



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

DETERMINACIÓN DE METALES EN *OPUNTIA FICUS-INDICA*

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2020

Autor: ATIQA LATRECH

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Elena García García/ Marta Beltrá García-Calvo

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a varias personas las ayudas que me han prestado para la realización de este Trabajo Fin de Grado.

En primer lugar, dar las gracias a la Dra. Elena García por aceptar ser mi tutora de TFG y darme la oportunidad de participar en este estudio sobre *Opuntia ficus-indica* ya que me recuerda a mi infancia, también por la cantidad de emails y mensajes que me ha contestado, por ayudarme a perfeccionar mi trabajo y ser tan agradable conmigo. Además, sus conocimientos, todos sus consejos, su manera de trabajar, su persistencia y su motivación han sido fundamentales en mí a la hora de realizar este Trabajo Fin de Grado.

A la Dra. Marta Beltrá, por su gran esfuerzo y la ayuda que me ha ofrecido desde el principio hasta el final. Le agradezco su dedicación y los conocimientos que me ha transmitido durante la realización de este TFG. Gracias por ofrecerme la oportunidad de trabajar y aprender contigo, aunque agradecerme todo en pocas líneas es complicado.

A José María Y Mamen, por su gran ayuda en el procesamiento de las muestras en Orihuela.

A la Dra. Francisca García Hernández, por su ayuda durante todo el estudio.

Al Dr. Eugenio Vilanova Gisbert, un gran maestro, por su ayuda en el proceso de determinación de metales.

A Francisco Clemente Villalba, por la recolección de las diferentes muestras de Opuntia.

Agradecer a la gran familia que tengo, mis padres y mis hermanos, por acompañarme y darme tanta fuerza durante mi carrera profesional.

Para finalizar, me gustaría decir que todos vosotros os lleváis mi mayor reconocimiento y gratitud. Muchísimas gracias por haber hecho posible este Trabajo Fin de Grado.

ÍNDICE:

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
a. CARACTERÍSTICAS DEL NOPAL.....	7
b. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LAS PROPIEDADES SALUDABLES DEL OPUNTIA FICUS-INDICA	8
c. METALES EN OPUNTIA FICUS-INDICA	9
d. PAPEL DEL FARMACÉUTICO PARA LA EDUCACIÓN DE LA SALUD.....	12
e. ANTECEDENTES.....	12
3. OBJETIVOS	14
a. OBJETIVO GENERAL.....	14
b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIAL	15
a. ENCUESTA DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE OPUNTIA	15
b. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	15
c. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	15
d. APARATOS.....	16
5. MÉTODOS	19
a. OBTENCIÓN Y LIOFILIZADO DE LAS MUESTRAS.....	19
b. DIGESTIÓN Y MINERALIZACIÓN DE MUESTRAS.....	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7. ENCUESTA REALIZADA	36
8. CONCLUSIÓN	39
9. BIBLIOGRAFÍA	40
10. ANEXOS	42

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1: Elementos traza presentes en *Opuntia ficus-indica*
- Tabla 2: Principales macroelementos determinados en *Opuntia ficus-indica*
- Tabla 3: Metales tóxicos presentes en *Opuntia ficus-indica*
- Tabla 4: Concentración de los patrones
- Tabla 5: Concentración de metales obtenidas por ICP-MS
- Tabla 6: Test de normalidad
- Tabla 7: Test de Kruskal Wallis
- Tabla 8: Interpretación del test de Kruskal Wallis
- Tabla 9: Test estadístico ANOVA y test de Tukey
- Tabla 10: Interpretación de los resultados de la Tabla 9.
- Tabla 11: Datos de personas entrevistadas obtenidos de la encuesta realizada.
- Tabla 12: Datos del consumo de Nopal obtenidos en la encuesta realizada.

ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 1: Equipo ICP-MS.
- Figura 2: Liofilizador.
- Figura 3: Bomba de vacío que está acoplada al liofilizador
- Figura 4: Planta de *Opuntia ficus-indica* en Salades.
- Figura 5: Frutos y cladodios recolectados y lavados
- Figura 6: Pulpa antes y después de ser cortada
- Figura 7: Piel antes y después de ser cortada
- Figura 8: Cladodios antes y después de ser cortados
- Figura 9: Pulpa, piel y cladodios triturados.
- Figura 10: Disoluciones preparadas para ser medidas.

ABREVIATURAS

- PU: Pulpa
- PI: Piel
- C: Cladodios
- HNO₃: Ácido nítrico.

MAOs: Monoamino oxidasas.

EASD: Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ICP-MS: Espectrómetro de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente

LDL: Lipoproteínas de baja densidad



1. RESUMEN

El nopal (*Opuntia ficus indica* L. Miller) es una planta que pertenece a la familia *Cactaceae*. La composición de *Opuntia ficus indica* está influenciada por múltiples factores entre los que se encuentra el ambiente. Cabe señalar que, en este estudio, se han analizado tanto los cladodios como las frutas (pulpa y piel).

El aumento de la contaminación ambiental y la capacidad de bioacumulación de metales en las diferentes partes de *Opuntia ficus indica*, hace necesario determinar el contenido de metales en este alimento.

El objetivo de este estudio es determinar el contenido de macroelementos (Na, K, Ca, Mg), elementos traza esenciales y no esenciales (Fe, Cu, Zn, Cr, Mn, Mo, Co, B, Ba, Ni, Sr, U, Li) y metales tóxicos (Al, Cd, Pb) para evaluar el aporte nutricional y el riesgo toxicológico teniendo en cuenta los valores de ingesta recomendados y máximos, respectivamente.

Se han analizado un total de 9 muestras de *Opuntia ficus indica* adquiridas en un campo de Elche, concretamente en la pedanía de Salades, mediante Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

El K ($3,9640 \times 10^4$ mg/Kg peso húmedo) es el macroelemento que más destaca en la pulpa, mientras que los cladodios son ricos en Ca y Mg ($5,0707 \times 10^6$ y $1,0105 \times 10^4$ mg/Kg, respectivamente) y la piel en Na ($1,3685 \times 10^2$ mg/Kg). En cuanto a los niveles de metales traza, el elemento más notable en la pulpa es el Li (1,49 mg/Kg) al igual que la piel, aunque esta última es más rica en Fe ($1,8977 \times 10^2$ mg/Kg). Por otro lado, el metal traza que más destaca en los cladodios es el Mn (1,19 mg/Kg). Y, por último, podemos decir que todas las muestras tienen, como metales tóxicos, aproximadamente el mismo nivel del Pb ($2,1400 \times 10^{-1}$ mg/Kg), mientras que la piel tiene más Al ($1,9049 \times 10^1$ mg/Kg).

Palabras clave: *Opuntia*, metales traza, beneficios, nutrientes, composición mineral, salud, nopal, higo chumbo

2. INTRODUCCIÓN

a. CARACTERÍSTICAS DEL *OPUNTIA FICUS-INDICA* (NOPAL)

Opuntia ficus-indica, comúnmente conocida como, nopal, higuera (de pala), palera, tuna, chumbera, es una especie de planta arbustiva del género *Opuntia* que pertenece a la familia Cactaceae. Esta planta como la mayoría de los miembros de este género carece de hojas monófilas, los segmentos, pencas o cladodios en que se divide, con forma de paletas o tallos, son verdes y con espinas son capaces de ramificarse, emitiendo flores y frutos. Las flores, en forma de corona, nacen de las areolas en los bordes de los segmentos. Florece una vez al año y tanto el fruto como la flor pueden ser de diversos colores, desde el amarillo al rojo. El fruto maduro o tuna, es una baya ovoidea rojiza, con una piel gruesa, espinosa, y con una pulpa abundante en pepas o diminutas semillas. Posee en la superficie una especie de espinas muy finas conocidas como gloquidios, las cuales son fuertes cuando el fruto está verde, pero se vuelven frágiles y fáciles de desprender a medida que avanza su grado de madurez.

