

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EVALUACIÓN DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA FORMACIÓN DE OXALATOS Y
CARBONATOS DE CALCIO CON ANÁLISIS MICROFOTOGRAFICO EN NOPAL
VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) MILLER)**

P R E S E N T A

RAFAEL ZUÑIGA VALENZUELA

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

ENERO, 2020

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EVALUACIÓN DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA FORMACIÓN DE OXALATOS Y
CARBONATOS DE CALCIO CON ANÁLISIS MICROFOTOGRAFÍCO EN NOPAL
VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) MILLER)**

P R E S E N T A

RAFAEL ZUÑIGA VALENZUELA

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

ESCOBEDO NUEVO LEÓN, MÉXICO

ENERO 2020

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EVALUACIÓN DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA FORMACIÓN DE OXALATOS Y
CARBONATOS DE CALCIO CON ANÁLISIS MICROFOTOGRAFÍCO EN NOPAL
VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) MILLER)**

P R E S E N T A

RAFAEL ZUÑIGA VALENZUELA

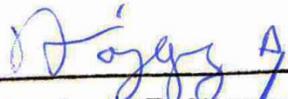
**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

ESCOBEDO NUEVO LEÓN, MÉXICO

ENERO 2020

**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

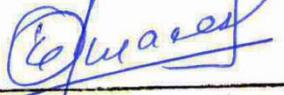
COMITÉ PARTICULAR



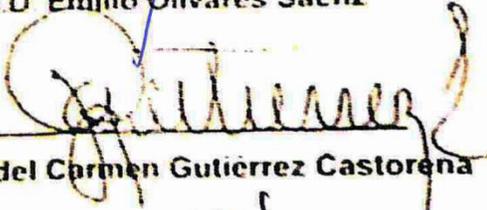
Ph.D. Rigoberto E. Vazquez Alvarado
Director de Tesis



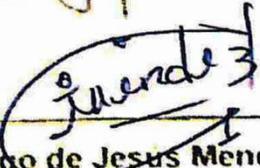
Dr. Edgar V. Gutierrez Castorena
Co-Director



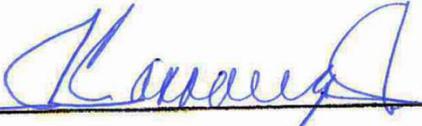
Ph.D. Emilio Olivares Saenz



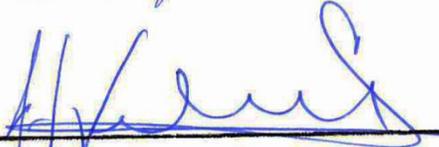
Dra. Ma. del Carmen Gutierrez Castorena



Dr. Santiago de Jesus Mendez Gallegos



Dr. Roberto Carranza de la Rosa



Ph.D. Juan Antonio Vidales Contreras
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

Quiero comenzar por agradecerle a dios por permitirme dedicar este trabajo a la persona que siempre me impulso a seguir adelante no importando lo difícil de las situaciones, llenándome de valores como la humildad, perseverancia, paciencia y respeto, así como también apoyar mi sueño con amor pero sobre todo siempre teniendo credibilidad de su parte. Esperando que este humilde regalo cree un sentimiento de satisfacción hacia mi madre

MARIA DOLORES VALENZUELA GALLEGOS

AGRADECIMEINTOS

A toda la sociedad mexicana que por medio del CONACYT me otorgaron el apoyo para realizar mis estudios de doctorado.

A la Facultad de Agronomía de la UANL. Por darme la oportunidad de realizar el doctorado en ciencias agrícolas.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Por compartir sus conocimientos y técnicas para la realización de mi investigación.

A mis profesores los doctores Rigoberto Vázquez, Edgar V. Gutiérrez Castorena, Emilio Olivares que con su apoyo y sus conocimientos contribuyeron a mi formación.

A la familia Pichardo Zuñiga por acogerme durante mi estancia gracias por dejarme formar parte de su familia.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMEINTOS	VII
RESUMEN	XV
SUMMARY	XVII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 HIPÓTESIS	3
1.2 OBJETIVOS	4
2. REVISION DE LITERATURA	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Taxonomía y Características Morfológicas del Nopal	6
2.3 Producción y usos del nopal	10
2.4 Composición Química de la Planta	12
2.5 Requerimientos de Agua en el Nopal Verdura	14
2.6 Calcio en Nopal.....	16
2.7 Oxalatos de Calcio en Nopal.....	18
2.8 Generalidades de los Oxalatos de Calcio	20
2.9 Biomineralización de Oxalato de Calcio	22
2.10 Formación de Oxalatos de Calcio	24
2.11 Función de los Oxalatos de Calcio.....	25

2.12 Técnicas para la Observación de los Oxalatos de Calcio	28
2.13 Estudios Micromorfológicos en Secciones Delgadas	29
2.14 Microscopio Petrográfico.....	30
2.15 Polarización lineal, Circular y Elíptica	34
3. MATERIALES Y METODOS	38
3.1 Primera Etapa	38
3.1.1 Construcción del mosaico de alta resolución	40
3.2 Segunda Etapa	41
3.1.1 Construcción del mosaico de alta resolución	43
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1 Primera Etapa	45
4.2 Segunda Etapa	49
5 CONCLUSIONES.....	63
6 LITERATURA CITADA.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica	8
Cuadro 2. Producción nacional de nopal forraje, verdura y tuna en 2013.	12
Cuadro 3. Composición fisicoquímica de cladodios en base seca y húmeda.	13
Cuadro 4. Contenido de minerales en cladodios de <i>Opuntia ficus indica</i>	13
Cuadro 5. Comparación de medias entre diferentes tipos de minerales de los tratamientos de 10 y 30% de agua disponible.....	49
Cuadro 6. Prueba de los efectos entre los diferentes tratamientos de A.D para la presencia de Oxalatos de Calcio.....	56
Cuadro 7. Prueba de los efectos entre los diferentes tratamientos de A.D para la concentración de Carbonatos de Calcio.....	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de oxalato de calcio en las células mucilaginosas del nopal y su forma de weddellita tetragonales con forma de estrella (Rodríguez et al., 2007).....	18
Figura 2. Número de cristales de oxalato de calcio mm ² por cultivar de nopal (Tovar et al., 2007).	19
Figura 3. Representación esquemática de las estructuras del ácido oxálico y oxalato de calcio (Pérez, 2015).	21
Figura 4. Diferentes morfologías de cristales de oxalato de calcio. a) Prisma formado en la testa del frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>), b) Drusa formada en la semilla del fruto de la uva, c) Cristal de oxalato de calcio monohidratado sintético, d) cristal triclinico de calcio dihidratado sintético.	23
Figura 5. Principales componentes del microscopio petrográfico.....	32
Figura 6. Dirección de oscilación de los campos eléctricos ϵ y magnético (B) comparados con una dirección de propagación de la luz.....	34
Figura 7. Indicatriz óptica.	36
Figura 8. Luz compensada	37
Figura 9. Establecimiento del sitio experimental.....	38
Figura 10. Estado vegetal de cladodios según el tratamiento. A) 10% de agua aprovechable. B) 30% de agua aprovechable.....	39
Figura 11. Representación del método de muestra y deshidratación del nopal con acetona (CH ₃ CH ₃) al 100%.	40
Figura 12. Impregnación con resina de muestras de nopal y la cámara de vacío....	40

Figura 13. Fijación de las muestras hasta obtención de la sección delgada hasta obtener las 30 μm de aspersion.....	41
Figura 14. Estado vegetal de los cladodios según el tratamiento correspondiente. A) 10% de agua aprovechable, B) 30% de agua aprovechable, C) 60% de agua aprovechable.....	42
Figura 15. Zona de muestreo en el cladodio.	43
Figura 16. Tratamientos a 10% de agua disponible; mosaicos de 169 mm^2 con altura focal de 3.08 mm^2 . A) Luz plana; B) Luz polarizada o cruzada; y C) Luz compensada.	45
Figura 17. Tratamiento a 30% de agua disponible. Mosaicos de 169 mm^2 ; acercamiento de 3.08 mm^2 . A) Luz plana; B) Luz polarizada cruzada; y C) Luz polarizada cruzada con compensador.....	45
Figura 18. Cristales de oxalato de calcio (Drusas) con tres fuentes de luz. A) Luz plana; B) Luz polarizada o cruzada; y C) Luz polarizada cruzada con compensador.	46
Figura 19. Carbonatos de calcio (Calcita) con dos fuentes de luz. A) Luz polarizada o cruzada; y B) Luz polarizada cruzada con compensador.....	47
Figura 20. Diámetros de Oxalatos de calcio a 10 y 30% de agua disponible.	47
Figura 21. Diámetros de Carbonatos de calcio a 10 y 30% de agua disponible.....	47
Figura 22. Comparación de tamaños entre los núcleos de oxalatos de calcio y carbonatos de calcio a 10 y 30% de agua disponible (A y B) respectivamente. A) Núcleo del oxalato de 1.38 μm y carbonato 1.4 μm ; y B) Núcleo del oxalato de 2.4 μm y carbonato 2.2 μm	48

Figura 23. Comparación entre imagen del oxalato de calcio en microscopio petrográfico y barrido electrónico. A) luz plana; B) luz polarizada o cruzada; C) luz compensada; y D) barrido electrónico por McCoonn y Nakata (2004).	48
Figura 24. Comparación entre imágenes de carbonato de calcio y de barrido electrónico. A) Luz polarizada; B) luz compensada; y C) barrido electrónico por McCoonn y Nakata (2004) sistema triclinico de los carbonatos de calcio.....	48
Figura 25. Mosaicos entre componentes del tejido vegeta en una superficie de un centímetro cuadrado. A) luz plana, B) luz plana, C) luz cruzada, y D) luz polarizada.	50
Figura 26. Mapas temáticos de componentes en tejido vegetal a campo visible real de 1 cm ² . A) luz plana, B) luz cruzada y C) mapa temático de minerales. Ampliación del mosaico representando a una superficie de 2.4 mm ² en figuras D, E, F.....	51
Figura 27. Mapas temáticos de oxalatos de calcio en tejido vegetal a 10% de agua disponible en luz plana y luz cruzada.....	51
Figura 28. Mapas temáticos oxalatos de calcio en tejido vegetal a 30% de agua disponible con la luz plana y luz cruzada.	52
Figura 29. Mapas temáticos de oxalatos de calcio en tejido vegetal a 60% de agua disponible sobre luz plana y luz cruzada.....	53
Figura 30. Mapas temáticos de Oxalatos de calcio y Carbonato de Calcio en tejido vegetal a 10% de agua disponible en luz cruzada y extracción vectorial de polígonos.	54
Figura 31. Mapas temáticos de Oxalatos de Calcio y Carbonato de Calcio en tejido vegetal a 30% de agua disponible.....	54

Figura 32. Mapas temáticos Oxalatos de Calcio y de Carbonatos de Calcio en tejido vegetal a 60% de agua disponible en luz cruzada con extracción de polígonos.	55
Figura 33. Frecuencia de Oxalatos de calcio a diferente estrés hídrico del cladodio.	56
Figura 34. La gráfica muestra el tratamiento 10% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando.	57
Figura 35. La grafica muestran el tratamiento 30% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando el área ocupada por los minerales descritos.	58
Figura 36. La grafica muestran el tratamiento 60% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando el área ocupada por los minerales descritos.	58
Figura 37. Concentración en mg/cm ² de Carbonatos de Calcio y carbonatos de calcio a diferente estrés hídrico del cladodio.	59
Figura 38. La gráfica muestra el tratamiento 10% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando.	60
Figura 39. La gráfica muestra el tratamiento 30% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando.	61
Figura 40. La gráfica muestra el tratamiento 60% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando.	62

RESUMEN

El nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* (L). Miller.) Es importante en la dieta humana por ser una fuente de calcio (Ca^{++}); sin embargo, su biodisponibilidad y viabilidad a veces puede ser limitada sobre todo cuando la planta sufre estrés hídrico y el Ca^{++} se precipita en forma de oxalato de calcio (CaC_2O_4). La mayoría de los estudios que tratan de cuantificar e identificar estos minerales de origen biológico se llevan a cabo de forma alterada por lo que se desconoce su comportamiento bajo diferentes condiciones de estrés y directamente en el cladodio. El objetivo de la presente investigación fue cuantificar a través de un análisis micro fotográfico los oxalatos y carbonatos de calcio en cladodios de plantas de nopal de 60 días de crecimiento. Los cladodios fueron sometidas a diferenciales hídricas de 10, 30 y 60% de agua disponible (AD), luego fueron fijados en resina poliéster y se elaboraron secciones delgadas (en 1 cm^2 a $30\ \mu\text{m}$ de espesor).

Imágenes secuenciales (40 fotografías) con objetivo a $10\times$ fueron capturadas utilizando un microscopio petrográfico con diferentes fuentes de luz: polarizada plana (LPP), polariza cruzada (LPC) y compensador ($\text{LPC}\lambda$). Mosaicos de alta resolución espacial se elaboraron utilizando operadores geoespaciales. Los CaC_2O_4 y el CaCO_3 se identificaron por su firma espectral o grados de brillantez en imágenes en formato RGB y se cuantificó el tamaño de los cristales y núcleo, así como su textura (sistema cristalino) y la superficie que ocupan en el cladodio. Los resultados indican que el tamaño de los cristales de CaC_2O_4 de 10 y 30% AD fueron: de $37.63\ \mu\text{m}$ y $71.39\ \mu\text{m}$ y

sus núcleos de 20.4 μm y 24.04 μm ; con desarrollo de formas prismáticas (**drusas**); mientras que los CaCO_3 fueron de 19.15 μm y 20.86 μm con una textura **triclínica** preponderante. También se observó que hay una correlación entre el tamaño del núcleo de CaC_2O_4 y el CaCO_3 , donde para cada CaC_2O_4 se fija un CaCO_3 , que no está disponible.

Además, con el método propuesto se puede utilizar para cuantificar *in situ* minerales en tejidos vegetales donde se utilizaron muestras inalteradas de nopal, con superposición entre imágenes. Para la cuantificación de los minerales fue posible encontrar diferencias estadísticas $p < 0.05\%$ en el área que ocupan los oxalatos en el tratamiento de 10% y carbonatos de calcio en el de 60% dentro de las estructuras vegetales de nopal verdura, concluyendo que el tamaño, la forma y concentración de CaC_2O_4 y CaCO_3 están directamente relacionado con el estado de deshidratación de las plantas y que el uso de mosaicos de alta resolución y operadores espaciales permiten la rápida identificación y cuantificación de los bio minerales en tejidos vegetales de manera *in situ*.

Palabras clave: secciones delgadas, densitométricamente, mosaicos digitales, fases de luz.

SUMMARY

The nopal vegetable (*Opuntia ficus-indica* (L). Miller.) is important in the human diet as a source of calcium (Ca^{++}); However, its bioavailability and viability can sometimes be limited especially when the plant suffers water stress and Ca^{++} is precipitated in the form of calcium oxalate (CaC_2O_4). Most of the studies that try to quantify and identify these minerals of biological origin are carried out unchanged so that their behavior under different stress conditions and directly in the cladiol is unknown. The objective of this research was to quantify calcium oxalates and carbonates in nopal plants with 60 days of growth, were subjected to water differentials of 10, 30 and 60% of available water (AD). Subsequently, the cladioli were fixed in polyester resin and were made of thin sections (1 cm^2 and $30 \mu\text{m}$).

Sequential images (40 photographs) with the 10X objective, were captured using a petrographic microscope with different light sources: flat polarized, cross polarized and compensating. High spatial resolution mosaics were made using space operators. The CaC_2O_4 and CaCO_3 were identified by their spectral signature on images in RGB format and the size of the crystals and nucleus was quantified, as well as their texture (crystalline system) and the surface they occupy in the cladiol. The results indicate that the size of the CaC_2O_4 crystals of 10 and 30% AD were: $37.63\mu\text{m}$ and $71.39\mu\text{m}$ and their nuclei $20.4\mu\text{m}$ and $24.04\mu\text{m}$; developing prismatic forms (drusen); while the CaCO_3 were $19.15\mu\text{m}$ and $20.86\mu\text{m}$ with a preponderant triclinic texture. It was also observed that there is a correlation between the core size of

CaC_2O_4 and CaCO_3 , where for each CaC_2O_4 a CaCO_3 is set, which is not available. No statistical differences were found in the area occupied by calcium oxalates and carbonates within the vegetable nopal vegetable structures.

The conclusions were that the size and shape of CaC_2O_4 and CaCO_3 are directly related to the state of dehydration of plants. The use of high resolution mosaics and space operators allow the rapid identification and quantification of bio minerals in plant tissues in situ.

Key words: thin sections, densitometrically, digital mosaics, light phases.

1. INTRODUCCIÓN

México es el principal productor de nopal (90%) a nivel mundial. La producción está constituida por el tipo de aprovechamiento (tuna, forrajero y verdura) donde el nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller), al ser el de mayor consumo humano, es el que más se produce con 676,180 toneladas por año (SAGARPA 2015).

El nopal es una fuente importante de Ca^{++} ; sin embargo, la disponibilidad del elemento presenta algunas limitaciones, las cuales generan una problemática que se debe superar. La presencia de ácido oxálico en el nopal ocasiona el secuestro de muchos cationes, principalmente Ca^{++} y Mg, el cual los precipita formando cristales de oxalato de calcio no son disponible para el ser humano. Además, se ha reportado que el Ca^{++} secuestrado en forma de cristales de oxalato (McConn y Nakata, 2004) representan un alto porcentaje del peso seco (entre 8 y 50 %) en las cactáceas (Gallaher, 1975).

