

## Caracterización $\text{CaCO}_3$ y $\text{CaC}_2\text{O}_4$ con análisis microfotográfico en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller.

Rafael Zúñiga Valenzuela<sup>1</sup>  
Edgar Vladimir Gutiérrez Castorena<sup>1</sup>  
Ma. Del Carmen Gutiérrez Castorena<sup>2</sup>  
Emilio Olivares Sáenz<sup>1</sup>  
Santiago de Jesús Méndez Gallegos<sup>3</sup>  
Roberto Carranza de la Rosa<sup>1</sup>  
Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía-Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Francisco Villa s/n, col. Ex-hacienda el Canadá, Nuevo León, México. Tel. 01(81) 13404399. <sup>2</sup>Colegio de Posgraduados-*Campus* Montecillos. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Tel. 01(55) 58045900. <sup>3</sup>Colegio de Posgraduados-*Campus* San Luis Potosí. Calle de Iturbide 73, San Agustín, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México. CP. 78622. Tel. 01(444) 9630240.

§Autor para correspondencia: r.vazquez.alvarado@yahoo.com.mx.

### Resumen

El consumo de calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) es más frecuente en la dieta humana por su biodisponibilidad y viabilidad de forma natural en el cultivo del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L. Miller.); sin embargo, su disponibilidad es limitada por estrés hídrico en la planta al secuestrar  $\text{Ca}^{++}$  en forma de oxalato de calcio ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ). El estudio incursiona en análisis microfotográfico secuencial para elaborar mosaicos digitales de alta definición en muestras inalteradas del cladodios del nopal con 60 días de edad a diferenciales hídricas 10 y 30% de agua disponible (AD) y son procesadas en secciones delgadas (SD) de 30 micras ( $\mu\text{m}$ ) de espesor, además de ser analizadas densitométricamente en tres diferentes fases de luz mediante un microscopio petrográfico, la caracterización de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  y  $\text{CaCO}_3$  fue realizada por firma en formatos RGB caracterizando el tipo de compuesto, su núcleo, tamaño y textura. Los resultados obtenidos por tamaño de los  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  de 10 y 30% AD fueron: de  $37.63\mu\text{m}$  y  $71.39\mu\text{m}$  en estos compuestos y los núcleos de dichos compuestos alcanzaron de  $20.4\mu\text{m}$  y  $24.04\mu\text{m}$ ; con una textura de forma prismática y cubica, mientras que los  $\text{CaCO}_3$  para los mismos niveles de agua disponible: alcanzaron tamaño de  $19.15\mu\text{m}$  y  $20.86\mu\text{m}$  con una textura cubica preponderante. Concluyendo que el tamaño de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  y  $\text{CaCO}_3$  depende del estado de deshidratación de las plantas, así también se observó una correlación entre el tamaño del núcleo de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ , donde para cada  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  se fija un  $\text{CaCO}_3$ , que no está disponible.

**Palabras clave:** estrés hídrico, mosaicos digitales, nopal, oxalato.

Recibido: septiembre de 2018

Aceptado: octubre de 2018

El carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) es un compuesto abundante debido a sustancias inorgánicas originadas por organismos vivos, aspecto importante en el desarrollo de nuevos materiales y campo de aplicación (Shu-Chen *et al.*, 2007). Estos presentan tres polimorfos cristalinos anhidros como calcita, aragonita y vaterita ordenados por su estabilidad termodinámica (Payne *et al.*, 2007). De manera que la calcita se encuentra presente tanto en el nopal como en cáscaras de huevos, conchas de moluscos, crustáceos y otros biominerales (Shu-Chen *et al.*, 2007). Los carbonatos poseen un radical discreto que dependen de las condiciones de presión y temperatura para dar origen a minerales de carbonato de calcio monohidratado (Young *et al.*, 2003) o por su forma cubica específicos en especies vegetales (Franceschi y Horner, 1980).

