

Descripción de las microestructuras superficiales de algunas especies de orquídeas con hidrorepelencia en busca de patrones de estructuras superhidrofóbicas

**Tesis presentada para optar por el título de Licenciatura en Biología con énfasis en Biología
Molecular y Biotecnología**

Escuela de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad de Costa Rica

Luis Diego Barrantes Rodríguez

2016

Miembros del tribunal

Dr. Javier Trejos Zelaya
Decano Facultad de Ciencias

Licda. Marisol Jiménez Chavarría
Directora del Trabajo Final de Graduación

Dr. Axel Retana Salazar
Miembro del Comité Asesor

M.Sc. Alexander Rodríguez Arrieta
Miembro del Comité Asesor

M.Sc. Ethel Sanchez Chacón
Miembro del tribunal

Luis Diego Barrantes Rodríguez
Postulante

Agradecimientos

Un gran agradecimiento a mi familia por su apoyo incondicional a través de todo el proceso, sin el cual este trabajo no sería posible. Un gran agradecimiento también al comité asesor por toda su ayuda y asesoramiento durante el proceso de investigación, así como al personal del CIEMIC y del Jardín Botánico Lankester por su colaboración con el proyecto y su apoyo logístico. Muchas gracias a todos.

Índice General

Introducción	1
Antecedentes	2
Historia de la biomimesis	2
Humectación y superhidrofobicidad	3
Nuevos materiales superhidrofóbicos	7
Justificación	9
Objetivos	11
Materiales y métodos	11
Resultados	12
Discusión	33
Conclusiones y recomendaciones	40
Referencias	41

Resumen

El hombre desde sus orígenes ha demostrado una tendencia a descubrir y aprender de su ambiente por medio de la imitación y la interpretación, resultando en un nuevo campo de la ciencia: la biomimesis, definida en la década de 1950 como la transferencia de ideas y análogos de la biología a la tecnología. Este campo emergente permite emular propiedades biológicas que pueden provenir de interacción entre la morfología de las superficies y sus propiedades químicas o físicas, para el desarrollo de nanomateriales y nanodispositivos. En superficies superhidrofóbicas, las gotas de agua tienden a formar una esfera y a rodar fácilmente con un ángulo de inclinación bajo, arrastrando partículas contaminantes. La medición del ángulo de contacto de una gota entre la interfase líquido/vapor y la superficie sólida es el método principal de caracterización de la humectabilidad de las superficies. Se determinó el grado de hidrorepelencia de estructuras florales de algunas especies de la familia Orchidaceae, cuyo ángulo de contacto varió entre 75° y 137° . También se identificaron patrones de ordenamiento de micro y nano estructuras en dichas superficies, observándose variedad en cuanto a tricomas, papilas, cera epicuticular, densidad de dichas estructuras y su ordenamiento espacial, detalles de la ultraestructura superficial que causarían el fenómeno de hidrorepelencia en las plantas analizadas. Aunque no se encontraron órganos florales superhidrofóbicos, los resultados indican que las plantas pertenecientes a la familia Orchidaceae poseen potencial de poseer estructuras súper hidrofóbicas de interés, lo que da pie a más investigaciones en diferentes aspectos de las superficies florales de orquídeas.

Introducción

El hombre, desde sus orígenes, ha demostrado una tendencia a descubrir y aprender de su ambiente. En este proceso se han experimentado adaptaciones y desarrollado habilidades para cubrir sus necesidades por medio de la imitación, la interpretación y utilizando las oportunidades de la naturaleza. Este proceso de aprendizaje, adaptación y diseño resultó en un nuevo campo de la ciencia: la biomimesis (Arslan & Sorguc 2004). Este nuevo campo involucra usar ideas de la naturaleza para desarrollar sistemas artificiales que copian o emulan algunas de las funciones de las naturales u originales (Pérez & Gómez 2009). De este modo, esta disciplina estudia las mejores “ideas” o adaptaciones de la naturaleza e imita estos diseños y procesos para resolver problemas en campos que van desde la manufactura, medicina, ingeniería, hasta la tecnología de la información (Arslan & Sorguc 2004).

Las características de interés que se busca imitar o emular, surgen al analizar las adaptaciones de diferentes a diferentes ambientes, las cuales han derivado en una enorme variación estructural, como por ejemplo, en el desarrollo de interfaces protectoras y multifuncionales. Las propiedades de estas superficies frecuentemente son deseables para su aplicación en una amplia variedad de materiales artificiales biológicamente inspirados (Koch & Barthlott 2009), y gracias al reciente desarrollo de la ingeniería molecular y a nanoescala, y los avances en biología molecular, la biomimesis está entrando en la micro y nanoescala. Combinando las herramientas moleculares de la naturaleza con construcciones a nanoescala, la biomimesis molecular emerge como una metodología híbrida (Sariyaka et al. 2003).

Uno de los campos activos de investigación se enfoca en la diversidad de las estructuras de superficies vegetales, la cual se basa en la variabilidad de las formas celulares, micro y nano estructuras en la superficie celular, y en la formación de estructuras multicelulares (Koch & Barthlott 2009). Estas estructuras les proporcionan a las superficies propiedades particulares y de interés, como por ejemplo, superhidrofobicidad, el cual es uno de los fenómenos que llaman la atención de diversos grupos de investigación actualmente (Marmur 2004). La gran eficiencia de este tipo de fenómenos de superficies vegetales se debe al hecho de que el curso de la naturaleza los lleva a evolucionar por selección natural, un mecanismo exhaustivo de prueba y error que ha tomado mucho tiempo para depurar sus diseños, acumulando adaptaciones y mejorías (Pérez & Gómez 2009).

En este tipo de superficies superhidrofóbicas, las gotas de agua tienden a formar una esfera y a rodar fácilmente con un ángulo de inclinación bajo (Bhushan 2009). Cuando las gotas de agua ruedan completamente fuera de la hoja, arrastran partículas contaminantes no deseadas (Marmur

2004; Guo & Liu 2007; Xi & Jiang 2008). La habilidad de la hoja de loto y otros materiales naturales de promover la repelencia al agua y la auto-limpieza induciendo a las gotas de agua a rodar fuera de la hoja, ha inspirado a numerosos grupos de investigación a preparar análogos sintéticos (Gao & McCarthy 2006). Este efecto es llamado efecto loto ya que, según tradiciones religiosas asiáticas, el loto es un símbolo de pureza. Esta idea proviene del hecho que las hojas de la planta de loto se encuentran siempre limpias, aunque la planta sea sacada de o se encuentre en agua fangosa. Esta tradición es tan antigua que se encuentra documentada inclusive en sánscrito (Barthlott & Neinhuis 1997).

Este fenómeno ha sido buscado y descrito en un gran número de plantas y de diferentes grupos taxonómicos, algunas de ellas bastante conocidas, como lo son *Nelumbo nucifera* (loto), *Persea americana* (aguacate), *Oryza sativa* (arroz), *Origanum amanum* (orégano), *Taxodium* sp. y *Metasequoia* sp. (ambas gimnospermas de la familia Taxodiaceae), *Picea abies* (Pinnaceae, gimnosperma) y *Ginkgo biloba* entre otras (Neinhuis & Barthlott 1997). También se ha descrito en helechos flotantes, como por ejemplo, especies del género *Salvinia*, los cuales tienen pelos hidrofóbicos que varían en tamaño entre especies. Estas superficies logran mantener aire retenido por varios días inclusive manteniendo las hojas bajo el agua (Bhushan 2009). *Colocasia esculenta* también presenta este efecto, y es una de las plantas más estudiadas en este aspecto (Arvind et al. 2009). Hoy se encuentra disponible una gran cantidad de datos acerca de la humectabilidad de las superficies vegetales (Neinhuis & Barthlott 1997).

Antecedentes

- Historia de la biomimesis

A pesar de que nuestros ancestros remotos ya observaban la naturaleza para obtener inspiración para el desarrollo de materiales y dispositivos, el término biomimesis es relativamente nuevo (Bhushan 2009). Fue acuñado por Otto Schmitt en la década de 1950, y se definió como la transferencia de ideas y análogos de la biología a la tecnología (Vincent et al. 2006). Se han usado otros términos, como biónica, biomimetismo y biognosis, para describir esta disciplina (Bhushan 2009). Ejemplos documentados de que los humanos han buscado inspiración en la naturaleza datan desde hace más de 3000 años, cuando en China se intentaba producir seda artificial (Vincent et al. 2006, Bhushan 2009). Otros ejemplos dignos de mención provienen de los estudios de Leonardo da Vinci en mecanismos para utilizar en medicina (Arslan & Sorguc 2004), así como el estudio del mecanismo del vuelo de las aves, el que le permitió proponer diseños de máquinas voladoras (Bhushan 2009).

Algunos inventos muy importantes también han sido inspirados por estructuras vegetales. Por ejemplo, el ala estable, diseñada en 1904, derivada de la voluminosa semilla alada de *Alsomira macrocarpa*, una liana propia de islas del Pacífico, la cual puede planear distancias significativas. El velcro es otro ejemplo; fue desarrollado a partir de las semillas con ganchos pequeños de *Arctium lappa* (Vincent et al. 2006) y es uno de los inventos basados en la arquitectura de la naturaleza más exitosos y populares en la actualidad. Las estructuras se enganchan en el pelo de los animales para dispersar las semillas largas distancias (Arvind et al. 2009). Actualmente muchos inventos influyentes, incluyendo los diseños de aeronaves, han sido inspirados por la naturaleza, y recientemente, la inteligencia artificial y la investigación en redes neurales se han inspirado en el deseo de emular inclusive el cerebro humano.

Otras características de interés lo son por ejemplo la superhidrofobicidad, autolimpieza, conversión y conservación de energía, adhesión alta y reversible, autoensamblaje, aislamiento térmico, irreflexión de la luz en los ojos de algunas polillas para su aplicación en pantallas anti-reflectivas, las micro y nanoestructuras jerárquicas de las escamas de los tiburones para reducir la fricción en el agua, el color estructural (sin pigmentos, por reflexión de luz) de algunas superficies de las alas de algunas mariposas y otros insectos para su aplicación en textiles, pinturas y dispositivos como los teléfonos celulares. Actualmente dichos fenómenos se estudian a micro y nanoescala, por medio del análisis de las superficies que los producen con técnicas de microscopía de alta resolución. Así, ahora este campo emergente de la biomimesis va permitiendo emular propiedades biológicas naturales, que pueden provenir de interacción entre la morfología de las superficies y sus propiedades químicas o físicas, para el desarrollo de nanomateriales y nanodispositivos (Bhushan 2009).

- Humectación y superhidrofobicidad

La humectación se define como el proceso fundamental de interacción de un líquido en interfaces sólido-gas, y describe cómo un líquido entra en contacto con una superficie sólida. La medición del ángulo de contacto (AC) de una gota entre la interfase líquido/vapor y la superficie sólida es el método principal de caracterización de la humectabilidad de las superficies (Koch & Barthlott 2009) y se utiliza como unidad para medir la humectabilidad de las mismas. El AC (denotado a menudo como Θ) de un líquido en una superficie es determinado por la relación entre las tensiones de las interfases agua/aire (γ^{wa}), agua/sólido (γ^{ws}) y sólido/aire (γ^{sa}). Un sólido con baja γ^{sa} es más difícil de humectar, y las gotas tienden a formar gotas semiesféricas con alto AC. Esta relación se describe en la ecuación de Young: $\gamma^{sa} - \gamma^{ws} = \gamma^{wa} \cos \Theta$ (Barthlott & Neinhuis 1997). De este modo, la humectabilidad depende de la razón entre la energía necesaria para el alargamiento de

la superficie del líquido y la ganancia de energía debida a la adsorción. Un AC alto describe una superficie hidrofóbica, en la cual una gota pequeña de agua toma una forma esférica, y el contacto real entre la gota pequeña y la superficie es muy poco (Koch & Barthlott 2009). Un AC de 0° significa humectabilidad completa, mientras que un AC de 180° significaría no-humectabilidad completa. Ninguno de estos casos se da en las superficies vegetales (Barthlott & Neinhuis 1997).

Dos criterios definen la superhidrofobicidad: un AC muy alto con el agua, y que una pequeña inclinación de la superficie sea necesaria para que la gota se deslice (Marmur 2004). Típicamente estas superficies presentan un AC de 150° o más (Qu et al. 2008) y un ángulo de inclinación necesario para que la gota ruede de 10° (Bhushan 2009). Dicha inclinación o ángulo de deslizamiento se expresa generalmente como histéresis, la diferencia entre el ángulo de contacto donde la gota avanza y el ángulo en donde se recoge (Feng et al. 2002, Bhushan 2009).

Las plantas constantemente deben hacerle frente al fenómeno de la humectabilidad. Por ello, todas las estructuras primarias de las plantas, excepto las raíces, se encuentran cubiertas por la cutícula, que es la interfase entre las plantas y el ambiente. Por su composición química cerosa en la mayoría de los casos forman una superficie hidrofóbica (Barthlott & Neinhuis 1997). Esta es una estructura que cubre casi todos los tejidos aéreos de las plantas, como una membrana extracelular continua. Está compuesta básicamente por un poliéster llamado cutina, el cual también posee ceras incrustadas o integradas (intracuticulares) y superimpuestas (epicuticulares). Las ceras epicuticulares juegan un papel importante en la estructuración de la superficie a nivel subcelular (Kunst & Samuels 2003; Koch & Barthlott 2009). En algunos casos las ceras epicuticulares pueden formar cristaloides que recubren la superficie exterior de la planta y le dan una apariencia blanquecina (Kunst & Samuels 2003).

Otras micro y nano estructuras como tricomas, pliegues cuticulares, además de dichos cristaloides de cera, se encuentran sobre la cutícula y tienen diferentes propósitos, y frecuentemente proveen una superficie hidro-repelente. Los cristaloides cubren la superficie cuticular en un microrelieve regular entre 1 y 5 μm de altura (Barthlott & Neinhuis 1997). Estas ceras vegetales son mezclas de hidrocarburos alifáticos y cíclicos así como sus derivados. Su composición química es altamente variable entre diferentes especies de plantas. De este modo, hay gran diversidad de posibles estructuras o sus combinaciones que podrían estar en las superficies vegetales. Tal diversidad se debe a la variabilidad de las formas celulares, micro y nano estructuras en la superficie celular, y por la formación de estructuras multicelulares (Koch & Barthlott 2009).

La variedad de las estructuras de superficie de las plantas han sido bien documentadas en microscopía electrónica de barrido durante las últimas dos décadas (Neinhuis & Barthlott 1997). Un primer tipo de estructuración superficial se puede atribuir a las ceras epicuticulares cristalinas, y estas ocurren en diferentes morfologías, las cuales surgen por medio de auto-ensamblaje. Un

segundo tipo de estructuración de la superficie celular se origina por la estructuración de la cutícula. Dichos patrones se han descrito para casi todas las superficies aéreas de las plantas, pero son muy frecuentemente halladas en pétalos y superficies de semillas. Estos últimos ocurren como plegamientos o patrones tuberculares o papilosos que se originan debido a la propia cutícula, por la expresión de abultamientos de la pared celular subyacente o por insertos subcuticulares (Koch & Barthlott 2009).

La relación entre la superhidrofobicidad y la topología de la superficie de la hoja ya se ha reportado muchas veces, y se cree que esta propiedad única se basa en la rugosidad de la superficie causada por micro papilas y los cristales. El aire al parecer queda atrapado entre los cristaloides, formando una superficie compuesta, en que se agranda la interfase agua/aire, mientras que la interfase sólido/agua se minimiza. En dicha superficie rugosa de baja energía el agua gana poca energía a través de la adsorción como para compensar cualquier alargamiento de su superficie, de modo que no ocurre el alargamiento y el agua forma gotas esféricas, en donde el AC depende casi completamente de la tensión superficial del agua (Barthlott & Neinhuis 1997).

En 1997 Barthlott y Neinhuis demuestran por primera vez la interdependencia entre las irregularidades de la superficie, la reducción de la adhesión de partículas y la repelencia del agua, que es la clave para el mecanismo de auto-limpieza de muchas superficies biológicas, un fenómeno llamado “efecto loto”. Este efecto resulta en una purificación de las superficies vegetales de polvo, esporas, etc. a través de la lluvia, neblina o rocío, ya que el área de contacto y la adhesión entre partículas y superficies se reducen por las irregularidades de la superficie, causadas por los cristales de ceras epicuticulares, mientras el área de contacto entre las partículas y las gotas de agua, y por ende la adhesión, son mayores (Neinhuis & Barthlott 1997). La partícula es removida de la superficie de la gota solo si una fuerza mayor sobrepasa la adhesión entre la partícula y la gota, y dada la reducción de la superficie en contacto entre la partícula y la hoja, la adhesión es minimizada y la partícula es capturada por la gota (Barthlott & Neinhuis 1997).

Feng et al. (2002) reportaron nanoestructuras tipo rama (124 ± 3.2 nm) sobre las micropapilas (5-9 μm) de la superficie de las hojas de loto (*Nelumbo nucifera*), que producen una superficie superhidrofóbica, con alto CA y baja histéresis (ángulo de inclinación para el deslizamiento de la gota). La reducida humectación como un efecto macroscópico causado por ceras epicuticulares fue reconocida bastante temprano, pero descrita solo en términos generales, hasta que Cassie y Baxter publicaron los fundamentos físicos de la repelencia al agua en 1944 (Neinhuis & Barthlott 1997).

Sin embargo, es necesario en este punto aclarar que las rugosidades, causadas por diferentes elementos estructurales (tricomas, paredes celulares periclinales desde convexas hasta papilosas, ceras epicuticulares) no son un prerrequisito para obtener una hoja no humectable, y no

necesariamente producen superhidrofobicidad (Shirtcliffe et al. 2009). El material hidrofóbico se vuelve hidro repelente si el aire queda atrapado entre las estructuras de la superficie y una gota aplicada de agua (Neinhuis & Barthlott 1997). La humectabilidad en superficies ásperas o desiguales puede asumir dos regímenes: la humectabilidad homogénea, en la cual el líquido penetra los surcos o valles, o humectabilidad heterogénea, donde el aire u otro fluido es atrapado bajo el líquido y entre los surcos. Es por esto que algunos materiales cuentan con una química de superficie que tiende a la humectabilidad completa, y el efecto de las irregularidades más bien puede tender a la superhidrofilia (Shirtcliffe et al. 2009).

La transición (efecto de la naturaleza química de la superficie) entre ambos regímenes, de humectabilidad homogénea y heterogénea, tiene un rol decisivo en la superhidrofobicidad. El estado más estable termodinámicamente es el que tiene el ángulo de contacto más bajo (mayor humectación o líquido esparcido sobre la superficie), de modo que los regímenes heterogéneos con ángulos de contacto mayores deben ser metaestables. Aun así, el régimen heterogéneo es preferido por la naturaleza principalmente porque el AC del régimen heterogéneo es relativamente insensible para la distancia entre protuberancias y medianamente insensible para la profundidad, y porque el régimen heterogéneo supone un área humedecida menor, inclusive si los ángulos de contacto de los dos regímenes fueran iguales (Marmur 2004).

