, 2007). Sin embargo, sólo algunas variedades son utilizables para la elaboración de distintas bebidas alcohólicas (por ejemplo, el mezcal, tequila y bacanora entre otras), por las características industriales y sus vástagos entre las que se encuentran el *A. tequilana* y *A. angustifolia*.

La agavecultura es un actividad milenaria de las sociedades americanas, la riqueza de los agaves no es específica, sino que además se ha comenzado a estudiar sus cultivares que forman parte del conjunto de la agro-biodiversidad. Se conocen 22 especies del género *Agave* que son especialmente utilizada para elaboración de mezcal y tequila y de amplia distribución geográfica en México, de ellas la especie *A. tequilana* Weber, es la más reconocida por su participación en la elaboración del tequila (Valenzuela, 2007). Sin embargo, actualmente se maneja la idea que *de A. tequilana* es cultivar de *A. angustifolia* spp puesto que son físicamente muy parecidas entre sí, no obstante si el conocimiento botánico

de quien pretende describirlas no es sólido puede caer fácilmente en errores (Valenzuela, 2003).

Los agaves debido a sus largos ciclos biológicos, son plantas multianuales que forman parte del paisaje natural y rural de México, sin embargo existen obstáculos en la investigación botánica, porque tienen un largo ciclo antes de florecer y los proyectos son poco favorecidos en cuanto a apoyo económico (Valenzuela, 2003).

Por otra parte, gracias a los productores de agave de la región tequilera, se ha logrado redescubrir cultivares que parecían perdidos. Sin embargo, lo que se ha trabajado hasta ahora es muy poco (AGROPRODUCE, 2007). Del bagazo de agave, se han obtenido soluciones de carbohidratos que podrían ser utilizables en diversos procesos fermentativos; también se han realizado estudios de las vinazas producidas en el proceso de destilación y estas cumplen con los requerimientos de algunos nutrientes y podría ser utilizada como complemento en la elaboración de fertilizantes, composta y alimentos para animales (Parra, 2009).

Uno de los usos más promisorios es la obtención de inulina un polisacárido compuesto de cadenas de fructosa, por lo tanto, es un fructano, que se encuentran como sustancia de reserva en las células de la planta. Adicionalmente, forma parte de las fibras alimentarias puesto que tiene un efecto prebiótico (Martínez y Morales, 2005).

La obtención de inulina conlleva diversas operaciones unitarias para su extracción, concentración y purificación; por lo que caracterizar la morfo-estructura podrá arrojar información detallada de la arquitectura a nivel celular lo cual coadyuvará a proponer alternativas para el diseño de sistemas de producción.

2.1.1. *Agave tequilana* Weber

El *Agave tequilana* Weber o “agave tequilana azul” (Figura 1) es una planta de 1.5 a 2.0 m de alto, de tallo reducido y cubierto por las hojas las cuales se encuentran aglomeradas formando una roseta. Éstas son de color azul verdoso, angostas, muy rígidas, linear -puntiagudas de 1 a 1.20 m de largo y 8 a 12 cm de ancho en la parte media, con una espina apical de 8 a 20 mm de largo y numerosos dientes marginales curvados, ganchudos, de 5 a 6 mm de largo (Bautista *et al.*, 2001).



Figura1. *Agave tequilana* Weber (“Agave azul”)
Disponibile en: www.elagave.it

Estas plantas tienen inflorescencia en panícula de 3 a 6 m de longitud, con 20 a 35 ramificaciones en cuyos extremos se encuentran las flores de color verde amarillento, el ovario 23 a 38 mm de largo y 7 mm de diámetro, estambres color amarillento. Fruto seco cuando esta maduro, capsular, de alrededor de 3.5 cm de largo y 2.4 cm de diámetro. (Valenzuela, 2003). Se caracteriza sobre todo, por las magníficas cualidades para la elaboración de tequila (CAPCA, 2009).

La región cultivada con mayor antigüedad es la denominada Tequila, en el Valle de Jalisco en México, también se encuentra en la región de Los Altos del mismo Estado; sin embargo conforman dos núcleos geográficos separados con sistemas

de producción muy diferente. Adicionalmente el crecimiento en la demanda de tequila, hizo que en la década de 1983 a 1993 el cultivo de agave se extendiera en valles fértiles, en pendientes y suelos pedregosos del centro y sur de México (Valenzuela, 2003).

2.1.2 *Agave angustifolia* Haw.

El *Agave angustifolia* Haw. (Figura 2) tiene el rango de distribución más amplio de los agaves en América.



Figura 2. *Agave angustifolia* Haw.
Disponibile en: www.dasignsourcebotanicals.com

Crece de manera natural desde Costa Rica hasta Tamaulipas y el noroeste de Sonora, en las costas del Atlántico y el Pacífico, siendo el agave más común en Sonora y en el bosque denso cercano a la costa de Sinaloa. Se utiliza para la producción de los aguardientes: a) *mezcal* en Oaxaca y b) la única variedad permitida en la elaboración del *bacanora*, siempre que sea cultivada y procesada en el Estado de Sonora (Guillot *et al.*, 2008).

La planta presenta un tronco corto con hojas lanceoladas de 120 cm de longitud y 10 cm de ancho en la parte media, de color verde pálido a gris y borde blanco, generalmente son cóncavas en el haz y convexas en el envés. Cada hoja lleva una espina terminal de unos 3 cm de longitud de color marrón oscuro. La inflorescencia tiene de 3 a 5 m de altura con flores amarillo-verdosas que se disponen en umbelas (Valenzuela, 2003). Este agave requiere de una planta nodriza que le proporcione sombra en sus primeras etapas de desarrollo, por lo que se encuentra asociado a árboles que le puedan proporcionar sombra y refugio. Tienen un tipo de reproducción semélparo o monocárpico, es decir, las plantas mueren después de reproducirse (García, 2007).

2.1.3 Inulina

Wesche en el 2000 (citado por Bautista *et al.*, 2001), reportó que algunas especies de plantas, entre ellas el agave, tienen como reserva de carbohidratos, polímeros de fructosa (fructanos), en lugar de glucosa, tales como la inulina (Figura 3). La inulina, es un polímero lineal que está compuesto de cadenas de fructosa unidas por enlaces glucosídicos $\beta(2\rightarrow1)$ y termina con una molécula de sacarosa (Wei *et al.*, 2006).

La inulina puede ser convertida directamente en etanol, para la producción de bebidas alcohólicas, pero también posee un gran potencial como fibra alimentaria, puesto que simula el crecimiento y la actividad de ciertas bacterias benéficas en el colon y mejora la digestión y la salud del organismo hospedador, de hecho, se ha empezado a utilizar ampliamente en el procesamiento de diferentes alimentos, atribuyéndoles características nutricionales (McKevith, 2004).

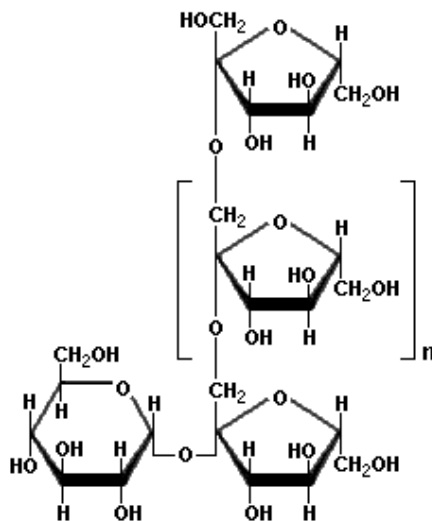


Figura 3. Molécula de inulina
 Disponible en: www.scientificpsychic.com

El 24% del total de polisacáridos presentes en el agave son inulina, que se encuentra almacenada generalmente en las células de las raíces, partes aéreas y principalmente, en las de la piña o roseta (Bautista *et al.*, 2001).

2.1.4 Procesos de extracción de la inulina.

La inulina del agave se obtiene por medio de la operación de lixiviación o percolación, que es una extracción solido-líquido, la cual consiste en separar sustancias solubles que hacen parte de un sólido por medio de un disolvente (CGUT, 2001). En este sentido, el caso de la extracción de sustancias de tejidos vegetales, los mecanismos difusivos juegan un papel preponderante. La facilidad para que el disolvente difunda a través del material (tejido vegetal) depende de diversas variables y en particular de la estructura del material. El proceso usualmente puede ser estimado mediante la difusión efectiva ($\delta_{ef.}$) a través de la segunda ley de difusión de Fick.

La velocidad de extracción depende de la concentración de la sustancia que se difunde, como una función del espacio y el tiempo en fenómenos que ocurren en régimen transitorio (Grasso *et al*, 2007); lo que quiere decir que tanto el flujo como la concentración varían con el tiempo. Adicionalmente, puede incrementarse por un aumento de la permeabilidad de la estructura del tejido y también debido al grado de integridad de las estructuras celulares, entre mayor sea, menor será la difusión a través de la célula.

Adicionalmente, la extracción también va a depender de la superficie de contacto que se logra con la reducción de tamaño del material y la deformación (colapso) de las estructuras celulares (Varzakas *et al*, 2005). Los tejidos vegetales en general se ven afectados por los procesos a los que son sometidos, puesto que están formados por estructuras celulares altamente organizadas, que condicionan su funcionalidad (Gumeta, 2009).

Por tal razón es necesario conocer la morfoestructura de ellas para diseñar procesos altamente eficientes, en este caso es necesario conocer la arquitectura celular en los distintos tejidos del agave, para lograr una extracción eficiente de la inulina.

2.2. Morfoestructura

La morfología se encarga del estudio de la forma y estructura de un organismo o sistema, es entonces, una ciencia biológica que trata de la forma y transformaciones de los seres vivos. Sin embargo, estos pueden presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición. En este sentido, el avance en las ciencias computacionales ha hecho posible la medición de las formas y de estructuras. Este aspecto se

conoce como “morfometría”; de acuerdo a las medidas y forma que presentan los distintos objetos, se puede lograr su clasificación e identificación (Centeno, 2008). Otra definición se refiere a: “La configuración arquitectónica de un objeto que condiciona su apariencia física, como fruto de la ordenación de sus elementos estructurales y de sus rasgos morfológicos fundamentales” (Anónimo, 2009).

En este sentido, las células de las plantas varían ampliamente en cuanto a tipo, forma, tamaño y arreglo o configuración (Greulach, 1973). Las plantas vasculares, como es el caso del agave, están compuestas por distintos tipos de células que están asociadas estructuralmente de distintas maneras formando *tejidos*; tan es así, que las diferentes partes de un mismo órgano pueden variar considerablemente. Es posible reconocer además, unidades más grandes de tejidos que muestran una continuidad topográfica (arquitectónica), una similitud fisiológica o ambas, a las que se les llama *sistema de tejidos*. Por consiguiente la complejidad estructural del cuerpo de una planta, resulta de la variación en la forma y en la función de las células y también de las diferentes maneras de combinarse en tejidos y sistemas de tejidos (Esau, 1967; Centeno, 2008).

Los principales órganos de las plantas son la raíz, el tallo y las hojas, que a su vez están compuestos por tres sistemas de tejidos: dérmico, fundamental y vascular, que presentan diferentes tipos de células (Greulach, 1973), como lo muestra la *Tabla 1*.

En el Agave, así como también en otras especies de plantas monocotiledóneas (*Yucca*, *Phormium*, *Sansevieria*), las hojas presentan grandes cantidades de esclerénquima y colénquima (parénquima en empalizada), como se muestra en la Figura 4. En el Agave, las hojas están constituidas del exterior hacia el interior, por una capa fina de cera llamada cutícula que tiene la función de evitar pérdidas de agua en la hoja, debajo de ella, se encuentra la epidermis, luego el parénquima en empalizada, y el mesófilo de la hoja, el cual está constituido por fibras del

esclerénquima agrupadas en forma de herradura, por haces vasculares constituidos por fibras del xilema y fibras del floema y por parénquima (Gumeta, 2009).

Tejidos y Regiones	Tipo de Células												
	Meristemáticas	Parénquima	Colénquima	Epidérmicas	Protectoras	Endodérmicas	Cribosas	Compañía	Fibras	Escrereidas	Traqueidas	Elementos tubulares	Cordho
Dérmico													
Epidermis				x	x								
Felodermo		x											x
Vascular													
Xilema		x							x		x	x	
Floema		x					x	x	x				
Fundamental													
Cortex		x	x						x	x			
Endodermis		x				x							
Periciclo		x											
Médula		x											
Mesófilo		x								x			
Meristemático													
Meristemo apical	x												
Cambium vascular	x												
Felógeno	x												

Tabla 1. Principales tipos de células presentes en varios sistemas de tejidos y regiones vasculares de las plantas. Tomado de: Greulich, 1973

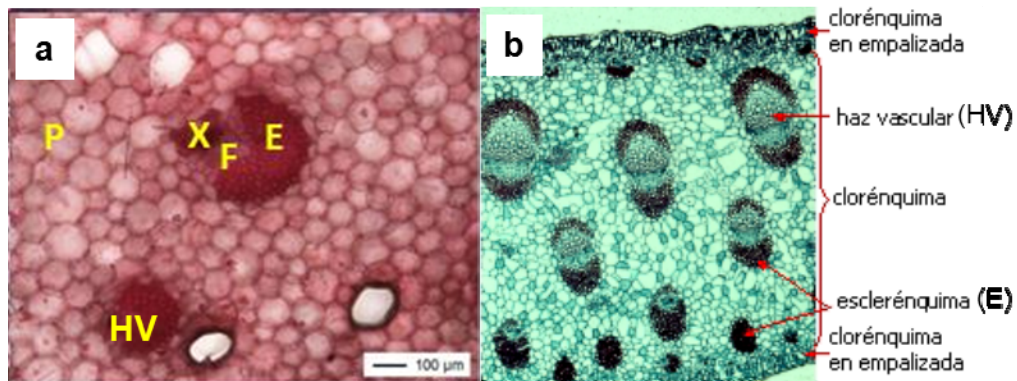


Figura 4. Cortes transversales de: a) *Agave atrovirens* Karw y b) *Yucca* sp. Adaptado de: a) Gumeta, 2009; b) Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema21/index21.htm>

Sin embargo, la anatomía de las plantas depende no solo de su clasificación, sino que también va muy ligada a otros aspectos como lo es el tipo de fotosíntesis que realiza y a las modificaciones que realizan relacionadas con el ambiente (Gonzalez y Arbo, 2009).

2.3 Tratamiento digital de Imágenes (TDI).

El tratamiento digital de imágenes se refiere a un grupo de procedimientos por los cuales la información contenida en una imagen guardada digitalmente puede ser manipulada para: recuperarla, optimizarla, mejorar su aspecto visual o las características estructurales y luego proceder a la cuantificación de los parámetros de interés (Lira, 2002; González y Woods, 2008). El TDI se lleva a cabo por medio de diversas tareas, entre las que destacan tres fundamentales:

- ***Adquisición o captura de la imagen:*** en ésta se obtiene la imagen como objeto de estudio, aquí se utilizan cámaras, videocámaras o scanner, y frecuentemente se utiliza la ayuda de un sistema amplificador para lograr la captura de la imagen.
- ***Procesamiento de la imagen:*** en esta etapa se lleva la imagen a una computadora en dónde se almacenará digitalmente y manipulará de tal forma, que se deje en condiciones que permitan realizar la extracción del objeto de estudio. Aquí se llevan a cabo entre otros procesos, los de binarización y segmentación de las imágenes, que consisten básicamente en cambiar la imagen a una escala en blanco y negro (2 bits, es decir binarizada) para asignar a cada pixel un valor especial, para extraer el objeto de interés del resto de la imagen.

- **Análisis de la imagen:** Se hace uso de software específico que entrega datos que dependen de las características y alcances del mismo. El tener una imagen de calidad, permite la extracción de una buena cantidad de datos y por ende, precisión en los resultados.

La finalidad del TDI es la cuantificación de las propiedades de los objetos presentes en éstas, para lo cual es necesario entender los elementos que la componen, su origen y su naturaleza (Lira, 2002); en el siguiente párrafo, se revisan algunos de los parámetros que son de interés para el trabajo que se desarrolló.

2.3.1 Descriptores morfométricos

En el TDI se pueden evaluar diferentes características morfométricas. Sin embargo, no todos los cuerpos son simétricos, la descripción de éstos se complica y en numerosas ocasiones se vuelve subjetiva. Por tal razón, la estimación de la forma de los cuerpos irregulares se hace a través de descriptores morfométricos, los cuales tienen la finalidad de cuantificar y describir de la manera más objetiva posible, dichos objetos (Isaza *et al.* 2006) Los descriptores se pueden dividir en tres grupos:

- a) **Dimensionalidad:** Son aquellos que pueden medir a través de software específicos diversas características tales como área, perímetro diámetro de Feret y longitud máxima, entre otros. Todos ellos, tienen unidades de medición (mm, mm² etc.).
- b) **Forma:** Son aquellos que describen la forma del objeto estudiado, asociándolo a una figura de geométrica euclidiana aproximada, entre estos

están los factores de forma circular y elíptica, excentricidad, compactación (compacidad), esfericidad y convexidad.

- c) **Regularidad:** Son aquellos que proporcionan la información necesaria para describir la regularidad o no de un objeto; en este sentido, se hace uso de algunos conceptos de la dimensión fractal tales como la de perímetro, área y textura.

A continuación se definen algunos de los descriptores más utilizados (Aguilera, 1999; SPSS, 1999; Aguilera, 2003):

- **Área:** El área de un objeto es el número de píxeles (bajo cierta conectividad) que lo forman multiplicando por la escala a la cual se observa, es decir, el tamaño asociado al píxel.
- **Perímetro:** Depende de la conectividad de los píxeles que lo componen. Se pueden manejar dos conectividades, 4 y 8, las cuales se refieren al número de píxeles que rodean a un píxel. En conectividad 4, se cuenta el número de lados que tienen los píxeles del borde del objeto, mientras que en conectividad 8 se calcula la distancia entre los centros de tales píxeles.
- **Longitud máxima:** Es la distancia entre los dos puntos más alejados del objeto.
- **Compactación o compacidad:** Se evalúa a partir de los descriptores anteriores. Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$F_c = \frac{p^2}{4\pi A} \quad (1)$$

Donde: F_c es el factor de compacidad, A es el área y P es Perímetro.

- **Excentricidad o factor elíptico:** Es una medida de la elongación de un objeto, en donde L_M es la longitud de los píxeles más alejados entre sí y L_m es la longitud mínima perpendicular a L_M :

$$F_e = \frac{L_M}{L_m} \quad (2)$$

- **Factor de forma:** Es un factor que indica que tanto un objeto se circunscribe a un círculo. Es decir al valor de 1 se refiere a un círculo perfecto.

$$F_f = \frac{4 \cdot A}{2 \cdot \pi \cdot R_d} \quad (3)$$

Donde: A es el área, F_f es el factor de forma y R_d es Radio del objeto medido.

- **Textura:** es la manifestación espacial organizada de un arreglo local de tonos (píxeles) de la imagen.

La medición de formas ha obligado a introducir conceptos nuevos que van más allá de los conceptos geométricos clásicos. Los conceptos de dimensión fractal o dimensión fraccionaria han resultado ser una herramienta útil para la medición de la regularidad o irregularidad de un objeto (Jiménez, 2005), tema que a continuación se describe.

2.4 Dimensión Fractal

La palabra “fractal” proviene del latín *fractus*, o del griego “*frangere*” que significa “fragmentado”, “fracturado”, o simplemente “roto” o “quebrado”, muy apropiado para objetos cuya dimensión es fraccionaria. El término fue acuñado por Benoît Mandelbrot en 1977 en su libro “*The Fractal Geometry of Nature*” (citado por Braña, 2003). Al estudio de los objetos fractales se le conoce, generalmente, como geometría fractal.

Se entiende que la naturaleza es irregular, en ella no existen líneas rectas, ni planos, ni poliedros como los objetos descritos por la geometría euclidiana, es más, la realidad y la geometría euclidiana muestran que por ejemplo, una figura con bordes rectos o redondeados tiene una longitud menor que otra equivalente pero llena de rugosidades (Alfaro *et al.*, 2001).

La Geometría fractal es un conjunto de estructuras irregulares y complejas descritas a través de algoritmos matemáticos y computacionales; los cuales reemplazan a los puntos, rectas, circunferencias y demás figuras provenientes de la matemática tradicional (Chanona *et al.*, 2001).

La dimensión fractal se utiliza como medida de la irregularidad de muchos procesos físicos, permite cuantificar el grado de accidentalidad o tortuosidad de un objeto, caracteriza la variación de las propiedades geométricas fractales con el tamaño y su magnitud está relacionada con la morfología (Jiménez, 2005).

Empleando este concepto, el grado de irregularidad puede ser estimado con la dimensión fractal (DF). La mayoría de los métodos para medir la dimensión fractal son empíricos y en general dependen de la disciplina de trabajo, los objetos buscados y el tipo de datos analizados (Isaza *et al.*, 2006). En la geometría

Euclidiana un punto tiene una dimensión cero, una línea una dimensión de uno, un área de dos, un volumen de tres, es decir:

$$P = K_1 * L^1 \dots\dots(4)$$

$$A = K_2 * L^2 \dots\dots(5)$$

$$V = K_3 * L^3 \dots\dots(6)$$

Dónde L es la longitud característica y P, A y V el perímetro, área y volumen respectivamente con dimensiones 1, 2 y 3. Por ejemplo si se triplicara L, el perímetro, el área y el volumen aumentarán a razón de 3^1 , 3^2 y 3^3 respectivamente.

Esto también se puede hacer a través de una relación logarítmica en un gráfico de Log P, Log A o Log V vs. Log L, obteniendo líneas rectas donde las pendientes corresponden a la dimensión fractal.

En la dimensión fractal se puede trabajar con las dimensiones fractales de perímetro, área y volumen. Donde la dimensión fractal de perímetro o contorno (Df_p) mide el grado de irregularidad de contornos o frontera; la de área (Df_a) se define por la relación entre área proyectada y la longitud característica del objeto; y finalmente la de volumen (Df_v) por la relación de potencia entre el volumen y su longitud característica.

2.4.1 Propiedades de los fractales

Los fractales se identifican por varias características, destacado las siguientes (Jiménez, 2005):

- En su aparente irregularidad presentan la regularidad de ser autosimilares independientemente de la escala de observación; es decir, que si se toma una parte del fractal y se amplia, el objeto resultante será morfológicamente semejante al objeto original.
- No tienen una longitud, área y volumen definidos porque esas mediciones van a tomar valores diferentes de acuerdo a la escala de observación.
- No se puede alcanzar de forma efectiva con el cálculo diferencial o integral, solo se pueden hacer algunas predicciones lógicas a través de simulaciones en computador y modelos de redes.
- No tienen una dimensión entera como los objetos euclidianos (0, 1, 2 ó 3) y su complejidad se evalúa a través de la dimensión fractal.

2.4.2 Métodos de medición de la dimensión fractal

Existen varios métodos para estimar la dimensión fractal de un objeto, la selección de éste dependerá de lo que se desee realizar y el objetivo a alcanzar. Entre los métodos más utilizados se encuentran el conteo de cajas y las relaciones área-perímetro.

- **Conteo de cajas:** Se utiliza para medir la dimensión fractal de curvaturas y se fundamenta en hallar el número de pixeles (cajas) requeridos para

ocupar la imagen como se muestra en la Figura 4. Los píxeles tienen una dimensión D y se van cambiando progresivamente por otras más pequeñas, siguiendo factor de escala, hasta lograr medir la imagen.