En plantas superiores, la cantidad, distribución de cristales de oxalato y morfología siguen patrones específicos en diferentes especies, así como la regulación que indica los sitios de formación y sus modos de acumulación. El contenido de oxalato de calcio y de calcio libre en *Opuntia ficus-indica* ha sido investigado por diferentes autores (McConn y Nakata, 2004; Monje y Baran, 2002) y han encontrado que el Ca^{++} no siempre está completamente biodisponible. Una explicación a este fenómeno es la absorción de Ca^{++} por la planta y puede estar afectada por la

ausencia de otros iones vinculados directa o indirectamente al metabolismo de absorción de este elemento. De la misma manera se plantea que la absorción de C^{++} y la presencia de oxalatos de Ca^{++} en nopal provocan que el C^{++} no se presente en forma adecuada para ser absorbido donde está secuestrado en forma de cristales de oxalato (McConn y Nakata, 2004).

El cultivo de nopal verdura ofrece una alternativa viable como fuente de calcio en forma natural para el ser humano (Fairweather, 2007; Heaney, 2001), de ahí la necesidad de incrementar su consumo y disponibilidad del calcio para la nutrición; no obstante, esta puede estar limitada por los cristales de oxalato de calcio que impide su utilización en el metabolismo humano. Debido a lo anterior es importante generar un manejo agronómico que evite la transformación del calcio a oxalatos de calcio evitando que la planta entre en estrés hídrico y nutrimental.

Además de desarrollar nuevas metodologías que permitan llevar a cabo una cuantificación *in situ* con muestras inalteradas ya que las formas de medir la cantidad de calcio actualmente nos arrojan resultados de presencia de calcio total, desconociendo la cantidad del mineral que se encuentre de forma disponible para el organismo humano.

1.1 HIPÓTESIS

1. El estrés hídrico promueve la formación de oxalatos de calcio en el nopal, por lo tanto la evaluación de niveles de agua aprovechable permitirá determinar su sistema cristalino tanto del carbonato de calcio (calcita) como del oxalato de calcio.
2. El análisis de mosaicos digitales de alta resolución espacial y espectral, con parámetros dicromofométricos y densitométricos, permiten identificar minerales dentro de estructuras vegetales.

1.2 OBJETIVOS

- 1) Determinar la formación de cristales de oxalato de calcio y carbonato de calcio in situ en plantas de nopal sometidas a diferentes niveles de humedad.
- 2) Cuantificar los biominerales presentes en la estructura del cladodio de nopal a través de mosaicos de alta resolución y sistemas operativos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

El nopal (*Opuntia ficus indica*) es conocido como “planta de tuna” y ha tenido gran interés desde tiempos prehispánicos (Velásquez, 1998) al ser empleado como alimento, bebida y pigmentos; además se han encontrado una amplia variedad de propiedades medicinales y utilizado como objeto de prácticas mágico-religiosas. De acuerdo con Quiguango (2011) a nivel internacional nuestro país es el que más consume nopal como alimento, principalmente como fuente de energía; asimismo, se utiliza en reparaciones tradicionales y artesanales que pueden variar desde sencillas producciones hasta productos que requieren un proceso técnico que exigen un mayor control de calidad, como licores, suplementos dietéticos y otros productos que han alcanzado relieve en mercado internacional (Corrales, 2000) su alta demanda generó la sobre explotación y degradación de las tierras. Bajo ese esquema, en la segunda mitad del siglo XX el gobierno de México empezó a crear programas de reforestación y recuperación de áreas degradadas para controlar la desertificación (Pérez, 2013).

En diferentes países, el nopal (*Opuntia ficus indica*) es tema de investigación para elaborar productos comestibles; por ejemplo, la penca de nopal se usa para formular y elaborar mermelada dietética con niveles ajustados de edulcorantes con bajo aporte calórico por lo que son útiles para las personas diabéticas (Anrrango, 2012). También se elaboran productos artesanales donde se reconoce su alto valor nutritivo

en productos con buen sabor a los consumidores (Parraga, 2015). Esta planta es considerada útil en investigaciones que señalan su uso para la creación de fuentes de energías alternativas como biocombustibles, haciéndolo una opción de energía muy sustentable (Méndez-Gallegos, 2010).

En medicina, desde épocas prehispánicas, se conoce la importancia terapéutica por la presencia de hipoglucemiantes cuya ocurrencia se demostró en estudios in vitro. (Háuad Marroquín, 2010). Hoy en día se estudia al nopal para encontrar soluciones que minoricen o controlen enfermedades crónicas como la diabetes por su efecto antihiper glucémico o reducir el colesterol y prevenir problemas cardiacos (Basurto-Santos, 2006), lo cual le da una gran importancia farmacológica (Rodríguez-Fragoso., 2014).

Como fitofármacos, el nopal ayuda a corregir problemas de diarrea, reumas, además puede ser útil como analgésico y antiinflamatorio (Háuad-Marroquín, 2010). Los cladodios y sus frutos pueden ser útiles en el tratamiento de la arteriosclerosis y en osteoporosis sobre todo en mujeres de edad avanzada(Celis, 2009) .

2.2 Taxonomía y Características Morfológicas del Nopal

El nopal es una cetácea originaria del continente americano; su distribución inicia desde Canadá, cubriendo la mayor parte de Norteamérica, el Caribe, Centroamérica y casi cubrir el extremo del sur de Suramérica. El nopal es ampliamente conocido

como un género de cactáceas con tallos segmentados y aplanados llamados cladodios (Anderson, 2001). Tiene gran eficiencia en la absorción de agua en el suelo para producir biomasa; por ejemplo, es en promedio tres veces más que en plantas C4 y cinco veces más que en plantas C3 (Novel, 1995). Los cladodios, también conocidos como pencas o palas, son hojas aplanadas gruesas con abundante tejido carnoso aunque su forma y color depende en gran medida de la edad de la planta (Guzmán-Loayza, 2007).

A nivel internacional se han reportado 1600 especies y géneros de cactáceas de las cuales tan solo en nuestro país se han registrado 1088 lo que significa una gran diversidad. Bravo (1978) menciona que se encuentran dos géneros importantes: *Opuntia* y el *Nopalea*. “El género *Opuntia* en México presenta 5 subgéneros, 17 series y 104 especies; mientras que el género *Nopalea* presenta 10 especies de las cuáles la “*Nopalea Cochenillifera*” se utiliza como Nopal Verdura.”

Familia *Cactaceae*: La familia se divide en 112 géneros, en tres tribus: *cereeae*, *opuntia* y *pereskiaee*. Además, comprende más de 100 géneros y poco más de 1000 especies, están distribuidas en toda América y es abundante en México y Centro América (Lozano, 1958). Subfamilia *opuntioideae*: son suculentas con tallos aplanados y articulados, hojas pequeñas y caducas, areolas gloquidias y flores rotiformes; los tubérculos prominentes, areolas circulares hasta elípticas, con fieltros, pelos, gloquidias y espinas; el tamaño de la espina varia dependido la especie que

sea, ya sean pequeñas o muy largas y delgadas, a veces con vaina papirácea, flores diurnas y vespertinas y sésiles una en cada areola (Bravo, 1978).

El nopal pertenece al género *Opuntia* y su ubicación taxonómica se presenta en el Cuadro 1 (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978). Son plantas que pueden tener hábito de crecimiento arbóreo, arbustivo o cespitoso. Los tallos están segmentados o articulados en cladodios, tienen hojas efímeras (pequeñas y cilíndricas), presenta gloquídeas y espinas variables. Las flores son generalmente laterales sésiles, solitarias y diurnas, y tienen pericarpio con hojas, areolas, gloquídeas y espinas. Los tubos florales son cortos o ausentes. Los frutos son indehiscentes (algunas veces secos en la maduración). La semilla es redondeada a oval, de 3 a 12 milímetros de diámetro.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica

Reino:	Vegetal
Subreino:	Embryopyta
División:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledoneae
Subclase:	Dialipétalas
Orden:	Opuntiales
Familia:	Cactaceae
Tribu:	Opuntiae
Subfamilia:	Opuntioideae
Genero:	Opuntia
Subgénero:	Platyopuntia
Especie:	Spp.

Fuente: Bravo-Hollis1978.

El nopal puede extenderse horizontalmente varios metros; cuentan con un sistema ramificado rico en raíces muy absorbentes y superficiales para crecer en zonas áridas donde la humedad es muy escasa; la longitud de las raíces tiene una relación muy directa con las condiciones hídricas y fértiles de la tierra (Sudzuki, 1999). También presentan numerosos tallos modificados que hacen el trabajo de hoja denominado “cladodios” conocidos también como pencas, de forma ovoide, elípticos u oblonga parecido a una raqueta pueden alcanzar una longitud de 33 - 60 cm y 18 - 25cm de ancho y alcanzar un grosor de 1.8 - 2.3 cm de color verde pálido a oscuro dependiendo la variedad de la cactácea (Sáenz, 2006).

Sobre ambas caras de los cladodios hay yemas llamadas areolas que tienen la capacidad de desarrollar nuevos cladodios, flores y raíces. Una vez que los cladodios están completamente desarrollados tienen 52 - 69 areolas por cada cara y a su vez cubierta por una gruesa cutícula que los protege de los insectos y patógenos. Esta cutícula tiene la peculiaridad de ser de color blanquecino lo que permite reflejar gran parte de la radiación solar permitiendo que la planta tolere hasta 60 °C propio de un ambiente desértico. Durante el día sus estomas, que están en las pencas, se mantienen cerrados para evitar la pérdida de agua, abriendo solo de noche; es decir, cumpliendo un patrón nocturno para que el paso de dióxido de carbono y la pérdida de vapor de agua ocurra en el momento más fresco del día. A este patrón se lo conoce como metabolismo del ácido crasuláceo (MAC). Generalmente, las plantas nativas de zonas áridas y semiáridas propensas a sequías poseen este metabolismo

(Nobel, 2003), donde los tallos con el tiempo pueden transformarse en tallos leñosos, de color ocre intenso a grisáceo (Álvarez, 2007).

El nopal también presenta unas pequeñas espinas llamadas gloquidios que se encuentran agrupadas entre si y recubiertas por una diminuta pelusa; éstos cumplen funciones específicas como proveer una defensa ante animales herbívoros y de proteger de la luz solar (Quiguango, 2011).

Sus flores son hermafroditas con dimensiones de 6 a 7cm de longitud, presentan colores muy brillantes como rojo, amarillo, blanco y lila (Quiguango, 2011). Puede haber hasta 25 flores por cladodio los cuales se abren a los 35 - 45 días de su brotación. En la mayor parte del mundo la tuna florece una sola vez al año pero se puede modificar bajo condiciones específicas como el suministro de agua en la estación seca lo que lo que provocara una segunda floración (Álvarez, 2007).

2.3 Producción y usos del nopal

Reynolds y Arias (2003) estimaron que hay 900,000 ha de cultivo de nopal forrajero. En Brasil se estimó la superficie cultivada en 600,000 ha (Torres-Sales, 2009); en el norte de África (Túnez, Algeria y Marruecos), hay una superficie de 700,000 a 1,000,000 de hectáreas para producción de forraje (Nefzaoui y Salem, 2003). En 2013 en México se cultivaron 84,924 hectáreas de nopal, de las cuales la mayor parte con 55,812 (65.7%) fueron destinadas a la producción de tuna, otras 13,124

has (15.5%) a la producción de verdura y 15,987 has (18.8%) a la producción de forraje. El valor económico total de la producción fue estimada en 3,573,942 pesos (SAGARPA-SIAP, 2015) (Cuadro 2).

Tradicionalmente, el nopal es consumido en México como: verdura (nopalitos); como fruta; como colorante, y para consumo de los animales en época de estiaje debido a que mantiene la sobrevivencia del ganado bovino, ovino y caprino en sequías prolongadas.

En 2007, la superficie sembrada de nopal forrajero fue de 11,227 hectáreas (SAGARPA-SIEP, 2015), llegando a establecer una superficie para el 2013 de 15,987 has con un incremento del 42.4%.. La producción aumentó de 750 a 140,723 toneladas, respectivamente, este último con un valor de \$54, 377,050. Sin embargo, el rendimiento no ha mejorado mucho, ya que en 1990 fue de 30 t ha⁻¹; mientras que en 2007 fue de 37 t ha⁻¹, e incluso ha bajado en los últimos años hasta llegar a 14.87 t ha⁻¹ en el 2013.

Cuadro 2. Producción nacional de nopal forraje, verdura y tuna en 2013.

Producto	Superficie sembrada (ha)	%	Superficie cosechada (ha)	Producción (T)	Rendimiento (T. ha ⁻¹)	PMR ¹ (\$T ⁻¹)	Valor de producción (miles de pesos)
Forraje	15,987	18.83	9,461	140,723	14.9	386.4	54,377
Verdura	13,124	15.45	12,521	786,774	62.8	2,448.2	1,926,161
Tuna	55,812	65.72	50,823	487,375	9.6	3,269.4	1,593,404
TOTAL	84,924	100.00	72,805	1,414,872	87.3	6,103.9	3,573,942

2.4 Composición Química de la Planta

Los cladodios son muy ricos en pectina, minerales y mucilago, poseen un alto contenido de ácido málico relacionado al metabolismo CAM (Metabolismo ácido crasuláceo) (Stinzing-Florian, 2006). El Cuadro 3 reporta la composición fisicoquímica de cladodios, los cuales son ricos en azúcares, pro-vitamina A, C, pero pobres en nitrógeno (Sudzuki, 1999) y son una importante fuente de fibra dietética (Guzmán-Loayza, 2007) y El mucilago contiene aproximadamente 30.000 diferentes azúcares en diferentes proporciones (Celis, 2009).

Cuadro 3. Composición fisicoquímica de cladodios en base seca y húmeda.

Constituyente	Cladodios (g/100g) en base seca	Cladodios (g/100g) en base húmeda
Agua	-	88-95
Carbohidratos	64-71	3-7
Ceniza	19-23	1-2
Fibra	18	1-2
Proteínas	14-10	0.5-1
Lípidos	1-4	0.5-1
Ácido ascórbico	-	0.2

En el Cuadro 4 se puede destacar la concentración de cada uno de los constituyentes el cual depende en gran manera del lugar del cultivo, clima, variedad y edad de la planta, además posee una acidez titulable de 0.03 a 0.12% con un pH de 5.0 a 6.6 y un contenido de sólidos solubles entre 12 y 17% (Celis, 2009).

Cuadro 4. Contenido de minerales en cladodios de *Opuntia ficus indica*.

Componente	Peso seco del cladodio
Calcio	5.6
Magnesio	0.2
Potasio	2.3
Fosforo	0.1
Sodio	0.4
Hierro	0.14 µg (trazas)

2.5 Requerimientos de Agua en el Nopal Verdura

La falta de agua provoca reducción en la humedad aprovechable del suelo y el contenido de agua de los tejidos de las plantas, y ha sido considerada el factor ambiental que restringe con más frecuencia la productividad de los ecosistemas naturales y la agricultura (Blum, 1997).

El efecto del déficit de agua está determinado por su intensidad, duración y oportunidad, así como por la capacidad de las especies para tolerarlo (Bradford y Hsiao, 1982). En el caso de las cactáceas (CAM) es poco conocido como se efectúa su metabolismo fotosintético (Steudle, 2000).

En el nopal (*Opuntia ficus-indica*) se conoce que es un cultivo que prospera en lugares donde la escasa lluvia no permite el desarrollo de otros cultivos hortícolas. No obstante, su adaptabilidad y resistencia a sequía, los cambios fisiológicos del nopal provocados por la falta de agua se han estudiado relativamente poco (Wu y Cosgrove, 2000).

Aguilar (1991) señala que si el déficit de agua en el suelo se agudiza se genera una disminución del crecimiento y arrugamiento severo del cladodio, este arrugamiento es localizado en los tejidos debido a la traslocación del agua del tejido medular al tejido clorenquimatoso (Von Willert *et al.*, 1992). Se han identificado algunos mecanismos de resistencia a la sequía en plantas CAM, los más comunes son:

absorción o penetración a través de areolas (Aguilar, 1991) e hidátodos del agua que se condensa (niebla y vapor de agua) durante la madrugada (Tolken, 1977). La penetración de agua se incrementa cuando hay días nublados, lo que fue comprobado mediante aspersiones de soluciones coloreadas a tallos y hojas y se apreció que la solución coloreada penetró los tejidos sin cambiar de tonalidad, vía areolas e hidátodos. La penetración de agua también se puede dar a través de las estomas y la epidermis (Von Willert *et al.*, 1992).

Nobel y Castañeda (1998) mencionan que el agua es un recurso que permite el brote en el nopal, donde las raíces superficiales y extendidas captan el agua de lluvia e inducen la formación de raíces secundarias; además, aumentan la superficie de contacto con el suelo, lo que facilita la absorción de agua y de nutrientes. Kaush (1965) afirma que esta especie puede formar nuevas raíces dentro de las 24 horas posteriores al humedecimiento de un suelo seco.

Cuando ocurre un déficit de agua severo se reduce significativamente la concentración de los pigmentos fotosintéticos en el tejido clorenquimatoso, ya que las clorofilas decrecen a 57.6 %, 65.8 % y 68.6 % con respecto al nivel de estrés hídrico que se someta (Aguilar y Peña, 2006).

Demming *et al.* (1988) encontraron que la clorofila **a** disminuye cuando se impone un estrés por sequía, pero cuando el déficit de agua se agudiza se inicia la disminución

de la clorofila **b**. La disminución de las clorofilas en el clorénquima con el 'déficit severo' de agua, contrastó con el incremento significativo de las clorofilas **a+b** (14.2%) y **a** (36.5 %) cuando el déficit de agua fue intermedio. Al parecer, la disminución de los niveles de clorofilas es una respuesta común al estrés por sequía (Ludwing y Matthews, 1993).

2.6 Calcio en Nopal

Actualmente, existe interés por vigilar e incrementar el consumo de calcio (Ca^{++}) en la dieta humana. La manera de aumentar los niveles de Ca^{++} en el ser humano es adquirirlo a través del carbonato de calcio (CaCO_3) ya que es la forma en que se metaboliza (Fairweathert, 2007). El CaCO_3 se encuentra principalmente en los lácteos que aportan más de 80 % de este mineral a la dieta.