En plantas que crecen en condiciones áridas o semiáridas, la reducción del área de la superficie humedecida es seguramente de poca importancia. Los tricomas y estructuras de las superficies foliares están más probablemente involucrados en la regulación de la radiación, e indirectamente, en el control de la temperatura (Neinhuis & Barthlott 1997), protegiendo la planta del sobrecalentamiento al reflejar la radiación o por transferencia de calor por medio del flujo turbulento del aire y convección (Bhushan 2009). Esto podría explicar la gran cantidad de plantas de ambientes de tipo mediterráneo que poseen cristales de cera de este tipo. Pero los hábitats húmedos, acuáticos o semi-acuáticos se caracterizan por poseer una alta humedad ambiental y "agua libre", lo que propicia la proliferación de gran cantidad de organismos patógenos. Las plantas evitan este riesgo produciendo esta capa hidro-repelente que se auto-limpia con cada precipitación. Esta defensa fallaría si la capa de cera es dañada o si el agente patógeno se adapta a dichas condiciones. Sin embargo, en plantas acuáticas o de manglar, la protección contra patógenos parece ser la causa más probable para el desarrollo de una capa hidro-repelente (Neinhuis & Barthlott 1997). Esporas, conidios y microorganismos son privados del agua necesaria para su germinación o crecimiento, de modo que los cristaloides de cera deben considerarse como la primera línea de defensa contra patógenos, y esta probablemente sea su función más importante (Barthlott & Neinhuis 1997). En geófitas, especies pioneras y plantas que colonizan áreas alteradas, las propiedades de auto-limpieza proveen una protección efectiva contra contaminación de una gran

cantidad de partículas. En muchos casos estas son plantas herbáceas pequeñas que son susceptibles de ser cubiertas en gran medida, por polvo y partículas del suelo por sedimentación o salpicaduras causadas por lluvia (Neinhuis & Barthlott 1997). Por ejemplo, en áreas de alta contaminación, donde las hojas son severamente contaminadas con polvo, las temperaturas de la superficie foliar aumentaron con incidencia solar. Además, partículas de cierto rango de tamaño podrían ocluir los estomas o producir resistencia a la difusión (Barthlott & Neinhuis 1997).

De este modo, la auto limpieza es solo una posible razón por la cual la naturaleza ha desarrollado las superficies superhidrofóbicas. Por ello es posible especular que los beneficios para las plantas de la superhidrofobicidad pueden no estar restringidos simplemente a la auto limpieza (Shirtcliffe et al. 2009). Por ejemplo, se sabe que el CO₂ presenta una difusión 10% más lenta en agua que en el aire, de modo que la repelencia al agua podría asegurar la óptima toma de CO₂ para llevar a cabo una fotosíntesis eficiente (Arvind et al. 2009). Asimismo también existen ejemplos en el reino animal que pueden arrojar pistas al respecto. Por ejemplo, la superficie papilosa de los élitros de algunos escarabajos del género *Stenocara*, del desierto de Namibia, inducen la formación de pequeñas gotas a partir de la humedad del aire, las cuales son vitales para suplir su necesidad de hidratarse. Esto lo hacen exponiendo la superficie de sus élitros hacia el viento húmedo de las mañanas. Las gotas se forman al frente de sus élitros y ruedan hacia sus estructuras bucales (Vincent et al. 2006, Bhushan 2009).

Otro ejemplo lo proporcionan los insectos de la especie *Gerris remingis* (Hemíptera), los cuales flotan caminando sobre sus patas en estanques sin mojarse. Estos insectos tienen en la superficie de sus patas estructuras jerárquicas que consisten de pelos con nano-surcos, cubiertos de cera, lo que les confiere la superhidrofobicidad responsable de la resistencia al agua y su habilidad de caminar sobre el ella. Los análisis indican que cada pata tiene capacidad de soportar 15 veces el peso corporal del insecto (Bhushan 2009). Otros insectos acuáticos utilizan una superficie superhidrofóbica para atrapar oxígeno y respirar bajo el agua sin necesidad de una agalla (Shirtcliffe et al. 2009). Asimismo, insectos cuyas alas son suficientemente grandes como para no poder ser limpiadas por medio de las patas, pueden presentar repelencia al agua en conjunto con la característica de auto limpieza. En este caso se busca el mantenimiento de la capacidad de vuelo, la cual puede perderse debido a inequidad en el peso de las mismas (Barthlott & Neinhuis 1997).

- Nuevos materiales superhidrofóbicos y sus aplicaciones

Los resultados de estudios del mundo natural proveen una guía para construir superficies artificiales hidrofóbicas y diseñar superficies con humectabilidad controlada (Feng et al. 2002). Por ejemplo, la observación de que las hojas de loto siempre están limpias a pesar de crecer en áreas

lodosas, llevó a la producción de Lutosano, una pintura para superficies auto limpiables (Vincent et al. 2006). Superficies similares que hacen fácil la remoción de suciedad han sido observadas en muchas otras plantas, e inclusive en alas de insectos (Vincent et al. 2006). Las técnicas para fabricar estos materiales tienen sus limitaciones, de modo que por lo general no copian directamente las microestructuras de las superficies biológicas. (Xi & Jiang 2008). Los materiales superhidrofóbicos pueden fabricarse por ejemplo incrementando el área superficial del sustrato, constituido por materiales hidrofóbicos y modificando las superficies ásperas para disminuir la energía de superficie (Qu et al. 2008).

Inspirados en las micro y nano estructuras encontradas en este tipo de superficies, se han desarrollado diferentes enfoques para la síntesis de materiales artificiales con características novedosas en cuanto a la humectabilidad (Xi & Jiang 2008). Se han desarrollado por ejemplo, inspirados en estas estructuras, superficies que emulan dichas protuberancias en films poliméricos delgados cubiertos por hojuelas de silicón usando una técnica llamada litografía de capilaridad dirigida, llegando a ángulos de contacto de 90° (Arvind et al. 2009). Otro ejemplo de cómo se intenta emular dicha topología lo proporcionan experimentos con agregados de oro que emulan las patas de insectos que flotan de pie en el agua (*Gerris* sp.) o superficies superhidrofóbicas que emulan las de la hoja de loto por medio de métodos electrohidrodinámicos (Xi & Jiang 2008).

Se han diseñado además superficies súper hidrofóbicas artificiales que simulan tanto dicha estructura binaria como la unitaria de la superficie de las hojas. Convencionalmente se han producido de 2 modos principales; creando una estructura rugosa (por ejemplo por solidificación de dímeros de alquilceteno (alkylketene dimer, AKD) fundido, un tipo de cera, o por polimerización de polipropileno (PP) en presencia de politetrafluoroetileno (PTFE) en una superficie ya hidrofóbica ($CA > 90^\circ$), o de otro modo modificando una superficie rugosa con materiales con baja energía libre de superficie, como cubrimientos de fluoroalquilsilano (FAS). Por ejemplo, se ha reportado la preparación de nanotubos de carbón diferencialmente alineados y densamente empacados (ACNT aligned carbon nanotubes), los cuales presentaron anfifobicidad luego de recubrirse con una capa de FAS (CA mayores a 160° en agua y aceite) (Feng et al. 2002).

El desarrollo de estas nuevas técnicas o adaptación de otras preexistentes pueden llevar al desarrollo de materiales que presenten características de interés extra. Un ejemplo que lo ilustra es el uso de una técnica llamada litografía suave, la cual es una técnica ampliamente usada en fabricación a nano o micro escala. Es fácil de controlar y es altamente fiel a las estructuras de la superficie original, aún en nanoescala, de modo que es útil para replicar la intrincada microtopografía superficial de las hojas. Esta técnica se utilizó para preparar una superficie superhidrofóbica con alta fuerza adhesiva, duplicando directamente la microestructura y característica de adhesión del pétalo de rosa. Dicho material presenta superhidrofobicidad hasta con

líquidos corrosivos (ácidos y básicos), por lo que se espera que tenga amplio rango de aplicaciones como anticorrosión. Esto se lleva a cabo por solidificación de un poli(vinil alcohol) 15 wt % donde se imprime un “negativo” de la superficie del pétalo. Luego se hace una réplica “en positivo” con polidimetilsiloxano (PDMS), un material hidrofóbico ($CA\ 104^\circ$ en superficie lisa) y su catalizador. En la superficie preparada se presenta una alta histéresis, ya que la gota aplicada a la misma no rueda cuando la superficie se gira verticalmente o inclusive cabeza abajo, presentando un peso crítico de la gota aplicada de 10 mg con una fuerza adhesiva máxima de $63,8\ \mu N$. En el loto las líneas son discontinuas, lo que impide la intrusión de la gota entre las microestructuras, mientras que en la superficie preparada las líneas son continuas, lo que permite la intrusión de la gota, que se mantiene unida por capilaridad pero aún así presenta superhidrofobicidad (Xi & Jiang 2008).

Otro ejemplo lo proporcionan Qu et al. (2008), quienes fabricaron una superficie superhidrofóbica inclusive al aplicar líquidos corrosivos, y que además presenta conductividad. Esto se llevó a cabo por medio de deposición anódica en un sustrato Ti/Si de nanocables de polianilina, un polímero de conductividad controlable, formando de esta forma una superficie con micro y nano estructuras. Por sus características, una superficie de esta naturaleza podría tener un amplio campo de aplicación. Por ejemplo, podría utilizarse como un método efectivo para eliminar los inconvenientes de la acumulación de carga estática en la superficie de ciertos dispositivos tecnológicos.

Justificación

El estudio de diferentes fenómenos naturales a micro escala puede eventualmente llevar a la producción de dispositivos útiles, como lo ha hecho con el velcro por ejemplo, o cintas adhesivas inspiradas en la adhesión de las patas del gecko a las superficies, la cual puede ser sometida a 1000 ciclos de adhesión/remoción sin perder su propiedad adhesiva (Arvind et al. 2009). En este estudio se espera identificar y describir patrones en la ultraestructura de la superficie foliar de diferentes especies de orquídeas que presenten el fenómeno del efecto loto y ayuden a explicarlo, para crear nuevos conocimientos para el posible desarrollo de nuevos materiales con dicha característica. Para que las superficies biológicas sean utilizadas en nuevas tecnologías, los mecanismos físicos que causan sus características especiales deben ser dilucidados (Arvind et al. 2009), así que estos nuevos conocimientos pueden ser de utilidad a la comunidad científica y a la sociedad en general por medio del desarrollo tecnológico.

La superhidrofobicidad y auto limpieza inducida por estructuras de superficie es de interés para el desarrollo de, por ejemplo, ventanas o parabrisas auto limpiables, pinturas para exteriores de edificios, barcos y aeronaves (Bhushan 2009). Esta característica de algunas superficies foliares ha

inspirado intentos de emularla debido a que se ha visto que la naturaleza ha desarrollado sistemas superhidrofóbicos muy eficientes, y por esto es muy útil aprender de ellos e imitar su diseño (Marmur 2004). Barthlott y Neinhuis (1997) asumían hace un tiempo que el efecto loto podría ser transferido a superficies artificiales, como automóviles, fachadas, láminas, y aplicaciones técnicas innumerables, y tiempo después ya se comercializaban pinturas para barco que les confieren auto limpieza, y así que evitan la adherencia de percebes, así como ventanas auto limpiables (Bhushan 2009).

Investigaciones en este campo pueden llevar a desarrollo de superficies que emulen las características de las superficies naturales estudiadas, e inclusive presenten características nuevas que podrían ser de utilidad en un futuro, como es el caso de Xi y Jiang (2008) quienes, en busca de un método que replicara de manera más fiel las micro y nano estructuras en pétalos de rosa, prepararon una superficie superhidrofóbica, la cual a la vez presenta alta adhesión a las gotas de agua, sin que estas mojen realmente las superficie, y también presenta superhidrofobicidad con líquidos corrosivos (ácidos y básicos). También se ha fabricado una superficie superhidrofóbica a partir de polianilina, que además presenta conductividad (Qu et al. 2008). Se espera que por medio de la investigación en este campo, fenómenos como la adherencia de nieve, contaminación u oxidación o conducción de corriente sean inhibidos en una superficie de esta naturaleza (Feng et al. 2002). Las aplicaciones de este fenómeno a estructuras artificiales pueden incluir también nanochips (Marmur 2004).

Asimismo, se espera que se propicie la posibilidad de realizar en el futuro más estudios o proyectos conjuntos o interdisciplinarios y se fomente la cooperación entre diferentes campos, como por ejemplo la ingeniería de materiales. La naturaleza de la biología y la ingeniería son muy diferentes: los organismos se desarrollan a través de un proceso evolutivo y de selección; la biología en estos casos es ampliamente descriptiva, mientras que la ingeniería es el resultado de la toma de decisiones, se basa en hechos preestablecidos y genera reglas y regularidades (Vincent et al. 2006). Se puede entonces asegurar que el campo de la biomimesis es altamente interdisciplinario, ya que involucra el entendimiento de la funciones biológicas, estructuras y principios de algunas estructuras de la naturaleza descritas por biólogos, físicos, químicos y científicos de materiales, además del diseño y fabricación de materiales y dispositivos de interés comercial por parte de ingenieros, químicos, científicos de materiales, etc. (Bhushan 2009), pero comúnmente, la abstracción técnica de estos fenómenos es posible solo porque un biólogo ha divulgado previamente un fenómeno inusual y ha descubierto los principios generales detrás de su funcionamiento (Vincent et al. 2006). Este estudio se basa en la familia Orchidaceae por presentar gran diversidad en el país, gracias al gran rango de hábitats y a características climatológicas y geológicas favorables. Tomando en cuenta el reducido tamaño de Costa Rica, este es en extremo rico en orquídeas, ya que

se han reportado aproximadamente 1200 especies de la familia Orchidaceae en el país (Dressler 1993).

Objetivos

- General

- Determinar el grado de hidropelencia de algunas especies pertenecientes a la familia Orchidaceae para determinar si hay superhidrofobicidad.

- Específicos

- Identificar patrones de ordenamiento espacial de micro y nanoestructuras de la superficie aérea de diferentes especies de orquídeas que presenten hidropelencia para determinar la causa de la misma.

- Medir el ángulo de contacto de las superficies vegetales a observar para determinar cuánta hidrofobicidad posee cada superficie.

- Establecer y describir los detalles de la ultraestructura superficial que causaría el fenómeno de hidropelencia en las plantas a observar para establecer su relación con el grado de hidrofobicidad de la superficie.

Materiales y métodos

El estudio se concentró en flores de plantas de la familia Orchidaceae que presentan el “efecto loto”. Las muestras analizadas son estructuras florales completamente desarrolladas o en desarrollo, y se escogieron a partir de una búsqueda visual del “efecto loto”. Esto se hizo aplicando, con un gotero, una gota de agua a cada superficie aérea de las plantas para evaluar visualmente la humectabilidad o hidropelencia de la superficie observada. Se seleccionaron estructuras florales en las que la gota rodó fuera de la estructura sin humectarla, pertenecientes a 6 diferentes especies de la familia Orchidaceae, las cuales se obtuvieron de los invernaderos del Jardín Botánico Lankester de la Universidad de Costa Rica, Paraíso, Cartago.

Se determinó el ángulo de contacto (AC) de las muestras en el Centro de Investigación en

Electroquímica y Energía Química (CELEQ) por medio de su medición utilizando un goniómetro (Ramé-hart Instrument Co., modelo 250-F1). Se realizaron 3 mediciones de la misma estructura con 3 diferentes gotas de agua de 0,05µL.

Las especies seleccionadas y sus estructuras en las que se encontró hidropelencia se indican en el cuadro I. El procesamiento de las mismas para su observación en el microscopio electrónico de barrido se llevó a cabo en el laboratorio del Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica. Se tomaron secciones de muestra de aproximadamente 1 cm² para su fijación en solución fijadora de Karnovsky (glutaraldehído al 2,5%, paraformaldehído al 2,0%, sucrosa al 4%, en amortiguador de fosfato de sodio 0,1M, pH 7,4). Se lavaron 3 veces por 10 min. con amortiguador de fosfatos de sodio. Luego se pos-fijaron en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en amortiguador de fosfatos de sodio, por aproximadamente 1h, y se lavaron 3 veces durante 15 min. con agua destilada. Se deshidrataron con etanol en concentraciones ascendentes de 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 2 veces al 100%, 10min. cada una. Luego se realizaron 4 lavados de 15 min. en alcohol terbutílico (Mallinckrodt) y se secó por sublimación (sublimador Eiko ID-2).

Las muestras se montaron en bases de aluminio de 15 mm por medio de cinta de carbono de doble cara adhesiva, se realizaron puntos de contacto con pintura de plata y se recubrieron con aproximadamente 40nm de metal Pt/Pd en un cobertor iónico (Giko IB3). Luego se observaron con microscopios electrónicos de barrido, modelos Hitachi S-570 e Hitachi S-3700, los cuales operan a 15KV. Se capturaron imágenes de las superficies de las muestras para la observación y descripción de la ultraestructura de cada muestra.

Cuadro I: Especies seleccionadas para su estudio en MEB y sus estructuras que presentan hidropelencia.

	Especie	Estructura floral analizada
1	<i>Paphiopedilum insigne</i>	Sépalos (botón)
2	<i>Phragmipedium longifolium</i>	Sépalos (botón)
3	<i>Brassavola nodosa</i>	Labelo
4	<i>Maxilaria luteo-alba</i>	Labelo
5	<i>Oncidium schroederianum</i>	Labelo
6	<i>Cattleya</i> sp.	Labelo, pétalo y sépalo

Resultados

Paphiopedilum insigne

- Sépalo superior

La superficie adaxial de los sépalos de esta planta se mostró mayormente lisa, sin texturas u ondulaciones apreciables a gran escala, compuesta por células aplanadas y con los límites entre las células bien marcados (figura 1A). El borde es bastante irregular en su forma, y allí la pared celular presenta pequeñas arrugas, no muy prominentes, que semejan ser un recubrimiento que disminuye en grosor hacia los bordes y da la sensación de estar constituido por capas superpuestas (figura 1B). En algunas zonas las células son ligeramente abultadas (figura 1C), y algunas de ellas colapsaron parcialmente. En estas últimas el borde se muestra marcado por lo que parece ser alguna estructura de la pared celular, probablemente la lámina media o algún abultamiento de la epicutícula (figura 1D).