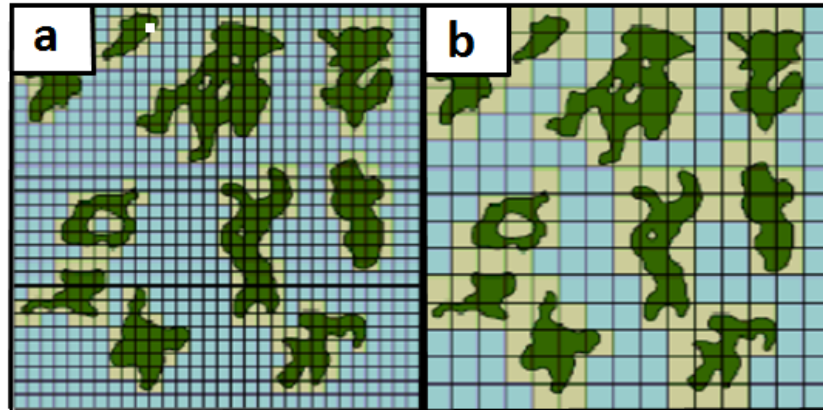


Figura 5. Método de conteo de cajas para la evaluación de la dimensión fractal, en el que los objetos son medidos a diferentes escalas. **a)** área dividida en 35 x 35 **b)** área dividida en 15 x 15
(Tomado de: Kenkel y Walker, 1996)

- **Métodos que involucran relaciones área-perímetro:** Se utilizan para medir la dimensión fractal de uno o varios objetos que se encuentran distribuidos como islas. Permite estudiar la estructura de las formas planas o el área proyectada de los objetos tridimensionales. Este método relaciona las medidas de área, longitud característica y perímetro. En la (D_{fp}) , se separa el contorno las imágenes de interés y éste se evalúa por medio de una relación área-perímetro como la ecuación propuesta por Olsen *et al.* (1993):

$$D_p = 2 \cdot \left(\frac{\ln \frac{P}{4}}{\ln A} \right) \dots (7)$$

Dónde P es perímetro y A es área del objeto medido y ambos valores deben ser expresados en píxeles. La figura 6 esquematiza una serie de objetos cuyo Df_p se encuentra entre 1.0 y 1.5.

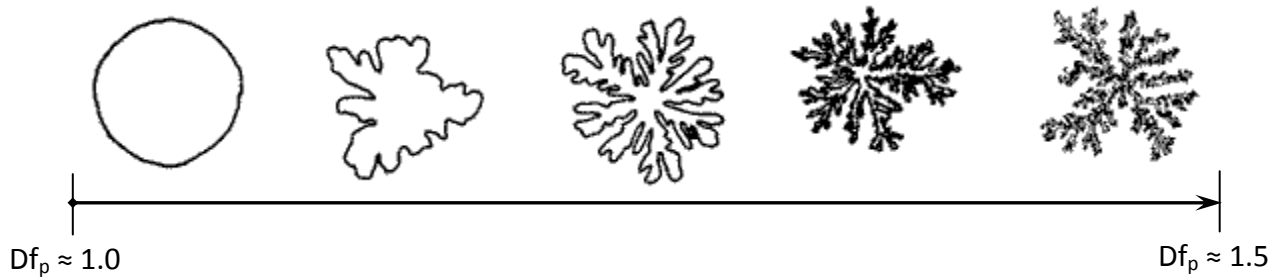


Figura 6. Ejemplo de objetos cuya Df_C se encuentra entre 1 y 1.5
(Adaptado de: Gumeta, 2009)

La (Df_a) cuantifica la proporción de un plano que ocupa el objeto de interés. También se obtiene mediante el método de conteo de cajas o bien a través de una relación área-perímetro, tal como la reportada por Voss (1988).

$$D_A = \left(\frac{\ln A}{\ln LM} \right) \dots (8)$$

Donde A es el área y LM es la longitud máxima del objeto medido, ambas expresadas en píxeles. La figura 7 esquematiza una serie de objetos cuyo DF_A se encuentra entre 2.0 y 1.5.

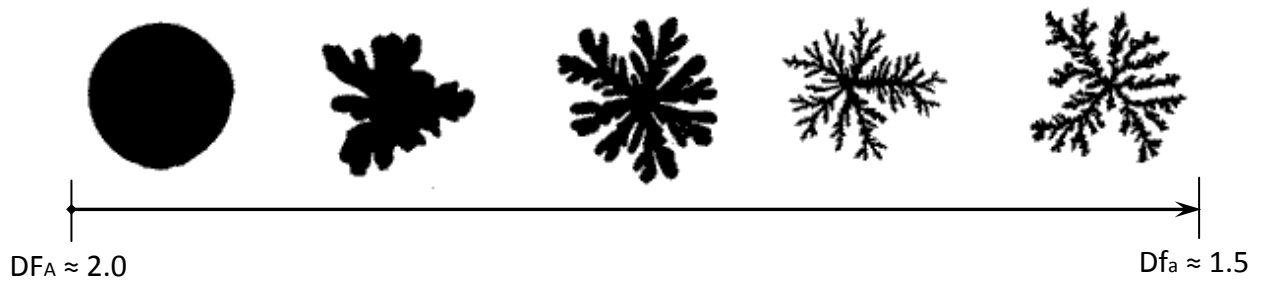


Figura 7. Ejemplo de objetos cuya Df_a se encuentra entre 1.5 y 2.0
(Adaptado de: Gumeta, 2009)

2.4.3 Antecedentes de la caracterización estructural de Agave por medio de TDI y conceptos de dimensión fractal.

En la literatura disponible, son muy escasos los trabajos referentes a estudios morfoestructurales de agave, utilizando TDI y conceptos de dimensión fractal. En este sentido, Arroyo *et al.*, en el 2005 reportaron un estudio comparativo de las estructuras epidérmicas de *A. tequilana*, *A. americana* y *A. angustifolia*, con el propósito de identificar las diferentes microestructura foliares utilizando MO y MEB.

Con base en sus observaciones, estos autores reportaron que las especies estudiadas tenían una epidermis monoestratificada cubierta por ceras, con estomas en ambas caras de la hoja con células epidérmicas ordinarias sin plastos. El tamaño del complejo estomático era variable, siendo los más grandes aquellos presentes en *A. americana* y los más pequeños los de *A. tequilana*, aunque en una menor densidad. En las hojas del cogollo de todas las especies estudiadas, existía en la parte apical una mayor densidad de estomas; mientras que en la adaxial observaron que las ceras epicuticulares presentes tenían una morfología muy similar entre las tres especies, es decir, láminas delgadas y erectas sin organización aparente que cubrían incluso el interior de los poros del complejo estomático.

Por otro lado, un estudio reciente (Gumeta, 2009) reveló la influencia que tenía el arreglo estructural del tejido de *Agave atrovirens* Karw en los fenómenos de transferencia de masa, encogimiento y deformación ocurridos durante el proceso de deshidratación convectiva; de igual manera evaluó la microestructura de la celulosa obtenida en un proceso organo-solv. Este autor, utilizó TDI para obtener diferentes parámetros morfométricos como área proyectada (AP) longitud máxima (LM) y factor de forma (Ff), así como la dimensión fractal de contorno (Df_c).

Los resultados que obtuvo a partir de estos parámetros demostraron que los cambios en encogimiento y forma dependían del arreglo estructural que tuviesen los cortes de Agave y que además, dicho arreglo afectaba significativamente la eficiencia de los procesos de secado y la extracción de celulosa; concluyendo que este tipo de factores deberán ser tomados en cuenta como criterios importantes en el diseño de procesos en estas áreas de estudio.

III. JUSTIFICACIÓN

Con el fin de diversificar la utilización al Agave, se están implementando diversos procesos industriales para así obtener productos de importancia comercial; entre los que se encuentra la extracción de fructanos, particularmente inulina (Martínez *et al.*, 2005). Los procesos de extracción sólido-líquido, como sería el caso de la percolación, tienen gran importancia en numerosos procesos industriales. De hecho, una cantidad importante de compuestos orgánicos naturales se separan de sus estructuras originales mediante esta operación, como es el caso de la inulina.

Para que los procesos de extracción sólido-líquido sean eficientes, resulta de vital importancia conocer las propiedades físicas del material del que se parte; particularmente si se trata de estructuras vegetales. La morfología de las estructuras vegetales en general, son de gran complejidad ya que dependen del lugar en donde se ubiquen en la planta, son altamente organizadas y cumplen funciones específicas (Arroyo *et al.*, 2005). Tales estructuras están involucradas directamente con los procesos de extracción, ya que de éstas depende o no, la facilidad y eficiencia con la que una cierta sustancia de interés pueda ser extraída. De hecho, la morfo-estructura de células, tejidos y órganos vegetales en las que se encuentre confinada la sustancia de interés, es la principal resistencia que se debe vencer para su extracción. Con el objeto de diseñar un proceso eficiente de extracción, resulta fundamental conocer la estructura-función de este tipo de materiales.

Una de las técnicas que permite recolectar una cantidad importante de información sobre la morfo-estructura de los materiales, y los posibles cambios que sufren cuando éstos son sometidos a diferentes operaciones, es la Imagenología; permitiendo de manera adicional, conocer la relación estructura-función.

El desarrollo tecnológico que se ha venido dando en los últimos años en materia de sistemas computacionales, ha permitido desarrollar significativamente a la imagenología en diversos campos del conocimiento, proveyendo soluciones a problemas particulares; entre los cuales se encuentra el tratamiento de imágenes digitales (TDI), (Jiménez, 2005).

El TDI, de manera conjunta a la morfometría, el desarrollo de los sistemas de visión y captura de imágenes (videomicroscopía) y la utilización de nuevos conceptos de geometría no euclidiana (geometría fractal) han permitido que la imagenología se esté aplicando exitosamente para el desarrollo de procesos ingenieriles, así como en la toma de decisiones (Jiménez, 2005; Russ, 2005). La combinación de la adquisición de imágenes en tiempo real, el procesamiento y la cuantificación de las características más relevantes están siendo fundamentales para generar un acercamiento al estudio de las microestructuras.

Sin embargo, poco se conoce acerca de la morfo - estructura de hojas y tallo del agave de las variedades *A. tequilana* y *A. angustifolia* (incluyendo su morfometría y geometría) cuando son seccionadas de distinta manera (transversal, tangencial y radial). Este tipo de estudios podrían servir para sentar bases acerca de las implicaciones que pudiesen tener los arreglos microestructurales y su organización (es decir su morfoestructura) en algunas operaciones unitarias involucradas en los procesos de extracción de inulina; con lo que finalmente, se estarían implementando procesos agroindustriales de mayor eficiencia.

IV. HIPÓTESIS

Los parámetros morfométricos y de dimensión fractal de las células y tejidos evidenciarán las diferencias estructurales de las dos especies de agave estudiadas (*Agave tequilana* Weber y *Agave angustifolia* Haw.).

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer las posibles diferencias morfo - estructurales de las células y tejidos del tallo y de las hojas (pencas) de *Agave tequilana* Weber y *Agave angustifolia* Haw producidas en el Estado de Morelos utilizando para ello, Tratamiento Digital de Imágenes acoplada a microscopía óptica (TDI-MO) y conceptos de Dimensión Fractal (DF).

5.2 Objetivos específicos

- Realizar cortes del tallo y hojas de plantas de *A. tequilana* Weber y *A. angustifolia* Haw producidas en el Estado de Morelos e identificar las principales estructuras mediante técnicas histológicas.
- Describir el arreglo microestructural de células y tejidos de las especies de agaves mencionadas, en el tallo y hojas mediante observaciones con microscopía óptica (MO).

- Caracterizar la morfometría de las células del tallo y las hojas de las especies de agave antes señaladas, utilizando tratamiento digital de imágenes (TDI).
- Determinar los valores de dimensión fractal de la morfo estructura celular, tanto en el tallo como en las hojas de tales especies.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Materiales.

6.1.1 Material Biológico

Las muestras de agave tanto del *Agave tequilana* y el *Agave angustifolia* provinieron del “Centro de Acopio de Agaveros del Estado de Morelos”, (México). Las plantas tenían una edad de 5 años y se encontraban en un estado de maduración adecuado para ser procesadas. La figura 8 ejemplifica los tallos (rosetas) y pencas de donde se obtuvieron las muestras para realizar los cortes.

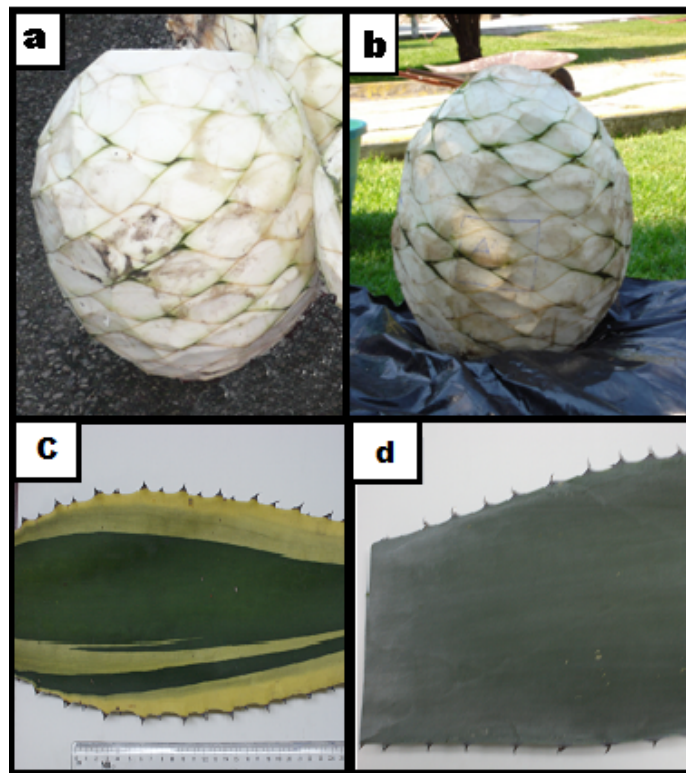


Figura 8. Rosetas y pencas de Agave utilizada como material biológico. a) y c) *Agave angustifolia* Haw. b) y d) *Agave tequilana* Weber.

6.1.2 Material de laboratorio

- Cristalería de uso común del laboratorio
- Reactivos para las tinciones: FAA (Formol Acetato Alcohólico) este es preparado con 5% Formaldehído, 10% Ácido acético, 35% Agua y 50% Alcohol, Safranina "O" al 50%, Verde rápido FCF al 90% y Alcohol concentraciones crecientes de 10 en 10 de 30% a 100%
- Parafina
- Xilol
- Bálsamo de Canadá o resina sintética.
- Sistema métrico de referencia (Regla graduada en mm y micrómetro en μm).
- Cassettes para embeber tejidos de Leica modelos M490-10, M490-12

6.2. Equipos

6.2.1 Equipo de laboratorio

- Microtomo rotatorio Leica RM 2125
- Baño de María Leica HI 1210
- Horno con vacío marca VWR S/P Scientific Products (USA), Modelo 1450M.
- Microscopio óptico Nikon eclipse 80i, con sistema de epi-fluorescencia, iluminación (diascópica y episcópica) de xenón óptico; acoplado mediante interfase flashbus a Cámara digital Dage-MTI 3CCD (Michigan, USA) para la captura de imágenes.

- Microscopio estereoscópico, Nikon ZM1500, con sistema de iluminación de xenón óptico acoplado mediante interfase flashbus a Cámara digital Dage-MTI 3CCD (Michigan, USA) para la captura de imágenes.

6.2.2 Equipo de cómputo

- Computadora PC genérica, procesador Intel Core 2 Duo de 3.0 GHZ, 2GB de memoria RAM, tarjeta de video en color verdadero de alta definición.

6.2.3 Software

- Excel XP de Office V.2007, (Microsoft Corporation, USA).
- ImageJ V1.34 (National Institute of Health, USA), con los siguientes “plugins”: a) Fractal box counting; b) Frac lac 2.3-Plan a Sliding Box Lacunarity Scan y c) Surface Plotter 3D.
- MetaMorph V.7.5 (Molecular devices MDS, USA).
- Corel Photo Paint del Corel Draw V11.5 (Corel Draw Corporation, USA)
- Sigma Scan Pro V5.0 (SPSS, USA).
- Minitab V.15 (Minitab Inc, USA)

6.3 Metodología

En la Figura 9 se muestra un diagrama general de la metodología del trabajo; la cual se describe en los párrafos subsecuentes.

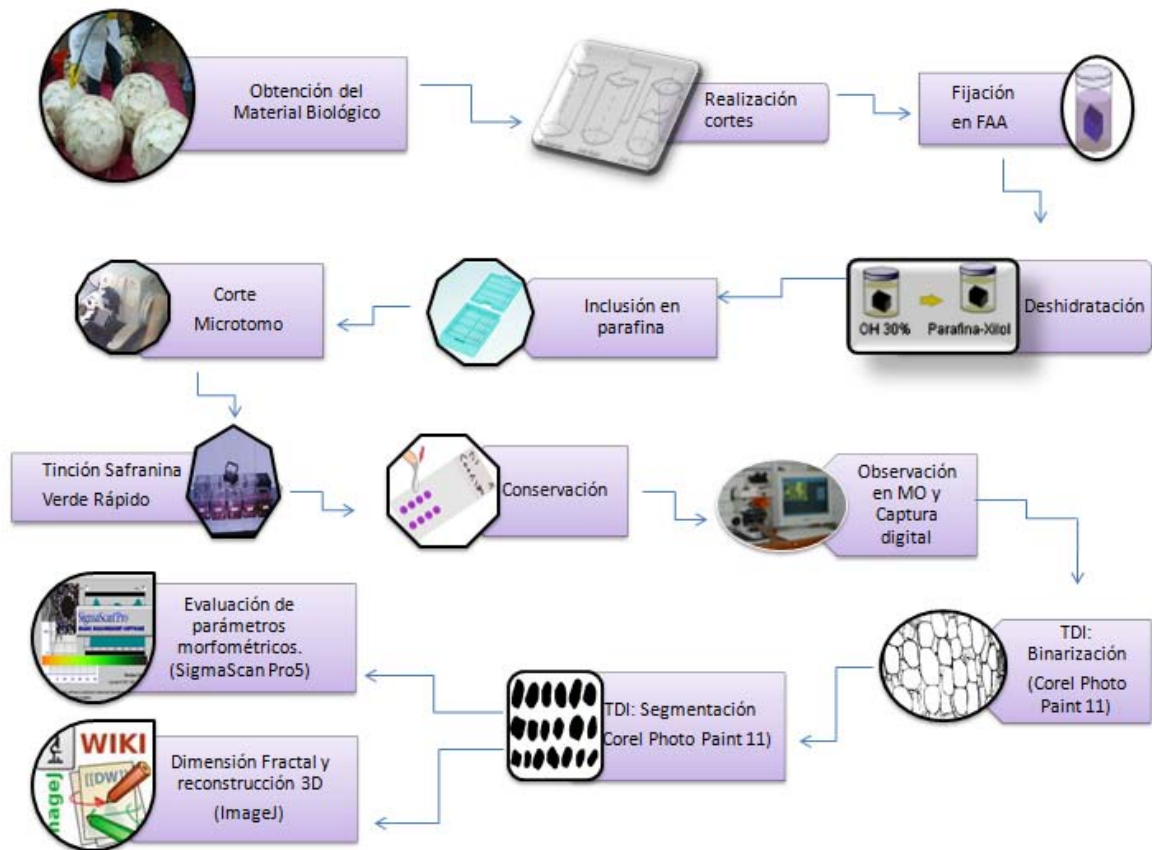


Figura 9. Diagrama de flujo del trabajo experimental

6.3.1 Tratamiento del material vegetal

Para el análisis de los tejidos vegetales se llevaron a cabo seis tareas fundamentales: Obtención del tejido, fijación, corte, coloración y conservación de acuerdo a lo propuesto por Estrada *et al.*, 1982.

6.3.1.1 Obtención del tejido

El proceso histológico se inició con la obtención del tejido, para este caso se tomaron muestras de las hojas y el tallo de ambas especies y se realizaron cortes transversales, radiales y tangenciales tal y como se observa en la Figura 10, con

un tamaño aproximado de 0.5 x 1 cm. A tales cortes se les dio el siguiente tratamiento:

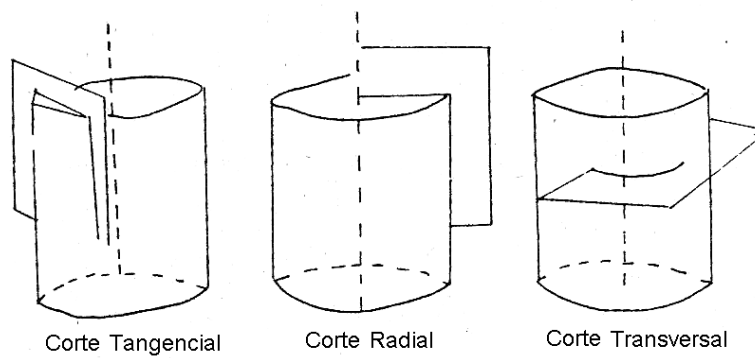


Figura 10. Forma de realización de los cortes tanto en el tallo como en las hojas.
Tomado de: Carvajal (1996).

6.3.1.2 Fijación

La fijación de las muestras se realizó con el objeto de preservar sus características morfológicas y microestructurales lo más parecidas posibles a las que poseía en estado vivo (Estrada *et al.*, 1982). Para ello, se utilizó el reactivo FAA para los cortes en el que permanecieron durante 48 horas.

6.3.1.3 Inclusión

Para este procedimiento, primero se realizó una deshidratación del tejido en soluciones hidro-etanólicas crecientes de 30 a 100% (v/v). Las muestras se dejaron por espacio de 2 horas en las concentraciones de 30 a 60%; durante 12 horas las muestras correspondientes al alcohol al 70% con el fin de que éste penetrara completamente las estructuras y finalmente, en las concentraciones de 80 a 100% se mantuvieron por 2 horas en cada una de ellas (Sandoval, 2005).

Una vez terminada estas series se transfirió la muestra a una mezcla con xilol que es una sustancia líquida miscible tanto con el alcohol como con la parafina, en concentraciones de alcohol-xilol (1:1) durante 2 horas y luego a parafina-xilol (1:1) durante 12 horas con el fin de que penetrara en el tejido.

Finalmente se transfirió el tejido a parafina líquida, cubriendo completamente la muestra y colocándola según la orientación deseada de corte, durante 24 horas. Tanto la mezcla parafina-xilol como la inclusión en parafina se realizaron en una estufa regulada a 60°C para favorecer la impregnación. Una vez cumplido el tiempo, las muestras se dejaron solidificar a temperatura ambiente (González y Arbo, 2009).

6.3.1.4 Corte

Se procedió a realizar los cortes en serie en los bloques de parafina, utilizando para ello el micrótopo; se hicieron cortes de 20 µm colocando los bloques en el porta-molde del microtopo, teniendo el cuidado de dejar la superficie que se corta, paralela al filo de la navaja. A continuación, los cortes se colocaron en los portaobjetos y se llevaron a baño de maría por 30 s con el fin de estirar el tejido y luego se pasaron a una estufa a 60°C por 15 min para fijarlo completamente al portaobjetos y después realizar su desparafinación.

Posteriormente se realizó la hidratación del tejido, para lo cual se lavaron las muestras en xilol durante 20 min seguida de una mezcla de alcohol-xilol (1:1 v/v) durante 15 min y luego se sometió el tejido a una serie decreciente de soluciones hidro-alcohólicas desde 100 hasta 50% (v/v) durante 10 min cada lavado (Nunn, 1976).