La biodisponibilidad del calcio, procedente de este grupo de alimentos, es relativamente alta entre otros factores, porque está asociado a promotores de su absorción como la lactosa (Bronner y Pansu, 1999). En los países en vías de desarrollo incluyendo México, la ingesta de calcio por productos lácteos está limitada, por el alto costo que representan. Otra alternativa de obtener Ca^{++} es en el nopal, ya que se ha demostrado que esta verdura lo ofrece como fuente natural, lo que puede mejorar la salud ósea (Heaney, 2001; Fairweathert, 2007).

El CaCO_3 es uno de los sistemas más abundantes y por lo tanto más estudiados debido a que es una sustancia inorgánica producida por organismos vivos, lo que permite que este aspecto sea importante para el desarrollo de nuevos materiales en diversos campos de aplicación (Shu-Chen *et al.*, 2007).

Además, el carbonato de calcio tiene tres polimorfos cristalinos anhidros, los cuales ordenados por estabilidad termodinámica son calcita, aragonita y vaterita (Payne *et al.*, 2007) La calcita es un biomineral, principal constituyente de las cáscaras de huevos, conchas de moluscos y crustáceos (Shu-Chen *et al.*, 2007). Los carbonatos poseen un radical discreto que varía de acuerdo con las condiciones de presión y de temperatura. En el caso de la calcita, es un carbonato de calcio monohidratado (Young *et al.*, 2003), del sistema cristalino hexagonal (trigonal) aunque sus formas pueden variar de acuerdo con la especie vegetal (Franceschi y Horner, 1980).

Generalmente, la eficiencia de la absorción del calcio en el nopal verdura es favorable, a menos que presenten grandes concentraciones de sustancias como el ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) o fibra dietética (Kennefick y Cashman, 2000; Heaney, 2001; Charoenkiatkul *et al.*, 2008). En este caso, el Ca^{++} puede quedar secuestrado por los oxalatos, que impide su absorción en el metabolismo humano, pues la disponibilidad del elemento está limitada. Los cristales del oxalato de calcio (CaC_2O_4) representan desde 8 a 50% del peso seco del cladodio (Gallaher, 1975; McConn y Nakata, 2004).

2.7 Oxalatos de Calcio en Nopal

El nopal con cristales de oxalato de calcio se pueden observar en la Figura 1 los cuales se distinguen por su forma de drusas (Franceschi y Horner, 1980). Estos cristales se producen en células especializadas llamadas idioblastos (células mucilaginosas), y en la vacuola intra o extracelular (Fink, 1991), y difieren en forma y tamaño (Franceschi y Nakata, 2005).

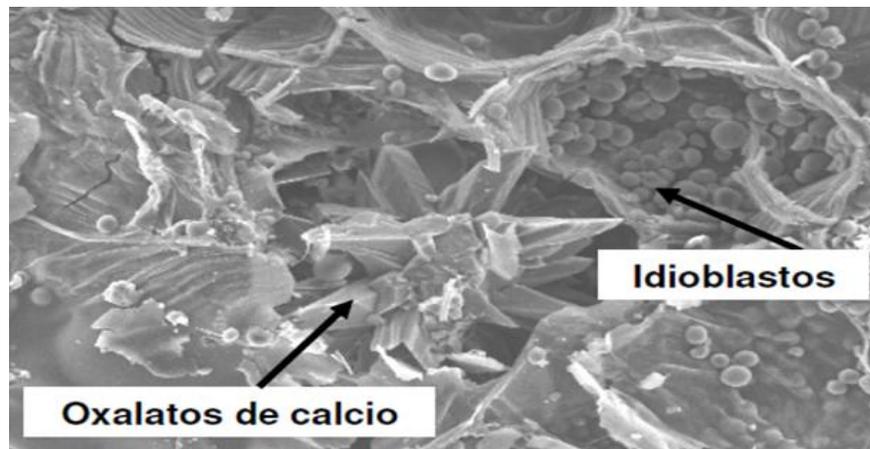


Figura 1. Fotografía de oxalato de calcio en las células mucilaginosas del nopal y su forma de weddellita tetragonales con forma de estrella (Rodríguez *et al.*, 2007).

Tovar *et al.* (2007) evaluaron la concentración de cristales de oxalato en la parte superior, media y basal de 15 cultivares de nopal del género *Opuntia* y *Nopalea* y encontraron que no hay diferencias significativas ($P > .01$). No obstante, estos resultados se pueden utilizar para simplificar la zona de muestreo y cuantificar el número de cristales de oxalato de calcio. El procedimiento de muestreo fue uniforme,

en cuanto dimensiones de cladiolos, altura de corte al tercer piso, con exposición norte, y una edad entre 8 y 10 meses.

Tovar *et al.* (2007) también encontraron que el número de cristales de oxalato de calcio por mm² varía entre 18 y 57 para los 15 cultivares que estudiaron. Este trabajo hizo una importante contribución al diferenciar entre cultivares de nopal y otras especies de cactáceas en una forma sencilla, mediante la determinación de la densidad de cristales de oxalato de calcio que están presentes (Figura 2).

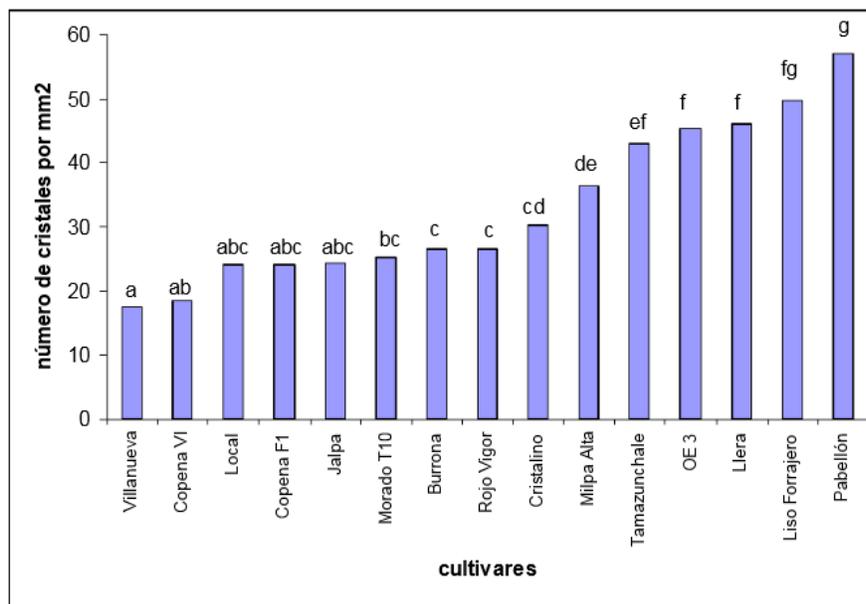


Figura 2. Número de cristales de oxalato de calcio mm² por cultivar de nopal (Tovar *et al.*, 2007).

El oxalato de calcio en la planta actúa como un regulador del C⁺⁺ disponible y evita que la planta pierda este elemento importante en sus actividades fisiológicas

(Kostman y Franceschi, 2000, Rajendra y Yashbir 2017). También el oxalato de calcio se forma cuando existe un exceso de Ca^{++} , evitando así que la planta tenga alguna intoxicación (Ruiz y Mansfield, 1994).

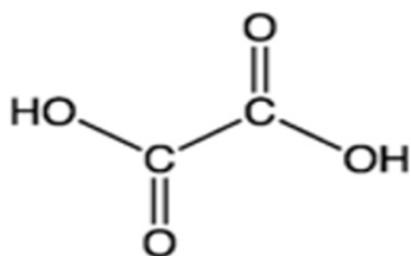
La cantidad de Ca^{++} aumenta en los cladodios a diferentes etapas de maduración (40 días con 17.95% y 135 días con 34.4% respectivamente) (Hernández, 2011). No obstante, la disponibilidad no decreció por que se encuentra fijado por el oxalato (Contreras, 2010). Además, este influye en la precipitación y toxicidad del ácido oxálico (Franceschi y Loewus, 1995) y actúa como almacén de nutrientes (Lane, 1994) en respuesta al estrés hídrico o nutrimental (Kostman *et al.*, 2001).

2.8 Generalidades de los Oxalatos de Calcio

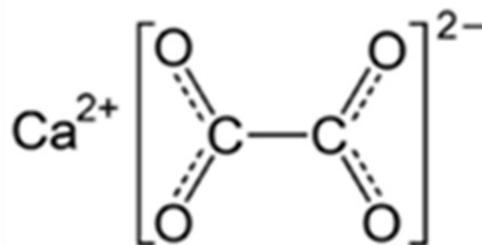
Pérez (2015) menciona que los oxalatos se producen en estado natural en forma de oxalato de potasio o de calcio en las raíces y rizomas de muchas plantas y que su nombre es "ácido oxálico" el cual proviene de la palabra de origen griego axys (agrio), debido a su sabor amargo. El compuesto químico puro fue descubierto en 1776 por el químico sueco Carl Wilhelm Scheele en el proceso de oxidación del azúcar por el ácido nítrico. De ahí que al ácido oxálico se le llamara también "ácido de azúcar".

El ácido oxálico, de estructura HOOC-COOH , es el más simple de los ácidos dicarboxílicos alifáticos, siendo la forma comercial más común la deshidratada;

aunque también es común la hidratada ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ o $HOOC-COOH \cdot 2H_2O$). Se trata de un ácido orgánico saturado, de cadena normal, y muy fuerte (10000 veces más fuerte que el ácido acético). El oxalato de calcio es un cristal iónico casi insoluble en agua, de fórmula $Ca(COO)_2$ o CaC_2O_4 (Figura 3), compuesto por un ion de Ca^{2+} y un ion oxalato $-OOC-COO-$ derivado del ácido oxálico. Por otra parte, ya se ha demostrado que el proceso de formación y crecimiento de los cristales es altamente controlado en el interior de las células de las plantas, lo cual nos permite conocer más detalles del proceso (Mann, 1989; Baran, 1995).



Estructura del ácido oxálico
 $HOOC-COOH = C_2H_2O_4$



Estructura del oxalato de calcio
 $Ca(COO)_2 = CaC_2O_4$

Figura 3. Representación esquemática de las estructuras del ácido oxálico y oxalato de calcio (Pérez, 2015).

Los oxalatos existen en dos formas en los vegetales: oxalatos insolubles (sales de calcio y magnesio) y oxalatos solubles en agua (sales de sodio y potasio). Los primeros cuando son ingeridos no se absorben y son excretados sin causar problemas; los últimos, al ingerirse son absorbidos y pueden causar intoxicación a los animales principalmente. Una vez ingeridos los oxalatos de sodio y potasio que se hallan en los vegetales, el ácido oxálico es liberado en el estómago y de ahí pasa

a la sangre; precipita el calcio iónico de ésta y se forma oxalato de calcio insoluble. Estos cristales destruyen los tejidos, afectando principalmente los riñones y pulmones (Gallo, 1987).

2.9 Biomineralización de Oxalato de Calcio

La mayoría de las plantas producen cristales de oxalato de calcio, los cuales pueden representar más de 85 % del peso seco de algunas de ellas (cactáceas) (Gallaher, 1975).

Los primeros reportes de estos cristales en las plantas fueron realizados por Leeuwenhoek en el siglo XVII; sin embargo, no se les dio mucha importancia, ya que se les consideró sólo como productos de desecho. Debido a que presentaban morfologías peculiares y una compleja fenomenología asociada a su formación, en la década de los años 70 se iniciaron una serie de estudios para demostrar que estos cristales no eran simples productos de desecho.

Los cristales de este mineral han sido observados virtualmente en todos los tipos de tejidos vegetales e igualmente en algunas bacterias, hongos y animales. La formación de oxalato de calcio es un proceso esencial en la mayoría de las especies de plantas conocidas y en algunos casos representan hasta 90% del calcio total. Sin embargo, este porcentaje varía entre las diferentes especies de plantas que presentan este tipo de cristales. Lo anterior parece indicar que su formación

representa el mayor mecanismo de regulación de los niveles de calcio en la planta (Horner y Wagner, 1995).

Las plantas producen los cristales de oxalato de calcio en una gran variedad de formas y tamaños, aunque la mayoría de los cristales pueden clasificarse dentro de cuatro tipos principales de acuerdo con su morfología: rafidios (cristales aciculares en agregados), drusas (agregados cristalinos esféricos), estiloides (cristales aciculares) y prismas (Figura 4). Generalmente, la morfología de los cristales y su distribución dentro de los tejidos de la planta son específicas. El tipo de polimorfo del oxalato de calcio presente en las plantas también es especie-específico y puede ser la whewellita (oxalato de calcio monohidratado) o la weddellita (oxalato de calcio dihidratado) (Franceschi y Horner, 1980).

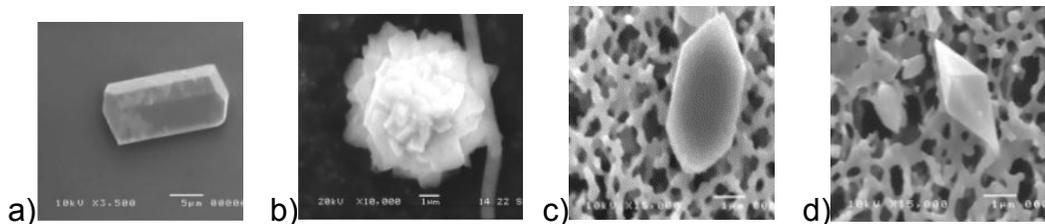


Figura 4. Diferentes morfologías de cristales de oxalato de calcio. a) Prisma formado en la testa del frijol común (*Phaseolus vulgaris*), b) Drusa formada en la semilla del fruto de la uva, c) Cristal de oxalato de calcio monohidratado sintético, d) cristal triclinico de calcio dihidratado sintético.

2.10 Formación de Oxalatos de Calcio

Los cristales de oxalato de calcio tienen una morfología y ubicación especial. Estos cristales se desarrollan dentro de una cámara cristalina formada por una matriz orgánica, la cual se encuentra en la vacuola central de los idioblastos (Webb *et al.*, 1995).

La matriz orgánica intravacuolar es una estructura que juega un papel crucial en la precipitación y regulación de la morfología del cristal, debido a que separa el espacio en donde se forma. El cristal está formado por polisacáridos, lípidos y proteínas, los cuales crean y controlan el microambiente alrededor de los cristales en formación.

En los idioblastos, la matriz orgánica es una de las primeras estructuras que se diferencia durante el proceso de formación de los cristales; debido a esto, la morfología última del cristal puede ser predicha antes de su formación (Arnott y Webb, 1983).

Dentro de la matriz hay dos tipos principales de proteínas: ácidas altamente cargadas, solubles en medios acuosos y generalmente ricas en ácido aspártico y glutámico. Estas proteínas pueden promover o inhibir la nucleación del oxalato de calcio y poseen diferentes afinidades cristalográficas por las diferentes caras que presentan los cristales (Weiner *et al.*, 1983). El segundo tipo de proteínas son insolubles en medios acuosos y ricas en aminoácidos no polares tales como glicina y

alanina. Estas proteínas (tipo colágena o fibroína de la seda) actúan como el soporte estructural de las proteínas ácidas y la cámara cristalina (Meenakshi *et al.*, 1971).

Las proteínas ácidas cumplen una función primordial en la formación de los cristales ya que pueden unirse específicamente a caras determinadas del cristal con las cuales tienen complementariedad cristalográfica. Debido a esto pueden inhibir la nucleación cristalina, cuando están en solución promueve la nucleación al adherirse a un sustrato (por ejemplo el que forman las proteínas insolubles) (Campbell *et al.*, 1989). Modelar la forma del cristal (modificando la velocidad de crecimiento de ciertas caras cristalinas o promoviendo la desaparición o aparición de nuevas caras), es necesario para controlar el estado de hidratación del cristal y la formación de agregados cristalinos o monocristales (Bouropoulos y Weiner, 2001).

Todo lo anterior en colaboración con factores fisicoquímicos como el pH de la solución, el nivel de sobresaturación, la concentración diferencial de los iones calcio y oxalato, entre otras (Jáuregui *et al.*, 2003).

2.11 Función de los Oxalatos de Calcio

La función de los cristales de oxalato de calcio en las plantas no se ha determinado con precisión. En investigaciones recientes se ha propuesto que estos cristales pueden desempeñar diversas funciones, una de ellas, al parecer la más importante, es el secuestro y mantenimiento de los niveles de calcio dentro de la planta, lo que

indica que puede actuar como un mecanismo de regulación para los niveles de calcio. El oxalato captura al Ca^{++} cuando existe un déficit para evitar más pérdidas del mineral que impida realizar sus funciones metabólicas, pero si existiera un incremento en los niveles este impide una intoxicación; no obstante, algunos estudios han mostrado que el número y tamaño de los cristales de oxalato de calcio responden algún tipo de estrés.

Las diferentes morfologías presentadas por los cristales responden de manera diferente al estrés; un ejemplo es la planta *Pistia stratiotes* que forma drusas y rafidios. Estas mostraron una respuesta particularmente más dinámica a las fluctuaciones en los niveles de calcio, ya que aumentan rápidamente en número y tamaño cuando la planta sufre estrés por exceso de calcio; mientras que, cuando existe un déficit de calcio, su número y tamaño disminuyó drásticamente debido a una redisolución de los cristales para utilizar el calcio.

Por otra parte, los rafidios tuvieron una respuesta similar a las drusas bajo un estrés por exceso de calcio; sin embargo, no sufrieron una disminución en número o tamaño cuando el estrés fue por déficit de calcio (Volk *et al.*, 2002). Los prismas en algunos cristales de leguminosas mostraron la misma respuesta, que las drusas cuando se forman en condiciones de exceso y déficit de calcio (Zindler *et al.*, 2001).