En países en vías de desarrollo como México, el consumo de calcio en productos lácteos es limitado por su alto costo, presentándose como una alternativa el nopal verdura (Heaney, 2001; Fairweather, 2007). Para la absorción del cuerpo, el calcio está disponible en el nopal verdura a menos que presenten grandes concentraciones de ácido oxálico ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ) o fibra dietética (Kennefick y Cashman, 2000; Heaney, 2001; Charoenkiatkul *et al.*, 2008) ya que limitan su formación al quedar secuestrado como oxalatos, impidiendo su absorción por el metabolismo, además el oxalato de calcio ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ) esta limitada por el tipo y forma de cristales el cual varía entre 8 y 50% del peso seco del cladodio (Gallaher, 1975; McConn y Nakata, 2004). Asimismo, el consumo de nopalito varía dependiendo del estado de maduración (entre 400 y 500 g) que reporta altos contenidos de calcio libre de oxalato (3.4 g en 100 g) (Rodríguez *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha reportado que el nopal por su fisiología produce cristales de oxalato de calcio (Franceschi y Horner, 1980) clasificados en cuatro tipos por su morfología (Jauregui *et al.*, 2003) en: rafidios (cristales aciculares en agregados), drusas (agregados cristalinos esféricos), estiloides (cristales aciculares) y prismas. Donde la morfología de los cristales y distribución dentro de los tejidos de la planta son específicos, que puede ser en forma de whewellita (oxalato de calcio monohidratado) o de weddellita (oxalato de calcio dihidratado) (Franceschi y Horner, 1980).

Atendiendo la inquietud de conocer la forma y estructura de diferentes cristales presentes en el nopal Jauregui *et al.* (2003) utilizaron microscopía electrónica de barrido acoplada a una energía de espectrómetro de rayos X dispersivo (EDS), o con uso de la espectroscopia infrarroja sistemática para caracterizar la naturaleza química y depósitos de cristales (Moje y Baran, 2003), o caracterización de drusas de oxalato de calcio en tejido vegetal (Monje y Baran, 2009) o caracterización de células de inclusión de minerales incluyendo la composición química y su morfología mediante la identificación por difracción de rayos X (XRD) y microscopio petrográfico (Bárcenas *et al.*, 2015).

Sin embargo, estas metodologías de caracterización de oxalatos y carbonatos de calcio requieren instrumentos muy específicos, de manera que se propone implementar procedimientos para el análisis de minerales dentro de las estructuras vegetales y su cuantificación a escala microscópica con micro fotomosaicos en Giga imágenes de secciones delgadas, como alternativa viable de análisis utilizando la microscopia de trasmisión. Esta propuesta metodológica fue empleada para cuantificar e identificar la distribución geoespacial en bacterias y microorganismos dentro de los componentes del suelo (Tarquini y Favalli, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2016).

A pesar de esto, la técnica no se ha aplicado en la caracterización de oxalatos y carbonatos de calcio por lo que se puede adaptar a tejidos vegetales, permitiendo que las fotografías secuenciales de los campos continuos puedan ser empleadas para formar imágenes compuestas o micro-fotomosaicos. La captura de imágenes secuenciales es muy precisa, y permite la generación de micromosaicos con alta resolución espectral y espacial (Gutiérrez *et al.*, 2016), de alta precisión (Li *et al.*, 2008).

No obstante, sigue siendo una limitante la cuantificación y distribución espacial de los oxalatos y carbonatos de calcio dentro de las estructuras vegetales, así como la localización de estos, al ser escasa la información de cómo cuantificar y caracterizar estos minerales en nopal verdura. El objetivo del presente trabajo fue describir un procedimiento de análisis de imágenes que se pueda utilizar para caracterizar carbonatos y oxalatos de calcio presentes en el nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L. Miller.) en imágenes compuestas derivadas de secciones delgadas de tejido vegetal; por lo anterior el supuesto, sugiere que el tamaño, cantidad y forma en los carbonatos de calcio, está relacionado con estrés hídrico, donde los diferentes niveles de deshidratación de cladodios influirán en su presencia o ausencia.

## Procedimientos

La presente investigación se realizó en el Campo Experimental Marín en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante los años 2015-2017. Las unidades experimentales se establecieron en contenedores de 36 cm de alto, 28.5 cm de diámetro, bajo condiciones controladas.