6.3.1.5 Tinciones

Para observar las diferentes estructuras en los tejidos, se realizaron tinciones con diferentes soluciones. Se utilizó la técnica de tinción Safranina “O”-Verde rápido FCF para tejidos incluidos en parafina, para observar paredes celulares lignificadas, colénquima, *cambium* vascular y parénquima (Carvajal, 1996). Para esto se colocaron los portaobjetos en cajas petri y se agregó una cantidad suficiente de la Safranina “O” al 50% para cubrir totalmente la muestra; el portaobjetos y el colorante se dejaron por 30 min en oscuridad con el fin conseguir una mejor impregnación del colorante. Adicionalmente, para evitar que la muestra no se fisurara, se le adicionaba etanol al 50% para hidratada.

Luego se lavó con esta misma solución para retirar las impurezas y se transfirió a alcohol al 70% y al 90% durante 10 min. Al término la muestra se pasó de nuevo a una caja petri donde se le adicionó Verde Rápido FCF al 90% hasta cubrirla totalmente; la muestra se dejó así 20 min. Luego se lavó con alcohol al 90% para eliminar impurezas y se transfirió a etanol al 90 y 100% durante 10 min. y por ultimo a la mezcla de xilol-alcohol durante 15 min.

6.3.1.6 Conservación

Se utilizó bálsamo de Canadá para cubrir las muestras deshidratadas y teñidas; se les colocó un cubreobjetos y finalmente se etiquetaron para su posterior observación al microscopio. (González y Arbo, 2009).

6.3.2 Tratamiento digital de imágenes

6.3.2.1 Observación y captura de imágenes

Las observaciones se realizaron en campo claro en el microscopio óptico (MO), utilizando luz diascópica de xenón óptico, utilizando los objetivos 4X y 10X; también se usó epi-fluorescencia con el filtro w-blue con el fin de determinar la presencia de fluorocromos. Una vez seleccionado el campo de interés, se procedió a la captura de las imágenes de las diversas estructuras utilizando para ello la videocámara digital del microscopio conectada mediante una interfaz a un computador y se recurrió al software MetaMorph V.7.5.

Las imágenes capturadas fueron almacenadas digitalmente (1280 x 960 pixeles, 300 ppp) sin compresión, con un formato *.tiff ("Tagged Image File Format" por sus siglas en ingles) en el computador hasta su procesamiento con TDI.

6.3.2.2 Procesamiento de imágenes

El procesamiento de imágenes consistió en la modificación de la imagen a escala de grises, ajuste de características (brillo, contraste etc.) y de una segmentación. Para ello, las imágenes de MO se procesaron digitalmente utilizando el procedimiento reportado por Yoshioka *et al.*, (2007) y adaptado por Valenzuela *et al.*, (2007).

Primero, las imágenes fueron estandarizadas con la ayuda del programa Corel PhotoPaint V11.5 (Corel Co., USA); para ello, se convirtieron a escala de grises de 8 bits y un formato *.bmp ("Bits map protocol", por sus siglas en ingles) y se les ajustó el brillo, contraste e intensidad. A continuación se seleccionó el objeto de interés de forma manual con la herramienta "varita mágica" y extrajo del resto de la imagen, para colocarla en una nueva carpeta, de tal manera que quedara como

un objeto aislado. Estas nuevas imágenes fueron binarizadas (2 bits) mediante la ayuda del filtro “Threshold” y guardadas en un formato *.bmp con una resolución de 300 ppp para la posterior medición de las características morfométricas de interés, así como la evaluación de la DF. En caso de ser necesario se perfeccionó manualmente la imagen con el fin de eliminar los pixeles de aquellas partes que no correspondían al perfil de ésta.

6.3.2.3 Evaluación de los parámetros morfométricos

Los objetos segmentados se procesaron con el programa Sigma Scan Pro 5, con el que se determinaron los siguientes descriptores morfométricos: área proyectada (A), Longitud máxima (LM), perímetro (Pm), factor de compactación (Fc) y factor de forma (Ff).

6.3.2.4 Análisis de la dimensión fractal

La dimensiones fractales de perímetro (Df_p) se obtuvo con el plugin “Fractal box counting”; para ello, a las imágenes binarizadas se les aplicó la herramienta “bordes” del Corel PhotoPaint V.11.5 previo a la determinación de la Df_p . Finalmente la de área (Df_a) se calculó con el “Frac lac 2.3-Plan a Sliding Box Lacunarity Scan” del software Image J V.1.34. Este plugin se aplicó a las imágenes que previamente fueron rellenadas con la herramienta “relleno” del Corel PhotoPaint V.11.5.

6.3.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de ANOVA para evaluar el efecto que tienen los diferentes tipos de corte (tangenciales, transversal y radiales) y el origen de la muestra (tallo

y hoja de las plantas) en los diferentes descriptores morfométricos (adimensionales y dimensionales). Adicionalmente se realizaron histogramas y pruebas de normalidad para encontrar el error en las mediciones y el tamaño de la muestra a evaluar con una certeza del 95%. Para ello se utilizó el programa Minitab V.15.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Arreglo microestructural

En la Figura 11 se muestra una galería de imágenes correspondiente a las fotomicrografías capturadas en el estereomicroscopio del envés de las hojas. En estas es posible observar las diferencias para las especies *A. angustifolia* Haw y *A. tequilana* Weber, en cuanto a la cantidad de estomas (Figura 11a y b), los haces vasculares (Figuras 11c y d) y el arreglo de las microfibrillas (Figuras 11e y f).

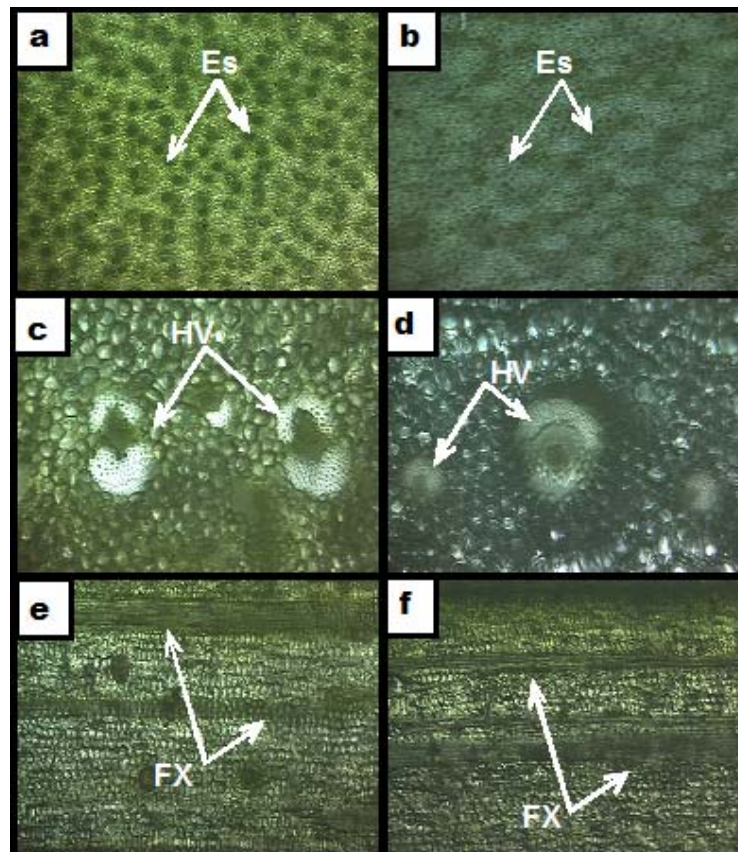


Figura 11. Micrografías (microscopio estereoscópico, 10X) de estomas (Es), Haces vasculares (HV) y Fibras del xilema (FX) para *Agave angustifolia* Haw (a, c y e) y de *Agave tequilana* Weber (b, d y f).

7.1.1 Hoja

En la Figura 12 se muestran imágenes fotomicrográficas de cortes transversales para las especies *A. angustifolia* Haw y *A. tequilana* Weber estudiadas. Se observó para ambas especies, que los cortes transversales presentaron un tejido heterogéneo con: a) grandes cantidades de fibras del esclerénquima (E) agrupadas en forma de herradura o arriñonado; b) tejidos vasculares constituidos por xilema (X) y floema (F) que poseen membranas engrosadas debido al alto contenido de lignina y c) tejido parenquimatoso (P).

En este sentido, la disposición de estas estructuras son similares a lo reportado por Gumeta (2009) para *A. atrovirens*. Adicionalmente se observó que los tejidos vasculares se iban formando en direcciones opuestas, es decir, el xilema hacia el centro de la hoja y el floema hacia la periferia.

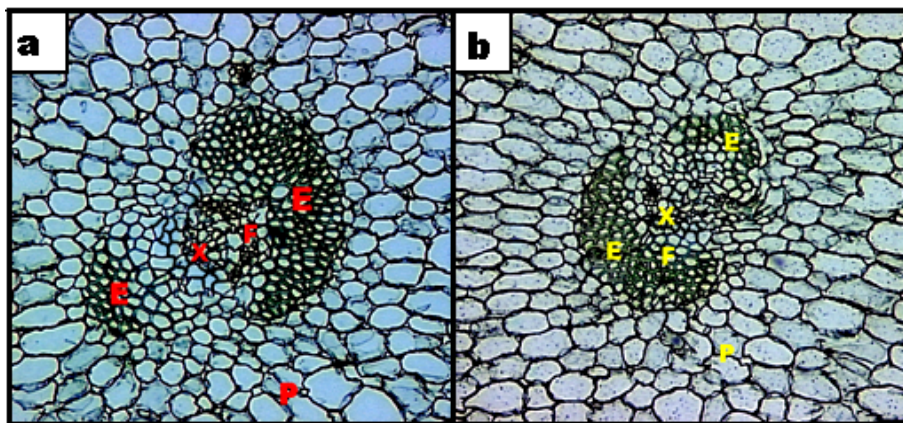


Figura 12. Corte Transversal 4X. **a).** *Agave angustifolia* Haw **b).** *Agave tequilana* Weber. E: Esclerénquima, F: Floema, P: Parénquima, X: Xilema

De manera general, cabe señalar que las hojas presentan tres tipos de tejido: fundamental, vascular y dérmico. Bianco *et al.*, (2004) señalaron que en las plantas cuyo metabolismo se refiere al ácido crasuláceo (CAM) particularmente, las células del tejido fundamental se presentan de forma radial a los haces

vasculares, los cuales se diferencian estructural y funcionalmente por sus paredes gruesas, debido al contenido de lignina y su acción como soporte de la planta, similarmente a lo mostrado en la Figura 12.

En los cortes radiales y tangenciales no se encontraron grandes diferencias en cuanto a la disposición de las estructuras en el espacio, por lo que se pudo observar al igual que en los cortes transversales, la presencia de gran cantidad de fibras alrededor de los haces vasculares y tejido parenquimatoso; esta característica proporciona una gran resistencia y rigidez a la hoja de Agave (González y Arbo, 2009).

Las fibras (FIB) obtenidas en las hojas de ambas especies hacen parte del esclerénquima y corresponden a fibras extraxilares (FE) y fibras del xilema (FX). Las fibras extraxilares son las células del esclerénquima que tienen forma de huso alargado con extremos romos, como se muestra en la Figura 13 y su función principal es de índole mecánica.

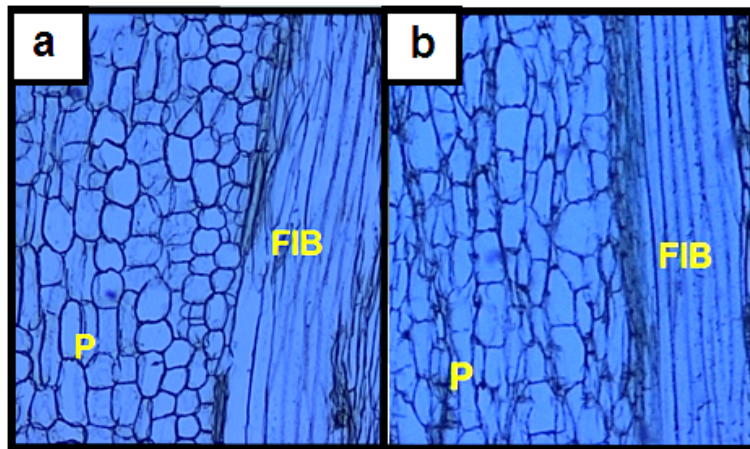


Figura 13. Corte Tangencial 4X. **a)** *A. angustifolia* Haw **b)** *A. tequilana* Weber. FIB: Fibra. P: Parénquima.

En la Figura 14 se muestran también cortes radiales y tangenciales; en éstos se observaron estructuras claramente alargadas, con anillos o helicoides dispuestos

transversalmente que son típicas de los elementos traqueales (T) del xilema. Las fibras del xilema son de difícil identificación en cortes transversales ya que constituyen parte integral del mismo (González y Arbo, 2009). Estas fibras además, están relacionadas filogenéticamente a las traqueidas, presentándose también formas transitorias (FT) cuya diferenciación es casi imperceptible. Se considera que estas fibras combinan la función de transporte o conducción de agua, con la de soporte (Esau, 1976).

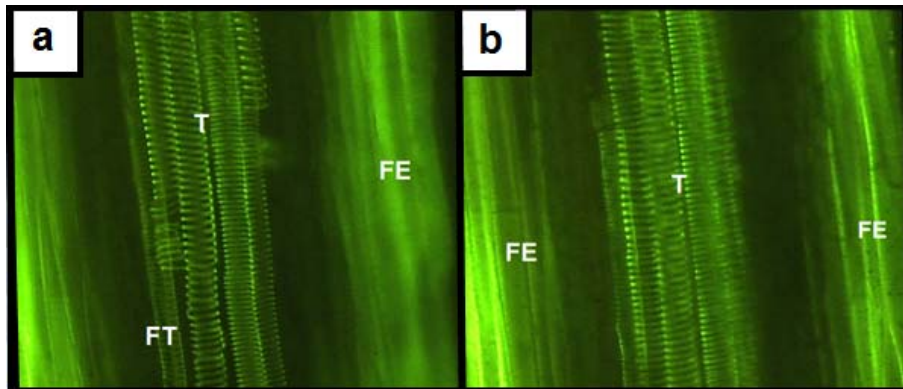


Figura 14. Corte radial observado con epi-fluorescencia con Filtro w-blue a 10X **a)** *A. angustifolia* Haw **b)** *A. tequilana* Weber. FE: Fibras extraxiliares. FT: Fibras transitorias T: Traqueidas

Estas estructuras además mostraron que los tejidos vasculares de las hojas para ambas variedades presentaban auto-fluorescencia. Esta particularidad se debió a la reacción de la safranina con la lignina de las células y específicamente, por la gran afinidad con la lignina-guaiacil-siringil (Micco y Aronne, 2007). Este polímero al ser iluminado episcópicamente emite una auto-fluorescencia verdosa debido a los dobles enlaces presentes en las moléculas de los elementos conductores y en las paredes celulares de las fibras de los tejidos vasculares (Rolleri y Prada, 2004).

Se encontró la presencia de paquetes de cristales en forma de agujas en algunas células del parénquima, como se muestra en la Figura 15. Estos cristales están compuestos de oxalato de calcio y se han reportado para otras especies de agaves, tales como *A. atrovirens* (Gumeta, 2009).

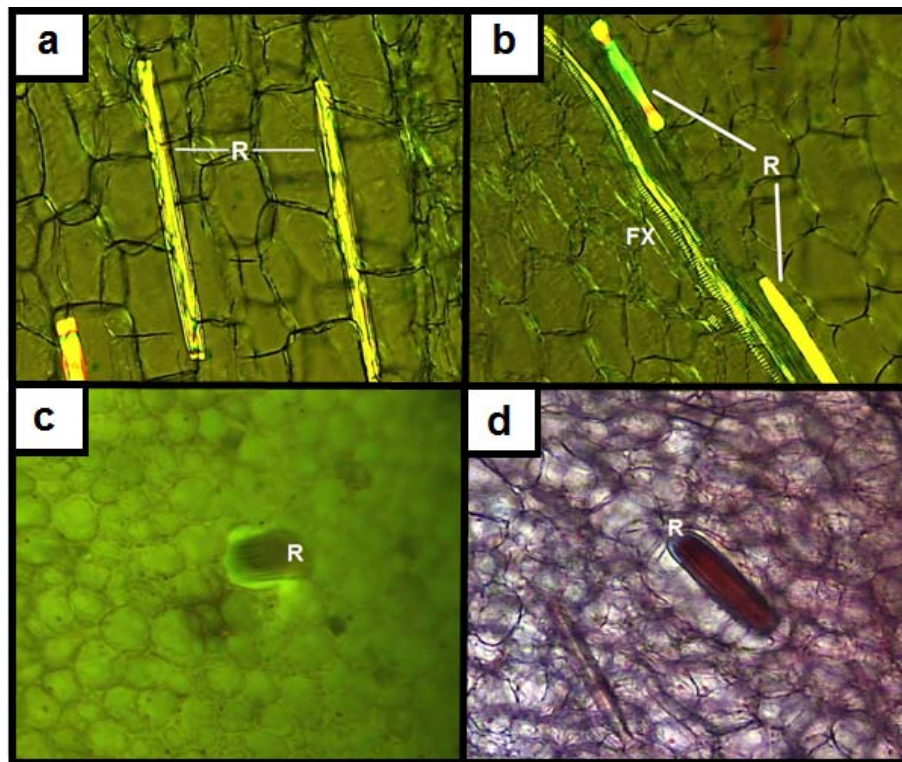


Figura 15. Rafidios 10x. **a).** *A. angustifolia* Haw **b)** *A. tequilana* Weber. R: Rafidios FX: Fibras del xilema

Se sabe que la anatomía foliar está fuertemente relacionada con la distribución ecológica y con las vías bioquímicas que utiliza la planta para realizar la fotosíntesis y las características anatómicas de cada vía fotosintética se manifiesta en todos los órganos de la planta que realizan la fotosíntesis (Fontúrbel, 2001).

La familia de las Agaváceas se encuentra dentro de las plantas que utilizan las vías CAM para fotosintetizar; en este sentido, los cristales de oxalato son productos del metabolismo celular, de reserva o de desecho, que se acumulan en la pared celular, en las vacuolas o en plástidos. Estos compuestos son el

componente más común de los cristales vegetales, y resultan de la acumulación intracelular de Calcio (Raven, 1999)

Existen tres tipos de cristales de oxalato, sin embargo los que se muestran en la Figura 15, por su forma corresponden a los rafidios. Es decir, son largos, finos y afilados, se presentan agrupados y en gran número formando un haz dentro de la célula (Figuras 15 a y b) y en algunos están aprisionados en la célula (Figuras 15 c y d). Debido a la iluminación episcópica, estos cristales presentaron la propiedad de reflejar el haz luminoso (Figuras 15 a y b)

De acuerdo con Tovar-Puente *et al.*, en el 2007, las plantas que son capaces de acumular rafidios sintetizan ácido oxálico en respuesta a altos niveles de calcio. Las plantas los utilizan para inactivar el ácido oxálico, ya que es potencialmente tóxico, así como también la de almacenar los nutrientes estructuralmente importante.

La Figura 16 muestra los estomas dispersos en el tejido dérmico el cual que está formado por células epidérmicas que se consideran elementos menos especializados del sistema y constituyen la masa fundamental del tejido.

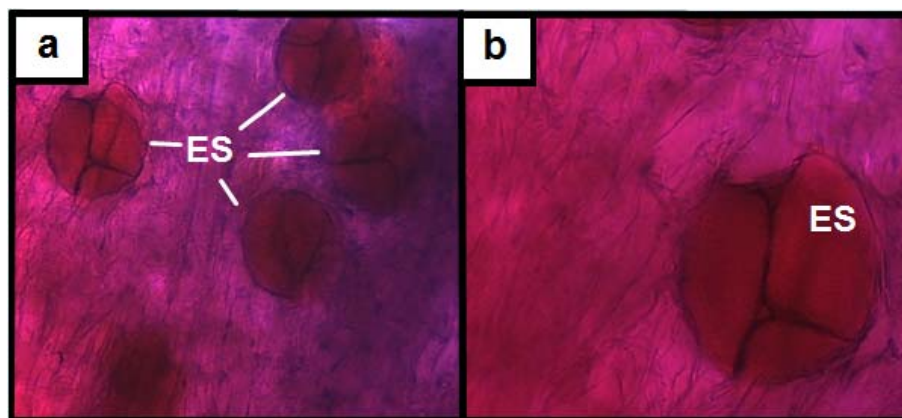


Figura 16. ES: Estomas (corte radial) presentes en *A. angustifolia* Haw: **a)** 4X **b)** 10X

Las células epidérmicas presentan membranas delgadas y muy vacuoladas, tienen la función de limitar la transpiración, protección mecánica, intercambio gaseoso a través de los estomas y almacenaje de agua y productos metabólicos.

7.1.2 Tallo

Como se muestra en la figura 17, las microfotografías de ambas especies, en los cortes radiales, tangenciales y transversales, en el tallo pareciese no haber una disposición espacial (orientación) particular de las células en los tejidos, a diferencia de lo observado en las hojas; inclusive si son de las diferentes posiciones del muestreo.

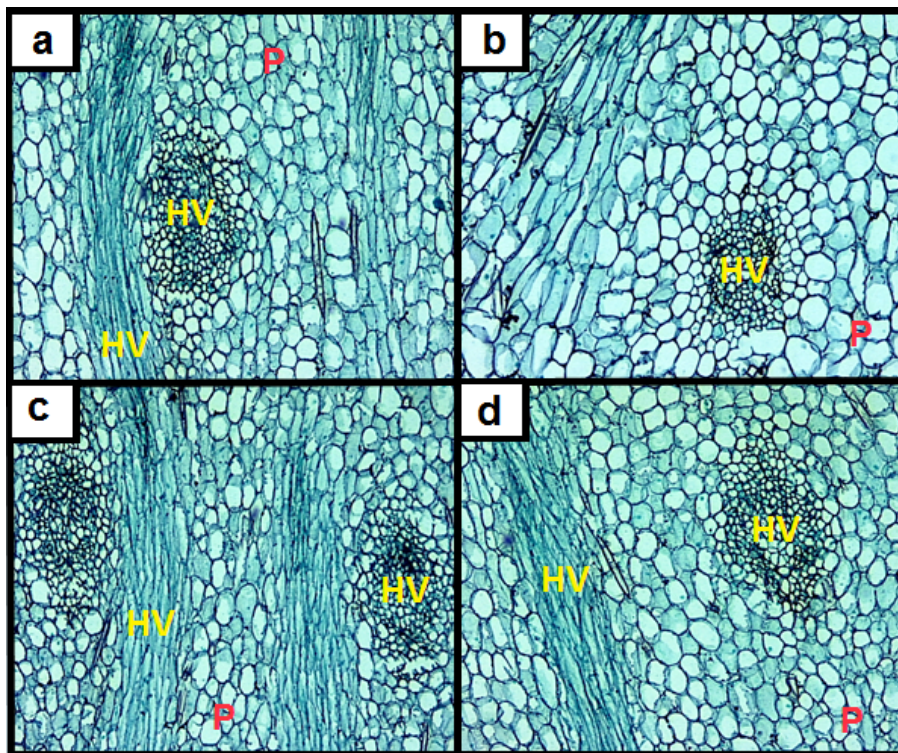


Figura 17. Disposición espacial (orientación) de los tejidos en cortes (4X) transversales de (a) *A. angustifolia* Haw (b) *A. tequilana* Weber.; Cortes radiales de: (c) *A. Angustifolia* Haw y (d) *A. Tequilana* Weber. (HV: Haces vasculares P: Parénquima).