Los cristales de oxalato de calcio también pueden actuar como mecanismo de defensa en la planta. Investigaciones en *Sida rhombifolia* mostraron que hay una acumulación de rafidios en respuesta a un tratamiento de herbivoría artificial (Molano, 2001). Por el contrario, en *Pancratium sickenbergeri* no hubo un aumento en el número de rafidios bajo herbívora artificial; sin embargo, se observó que variedades de esta especie con contenidos mayores de cristales eran menos consumidas (Ruiz *et al.*, 2002). En la planta de nopal se encontró que un alto contenido de oxalatos redujo la producción de grana cochinilla. Lo anterior coincide con lo reportado por Rajendra y Yashbir (2017) quienes mencionan que el ácido oxálico y los oxalatos desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la concentración deseada de Ca^{++} en las células, y en la autodefensa inducida o adquirida contra plagas de insectos y animales de pastoreo.

También se ha propuesto que los cristales de oxalato de calcio pueden actuar como depósitos inertes para metales pesados como Zn, Cd, Sr, Pb y Al, debido a que se han detectado (por espectrometría de dispersión de energía o absorción atómica) en los cristales aislados de plantas que crecieron en suelos contaminados (Mazen y Maghraby, 1998). Algunas funciones adicionales de los cristales son: formación de cámaras aéreas, actuar como soporte estructural, como dispersores, o concentradores de los rayos luminosos (Franceschi, 2001).

2.12 Técnicas para la Observación de los Oxalatos de Calcio

Diferentes técnicas se han utilizado para la caracterización de los cristales de oxalato de calcio, desde análisis químicos, difracción de rayos X, petrografía, microscopio electrónico de barrido, secciones delgadas e infrarrojas.

Jauregui *et al.* (2003) utilizaron microscopía electrónica de barrido acoplada a una energía de espectrómetro de rayos X dispersivo (EDS) para análisis de sondas, con la finalidad de caracterizar la cristalográfica y composición química de los cristales de oxalato de calcio. Por su parte, Monje y Baran (2009) caracterizaron drusas de oxalato de calcio en tejido vegetal fresco sumergiéndolo en solución de hipoclorito de sodio 6% por 48 h. El tejido se disoció mecánicamente a través de una transferencia de plástico (Pipetear) filtrado y decantado. El sedimento, que contenía los productos cristalinos fueron observados en un microscopio óptico de disección.

Moje y baran (2003) realizaron un estudio espectroscópico infrarrojo sistemático para caracterizar la naturaleza química de los depósitos, y describieron los cristales en términos de su morfología. Técnicas como el SEM junto al análisis de rayos X de área restringida por dispersión de son empleadas para la captura fotográfica de las muestras sobre los portaobjetos en película blanca y negra para el barrido electrónico.

2.13 Estudios Micromorfológicos en Secciones Delgadas

El análisis mineralógico dentro de las estructuras vegetales así como su cuantificación a escala microscópica en Giga Imágenes de secciones delgadas representar una alternativa viable al analizar micromorfológicamente sobre secciones delgadas por microscopia de trasmisión y obtener la caracterización y clasificación de los minerales (Piochi *et al.*, 2008).

Los recientes avances en estudios de análisis de imágenes microscópicas han hecho posible la observación y caracterización de la microbiología y su relación con los diferentes componentes (Tarquini y Favalli, 2010), adaptando esta técnica de tejidos vegetales, en un contexto geoespacial. No obstante, una limitante ha sido la cuantificación y distribución espacial de los oxalatos de calcio dentro de las estructuras vegetales, así como la localización de los cristales de calcio.

El uso y análisis de gigaimágenes digitales se han utilizado para cuantificar e identificar la distribución geoespacial de bacterias dentro de los componentes del suelo (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2016); sin embargo, esta técnica no se ha aplicado en la cuantificación de oxalatos de calcio para estimar el volumen de células en muestras acuáticas, suspensiones de suelo y frotis del suelo.

La adquisición secuencial de imágenes digitales permite que las imágenes de los campos continuos se traslapen para formar imágenes compuestas más grandes. El

registro muy preciso de imágenes continuas permite la generación de mosaicos a gran escala con la calidad y la suficiente definición para las distribuciones de oxalato de calcio para ser cuantificada en un rango de escalas (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2016).

Los datos obtenidos de esta manera son más precisos y objetivos que los alcanzables por estimación visual (Li *et al.*, 2008). Sin embargo, la segmentación de tejidos vegetales en las imágenes de secciones delgadas de nopales son considerablemente más difíciles debido a una variedad de factores, incluyendo un fondo heterogéneo complejo, no específico por tinción de fondo.

Estas preparaciones microscópicas están hechas de tal manera que los oxalatos de calcio se visualicen como puntos brillantes sobre un fondo oscuro (Tarquini y Favalli 2010). La presencia de objetos fluorescentes y un grado variable de enfoque complica la identificación de los cristales. Además, el fondo de brillo en las imágenes de secciones delgadas diferentes puede mostrar una variación considerable debido al nivel de fluorescencia de lotes de la resina (calidad) utilizada para impregnar las muestras (Nunan y Ritz, 2001).

2.14 Microscopio Petrográfico

El microscopio petrográfico esté integrado con tres fuentes de luz: polarizada plana, polarizada cruzada y luz polarizada con retardación o compensador de yeso.

Además de elementos básicos de cualquier microscopio óptico como: sistema de iluminación, condensador, platina giratoria para colocar las muestras, objetivos y oculares. El microscopio petrográfico está formado por los siguientes elementos (Figura 5).

- Un polarizador lineal situado antes del condensador, que transforma la luz procedente de la fuente de iluminación, que no está polarizada, en luz polarizada lineal. Generalmente se coloca de tal forma que el eje de polarización sea horizontal respecto al observador (derecha/izquierda).
- Una platina móvil que permite la rotación de las muestras y el ajuste del eje de rotación, para que la muestra coincida con el eje óptico del microscopio, de tal forma que permanezca centrada en el campo de visión. En algunos modelos este ajuste se realiza en el revolver de los objetivos).
- Un segundo polarizador lineal, también llamado analizador, que se coloca entre el objetivo y el ocular. Este polarizador debe tener su eje de transmisión perpendicular al eje del primer polarizador. Algunos modelos permiten la rotación de ambos polarizadores.

Los objetivos empleados con luz polarizada deben estar contruidos de tal manera que sus lentes no estén sometidas a tensiones que puedan afectar a la polarización de la luz que pasa a través de ellas. Habitualmente los fabricantes graban las letras “pol” en los objetivos indicados para utilizar luz polarizada.

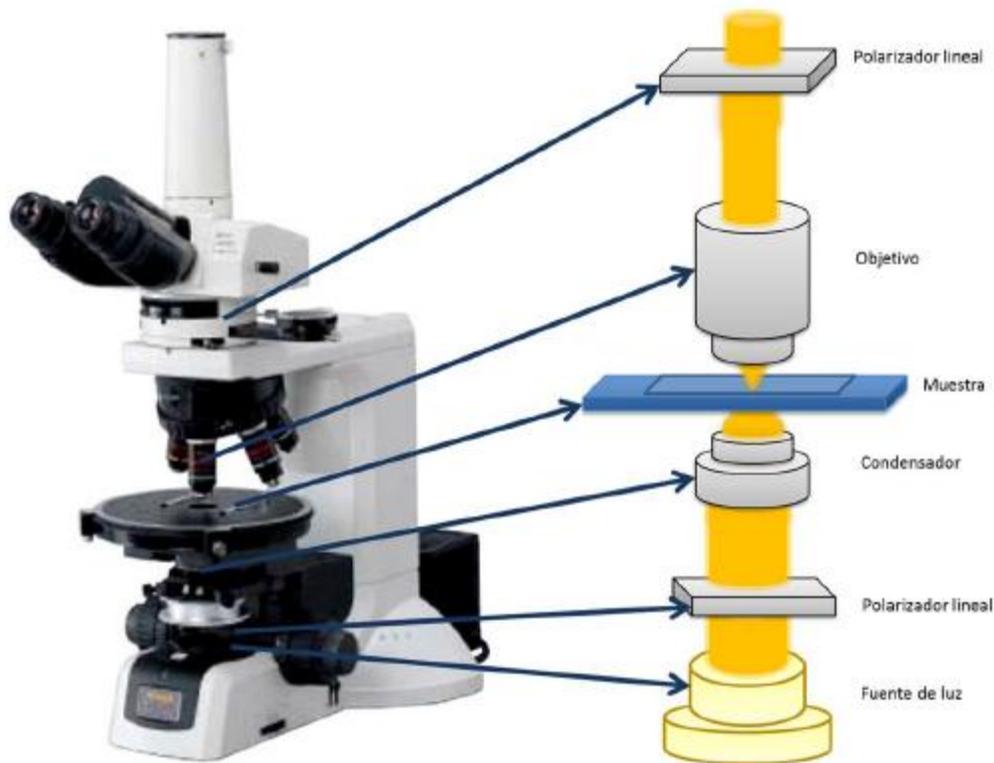


Figura 5. Principales componentes del microscopio petrográfico.

Al utilizar un microscopio de este tipo, la muestra se ilumina con luz polarizada lineal. Si el material a observar es birrefringente, al atravesar la muestra cada rayo de luz se dividirá en dos, y ambos rayos tendrán un desfase relativo que, como ya se ha visto, estará relacionado con el ángulo entre el plano de polarización, el eje óptico del

crystal, el tipo de luz empleada, el espesor del material y la diferencia entre los índices de refracción ordinario y extraordinario. Cuando los rayos salen del cristal, existe un retardo entre ellos, que suele ser del orden de nanómetros.

Además, al haber atravesado la muestra, entran en el polarizador superior, también llamado analizador, ambos rayos interfieren entre sí, originando una figura de interferencia con tonos y colores que aparecen en un orden determinado y se van repitiendo con menor intensidad. Antes de que aparezca el primer color, amarillo, el cual se observa como una zona grisácea de distinta intensidad.

La formación de colores de interferencia fue observada y explicada por Newton en su *Optica*, y en el caso de los minerales fue estudiada en detalle por Michel-Lévy, quien en 1888 publicó una tabla con los colores de interferencia producidos por diversos minerales según su espesor en su obra *Les Minéraux des Roches*. Esta tabla ha sido perfeccionada desde entonces, siendo la más reciente la publicada por Sørensen (2012).

El uso más común de los microscopios polarizadores en geología se da en el campo del análisis e identificación de los minerales que forman una roca. Para ello se corta una fina lámina de la muestra de espesor conocido. Al tener toda la lámina el mismo espesor, y ser iluminada con el mismo tipo de luz, el desfase entre los rayos, y por tanto su color, dependerá de las características de cada uno de los minerales que

forman la lámina. Al comparar los colores y tonalidades observados con los que aparecen en la tabla de Michel-Lévy se puede saber de qué minerales está formada la muestra.

2.15 Polarización lineal, Circular y Elíptica

La luz visible ondulatoria la radiación electromagnética es aquella que tiene una longitud de onda comprendida entre 400 y 700 nanómetros. La radiación electromagnética es una onda transversal formada por un campo eléctrico y otro magnético, perpendiculares entre sí, que son a su vez perpendiculares a la dirección de propagación como se representa en la Figura 6 (Born, 1980).

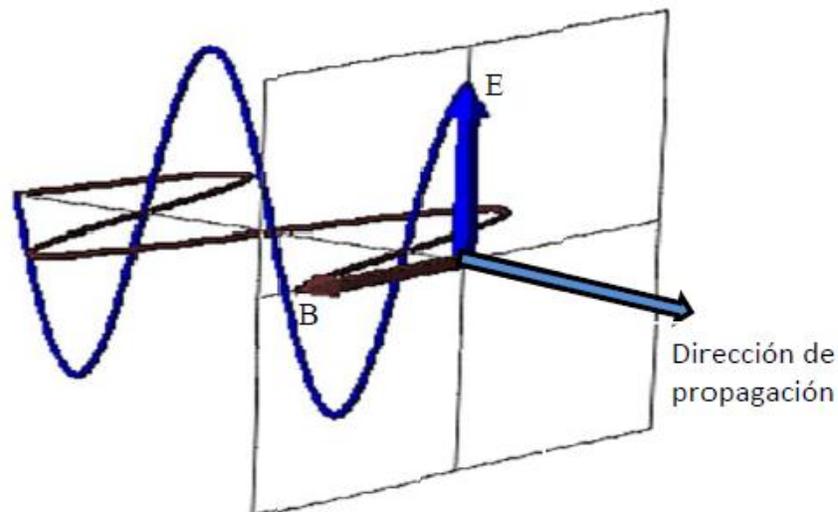


Figura 6. Dirección de oscilación de los campos eléctricos E y magnético (B) comparados con una dirección de propagación de la luz.

Existen minerales que tienen la propiedad de dejar pasar únicamente aquellos rayos en los que el campo eléctrico vibra en una dirección . De esta manera, al incidir en ellos emerge la luz polarizada lineal, es decir, luz en la que el campo eléctrico vibra siempre en la misma dirección (Delly, 2008). Además, hay varias formas de conseguir polarización lineal, entre las que destacan la absorción selectiva por dicroísmo, la reflexión por ángulo de Brewster o la polarización por dispersión (Delly, 2008).

Los cristales del sistema hexagonal y tetragonal dividen el rayo incidente en dos, por lo que se llaman birrefringentes, aunque tienen una única dirección a lo largo de la cual se comportan como si fueran isotrópicos. Esa dirección se llama eje óptico y por ello los cristales birrefringentes son uniaxiales (Douglas *et al.*, 2012). En los sistemas rómbico, triclinio y monoclinico. De esta manera, cuando un rayo de luz incide de forma perpendicular a la superficie de un cristal birrefringente, con una dirección distinta a la del eje óptico, se divide en dos rayos que viajan a través del cristal, cada uno de ellos con una velocidad diferente, por lo que ambos rayos se van desfasando uno respecto al otro (Kameo y Furucaawa, 2007).

Los minerales que forman cristales con dos direcciones de vibración (tetragonal y hexagonal) reciben el nombre de uniaxiales; mientras que los minerales con tres direcciones de vibración (ortorrómbica, monoclinica y triclinica) reciben el nombre de

biaxiales. En ellos los rayos refractados de luz viajan en diferentes direcciones de vibración dentro del cristal (Kameo y Furukawa, 2007).

Los carbonatos presentan birrefringencia de tercer orden debido a que las estructuras triangulares planas que conforman los aniones se orientan paralelas al eje óptico, que discurren en forma oblicua atravesando diametralmente el cristal.

En el caso de los oxalatos también son cristales con alta birrefringencia negativa lo que significa que el índice de refracción ordinario es mayor que el extraordinario; esta variación espacial es característico de los cristales uniaxiales en donde un rayo de luz alcanza perpendicularmente la superficie de un material birrefringente como es el caso de los oxalatos donde puede generar imágenes modificadas (Douglas *et al.*, 2012). La indicatriz óptica en la Figura 7 muestran donde los ejes de la elipse representan los índices de refracción ordinario o extraordinario.

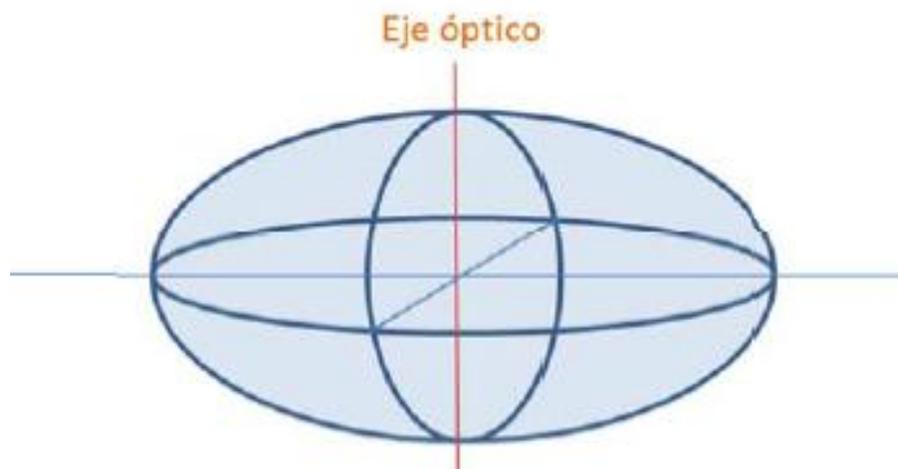


Figura 7. Indicatriz óptica.

En la Figura 8 se realiza una representación de la luz visible que se puede describir como compensada por gran cantidad de ondas elementales de diferentes frecuencias. Habitualmente cada una de estas frecuencias tiene una orientación del campo eléctrico aleatoria, lo que hace que en la luz no haya una única orientación del campo eléctrico total. En ese caso se dice que el haz de luz no está polarizado (Delly 2008).

La representación de haz de luz (azul) inicialmente polarizado linealmente que incide en un material birrefringente (paralelepípedo naranja). A medida que recorre el material, los componentes perpendiculares en las que se pueden descomponer el campo eléctrico (verde y roja) se van desfasando de tal manera que cuando abandona el material la luz esta polarizada circularmente.

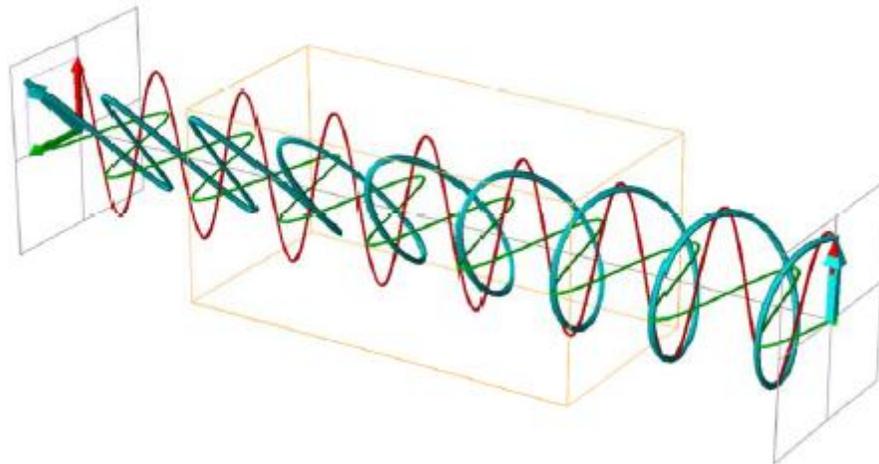


Figura 8. Luz compensada

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Primera Etapa

La presente investigación se realizó en el Campo Experimental Marín, Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León durante entre los años 2015 y 2017. Las unidades experimentales se establecieron en contenedores de 36 cm de alto, 28.5 cm de diámetro, bajo condiciones controladas (porcentaje de humedad y protección a posibles lluvias que pudieran alterar los tratamientos).