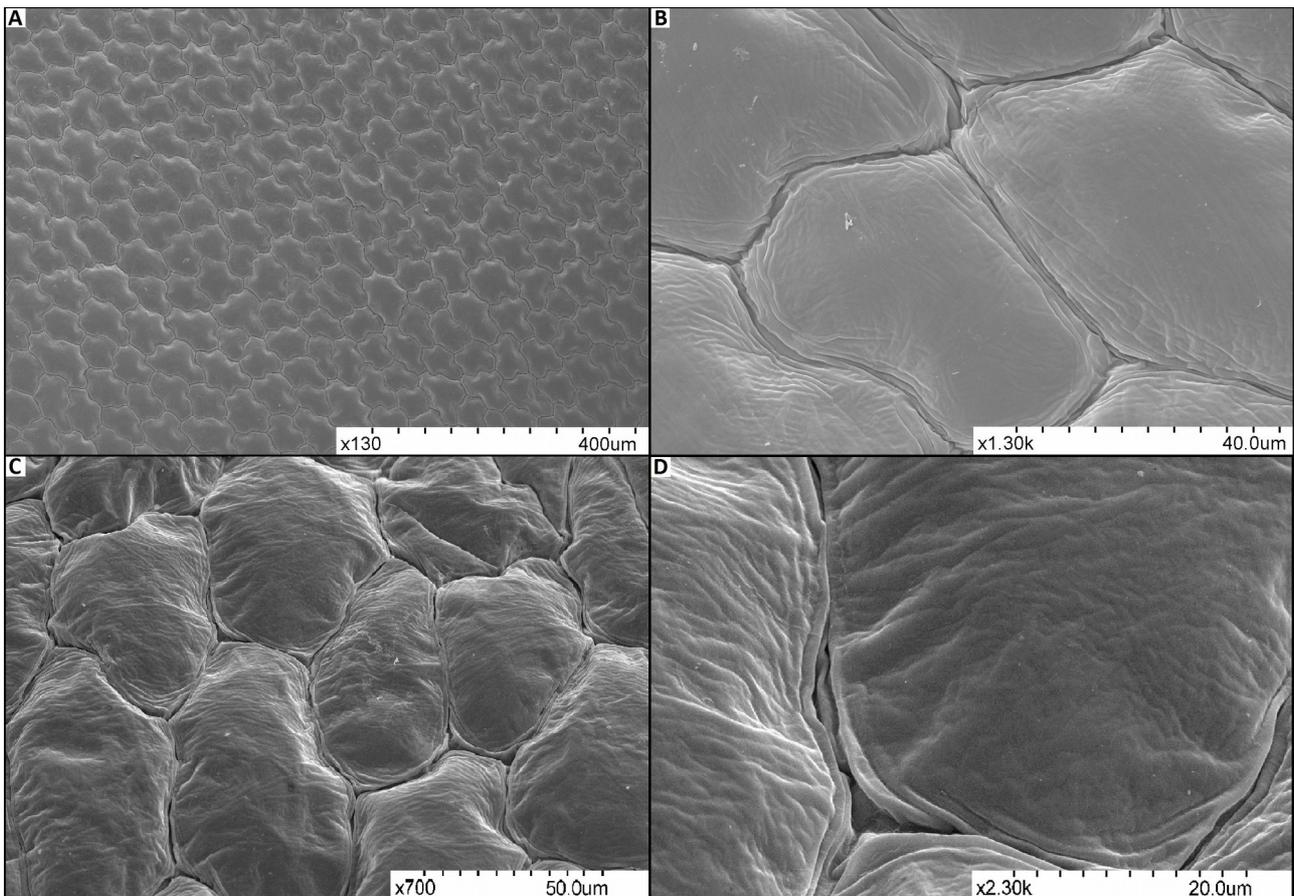


Figura 1: Imagen obtenida con MEB de la superficie adaxial del sépalo superior de la flor en botón de *Paphiopedilum insigne*. A- Vista general, se aprecian células con formas irregulares constituyendo una superficie plana, 130x B- Detalle de la misma superficie, se aprecian los bordes bien definidos entre las células, 1300x C- Células un poco abultadas en la misma superficie, 700x D- Detalle de las células vistas en C, se aprecian los bordes bien definidos por lo que parece ser alguna estructura de la pared celular primaria, probablemente la lámina media, 2300x.

La superficie abaxial presenta numerosos tricomas aparentemente unicelulares. Aunque se puede apreciar cierta segmentación, esta parece corresponder a colapso de las estructuras. Estos son tubulares y su grosor los disminuye gradualmente hacia sus ápices. La superficie en sí, donde están insertos los tricomas posee células con los bordes bien definidos (figura 2A) y otras zonas con pliegues prominentes, posiblemente producto del colapso de las células, que impiden diferenciar cada una. Los tricomas están presentes en una densidad considerable. Presentan variación en cuanto

a su longitud, y se orientan en su mayoría perpendicularmente a la superficie (figura 2B). Su textura es bastante lisa, si bien tienen algunas leves irregularidades, posiblemente por colapso (figura 2C, D y E).

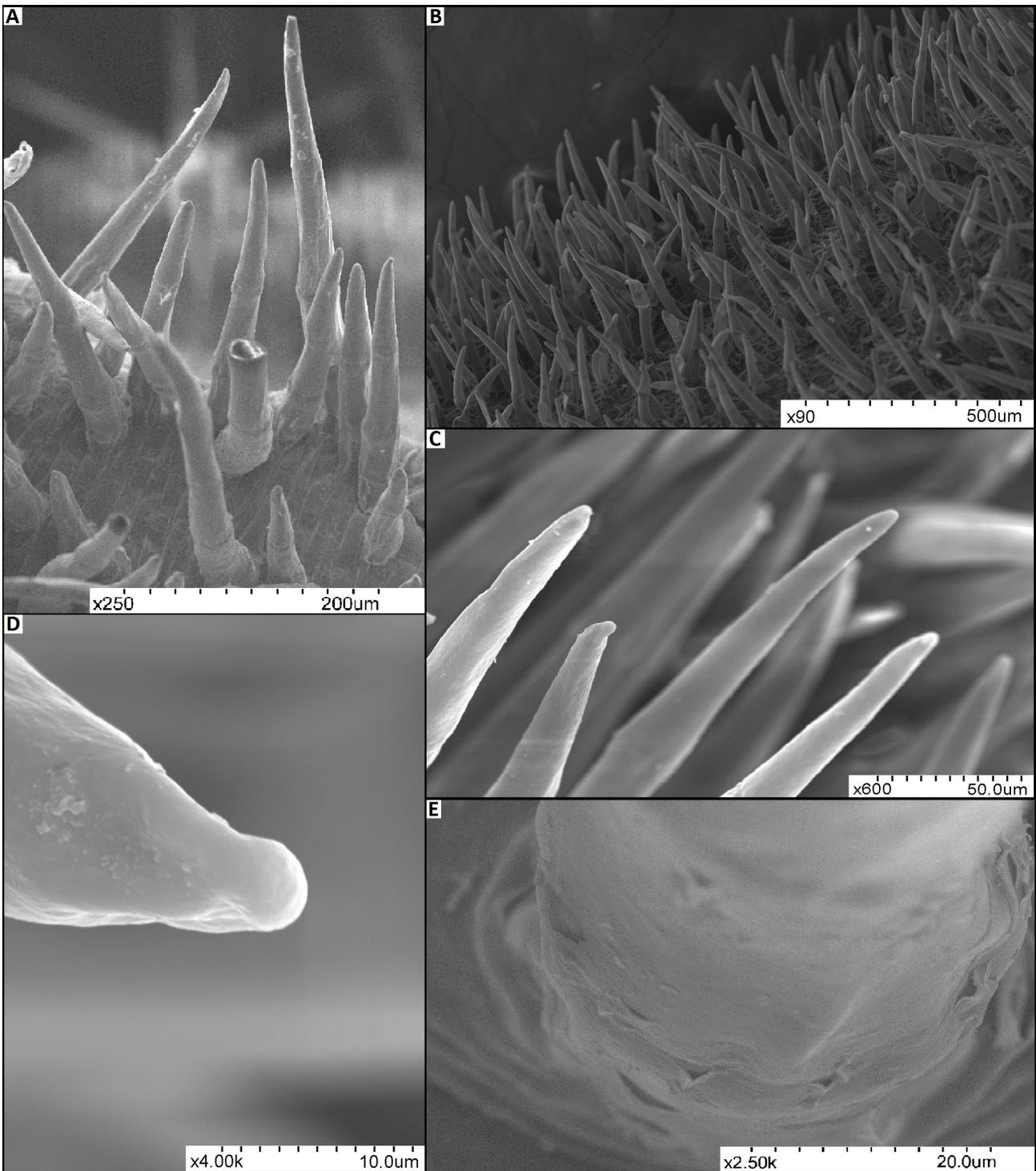


Figura 2: Imagen obtenida con MEB de la superficie abaxial del sépalo superior de la flor en botón de *Paphiopedilum insigne*. A- Vista lateral de los tricomas multicelulares, se aprecian las demás células con bordes bien definidos, 250x B- Vista general de la superficie, se muestra una densidad considerable de tricomas, 90x C- Detalle de las superficie distal de los tricomas, apreciablemente lisa, 600x D- Detalle del ápice de uno de los tricomas, se muestran pequeñas imperfecciones, 4000x E- Detalle de la superficie basal de un tricoma, donde se observa una textura mayormente lisa, 2500x.

En cuanto a la interacción con gotas de agua, la superficie adaxial resultó menos

hidrofóbica, ya que presentó un ángulo de contacto promedio de $71,6^\circ$, mientras que en la superficie abaxial presentó un ángulo de contacto promedio de $131,4^\circ$ (figura 3).

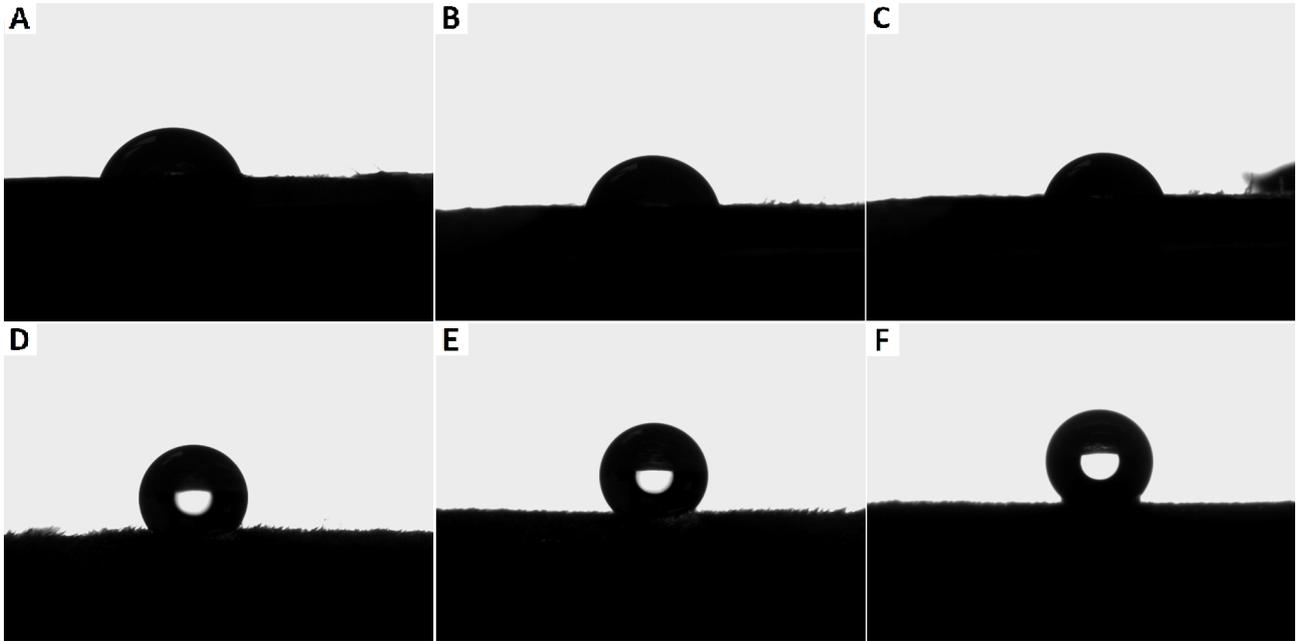


Figura 3: Interacción de gotas de agua con la superficie del sépalo superior de la flor en botón de *Paphiopedilum insigne*. A- Superficie adaxial, ángulo de contacto: $69,9^\circ$ B- Superficie adaxial, ángulo de contacto: $74,2^\circ$ C- Superficie adaxial, ángulo de contacto: $70,6^\circ$ D- Superficie abaxial, ángulo de contacto: $124,2^\circ$ E- Superficie abaxial, ángulo de contacto: $133,6^\circ$ F- Superficie abaxial, ángulo de contacto: $136,5^\circ$.

- Sépalo inferior

La superficie del sépalo inferior de las flores de *Paphiopedilum insigne* es bastante similar a la del sépalo superior, dado que la superficie adaxial es lisa, y presenta células redondeadas y algo irregulares, similares a las encontradas en el sépalo superior (figura 4A). Estas presentan cierta textura irregular, y presenta pliegues bastante notorios, obteniendo una superficie algo rugosa. El borde de las células también se muestra delineado por una fibra que lo recorre, que podría corresponder a un abultamiento de la epicutícula (figura 4B).

La superficie abaxial presenta tricomas alargados en gran cantidad (figura 4C), los cuales poseen longitudes variables. Las células entre tricomas son algo redondeadas, creando una textura rugosa (figura 4D). Dichos tricomas no parecen diferir de los del sépalo superior; se trata de tricomas unicelulares, alargados, tubulares y mayormente lisos, si bien presentan pequeñas imperfecciones posiblemente debidas al colapso del tejido (figura 4E). En algunas zonas se muestra evidencia de lo que parece ser pequeñas acumulaciones de lo que presumiblemente serían excesos del recubrimiento de cera (figura 4F).

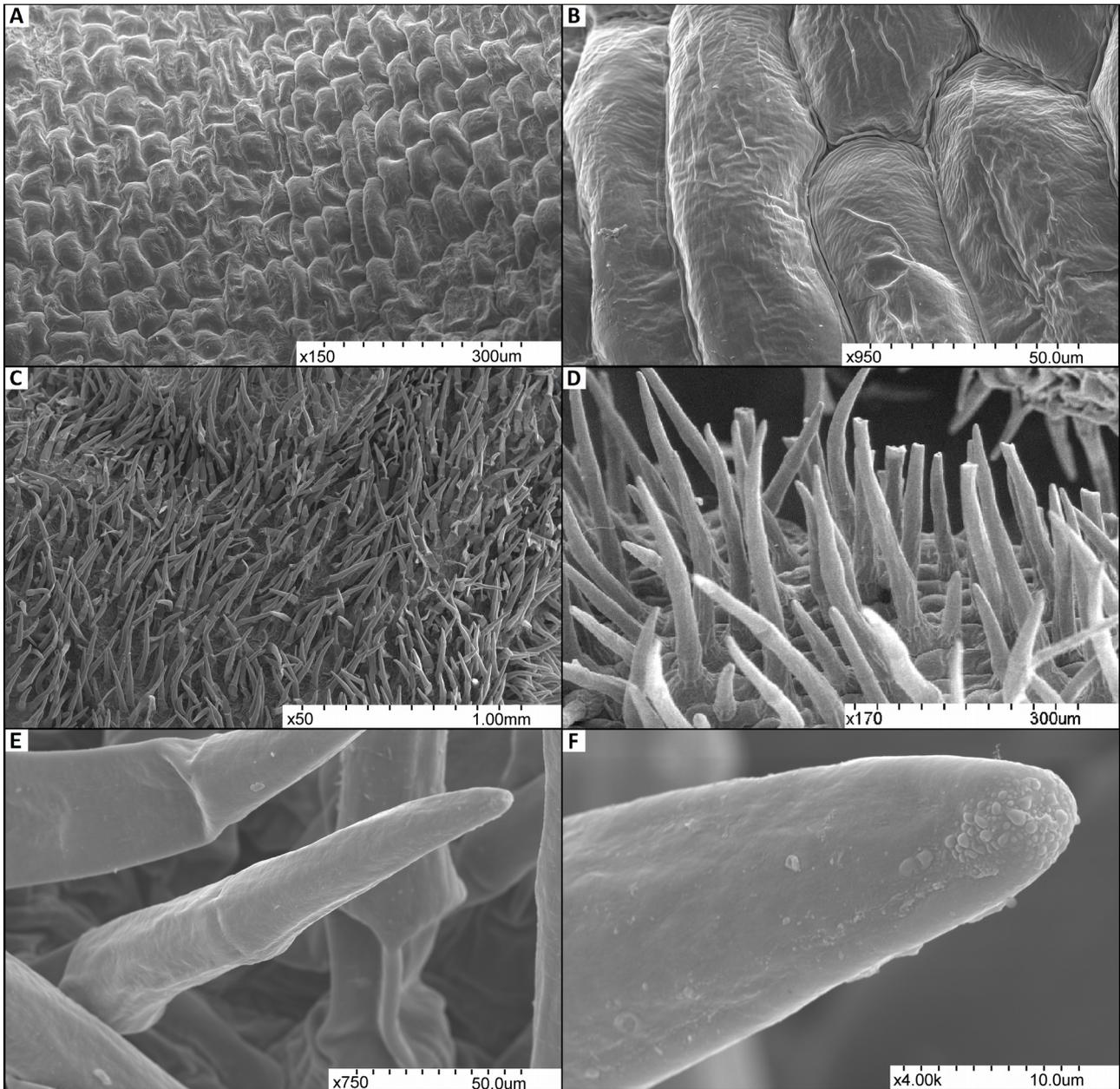


Figura 4: Imagen obtenida con MEB de las superficies adaxial y abaxial del sépalo inferior en botón de *Paphiopedilum insigne*. A- Vista general de la superficie adaxial, células ligeramente redondeadas de forma irregular, 150x y B- Detalle de la superficie adaxial, se muestran células prominentes y abultadas, con los bordes delineados por alguna estructura de la pared celular, 950x C- Vista general de la superficie abaxial, se muestra gran cantidad de tricomas, 50x D- Detalle de la superficie abaxial, se observan los tricomas alargados y células redondeadas entre ellos, 170x E- Detalle de un tricoma de la superficie abaxial, de textura lisa 750x F- Detalle del ápice de un tricoma de la superficie abaxial, donde se muestra lo que parece acumulación de cera epicuticular, 4000x.

En cuanto a la interacción de estas superficies con gotas de agua, las superficies del labelo inferior fueron menos hidrofóbicas que sus contrapartes del sépalo superior, pero al igual que el sépalo superior, también presentó una superficie menos hidrofóbica en la superficie adaxial, presentando un ángulo de contacto promedio de $80,5^\circ$, mientras que en la superficie abaxial el ángulo promedio fue de $111,0^\circ$ (figura 5).

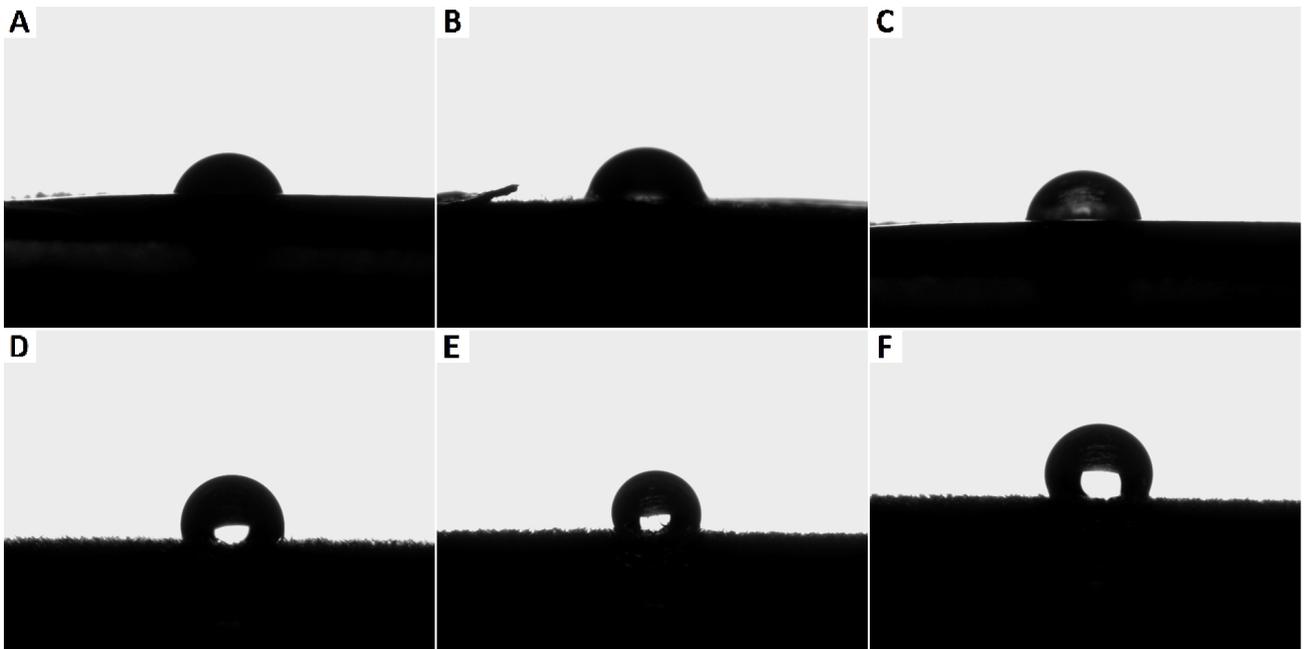


Figura 5: Interacción de gotas de agua con la superficie del sépalo inferior de la flor en botón de *Paphiopedilum insigne*. A- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 76,5° B- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 78,7° C- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 86,4° D- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 104,5° E- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 110,4° F- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 118,2°.