Se conoce que el tallo está constituido por tejido vascular, fundamental dérmico y meristemático. El tejido vascular puede disponerse dentro del fundamental a manera de un cilindro complejo formado por cordones (fibras) unidos unos a otros de manera contigua; o bien, por cordones anastomosados (estructuras trenzadas) dispersos en gran parte del tallo. Por esta razón, se observó que en las secciones transversales, al igual que en las tangenciales, el tejido vascular se presentaba como un anillo con haces vasculares dispersos (Esau, 1976).

En la figura 18 se muestra fotomicrográficas que contienen la presencia de xilema (X) y floema (F) de los tejidos vasculares. Las células de estos tejidos se caracterizaron por su forma alargada y estrecha, así como sus paredes gruesas, uniformes y altamente lignificadas, notorio porque este polímero de la pared celular, se tiñe intensamente con la Safranina O (Rolleri y Prada, 2004; Micco y Aronne, 2007).

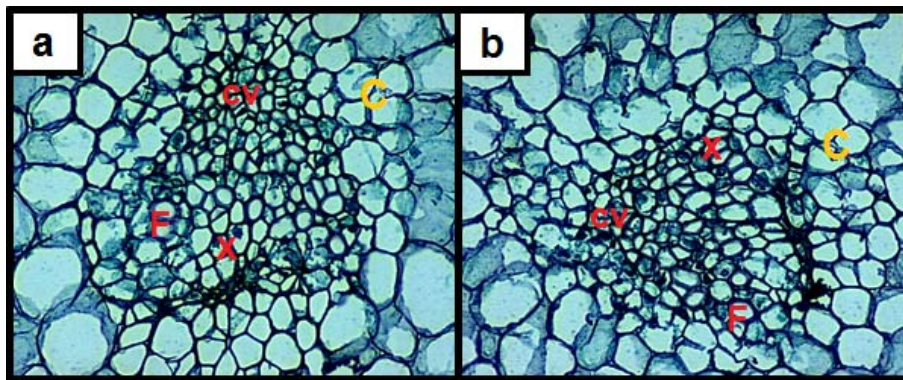


Figura 18. Cortes (10X) de tallo mostrando haces vasculares en: **a)** *A. angustifolia* Haw **b)** *A. tequilana* Weber. (C: Colénquima, F: Floema X: Xilema CV: Cambium vascular).

Adicionalmente, se observa la presencia de *cambium* vascular (CV), referidas como células redondeadas muy pequeñas, las cuales tienen la función de dar origen a las células del xilema y del floema (Esau, 1976); sin embargo son de difícil identificación ya que existe una gran semejanza entre ellas (Fontúrbel, 2001).

En figura 19 se muestra el tejido fundamental parénquimático para las especies estudiadas.

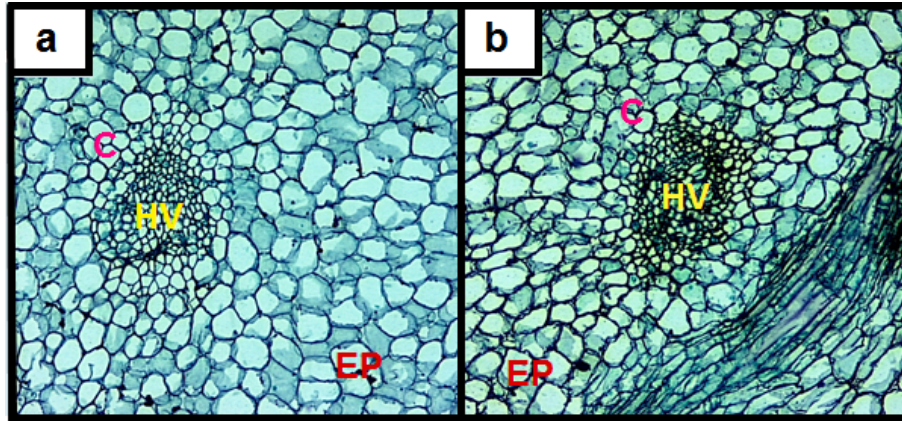


Figura 19. Cortes (10X) de tallo mostrando la disposición de los haces vasculares en el colénquima y la epidermis: a) *A. angustifolia* Haw y b) *A. tequilana* Weber. C: Colénquima. EP: Epidermis. HV: Haces Vasculares

Se observó que dicho tejido estaba constituido básicamente por células del colénquima (C) el cual se encontraba en forma de cilindro alrededor de los haces vasculares; además este tejido se sitúa cerca de la epidermis. Se conoce que este tejido, que se encuentran comúnmente en los tallos, tiene la función de soporte al tejido vascular de la planta (Hopkings, 1999). El colénquima contiene solo un tipo de células estrechas con paredes no lignificadas, principalmente constituidas por celulosa, sustancias pécticas y agua. Este tejido se encuentra junto al parénquima y es frecuente encontrar células de tránsito entre ambos y en vista de la semejanza y de la variabilidad estructural y funcional y por su disposición en la planta indican que el colénquima es considerado una clase de parénquima especializado como tejido de sostén (Esau, 1976).

En cuanto al tejido dérmico del tallo se observó que estaba constituido principalmente por células de la epidermis, las cuales se encontraron muy compactadas; de hecho, sin haber casi espacio entre ellas. Estas células tienen la función de reserva de agua (Raven, 1999). Adicionalmente, se pudieron

diferenciar elementos vasculares, particularmente tubos cribosos y fibras del xilema, anastomosados en el colénquima y la epidermis. Además, entre los haces vasculares se observó la existencia de áreas interfasciculares ocupadas por tejido fundamental parénquimático.

7.2 Morfometría

7.2.1. Hoja

7.2.1.1 Área (A). En la tabla 2 se muestran los resultados de las mediciones del Área (μm^2) para las dos variedades de agave estudiadas de acuerdo al corte realizado y a la posición de la cual fue tomada la muestra. En el anexo A se encuentran los resultados del ANOVA respectivo.

ESPECIE	POCISIÓN	CORTE TANGENCIAL	CORTE TRANSVERSAL	CORTE RADIAL
A. angustifolia Haw	<i>Adelante</i>	81,3012 \pm 20,781	49,518 \pm 13,105	57,604 \pm 16,939
	<i>Atrás</i>	87,801 \pm 20,482	36,312 \pm 10,317	104,34 \pm 32,703
	<i>Derecha</i>	75,600 \pm 14,605	51,206 \pm 14,813	52,504 \pm 13,894
	<i>Izquierda</i>	89,621 \pm 30,775	89,018 \pm 30,578	69,9704 \pm 20,896
A. tequilana Weber	<i>Adelante</i>	48,361 \pm 17,943	62,816 \pm 17,943	32,036 \pm 10,468
	<i>Atrás</i>	46,359 \pm 12,265	67,794 \pm 17,875	30,592 \pm 9,259
	<i>Derecha</i>	32,447 \pm 7,157	30,026 \pm 10,467	38,935 \pm 10,166
	<i>Izquierda</i>	30,026 \pm 10,467	42,176 \pm 10,102	36,542 \pm 7,524

Tabla 2. Área celular promedio (μm^2) en cortes de hoja.

El análisis estadístico mostró que si hubo diferencia significativa en el área entre ambas especies. Adicional a esto, para la posición de la cual fue tomada la muestra no hubo una diferencia significativa, dado que el valor de F fue menor que

el valor del F crítico; mientras que para el tipo de corte, el valor de F fue mayor y por lo tanto hay una diferencia significativa del área entre ellos (tangencial, transversal y radial). Lo que se traduce en que, tanto para *A. angustifolia* Haw, como para *A. tequilana* Weber, el área se vio afectada de acuerdo a la forma como se realizaban los cortes, más no por la posición de donde se tome la muestra.

7.2.1.2 Perímetro (Pm). En la tabla 3 se muestran los resultados de las mediciones del Perímetro (μm) para las dos variedades de agave estudiadas de acuerdo al corte realizado y a la posición de la cual fue tomada la muestra. En el anexo B se encuentran los resultados del ANOVA respectivo.

ESPECIE	POCISIÓN	CORTE TANGENCIAL	CORTE TRANSVERSAL	CORTE RADIAL
A. angustifolia Haw	<i>Adelante</i>	35,601 \pm 4,391	27,659 \pm 3,419	30,198 \pm 4,433
	<i>Atrás</i>	37,363 \pm 4,397	23,459 \pm 3,212	40,075 \pm 6,249
	<i>Derecha</i>	34,784 \pm 3,589	29,448 \pm 4,956	28,388 \pm 4,006
	<i>Izquierda</i>	37,035 \pm 6,187	36,928 \pm 6,674	33,224 \pm 4,769
A. tequilana Weber	<i>Adelante</i>	29,186 \pm 5,499	32,340 \pm 4,970	23,303 \pm 3,917
	<i>Atrás</i>	27,297 \pm 3,752	33,924 \pm 5,377	22,409 \pm 3,211
	<i>Derecha</i>	23,157 \pm 2,791	21,725 \pm 3,761	25,181 \pm 3,532
	<i>Izquierda</i>	21,725 \pm 3,761	26,883 \pm 3,725	24,442 \pm 2,653

Tabla 3. Perímetro celular promedio (μm) en cortes de hoja

El análisis estadístico reveló que existen diferencias significativas en el Pm entre ambas especies. Adicionalmente, para la posición no hay diferencias significativas, ya que el valor de F es menor que F crítico, mientras que para los cortes si hay diferencias significativas, ya que el valor de F es mayor que F crítico. Lo que indica que, tanto para *A. angustifolia* Haw y *A. tequilana* Weber, el perímetro, al igual que el área, depende de la forma como se realicen los cortes y no, de la posición de donde se tome la muestra.

7.2.1.3 Diámetro de Feret (Df). En la tabla 4 se muestran los resultados de las mediciones del Df para las dos variedades de agave estudiadas de acuerdo al corte realizado y a la posición de la cual fue tomada la muestra. En el anexo C se muestran los resultados el ANOVA respectivo.

ESPECIE	POCISIÓN	CORTE TANGENCIAL	CORTE TRANSVERSAL	CORTE RADIAL
A. angustifolia Haw	<i>Adelante</i>	10,095 ± 1,272	7,870 ± 1,060	8,470 ± 1,271
	<i>Atrás</i>	10,503 ± 1,222	6,735 ± 0,942	11,932 ± 1,762
	<i>Derecha</i>	9,767 ± 0,936	7,987 ± 1,192	8,103 ± 1,094
	<i>Izquierda</i>	10,527 ± 1,826	10,483 ± 1,865	9,342 ± 1,355
A. tequilana Weber	<i>Adelante</i>	7,716 ± 1,433	8,846 ± 1,324	6,307 ± 1,014
	<i>Atrás</i>	7,712 ± 1,006	8,846 ± 1,324	6,306 ± 1,014
	<i>Derecha</i>	6,389 ± 0,709	6,095 ± 1,044	6,980 ± 0,929
	<i>Izquierda</i>	6,095 ± 1,044	7,277 ± 0,864	6,783 ± 0,720

Tabla 4. Diámetro de Feret celular promedio (μm) en cortes de hoja

El análisis estadístico mostró que si hubo diferencia significativa en el Df entre ambas especies. Tanto para *A. angustifolia* Haw como para *A. tequilana* Weber, no hay una diferencia significativa en cuanto a la posición de donde se tome la muestras, ya que el valor de F es menor que el F crítico. Sin embargo, si hay diferencia significativa para los cortes, puesto que ocurre lo contrario con el valor de F. Lo que quiere decir que el Df, depende al igual que A y Pm de la forma como se realicen los cortes y no de la posición de donde se tome la muestra.

El Df representa el diámetro de un objeto circular equivalente, que tiene la misma área que el objeto actual, en este caso el área calculada se asemeja a la hallada con el Df, lo que indica que el perímetro presenta una baja irregularidad, que a su vez refleja que la longitud del perímetro no es muy extensa con respecto al área que encierra.

7.2.1.4 Longitud Máxima (LM). En la tabla 5 se muestran los resultados de las mediciones de LM de las dos variedades de agave estudiadas de acuerdo al corte realizado y a la posición de la cual fue tomada la muestra. En el anexo D se encuentran los resultados del ANOVA respectivo.

ESPECIE	POCISIÓN	CORTE TANGENCIAL	CORTE TRANSVERSAL	CORTE RADIAL
A. angustifolia Haw	<i>Adelante</i>	12,648 ± 1,684	9,410 ± 1,376	10,613 ± 1,583
	<i>Atrás</i>	13,125 ± 1,776	8,147 ± 1,243	13,665 ± 2,137
	<i>Derecha</i>	12,445 ± 1,574	10,864 ± 2,107	9,653 ± 1,388
	<i>Izquierda</i>	12,708 ± 2,104	12,750 ± 2,423	11,446 ± 1,704
A. tequilana Weber	<i>Adelante</i>	9,741 ± 1,967	10,874 ± 1,809	8,220 ± 1,402
	<i>Atrás</i>	9,414 ± 1,445	12,558 ± 2,262	7,890 ± 1,289
	<i>Derecha</i>	8,161 ± 1,227	7,661 ± 1,430	8,851 ± 1,390
	<i>Izquierda</i>	7,661 ± 1,430	9,591 ± 1,692	8,633 ± 1,172

Tabla 5. Longitud máxima celular promedio (µm) en cortes de hoja

El análisis estadístico mostró que si hubo diferencia significativa en la LM entre ambas especies, esto debido a que el valor de F es mayor que el F crítico, tanto para la posición como para los cortes. Lo que se traduce en que, la longitud máxima depende de la forma como se realicen los cortes y de la posición de donde se tome la muestra, tanto para *A. angustifolia* Haw y *A. tequilana* Weber.

Al ser LM un descriptor que evalúa la máxima distancia entre los dos puntos más lejanos de la célula, se puede deducir y confirmar que existen grandes diferencias de tamaño de las células en relación a los cortes realizados entre ambas especies.

7.2.1.5 Factor de Compacidad (Fc). En la tabla 6 se muestran los resultados de las mediciones de Fc de las dos variedades de agave, estudiadas de acuerdo al corte realizado y a la posición de la cual fue tomada la muestra. En el anexo E se encuentra el resultado del ANOVA respectivo.

ESPECIE	POCISIÓN	CORTE TANGENCIAL	CORTE TRANSVERSAL	CORTE RADIAL
<i>A. angustifolia</i> Haw	<i>Adelante</i>	15,880 ± 1,110	15,896 ± 2,362	16,261 ± 1,124
	<i>Atrás</i>	16,151 ± 1,224	15,496 ± 1,047	15,783 ± 1,003
	<i>Derecha</i>	16,168 ± 1,189	17,297 ± 1,765	15,628 ± 0,908
	<i>Izquierda</i>	15,822 ± 0,996	15,814 ± 1,765	16,138 ± 1,066
<i>A. tequilana</i> Weber	<i>Adelante</i>	18,295 ± 2,124	17,065 ± 1,545	17,519 ± 2,648
	<i>Atrás</i>	16,031 ± 1,151	16,430 ± 1,332	16,971 ± 2,295
	<i>Derecha</i>	16,737 ± 1,251	16,192 ± 1,022	16,623 ± 1,683
	<i>Izquierda</i>	16,192 ± 1,022	17,382 ± 1,869	16,571 ± 1,283

Tabla 6. Factor de compacidad celular promedio en cortes de hoja

El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa en el Fc entre ambas especies ya que el valor de F es menor que el F crítico, mostrando a la vez que el Fc, tanto para *A. angustifolia* Haw y *A. tequilana* Weber, no depende de la forma como se realicen los cortes, ni de la posición de donde se tome la muestra.

Este parámetro se estudió con el fin de evaluar la irregularidad del perímetro, es decir, que tan liso o rugoso es el perímetro de las células. De acuerdo con la definición de este descriptor, el valor para un perímetro liso en un círculo es aproximadamente 12.57 (SPSS, 1999), por lo que valores mostrados en la tabla 6 indican una baja irregularidad para ambas especies y esto hace que este parámetro morfométrico no ofrezca una información relevante para hallar diferencias entre los cortes en las diferentes posiciones

7.2.1.6 Factor de Forma (Ff). En la tabla 7 se muestran los resultados de las mediciones de Ff de las dos variedades de agave estudiadas de acuerdo al corte realizado y a la posición de la cual fue tomada la muestra. En el Anexo F se encuentran los resultados del ANOVA respectivo.

PLANTA	POCISIÓN	CORTE TANGENCIAL	CORTE TRANSVERSAL	CORTE RADIAL
<i>A. angustifolia</i> Haw	<i>Adelante</i>	0,795 ± 0,054	0,801 ± 0,073	0,776 ± 0,052
	<i>Atrás</i>	0,782 ± 0,056	0,814 ± 0,052	0,799 ± 0,049
	<i>Derecha</i>	0,781 ± 0,055	0,734 ± 0,073	0,807 ± 0,045
	<i>Izquierda</i>	0,797 ± 0,046	0,798 ± 0,049	0,782 ± 0,049
<i>A. tequilana</i> Weber	<i>Adelante</i>	0,695 ± 0,075	0,742 ± 0,062	0,730 ± 0,088
	<i>Atrás</i>	0,787 ± 0,052	0,770 ± 0,059	0,752 ± 0,087
	<i>Derecha</i>	0,755 ± 0,054	0,779 ± 0,048	0,763 ± 0,073
	<i>Izquierda</i>	0,779 ± 0,048	0,731 ± 0,073	0,763 ± 0,056

Tabla 7. Factor de forma celular promedio en cortes de hoja

El análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa en el Ff entre ambas especies, ya que el valor de F es menor que el F crítico, tanto para la posición como para los cortes. Revelando además que, el Ff, tanto para *A. angustifolia* Haw como para *A. tequilana* Weber, no depende de la forma como se realicen los cortes, ni de la posición de donde se tome la muestra.

El Ff indica que tanto un objeto se circunscribe a un círculo. Se puede observar que los valores no son muy cercanos a 1, indicando que las células son un poco irregulares, lo que se complementa con el hecho de que el perímetro sea algo convolucionado.

7.2.1.7 Dimensión Fractal. En la tabla 8 se muestran se muestran los resultados de Dfp y Dfa para las hojas. Cabe señalar que no se encontraron diferencias significativas entre los valores evaluando la posición y los cortes. Sin embargo, si se encontraron diferencias entre una especie y otra, como se muestra en el anexo G.

Especie	Dfp	Dfa
<i>A. angustifolia</i> Haw	1,203	1,865
<i>A. tequilana</i> Weber	1,065	1,831

Tabla 8. Valores (promedio) de Dfp y Dfa para hojas

Se encontró que todos los perímetros y las áreas de las hojas eran de naturaleza fractal. Los perímetros de la especie *A. tequilana* Weber presentaron una tendencia a ser lisos, mientras que los de *A. angustifolia* Haw tienden a ser un poco más rugosos como se ejemplifica en la figura 20.



Figura 20. Imagen proyectada y binarizada del contorno de las células de las hojas. **a).** *A. angustifolia* Haw **b).** *A. tequilana* Weber.

La Dfp es la relación entre el perímetro y el área, proporciona evidencias sobre que tan liso, rugoso o sinuoso es un perímetro con relación al área que abarca. Las hojas de *A. angustifolia* Haw presentaron mayor valor fractal y por lo tanto mayor sinuosidad, debido a que mostraron valores de Pm y A mayores, y se presentó además un Pm mayor con relación al área que abarca. Para *A. tequilana* Weber se presentó una Dfp menor, esto debido a que el perímetro es bajo con relación al área que abarca. Por lo anterior se puede suponer que la Dfp es sensible a los cambios en los descriptores morfométricos que involucra, es decir, cambios del área o del perímetro.

Para el caso de la Dfa no se encontraron grandes diferencias entre una especie y otra. El Dfa también es la relación entre dos propiedades geométricas que son A y LM, y estas proporcionan evidencias sobre qué tanto la proyección de un objeto se

encuentra compactada o ramificada. Se puede decir que las células de ambas variedades tienden a ser más compactas y que llenan más un área puesto que sus valores son muy cercanos a 2. Por esta razón Dfa resulta ser también sensible a los cambios de cualquiera de estos dos descriptores.

7.2.2 Tallo

En la tabla 9 se muestran resultados de A, P, Df, LM, Ff y Fc de las dos variedades de agave estudiadas de acuerdo a la posición de la cual fue tomada la muestra. En el anexo H se encuentra el resultado del ANOVA correspondiente.

	POSICIÓN	A	P	DF	LM	FC	FF
A. <i>angustifolia</i> Haw	Adelante	46,977 ±	27,082 ±	7,677 ±	9,063 ±	15,895 ±	0,796 ±
		11,743	3,349	0,943	1,310	1,318	0,061
	Atrás	33,946 ±	22,691 ±	6,497 ±	7,707 ±	15,578 ±	0,810 ±
		10,446	3,508	1,014	1,319	1,066	0,052
	Derecha	51,1116 ±	28,035 ±	7,963 ±	9,626 ±	15,808 ±	0,799 ±
		16,033	4,650	1,298	1,776	1,130	0,054
Izquierda	40,279 ±	25,263 ±	7,103 ±	8,836 ±	16,126 ±	0,784 ±	
		10,306	3453	0,916	1,437	1,307	0,059
	POSICIÓN	A	P	DF	LM	FC	FF
A. <i>tequilana</i> Weber	Adelante	52,362 ±	29,295 ±	8,105 ±	10,576 ±	16,669 ±	0,761 ±
		12,686	3,895	0,990	1,737	1,714	0,073
	Atrás	45,236 ±	27,074 ±	7,483 ±	9,420 ±	16,790 ±	0,756 ±
		15,167	4,466	1,270	1,575	0,071	1,912
	Derecha	63,645 ±	32,228 ±	8,948 ±	11,302 ±	16,537 ±	0,766 ±
		14,061	3,968	0,985	1,864	0,064	1,534
Izquierda	64,044 ±	32,446 ±	8,953 ±	11,300 ±	16,749 ±	0,756 ±	
		16,442	4,478	1,179	1,752	0,062	1,447

Tabla 9. Valores de los descriptores morfométricos del tallo

De acuerdo al análisis estadístico realizado mostró que no hubo diferencias significativas en cuanto a la posición y la forma como es realizado el corte para ambas especies, ya que, el valor de F es menor que el F crítico. Esto quiere decir que, tanto para *A. angustifolia* Haw como para *A. tequilana* Weber, la variación en

los parámetros tanto dimensionales como adimensionales (A, Pm, DF, LM, Fc y Fc) no dependen ni de la posición de donde se tome la muestra, ni de la forma como se realice el corte en una misma especie. Esto se debe posiblemente al arreglo microestructural que presenta el tallo de ambas especies.

En el anexo I se muestran los resultados del ANOVA realizado para evaluar las diferencias entre los descriptores morfométricos estudiados, entre las especies estudiadas. En este el valor de F es mayor que el F crítico, indicando así, que si existe una diferencia significativa entre el valor de los descriptores morfométricos entre una especie y otra. Lo que confirma que, aunque el arreglo microestructural es similar, los descriptores morfométricos presentan diferencias significativas en cuanto al valor entre una especie y la otra, puesto que son diferentes.

7.2.2.1. Dimensión Fractal. Todos los perímetros y las áreas del tallo presentaron una naturaleza fractal. En la tabla 10 se muestran los resultados de Dfp y Dfa para el tallo. Cabe señalar que no se encontraron diferencias significativas entre los valores evaluando la posición y los cortes. Sin embargo, si se encontraron diferencias entre una especie y otra, como se muestra en el anexo J.

Especie	Dfp	Dfa
<i>A. angustifolia</i> Haw	1,225	1,883
<i>A. tequilana</i> Weber	1,035	1,760

Tabla 10. Valores de Dfp y Dfa para tallo.