Los cladodios contienen compuestos bioactivos como fibra, minerales, flavonoides, compuestos fenólicos y otros nutrientes. La fruta consiste en pulpa, piel y semillas, siendo la pulpa más rica en glucosa, fructosa y pectina^{1,2}, la piel contiene celulosa, calcio y potasio; y las semillas contienen celulosa, proteínas y lípidos de buena calidad². *Opuntia ficus-indica* (especialmente frutas y cladodios) se utiliza comúnmente como un ingrediente alimenticio comestible fresco y en productos como mermeladas, bebidas alcohólicas, edulcorantes líquidos naturales ¹.

La calidad de los alimentos está en la actualidad descendiendo rápidamente debido al uso de semillas híbridas, a la pérdida y empobrecimiento del suelo superficial por su explotación, a la contaminación del agua y del aire, al calentamiento global y otras formas de cambio climático. Así, cuando se determina el contenido mineral presente en las cenizas después de calcinar la materia orgánica de alimentos refinados y altamente procesados, éstos presentan valores muy bajos en contenido mineral. Es por ello que el contenido

en minerales en los alimentos puede ser un buen indicador de niveles de seguridad³.

Los descensos en nutrientes pueden atribuirse a los esfuerzos en las prácticas agrícolas para obtener mayores rendimientos, velocidades de crecimiento mayores y resistencia a plaguicidas. Por otra parte, los análisis de “Official U.S. Food Composition Tables” muestran como el contenido de vitaminas y minerales de frutas y verduras han disminuido entre un 25 y 50% desde 1975⁴. Este descenso en los resultados publicados podría también deberse a las nuevas metodologías, a muestreos limitados, a procedimientos analíticos mejorados y a avances en la instrumentación analítica.

b. EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LAS PROPIEDADES SALUDABLES DEL *OPUNTIA FICUS-INDICA*

La Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD) y la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomiendan que el consumo de fructosa sea menor a 10% de la ingesta energética. Aunque en esos pacientes el consumo de 60 gramos de fructosa no tiene efecto adverso en la respuesta glucémica, sí pueden presentar incrementos en los niveles de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LDL)².

Además, la fibra soluble favorece el desarrollo en el colon de bacterias deseables, que la fermentan y producen ácidos grasos de cadena corta. Estos ácidos son la fuente energética esencial para las células del colon y favorecen la absorción de calcio, magnesio, zinc, sodio y agua².

También cabe señalar que existen numerosos estudios sobre la presencia de compuestos fenólicos en el nopal y sus frutos (tuna), que han mostrado tener capacidades antioxidantes, diuréticas, cicatrizantes, antiulcerogénicas (protección y tratamiento de la mucosa gástrica), antiúricas, anticarcinogénicas y antivirales (contra el ADN del virus del herpes, el ARN del virus de la influenza tipo A y el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH), entre otras propiedades^{5,6,9,11}.

También posee otros efectos biofuncionales como efectos analgésicos similares a la del ácido salicílico y antiinflamatorios asociados con extractos de flores, cladodios y frutos^{9,11}.

Se ha demostrado que los extractos y compuestos polifenólicos de la tuna generan una actividad inmunomodulatoria como respuesta a la activación de los linfocitos T a través de receptores induciendo un incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ libre en las células T, probablemente abriendo los canales de calcio. Estos mismos generan actividad inhibitoria contra la monoamino oxidasa (MAOs) y sus isoformas (A, B, etc.), que son las enzimas más involucradas en el catabolismo de las catecolaminas⁹.

Así, sus usos medicinales populares incluyen el tratamiento de los procesos catarrales, el asma y procesos similares, la migraña y dolores de cabeza en general. También se usa en la medicina tradicional contra la diabetes y el exceso de colesterol^{2,5,9,11}.

Por lo tanto, los cladodios y las frutas podrían utilizarse para la elaboración de complementos alimenticios y podría ser un importante aditivo para alimentos funcionales². Además, el consumo de ***Opuntia ficus-indica*** estimula de manera general el proceso de detoxificación⁹.

c. METALES EN *OPUNTIA FICUS-INDICA*

Los elementos objeto de este estudio son los metales traza u oligoelementos, los metales tóxicos y macroelementos.

Un elemento traza u oligoelemento (Tabla 1) es un elemento químico, que se necesita, en cantidades pequeñas, para asegurar un crecimiento y un desarrollo adecuado. Su ausencia o concentración por encima del nivel tolerable, puede ser perjudicial para el organismo, llegando a ser incluso tóxicos si se toman en cantidades excesivas. Una de las principales funciones de los oligoelementos metálicos es formar parte de las denominadas metaloenzimas en las que intervienen como coenzimas⁷.

Beneficios de los principales elementos traza a nivel de la salud	
Elementos	Efecto
Fe	La función más importante del Fe es la de transportar y almacenar oxígeno. En este sentido, el metal participa en el transporte de O ₂ desde los pulmones hacia los tejidos, mediante la hemoglobina, y en el almacenamiento de este a nivel muscular, mediante la mioglobina.
Cu	El Cu como elemento traza esencial es fundamental en diversos procesos fisiológicos y metabólicos como el crecimiento corporal, los mecanismos de defensa del huésped, el mantenimiento de la estructura ósea, la maduración de las células sanguíneas de las series blanca y roja, el transporte del Fe, el metabolismo del colesterol, la contractilidad miocárdica, el metabolismo de la glucosa, el desarrollo y la función del cerebro
Zn	El Zn es necesario para la integridad de las histonas, proteínas íntimamente involucradas con el ADN, además de ser un componente de las polimerasas del ADN y del ARN y de diversas enzimas citosólicas involucradas en la síntesis de proteínas, razón por la cual se ha mencionado que el Zn puede desempeñar un papel central en el crecimiento celular
Cr	Cofactor esencial en la acción de la insulina y su suplementación mejora el control de la glucosa en las personas que sufren resistencia a la insulina como prediabetes y diabetes tipo 2.
Mn	Fortalece los huesos, elimina radicales libres, controla los niveles de azúcar, trata la epilepsia, controla el metabolismo, interviene en el tratamiento las inflamaciones articulares, previene la osteoporosis, aumenta la eficiencia energética y funcional...
Mo	Actúa como cofactor de enzimas. Reduce el nivel de cobre. Es un cofactor de determinadas enzimas transferasas que se unen al hierro y ayuda a mantener un buen nivel de hierro en la sangre y músculos.
Co	Actúa para estimular y conseguir el buen funcionamiento de los glóbulos rojos.
Ni	En pequeñas cantidades es un aliado para la salud ya que sirve para combatir la cirrosis hepática, diabetes, falta de calcio, hipertensión arterial, trastornos del sistema nervioso.
V	En pequeñas cantidades es un aliado para la salud ya que sirve para combatir la cirrosis hepática, diabetes, falta de calcio, hipertensión arterial, trastornos del sistema nervioso.
Li	En pequeñas cantidades es un aliado para la salud ya que sirve para combatir la cirrosis hepática, diabetes, falta de calcio, hipertensión arterial, trastornos del sistema nervioso.
Bi	En pequeñas cantidades es un aliado para la salud ya que sirve para combatir la cirrosis hepática, diabetes, falta de calcio, hipertensión arterial, trastornos del sistema nervioso.
Ag	La plata es útil en procesos de emanación, fiebre crónica, debilidad después de fiebres, acidez, condiciones inflamatorias de los intestinos, hiperactividad de la vesícula biliar y exceso sangrado menstrual.