Figura 9. Establecimiento del sitio experimental.

El sustrato utilizado fue extraído de la capa arable de parcelas experimentales (nopaleras), donde se ha reportado constantes diferenciales al estrés hídrico durante el desarrollo de los cladodios.

Los tratamientos de raquetas de nopal verdura que fueron sometidos a estrés hídrico consistieron en cantidad de agua disponible en 10% y 30% con base al volumen del contenedor.

Los tiempos de intervalo entre riego se determinaron con base al peso del contenedor o macetas hasta alcanzar los niveles de humedad referidos.



Figura 10. Estado vegetal de cladodios según el tratamiento. A) 10% de agua aprovechable. B) 30% de agua aprovechable.

Las muestras de tejido vegetal fueron obtenidas de cladodios a 60 días, mediante cortes transversales de 4 cm² (Figura 11A) y sometidas a deshidratación con acetona (CH₃CH₃) al 100% (Figura 11B, C y D) durante 6 días. Posteriormente estas fueron impregnadas con resina poliéster insaturada y monómero de estireno (C₈H₈) en una relación 9:1. La impregnación se llevó a cabo en una cámara de vacío durante 45 min a 15 lb de tención (Figuras 12 y 13), finalizando en una etapa de gelación

durante 15 días. Una vez seca fueron cortadas utilizando un disco de punta de diamante, colocando la sección en portaobjetos de 5.5 × 7 cm fijándose con resina epóxica. El proceso finaliza cuando se obtiene un espesor de 30 µm (Figura 13).

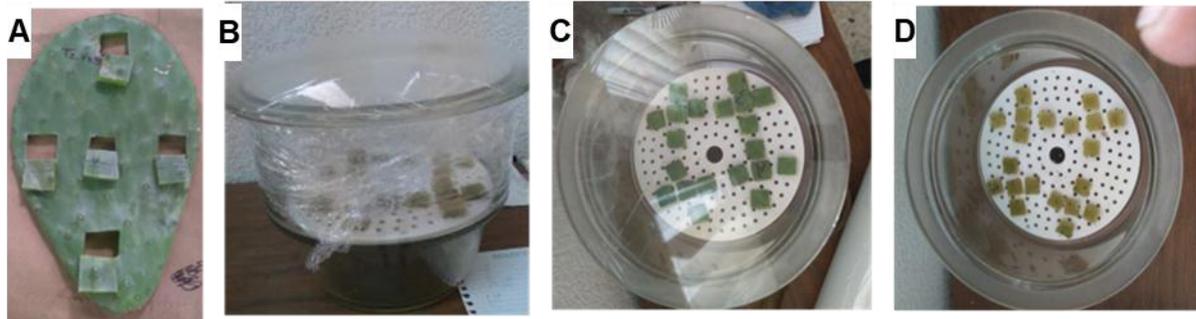


Figura 11. Representación del método de muestra y deshidratación del nopal con acetona (CH_3CH_3) al 100%.

3.1.1 Construcción del mosaico de alta resolución

Mosaicos de alta resolución se construyeron utilizando fotografías secuenciales capturadas con una cámara Canon EOS Rebel, montada en un microscopio petrográfico (Olimpus BX51). Un total de 117 imágenes fueron captadas con el objetivo 10× para una superficie de un cm^2 utilizando diferentes fuentes de luz (plana, cruzada y compensador). Cada imagen representa un área de 3.08 mm^2 .



Figura 12. Impregnación con resina de muestras de nopal y la cámara de vacío.

Las fotografías son analizadas y procesadas empleando softwares especializado tanto en imágenes digitales como ERDAS Imagine 2014v® en formato raster como y ArcGIS v.10. ® formato vectorial. Los procesos se basaron en la metodología reportada por Gutiérrez-Castorena *et al.* (2016).



Figura 13. Fijación de las muestras hasta obtención de la sección delgada hasta obtener las 30 μm de espesor.

3.2 Segunda Etapa

El sustrato utilizado se sometió a diferentes niveles de estrés hídrico durante el desarrollo de los cladodios (Figura 14). Los tratamientos consistieron en disminuir la cantidad de agua disponible a 10, 30 y 60% con 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 en peso periódico de las macetas hasta alcanzar los niveles de humedad referidos.

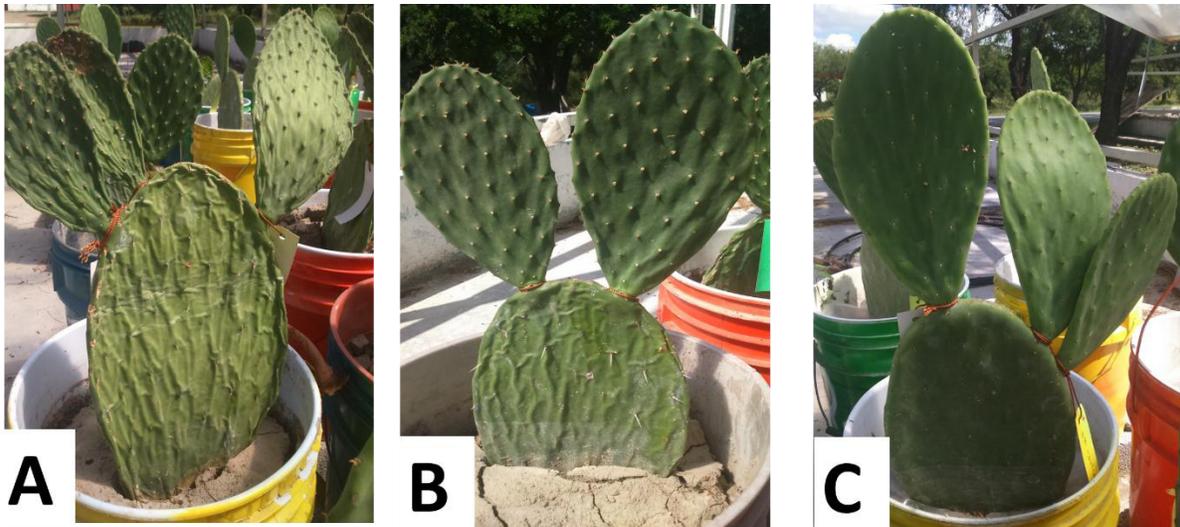


Figura 14. Estado vegetal de los cladodios según el tratamiento correspondiente. A) 10% de agua aprovechable, B) 30% de agua aprovechable, C) 60% de agua aprovechable.

Las muestras de tejido vegetal fueron obtenidas de cladodios de 60 días, sometidas a un estado de deshidratación con acetona (CH_3CH_3) al 100% durante 30 días. Posteriormente, las muestras de tejido fueron impregnadas con resina al 90% y un monómero de estireno (C_8H_8) al 10%. La impregnación se llevó a cabo en una cámara de vacío durante 45 min a 35 lb de tensión, secando durante 15 días posteriores a temperatura ambiente y bajo condiciones de sombra. Una vez seca la muestra se dividió en 5 zonas las cuales fueron tomadas como repeticiones por cada tratamiento (Figura 15). Para definir la localización de los minerales.

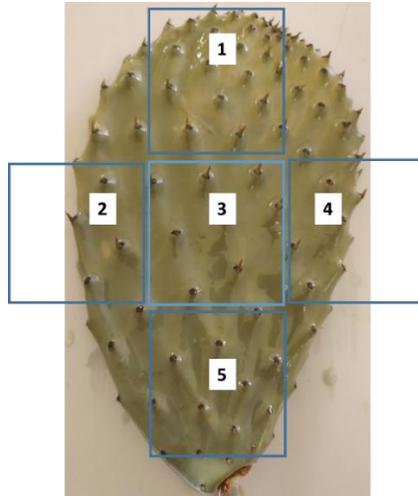


Figura 15. Zona de muestreo en el cladodio.

3.1.1 Construcción del mosaico de alta resolución

El análisis micromorfológico inicia con la captura de microimágenes secuenciales digitales utilizando una cámara como plataforma montada en un microscopio petrográfico (Olimpus BX51) con diferentes fuentes de luz y objetivo 10x; posteriormente fueron creados micro-fotomosaicos de alta resolución espacial, integrados por XXX imágenes.

Todos los procesos para realizar la construcción del micro mosaico fue empleando ERDAS Imagine 2014v® y su vectorización fue usando ArcGIS v.10.1. Los procesos se basaron en la metodología reportada por Gutiérrez-Castorena *et al.* (2016).

Una vez definida el área de 1 cm² en el mosaico original se realizaron los recortes a cada tratamiento (Figura 25). El álgebra de mapas o mapas temáticos se realizaron efectuando acercamientos a microescala de un área de 2.4 mm² (Figura 26).

Primeramente se observó la distribución y definición tanto del tipo de los Oxalatos de Calcio como de Carbonatos de Calcio, seguido del espacios vacíos y residuos de tejidos vegetales. Posteriormente, se clasificaron todos los componentes de la sección delgada sobresalientes para facilitar y evitar la confusión al momento de la clasificación de los diferentes minerales de interés.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Primera Etapa

La captura de micro-fotografías secuenciales con diferentes fases de luz: plana (Figura 16A), polarizada o cruzada (Figura 16B) y con compensador (Figura 16C) fueron utilizadas para construir mosaicos de alta calidad en resolución espacial en los tratamientos a 10 y 30% de agua disponible (Figura 16 y 17).

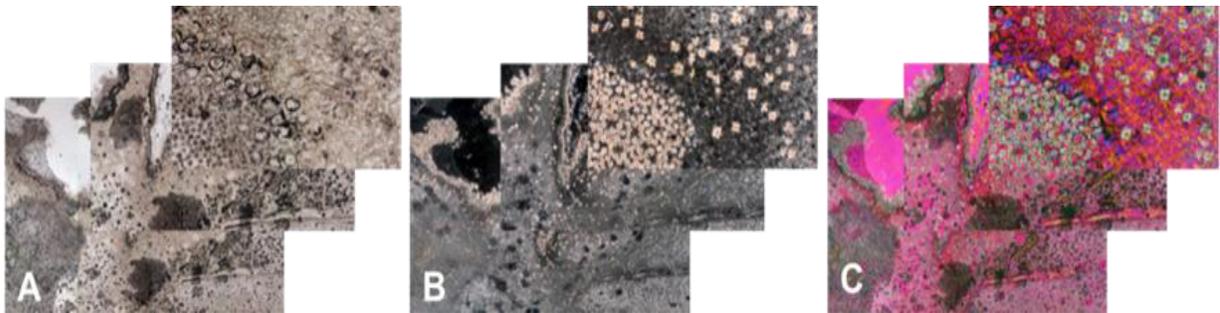


Figura 16. Tratamientos a 10% de agua disponible; mosaicos de 169 mm² con altura focal de 3.08 mm². A) Luz plana; B) Luz polarizada o cruzada; y C) Luz compensada.

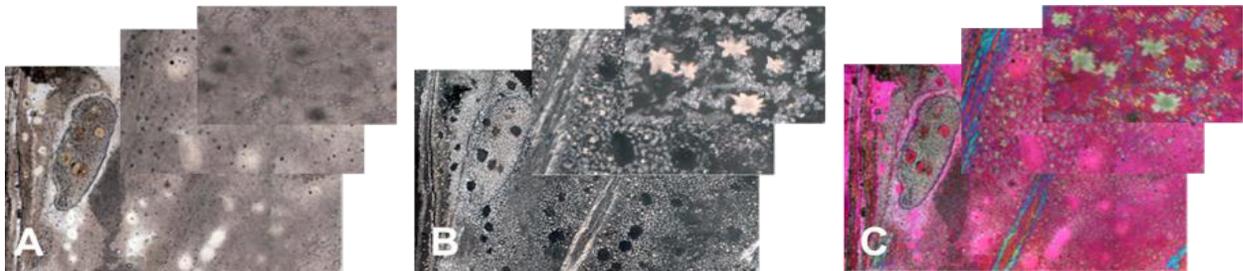


Figura 17. Tratamiento a 30% de agua disponible. Mosaicos de 169 mm²; acercamiento de 3.08 mm². A) Luz plana; B) Luz polarizada cruzada; y C) Luz polarizada cruzada con compensador.

Los mosaicos se componen de 117 micro fotografías secuenciales que representan una superficie de 369 mm², donde se pueden realizar acercamientos hasta 3.08

mm². Además, el uso de diferentes fuentes de luz (polarizada y con compensador) facilita la observación de los cristales de oxalato de calcio (drusas) (Figura 18) y carbonatos (calcitas) Figura 19.

La Figura 18 muestra una drusa incolora y transparente **A**); Drusa a luz polarizada **B**) presenta en RGB valores de 225, 218 y 232 respectivamente, mientras que en luz polarizada cruzada **C**) reporta valores de RGV de 213, 215 y 226 respectivamente. Estos resultados coinciden con Barcenás *et al.* (2017) quienes observaron drusas de oxalato de calcio en *Cephalocereus* (Cactaceae), además mencionan que los cristales tienen un núcleo opaco rodeado por un concéntrico marrón oscuro halo, y hacia el exterior, un material transparente con PPL y una birrefringencia de tercer orden con XPL.



Figura 18. Cristales de oxalato de calcio (**Drusas**) con tres fuentes de luz. A) Luz plana; B) Luz polarizada o cruzada; y C) Luz polarizada cruzada con compensador.

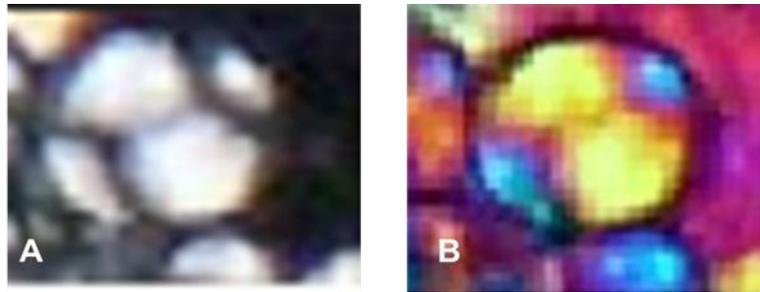


Figura 19. Carbonatos de calcio (**Calcita**) con dos fuentes de luz. A) Luz polarizada o cruzada; y B) Luz polarizada cruzada con compensador.

Más aun, la metodología ofrece la medición precisa de los minerales debido a que el proceso se encuentra en capos visibles reales, dando como resultado una diferencia significativa entre los tamaños de los oxalatos de calcio de los tratamientos de 10 y 30% de agua disponible (Figura 20) con diámetros entre 5.9 y 11.11 μm respectivamente, y los carbonatos de calcio entre 1.4 y 2.2 μm (Figura 21).

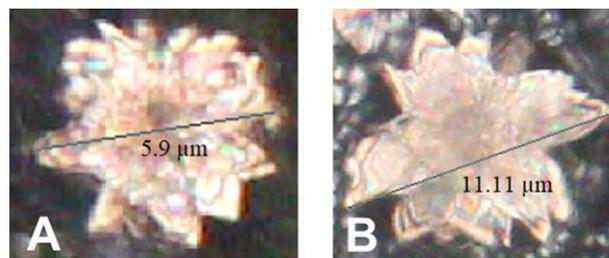


Figura 20. Diámetros de Oxalatos de calcio a 10 y 30% de agua disponible.

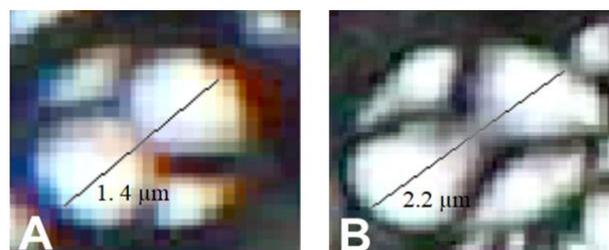


Figura 21. Diámetros de Carbonatos de calcio a 10 y 30% de agua disponible.

Los resultados demuestran que por cada carbonato de calcio se origina un oxalato de calcio por proceso de estrés hídrico (Figura 22) al ser observado en mosaicos con diferentes fuentes de luz sobre el microscopio petrográfico y barrido electrónico (Figura 23 y 24).

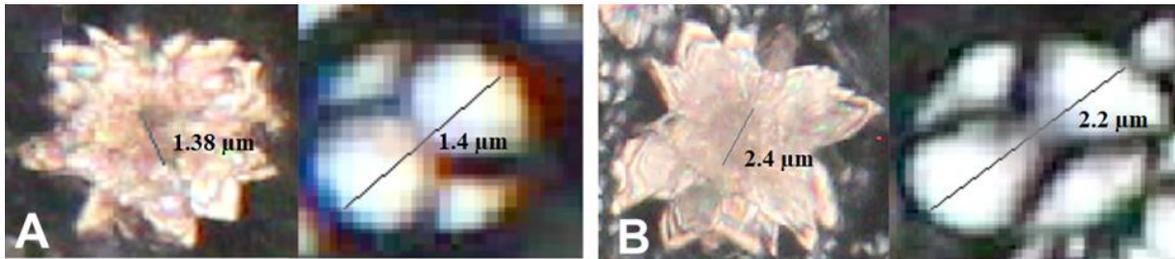


Figura 22. Comparación de tamaños entre los núcleos de oxalatos de calcio y carbonatos de calcio a 10 y 30% de agua disponible (A y B) respectivamente. A) Núcleo del oxalato de 1.38 μm y carbonato 1.4 μm ; y B) Núcleo del oxalato de 2.4 μm y carbonato 2.2 μm .