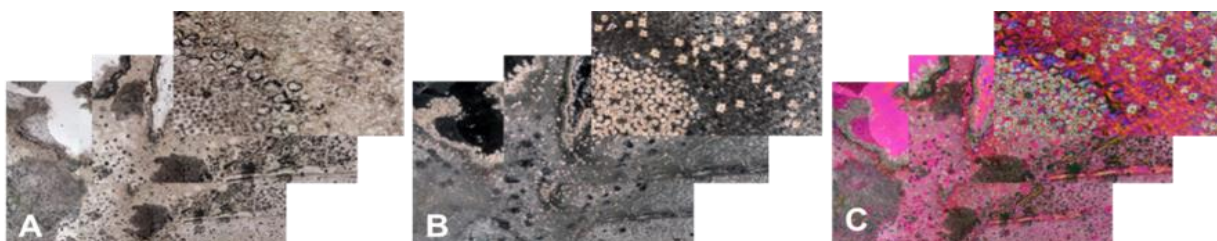
El sustrato utilizado reportó constantes diferenciales al estrés hídrico durante el desarrollo de los cladodios. El estrés consistió en disminuir la cantidad de agua disponible a 10% y 30% base al volumen, tomando como referencia la capacidad de campo (CC) y punto de marchitez permanente (PMP) del sustrato. Los momentos de riego se determinaron con base al peso periódico de las macetas hasta alcanzar los niveles de humedad referidos.

Las muestras de tejido vegetal fueron obtenidas de cladodios de 60 días, mediante cortes transversales de 4 cm<sup>2</sup> y sometidas a un estado de deshidratación con acetona (CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>) al 100% durante 6 días e impregnadas con resina al 90% y un monómero de estireno (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>) al 10%. La impregnación se llevó a cabo en una cámara de vacío durante 45 min a 15 lb de tensión, secado durante 15 días posteriores, una vez seca fueron cortadas colocándose en cubreobjetos fijados con resina apoxica y pulidas hasta 30 μm de espesor.

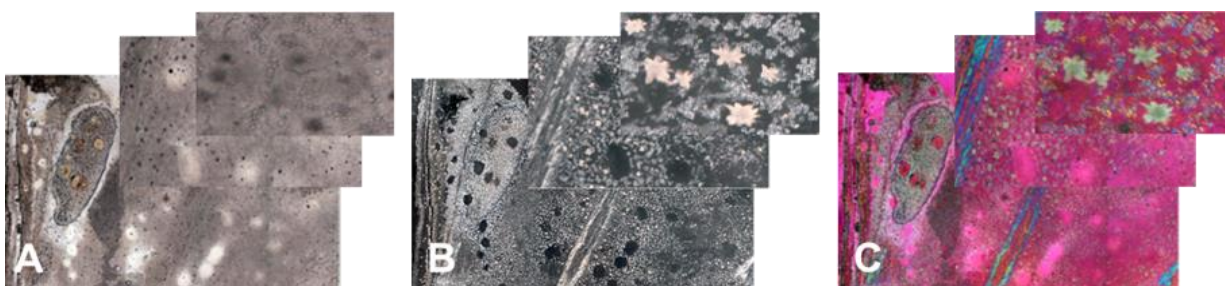
El análisis micromorfológico inició en capturar microimágenes secuenciales con diferentes fuentes de luz a un objetivo 10x utilizando una cámara digital montada en un microscopio petrográfico (Olimpus BX51), posteriormente fueron creados micro-fotomosaicos de alta resolución espacial. El análisis de imágenes fue empleando ERDAS Imagine 2014v<sup>®</sup>. La medición de los oxalatos y carbonatos de calcio se logró mediante la conversión de información raster en formato vectorial mediante ArcGIS v.10.1. Los procesos se basaron en la metodología reportada por Gutiérrez *et al.* (2016).

## Discusiones

La captura de fotografías secuenciales con diferentes fases de luz: plana (Figura 1A), polarizada o cruzada (Figura 1B) y compensada (Figura 1C) formaron micro-mosaicos de alta calidad en resolución espacial en el tratamiento 10% y 30% de AD (Figura 2 A, B, C).



**Figura 1. Tratamiento de 10% AD. Construcción de mosaicos de alta resolución espacial en diferentes fuentes de luz y con diferentes objetivos. A) luz plana; B) luz polarizada o cruzada; y C) luz compensada.**

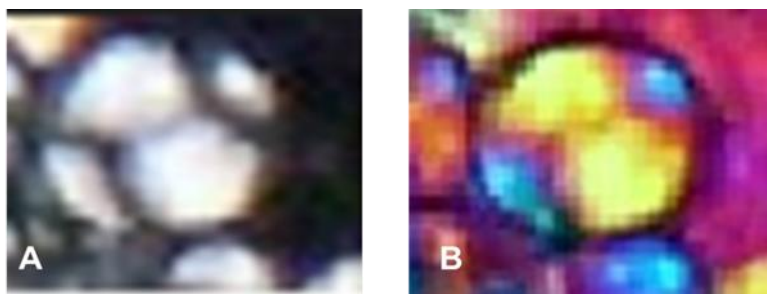


**Figura 2. Tratamiento de 30% AD. Construcción de mosaicos de alta resolución espacial en diferentes fuentes de luz y con diferentes objetivos. A) luz plana; B) luz polarizada o cruzada; y C) luz compensada.**

La construcción de micro-mosaicos con técnica de giga imágenes permitió observar los cristales de oxalato de calcio (drusas) (Figura 3) y carbonatos (calcitas) con luz polarizada y compensada (Figura 4).