Los perímetros de la especie *A. tequilana* Weber presentan una tendencia a ser lisos, mientras que los de *A. angustifolia* Haw tienden a ser un poco mas rugosos al igual que lo ocurrido en las hojas, como lo muestra la figura 21.



Figura 21. Imágenes proyectadas y binarizadas del contorno de las células del tallo. **a).** *A. angustifolia* Haw **b).** *A. tequilana* Weber.

Las células del tallo de *A. angustifolia* Haw presentaron mayor valor fractal que las de *A. tequilana* Weber. Esto se debe a que los valores de P y A son mayores y por lo tanto las células tienden a ser más irregulares y por lo tanto, de mayor sinuosidad. Para *A. tequilana* Weber, la D_{fp} es mucho menor, debido a que presentan áreas más elevadas pero un valor de P bajo, lo que indica que el perímetro tiende a ser más liso con valores cercanos a 1 y menor con relación al área que abarca. Por lo anterior se puede decir que estos cambios se deben a que la D_{fp} es sensible a los cambios en los descriptores morfométricos que involucra, es decir, cambios ya sea del área o del perímetro.

Para el caso de la D_{fa} se encontró que los valores para *A. angustifolia* Haw presentaron mayor valor fractal que las de *A. tequilana* Weber. Se puede decir que para la primera especie las células tienden a ser más compactas y que así mismo, llenan más un área puesto que su valor es cercano a 2, en cambio la morfología para *A. tequilana* Weber tiende a ser más rugosa.

Finalmente, utilizando los conceptos de geometría fractal, así como las evidencias morfométricas del TDI y estadísticas obtenidas para hojas y tallos de *A. angustifolia* Haw y *A. tequilana* Weber es posible establecer que se trata de dos especies distintas. Este punto de vista, resulta ser un aspecto novedoso que coadyuva a otras herramientas bioquímicas y fisiológicas, en el entendimiento de la morfo estructura de los agaves y con ello a establecer procesos tecnológicos

más eficientes, como lo pudiese ser la extracción sólido – líquido de compuestos de interés comercial.

VIII. CONCLUSIONES

Se consiguió describir el arreglo microestructural tanto del tallo como de la hoja de *A. tequilana* Weber y *A. angustifolia* Haw identificando. La técnica de Safranina "O"- Verde Rápido, permitió la identificación del tejido vascular, fundamental, esclerénquima y tejido dérmico.

Se encontró que las diferencias estructurales de los tejidos de *Agave tequilana* Weber y *Agave angustifolia* Haw para las hojas, no dependen de la posición de donde se seleccione la muestra, sino, del corte realizado. Sin embargo, el tallo no muestra una disposición espacial particular de las células en los tejidos, ya que el tejido vascular está formado anastomosadamente dentro del tejido fundamental y disperso radialmente en gran parte del tallo.

Para la morfometría de las hojas se halló que los descriptores no varían dependiendo de la posición de la cual se extraiga la muestra, pero por el contrario existen diferencias significativas entre los cortes realizados (transversales, tangenciales, radiales). Adicionalmente, existen diferencias entre los valores de los descriptores entre *Agave tequilana* Weber y *Agave angustifolia* Haw. Para el tallo, el valor de los descriptores no depende ni de la posición ni del corte que se realice en las plantas, pero hay diferencias en los valores de los descriptores entre una especie y otra, lo que confirma el hecho que son especies distintas y aunque presentan un arreglo microestructural similar el tamaño de sus células son diferentes.

Se determinó mediante TDI y ADF la naturaleza fractal de las células de las hojas y el tallo tanto para *Agave tequilana* Weber y *Agave angustifolia* Haw, presentando estructuras irregulares con perímetros sinuosos y áreas incompletas, no euclidianas. Se comprobó que las células, no se comportan como cuerpos

geométricos perfectos, lo que indicó que cada especie tiene características morfo estructurales propias que las hacen diferentes.

IX. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Poco se conoce acerca de la morfo - estructura de hojas y tallo del agave de las especies *A. tequilana* y *A. angustifolia* (incluyendo su morfometría y geometría) cuando son seccionadas de distinta manera (transversal, longitudinal y diagonal). Este estudio servirá para sentar bases acerca de las implicaciones que pudiesen tener los arreglos microestructurales y su organización en algunas operaciones unitarias que pudiesen estar involucradas con esta materia prima, como lo es el caso de los procesos de extracción de inulina y podrían ser también la base para la implementación de procesos industriales-forestales.

Este estudio se podría complementar con un estudio con Microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET), para de esta forma observar objetos o áreas particulares de las células, o bien para crear una imagen ampliada de la superficie de las células. Lo que permitirá hacer una descripción completa del arreglo microestructural de los tejidos de agave.

X. BIBLIOGRAFÍA.

Aguilera, J. and Stanley, D. 1999. Microestructural principles of food processing and engineering. Segunda edición. Capítulo 2. Aspen Publishers, Inc. (USA).

Aguilera, J. y Alvarado, J. 2003. Método para medir propiedades físicas en industrias de alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Alfaro-Ferreres, L. García-Rojo, M. Puras-Gil, A. 2001. Manual de telepatología. Capítulo 3. Club de Informática Aplicada de la Sociedad Española de Anatomía Patológica. Pamplona. pp. 11 – 16

Anónimo. Morfoestructura de la Sierra de Gredos. Glosario - Morfoestructura. Disponible en: <http://www.isftic.mepsyd.es/w3/eos/MaterialesEducativos/mem2001/gredos/Sitio/glosario/morf2.htm>. Consulta: 29 de mayo de 2009.

Anónimo. La técnica del Conteo de Cajas. Disponible en: <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Launchpad/9212/fract3.htm>. Consulta: 3 Junio 2009

Arroyo Estrada J., Espinosa Matías, S., Espinoza Paz, H. Peña Díaz, A. 2003. Estudio comparativo de las microestructuras foliares en Agaves de importancia económica. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. INIFAP, Campo Experimental Valles Centrales, Oaxaca.

ASERCA. 2003 Agave tequilero, pencas que abrazan al mundo. *Revista mensual de Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria*. SAGARPA México, D.F. pp. 2- 30

Bautista-Justo, M. García Oropeza, L. Barbosa Corona, J.E., y Parra Negrete. L. A. 2001. El *Agave tequilana* Weber y la Producción de Tequila. *Acta Universitaria* (Universidad de Guanajuato). 11: 26-34.

Bianco, C. Krauss, T. Vegetti, A. 2004. La hoja, morfología externa y anatomía. Primera edición. Universidad Nacional de Rio Cuarto.

Bidwell, R.G.S. 1990. Fisiología Vegetal. Primera edición en español. Sección I. pp. 3-94

Braña, J. 2003. "Introducción a la geometría fractal", Resumen del curso dictado a través del sitio www.fractaltec.org. Buenos Aires, Argentina

Carvajal-Sandoval, A. 1996. Manual de histología vegetal. Instituto Politécnico Nacional. Primera edición. México

Centeno, J. 2008. Morfometría. Resumen Clase "Geodinámica Externa LG+IG".

Centro de Articulación Productiva de la cadena Agave (CAPCA). El agave. Disponible en: <http://www.agave.org.mx/>. Consulta: 21 de mayo de 2009.

Chanona, J. Alamilla, L. y Gutiérrez, G. 2001. Caos y geometría de fractales, herramientas auxiliares para evaluar la complejidad del entorno biológico. *Biotecnología* 5: 117 - 126. México DF.

Cocho, G. y Miramontes, P. 2000. La importancia de los protectorados. *Ciencias* 59:14 – 22.

Coordinación General De Universidades Tecnológicas (CGUT). Operaciones Unitarias. 2001 México D.F.

Esau, K. 1976. Anatomía Vegetal. Tercera edición. Editorial Omega. Barcelona, España

Esguiarte Fruns, L. y González, A. 2007. De genes y magueyes, estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. *Ciencias* 87: 28 – 35.

Estrada-Flores, E., Peralta-Zamora, L., Rivas-Manzano, P. 1982. Manual de técnicas histológicas. AGT Editores, S.A. México.

Fontúrbel, F. 2001. Fotosíntesis CAM. La revista 4: 2-6. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia

Fundación Produce de Oaxaca A.C. 2007. Revista anual *AgroProduce*. pp. 3 – 8 y 28 – 32.

García Mendoza, A. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias* 87: 14 - 23

González, A., Arbo, M. Botánica morfológica. Morfología de plantas vasculares. Hipertextos del área de la Biología. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Nordeste. Argentina. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/>. Consulta: 3 junio de 2009.

González, R., y Woods, R. 2008. Digital image processing. Pearson Prentice Hall. Tercera Edición. USA

Grasso, F., Maroto B., Camusso, C., Zaritzky, N. 2007 . Modelado de la extracción con hexano de molido de soja pretratado enzimáticamente. *Grasas y Aceites* 58(2): 117 -121.

Greulach, V. 1973. *Plant Function and Structure*. Collier Macmillan International Editions. Capitulo 1 y 2. pp. 2 - 57

Guillot Ortíz, D., Van der Meer, P. Laguna Lumbreras, E. y Rosel Picornell, J. 2008. El Género *Agave* L. en la flora alóctona Valenciana. Valencia. Capitulo 9 pp. 18 -32.

Gumeta, C. 2008. Estudio fisicoquímico, espectroscópico y estructural del *Agave atrovirens* Karw, durante el proceso de obtención de celulosa. Examen Predoctoral. Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Hopking, W. 1999. *Introduction to Plant Physiology*. Segunda edición. John Wiley and sons Inc. USA.

Isaza Esguerra, C. Rodríguez Peña, K. Arenas Ocampo, M. Jiménez Junca, C. y Jiménez Aparicio, A. 2006. Limitantes tecnológicas del cultivo de células vegetales en biorreactores para la obtención de pigmentos naturales: el análisis fractal de imágenes digitales (AFID), una nueva y potente herramienta analítica. *Biótica, Revista de Investigación del Centro de Desarrollo De Productos Bióticos (CEPROBI)* 3: 19-41

Jiménez J. C., A., 2005. Aplicación de la geometría Fractal a agregados celulares de *Beta vulgaris* L. crecidos en suspensión (Matraces y Biorreactor tipo tanque agitado). Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. CEPROBI-IPN.

Kenkel, N.C. Walker, D.J. 1996. Fractal in the Biological Science. Quantitative Plant Ecology Lab Department of Botany University of Manitoba. Canadá

Lira, J. 2002. Introducción al Tratamiento Digital de Imágenes. IPN–UNAM-FCE, México.

Martínez Torres, R. Morales Durán, U. 2005. Estudio de la deshidratación del Maguey (*Agave atrovirens* Karw) para la obtención de un producto seco con alto contenido de fructooligosacáridos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Bioquímico. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

McKevith, B. 2004. Inulin and oligofructose: feelgood factors for health and well-being from British Nutrition Foundation, London, UK. Memorias de la conferencia del 12–13 de Febrero en La Cité des Sciences et de l'Industrie, Paris, France.

Micco, V. Aronne, G. 2006. Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls. *Journal of Biotechnic & Histochemistry* 2007, 82(4): 209-216

Nunn, R. 1976. Microscopía electrónica: Microtomía, tinción y técnicas especializadas. Editorial manual modern S.A. México.

Olsen, E. R., R. D. Ramsey y D. S. Winn 1993. A modified fractal dimensión as a measure of landscape diversity. *Pothogrammetric Engineering and Remote Sensing*. 59: 1517 – 1520.

Parra Negrete, L. 2009. Usos Potenciales del Agave. Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Guanajuato. Generado en la página www.agave.org.mx, Consultado el 21 de mayo de 2009.

Quintanilla-Carvajal, M. 2007. Caracterización clorimétrica y morfométrica de capítulos florales y lígulas de *Tajetes erecta* y *Tajetes pátula* a través de análisis digital de imágenes (ADI) y análisis de la dimensión fractal (ADF). Tesis de grado para optar por el título de Ingeniero de Producción Agroindustrial. Universidad de La Sabana.

Raven, P. 1999. Biology of Plant. Sexta Edición. Worth Publishers Inc., New York, USA.

Rolleri, C. Prada, C. 2004. Endodermis Foliares En El Género Isoetes L. (Isoetaceae). Acta Botanica Malacitana 29: 191-201. Malaga.

Russ, J. 2005. Image analysis of food microstructure. CRC Press LLC. United States of America.

Sandoval, E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Primera Edición. Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México. México DF.

SPSS, 1999. SigmaScan pro 5.0. User's Guide.

Tovar-Puente, A., Pando-Moreno, M., González-Rodríguez, H. Scott-Morales, L. Méndez-Gallegos, S. 2007. Densidad de cristales de oxalato de calcio en quince cultivares de nopal. J. PACD

Valenzuela Zapata, A. G. 2003. El Agave tequilero. Cultivo e industria de México. México, Ed. Mundi-prensa.

Valenzuela Zapata, A. G. 2007. Las denominaciones de origen Tequila y Mezcal y la biodiversidad en el género *Agave* sp. Conferencia dictada en el Seminario "Biodiversidade e Denominações de Origem: Uma problemática global", en la Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC) en Coimbra (Portugal).

Voss, R.F. 1988. Fractals in nature: from characterization to simulation. In: Peitgen, H.-O. and D. Saupe (eds.). The science of fractal images. pp. 21-70. Springer, New York.

Yoshioka, Y. Iwata, H. Tabata, M. Ninomiya, S. Ohsawa, R. 2007. *Crop Science*. 47: 2113 – 2110

Wei, L., Wang, J., Zheng, X., Teng D., Yang Y., Cai C., Feng T., Zhang F. 2007. Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers. *Journal of Food Engineering*. 79: 1087–1093.

XI ANEXOS

A. Resultado de ANOVA para A en Hoja

<i>A. angustifolia</i> Haw						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	302785,045	399	758,860	1,072	2,069E-01	1,151
Corte	146826,058	2	73413,029	103,736	8,988E-41	3,007
Error	564739,517	798	707,694			
Total	1014350,620	1199				

<i>A. tequilana</i> Weber						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	107443,186	399	269,281	1,050	2,814E-01	1,151
Corte	55270,611	2	27635,305	107,805	3,602E-42	3,007
Error	204563,026	798	256,345			
Total	367276,823	1199				

B. Resultado de ANOVA para Pm en Hoja

<i>A. angustifolia</i> Haw						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	14288,395	399	35,811	0,918	8,348E-01	1,151
Corte	9317,909	2	4658,955	119,415	4,283E-46	3,007
Error	31133,737	798	39,015			
Total	54740,042	1199				

A. tequilana Weber						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Posición	11531,241	399	28,900	1,102	1,280E-01	1,151
Corte	5003,873	2	2501,937	95,406	7,059E-38	3,007
Error	20926,810	798	26,224			
Total	37461,924	1199				

C. Resultado de ANOVA para Df en Hoja

A. angustifolia Haw						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Posición	1.203,078	399	3,015	0,998	5,065E-01	1,151
Corte	765,560	2	382,780	126,665	1,680E-48	3,007
Error	2.411,554	798	3,022			
Total	4.380,192	1.199				
A. tequilana Weber						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Posición	784,545	399	1,966	1,037	3,358E-01	1,151
Corte	385,822	2	192,911	101,693	4,561E-40	3,007
Error	1.513,798	798	1,897			
Total	2.684,165	1.199				

D. Resultado de ANOVA para LM en Hoja

<i>A. angustifolia</i> Haw						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	1731,660	399	4,340	0,826	9,849E-01	1,151
Corte	1197,097	2	598,549	113,944	2,952E-44	3,007
Error	4191,883	798	5,253			
Total	7120,640	1199				

<i>A. tequilana</i> Weber						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	784,545	399	1,966	1,037	3,358E-01	1,151
Corte	385,822	2	192,911	101,693	4,561E-40	3,007
Error	1513,798	798	1,897			
Total	2684,165	1199				

E. Resultado de ANOVA para Fc en Hoja

<i>A. angustifolia</i> Haw						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	702,690	399	1,761	0,927	0,806	1,151
Corte	6,311	2	3,155	1,660	0,191	3,007
Error	1516,508	798	1,900			
Total	2225,508	1199				

A. tequilana Weber						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	1427,246	399	3,577	1,121	0,020	1,151
Corte	4,950	2	2,475	0,824	0,439	3,007
Error	2396,326	798	3,003			
Total	3828,522	1199				

F. Resultado de ANOVA para Ff en Hoja

A. angustifolia Haw						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	1,310	399	0,003	0,939	0,763	1,151
Corte	0,004	2	0,002	0,536	0,585	3,007
Error	2,790	798	0,003			
Total	4,103	1199				
A. tequilana Weber						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	2,166	399	0,005	1,151	0,046	1,151
Corte	0,002	2	0,001	0,237	0,789	3,007
Error	3,752	798	0,005			
Total	5,920	1199				

G. Resultado de ANOVA para Dfp y Dfa de las hojas

Dfp						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Cortes	4,131E-06	2	2,065E-06	0,001	0,998	19
Especie	0,029	1	0,028	22,951	0,0409	18,519
Error	0,002	2	0,001			
Total	0,0309	5				
Dfa						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Cortes	0,003	2	0,0014	10,536	0,086	19
Especie	0,009	1	0,0017	12,446	0,071	18,512
Error	0,0002	2	0,0001			
Total	0,0049	5				

H. Resultado de ANOVA para los descriptores morfométricos del tallo de *A. angustifolia* Haw

<i>A. angustifolia</i> Haw						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	82,940	3	27,647	2,566	8,668E-02	3,160
Cortes	8745,239	6	1457,540	135,265	5,635E-14	2,661
Error	193,957	18	10,775			
Total	9022,136	27				

A. tequilana Weber						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Posición	61,134	3	20,378	2,803	6,94E-02	3,160
Cortes	5118,874	6	853,146	117,351	1,95E-13	2,661
Error	130,860	18	7,270			
Total	5310,868	27				

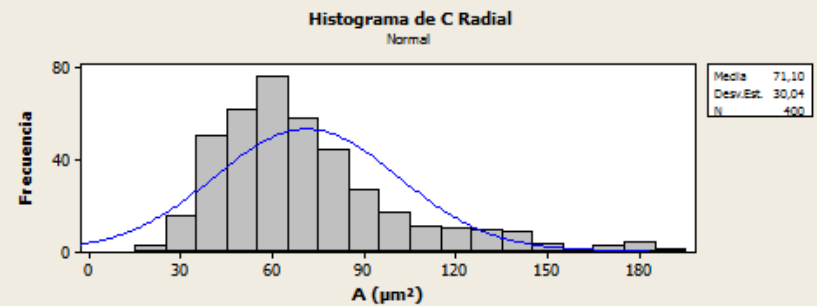
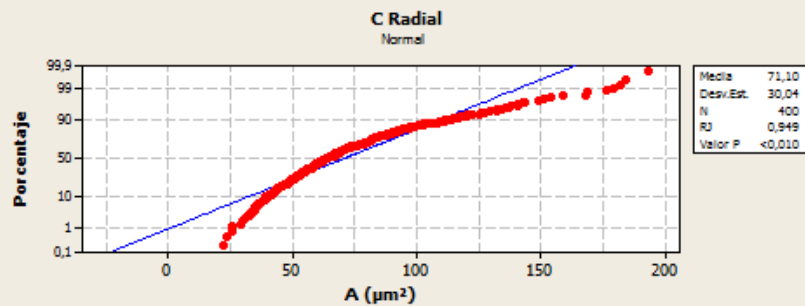
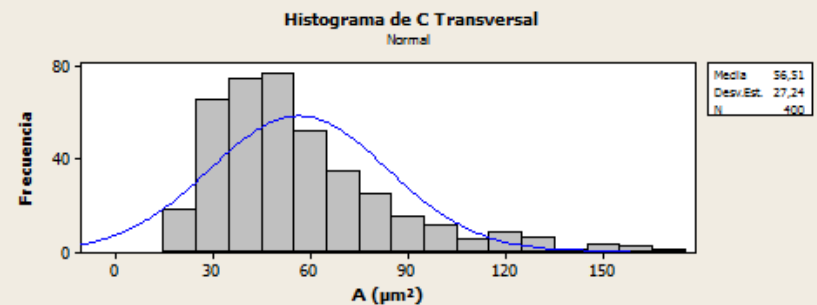
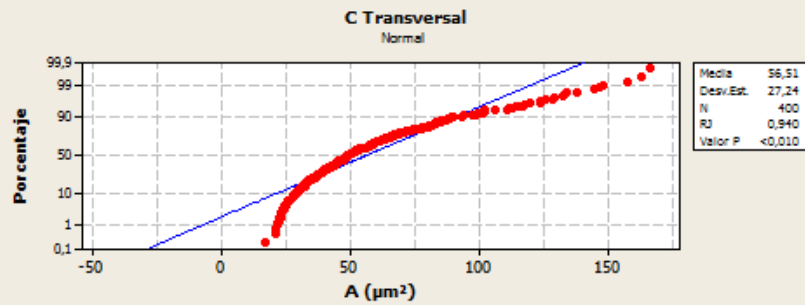
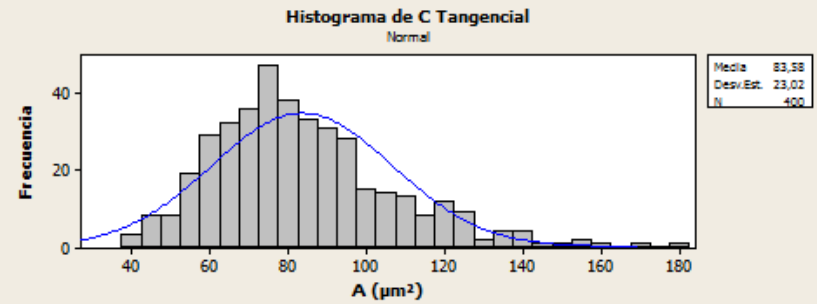
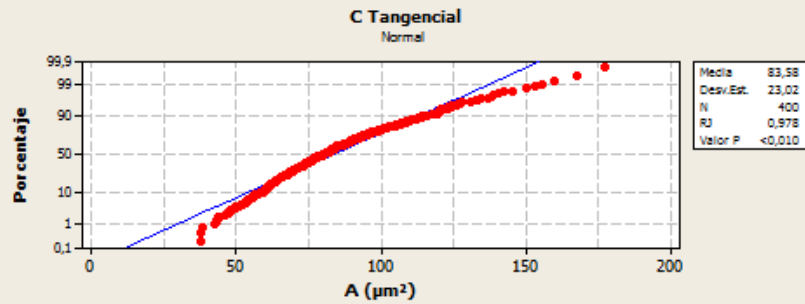
I. Resultado de ANOVA para los descriptores morfométricos del tallo de A. tequilana Weber

ANOVA Tallo						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Especie	283,030	7,000	40,433	2,887	1,48E-02	2,237
Descriptores	13600,783	6,000	2266,797	161,874	2,17E-27	2,324
Error	588,147	42,000	14,003			
Total	14471,960	55,000				