Tabla 1: Elementos traza presentes en *Opuntia ficus-indica* y sus efectos sobre la salud

Los macroelementos (Tabla 2) son los minerales que tienen una mayor presencia y función en las estructuras de nuestro organismo, por lo que también son los que requerimos en mayores cantidades, normalmente superiores a un gramo diario.

Los principales macroelementos con sus beneficios a nivel de salud	
Elementos	Efecto
Na	Interviene en el equilibrio osmótico que regula la concentración de líquidos dentro y fuera de la membrana celular, en la regulación de la acidez de la sangre (pH) y en la transmisión de los impulsos nerviosos.
K	Interviene en el equilibrio osmótico que regula la concentración de líquidos dentro y fuera de la membrana celular, en la regulación de la acidez de la sangre (pH) y en la transmisión de los impulsos nerviosos. Participa en el metabolismo de los hidratos de carbono, en la síntesis de proteínas y de insulina y contribuye a la regulación de la frecuencia cardíaca y al control de la presión arterial.
Ca	La función principal del calcio es contribuir a la formación y el mantenimiento de los huesos, donde se encuentra alrededor del 98% del calcio de nuestro cuerpo. Este calcio se va reemplazando a razón de un 20% cada año.
Mg	Contribuye al buen funcionamiento del sistema nervioso, participa en el control del ritmo cardíaco, optimiza la acción de la vitamina B6, participa en el metabolismo corporal mediante la activación de algunas enzimas, la síntesis de proteínas, el metabolismo de los carbohidratos y la formación del ADN.

Tabla 2: Principales macroelementos determinados en *Opuntia ficus-indica* y sus efectos sobre la salud

Por otra parte, se considera elementos tóxicos (Tabla 3) a los que no tienen ninguna función vital en el organismo y no deben estar presentes en él. Numerosos estudios han abordado el problema medioambiental de los metales pesados, existiendo unanimidad entre la comunidad científica, respecto al carácter tóxico de los mismos para los seres vivos. Afectan a las cadenas alimenticias, provocando un efecto de bioacumulación entre los organismos de la cadena trófica. Ello es debido a la alta persistencia de los metales pesados en el entorno, al no tener, la mayoría de estos, una función biológica definida.

Principales metales pesados con sus beneficios a nivel de la salud	
Elementos	Efecto
Al	Es una neurotoxina. Estudios han demostrado que el aluminio penetra en los vasos sanguíneos cerebrales ocasiona trastornos del sistema nervioso central y provoca síntomas similares a los de la enfermedad de Alzheimer.
Cd	Tiene efectos tóxicos en los riñones, en los sistemas óseo y respiratorio; además, está clasificado como carcinógeno para los seres humanos
Pb	Es un metal tóxico; su uso extendido ha causado una extensa contaminación ambiental y problemas de salud en muchas partes del mundo
Tl	El cuerpo humano absorbe el Talio muy eficientemente, especialmente a través de la piel, órganos respiratorios y tracto digestivo. El envenenamiento por Talio es mayormente causado por una toma accidental de veneno de rata, el cual contiene grandes cantidades de sulfato de Talio.
Be	Puede dañar los pulmones y causar neumonía. El efecto más comúnmente conocido del berilio es la llamada beriliosis, una peligrosa y persistente enfermedad de los pulmones que puede incluso dañar otros órganos, como el corazón.

Tabla 3: Metales tóxicos presentes en *Opuntia ficus-indica*

d. PAPEL DEL FARMACEUTICO PARA LA EDUCACION DE LA SALUD

Desde el punto de vista farmacéutico, es necesario educar en la salud a la población según la ley 29/2006 de 27 de julio, de Garantías u Uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios, y proporcionar una información con evidencia científica. Así mismo, a nivel de la Oficina de Farmacia, es importante resaltar las propiedades medicinales y nutricionales de ***Opuntia Ficus-indica*** con el fin de promover hábitos de vida saludables y disminuir así los factores de riesgo de determinadas enfermedades.

Por lo tanto, ha sido interesante recopilar resultados de frecuencia de consumo de opuntia en España (Elche) y en Marruecos (Oujda). Aunque, debido a la situación del COVID-19, solamente se ha podido procesar en este punto los resultados de Marruecos quedando pendiente de recoger los resultados de la población ilicitana. Además, cabe destacar que el grado de consumo y conocimiento de opuntia es muy notable en Marruecos a diferencia de España.

Opuntia está ampliamente distribuido en el entorno rural marroquí, siendo la tuna un fruto de consumo apreciado en verano ya que es la más buscada y vendida en el mercado local ¹⁵. Opuntia es una de las especies más valoradas por su calidad y sabor, se pone de relieve la contribución de esta planta como una fuente de ingresos para la mayoría de la población rural.

e. ANTECEDENTES

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos, de los estudios previos existentes, relacionados con la determinación de los diferentes metales presentes en ***Opuntia ficus-indica*** con el fin de poder estudiar sus propiedades nutricionales y medicinales.

Ammar I, et al. 2014¹², estudiaron el contenido de minerales durante las etapas de floración de dos especies de ***Opuntia***. Estos minerales (Ca, Fe, K, Mg, Na y Zn) se determinaron utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica. Se observó que el K, fue el componente predominante seguido de Ca, Mg, Na, Fe y

Zn, aunque hubo una variación significativa en las cantidades durante las etapas de floración que puede ser debido a las modificaciones relacionadas con la madurez de las flores. Por lo tanto, las flores de **Opuntia** pueden considerarse como una excelente fuente de minerales y tiene diferentes propiedades medicinales como la prevención de enfermedades cardiovasculares u oncogénicas, actividad diurética, mejora la función renal, entre otras.

El-Beltagi HS, et al. 2019¹⁰, determinaron la composición mineral de pulpa y piel mediante diferentes métodos. Los contenidos de Ca, Mg, P y Na se determinaron usando el procedimiento de cenizas en seco; mientras que K, Mg, Na, Fe, Mn, Zn y Cu se midieron con un espectrofotómetro de absorción atómica de doble haz. Se ha demostrado que la pulpa es más rica en calcio, potasio y magnesio que la piel, pero posee un contenido bajo de Na. Dicho estudio presentó evidencia sustancial de que la piel se puede considerar un potente antioxidante, agente antimicrobiano y posee cierta actividad anticancerígena.

En otro estudio de Prieto et al. 2016¹³, se determinaron las concentraciones de metales bioacumulados en las semillas de tres especies de **Opuntia** y se observó que **Opuntia ficus-indica** era una de las especies que más cantidad de calcio, magnesio y cromo tenía, aunque este último en valores inferiores a los estándares permitidos para semillas y granos. También cabe señalar que, dentro de los elementos traza, no se detectó zinc y que, como elementos tóxicos, no se observó la presencia de arsénico, cadmio y mercurio, pero se ha determinado una pequeña cantidad de plomo. Por lo tanto, las semillas se pueden utilizar para preparar suplementos alimenticios, aunque se debe prestar especial atención al contenido de plomo, lo que podría representar una desventaja a este respecto.

En un estudio de Santiago-Lorenzo MR, et al. 2016⁸, se utilizó fertilización mineral y orgánica para determinar la composición mineral del nopal (cladodios) y se observó que la composición fue diferente en Mn, Zn y B (fertilización mineral para Mn y B, y estiércol de bovino para Zn) en los cladodios en el momento de la cosecha, pero no así en N, P, K, Ca, Mg, Fe y Cu. Por consiguiente, este tratamiento es importante en la aportación de dicho mineral para la nutrición y salud humana. Ya que la calidad nutritiva del nopal está relacionada con su

composición mineral y es variable debido a varios factores, uno de ellos, el tipo de fertilización. En nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) la respuesta a la aplicación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos se ha enfocado principalmente al rendimiento y en menor proporción con la calidad nutricional.