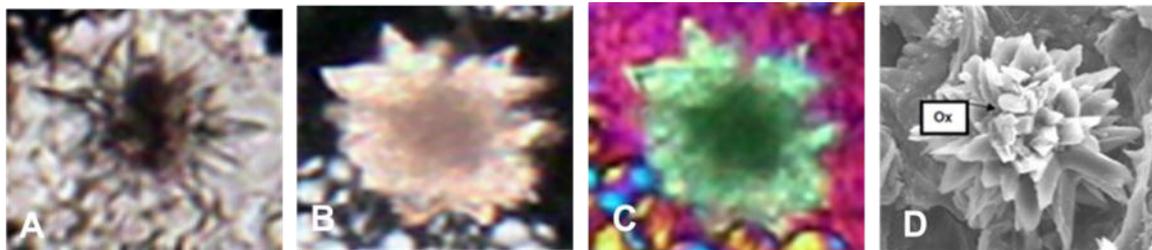


Figura 23. Comparación entre imagen del oxalato de calcio en microscopio petrográfico y barrido electrónico. A) luz plana; B) luz polarizada o cruzada; C) luz compensada; y D) barrido electrónico por McCoonn y Nakata (2004).



Figura 24. Comparación entre imágenes de carbonato de calcio y de barrido electrónico. A) Luz polarizada; B) luz compensada; y C) barrido electrónico por McCoonn y Nakata (2004) sistema triclinico de los carbonatos de calcio.

La comparación de medias entre muestras representativas de los tratamientos de 10 y 30% de A.D (Cuadro 5) reporta que los tamaños de oxalatos son significativamente mayores a los carbonatos de calcio con un diámetro de 71.39 μm .

Cuadro 5. Comparación de medias entre diferentes tipos de minerales de los tratamientos de 10 y 30% de agua disponible.

Tratamiento	Diámetro de oxalatos de calcio (μm)	Diámetro de carbonato de calcio (μm)	Diámetro del núcleo del oxalato de calcio (μm)
10%	37.63	19.15	20.04
30%	71.39	20.86	24.05

4.2 Segunda Etapa

La Figura 25A muestran la secuencia de fotografías y recorte de a centímetro cuadrado sobre la Sección Delgada (SD) de la muestra inalterada del cladodio a luz plana. La SD del centímetro fue expuesta a diversos tipos de fuente de luz como: plana, cruzada y compensada (Figura 25b, c y d) con la finalidad de poder visualizar y caracterizar tanto los oxalatos como los carbonatos de calcio, en la Figura 25 B correspondiente a la luz plana no es posible observar cristales de oxalato ni de calcio, debido a que la luz pasa atreves de ellos sin ninguna frecuencia que lo retarde evitando que los minerales sean distinguibles a otros componentes (espacio Vegetal, espacio poroso). Mientras que la Figura 25 C muestra imágenes con luz polarizada

que define forma y tamaño del mineral que es travesado por esta luz, por último la Figura 25 D muestra imágenes con luz polarizada más compensada, donde define tejido vegetal, espacio poroso y agentes contaminantes (resina mal impregnada) y minerales.

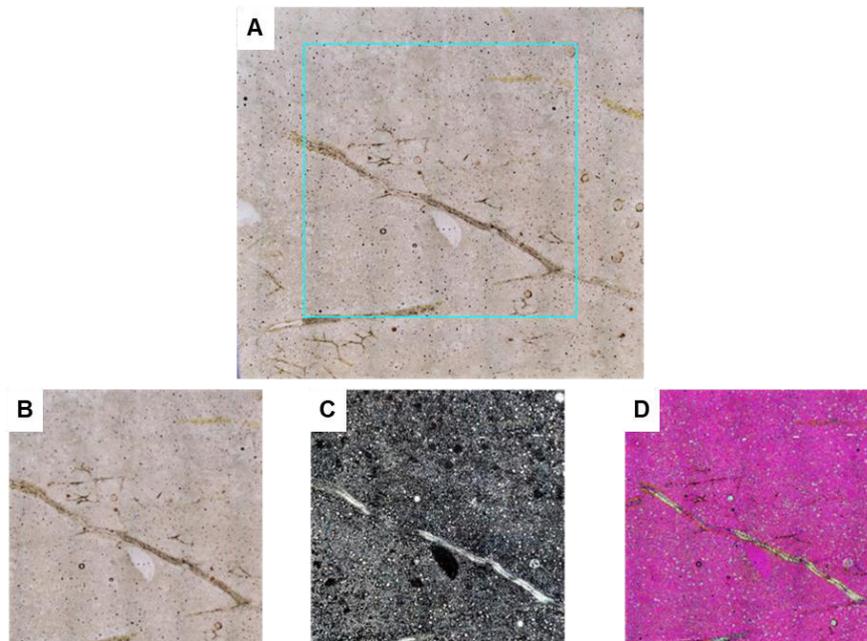


Figura 25. Mosaicos entre componentes del tejido vegetal en una superficie de un centímetro cuadrado. A) luz plana, B) luz plana, C) luz cruzada, y D) luz polarizada.

La ampliación visual de los mosaicos fue requerida para (Figura 26 d, e y f) confirmar que los minerales caracterizados son los correspondientes a oxalatos y carbonatos de calcio, posteriormente Estos mosaicos fueron procesados para separar los componentes y generar mapas temáticos tanto de oxalatos como de carbonatos..

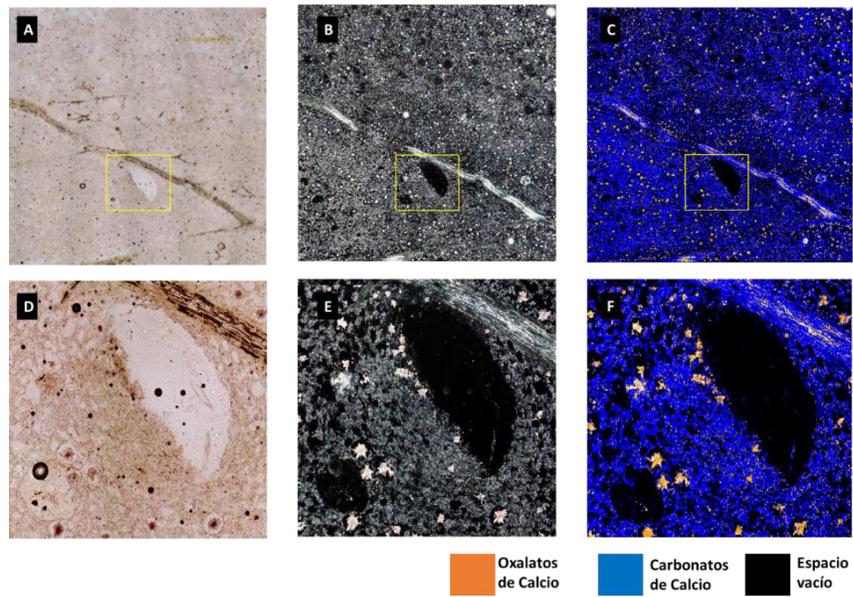


Figura 26. Mapas temáticos de componentes en tejido vegetal a campo visible real de 1 cm². A) luz plana, B) luz cruzada y C) mapa temático de minerales. Ampliación del mosaico representando a una superficie de 2.4 mm² en figuras D, E, F.

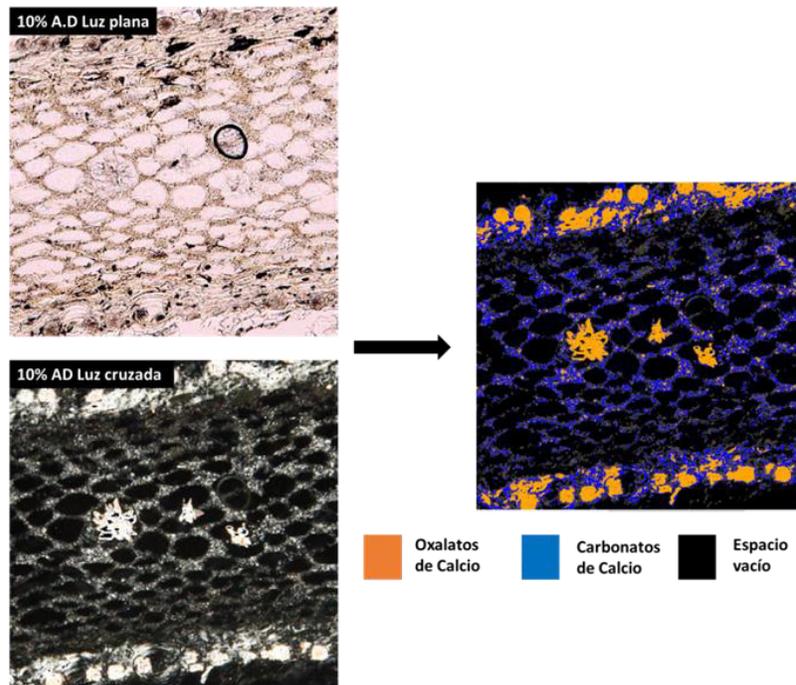


Figura 27. Mapas temáticos de oxalatos de calcio en tejido vegetal a 10% de agua disponible en luz plana y luz cruzada.

Los oxalatos de calcio se sintetizan en las células mucilaginosas del nopal al concentrar la mayor cantidad de ácidos orgánicos e inorgánicos sobre el cloroplasto en forma de weddellita tetragonales (forma de estrella). Por otra parte, los carbonatos de calcio se distribuyen sobre la pared celular debido al movimiento del calcio dentro de la planta de forma pasiva (Rodríguez *et al.*, 2007). Todos los cristales de carbonato de calcio son micríticos lo que indica una precipitación rápida por cambios en el CO_2 y los cristales de oxalatos son más grandes lo que implica un desarrollo lento este fenómeno de desarrollo o atribuye al estado de hidratación del cladodio y al tiempo de maduración del mismo debido a la concentración de ácidos málico y ascórbico.

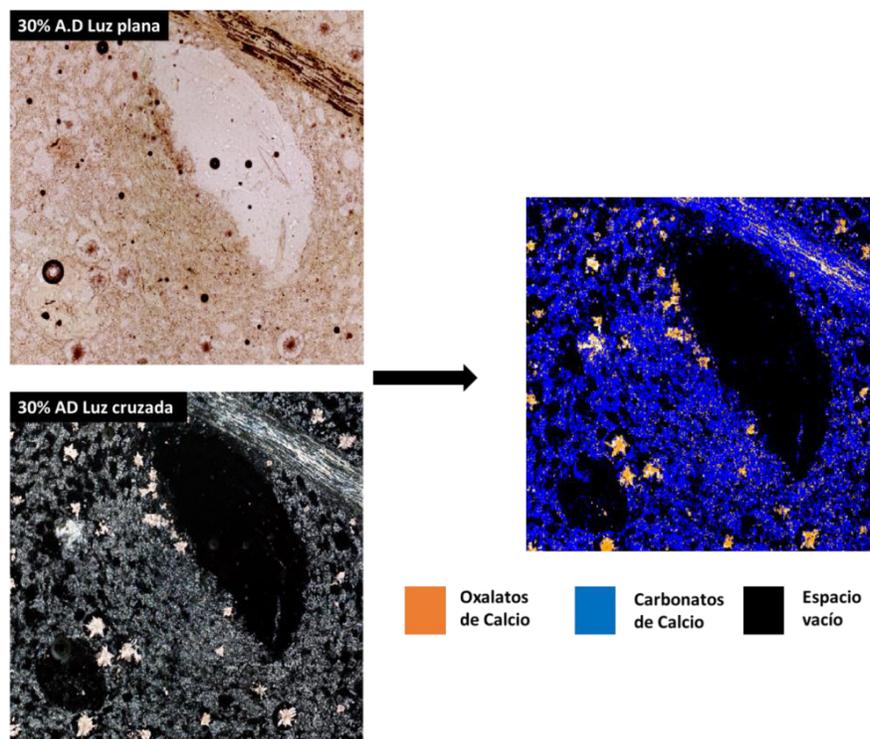


Figura 28. Mapas temáticos oxalatos de calcio en tejido vegetal a 30% de agua disponible con la luz plana y luz cruzada.

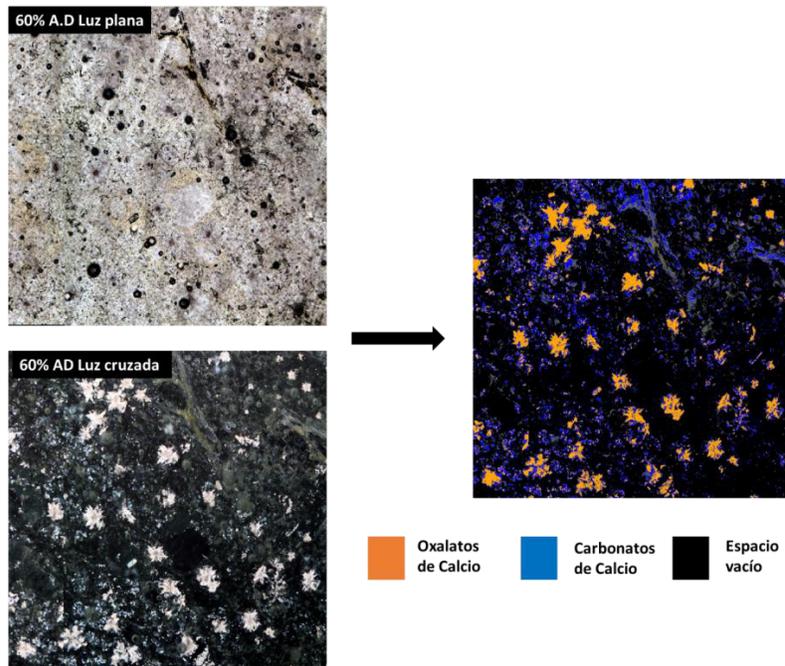


Figura 29. Mapas temáticos de oxalatos de calcio en tejido vegetal a 60% de agua disponible sobre luz plana y luz cruzada.

Siguiendo la metodología de Gutiérrez-Castorena *et al.* (2016), una vez terminado el álgebra de mapas se realizó una clasificación supervisada para separar los minerales obteniendo polígonos o capa de vectores de Oxalatos y carbonatos de calcio (Figuras 28, 29 y 30) y lograr la cuantificación y localización sobre las estructuras vegetales del cladodio.

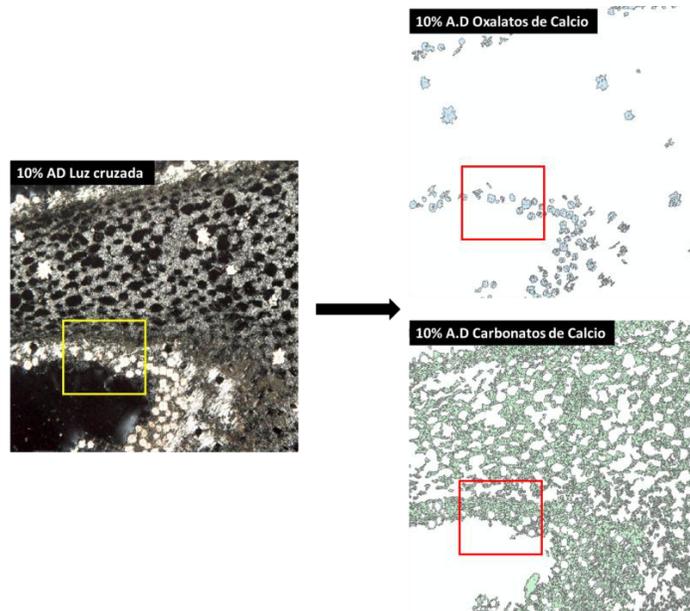


Figura 30. Mapas temáticos de Oxalatos de calcio y Carbonato de Calcio en tejido vegetal a 10% de agua disponible en luz cruzada y extracción vectorial de polígonos.

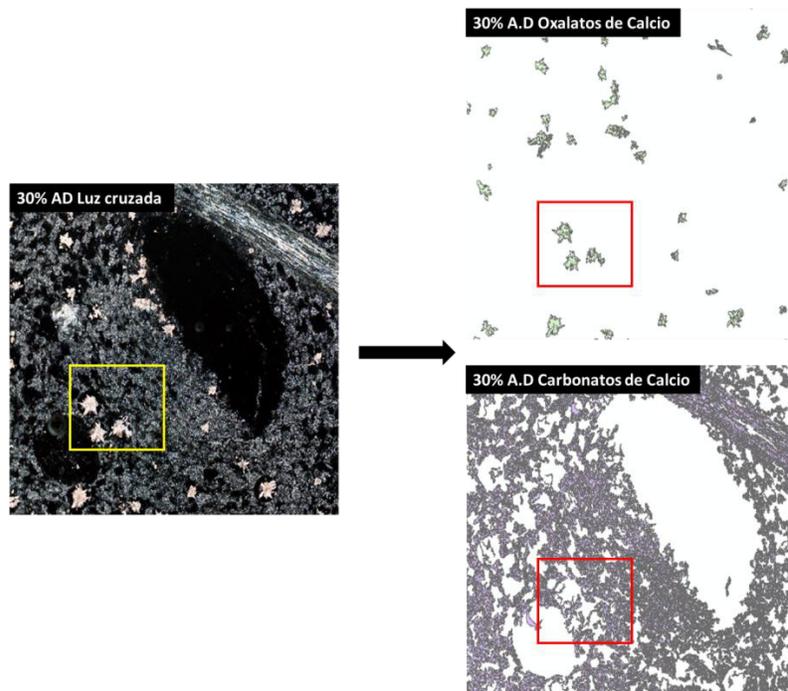


Figura 31. Mapas temáticos de Oxalatos de Calcio y Carbonato de Calcio en tejido vegetal a 30% de agua disponible.