Phragmipedium longifolium

– Sépalos

La superficie adaxial de los sépalos de *Phragmipedium longifolium* presenta tricomas algo esparcidos, y son aparentemente más cortos que los vistos anteriormente. También presenta ondulaciones a mayor escala, no muy marcadas (figura 6A). Estos tricomas son multicelulares, y se nota claramente la zona divisoria entre sus células. Estos tricomas son cortos, a diferencia de los observados anteriormente. Las células entre tricomas son poco convexas, casi planas. Estas presentan cierta textura superficial en forma de estructuras filiformes algo esparcidas, alargadas y orientadas en la misma dirección, las cuales son más marcadas en algunas zonas, mientras en otras no son tan evidentes. También se observa lo que aparenta ser un cordón de cera cuticular que recorre el borde entre células (figura 6B).

La superficie abaxial también presenta el mismo tipo de tricomas (figura 6C) pero en una baja densidad. Esta superficie presenta un recubrimiento grueso, aparentemente de cera, que impide ver la posición, el tamaño y forma de las células. Este recubrimiento de cera forma agregados de material en forma de fibras bastante alargadas, entrelazadas entre sí y orientadas en la misma dirección (figura 6D). En una sección de la muestra, al parecer por su manipulación al ser preparada, se desprendió una sección de esta capa exterior de cera, dejando al descubierto las células subyacentes. Estas son redondeadas, y presentan una textura poco prominente, producto de arrugas superficiales que bien podrían ser la forma de la cutícula o el efecto de la pérdida de turgor

o colapso del tejido (figura 6E). Al observar dichas estructuras filiformes a mayor magnificación, estas presentan bordes algo irregulares (figura 6F).

Las superficies abaxial y adaxial presentaron, en promedio, un nivel similar de hidrofobicidad, con un ángulo de contacto promedio de $66,4^\circ$ en la superficie adaxial, y de $67,0^\circ$ en la superficie abaxial (figura 7).

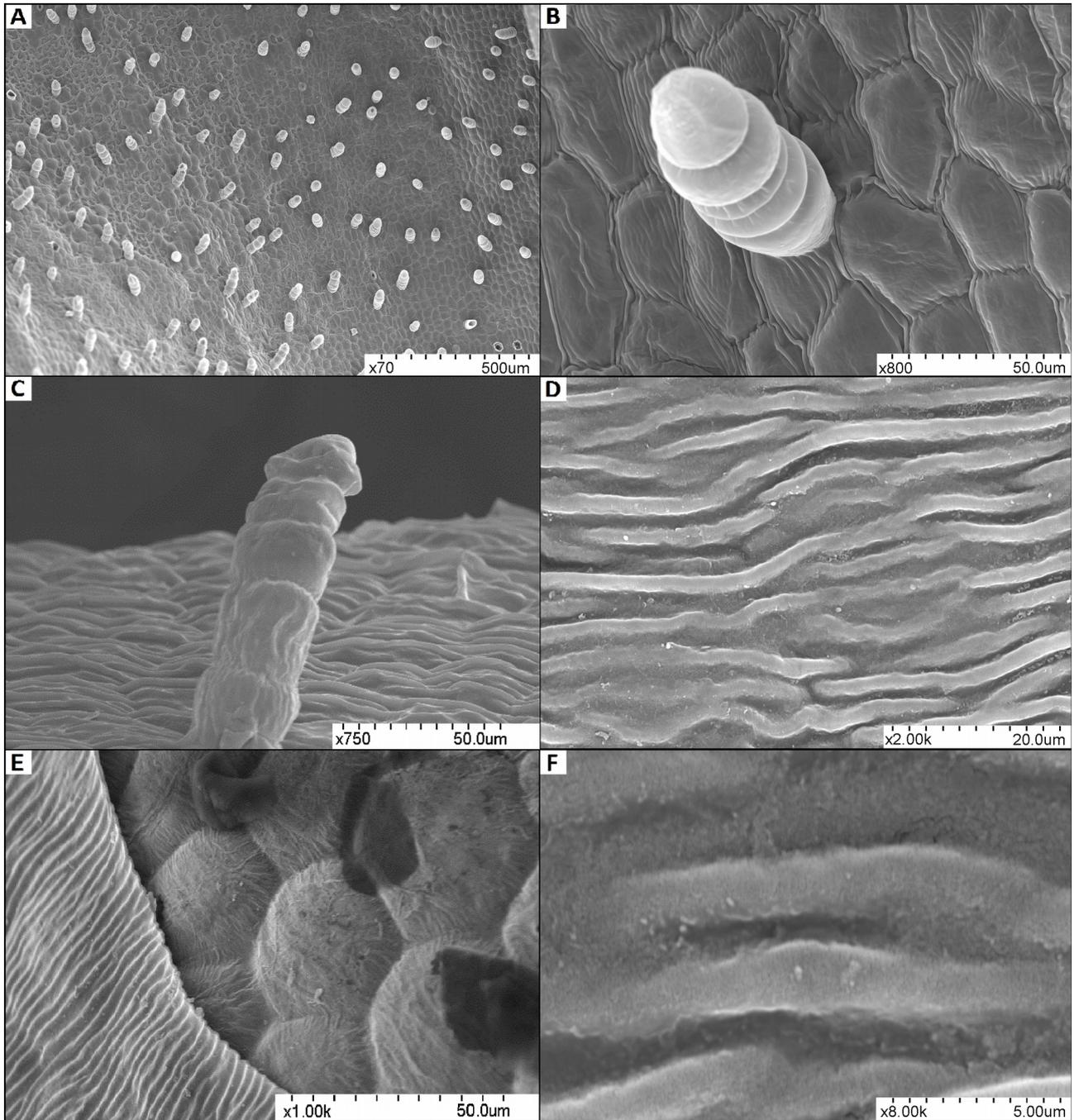


Figura 6: Imagen obtenida con MEB de los sépalos de *Phragmipedium longifolium*. A- Vista general de la superficie adaxial, donde se muestran ondulaciones sutiles y tricomas cortos, 70x B- Detalle de un tricoma de la superficie adaxial, se muestran las células entre tricomas recorridas por estructuras filiformes alargadas, 800x C- Detalle de un tricoma de la superficie abaxial, se muestra su superficie rugosa y la las estructuras que recubren la superficie de las demás células, 750x D- Detalle de la capa de cera epicuticular de la superficie abaxial, se muestran estructuras filiformes alargadas, 2000x E- Detalle de una sección de la superficie abaxial donde la cobertura superficial se desprendió, mostrando las células subyacentes, 1000x F- Detalle de las estructuras filiformes de la superficie abaxial, se observa su constitución granulosa, 8000x

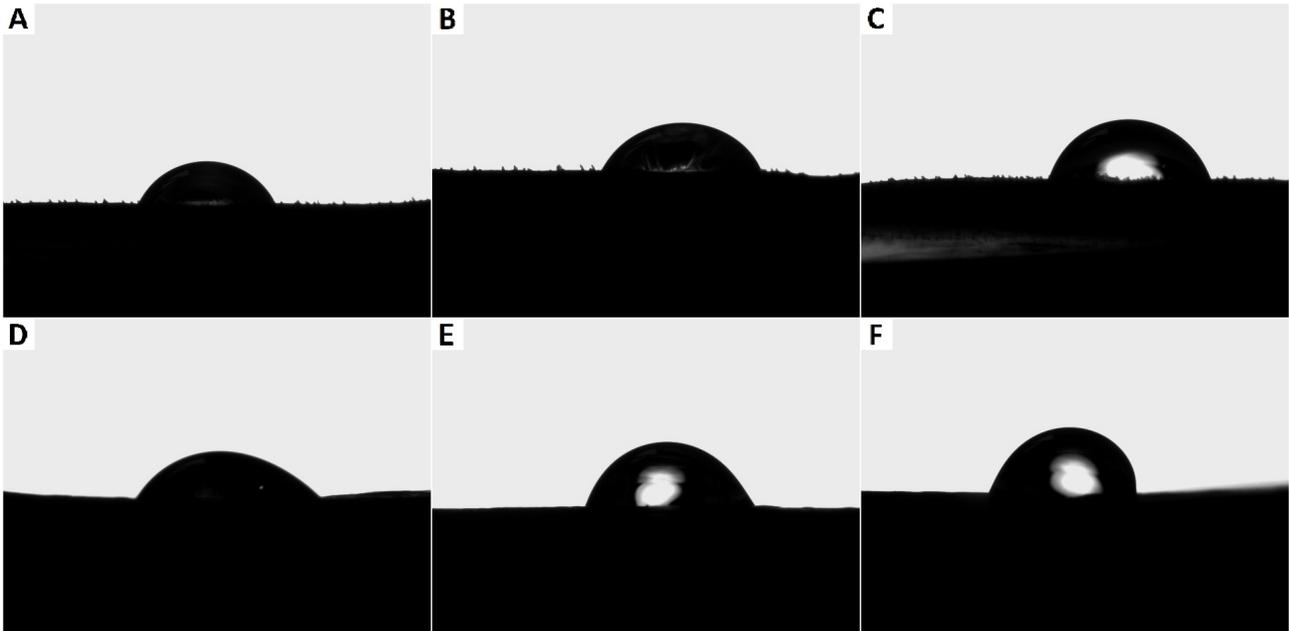


Figura 7: Interacción de gotas de agua con la superficie del labelo de *Phragmipedium longifolium*. A- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 63,6° B- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 64,4° C- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 71,2° D- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 51,8° E- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 67,1° F- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 82,1°.

Brassavola nodosa

– Labelo

En esta muestra, la superficie se muestra bastante lisa y uniforme, constituida de células redondeadas y poco protuberantes. En algunas zonas las células están colapsadas, total o parcialmente (figura 8A). Las células, aunque redondeadas, presentan formas geométricas irregulares, y presentan superficie aparentemente lisa, si bien presentan pequeñas arrugas e imperfecciones poco marcadas. No es clara la presencia de una capa de cera recubriendo la superficie, ya que no es visible ningún tipo de acumulación o exceso de material, de modo que los límites entre las células se muestran bien definidos (figura 8B). La superficie adaxial presenta las mismas características que las de la abaxial, excepto que en esta no se encontraron estomas, mientras que en la abaxial se observaron algunos de ellos. Estos se presentan al mismo nivel que las células adyacentes (figura 8C) y poseen un borde más liso que la textura superficial de aquellas (figura 8D). La superficie adaxial presenta pequeñas ondulaciones a mayor escala.

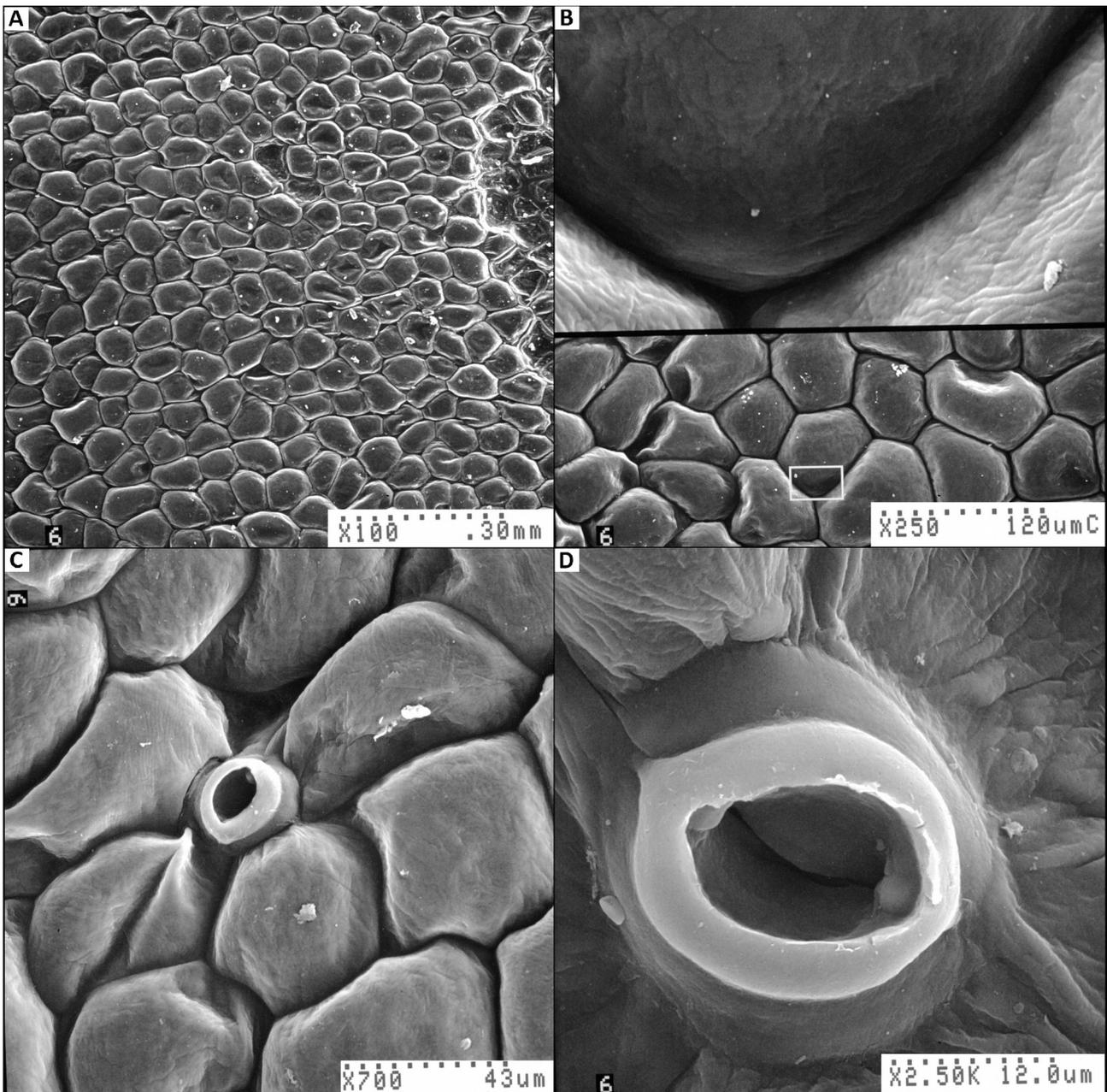


Figura 8: Imagen obtenida con MEB de la superficie del labelo de *Brassavola nodosa*. A- Vista general de la superficie adaxial, se muestra una superficie lisa y zonas con células colapsadas, 100x B- Detalle de la superficie adaxial, se observan células de formas geométricas irregulares, de borde bien definido y textura poco marcada, 250x C- Superficie abaxial, se muestran células similares a las de la superficie adaxial y la presencia de un estoma, 700x D- Detalle de un estoma en la superficie abaxial, se observa una textura muy lisa en su borde, 2500x.

En cuanto a la interacción de las superficies del labelo de *Brassavola nodosa* con gotas de agua, la superficie adaxial resultó menos hidrofóbica, con un ángulo de contacto promedio de $87,9^\circ$, mientras que la superficie abaxial presentó un ángulo promedio de $103,5^\circ$ (figura 9).

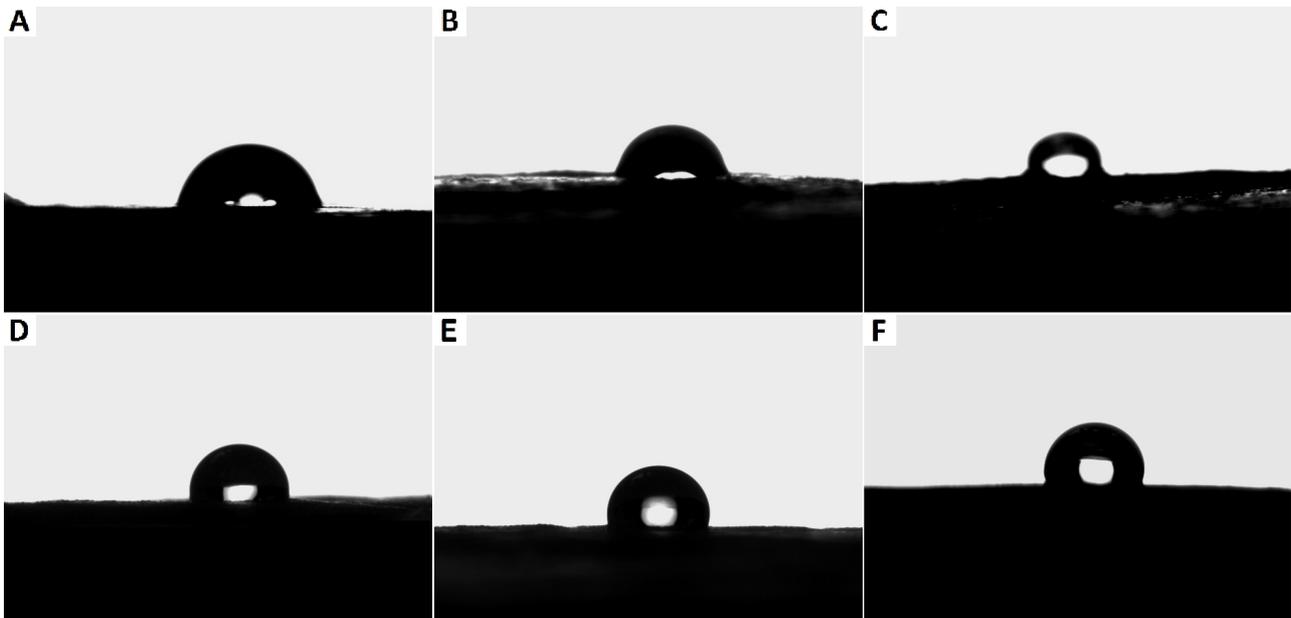


Figura 9: Interacción de gotas de agua con la superficie del labelo de *Brassavola nodosa*. A- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 76,7° B- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 79,8° C- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 107,1° D- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 98,2° E- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 103,8° F- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 108,5°.

Maxillaria luteo-alba JBL03719

– Labelo

La superficie abaxial posee una superficie bastante lisa y uniforme, y presenta algunos tricomas, muy alargados y delgados que aparentemente colapsaron, presentando así una apariencia aplastada (figura 10A). Dichos tricomas parecen presentar una capa de cera cubriendo su superficie, ya que se observan estructuras de forma redondeada en la capa más superficial (figura 10B). Las células entre los tricomas, que constituyen esta superficie, son bastante aplanadas y poseen cierto relieve resaltando sus bordes, delimitando la forma de cada célula individual. Estas podrían haber colapsado, hundiendo su área central y resaltando las estructuras rígidas de sus bordes (figura 10C). Estas células también parecen presentar un recubrimiento de cera epicuticular, ya que presentan las mismas estructuras redondeadas que se observan en los tricomas (figura 10D).

En la superficie adaxial se presenta una superficie muy diferente. Esta superficie presenta, especialmente hacia el borde del labelo, pliegues y grietas a gran escala que contribuyen con la textura total de la superficie. Esta se encuentra densamente cubierta de papilas epidérmicas, y de allí se proyectan tricomas filiformes de mucho mayor longitud, estos últimos intercalados entre las papilas, y en una menor densidad. Los tricomas alargados no parecen estar orientados en una dirección en particular (figura 11A). Ambas estructuras presentan bastante variación en cuanto a sus longitudes y tamaños (figura 11B). Ambos, si bien poseen una superficie bastante lisa en algunas

zonas donde su superficie presenta zonas con colapso leve y otras más colapsadas, más que todo en sus costados (figuras 11C y D).