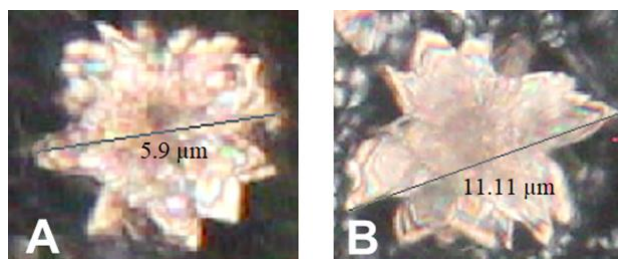


**Figura 3. Visualización de cristales de oxalato de calcio con tres fuentes de luz. A) luz plana; B) Luz polarizada o cruzada; y C) luz compensada.**

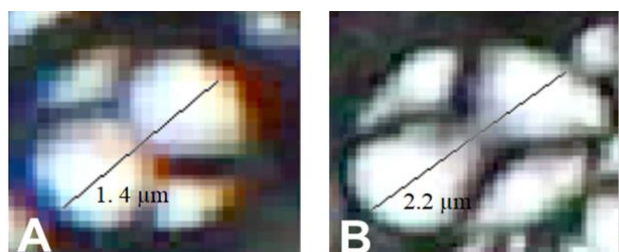


**Figura 4. Carbonatos de calcio (calcita) con dos fuentes de luz.** A) luz polarizada o cruzada; y B) luz compensada.

Otras ventajas del empleo de esta metodología fue la medición de los minerales, que arrojó como resultado una diferencia significativa entre los oxalatos de calcio de los tratamientos de 10 y 30% de AD (Figura 5) con diámetros de 5.9 y 11.11  $\mu\text{m}$  respectivamente, logrando además la medición de los carbonatos de calcio (Figura 6).

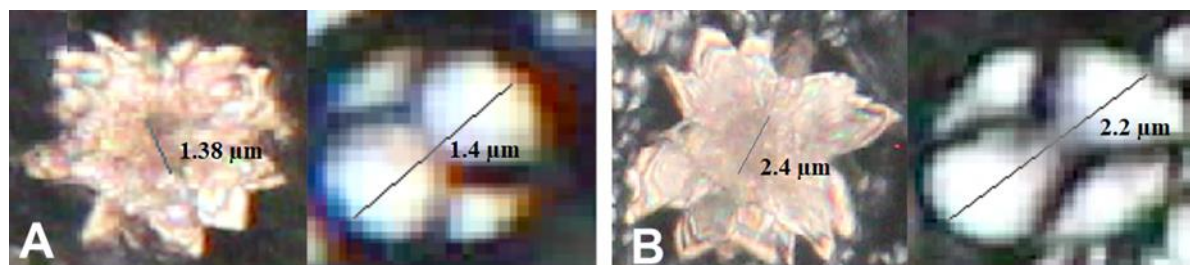


**Figura 5. Medición de oxalatos de calcio con un estrés hídrico del 10 y 30% de AD.** A) oxalato de calcio del tratamiento de 10% de AD con un diámetro de 5.9  $\mu\text{m}$ ; y B) oxalato de calcio del tratamiento 30% de agua disponible con un diámetro de 11.11  $\mu\text{m}$ .