Como conclusión, tras la búsqueda realizada, se observó que no hay suficientes estudios sobre la determinación de metales en *Opuntia ficus-indica*. También, cabe señalar, que en ningún estudio se ha realizado esa determinación de metales mediante la técnica de ICP-MS, que es la que ha sido utilizada en este estudio.

3. OBJETIVOS

a. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de los distintos metales pesados y oligoelementos en las tres muestras de *Opuntia Ficus-Indica* (cladodios, piel y pulpa).

b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- El objetivo principal es analizar la concentración de metales en *Opuntia ficus-indica*.
- Estudiar si existen diferencias de concentraciones entre las diversas partes (cladodios, piel, pulpa).
- Conocer que efecto beneficioso para la salud tendría el consumo de *Opuntia ficus-indica*.
- Determinar si los valores de los distintos elementos superan los establecidos por la OMS

4. MATERIAL

En este apartado se van a ir desarrollando conjuntamente los métodos utilizados en los distintos apartados realizados en la presente investigación y la descripción del material utilizado para el desarrollo de la misma.

a. ENCUESTA DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE *OPUNTIA*

La encuesta (Anexo I) se realizó en la Universidad Miguel Hernández por el equipo de trabajo, está compuesta por 2 cuestionarios distintos, con 15 preguntas en total: un cuestionario sobre variables sociodemográficas y presencia de enfermedad visual y otro cuestionario sobre el consumo y grado de conocimiento de *Opuntia ficus-indica*.

Las respuestas a la encuesta se recopilaron en Oujda (Marruecos), para pasar la encuesta se tuvo que traducir, al Marroquí, de manera individual por la propia alumna autora de este TFG.

b. EQUIPOS DE LABORATORIO

La balanza que se ha utilizado para pesar las muestras de *Opuntia ficus-indica* es una balanza de precisión Mettler AE 240 (Estados Unidos). La disolución de las diferentes muestras (tallos, cladodios y pulpa) se llevó a cabo mediante una placa Thermobloc Falc, donde se introducen los tubos de cristal pyrex que contienen la muestra. Mediante un panel táctil es posible controlar las condiciones de trabajo, variando la temperatura, y el tiempo de cada etapa. El análisis del contenido en metales de las muestras analizadas se realizó con un ICP-MS.

c. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Los reactivos utilizados durante el estudio:

- Ácido nítrico 65 %.
- Ácido perclórico 60%.

- Agua desmineralizada o agua milli-Q.
- Ácido nítrico al 6 %
- Patrón interno certipur® Merck para ICP-MS con 1000mg/L de Escandio (mz 45), Itrio (mz 89) y Renio (mz 185).
- Patrón externo: Nutrient standard solution 5 for ICP Sigma Aldrich N°54704 100 mL patrón utilizado para realizar la curva patrón. Este patrón posee las siguientes concentraciones:
 - 100 mg / L para Calcio (Ca); Hierro (Fe); Potasio (K) y Sodio (Na);
 - 10 mg /L. para Plata (Ag); Aluminio (Al); Bario (Ba); Berilio (Be); Cadmio (Cd); Cobalto (Co); Cesio (Cs); Cromo (Cr); Cobre (Cu); Galio (Ga); Indio (In); Litio (Li); Magnesio (Mg); Manganeseo (Mn); Molibdeno (Mo); Níquel (Ni), Plomo (Pb); Rubidio (Rb); Estroncio (Sr); Titanio (Ti); Volframio (V); Zinc (Zn).

d. APARATOS

i. ICP-MS:

Se ha utilizado ICP-MS para medir los metales presentes en las muestras. Es una técnica de análisis inorgánico elemental, que permite determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en cantidades traza, es decir, es capaz de detectar elementos que tengan un potencial de ionización menor que el potencial de ionización del argón a concentraciones muy bajas.

Además, permite realizar el análisis multielemental de la misma muestra y llevar a cabo la determinación de la composición isotópica de determinados elementos. ICP-MS es una técnica relativa y altamente sensible y las concentraciones son determinadas mediante una curva de calibración.

Espectrómetro de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente Thermo Scientific ICP-MS Agilent 7500 series (Figura 1).



Figura 1: Equipo ICP-MS del laboratorio de Dr Eugenio Vilanova.

ii. CAMPANA EXTRACTORA

Los sistemas de extracción localizada son dispositivos mecánicos cuya finalidad es captar los contaminantes liberados en un foco antes de que se dispersen en el ambiente de trabajo. Las campanas capturan, contienen y expulsan las emisiones generadas por sustancias químicas peligrosas y protegen al operador contra proyecciones y salpicaduras, permite la entrada de aire limpio en trabajos que lo requieren, facilita la renovación de aire del laboratorio y crea una depresión en el laboratorio que evita la salida de contaminantes a zonas anexas.

iii. LIOFILIZADOR

Aparato utilizado para llevar a cabo la liofilización (Figura 2 y 3), método de conservación de un alimento, que consiste en deshidratarlo sometándolo previamente a una rápida congelación y eliminando el hielo posteriormente mediante un ligero calentamiento en vacío, así la transformación es directa de hielo a vapor sin pasar por el estado líquido.



Figura 2: Liofilizador. Se muestra la cámara seca y condensador con circuito de refrigeración.



Figura 3: Bomba de vacío acoplada al liofilizador.

Consta de las siguientes partes:

- Cámara seca o cámara de liofilización: Es el lugar donde se coloca la muestra a liofilizar. Es donde tiene lugar la sublimación, pasando el agua de sólido a vapor. El cierre es hermético y se trabaja bajo en vacío.
- Condensador con circuito de refrigeración: Comunica con la cámara seca y es donde se condensa el vapor que se va produciendo en la sublimación. Un refrigerante lo mantiene a una temperatura más baja que la cámara seca (entre -50 y -125 ° C).
- Sistema de vacío: El vacío se produce con una bomba de aceite que trabaja sobre 10-2 mbar conectada a una trampa para que no pasen vapores del solvente a su interior. El sistema de vacío elimina primero el aire de la cámara seca al iniciar el proceso de liofilización, y luego ayuda a la sublimación.

iv. MOLINILLO DE CAFÉ

Herramienta empleada en la cocina para moler los granos de café y puede usarse para moler otros alimentos.

5. MÉTODOS

A continuación, se explican las técnicas y métodos llevados a cabo para este estudio.

a. OBTENCIÓN Y LIOFILIZADO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de *Opuntia ficus-indica* (higo chumbo) se recogieron en la zona del campo de Elche (concretamente en Salades) (Figura 4) en el mes de octubre, se trata de muestras ya maduras, ya que el mejor mes para su recolección óptima es entre agosto-septiembre.



Figura 4: Planta de *Opuntia ficus-indica* en Salades.

Se obtuvieron tres tipos de muestras diferentes de *Opuntia ficus-indica*:

- Fruto: la pulpa
- Fruto: la piel
- Cladodio o tallo

Una vez en el laboratorio, se lavan los frutos y los cladodios (Figura 5) con agua y un cepillo, para eliminar las espinas y la tierra, se escurren y se secan con papel absorbente.