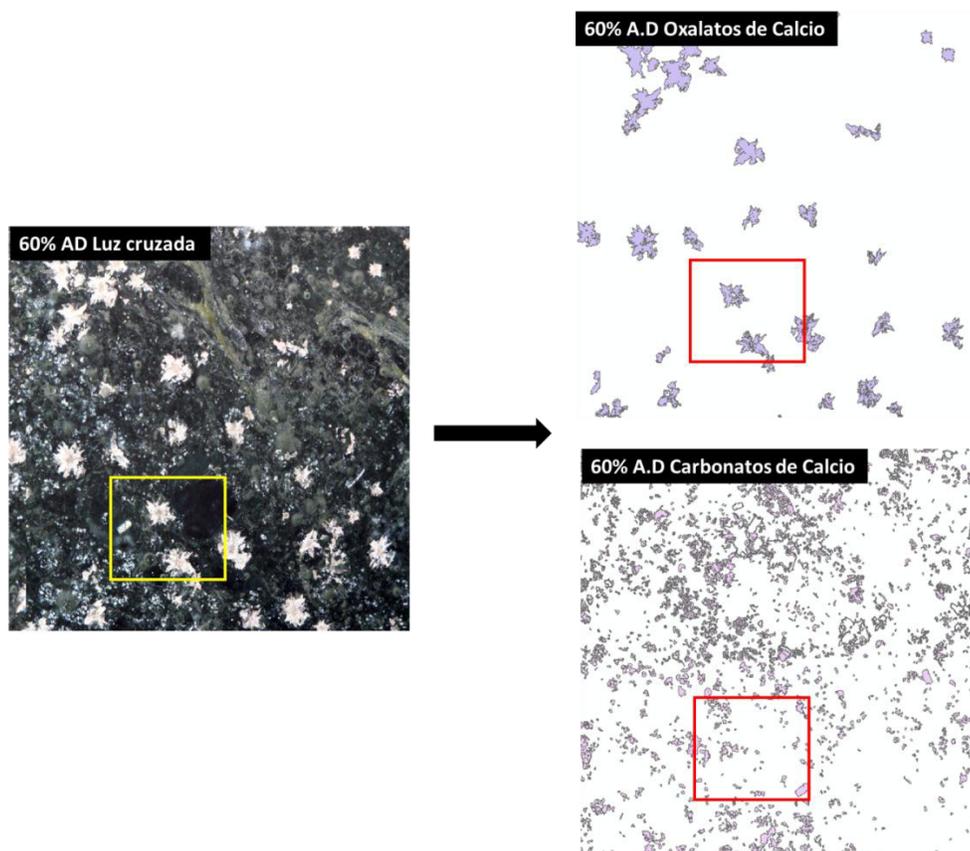


Figura 32. Mapas temáticos Oxalatos de Calcio y de Carbonatos de Calcio en tejido vegetal a 60% de agua disponible en luz cruzada con extracción de polígonos.

Una vez realizado la vectorización y aislamiento por separado de oxalatos y carbonatos de calcio se obtuvo el área ocupada de cada uno de ellos por muestra y demostrar que el estrés hídrico influye en su formación (Tamaño y distribución), y ubicación en la zona del cladodio donde se concentra con mayor frecuencia los minerales de interés (Figura 32).

Los gráficos de la Figura 33 muestran los tratamientos de agua disponible a los que fueron sometidos los cladodios. El análisis de varianza (cuadro 6) de polígonos de oxalato de calcio reportó una diferencia significativa ($P = .002$) entre tratamientos. La

Figura 33 muestra los polígonos de oxalatos de calcio, donde se observar que a **10%** de agua disponible la concentración es mayor (6409.4)

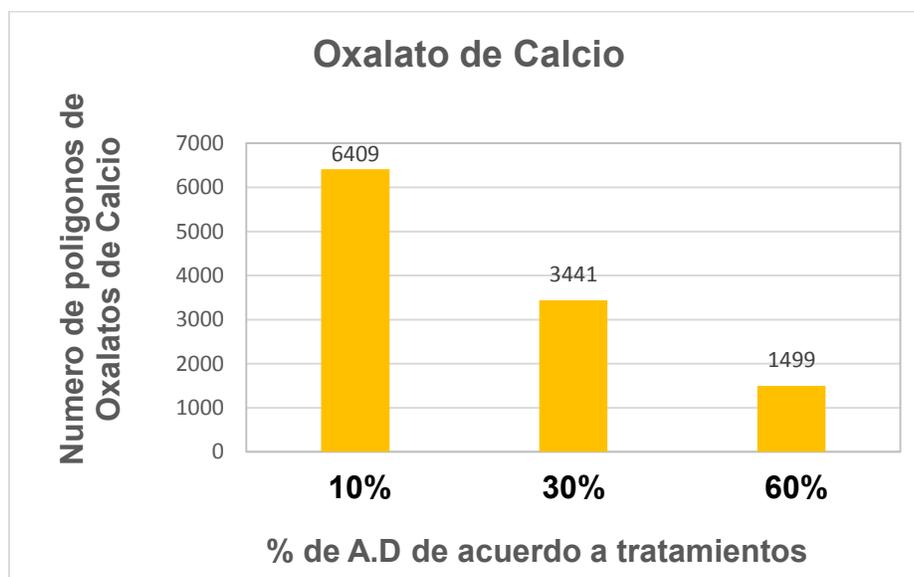


Figura 33. Frecuencia de Oxalatos de calcio a diferente estrés hídrico del cladodio.

Cuadro 6. Prueba de los efectos entre los diferentes tratamientos de A.D para la presencia de Oxalatos de Calcio.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	96478580.933 ^a	6	16079763.489	8.226	.004
Intersección	214711733.400	1	214711733.400	109.843	.000
repeticion	35331100.933	4	8832775.233	4.519	.033
tratamientos	61147480.000	2	30573740.000	15.641	.002
Error	15637736.667	8	1954717.083		
Total	326828051.000	15			
Total corregida	112116317.600	14			

a. R cuadrado = .861 (R cuadrado corregida = .756)

La Figura 34 representa los gráficos del tratamiento a **10%** de agua disponible por zona del muestreo sobre el cladodio y su la cuantificación de polígonos de oxalatos

de calcio. Aunque no existió diferencia significativa estadísticamente se encontró mayor presencia de oxalatos de calcio en la zona 4 como lo muestra el gráfico.

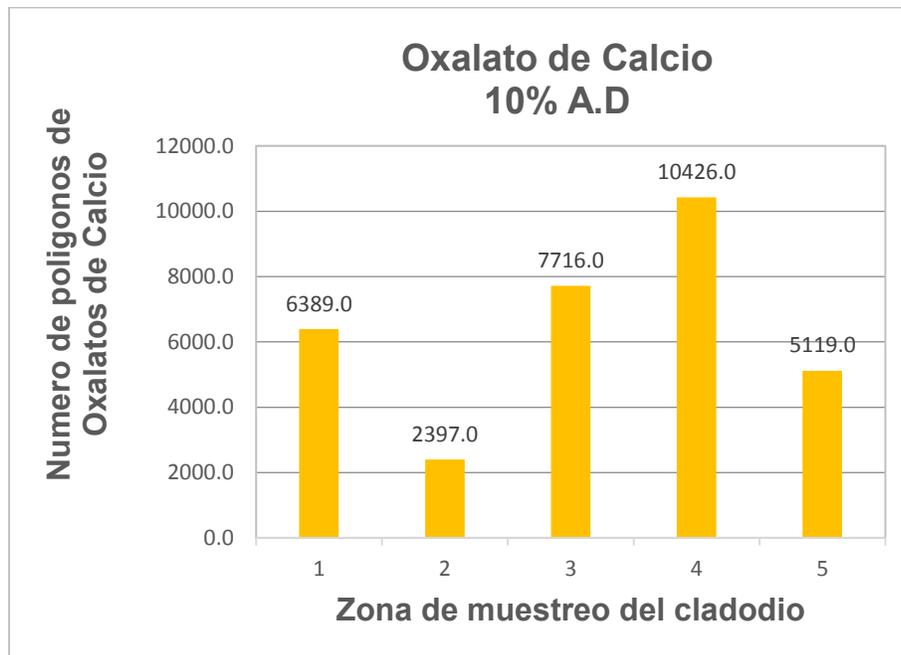


Figura 34. La gráfica muestra el tratamiento 10% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando.

La Figura 35 muestra los gráficos del tratamiento a **30%** de agua disponible por zona del muestreo del cladodio, cuantificando el área ocupada por los minerales descritos. Aunque no existió diferencia significativa estadísticamente se encontró mayor presencia de oxalatos de calcio en la zona 4, como lo muestra el gráfico.

Por otra parte, se puede observar en la Figura 36 que corresponde al **60%** de agua disponible, se presentó mayor presencia de oxalatos de calcio en la zona 3 como lo muestra el gráfico. Lo anterior indica que el centro del cladodio es donde se observa

la mayor concentración de oxalatos de calcio, lo cual no existen reportes de otros autores.

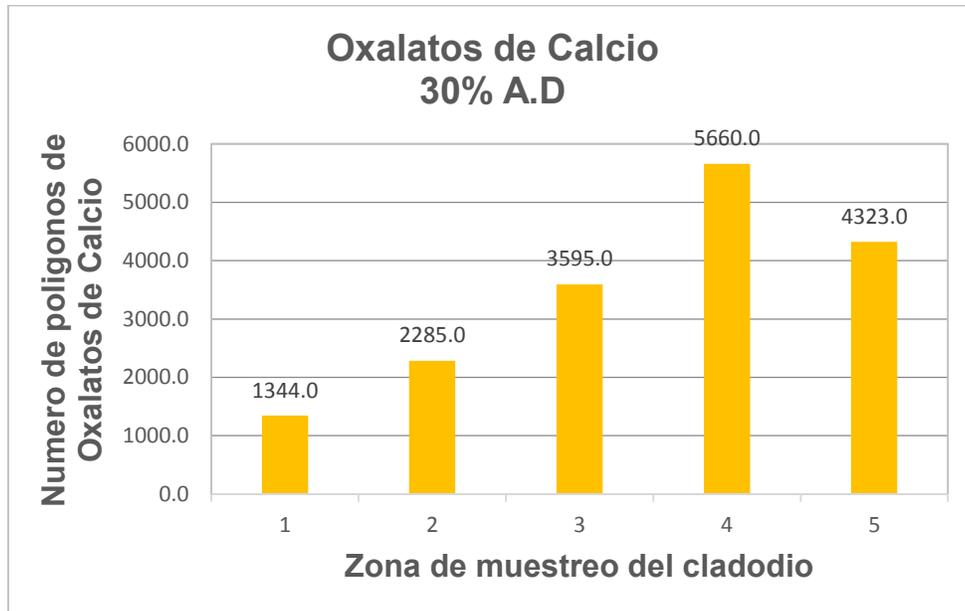


Figura 35. La grafica muestran el tratamiento 30% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando el área ocupada por los minerales descritos.

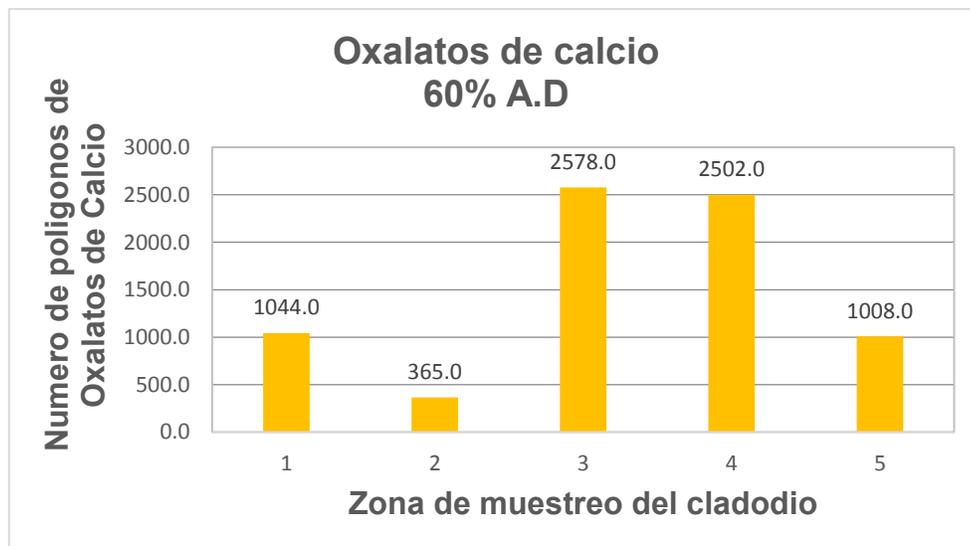


Figura 36. La grafica muestran el tratamiento 60% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando el área ocupada por los minerales descritos.

Los gráficos de la Figura 37 muestran los tratamientos de agua disponible a los que fueron sometidos los cladodios. El análisis de varianza (cuadro 7) de la concentración de carbonato de Calcio en mg/cm^3 reporto una diferencia significativa ($P= .002$) entre tratamientos. La Figura 37 muestra la concentración de carbonato de calcio en mg/cm^2 , donde se observar que a **60%** de agua disponible la concentración es mayor (206.5).

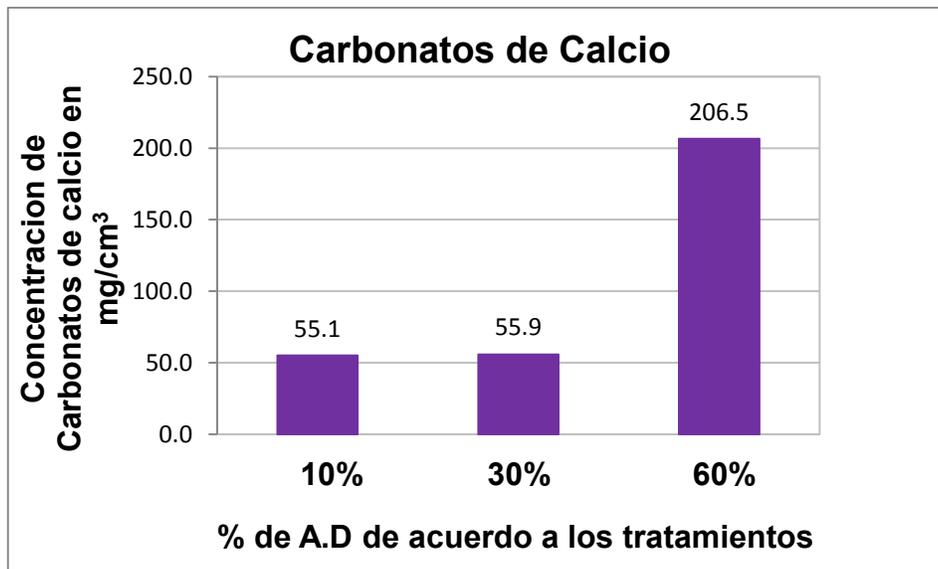


Figura 37. Concentración en mg/cm^2 de Carbonatos de Calcio y carbonatos de calcio a diferente estrés hídrico del cladodio.

Cuadro 7. Prueba de los efectos entre los diferentes tratamientos de A.D para la concentración de Carbonatos de Calcio.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	76034.401 ^a	2	38017.200	5.432	.021
Intersección	167987.021	1	167987.021	24.002	.000
TRATAMIENTO	76034.401	2	38017.200	5.432	.021
Error	83985.506	12	6998.792		
Total	328006.928	15			
Total corregida	160019.907	14			

a. R cuadrado = .475 (R cuadrado corregida = .388)

La Figura 38 representa los gráficos del tratamiento a **10%** de agua disponible por zona del muestreo sobre el cladodio y la concentración de carbonatos de calcio. Aunque no existió diferencia significativa estadísticamente se encontró mayor presencia de oxalatos de calcio en la zona 1 como lo muestra el gráfico.

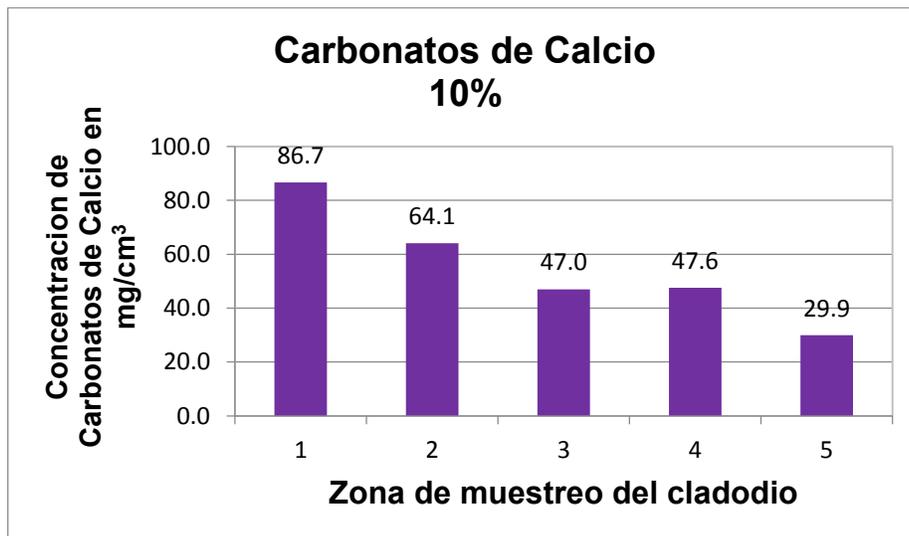


Figura 38. La gráfica muestra el tratamiento 10% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando.

La Figura 39 muestra los gráficos del tratamiento a **30%** de agua disponible por zona del muestreo del cladodio, cuantificando la concentración ocupada por los minerales descritos. Aunque no existió diferencia significativa estadísticamente se encontró mayor presencia de oxalatos de calcio en la zona 4, como lo muestra el gráfico.

Por otra parte, se puede observar en la Figura 40 que corresponde al **60%** de agua disponible, se presentó mayor presencia de carbonatos de calcio en la zona 4 como lo muestra el gráfico. No obstante el grafico muestra un desenso importante en la zona 3 indicando que el centro del cladodio es donde se observa la menor concentración de Carbonatos de Calcio, lo cual no existen reportes de otros autores.