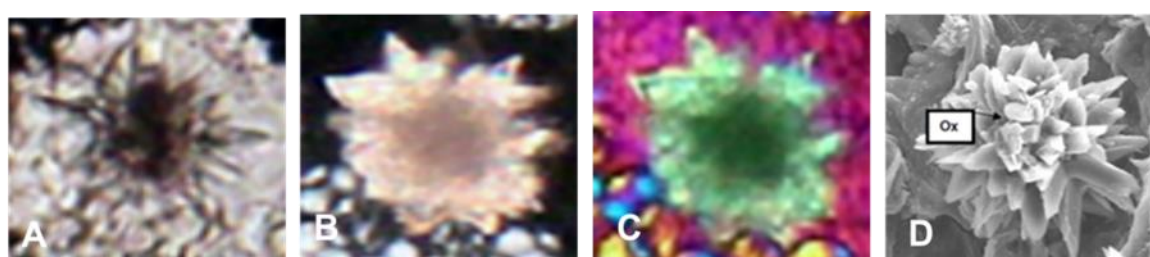


**Figura 6. Medición de carbonatos de calcio con estrés hídrico de 10 y 30% de AD.** A) carbonato de calcio del tratamiento 10% de AD con una medida de 1.4  $\mu\text{m}$ ; B) carbonato de calcio del tratamiento 30% de AD con una medida de 2.2  $\mu\text{m}$ .

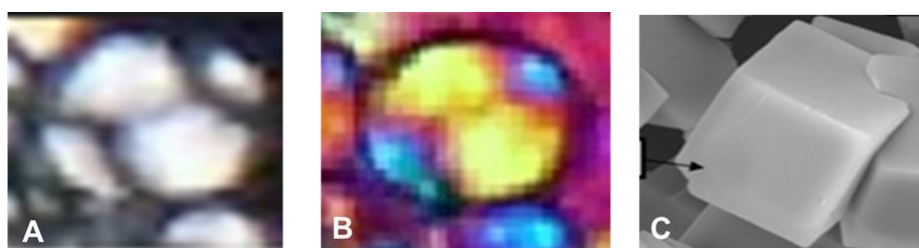
Además, fue posible realizar una comparación de tamaños entre los núcleos de oxalato y los carbonatos de calcio de algunas muestras de los tratamientos de 10 y 30% de AD, demostrando así que por cada oxalato se encuentra un carbonato de calcio secuestrado (Figura 7) al comparar las imágenes del oxalato de calcio y carbonatos de calcio en diferentes fuentes de luz con microscopio petrográfico y barrido electrónico (Figura 8 y 9).



**Figura 7. Comparación de medidas del núcleo de oxalatos de calcio y carbonatos de calcio.** A) tratamiento de 10% de agua disponible, muestra la similitud en tamaño del núcleo del oxalato 1.38  $\mu\text{m}$  y el carbonato 1.4  $\mu\text{m}$ ; y B) tratamiento de 30% de agua disponible, muestra la similitud en tamaño del núcleo del oxalato 2.4  $\mu\text{m}$  y el carbonato 2.2  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8. Comparación de fotografías del oxalato de calcio en diferentes fuentes de luz con microscopio petrográfico y electrónico.** A) luz plana; B) luz polarizada o cruzada; C) luz compensada; y D) microscopio de barrido electrónico por McCoonn y Nakata (2004).



**Figura 9. Comparación de fotografías del carbonato de calcio en diferentes fuentes de luz con microscopio petrográfico y electrónico.** A) luz polarizada o cruzada; B) luz compensada; y C) microscopio de barrido electrónico por McCoonn y Nakata (2004).

También se practicó una comparación de medias de muestras representativas de los tratamientos de 10 y 30% de AD (Cuadro 1) donde el diámetro de los oxalatos fue significativamente mayor que los carbonatos de calcio con un diámetro de 71.39  $\mu\text{m}$ .

**Cuadro 1. Comparación de medias entre diferentes tipos de minerales de los tratamientos de 10 y 30% de agua disponible.**

Tratamiento AD	Diámetro de oxalatos de calcio ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro de carbonato de calcio ( $\mu\text{m}$ )	Diámetro del núcleo del oxalato de calcio ( $\mu\text{m}$ )
10%	37.63	19.15	20.04
30%	71.39	20.86	24.05

## Conclusiones

Se determina que el estrés hídrico inhibe y promueve el tamaño, cantidad y forma de los oxalatos y carbonatos de calcio dentro de las estructuras vegetales de nopal verdura. Mientras que la identificación y caracterización en muestras inalteradas en cladodio con diferente estrés fue posible usando técnicas de análisis multiespectral en giga imágenes de micro-fotomosaicos determinando la correlación existente entre los núcleos que por cada oxalato existe un carbonato de calcio indisponible.

## Agradecimientos

Se agradece al CONACYT por la beca otorgada al primer autor para la realización de sus estudios de Doctorado en Ciencias Agrícolas. Al laboratorio de Micromorfología de Suelos, Colegio de Postgraduados, Montecillos. A la Facultad de Agronomía y al PAICYT de la UANL.