Figura 5: Frutos y cladodios recolectados y lavados.

i. Obtención de pulpa y piel del fruto:

Se realiza dos cortes transversales al fruto, así se separa fácilmente la piel del fruto. La piel obtenida de esta forma mantiene pegado al interior cierta cantidad pequeña de pulpa (pero en ningún momento se retira ya que esto en un consumo normal no se realiza), el resto que no es considerado piel, serán las muestras de pulpas, para cada bote de muestra se utilizaron 2,5 frutos por muestra a liofilizar.

ii. Obtención de las muestras a liofilizar:

Seguidamente se cortó la pulpa (Figura 6), piel (Figura 7) y cladodios (Figura 8) en trozos pequeños de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y luego se guardaron en duquesitas de plástico inerte, ya que evitamos utilizar papel de aluminio, para evitar una posible migración de minerales del papel de aluminio a la muestra. Una vez rotulados y llenos los botes con la muestra correspondiente, se conservaron a - 80°C hasta su posterior liofilización.



Figura 6: Pulpa antes y después de ser cortada.



Figura 7: Piel antes y después de ser cortada.



Figura 8: Cladodios antes y después de ser cortados.

iii. Liofilización:

Todo el proceso de liofilización se realizó bajo el mismo protocolo, tanto para la pulpa, como para la piel, como para el cladodio o tallo. Para ello se necesitó del liofilizador, allí se mantuvieron cada una de las muestras, durante 48 horas a una presión reducida de 0.220 mbar (milibares), como podemos apreciar en la Figura 2, el proceso de liofilización tiene lugar en dos fases diferentes, sublimación, donde se elimina el vapor de agua a presión reducida, y desecación, donde se elimina la humedad del alimento, siendo esta fase una consecuencia de la fase de sublimación. Finalmente, una vez alcanzada la humedad residual deseada, se obtiene el producto liofilizado, que se conservó a -80°C .

iv. Molienda:

El paso posterior fue triturar las muestras en un molinillo de café hasta la obtención de un polvo muy fino (Figura 9).



Figura 9: Pulpa, piel y cladodios triturados.

Una vez obtenido ese polvo fino, para homogeneizar las muestras y evitar la variabilidad intra-fruto o cladodio, se procedió a mezclar tres muestras diferentes (cada una de las muestras ya procede de 2,5 higos), así cada una de las muestras a analizar (pulpa, piel o cladodio), procede de una mezcla de 7,5 frutos o cladodios distintos. Las muestras así obtenidas se conservaron a -80°C hasta su procesamiento final.

b. DIGESTIÓN Y MINERALIZACIÓN DE MUESTRAS

i. MINERALIZACIÓN

La forma convencional de llevar a cabo la mineralización por vía húmeda es por calentamiento, donde la muestra se deposita en un contenedor abierto conjuntamente con la mezcla de ácidos. Una variante de este procedimiento es la mineralización por calentamiento en bloque de digestión. Se efectúa en tubos Pyrex introducidos en dichos bloques, y se calientan a unos $120\text{--}130^{\circ}\text{C}$, durante unas dos horas. Las ventajas que presenta este procedimiento son:

- La mineralización de la muestra es rápida, debido a que la temperatura de mineralización se adquiere rápidamente y de forma uniforme al quedar los tubos prácticamente cubiertos por bloques, evitándose gradientes de temperatura que conllevan pérdida por proyecciones y evaporación de los ácidos.

- La mineralización tiene lugar a temperatura constante y más baja, que si se utiliza el método convencional de la placa calefactora.
- El volumen de reactivos añadidos es comparativamente menor al de otros procedimientos de mineralización por vía húmeda, con lo que se disminuye el riesgo o de contaminación.

ii. DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS DE OPUNTIA: PULPA, PIEL Y CLADODIOS

Para la digestión de las muestras de pulpa, piel y cladodios, se pesaron 0,5 g de las distintas muestras liofilizadas por triplicado, en tubos de plástico y se etiquetaron de forma correcta (pulpa Pu1, Pu2, Pu3); piel (Pi1, Pi2, Pi3) y las de cladodio (C1, C2, C3) (cada una de las muestras corresponde a la mezcla de 7,5 muestras sin liofilizar). Una vez pesadas las muestras se añaden 5 mL de HNO₃ al 65 % (v/v). La mezcla se somete a digestión en el Thermobloc a una temperatura de 60°C durante 30 min (primera etapa) y a 120°C durante 180 min (segunda etapa). Una vez pasado este tiempo, se dejaron enfriar y posteriormente se les sometió a una segunda digestión, pero esta vez se añadió 1 mL de ácido perclórico al 60% y se volvieron a colocar en el Thermobloc a 120°C durante otros 90 minutos.

Para obtener mediciones de metales que pudieran estar dentro del rango de lectura del ICP MS, las muestras resultantes de la digestión, se trasvasaron a un matraz aforado de 10 mL, enrasando a 10 mL con agua ultra-pura Milli-Q. Todas las muestras fueron preparadas por triplicado. Las disoluciones así obtenidas (Figura 10) se conservaron 4°C, para posteriormente medir su contenido de elementos minerales mediante la técnica ICP-MS.

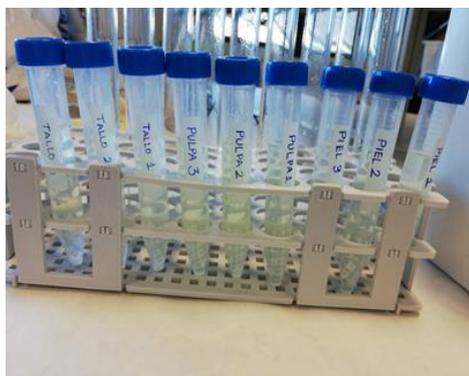


Figura 10: Disoluciones preparadas para ser medidas.

iii. DETERMINACIÓN DE LOS ELEMENTOS MINERALES POR ICP-MS

Una vez que se han obtenido las muestras procesadas en forma de disolución de las distintas partes de *Opuntia ficus-indica*, se procede a medir y cuantificar los contenidos en elementos mediante el equipo de ICP-MS.

La ICP-MS es una técnica muy adecuada para el control analítico de la contaminación ambiental por metales traza, con alta sensibilidad y total especificidad, con la ventaja de la determinación simultánea de muchos elementos. En la Figura 1 se puede observar el equipo que se utilizó para el estudio de los elementos minerales de las muestras analizadas.

Metales analizados con *ICP-MS*: Be, B, Na, Mg, Al, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Cd, Ba, Hg, Tl, Pb, Bi, Au, Ag y U.

En el funcionamiento del ICP- MS plasma inductivamente acoplado, se forma un plasma de gas argón, obtenido por la interacción de un campo de radio frecuencia y el gas argón ionizado. La corriente de argón, fluye entre dos tubos de cuarzo y se hace conductora por exposición a una descarga eléctrica que crea iones y electrones. Éstos, son obligados a circular, dentro del campo magnético, por un espacio anular cerrado, en el que sufren un calentamiento debido a la resistencia que encuentran, provocándose una ionización adicional. Este proceso, consigue que el plasma se expanda en todas las direcciones, en cuyo centro se inyecta la muestra en forma de aerosol. Los átomos de la muestra están sometidos a temperaturas entre 6000 a 8000° K, consiguiéndose una disociación casi completa y lográndose una reducción de las interferencias químicas.

En el ICP-MS los iones de los átomos de la muestra, son orientados por lentes electromagnéticas hacia un espectrómetro de masas, permitiendo la separación de los elementos y sus isótopos, por la relación masa/carga, gracias a campos electromagnéticos que orientan los iones hacia un detector, que cuenta los impactos de los iones, detectándose así los diferentes isótopos del elemento y cuantificándose.