J. Graficas de Normalidad e Histogramas

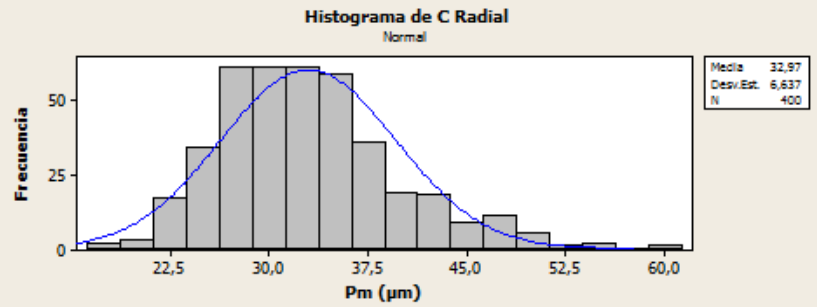
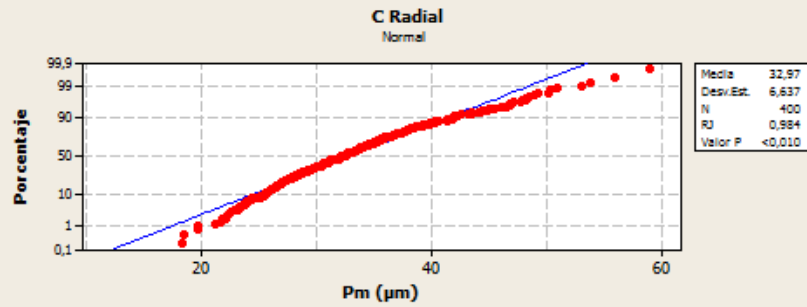
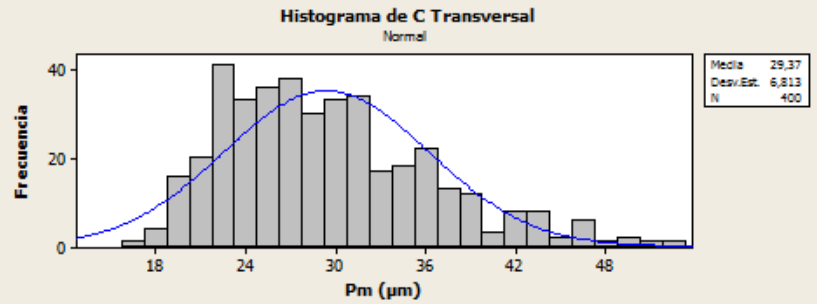
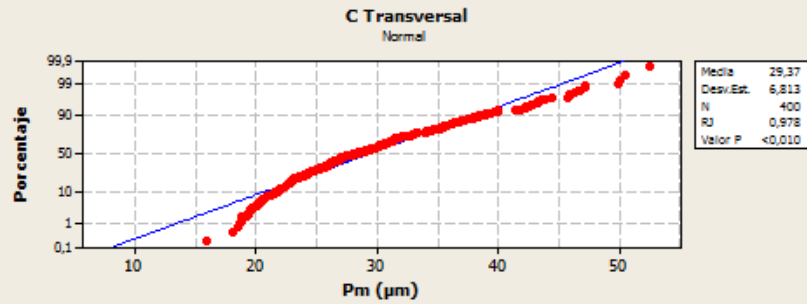
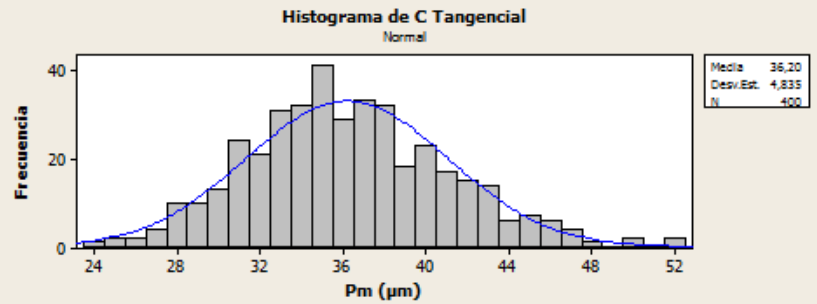
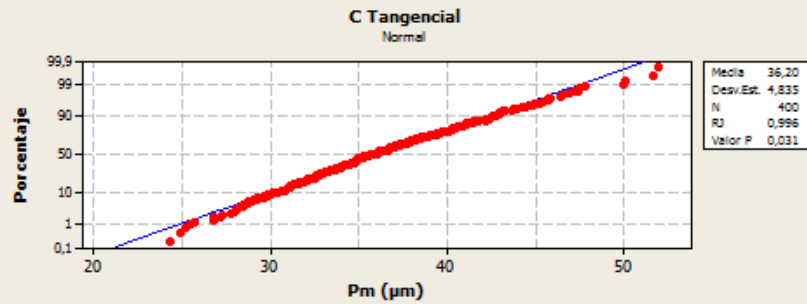
A Hoja

A. angustifolia Haw

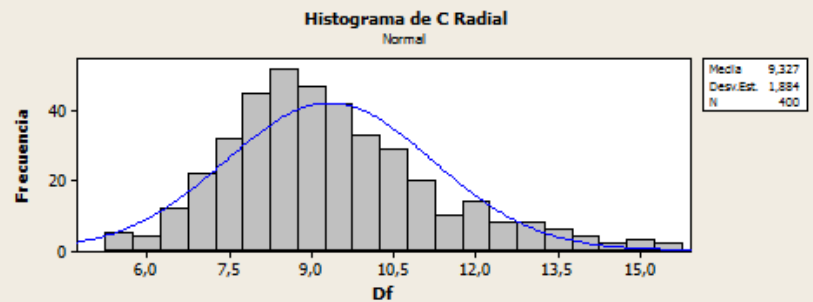
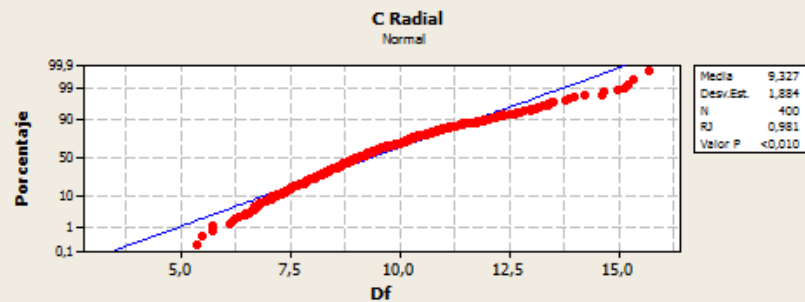
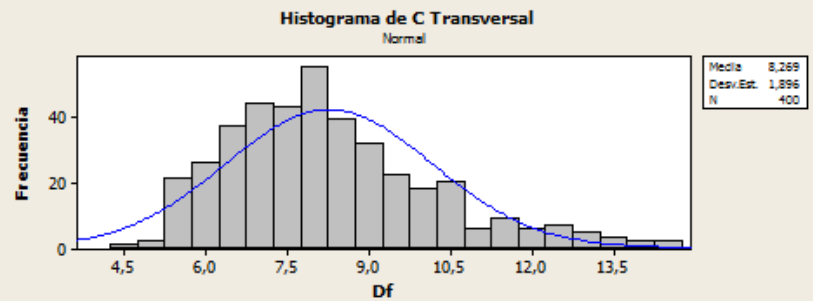
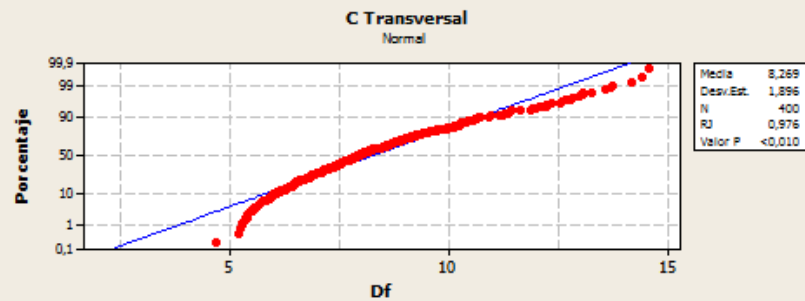
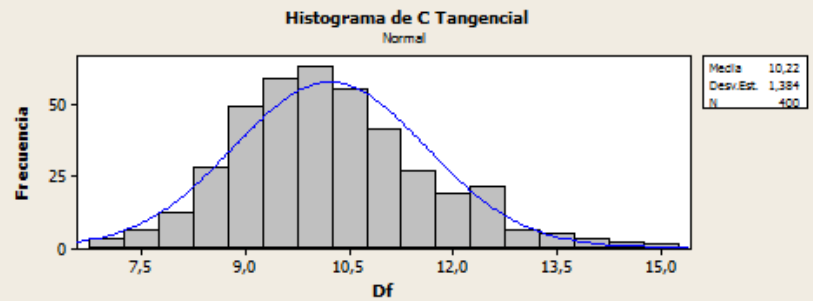
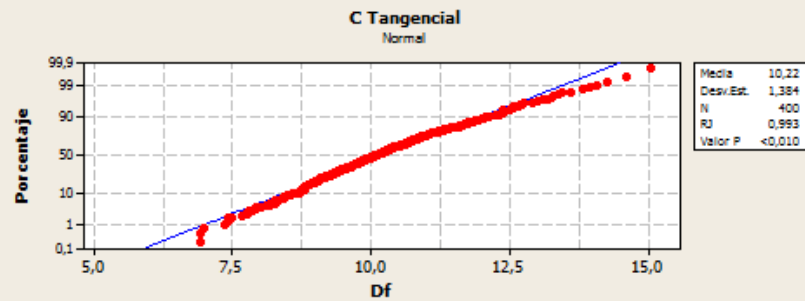


Pm Hoja

A. angustifolia Haw

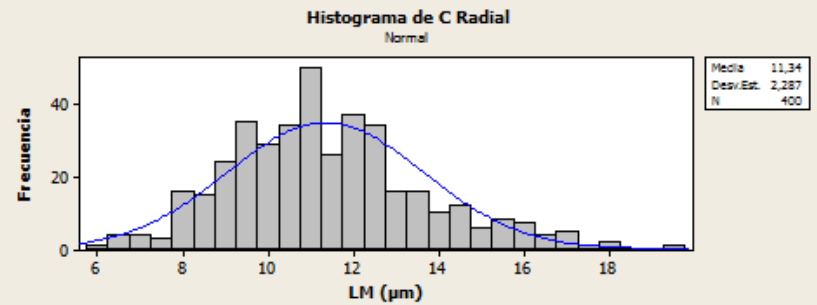
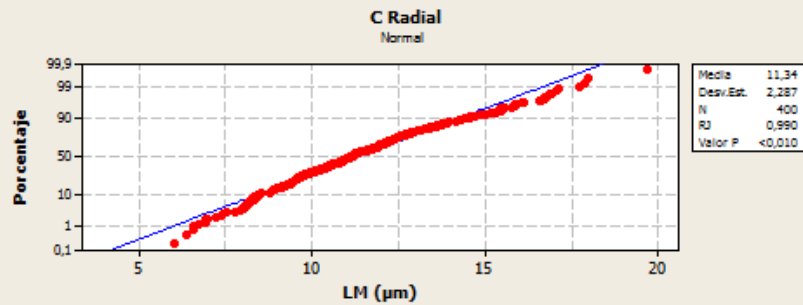
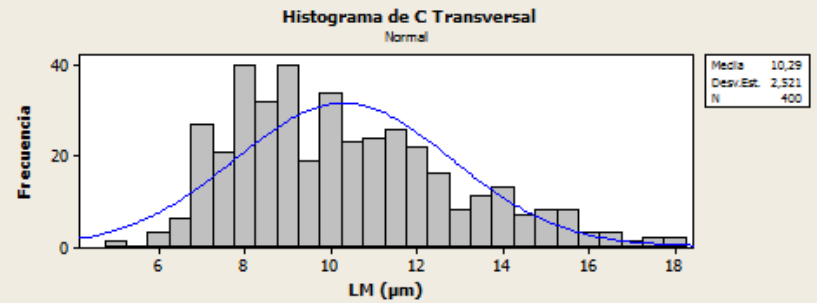
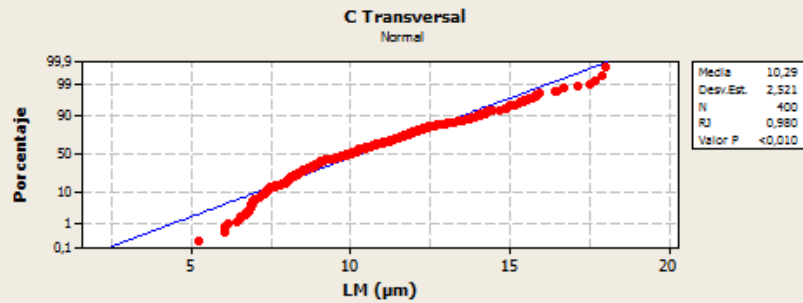
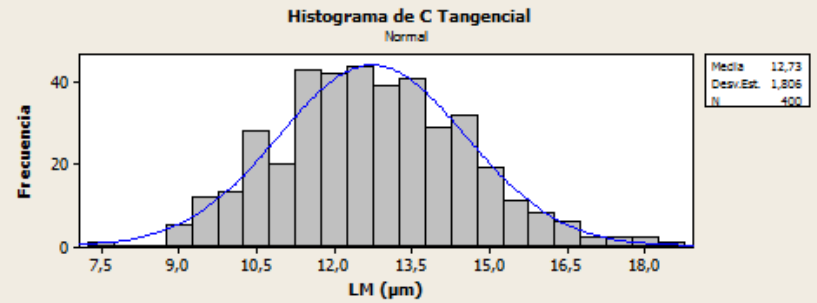
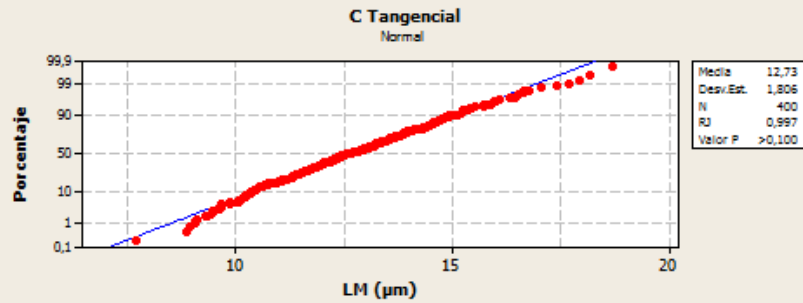


Df Hoja A. angustifolia Haw



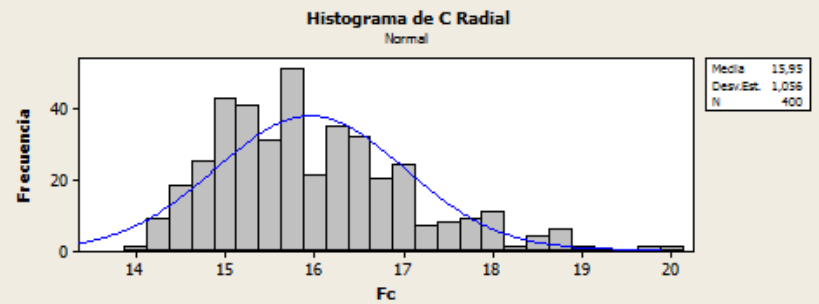
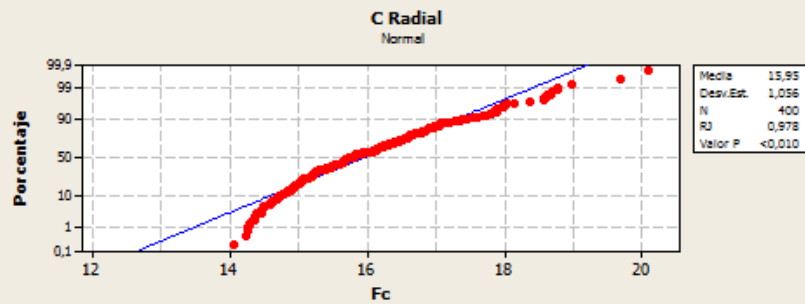
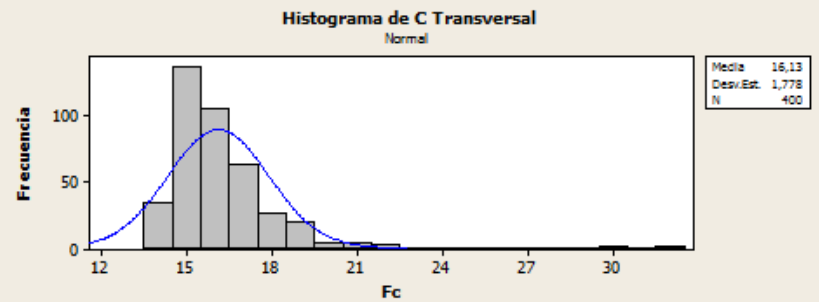
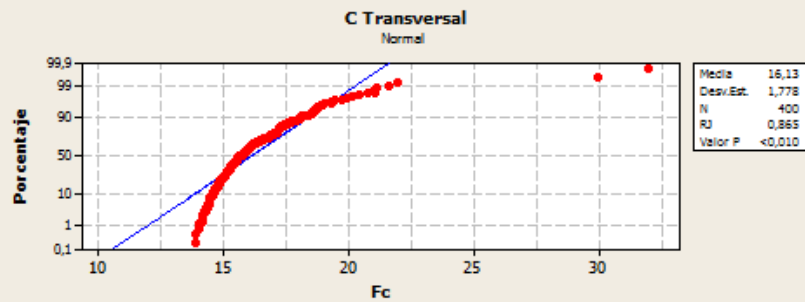
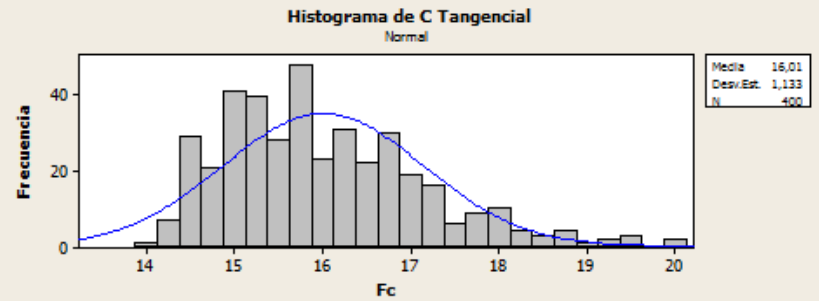
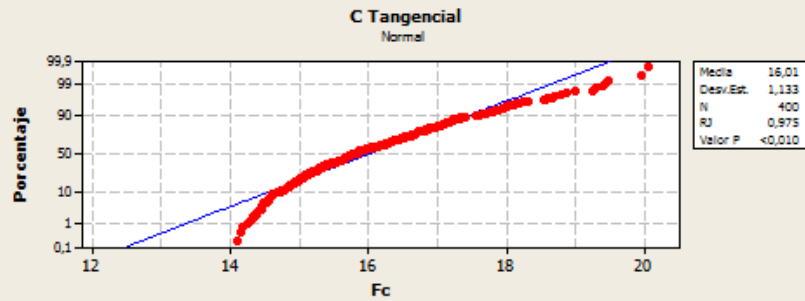
LM Hoja

A. angustifolia Haw



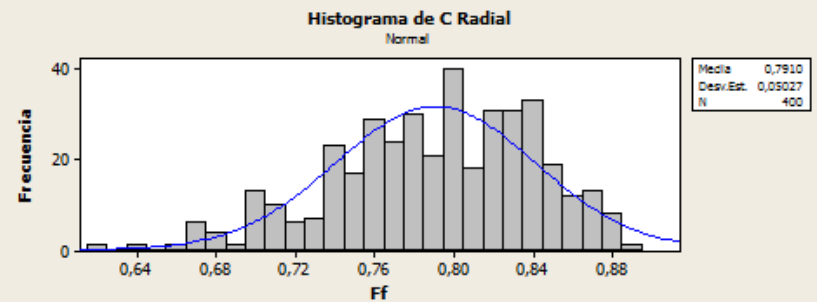
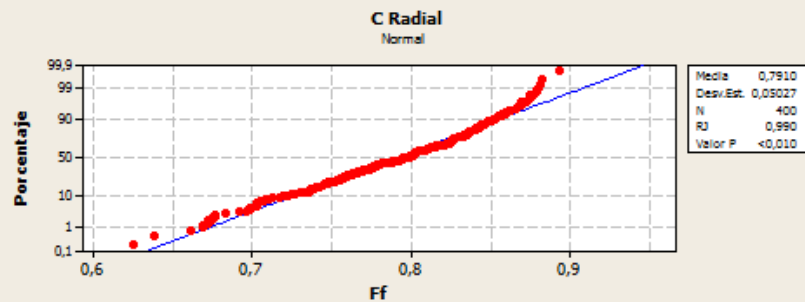
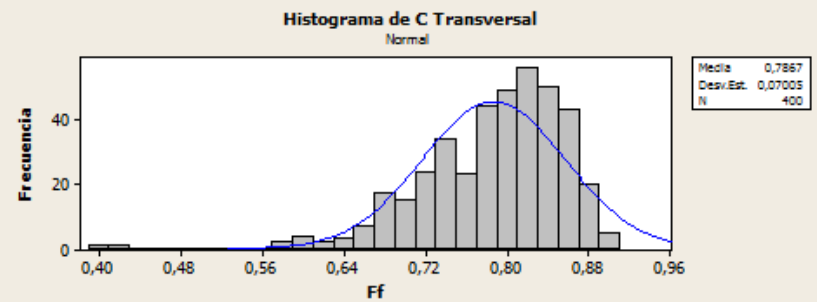
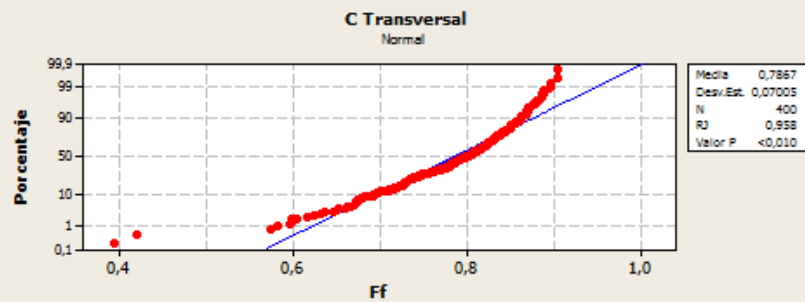
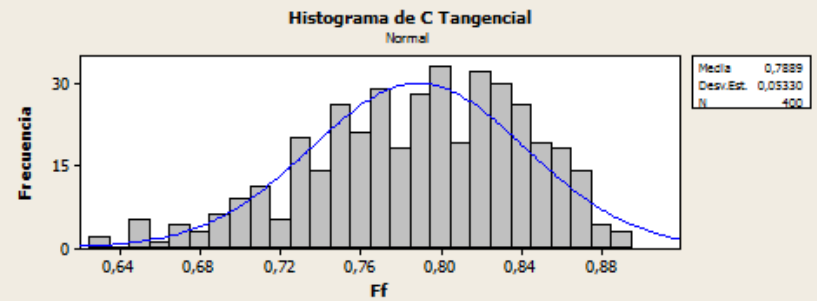
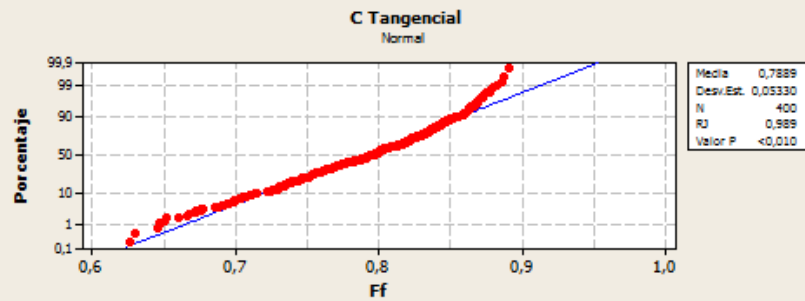
Fc Hoja