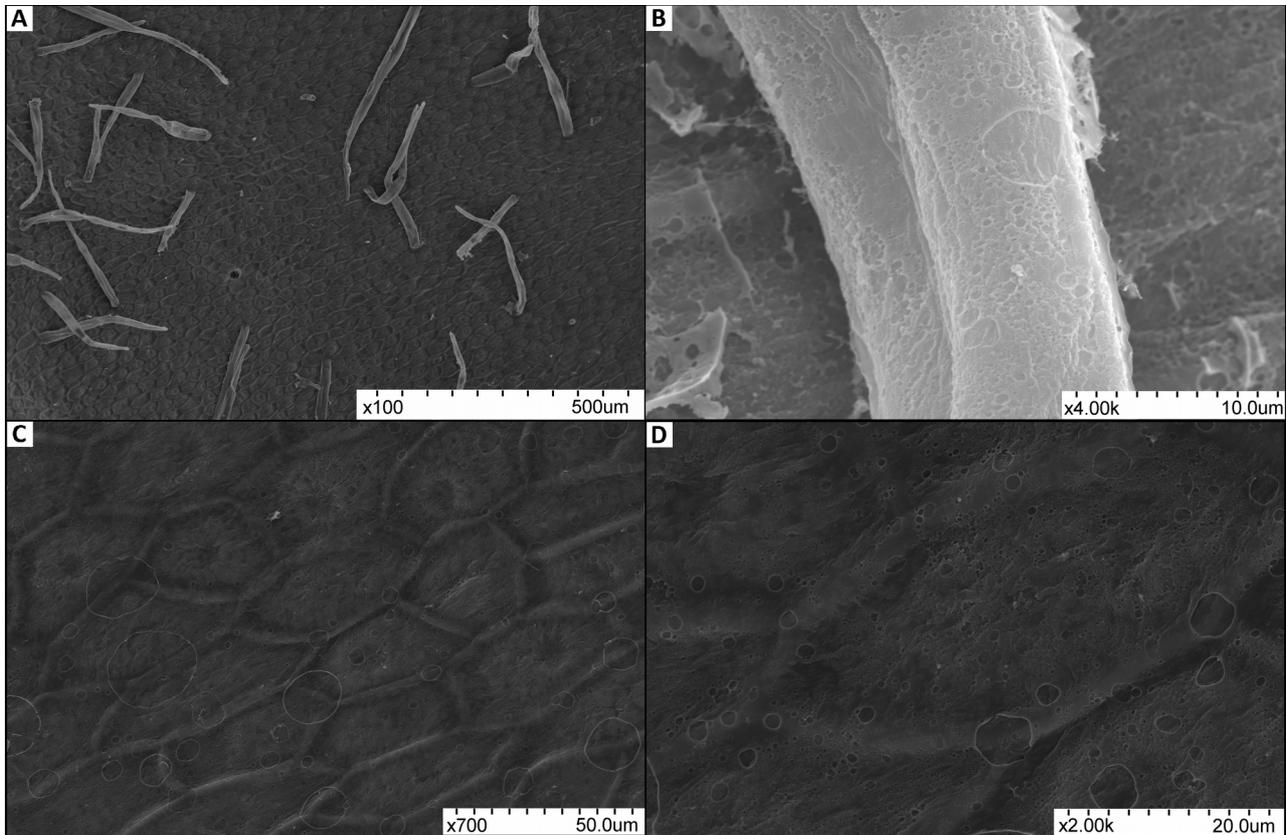


Figura 10: Imagen obtenida con MEB de la superficie abaxial del labelo de *Maxillaria luteo-alba*. A- Vista general de la superficie abaxial, se muestran algunos tricomas bastante alargados y colapsados y una superficie uniforme, 100x B- Detalle de uno de los tricomas, se observa su recubrimiento aparentemente de cera epicuticular, 4000x C- Células entre tricomas en la superficie abaxial, se aprecia un relieve que delimita cada célula, 700x D- Detalles de las células entre tricomas, se observa lo que parece un recubrimiento de cera epicuticular, 2000x.

En referencia a la interacción de ambas superficies del labelo, la superficie abaxial resultó la menos hidrofóbica, presentando un ángulo de contacto promedio de $87,2^\circ$, mientras que la superficie adaxial presentó un ángulo promedio de $137,0^\circ$ (figura 12).

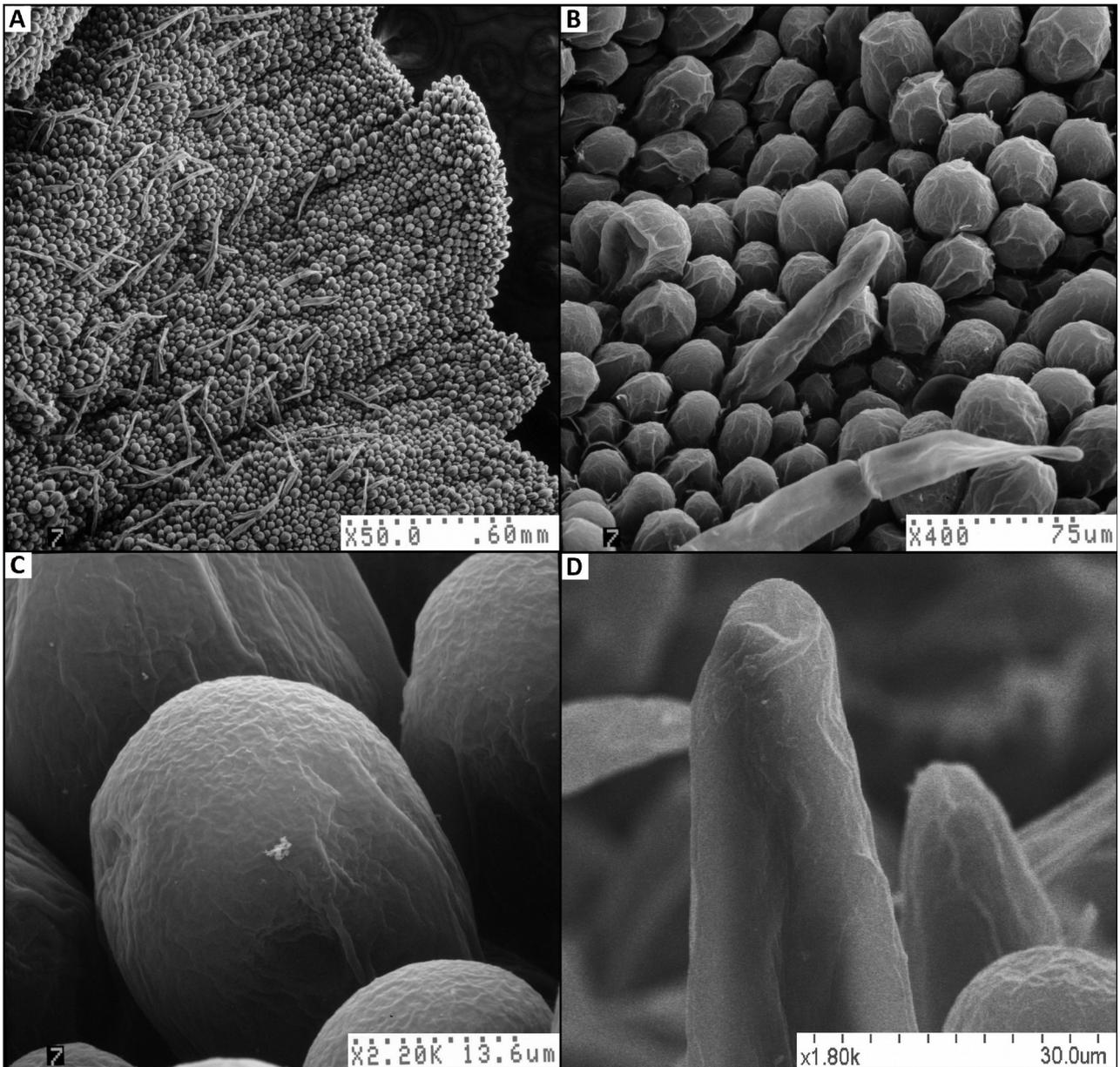


Figura 11: Imagen obtenida con MEB de la superficie adaxial del labelo de *Maxillaria luteo-alba*. A- Vista general de la superficie adaxial, se muestran pliegues a gran escala y una superficie cubierta por tricomas alargados y papilas epidérmicas, 50x B- Detalle de la superficie adaxial, se aprecia la diferencia en tamaño entre los tricomas y las papilas, 400x C- Detalle de una de las papilas de la superficie adaxial, se aprecia su textura rugosa, más en unas zonas que otras, 2200x D- Detalle de uno de los tricomas alargados, se observa su textura mayormente lisa con zonas colapsadas bastante marcadas, 1800x.

Oncidium schroederianum

- Labelo

En la superficie abaxial, en algunas zonas las células presentan una zona central hundida sobre sus bordes, lo que le da a la superficie apariencia plana pero con una textura algo rugosa (figura 13A). Al marcarse los bordes de las células, la superficie toma apariencia de rugosa, con pliegues en la superficie, los más prominentes de los cuales parecen corresponder a los límites de

cada célula. Esta zona presentó la presencia de estomas (figura 13B). En otras zonas, las células no parecen estar

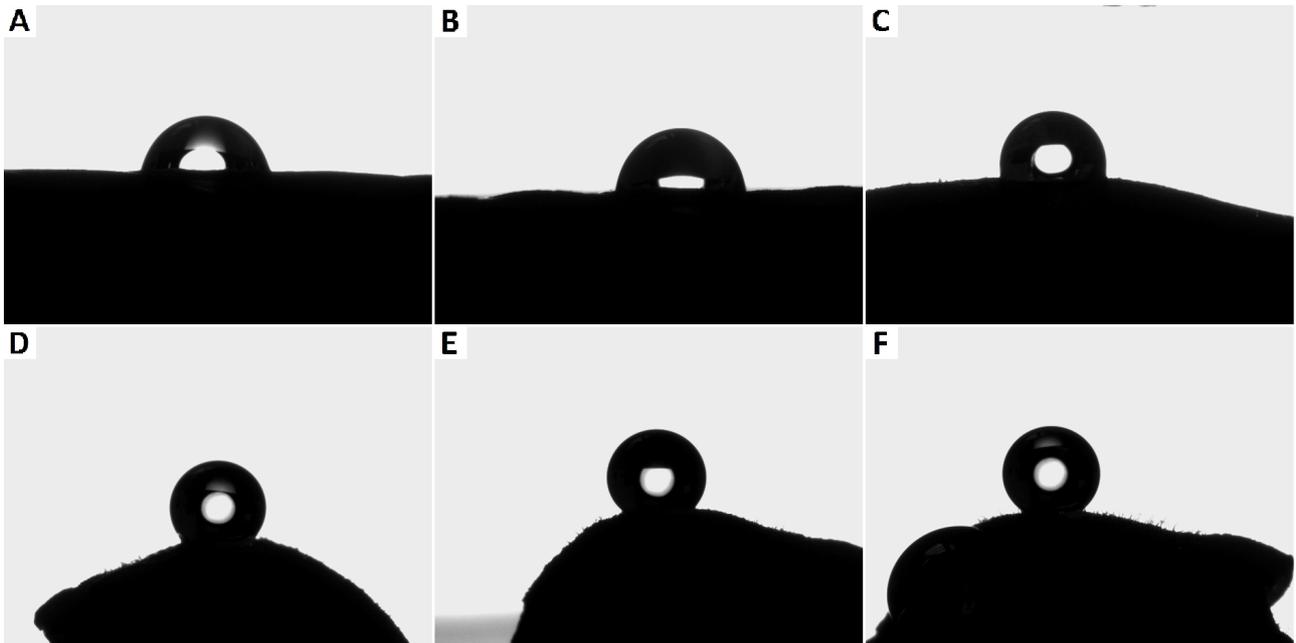


Figura 12: Interacción de gotas de agua con la superficie del labelo de *Maxillaria luteo-alba*. A- Superficie abaxial, ángulo de contacto: $77,1^{\circ}$ B- Superficie abaxial, ángulo de contacto: $83,6^{\circ}$ C- Superficie abaxial, ángulo de contacto: $101,0^{\circ}$ D- Superficie adaxial, ángulo de contacto: $131,7^{\circ}$ E- Superficie adaxial, ángulo de contacto: $135,6^{\circ}$ F- Superficie adaxial, ángulo de contacto: $143,7^{\circ}$.

hundidas sobre sí mismas, y presenta células un poco alargadas, planas y muy lisas, cuyos límites también se encuentran marcados pero de manera poco profunda, los cuales predominantemente son más marcados y anchos hacia lo largo de las células (figura 13C). Hacia el borde del labelo, se da una transición gradual en su forma, presentándose zonas en que las células presentan una superficie algo convexa, redondeada en vez de plana (figura 13D). Se pueden observar zonas de transición en que de la zona central de dichas células se va desarrollando una protuberancia papilosa (figura 13E), presentando papilas epidérmicas bien definidas en el borde del labelo (figura 13F).

En la superficie abaxial también se encuentran zonas cubiertas con células globosas (figura 14A), bien redondeadas y en apariencia más anchas que alargadas, lo que les da la apariencia de estar bien juntas (figura 14B). Además en algunas zonas parece evidenciarse la presencia de una delgada capa exterior que recubre la superficie, que correspondería a cera epicuticular, ya que se puede apreciar una capa delgada que se desprende hacia los bordes de algunas células (figura 14C).

En cuanto a la superficie adaxial, se pudo apreciar cómo toda su superficie estaba cubierta de células papilosas. Estas estructuras son similares a las células redondeadas encontradas en la superficie abaxial, pero algo más alargadas y puntiagudas, en apariencia más alargadas que anchas, y parecen poseer espacios más amplios entre ellas (figura 14D). En general su textura es bastante lisa, con pequeñas estructuras superficiales (figura 14E), que en algunos casos poseen apariencia de

ser pequeñas cantidades de cera acumulada (figura 14F).

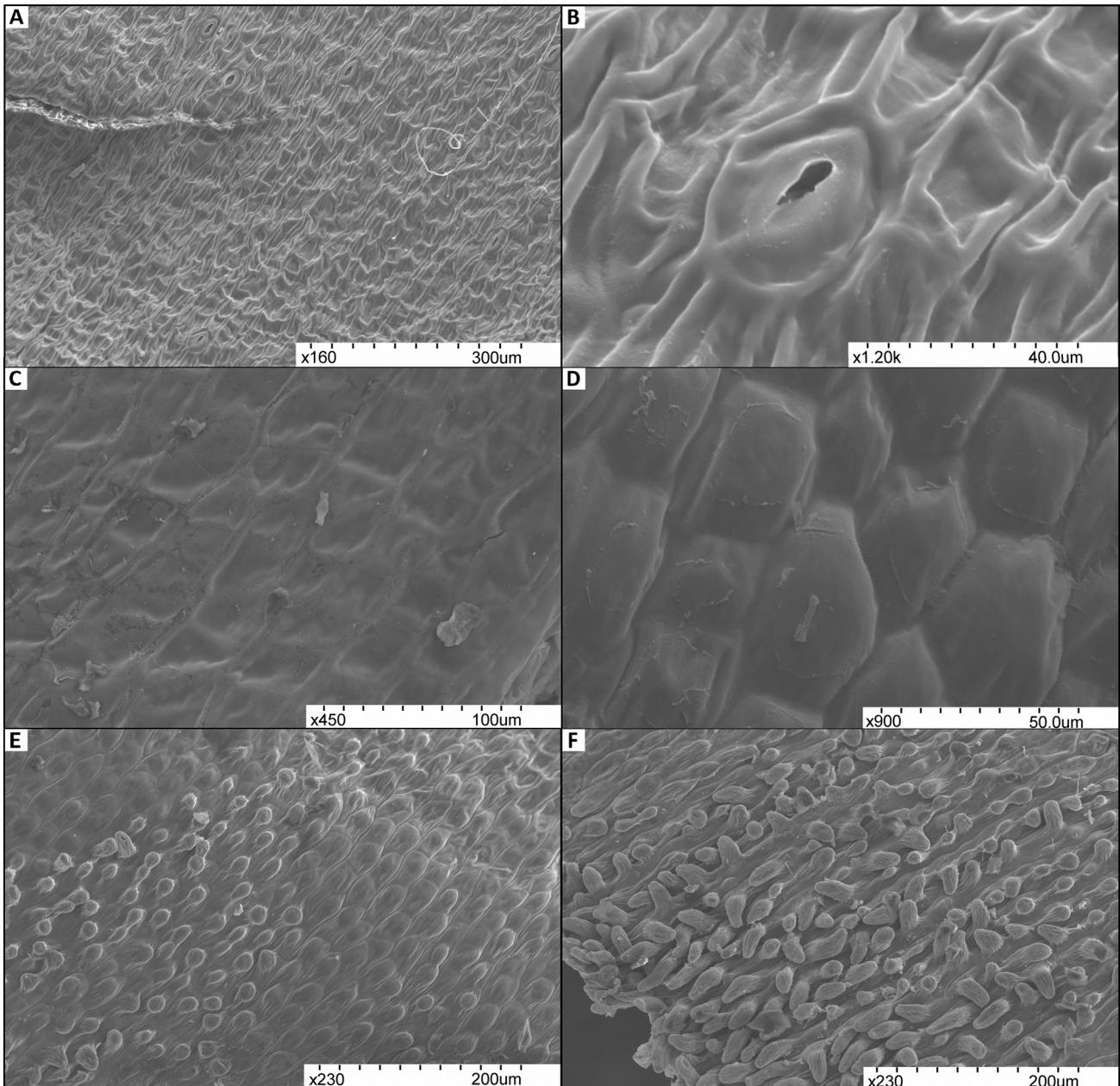


Figura 13: Imagen obtenida con MEB de la superficie abaxial del labelo de *Oncidium schroederianum* A- Superficie abaxial, se muestra una superficie bastante plana y algo rugosa, 160x. B- Detalle de un estoma, se observan pliegues prominentes que parecen corresponder a los bordes de cada célula, 1200x. C- Células de la misma superficie que no presentan hundimiento de su zona central, las cuales presentan una textura bastante lisa. D- Células más cercanas al borde del labelo, se forma es más redondeada y no aplanada como las anteriores, 900x E- Zona cercana al borde del labelo en que se observan células redondeadas y otras que parecen estar desarrollando tricomas papilosos, 230x F- Borde del labelo, se observan numerosos tricomas papilosos cubriendo la superficie, 230x.

La interacción de la superficie abaxial del labelo con gotas de agua fue menor, ya el ángulo de contacto promedio fue de $75,6^\circ$, mientras que la superficie adaxial presentó un ángulo de contacto promedio de $113,7^\circ$ (figura 15).