- PATRONES INTERNOS (ISTD)

Para cubrir todo el espectro de masas y con el objetivo de corregir la variabilidad propia del equipo, se usaron Sc (m/z 45), Y (m/z 89) y Re (m/z 185) ICP estándar 1000 mg/L, CertiPUR® Merck como patrones internos. Los criterios de elección de estos elementos fueron:

1. Que buscando en bibliografía esos elementos no estuviesen presentes en ***Opuntia ficus-indica***.
2. Que fuesen monoisótopos.

Con estos patrones, se hizo una disolución (usando HNO₃ al 5% como diluyente), con un volumen de 500 ml conteniendo los tres elementos a una concentración de 1000 mg/L cada uno, a la que se llamó patrón interno (*P_i*). La disolución *P_i*, se colocó en un frasco de plástico previamente tratado con HNO₃ al 0,6%, al cual se le adaptó un dosificador para botella, previamente calibrado para dispensar 0,5 ml. Usando ese dispensador se prepararon tubos Falcon con 1 ml de *P_i* cada uno; 3 para las muestras de cladodio, 3 para las de piel, 3 para las de pulpa, 15 para los patrones de calibración y 10 para blancos de laboratorio y reserva.

Se tomaron 5 ml de cada muestra problema y se agregaron a los tubos previamente preparados con 1 ml de patrón interno de Yttrium, Rhenium y Scandium ICP standard, a concentración de 1000 mg/L.

- PATRONES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA EL ICP-MS

La señal de medida del ICP-MS, se obtiene a partir de las cuentas por segundo de cada disolución del patrón. Para conseguir las curvas de calibrado correspondientes a cada elemento a analizar, expresadas como cuentas por segundo frente a la concentración de cada elemento.

En primer lugar, se realizó un ajuste interno del ICP-MS con una disolución patrón 10 nM de Litio, Cobalto, Talio e Ytrio de Autotune de Agilent Instruments. Previo al comienzo del análisis de las muestras en el laboratorio, se llevó a cabo la puesta a punto del método con las condiciones más adecuadas para medir dichos elementos. Para ello, se utilizaron dos métodos: el método cuantitativo ("fullquant") y el método semicuantitativo ("semiquant").

El método cuantitativo, se utilizó para analizar aquellos elementos de los cuales se habían preparado previamente sus respectivos patrones. Este método, calcula las concentraciones de cada elemento mediante las curvas de calibrado, que son construidas a partir de las concentraciones conocidas de los patrones que se han introducido previamente.

En cambio, el método semicuantitativo se utilizó para determinar aquellos elementos que eran interesantes para analizar, pero de los que no se disponía de patrón. Este método se basa en que la respuesta de un ion formado en el plasma, es una función continua de la masa ión. De esta forma se pueden construir curvas de respuesta, utilizando una serie de elementos a concentración conocidas y que cubran todo el rango de masas, si el equipo se ha calibrado previamente con una disolución de concentración conocida de algunos elementos representativos del sistema periódico. Este modo de trabajo permite obtener resultados en tiempo de análisis muy cortos con errores en torno al 10%, margen que es suficiente en muchos controles.

Usando los patrones CertiPUR® Merck certificados ya descritos y un matraz aforado de 25 mL se preparó una disolución conteniendo: 250 µg/L de patrón de Al, 250 µg/L de patrón de Hg y 24,5 mL de patrón multielementos. Se hicieron 12 patrones a diferentes diluciones para las curvas de calibración de cada elemento de estudio, excepto para el Cu y el Zn, de los que se hicieron 15 patrones. El análisis de Ag, Au y U se hizo por método semicuantitativo, usando como patrón la solución Tunning para ICP-MS Agilent con los elementos Li (m/z: 7), Co (m/z: 59), Y (m/z: 89), Ce (m/z: 140) y Tl (m/z: 205), a una concentración de 10 µg/l.

Los patrones internos utilizados en este trabajo fueron el Escandio (Sc), Itrio (I), el Renio (Re) y oro (Au) La cantidad de patrón interno añadido a todas las muestras fue de 1 mL y se añadió tanto a la recta patrón, como al blanco y a todas las muestras problema.

Recta patrón:

Se realizaron 6 patrones distintos a diferentes concentraciones, partiendo del patrón 0 que es la muestra patrón sin diluir y las demás diluciones, eran diluciones seriadas 1:3 sobre el patrón anterior (Tabla 4). La concentración del Patrón cero era 100 mg / L para el Calcio (Ca); Hierro (Fe); Potasio (K) y Sodio (Na); mientras que para Plata (Ag); Aluminio (Al); Bario (Ba); Berilio (Be); Cadmio (Cd); Cobalto (Co); Cesio (Cs); Cromo (Cr); Cobre (Cu); Galio (Ga); Indio (In); Litio (Li); Magnesio (Mg); Manganeso (Mn); Molibdeno (Mo); Níquel (Ni), Plomo (Pb); Rubidio (Rb); Estroncio (Sr); Titanio (Ti); Volframio (V); Zinc (Zn); la concentración era de 10 mg /L.

Para cada uno de estos elementos se realizó la calibración de la recta patrón, dependiendo del comportamiento del elemento en el ICP-MS. De este modo y como se ha mencionado ya previamente, todos los elementos fueron analizados con método cuantitativo en el software del ICP, usando las curvas de calibración mencionadas. A excepción del oro, plata y uranio que fueron analizados a través de método semicuantitativo, usando como patrón la solución Tuning 10 ppb de Li, Y, Ce, Tl y Co. La concentración era de 10 mg /L.

CONCENTRACIÓN DE LOS PATRONES UTILIZADOS mg/L		
Patrón 0	100	10
Patrón 1 (1:3 del patrón 0)	33,333	3,333
Patrón 2 (1:3 del patrón 1)	11,111	1,111
Patrón 3 (1:3 del patrón 2)	3,700	0,370
Patrón 4 (1:3 del patrón 3)	1,234	0,123
Patrón 5 (1:3 del patrón 4)	0,411	0,0041
Blanco (Agua mili-Q)	0,000	0,000

Tabla 4: Concentración final de la recta patrón dependiendo de la concentración del elemento.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

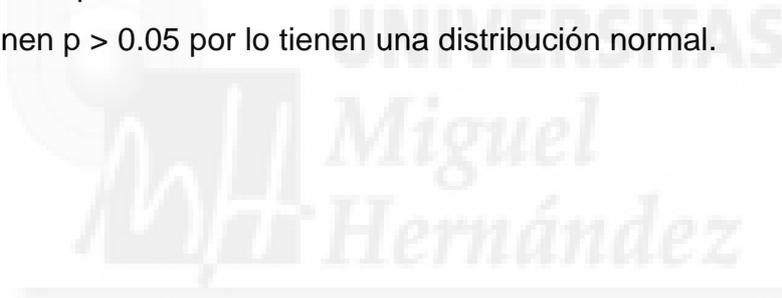
Utilizando las técnicas descritas en material y métodos, se midieron las muestras obtenidas en el campo de Elche. Cada muestra está codificada, para facilitar su tratamiento estadístico. Los datos de las concentraciones de todos los elementos obtenidos en el ICP-MS, se pueden ver en la Tabla 5. Los valores están expresados en mg/Kg de muestra.

Una vez obtuvimos el resultado de concentraciones, se realizaron diferentes estudios estadísticos, aplicando diferentes test estadísticos.