A. angustifolia Haw



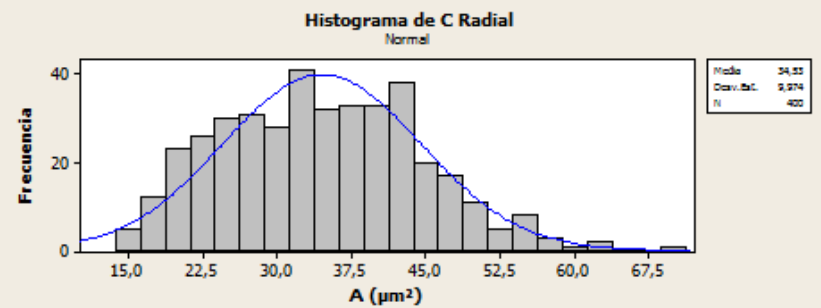
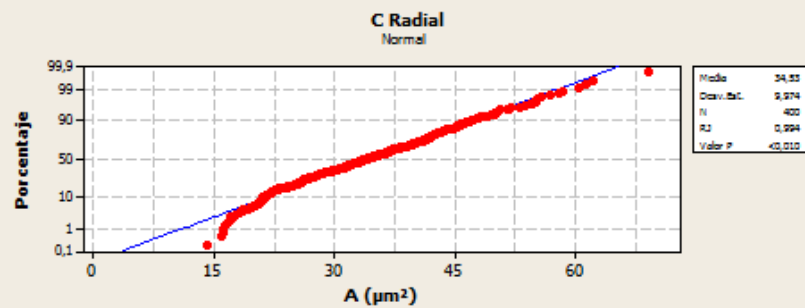
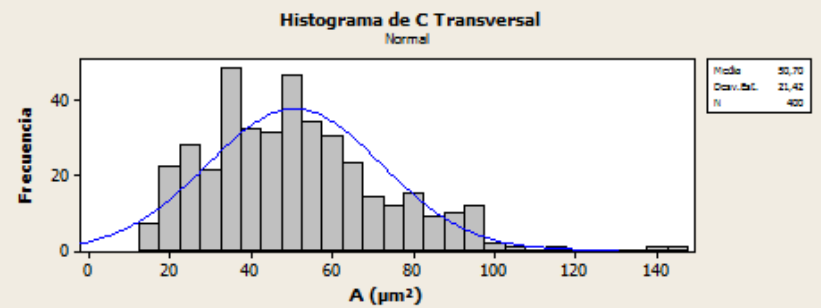
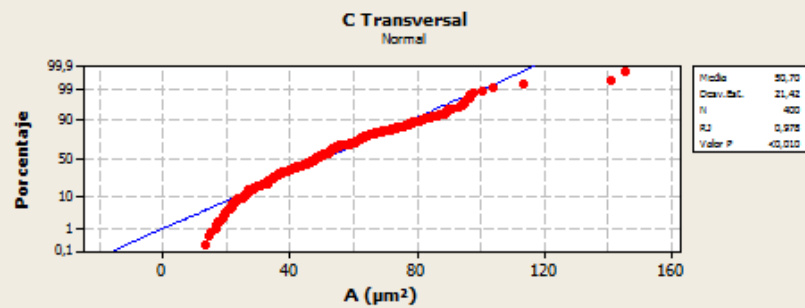
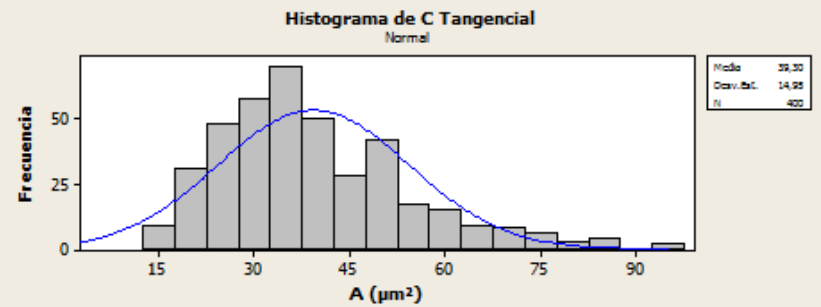
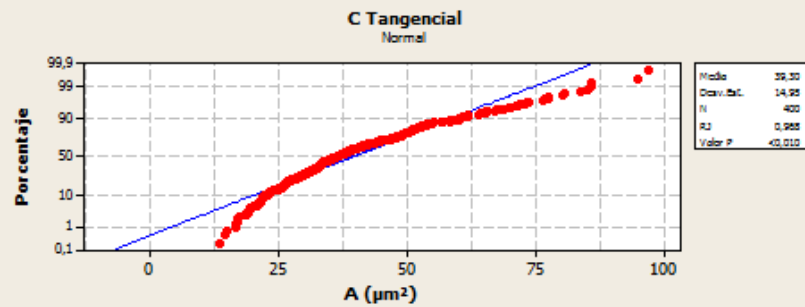
Ff Hoja

A. angustifolia Haw



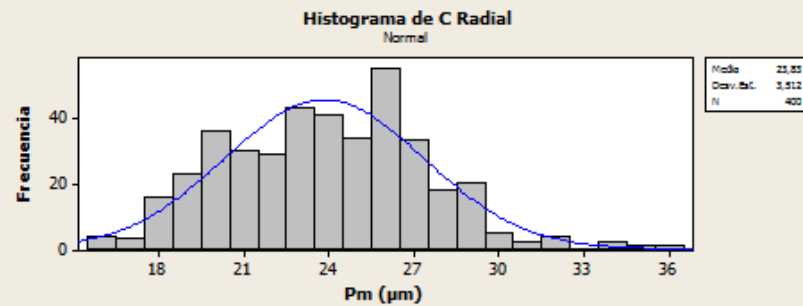
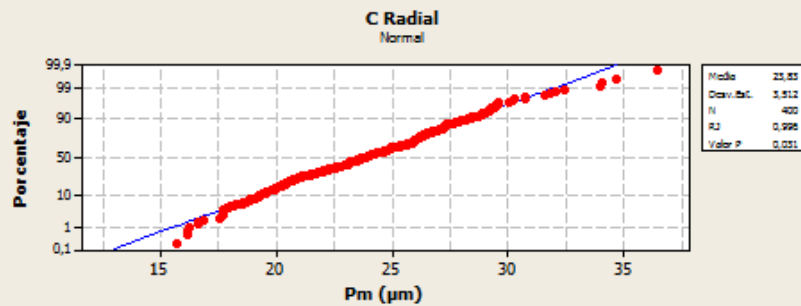
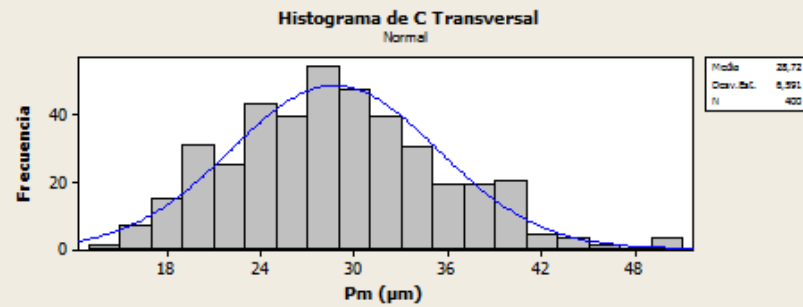
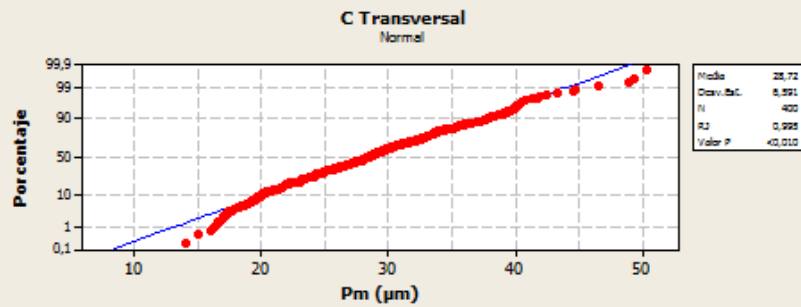
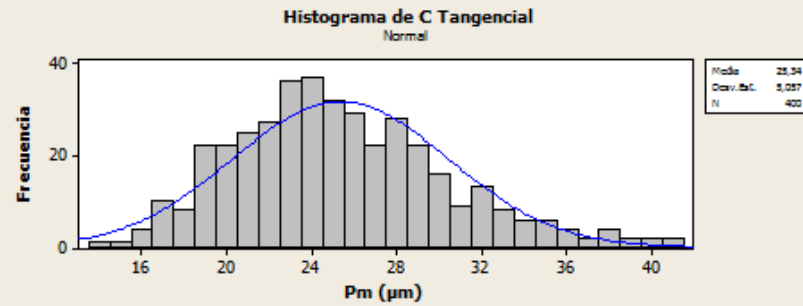
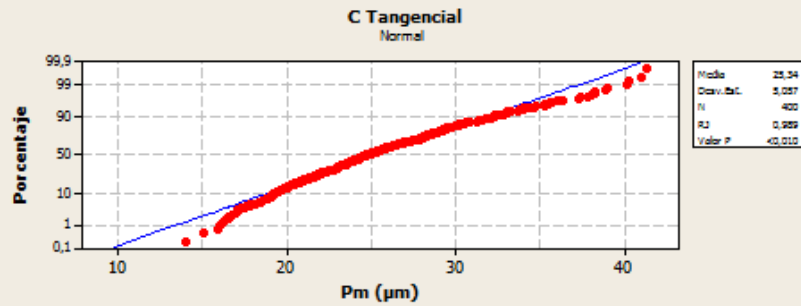
A Hoja

A. tequilana Weber

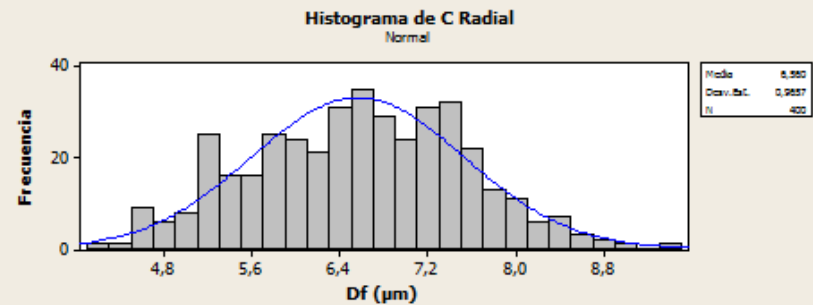
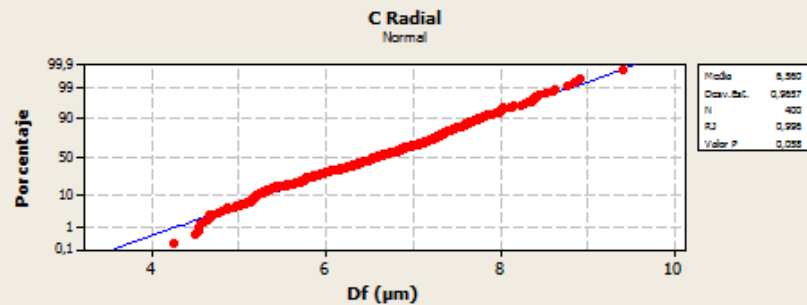
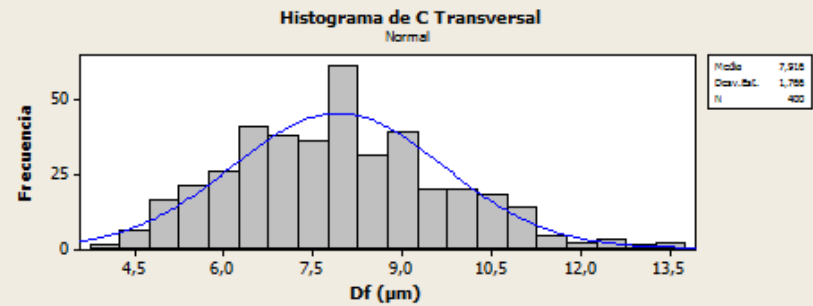
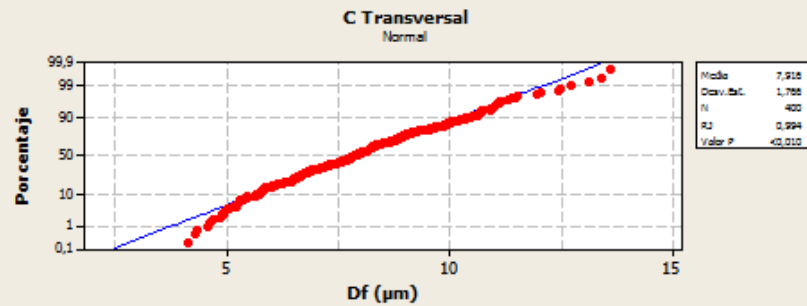
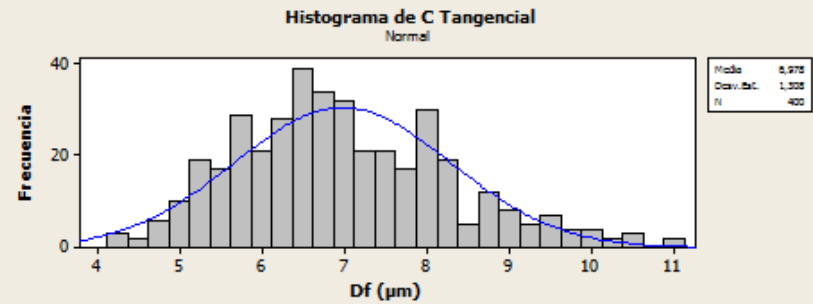
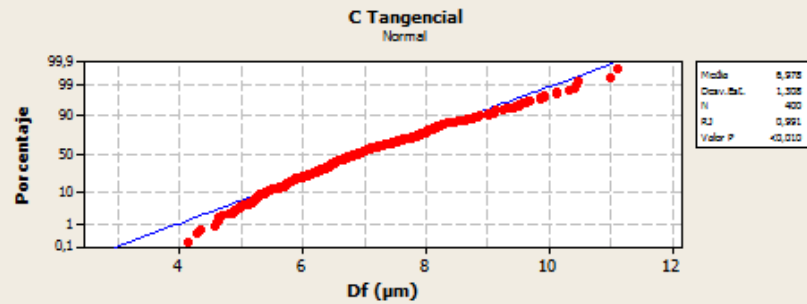


Pm Hoja

A. tequilana Weber

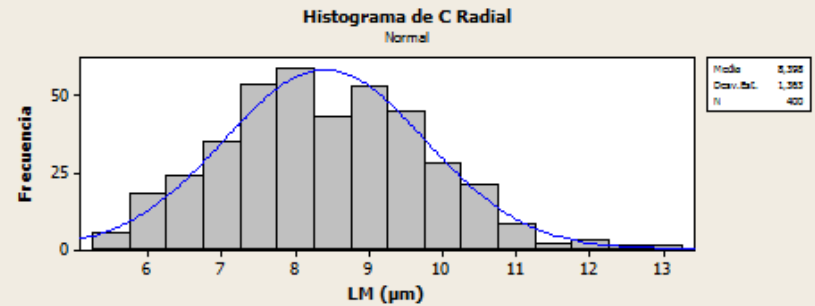
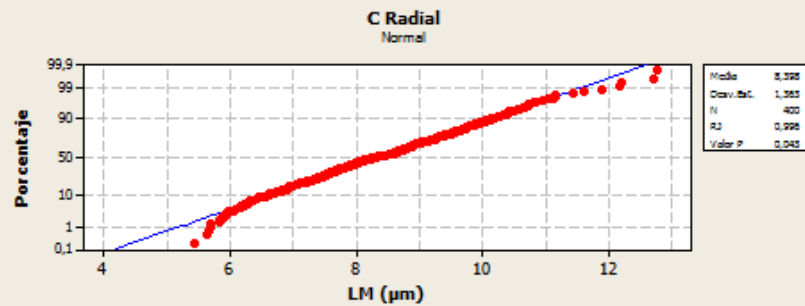
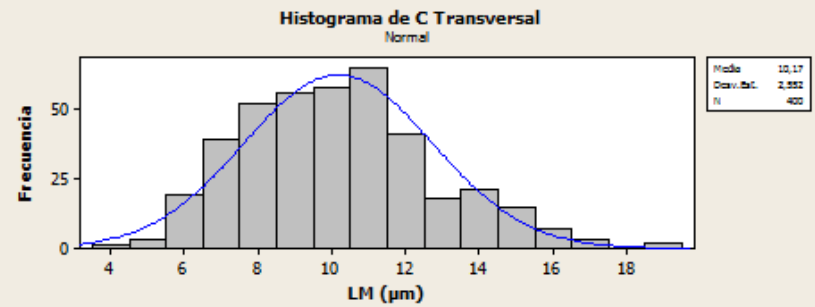
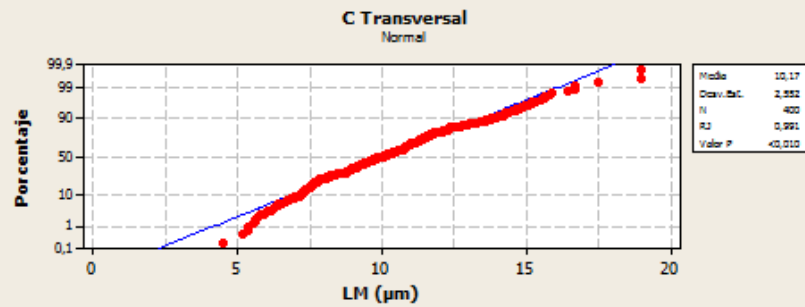
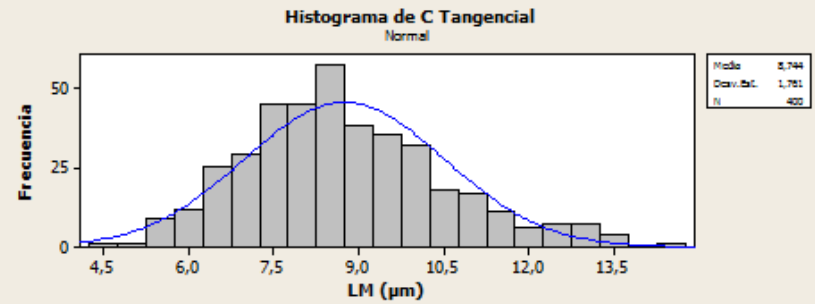
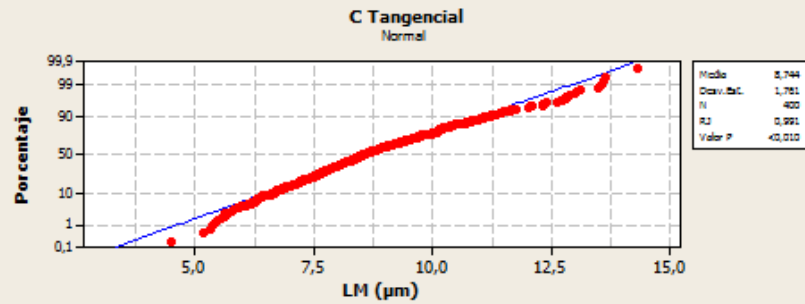


Df Hoja A. tequilana Weber



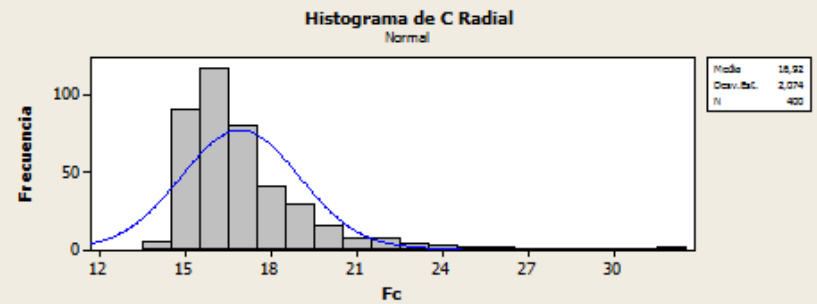
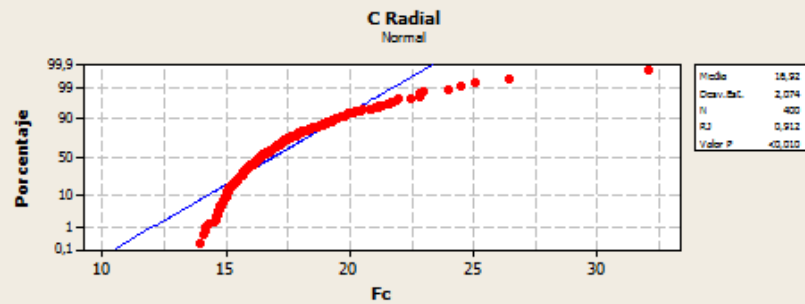
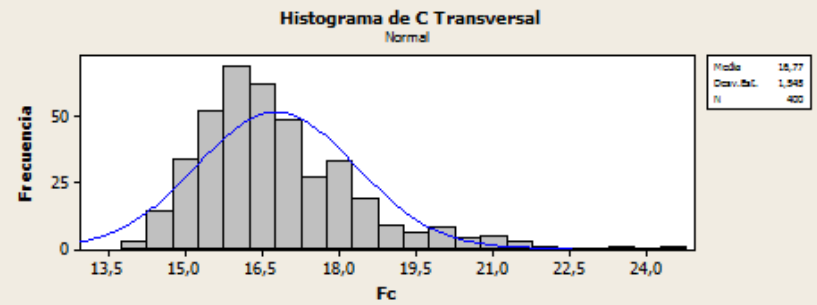
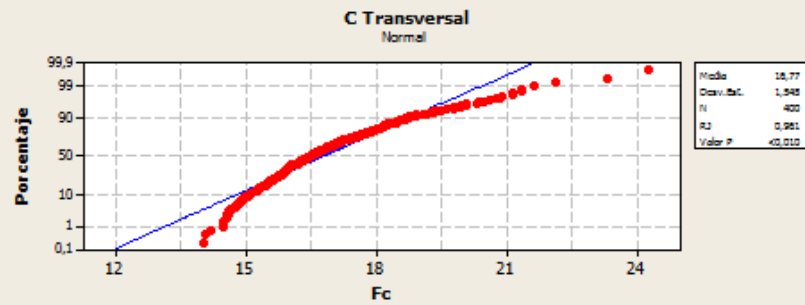
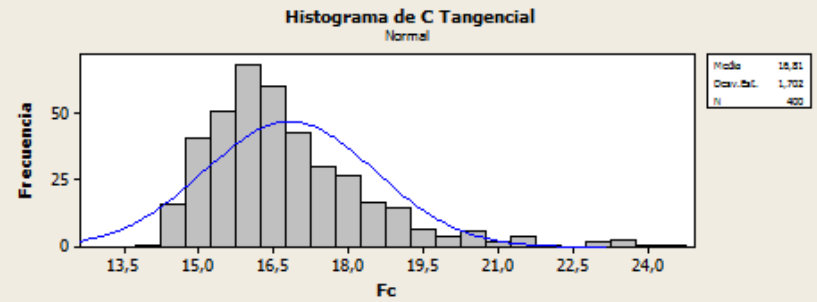
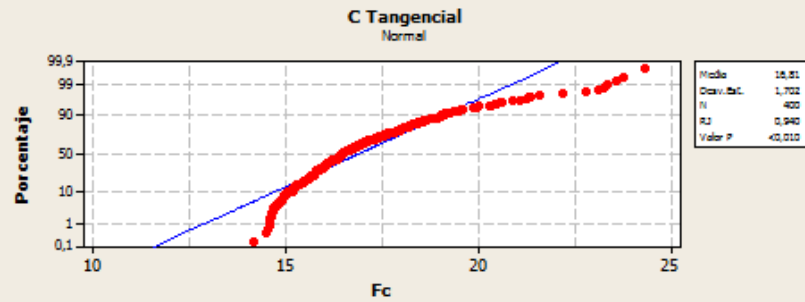
LM Hoja