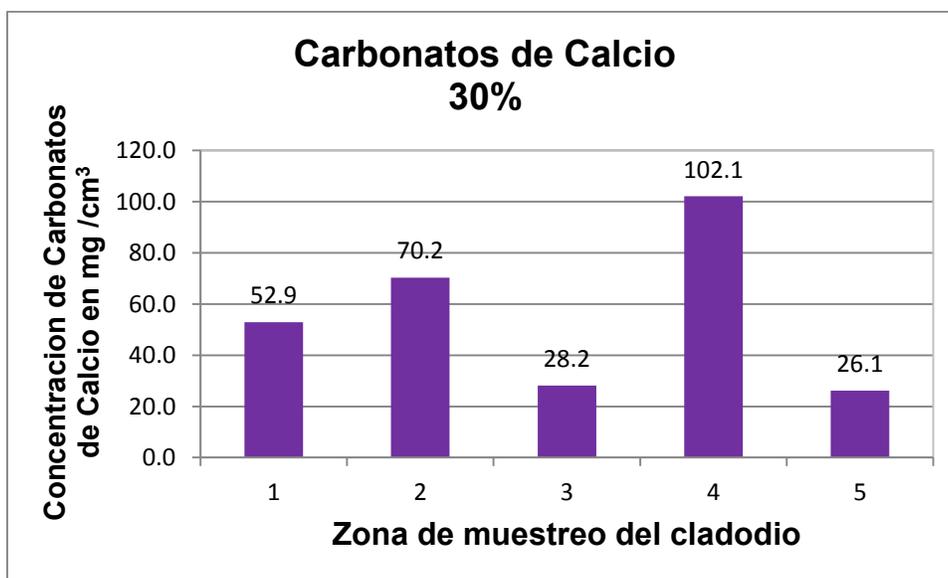


Figura 39. La gráfica muestra el tratamiento 30% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando.

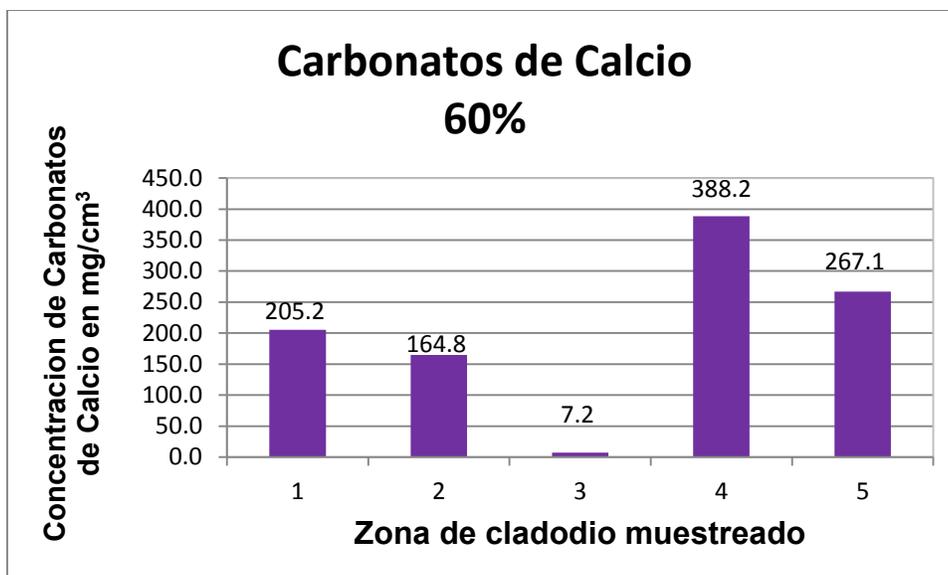


Figura 40. La gráfica muestra el tratamiento 60% A.D por zona del cladodio muestreado cuantificando.

Las diferentes técnicas que se han utilizado para caracterizar cristales de oxalato de calcio como: análisis químicos, difracción de rayos X, petrografía, microscopio electrónico de barrido solo han caracterizado debido a que son destructivas (tejido vegetal). No obstante, el uso de la micromorfometría en secciones delgadas en muestras *in situ* obtiene la cuantificación real sobre tejidos vegetales e identificación de los minerales como oxalato y carbonato de calcio reportados por varios autores (Jauregui *et al.*, 2003; Monje y Baran 2003; Moje y Baran 2009; Barcenás *et al.*, 2017)

5 CONCLUSIONES

1) En cuanto a la hipótesis planteada sobre el estrés hídrico y su efecto en la formación de oxalatos de calcio en nopal se concluye que el estrés hídrico inhibe, y promueve el tamaño, cantidad y forma de los oxalatos y carbonatos de calcio presentes en nopales de 60 días que son afectados de acuerdo con el nivel de estrés hídrico que se someta dentro de las estructuras vegetales de nopal verdura.

2) La identificación y caracterización de muestras inalteradas en cladodio con diferente estrés hídrico fue posible usando técnicas de análisis con parámetros dicromofométricos y densitométricos, determinando la correlación existente entre los núcleos y observando que por cada oxalato existe un carbonato de calcio no disponible. Además, con el método propuesto se puede utilizar para cuantificar *in situ* minerales en tejidos vegetales como en este caso donde se utilizaron muestras inalteradas de nopal, donde se requiere la superposición entre imágenes.

6 LITERATURA CITADA

Aguilar B. G., Peña V. C. B. 2006. Alteraciones fisiológicas provocadas por sequía en nopal (*Opuntia ficus-indica*). Rev. Fitotec. Mex. Vol. 29 (3): 231 – 237.

Aguilar B. G. 1991. Experiencias en la producción de nopal (*Opuntia spp.*) en el área de Chapingo México. Sociedad Mexicana de Fitogenética. Germen 10:8-9.

Álvarez, B. 2007. Análisis de Factibilidad del cultivo de la Tuna en la localidad del caño, Departamento la Paz. pag: 6-8. Dirección provincial de programación del Desarrollo, Argentina. Obtenido de <http://documents.mx/documents/19-analisis-de-factibilidad-del-cultivo-de-la-tuna-en-la-localidad-de-icano.html#>.

Anderson, E. F. 2001. The Cactus Family. Timber Press, Oregon, USA. pp 776.

Anrrango, A. 2012. Elaboración de mermelada dietética apta para personas diabéticas utilizando mezcla de penca de nopal (*Opuntia ficus indica*) y fresa (*Fragaria vesca* L.). *Tesis de Grado*. Ibarra, Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Escuela de Ingeniería agroindustrial, Ecuador: Retrieved from repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/2051.

Baran E.J. 1995. Química Bioinorgánica. McGraw Hill Interamericana de España S.A., Madrid, pp 197–212.

Basurto-Santos, D. L. J. G. 2006. Utilidad del nopal para el control de la glucosa en la Diabetes Mellitus tipo 2. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 4.

Blum A. 1997. Constitutive traits affecting plant performance under stress. *In: Developing Drought- and Low N- Tolerant Maize*. G O Edmeades, M

Bänziger, H.R. Mickelson, C B Peña-Valdivia (eds). Proc of a Symposium, March 25-29, 1996, CIMMYT, México, D.F.: pp:131-135.

Born, M. ;Wolf, E.;1980, Principles of Optics. 6 ed. Elmsford, N.Y.: Pergamon ress.

Britton, N. L. y J. N. Rose. 1963. The Cactaceae: description and illustrations of plants of the cactus Family. New York, USA.

Celis, E. F. 2009. Potencial nutraceutico del nopal. (Tesis de maestria)., Universidad de Queretano, Facultad de Química, Queretano, Mexico. Obtenido de <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:m6JvBSerlCkJ:ri.ua.g.mx/handle/123456789/2576+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=ec>

Bravo, H. 1978. Las Cactáceas de México. 2ª Ed. Vol. 1. UNAM, México. pp. 775

Bouropoulos, N.; Addadi L y Weiner, S. 2001 Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: Morphology and in vitro interactions of crystal-associated macromolecules. Chem Eur J 7: 1881-1888.

Bronner, F. and D. Pansu. 1999. Nutritional aspects of calcium absorption. *Journal of Nutrition*. 129:9-12.

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.

Corrales, J. 2000. Tendencias actuales y futuras en el procesamiento del Nopal y Tuna., Centro de Investigaciones económicas, sociales y tecnológicas de la Agricultura y la Agroindustria mundial, Primera Edición., Universidad Autónoma de Chapingo, México. Obtenido de http://www.researchgate.net/profile/Joel_Corrales_Garcia/publication/258631

- Delly, J.G.; 2008, Essentials of Polarized Light Microscopy, College of Microscopy.
- Demming, B.; K. Winter.; A Kruger, C.; Franz-Christian. 1988 Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of light and water stress. *Plant Physiol.* 87:17-24.
- Douglas, B. M. y Davidson, M. W. 2012. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging, 2nd Edition. Wiley-Blackwell.
- Fairweather Tait, S.M. 2007. Calcium bioavailability in relation to bone health. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research.* 72: 13-18.
- Franceschi, V. R. y Horner, H. T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Bot Rev* 46: 361-427.
- Franceschi, V. R. y Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56: 41-71.
- Franceschi, V. R. y Horner, H. T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *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.
- Gallo, G. G. 1987. Plantas Tóxicas para el Ganado en el Cono Sur de América. 2 ed. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- 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.

Guzmán Loayza Deysi.; C. J. 2007. Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Scielo Peru*, 2-4. Obtenido de Revista de la sociedad Química de Perú: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2007000100005

Heaney, R. P. 2001. Meta-analysis of calcium bioavailability. *Am. J. Therapeutics*. 8:73-78.

Háuad-Marroquín, L. A. 2010. Utilización del nopal y otras cactáceas. *Salud Pública y Nutrición*, 180-184.

Horner, H. T. y Wagner, B. L. 1995. Calcium oxalate formation in higher plants. En: Calcium oxalate in biological systems. Editor: Khan S R CRC Press Boca Raton Fl. pp 53-72.

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 vinifera*. *J. Plant Physiol*. 160:239-245.

Kameo, K. y Furukawa, N. 2007. Analysis of crystallographic directions in, *Braarudosphaerabigelowii* and Neogene discoasters: preliminary report on nanolith crystallography

Kensuke, N.; Shu-Chen, H.; Yoshiki, C. *Langmuir* 2006 7760-7767

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.

- Kostman, T. A.; Tarlyn, N.; Foewus, F.; Franceschi, V. 2001. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbonos 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant physiol* 125:634-640
- Kostman, T. A. and Franceschi, V. R. 2000. Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. *Protoplasma*214: 166-179.
- Li, Y.; Onasch, C. M.; Guo, Y. 2008. GIS-based detection of grain boundaries. *J. Struct. Geol.* 30:431-443.
- Ludwing, G.; Matthews, M. A. 1993. Reversibility of drought induced chloroplast degradation in maize. *Plant Physiol.* 102:155-158.
- Mann, S. 1989. Crystallochemical Strategies in Biomineralization. In S Mann, J Webb, RJP Williams, eds, *Biomineralization*. VCH Publishers, New York, pp 35–62.
- Mazen, A. M. y Maghraby, O. M.1998. Accumulation of Cadmium, lead and Strontium and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. *Biol Plantarum* 40: 411-417
- 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
- Meenakshi, V. R.; Hare, P. E.; Wilbur, K. M. 1971. Amino acids of the organic matrix of neogastropod shells. *Com Biochem Phys B* 40: 1037-1043.
- Méndez, G. de J. 2010. El nopal en la producción de Biocombustibles. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN)*(5), 65-85.

- Molano-Flores, B. 2001. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Ann Bot London* 88: 387-391.
- Monje, P. V. and Baran, E. J. 2002. Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in Cacti. *Plant Physiology*.
- Monje, P. V. and Baran, E. J. 2009. Characterization of calcium oxalate biominerals in *Pereskia* species (Cactaceae). *Z. Naturforsch.* 64:763-766.
- Nefzaoui, A. y Ben Salem, H. 2003. *Opuntia* forraje estratégico y herramienta eficiente para combatir la desertificación en la región Wana. En: Mondragón-Jacobo, L. y S. Pérez-González. (Eds.). *El Nopal (Opuntia spp.) como forraje*. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal 169. FAO, Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s0c.htm#BM12>. Consultado el 15 de noviembre de 2015.
- Nobel, P. S. 1995. Environmental biology. En: Barbera G., P. Inglese y E. Pimienta-Barrios (Eds.). *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO Plant and Protection Paper 132.
- Nobel, P. 2003. *Ecofisiología de Opuntia ficus indica*. In C. Mondragon-Jacobo, & S. Perez-Gonzales. Obtenido de *El Nopal (Opuntia spp) como forraje* (pp. 17-25). Roma, Italia: Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentacion (FAO): <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s00.htm>
- Orona Castillo, I.; Cueto Wong, J.; Murillo Amador, B.; Santamaría C.; Flores Hernández, A.; Valdez Cepeda, R.D.; García-Hernández, J.L.; Troyo Dieges, E. 2004. Extracción Nutrimental de Nopal-Verdura Bajo Condiciones de Riego por Goteo México. [En línea] disponible en

http://www.jpccd.org/downloads/vol.6/v6_7pdf.(Revisado el 18 de agosto del 2010).pp.99-101

Parraga, E. 2015. Formulación de dos presentaciones artesanales de conserva vegetal a base de Nopal (*Opuntia ficus indica*) y evaluación de su capacidad antioxidante. *Tesis de grado*. Guayaquil, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas, Ecuador: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/9044>.

Perez, M. 2013. Historia del uso de Opuntia como forraje en México, Departamento de Agricultura, Depósito de documento de la FAO. Universidad Autónoma de Chapingo, México. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s05.htm>

Pérez-Pérez, G. 2015. Oxalatos. http://www.oxalato.com/cido_oxlico. Guillermo Pérez. Publicado bajo licencia CC BY-SA 3.0.

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.

Quiguango, W. 2011. "Utilización de la penca de Nopal (*Opuntia ficus indica*), para la elaboración de jugo". *Tesis de grado*. Ibarra, Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Ecuador: <repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/379>. Ecuador: <repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/379>.

Rajendra, P. and Yashbir, S. S. 2017. Oxalic acid/oxalates in plants: from self-defence to phytoremediation. Division of Agronomy, ICAR -Indian Agricultural Research Institute, New Delhi 110 012, India.

- Reynolds, S. G. y E. Arias-Jimenez. 2003. En: Mondragón-Jacobo, L. y S. Pérez-González. (Eds.). El Nopal (*Opuntia* spp.) como forraje. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal 169. FAO, Roma, Italia.
- Rodríguez-Fragoso. 2014. Producto naturales química e investigación. Cactus (*Opuntia ficus-indica*): Una revisión de sus antioxidantes y propiedades potencial farmacológico uso en enfermedades crónicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Biológicas y Químicas. Obtenido de <http://www.esciencecentral.org/journals/cactus-opuntia-ficusindica-a-review-on-its-antioxidants-properties-2329-6836.1000153.php?aid=33317>
- Ruiz, N.; Ward, D. y Saltz, S. 2002. Calcium oxalate crystals in leaves of *Pancreaticum sickenbergeri*: constitutive or induced defense? *Funct Ecol* 16: 99-105.
- Saenz, C. H. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Obtenido de Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO N° 162. Roma: <http://www.fao.org/3/a-a0534s.pdf>
- SAGARPA-SIAP. 2015. Anuario estadístico de la Producción Agrícola. Ciclo: cíclicos y perenes 2013. Modalidad: riego + temporal. México. <http://www.siap.gob.mx/>. Consultado el 15 de noviembre de 2015.
- Simon R, Payne, Mary Heppenstall-Butler, Michael F. *Cryst Growth* 7 (2007) 1262-1276
- Steudle, E. 2000. Water uptake by roots: effect of water deficit. *J. Exp. Bot.* 51:1531-1542.
- Stinzing-Florian, C. F. 2006. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience*, 11. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720335>

- Sudzuki, F. 1999. Anatomía y Morfología. En *Agroecología, cultivos y usos del nopal* (págs. 29-36). Roma: Barbera.
- Tarquini, S. and Favalli, M. 2010. A microscopic information system (MIS) for petrographic analysis. *Computers Geosc.* 36:665-674.
- Tolken, H. R. 1977. A Revision of the Genus *Crassula* in Southern Africa. Contributions from the Bolus Herbarium. Cambridge University Press. UK. pp:1-200.
- Torres-Sales, A. 2010. Sistemas de producción de nopal forrajero en Brasil. VIISimposium-Taller Nacional y Ier Internacional "Producción y Aprovechamiento del Nopal". RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial No. 5:57-69.
- Tovar Puente, A.; Pando Moreno, M. H.; González Rodríguez, L.; Morales, S. y Méndez Gallegos, J. 2008. Relación entre producción de gana (*dactylopiuscoccus* Costal) (*Homoptera Dactylopidae*) y variables físicas y químicas del hospedante. *In: Grana cochinilla y colorantes naturales.* Llanderal C., D. H Zetina, A.L Viguera y L Portillo (Eds.). Colegio de posgraduados. México. pp 62-66.
- Velasquez, E. 1998. El nopal y su historia. Mexico: Clio.
- Von Willert, D. J.; Eller, B. M.; Werger, M. J.; Brinckmann, E. y Ihlenfeldt, H. D. 1992. Life strategies of succulents in deserts: with special reference to the Namib desert. Cambridge University Press. Cambridge. pp:155-275.
- Webb, M. A.; Cavaletto, J. M.; Carpita, N. C.; Lopez, L. E. y Arnott, H. J. 1995. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. *Plant J* 7: 633-648.

- Weiner S, Traub W. y Lowenstam, H. A. 1983 Organic matrix in calcified exoskeletons. En: Biomineralization and biological metal accumulation Editor: Westbroek P y de Jong E W Riedel Publishing Company, Holland, pp. 205-224.
- Wu Y, D. Cosgrove, J. 2000. Adaptation of roots to low water potentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. J. Exp. Bot. 51:1543-1553.
- 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.
- Zindler-Frank E, Honow R. y Hesse, A. 2001. Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. J Plant Physiol 158: 139-144.