Primero se estudió si los datos obtenidos de las muestras seguían una distribución normal o no, para ello se utilizó el programa estadístico R, donde se analizaron los datos con el test estadístico o prueba de Kolmogórov-Smirnov, test de normalidad, cuya hipótesis nula, H_0 , considera que la variable a estudiar, cumple con una distribución normal. En esta prueba se calcula el nivel de significación o p-valor, por lo que se pueden dar dos situaciones:

- Si p-valor $> 0,05$ aceptamos H_0 (hipótesis nula) \rightarrow Distribución normal.
- Si p-valor $< 0,05$ rechazamos H_0 (hipótesis nula) \rightarrow Distribución no normal.

Los datos obtenidos en la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 6), nos indican que los minerales, Be, Cd, Li, Mn, Mo, Ni, V, tienen $p < 0.05$ (color azul), por lo tanto, no se comportan como una distribución normal. El resto de los minerales medidos tienen $p > 0.05$ por lo que tienen una distribución normal.



Elementos	CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS (mg/Kg)								
	Pu1	Pu2	Pu3	Pi1	Pi2	Pi3	C1	C2	C3
Li	1,49E+00	1,49E+00	1,49E+00	1,49E+00	1,49E+00	1,49E+00	5,24E-05	3,83E-03	3,83E-03
Be	3,92E-06	1,96E-04	1,50E-04	1,96E-04	1,96E-04	1,99E-04	1,50E-04	1,75E-04	2,24E-04
Na	2,00E+02	6,26E+01	4,11E+01	2,59E+01	1,50E+02	2,34E+02	2,00E+02	9,85E+01	8,41E+01
Mg	1,25E+03	1,55E+03	1,22E+03	4,56E+03	3,02E+03	3,81E+03	8,33E+03	1,03E+04	1,17E+03
Al	7,33E-01	1,05E+00	9,88E-01	1,40E+01	2,00E+01	2,31E+01	1,12E+00	1,29E+00	1,28E+00
K	3,78E+04	3,59E+04	4,52E+04	2,10E+04	3,90E+04	4,00E+04	2,42E+04	3,19E+04	3,37E+04
Ca	2,91E+04	2,32E+04	2,91E+04	2,21E+06	1,58E+06	1,82E+06	3,98E+06	5,60E+06	5,63E+06
V	2,21E+00	2,21E+00	2,21E+00	2,21E+00	2,21E+00	2,21E+00	6,02E-01	6,02E-01	6,02E-01
Cr	5,57E+00	5,65E+00	5,65E+00	5,55E+00	5,58E+00	5,59E+00	5,54E+00	5,59E+00	5,58E+00
Mn	5,62E-01	5,62E-01	5,62E-01	5,62E-01	5,62E-01	5,62E-01	1,19E+00	1,19E+00	2,45E+00
Fe	1,21E+02	1,44E+02	1,57E+02	1,54E+02	1,82E+02	2,32E+02	1,31E+02	1,29E+02	1,82E+02
Ni	8,28E+01	8,27E+01	8,31E+01	9,09E+01	8,90E+01	9,09E+01	9,88E+01	1,05E+02	2,14E+02
Co	4,90E-01	4,89E-01	4,89E-01	4,92E-01	4,91E-01	4,92E-01	4,95E-01	4,96E-01	4,97E-01
Cu	4,07E+00	4,08E+00	4,09E+00	4,05E+00	4,06E+00	4,06E+00	4,05E+00	4,07E+00	4,06E+00
Zn	6,69E+00	6,95E+00	6,85E+00	6,06E+00	6,08E+00	6,00E+00	6,74E+00	7,14E+00	7,09E+00
Mo	6,64E-01	6,67E-01	6,67E-01	6,65E-01	6,56E-01	6,61E-01	6,91E-01	7,14E-01	7,08E-01
Ag	6,27E-01	6,28E-01	6,28E-01	6,22E-01	6,25E-01	6,24E-01	6,23E-01	6,23E-01	6,23E-01
Cd	3,33E-02	3,33E-02	3,33E-02	3,33E-02	3,33E-02	3,33E-02	1,69E-01	1,69E-01	1,69E-01
Tl	1,79E-01	1,79E-01	1,79E-01	1,79E-01	1,79E-01	1,79E-01	1,79E-01	1,79E-01	1,79E-01
Pb	2,12E-01	2,11E-01	2,13E-01	2,16E-01	2,12E-01	2,14E-01	2,14E-01	2,13E-01	2,12E-01
Bi	1,71E-01	1,70E-01							

Tabla 5: Concentración de metales obtenidas por ICP-MS en mg/Kg, en muestras de *Opuntia ficus-indica* liofilizado. Pu=pulpa, Pi= piel y C= cladodio. 1,2,3 = las diferentes mezclas de muestras analizadas.

b. MINERALES QUE NO SE COMPORTAN COMO UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL

Para los elementos que no siguen una distribución normal (Tabla 6) se trabajará con la mediana y el rango intercuartílico, para el cuartil 25 (25 % de los datos que se diferencian del valor medio) y el cuartil 75 (75 % de los datos que se diferencian del valor medio). Para saber si existen diferencias estadísticas, entre los valores obtenidos para cada elemento, dependiendo si la muestra procede de la piel, pulpa o tallo, se realizó el test estadístico de Kruskal-Wallis (Tabla 7). Los valores de $p < 0,05$ mostraran que mínimo dos de los valores (en cada elemento) son estadísticamente diferentes.

TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV		
Elementos	D	P
Ag	0,24032	0,1403
Al	0,34972	0,1403
Be	0,29663	0,02172
Bi	0,18959	0,4619
Ca	0,18677	0,4864
Cd	0,41417	0,00007318
Co	0,21651	0,2591
Cr	0,23713	0,1529
Cu	0,17871	0,5585
Fe	0,18864	0,47
K	0,15464	0,7736
Li	0,41417	0,00007318
Mg	0,21787	0,2507
Mn	0,37499	0,0006293
Mo	0,34225	0,003127
Na	0,18455	0,5059
Ni	0,38426	0,000387
Pb	0,22878	0,1906
V	0,41417	0,00007318
Zn	0,22526	0,2086

Tabla 6: Test de normalidad Si p-valor > 0,05 aceptamos distribución normal.

Como se puede apreciar (en la Tabla 7) únicamente el Berilio (Be) tiene una probabilidad mayor de 0,05 (0,2761), eso quiere decir que los valores que hemos encontrado de Berilio en *Opuntia ficus-indica* liofilizado, son iguales tanto en pulpa como en piel y cladodio. En cambio, para el resto de los elementos, la

probabilidad es menor de 0,05, por lo tanto, los valores son estadísticamente diferentes tanto para pulpa, piel o cladodio.

Así tal como vemos (en la Tabla 7). La pulpa y piel son más ricos que los cladodios en Li y V (1,49E+00 y 2,21E+00 mg/Kg). Pero los cladodios son las muestras más ricas en Cd, Mn, Mo y Ni (1,69E-01, 1,19E+00, 6,99E-01 y 1,05E+02 mg/Kg). En cuanto a pulpa y piel, existen diferencias significativas en el Mo y el Ni, de estas dos muestras, la piel posee más cantidad de Ni (9,09E+01 mg/Kg), mientras que la pulpa posee más cantidad de Mo (6,67E-01 mg/Kg), pero para estos dos minerales, es el cladodio que tiene más cantidad.