A. tequilana Weber



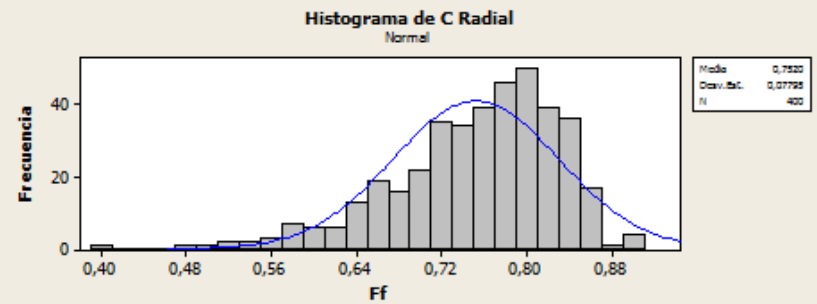
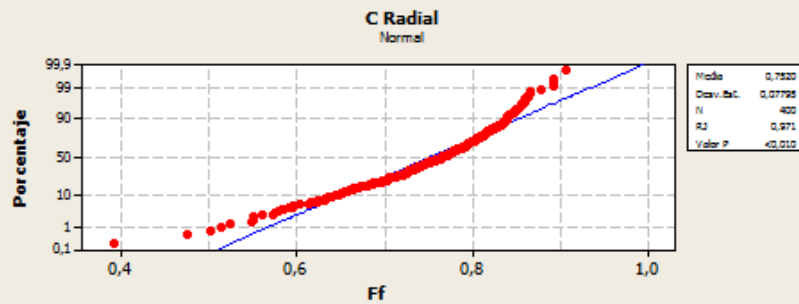
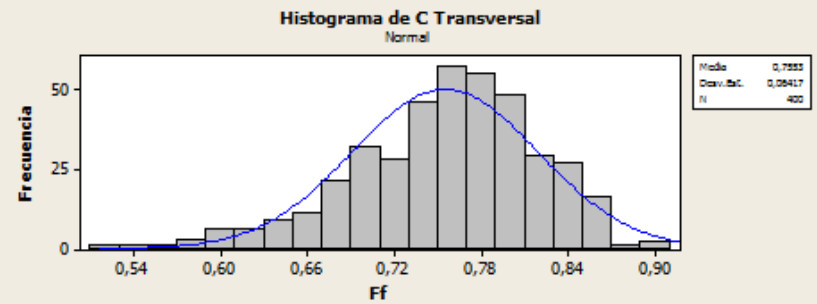
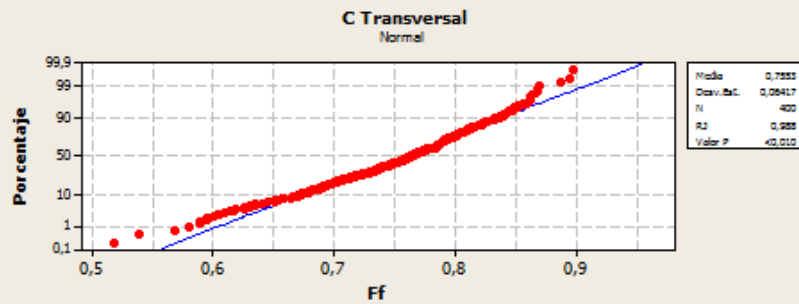
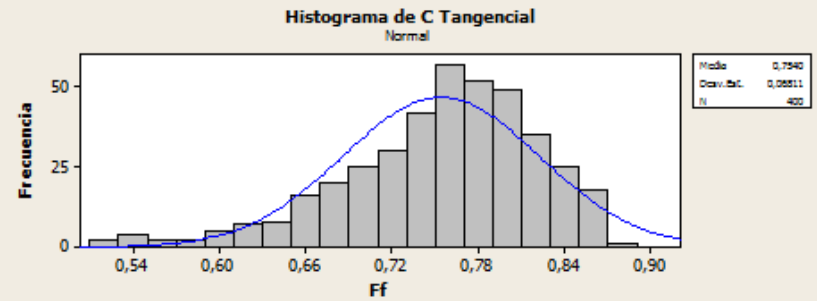
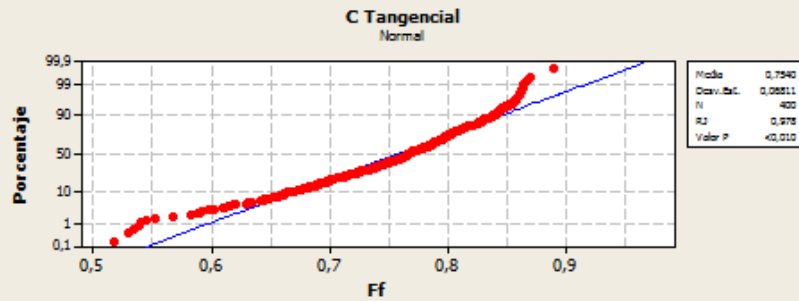
Fc Hoja

A. tequilana Weber



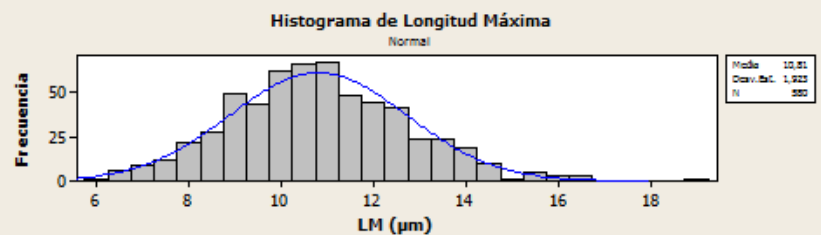
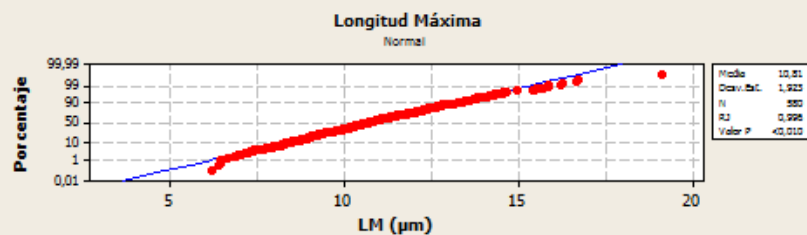
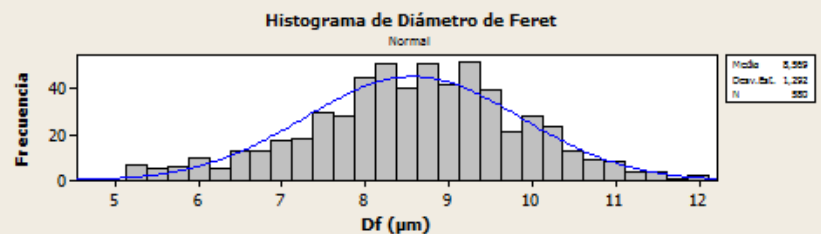
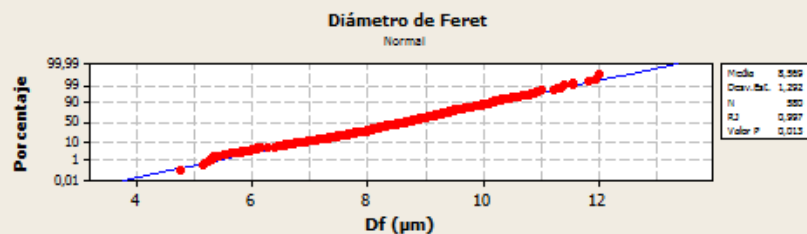
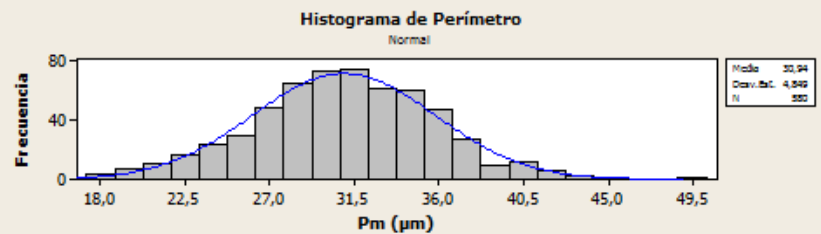
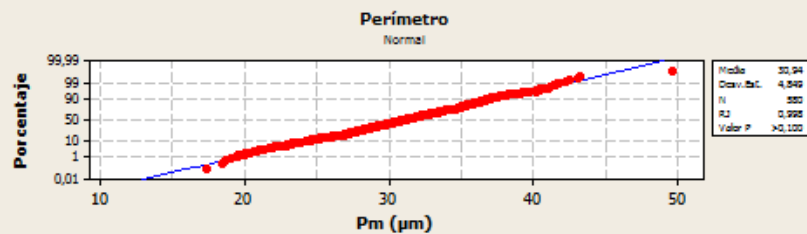
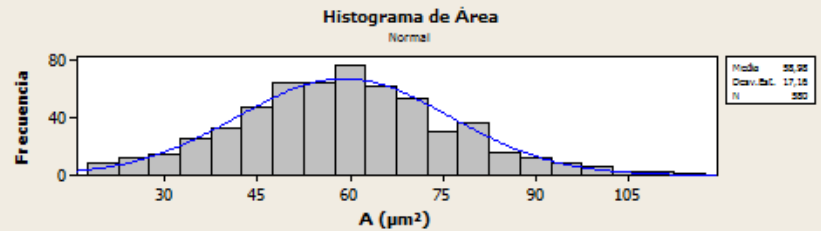
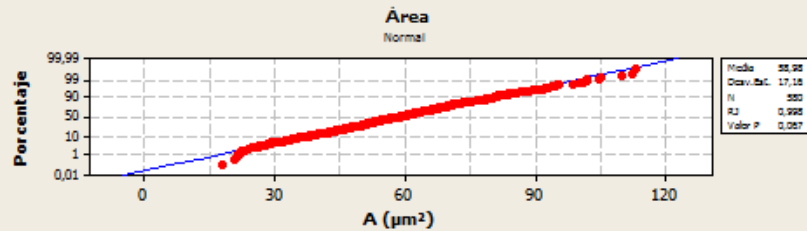
Ff Hoja

A. tequilana Weber



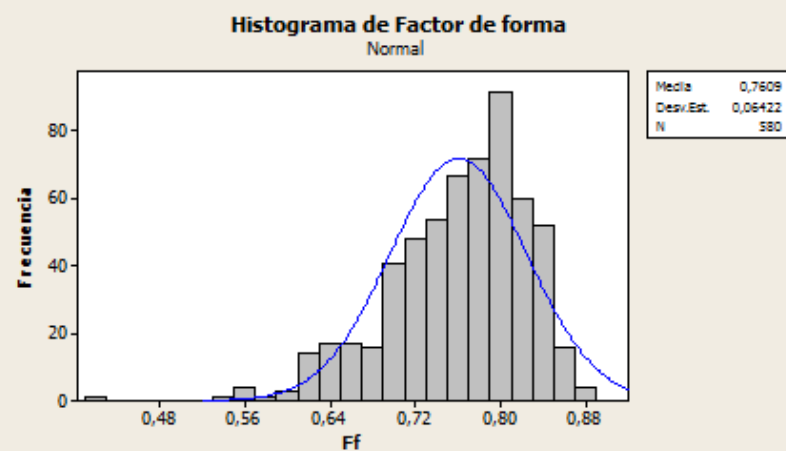
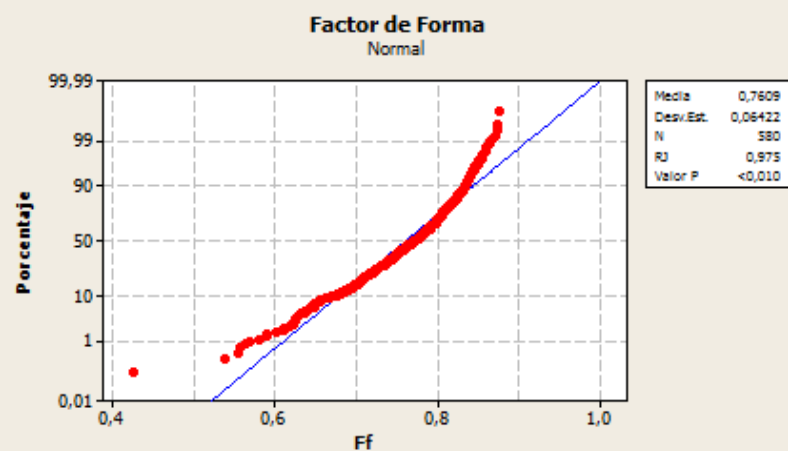
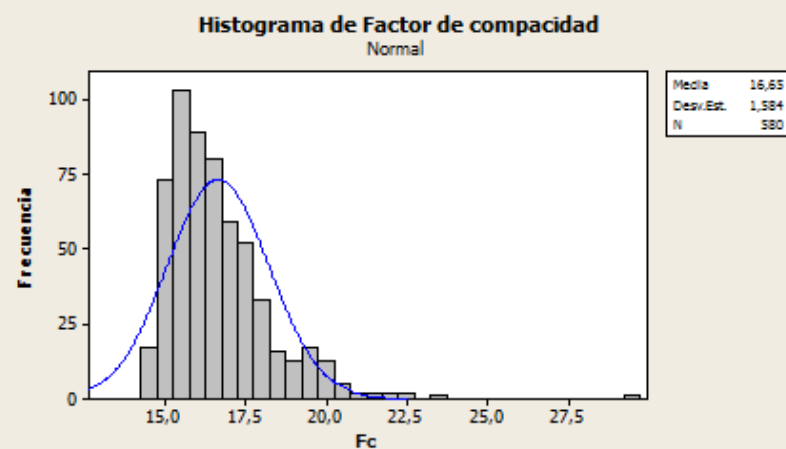
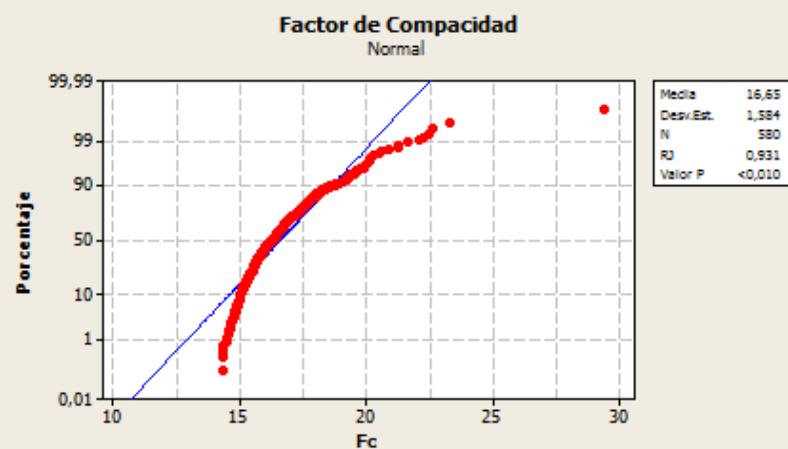
A. angustifolia Haw (Tallo)

Descriptores Dimensionales



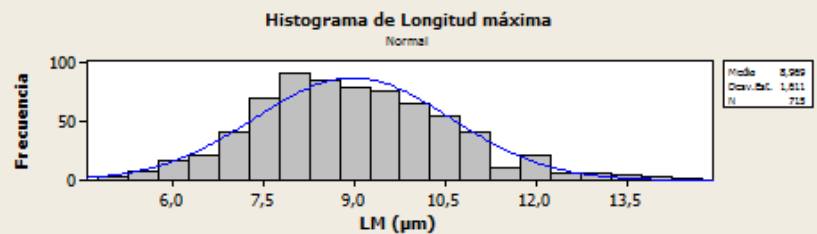
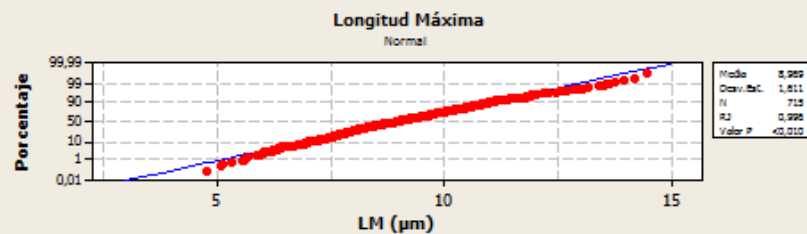
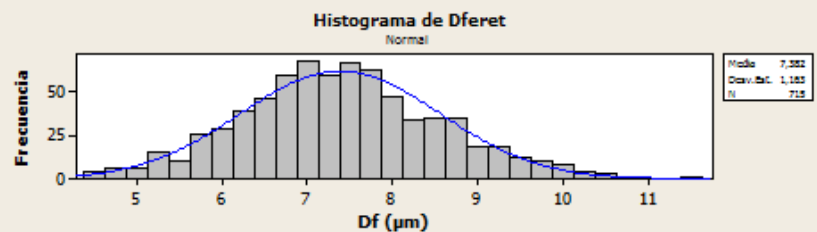
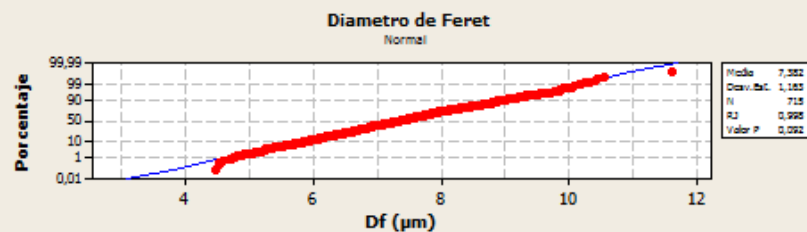
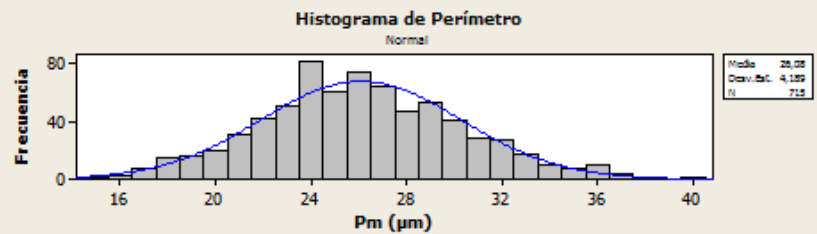
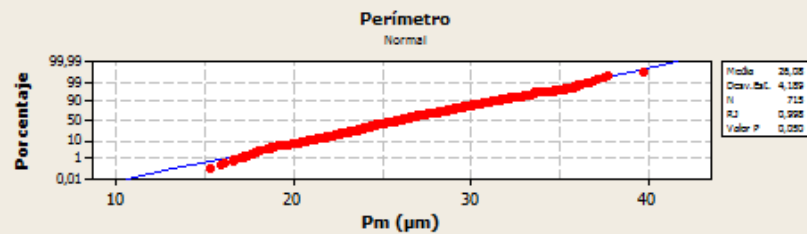
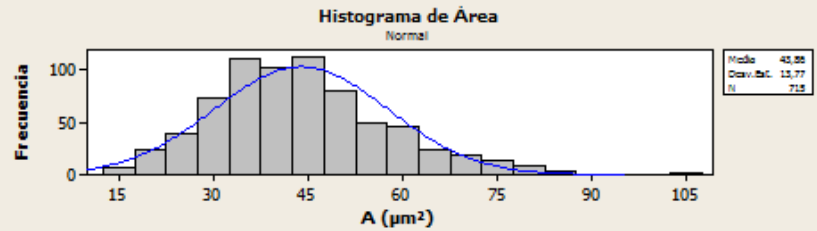
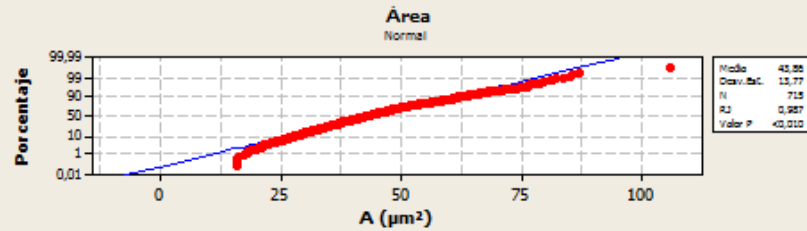
A. anstifolia Haw (Tallo)

Descriptores Adimensionales



A. tequilana Weber (Tallo)

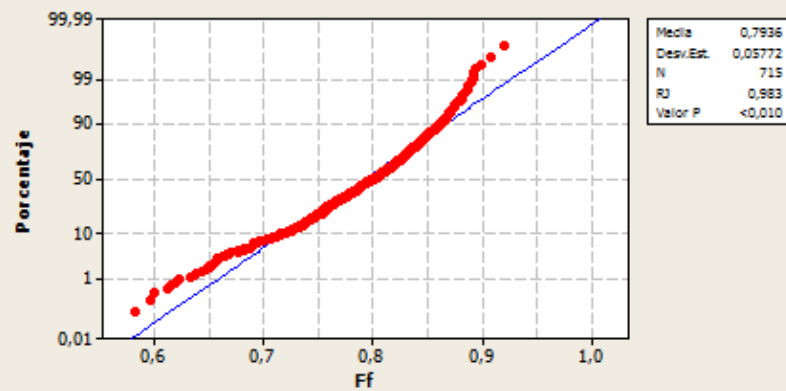
Descriptores Dimensionales



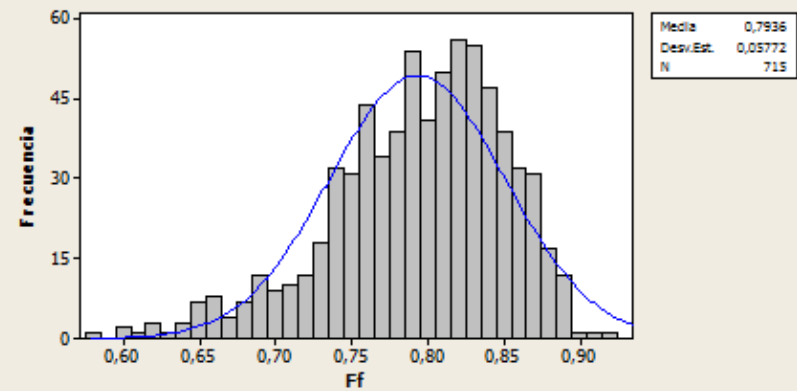
A. tequilana Weber (Tallo)

Descriptores Adimensionales

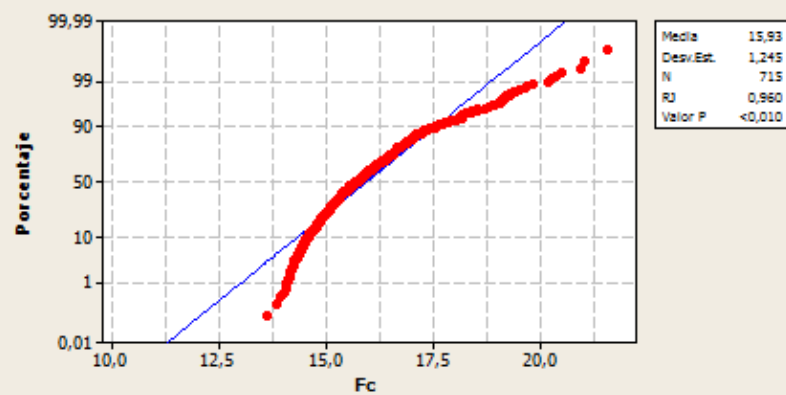
Factor de Forma
Normal



Histograma de Factor de forma
Normal



Factor de Compacidad
Normal



Histograma de Factor de Compacidad
Normal