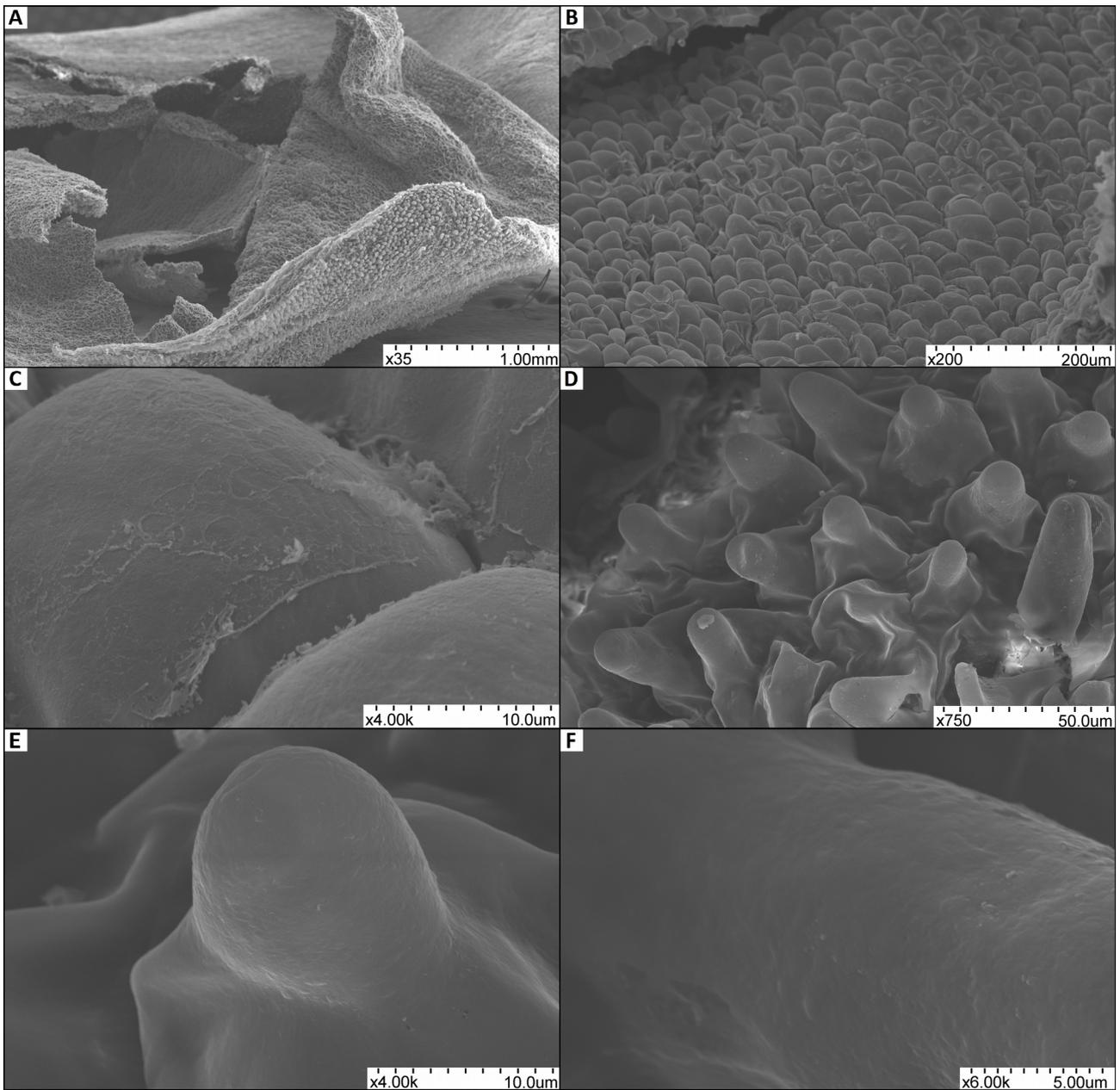


Figura 14: Imagen obtenida con MEB de la superficie del labelo de *Oncidium schroederianum* A- Vista general de la muestra, se observan células papilosas en ambas caras del labelo y amplias zonas de colapso celular B- Detalle de la superficie abaxial, donde se observan células redondeadas cubriendo toda la superficie C- Detalle de una de las células redondeadas de la superficie abaxial, se muestra lo que parece una fina capa que cubre la superficie y se desprende de la misma hacia los bordes D- Vista general de la superficie adaxial, la que se muestra cubierta de células papilosas más alargadas y puntiagudas que las anteriores. E- Detalle de una de las células papilosas, se observa su textura lisa con pequeñas imperfecciones F- Detalle de la superficie de una de las células papilosas de la superficie adaxial, donde se observan pequeñas imperfecciones con apariencia de acumulación de material.

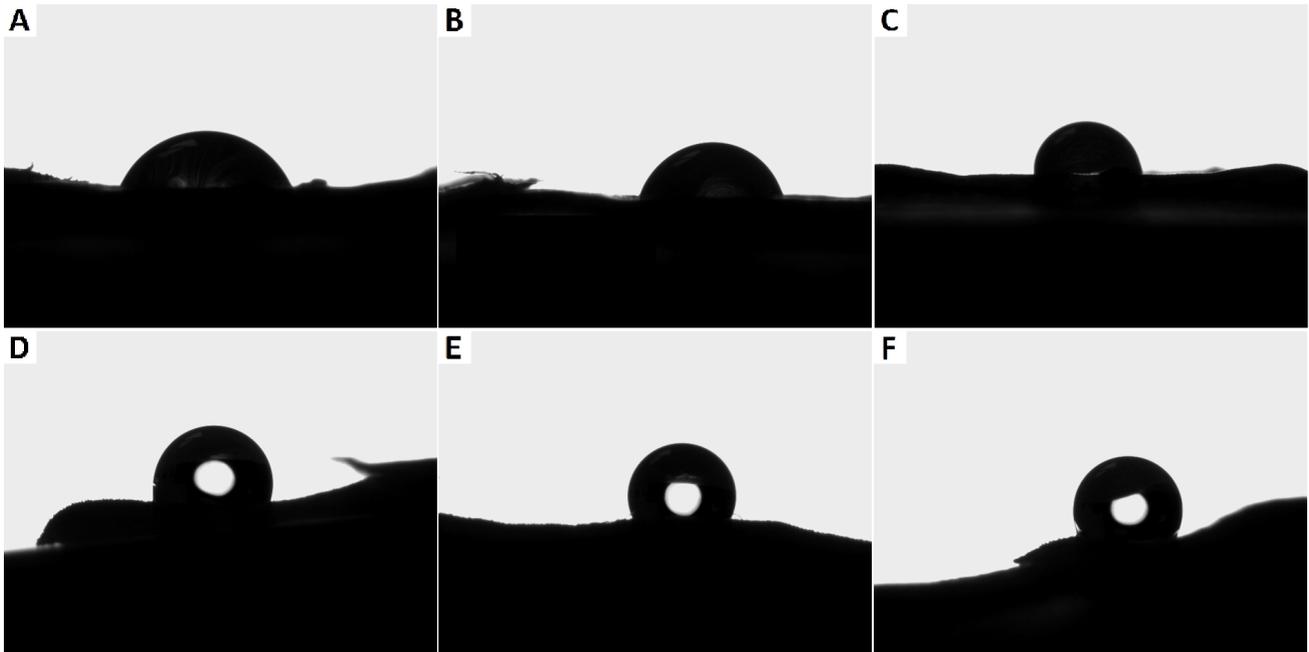


Figura 15: Interacción de gotas de agua con la superficie del labelo de *Oncidium schroederianum*. A- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 66,0° B- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 72,2° C- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 88,5° D- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 104,2° E- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 115,0° F- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 121,9°.

***Cattleya* sp. (JBL4206)**

– Labelo

La superficie abaxial del labelo se mostró cubierta de tricomas cortos y puntiagudas. Estos presentan bases bastante anchas que disminuyen de grosor abruptamente en un punto cercano a la base, para después continuar disminuyendo más gradualmente hacia sus extremos (figura 16A). En general, su textura es bastante lisa. En la base posee surcos bastante sutiles, más o menos circulares superpuestos uno sobre el otro, lo que le da apariencia anillada a la base del tricoma. La textura parece volverse más rugosa hacia el ápice a partir del punto en que su base se adelgaza más abruptamente. En la zona de contacto entre las bases de cada célula, las mismas parecen ser menos turgentes, lo que crea espacios entre las bases de los tricomas (figura 16B).

La superficie adaxial también se mostró cubierta de tricomas. Estos presentan forma similar: sus bases son anchas y en un punto cercano la base adelgaza abruptamente formando la proyección del tricoma. A partir de este punto el ancho disminuye gradualmente hacia el extremo distal. Los tricomas no presentan espacios entre las bases de las células ya que estas mantienen la turgencia en

sus bases. Su textura rugosa la producen fibras de lo que aparenta ser acumulación de cera epicuticular. Estas se originan cerca del borde de cada célula y se orientan hacia el ápice del tricoma (figura 16C). Dichas estructuras se entrelazan cerca de la zona en que el grosor de la célula disminuye abruptamente y hacia el ápice, lo que le confiere un aspecto festoneado al extremo distal de los tricomas. Las estructuras filiformes que cubren estos tricomas parecen poseer un textura bastante lisa (figura 16D).

El labelo presentó ángulos de contacto similares en ambas superficies, un promedio de $120,5^\circ$ en su superficie abaxial, y de $126,3^\circ$ para la adaxial (figura 17).

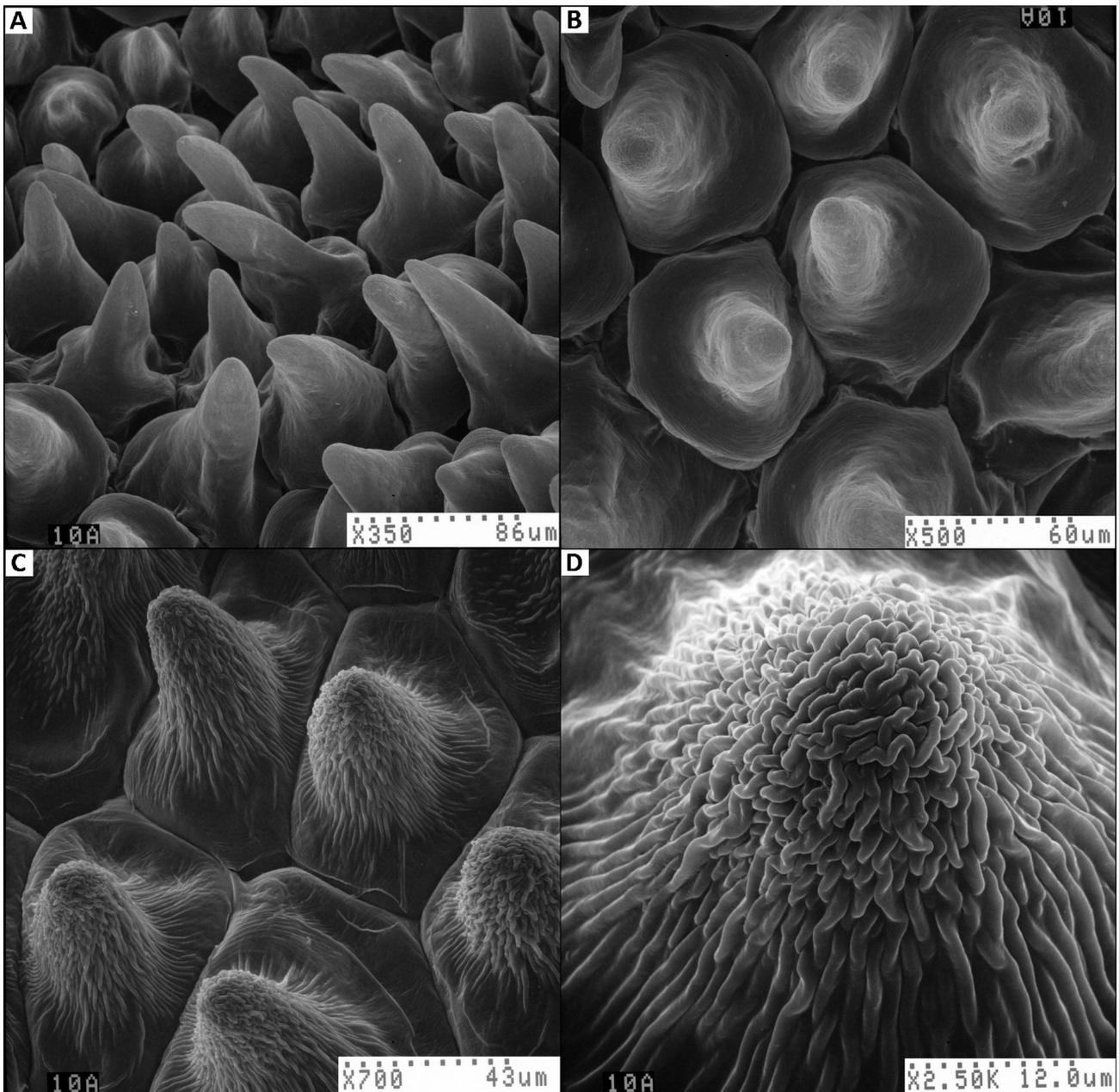


Figura 16: Imagen obtenida por MEB de la superficie del labelo de *Cattleya* sp. A- Superficie abaxial, se observa cubierta de tricomas alargados, puntiagudos y de bases anchas. B- Detalle de los tricomas de la superficie abaxial, donde se observa su textura mayormente lisa. C- Superficie adaxial, se muestran tricomas de forma similar a los presentes en la superficie abaxial, pero estos presentan una textura más rugosa D- Detalle de uno de los tricomas de la superficie adaxial, donde se observan estructuras filiformes aparentemente de cera epicuticular que cubren el tricoma y se entrelazan, más que todo en el ápice del tricoma.

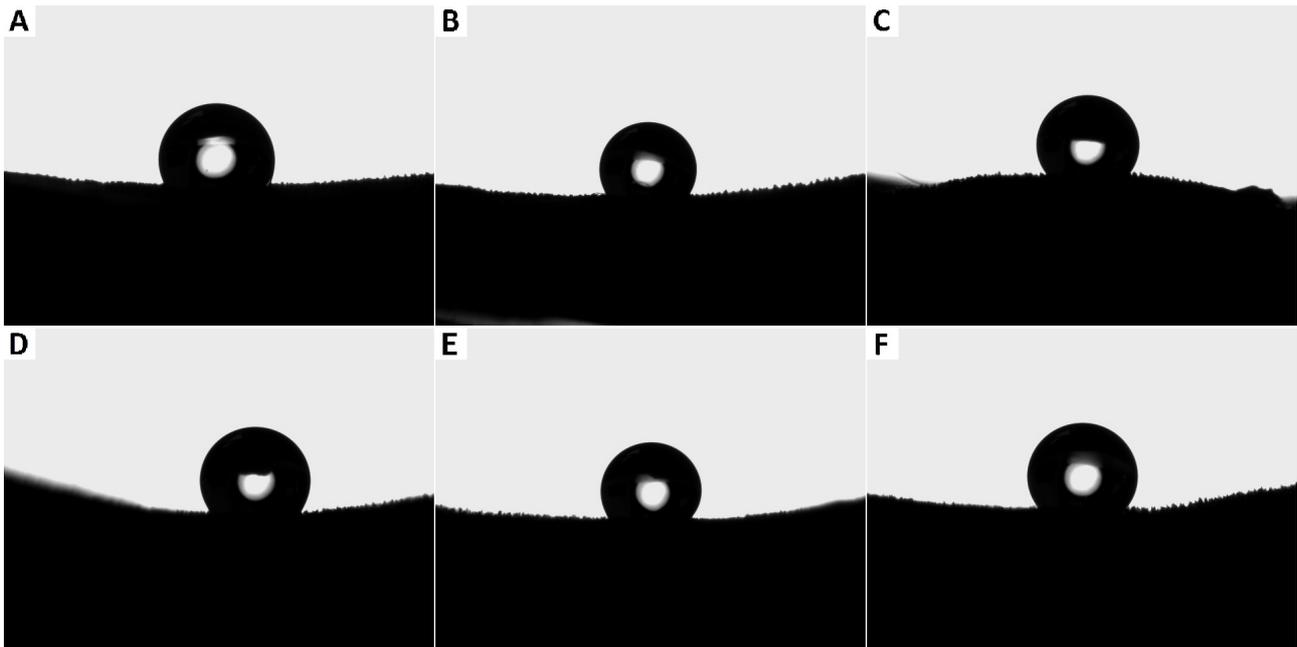


Figura 17: Interacción de gotas de agua con la superficie del labelo de *Cattleya* sp. A- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 113.3° B- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 120.5° C- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 127.8° D- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 125.1° E- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 126.1° F- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 127.8°.

– Pétalos

En cuanto a los pétalos, sus superficies adaxial y abaxial mostraron características similares. Sus superficies se muestran cubiertas de numerosas papilas epidérmicas cortas. Estas poseen una base ancha, la cual se constriñe en un punto más cercano a su extremo proximal que al distal, presentando más constancia en la disminución de su anchura hacia sus extremos distales. Dichas papilas presentaron tamaños visiblemente variables (figuras 18A y C).

La textura de las papilas epidérmicas de ambas superficies es más marcada hacia sus bases, donde se evidencia la presencia de estrías o surcos horizontales poco profundos que recorren la circunferencia de la estructura, lo que les da un aspecto anillado. Estos surcos superficiales se vuelven más sutiles hacia el ápice. Las bases de dichas papilas no aparentan estar muy compactadas con las bases de las papilas vecinas, de modo que se forman espacios vacíos entre las mismas. Ninguna de las superficies aparentan poseer alguna capa de cera epicuticular cubriéndolas (figuras 18B y D).

Pese a la gran similitud en cuanto a las estructuras que recubren la superficie de los pétalos por ambas caras, la superficie abaxial resultó nuevamente la menos hidrofóbica, ya que al interactuar con gotas de agua presentó un ángulo de contacto promedio de 117,8°, mientras que en la superficie adaxial el ángulo de contacto promedio fue de 129,5° (figura 19).

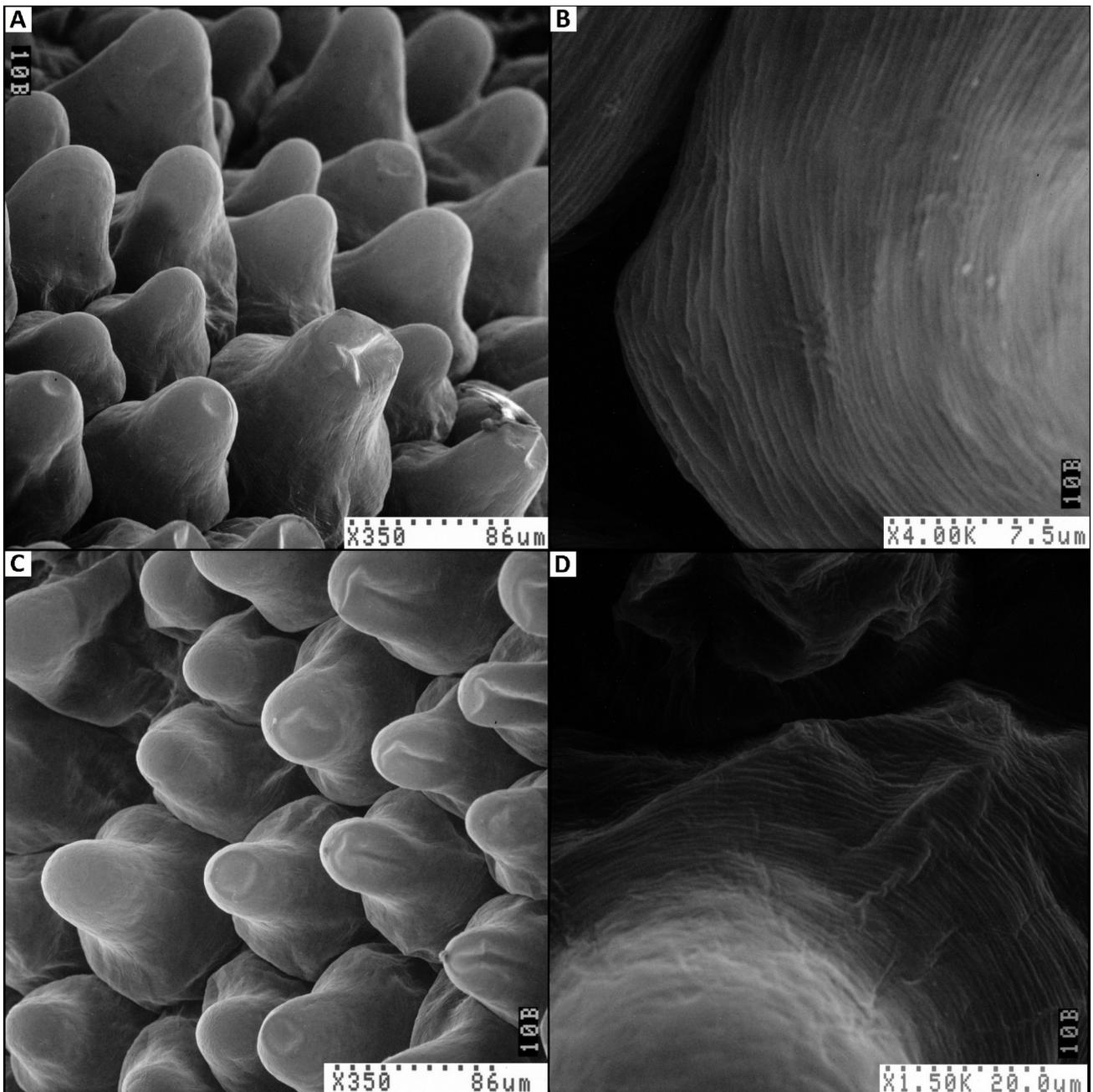


Figura 18: Imagen obtenida con MEB de la superficie del pétalo de *Cattleya* sp. A- Vista general de la superficie abaxial, donde se observan papilas cortas de base ancha y textura bastante lisa B- Detalle del borde de una de las células de la superficie abaxial, donde se muestra el espacio entre células y los surcos que recorren la circunferencia de la célula C- Detalle de la superficie adaxial donde se presentan papilas muy similares a las encontradas en la superficie abaxial D- Detalle del borde de una de las papilas de la superficie adaxial, donde se evidencia una textura similar a las células de la superficie abaxial.