## Literatura citada

- Bárcenas-Argüello, M. L.; Gutiérrez Castorena, M. C. and Terrazas, T. 2015. The polymorphic weddellita crystals in three species of *Cephalocereus* (Cactacea). *J. Micron.* 77:1-8
- Charoenkiatkul, S.; Kriengsinyos, W.; Tuntipopipat, S.; Suthutvoravut, U. and Weaver, C. M. 2008. Calcium absorption from commonly consumed vegetables in healthy Thai women. *J. Food Sci.* 73: H218-H221.
- Fairweathert- Tait, S. M. 2007. Calcium bioavailability in relation to bone health. *International J. Vitamin Nutr. Res.* 72:13-18.
- Franceschi, V. R. and Horner, H. T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *The Bot. Rev.* 46:361-427.
- Gallaher, R. N. 1975. The occurrence of calcium in plant tissue as crystals of calcium oxalate. *Coom Soil Sci. Plant Anal.* 6:315-321.
- Gutiérrez, C. E. V.; Gutiérrez, C.; Ma. del C.; González- V.; T.; Cajuste, B. L.; Delgadillo, M. J.; Suástegui Méndez, E. y Ortiz- Solorio, C. A. 2016. Micromapping of microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections. *Geoderma.* 279:11-21.
- Heaney, R. P. 2001. Meta-analysis of calcium bioavailability. *Am. J. Therapeutics.* 8:73-78.
- Jáuregui-Zúñiga, D. J. P.; Reyes-Grajeda, J. D.; Sepúlveda-Sánchez, J.; Whitaker, R. and Moreno, A. 2003. Crystallochemical characterization of calcium oxalate crystals isolated from seed coats of *Phaseolus vulgaris* and leaves of *Vitis vinifer*. *J. Plant Physiol.* 160:239-245.
- Kennefick, S. and Cashman, K. D. 2000. Inhibitory effect of wheat fibre extract on calcium absorption in Caco-2 cells: evidence for a role associated phytate rather than fibre per se. *Eur. J. Nutr.* 39:12-17.
- Li, Y.; Onasch, C. M. and Guo, Y. 2008. GIS-based detection of grain boundaries. *J. Struct. Geol.* 30:431-443.
- McCoonn, M. M. and Nakata, P. A. 2004. Oxalate reduces calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. *J. Agric. Food Chem.* 52:1371-1374.
- Monje, P. V. and Baran, E. J. 2002a. Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in cacti. *Plant Physiol.* 128:707-713.

- Monje, P. V. and Baran, E. J. 2009b. Characterization of calcium oxalate biominerals in *Pereskia* species (Cactaceae). *Z. Naturforsch.* 64:763-766.
- Payne, S. R.; Heppenstall-Butler, M. and Butler, M. F. 2007. Formation of thin calcium carbonate films on chitosan biopolymer substrates. *Cryst Growth Design.* 7:1262-1276.
- Piochi, M.; Polacci, M.; De Astis, G.; Zanetti, A.; Mangiacapra, A.; Vannucci, R. and Giordano, D. 2008. Texture and composition of pumices and scoriae from the Campi Flegrei caldera (Italy): implications on the dynamic of explosive eruptions. *Geochem. Geophys. Geosyst.* doi:10.1029/2007GC001746 Q.
- Rodríguez-García, M E.; de Lira, C.; Hernández Becerra, E.; Cornejo-Villegas, M. A.; Palacios-Fonseca, A. J.; Rojas-Molina, I. R.; Reynosa, L. C.; Quintero, A.; del Real, T.; Zepeda, A. and Muñoz-Torres, C. 2007. Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus-indica*) and dry *Vacuum* nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods Human Nutr.* 62:107-112.
- Shu-Chen, H.; Kensuke, N. and Yoshiki, C. 2007. A carbonate controlled-addition method for amorphous calcium carbonate spheres satabilized by poly (acrylic acids). *Langmuir.* 23:12086-12095.
- Tarquini, S. and Favalli, M. 2010. A microscopic information system (MIS) for petrographic analysis. *Computers Geosc.* 36:665-674.
- Young, J.; Geisen, M.; Cros, L.; Kleijne, A.; Sprengel, C.; Probert, I. and Ostergaard, J. 2003. A guide to extant coccolithophores taxonomy. *J. Nanoplankton Res.* 1:125.