– Sépalos

La superficie abaxial de los sépalos de la flor de esta planta se mostró cubierta de células redondeadas, un poco más ovadas que globosas, de tamaño variable (figura 20A). La textura de estas estructuras es bastante lisa, presentando surcos muy sutiles que recorren la circunferencia de la célula, de modo que le dan una apariencia anillada a su superficie. También presentan pliegues longitudinales un poco más marcados, e imperfecciones varias de la superficie. En algunos casos la

bases de las células forman espacios entre ellas, mientras que en otros casos las bases están bien compactadas entre sí y no se forman dichos espacios (figura 20B).

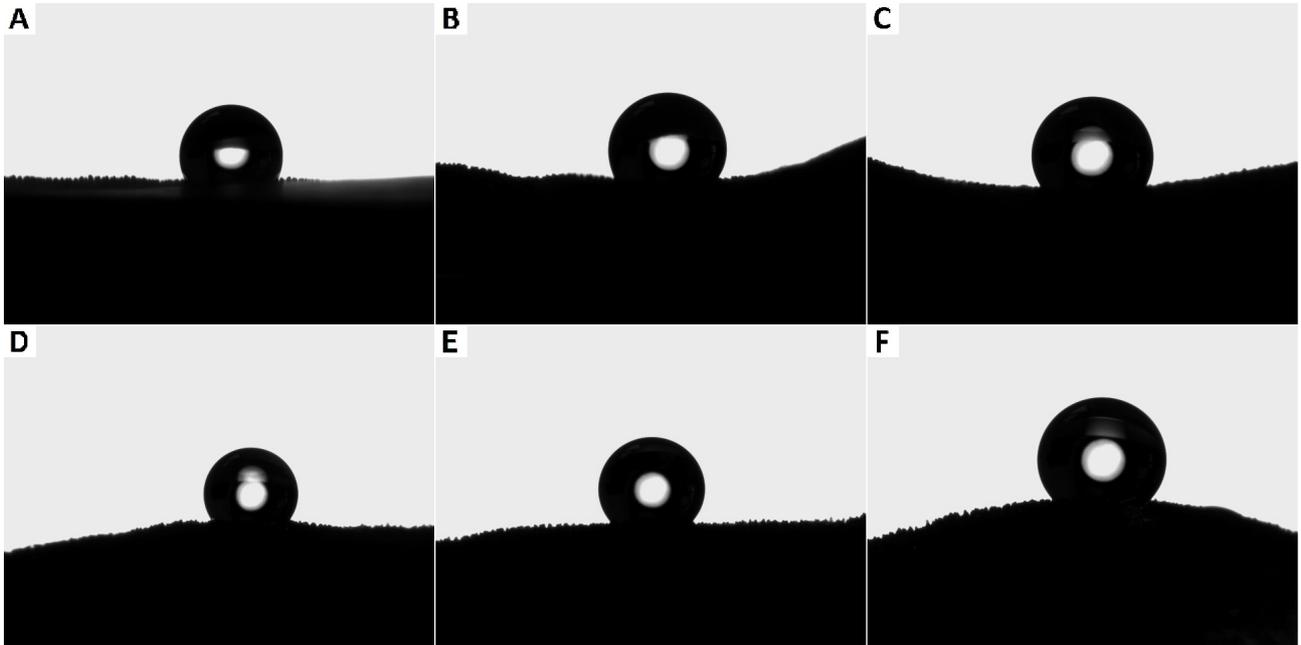


Figura 19: Interacción de una gota de agua con la superficie del pétalo de *Cattleya* sp. A- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 115,0° B- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 118,4° C- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 119,9 D- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 124,4° E- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 131,7° F- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 132,3°.

En la superficie adaxial se observó una superficie cubierta de células redondeadas, globosas, y de tamaño algo variable. Estas células presentan una textura notablemente más rugosa que la presentes en la superficie abaxial. Estas presentan pliegues perpendiculares a la superficie, bastante más acusados que en sus contrapartes de la superficie abaxial (figura 20C). Estas células también presentan surcos bastante superficiales que recorren la circunferencia de la célula, y también se forman espacios amplios entre las bases de las células (figura 20D).

La interacción con gotas de agua se dio en este caso en menor grado en la superficie abaxial, la cual presentó un ángulo de contacto promedio de 110,2°, mientras que en la superficie adaxial se presentó un ángulo de contacto promedio de 118,9° (figura 21).

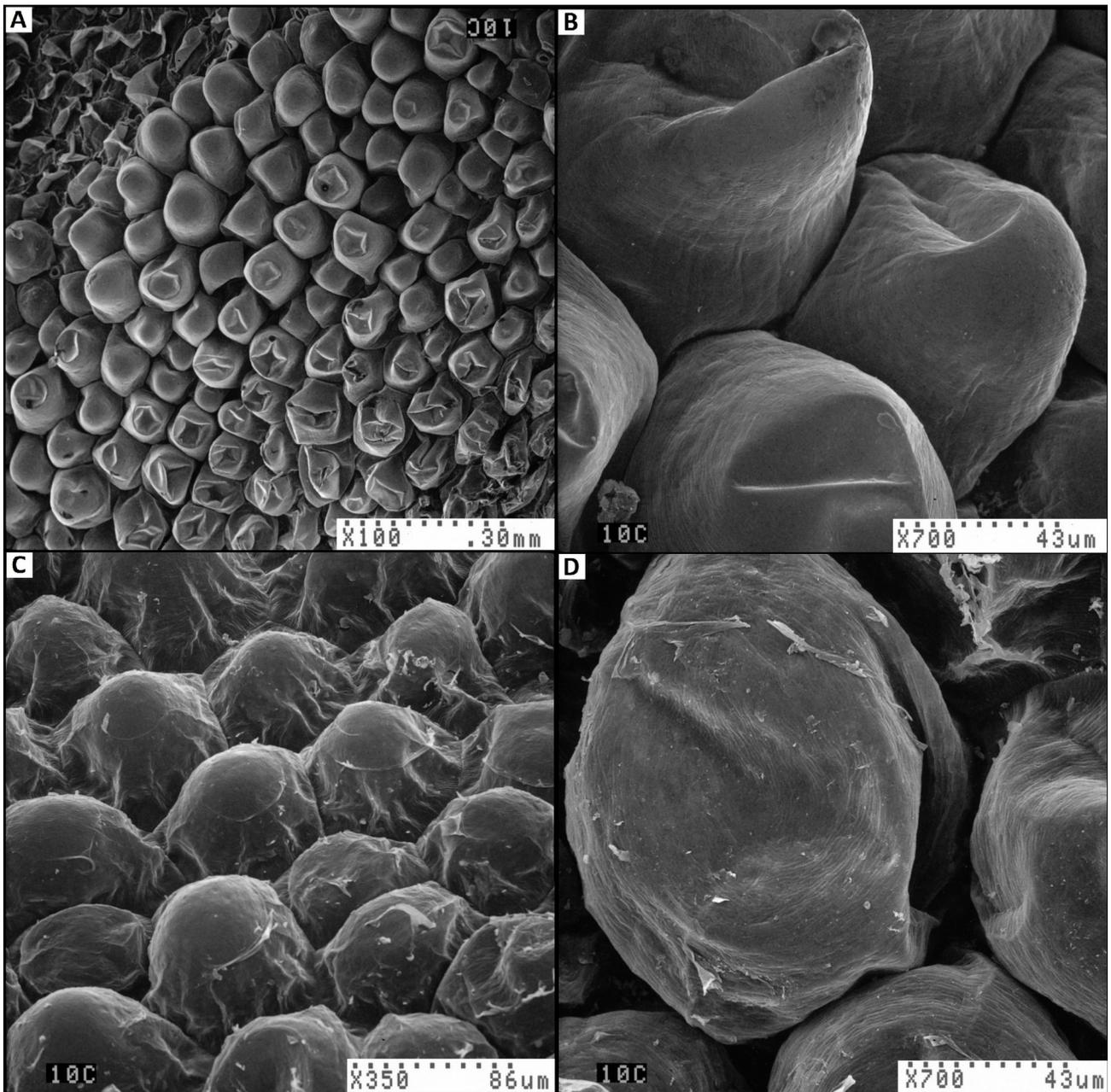


Figura 20: Imagen obtenida con MEB de la superficie del sépalo de *Cattleya* sp. A- Vista general de la superficie abaxial, donde se observan células ovadas y de tamaño variable, así como zonas de colapso celular B- Detalle de las células de la superficie abaxial, se muestra su textura mayormente lisa con surcos perpendiculares a su eje y otros longitudinales y más marcados C- Superficie adaxial, se observan células redondeadas, de textura más rugosa, con pliegues longitudinales bastante marcados D- Detalle de células de la superficie adaxial, donde se muestran surcos que recorren la circunferencia de las células, y los espacios que se presentan entre sus bases.

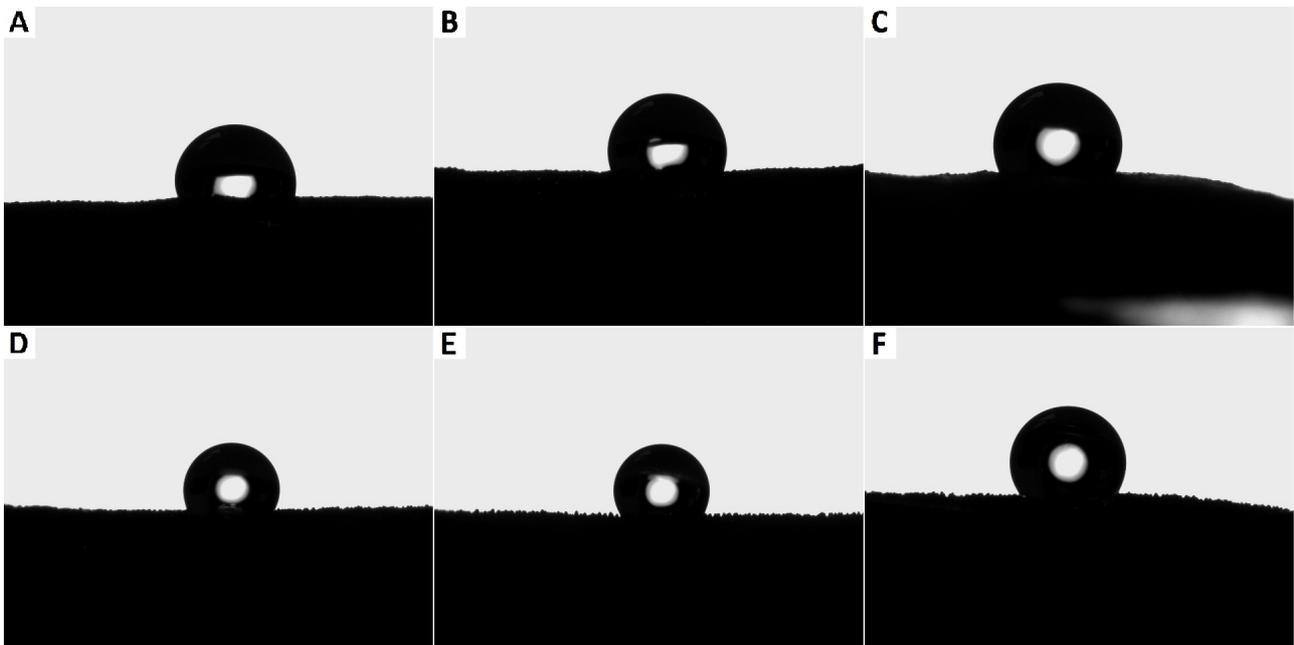


Figura 21: Interacción de gotas de agua con la superficie del sépalo de *Cattleya* sp. A- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 104,0° B- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 110,2° C- Superficie abaxial, ángulo de contacto: 116,5° D- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 115,3° E- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 119,9° F- Superficie adaxial, ángulo de contacto: 121,6°.

Discusión

Para explicar los resultados obtenidos es necesario evaluar los diferentes casos desde diferentes puntos de vista. Para los sépalos de *Phragmipedium longifolium*, por ejemplo, la diferencia entre los ángulos de contacto de las superficies abaxial y adaxial fue muy pequeña. Ambas resultaron hidrofóbicas pero en bajo grado. El hecho de que las superficies vegetales presenten al menos algún grado de hidrofobicidad es bastante razonable, ya que estas, como todas las estructuras primarias de las plantas excepto las raíces, se encuentran cubiertas por la cutícula (Flores-Vindas 1989; Barthlott & Neinhuis 1997) que es una capa continua e hidrofóbica por su composición cerosa, que es depositada en lo más externo de la matriz extracelular de la epidermis y recubre la superficies aéreas primarias de todas las plantas terrestres (Nawrath 2006; Kunst & Samuels 2009). Consiste de dos tipos principales de lípidos: cutina, el polímero estructural base, compuesto principalmente de ácidos grasos C_{16} y C_{18} y glicerol, y las ceras cuticulares, una mezcla mayormente de derivados de ácidos grasos alifáticos de cadenas muy largas (VLCFA, very long chain fatty acids) y cantidades variables de triterpenoides y fenilpropanoides (Kunst & Samuels 2009).

No obstante, es bien sabido que la textura de un sólido ya de por sí hidrofóbico, aumenta su hidrofobicidad. Este efecto es usualmente prominente, ya que no se puede generar el mismo efecto solo por su química (Lafuma & Quéré 2003), de modo que los tricomas observados en la superficie de los sépalos de *Phragmipedium longifolium* podrían contribuir moderadamente a la

hidrofobicidad de la superficie con respecto a los órganos de otras plantas, resultando en la selección de esta entre esas otras estructuras menos hidrofóbicas a simple vista, para las observaciones a mayor profundidad que se realizaron en este estudio.

Tras décadas de investigación, se ha hecho claro que los atributos de las superficies biológicas se derivan de una interacción compleja entre su química, morfología (como la textura), propiedades mecánicas (como por ejemplo estructuras modulares) y polaridad, y que dichas características juegan un rol pivotante en determinar la funcionalidad de los materiales biológicos (Genzer & Marmur 2008). Sin embargo, en los sépalos de *Phragmipedium longifolium* los tricomas se encuentran bastante distanciados entre sí, lo que podría producir una hidrofobicidad menor con respecto a las otras plantas seleccionadas. Por ejemplo, en el labelo de *Brassavola nodosa* no se encontraron tricomas, solo textura producida por lo redondeado de sus células, y sus dos superficies resultaron más hidrofóbicas que ambas superficies de los sépalos de *Phragmipedium longifolium*.

Como se mencionó anteriormente, las rugosidades causadas por diferentes elementos estructurales como tricomas no son un prerrequisito para obtener una hoja no humectable (Shirtcliffe et al. 2009). Uno de los factores que juega un rol en cuanto al ángulo de contacto es la distancia, ya que cuando las estructuras de la superficie están muy separadas entre sí se esperan ángulos de contacto bastante bajos (Marmur 2004), de modo que dichas estructuras, como tricomas o papilas no necesariamente producen superhidrofobicidad, y el efecto de dichas irregularidades de las superficies más bien podrían tender a la hidrofilia bajo ciertas circunstancias (Shirtcliffe et al. 2009).

Adicionalmente, las observaciones lograron evidenciar que la textura de la superficie abaxial de los sépalos de *Phragmipedium longifolium* muy probablemente no es causada por la textura de la pared celular epidérmica, ya que se observó cómo una capa superficial a esta se desprendió. Esta capa podría corresponder al recubrimiento de cera o a la cutícula sobre la cual se encuentra dicho recubrimiento. Koch & Barthlott (2009) aseguran que el tipo de estructuración de la superficie celular que se origina por texturas propiamente en la cutícula son muy frecuentemente halladas en pétalos u órganos florales, así como en superficies de semillas. Estas texturas usualmente ocurren como plegamientos o patrones tuberculares o papilosos que se originan debido a la propia cutícula, por la expresión de abultamientos de la pared celular subyacente o por insertos subcuticulares. Serían necesarias pruebas subsecuentes para verificar cuál de los casos aplica para las demás muestras observadas que presentan dichas estructuras papilosas.

Para ángulos de contacto mayores que los encontrados en *Phragmipedium longifolium* hay dos modelos para explicar el efecto de la textura en la hidro repelencia; uno corresponde al modelo Wenzel en que la textura aumenta el área superficial del sólido, lo que impulsa geométricamente la hidrofobicidad (Lafuma & Quéré 2003). Este modelo correspondería al régimen de humectabilidad

homogéneo mencionado anteriormente, en que el líquido penetra completamente en los espacios creados por la textura de la superficie (Marmur 2004) y da cuenta de sólidos moderadamente hidrofóbicos, en el rango de los 90° o poco más, de modo que las bolsas de aire, que implican interfases líquido/vapor de alta energía superficial, no serían favorecidas. El modelo Cassie por otro lado sostiene que la textura permite que el aire quede atrapado bajo la gota, quedando la gota apoyada parcialmente en dicho aire atrapado (Lafuma & Quéré 2003). Este modelo correspondería al régimen de humectabilidad heterogénea que se mencionó anteriormente, en que el líquido no penetra los espacios creados por la textura (Marmur 2004), y funciona mejor para sustratos muy hidrofóbicos o muy rugosos, casos en que la ecuación para el modelo Wenzel predice completa sequedad de la superficie (180°) lo cual no es físicamente correcto ya que la gota debe estar en contacto con la superficie (Lafuma & Quéré 2003).

Aunque el ángulo de contacto sea el mismo, ya que existe un rango de ángulos de contacto que pueden exhibir uno u otro estado, ambas situaciones son muy diferentes en cuanto a sus propiedades adhesivas ya que las gotas en estado Wenzel son altamente fijadas a la superficie, mientras que en el estado Cassie las gotas se deslizan fácilmente en la superficie (Lafuma & Quéré 2003), característica de interés en cuanto a auto limpieza (Gao & McCarthy 2006), ya que para que esta funcione, la organización espacial de la topografía de la superficie de la planta debe permitir que las gotas de agua y los contaminantes resbalen fácilmente (Genzer & Marmur 2008). Las muestras aquí observadas parecen corresponder en todos los casos al estado Cassie, ya que las gotas se deslizan fácilmente en todas las superficies observadas. Esto concuerda con las afirmaciones de que este es el estado favorecido por la naturaleza, probablemente porque el estado Cassie, cuando las protuberancias están cerca unas de otras, es relativamente insensible a su profundidad, y porque para dado ángulo de contacto el área humedecida siempre es menor en el estado Cassie (Marmur 2004).

Adicionalmente se sabe que en muchos casos las gotas en superficies con textura se encuentran en el régimen de Cassie, inclusive para hidrofobicidad moderada, o equivalentemente, textura moderada. Este hecho es revelado por una discontinuidad en la ecuación para el ángulo de contacto al ingresar en la región hidrofóbica. Inclusive si los ángulos de contacto son comparables, sus fluctuaciones (o la llamada histéresis) son profundamente afectadas por presión o tamaño de la gota, lo que lleva a enormes diferencias en las propiedades de adhesión, y puede afectar profundamente las características de auto limpieza (Lafuma & Quéré 2003). Tomando esto en consideración es fácil comprender los ángulos de contacto relativamente bajos obtenidos en superficies ya sea con tricomas esparcidos o sin ningún tipo de estructura similar, y los más altos ángulos en las superficies con características contrastantes a las primeras.

Otro aspecto de interés es la diferencia entre los ángulos de contacto entre ambas superficies

de un mismo órgano floral, como sucedió por ejemplo en *Phragmipedium longifolium*, *Brassavola nodosa* y *Paphiopedilum insigne*, con superficies abaxiales más hidrofóbicas que las adaxiales, las últimas dos con diferencias considerables, con ángulos de contacto en la superficie abaxial mayores a 100° y adaxiales menores a 88° . *Oncidium schroederianum* y *Maxillaria luteo-alba* también presentaron una diferencia amplia en cuanto a la hidrofobicidad entre ambas superficies, sin embargo en estos, al igual que los órganos florales de *Cattleya* sp., la cara más hidrofóbica fue la adaxial, aunque en esta última la diferencia entre ambas caras fue menor. Este efecto de diferencia en hidrofobicidad entre ambas caras pudo haber sido causado por diferentes aspectos en cada caso.

Paphiopedilum insigne por ejemplo, con las diferencias más amplias entre ambas superficies, no presentó tricomas en la superficie adaxial de los sépalos, mientras que en la abaxial se observaron tricomas numerosos con poco espacio entre ellos, aspecto que permitiría que se formen burbujas de aire al contacto con agua, lo que le daría mayor hidrofobicidad a esta superficie, como se observó. Esta superficie fue una de las más hidrofóbicas de las observadas.

En *Brassavola nodosa* no hubo mucha diferencia entre ambas superficies del labelo. Es posible que la superficie abaxial posea espacios más marcados entre las células, permitiendo que se formen burbujas de aire un poco más grandes, pero se necesitarían pruebas adicionales para comprobarlo.

En *Oncidium schroederianum*, la superficie del labelo que resultó menos hidrofóbica, la abaxial, presentó mayormente una superficie lisa, lo que puede explicar su poca hidrofobicidad, aunque hay estructuras hacia los bordes que, posiblemente por ocupar un área reducida cerca del borde del labelo, no tuvieron mayor influencia en su hidrofobicidad. La superficie adaxial en cambio, presentó tricomas papilosos densamente empacados y un mayor ángulo de contacto, sin embargo no se presentó textura a una escala menor, lo que pudo causar que no se alcance ni la súper hidrofobicidad ni el nivel de hidrofobicidad de la superficie adaxial del labelo de *Maxillaria luteo-alba*, que presentó una superficie similar, con papilas cortas densamente empacadas pero también tricomas largos, y estar compuesta de dos tipos de estructura contribuye para dar una textura aún más rugosa, que le concedería esa mayor hidrofobicidad. Esto podría ser la causa de que esta superficie presentara el mayor grado de hidrofobicidad de las muestras observadas. La superficie abaxial, menos hidrofóbica y con una superficie netamente lisa con tricomas alargados bastante esparcidos, no poseería los mismo espacios, presentando una hidrofobicidad mucho menor.

La similitud en los ángulos de contacto entre las caras adaxial y abaxial de los órganos florales de *Cattleya* sp. podría deberse al hecho de que las mismas estructuras de la superficie se encuentran presentes en ambas caras en una organización similar. El hecho de tener una mayor cantidad de cera en una de las caras, y su consecuente contribución a la textura de la superficie, parece tener poca influencia en el ángulo de contacto. Es posible que la textura producida por la

cera de la superficie no sea suficientemente profunda como para crear espacios para burbujas de aire que disminuirían la interacción del agua con la superficie hasta un nivel de súper hidrofobicidad.

El hecho de que la carga de cera difiera entre las superficies adaxial y abaxial de un mismo órgano en mayor o menor grado, como se observó en algunos de los órganos aquí observados, ya se ha documentado. Por medio de métodos combinando muestreo mecánico y extracción por medio de solventes en superficies foliares, se observa que la carga de cera puede variar no solo entre sus lados adaxial y abaxial, sino también entre ceras epicuticulares e intracuticulares (Nawrath 2006). Las observaciones realizadas extrapolan esta afirmación a órganos florales. El mismo tipo de agregados de cera epicuticular que forman estructuras fibrosas o filiformes se presentaron en *Phragmipedium longifolium* (superficie abaxial de sépalos y ligeramente en la adaxial), y *Cattleya* sp. (labelo, superficie adaxial). Esto podría sugerir evidencia de similitud química y/o genética en cuanto a la producción de cera, ya que, aunque la regulación de la deposición cuticular de ceras aún no ha sido completamente dilucidada, hay buena evidencia de que la biosíntesis de cera está bajo control transcripcional.

En células epidérmicas, los lípidos cuticulares deben ser transportados desde sus sitios de síntesis en el RE a la membrana celular, deben atravesarla para finalmente ser translocados a través de la pared celular exterior periclinal a la cutícula, donde aparentemente se auto ensamblan. Se ha postulado ampliamente que transportadores específicos de la pared celular, como por ejemplo, proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) podrían estar involucradas en la translocación de moléculas altamente hidrofóbicas a través de la pared celular, la cual es hidrofílica (Kunst & Samuels 2009). Adicionalmente se dice que el patrón en el que se ensamblan los depósitos de cera se debe a su composición química más que a la acción de cualquier otro control. De hecho si se remueve de la hoja con solvente y este se evapora, la cera que queda en el recipiente tiene la misma morfología que en la superficie foliar (Flores-Vindas 1989).

No se encontró ninguna superficie que exhibiera súper hidrofobicidad. La muestra más hidrofóbica fue la superficie adaxial de *Maxillaria luteo-alba*, con un ángulo de contacto de $137,0^\circ$. Aunque esta muestra presentó una textura compuesta por dos tipos de estructuras de diferentes longitudes, formando dos niveles de textura, no es el tipo de organización típicamente descrito para superficies súper hidrofóbicas, ya que en este caso los dos niveles fueron dados por tricomas con dos longitudes diferentes, mientras que lo usual en cuanto a súper hidrofobicidad es que el aire aparentemente quede atrapado entre las estructuras que forman cristaloides de cera epicuticular encontrados sobre estructuras como tricomas papiloides (Barthlott & Neinhuis 1997), como en el loto, donde se encuentran estructuras en la superficie, como papilas por ejemplo, y finas estructuras sobre dichas protuberancias (Marmur 2004). Esto forma una superficie compuesta, en que se

aumenta la interfase agua/aire, mientras que la interfase sólido/agua se minimiza. (Barthlott & Neinhuis 1997).

Al parecer, entonces, el poseer tricomas de 2 longitudes diferentes entremezclados en la misma superficie no es suficiente para disminuir la interacción con el agua hasta un nivel de súper hidrofobicidad, y las texturas deben encontrarse a niveles de organización o escalas diferentes. Esta puede ser una de las razones por las cuales no se observó ninguna superficie con ángulos de contacto de más de 150°; no se encontraron superficies con textura en dos escalas o niveles de organización, excepto en *Phragmipedium longifolium* (superficie abaxial de sépalos y ligeramente en la adaxial), y *Cattleya* sp. (labelo, superficie adaxial), que presentaron formaciones filiformes de cera que probablemente sean de profundidad insuficiente como para atrapar cantidades importantes de aire. Al parecer una alta densidad de tricomas alargados tiene un efecto similar basándose en los ángulos de contacto aquí obtenidos.

El hecho de encontrar estas estructuras en flores puede tener implicaciones interesantes. Algunas pistas pueden provenir de las micro estructuras en superficies foliares, de las cuales se ha hablado bastante en cuanto a sus funciones. Las de los tricomas en hojas incluyen protección mecánica, absorción de sustancias, aislamiento y reflexión de la luz, típico del indumento de ciertos cactus y xerófitas. En agricultura se descubrió la importancia de los tricomas como estructuras que pueden obstaculizar la penetración de ciertas sustancias químicas vía hoja. En plantas que crecen bajo diferentes intensidades de sombra podrían estar involucrados en la captación de luz. Las ceras epicuticulares también cumplen las funciones de protección contra el daño mecánico y reflexión o atenuación de la radiación entre otras (Flores-Vindas 1989). En algunos casos la presencia de micropapilas como ornamentaciones epidérmicas facilita una mejor captación de luz por los diferentes ángulos oblicuos. Asimismo, pueden actuar en la regulación de la cantidad de luz incidente y evitan que se sobre calienten los tejidos subyacentes (Noguera-Savelli & Jáuregui 2011). Por ejemplo, en *Encelia*, los tricomas pueden tener un efecto significativo en las características espectrales de la hoja, con un ámbito de luz reflejada de 8 a 71% en las diferentes especies. Consecuencia de dichas diferencias en la reflexión de la luz es un balance energético foliar alterado que disminuye la temperatura foliar, evitando temperaturas altas o letales, y al parecer maximizando la ganancia neta de carbono en condiciones de aridez luz (Flores-Vindas 1989).

La alta hidrofobicidad y la presencia de las estructuras de superficie en flores pueden tener diferentes significados. Por ejemplo, al reducir la retención de agua sobre la superficie de la planta, se evitaría la germinación de esporas fungales y de bacterias y evitaría la supervivencia de microorganismos de la filosfera (Genzer & Marmur 2008, Flores-Vindas 1989), algo que también podría aplicar para órganos florales, ya que una de las formas en que atraen polinizadores es por medio de características visuales de las flores (Singer 2003). Muchos himenópteros tienen sistemas de visión

a color con 3 tipos de receptores (UV, azul y verde), y solo algunas especies tienen visión tetracrómica. Los colores pueden producirse por refracción de la luz sobre estructuras específicas o por pigmentos que absorben longitudes de onda definidas. En flores en general, los pétalos suelen ser los órganos con más pigmento, pero en otras, los sépalos, brácteas o estambres son los que tienen colores intensos (Flores-Vindas 1989). De este modo es justificable el hecho de tener una ventaja al poseer una superficie floral libre de contaminantes y patógenos, y que estas características se observen en diferentes órganos florales.

Otro aspecto importante en cuanto a la captación, reflexión o atenuación de la luz o la radiación y la hidrofobicidad, puede tener que ver con las fragancias producidas por las orquídeas para su polinización. La adaptación a mecanismos de polinización está controlada por numerosos principios evolutivos. La morfología floral está relacionada con el polinizador más eficiente, y usualmente existe evolución adaptativa paralela entre el vector de la polinización y las especificaciones estructurales, espectrales y olfatorias de la flor (Flores-Vindas 1989). En total, las flores de unas 625 especies pertenecientes a unos 55 géneros de orquídeas tropicales americanas son primariamente fragantes (Dressler 1982). Las abejas macho de la familia Apidae, subtribu Euglossini colectan perfumes de un número de fuentes. Las orquídeas son la mejor conocida de ellas (Dressler 1982; Armbruster & Berg 1994, Roubik & Hanson 2004) y de hecho tienen una relación tan estrecha que son comúnmente reconocidas como las abejas de las orquídeas, aunque también son polinizadores de otras plantas. Las abejas euglosinas macho recolectan las fragancias de las flores principalmente de orquídeas y las mezclan con secreciones glandulares y las modifican aparentemente para atraer hembras (Roubik & Hanson 2004, Genzer & Marmur 2008). El aroma en flores tiene un ciclo diario probablemente influenciado por el ambiente térmico. Estas variaciones pueden afectar la distribución de los insectos e inclusive sus sistemas de apareo (Genzer & Marmur 2008). Además, temperaturas altas aumentan la tasa de volatilización, incrementando el tamaño de la nube volatilizada (Armbruster & Berg 1994).

Así, poseer una superficie floral libre de agua podría significar una ventaja en cuanto a la volatilización y el tamaño de la pluma de dichas fragancias atrayentes. Este es un aspecto importante debido a que por un lado las hembras euglosinas son especialmente importantes en la polinización cruzada de plantas dispersamente distribuidas en el bosque tropical, y que muchas especies de plantas que producen pocas flores en períodos largos, están adaptadas a polinización por euglosinas. Los machos también vuelan largas distancias y pueden ser importantes en la polinización cruzada a larga distancia de plantas con néctar o perfumes, y ya que no están atados a un sitio de anidación, tienen un rango más amplio (Dressler 1982).

Conclusiones y recomendaciones

Aunque no se encontraron órganos florales súper hidrofóbicos, los resultados indican que las plantas pertenecientes a la familia Orchidaceae poseen potencial de poseer estructuras súper hidrofóbicas de interés, lo que da pie a más investigaciones en este campo. También se abre la posibilidad de más investigaciones en cuanto a los mecanismos de producción o inhibición de la producción de ceras, dado que se evidenció que algunas superficies producen exceso de cera y otras no lo hacen del todo, y aunque por ejemplo se conocen los precursores para ceras cuticulares, en cuáles células se sintetizan, así como complejos enzimáticos y otros sustratos involucrados, aún hay mucha información que dilucidar al respecto (Kunst & Samuels 2009).

Asimismo, se lograron caracterizar estructuras en las superficies florales de los órganos analizados y relacionarlos a sus características de hidrofobicidad. Lagunas de conocimiento a rellenar en el conocimiento para categorizar nanomateriales adecuadamente incluyen incertidumbres relacionadas con sus propiedades (por ejemplo, tamaño, distribución del tamaño, forma, área superficial, carga superficial, composición química, etc.) y factores importantes para determinar cómo van a interactuar con procesos biológicos (como su estado de agregación, habilidad para degradación y el destino general y comportamiento del ambiente, etc.) (Wickson et al. 2010). De este modo, aún hay preguntas por responder, como por ejemplo aún no es claro el rol que juegan los pelos de ciertas superficies vegetales, si es meramente la combinación de rugosidades en diferentes escalas lo que afecta la humectabilidad o si por ejemplo la elasticidad de los pelos juega algún papel en mantener la planta limpia (Genzer & Marmur 2008). Del mismo modo se recomienda investigación acerca de la influencia de la remoción del agua en las superficies florales en cuanto a la volatilización de compuestos aromáticos atrayentes y su efecto en la atracción de polinizadores. Estas investigaciones seguirían contribuyendo al desarrollo de nuevos materiales con características de interés innovadoras para la industria.

Referencias

- Armbruster, W. S. & E. E. Berg. 1994. Thermal ecology of male euglossine bees in a tropical wet forest: fragrance foraging in relation to operative temperature. *Biotropica*. 26(1): 50-60
- Arslan, S. & A. G. Sorguc. 2004. Similarities between “structures in nature” and “man-made structures”: biomimesis in architecture. *Design and Nature*. 2: 45-54
- Arvind, R., E. Yoon. & R. L. Jackson. 2009. Biomimetics: the science of imitating nature. *Tribology and Lubrication Technology*. 65(2): 40-47
- Barthlott, W. & C. Neinhuis. 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta*. 202:1-8
- Bhushan, B. 2009. Biomimetics: lessons from nature – an overview. *Philosophical transactions of the Royal Society*. 367: 1445-1486.
- Dressler, R. L. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13:373-394
- Dressler, R. 1993. Field guide to the orchids of Costa Rica and Panama. Primera edición. Cornell University Press. New York, EE. UU. 374 pp.
- Feng, L., S. Li, Y. Li, H. Li, L. Zhang, J. Zhai, Y. Song, B. Liu, L. Jiang & D. Zhu. 2002. Superhydrophobic surfaces: from natural to artificial. *Advanced Materials*. 14(24): 1857-1860
- Flores- Vindas, E. M. 1989. La planta: estructura y función. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 3^a edición. San José, Costa Rica. 501pp.
- Gao, L. & T. J- McCarthy. 2006, The “lotus effect” explained: two reasons why two length scales of topography are important. *Langmuir*. 22: 2966-2967
- Guo, Z. & W. Liu. 2007. Biomimic from the superhydrophobic plant leaves in nature: Binary structure and unitary structure. *Plant Sci*. 172: 988-944.

- Genzer, J. & A. Marmur. 2008. Biological and synthetic self-cleaning surfaces. *MRS Bulletin*. 33: 742-746.
- Koch, K. & W. Barthlott. 2009. Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. *Phil. Trans. R. Soc. A*. 367(1487-1509).
- Kunst, L. & A. L. Samuels. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*. 42: 51-80
- Kunst, L. & L. Samuels. 2009. Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export. *Current Opinion in Plant Biology*. 12:721-727.
- Lafuma, A. & D. Quéré. 2003. Superhydrofobic states. *Nature Materials*. 2:457-460
- Marmur, A. 2004. The lotus effect: superhydrophobicity and metastability. *Langmuir*. 20: 3517-3519.
- Neinhuis, C. & W. Barthlott. 1997. Characterization of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. *Annals of Botany*. 79: 667-677
- Nawrath, C. 2006. Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Current Opinion in Plant Biology*. 9:281-287
- Noguera-Savelli, E. & D. Jáuregui. 2011. Anatomía foliar comparada y relaciones filogenéticas de 11 especies de Laeliinae con énfasis en *Brassavola* (Orchidaceae). *Rev. Biol. Trop.* 59(3): 1047-1059
- Pérez García, A. & F. Gómez Martínez. 2009. Natural structures: strategies for geometrical and morphological optimization. *Proceedings of the International Association for Shell and Spatial Structures (IASS) Symposium. Evolution and Trends in Design, Analysis and Construction of Shell and Spatial Structures*. Valencia, 28 Set- 2 Oct. pp 893- 906
- Qu, M., G. Zhao, X. Cao & J. Zhang. 2008. Biomimetic fabrication of lotus-leaf-like structured polyaniline film with stable superhydrophobic and conductive properties. *Langmuir*. 24: 4185-4189.

- Roubik, D. W. & P. E. Hanson. 2004. Abejas de orquídeas de la América tropical, biología y guía de campo. Instituto Nacional de Biodiversidad.
- Sariyaka, M., C. Tamerler, A. K. Jen, K. Schulten & F. Baneyx. 2003. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nature Materials* 2: 577-585
- Shirtcliffe, N. J., G. McHale & M. I. Newton. 2009. Learning from superhydrophobic plants: the use of hydrophilic areas on superhydrophobic surfaces for droplet control. *Langmuir*. 25(24): 14121-14128.
- Singer, R. B. 2003. Orchid pollination: recent development from Brazil. *Lankesteriana* 7: 111-114.
- Vincent, J. F. V., O. A. Bogatyreva, N. R. Bogatyrev, A. Bowyer & A. Pahl. 2006. Biomimetics: its practice and theory. *J. R. Soc. Interface*. 3: 471-482
- Wickson, F., K. Grieger & A. Baun. 2010. Nature and nanotechnology: Science, ideology and policy. *International Journal of Emerging Technologies and Society*. 8(1): 5-23
- Xi, J. & I. Jiang. 2008. Biomimic superhydrophobic surface with adhesive forces. 2008. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47: 6354-6357.