ELEMENTOS QUE NO SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL					
Elemento	Test de Kruskal Wallis	Pulpa	Piel	Cladodio	P value*
Be	Mediana	1,50E-04	1,96E-04	1,75E-04	0,2761
	IQR25%	7,71E-05	1,96E-04	1,63E-04	
	IQR75%	1,73E-04	1,98E-04	1,99E-04	
Cd	Mediana	3,33E-02	3,33E-02	1,69E-01	0,01832
	IQR25%	3,33E-02	3,33E-02	1,69E-01	
	IQR75%	3,33E-02	3,33E-02	1,69E-01	
Li	Mediana	1,49E+00	1,49E+00	3,83E-03	0,02113
	IQR25%	1,49E+00	1,49E+00	1,94E-03	
	IQR75%	1,49E+00	1,49E+00	3,83E-03	
Mn	Mediana	5,62E-01	5,62E-01	1,19E+00	0,02113
	IQR25%	5,62E-01	5,62E-01	1,19E+00	
	IQR75%	5,62E-01	5,62E-01	1,82E+00	
Mo	Mediana	6,67E-01	6,61E-01	6,99E-01	0,03899
	IQR25%	6,67E-01	6,59E-01	7,08E-01	
	IQR75%	6,67E-01	6,63E-01	7,11E-01	
Ni	Mediana	8,29E+01	9,09E+01	1,05E+02	0,02732
	IQR25%	8,29E+01	9,00E+01	1,02E+02	
	IQR75%	8,30E+01	9,09E+01	1,59E+02	
V	Mediana	2,21E+00	2,21E+00	6,02E-01	0,01832
	IQR25%	2,21E+00	2,21E+00	6,02E-01	
	IQR75%	2,21E+00	2,21E+00	6,02E-01	

Tabla 7: Test de Kruskal Wallis con la Media en mg/Kg y Cuartiles y la P- value= valor de la probabilidad que indica que los valores tendrán distribuciones iguales cuando la P es > 0.05

Interpretación de resultados encontrados en <i>Opuntia ficus-indica</i>	
Be	Los valores son iguales para el Be, tanto en pulpa, piel y cladodio
Cd	Los valores obtenidos de Cd son estadísticamente iguales para piel y pulpa, pero ambos son diferentes de los obtenidos en el cladodio. Menor cantidad de Cd en cladodio que el obtenido en piel o pulpa.
Li	Los valores son estadísticamente iguales para pulpa y piel, pero ambos son diferentes de los obtenidos en el cladodio, con el doble de cantidad de Li que el encontrado en piel o pulpa
Mn	Los valores obtenidos de Mn son estadísticamente iguales para pulpa y piel, estos son muy superiores a los encontrados en el cladodio.
Mo	A pesar de que los valores son muy parecidos, sí que encontramos datos estadísticamente diferentes para pulpa, piel y cladodio.
Ni	Los valores obtenidos de Ni son estadísticamente diferentes, en el cladodio encontramos valores muy superiores a los encontrados en pulpa o piel.
V	Los valores obtenidos de V son estadísticamente iguales para pulpa y piel, estos son muy superiores a los encontrados en cladodio.

Tabla 8: Interpretación de los resultados del test estadístico de Kruskal-Wallis

c. MINERALES QUE SE COMPORTAN COMO UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL

Para los elementos que siguen una distribución normal (Tabla 9), los datos estadísticos que utilizamos son la media, la desviación estándar y en el programa R, se utiliza el test estadístico de análisis de varianza (ANOVA de un factor) y posteriormente se comparan las medias dos a dos, con el análisis de Tukey. Para poder interpretar los resultados, un $P < 0.05$ en los elementos, quiere decir, que son muestras estadísticamente diferentes, así una misma letra en la misma fila, indica que las muestras estadísticamente no son diferentes entre sí (Tabla 9).

En la Tabla 9, Los elementos que tienen un P-value $< 0,05$ son Ag, Al, Ca, Co, Cu, Mg y Zn. Por lo tanto, podemos decir que los valores obtenidos para estos elementos son diferentes si hablamos de piel, pulpa o cladodio. Mientras que los elementos que no son estadísticamente diferentes son los que tienen un P-value

>0,05 y en este caso son Bi, Cr, Fe, K, Na y Pb, por lo tanto, son concentraciones iguales tanto en piel, como pulpa y cladodio.

ELEMENTOS QUE SIGUEN UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL				
Elemento	Pulpa	Piel	Cladodio	P value
Ag	6,2773e-01 ±3,0551e-04 _a	6,2360e-01 ±1,2000e-03 _b	6,2287e-01 ±1,1547e-04 _b	0,000338
Al	9,2480e-01 ±1,6899e-01 _a	1,9049e+01 ±4,6356e+00 _b	1,2305e+00 ±9,6766e-02 _a	0,000244
Bi	1,7043e-01 ±9,0185e-05 _a	1,7037e-01 ±3,0551e-05 _a	1,7030e-01 ±5,2915e-05 _a	0,122
Ca	2,7120e+04 ±3,4123e+03 _a	1,8689e +06±3,1753e+05 _b	5,0707e+06 ±9,4643e+05 _c	0,000114
Co	4,8934e-01 ±2,3094e-04 _a	4,9173e-01 ±3,0551e-04 _b	4,9607e-01 ±1,1373e-03 _c	0,000062
Cr	5,6240e+00 ±4,3313e-02 _a	5,5727e+00 ±2,3861e-02 _a	5,5673e+00 ±2,7593e-02 _a	0,142
Cu	4,0834e+00 ±1,0101e-02 _b	4,0560e+00 ±6,0000e-03 _a	4,0600e+00 ±8,7178e-03 _a	0,015
Fe	1,4083e+02 ±1,8107e+01 _a	1,8977e+02 ±3,9490e+01 _a	1,4723e+02 ±3,0313e+01 _a	0,185
K	3,9640e+04 ±4,8759e+03 _a	3,3340e+04 ±1,0717e+04 _a	2,9907e+04 ±5,0387e+03 _a	0,331
Mg	1,3367e+03 ±1,8398e+02 _a	3,7987e+03 ±7,7111e+02 _a	1,0105e+04 ±1,6904e+03 _b	0,000155
Na	1,0159e+02 ±1,0224e+02 _a	1,3685e+02 ±1,0484e+02 _a	1,2751e+02 ±6,3186e+01 _a	0,94
Pb	2,1200e-01 ±1,3115e-03 _a	2,1400e-01 ±2,0298e-03 _a	2,1287e-01 ± 9,4516e-04 _a	0,329
Tl	1,79E-01 ± 1,60E-04 _a	1,79E-01 ± 9,17E-05 _a	1,79E-01 ± 8,33E-05 _a	0,388
Zn	6,8327e+00 ±1,3329e-01 _b	6,0440e+00 ±4,1328e-02 _a	6,9907e+00 ± 2,2185e-01 _b	0,000546

Tabla 9: Concentración de metales que siguen distribución normal, Media ±SD (mg/Kg). P-value= valor de la probabilidad, distribuciones iguales P es > 0.05 Test estadístico ANOVA, comparación de medias, Tukey. *letras iguales en la misma fila indica no diferencias estadísticas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	
Ag	Los valores obtenidos nos muestran que no hay diferencias entre la piel y cladodio, pero ambos se diferencian de la pulpa.
Al	Pulpa y el cladodio son iguales, pero ambos se diferencian de la piel.
Bi	Los valores obtenidos nos muestran que son iguales tanto para la pulpa, piel y el cladodio, ya que las tres letras son iguales en la misma fila.
Ca	Los valores son diferentes para la pulpa, piel y cladodio, ya que cada muestra tiene una letra diferente.
Co	Los valores son diferentes para la pulpa, piel y cladodio, ya que cada muestra tiene una letra diferente.
Cr	Los valores obtenidos son iguales tanto para la pulpa, piel y el cladodio.
Cu	Podemos ver que entre la piel y el cladodio no hay diferencias, pero ambos se diferencian de los obtenidos en la pulpa.
Fe	Los valores obtenidos son iguales tanto para la pulpa, piel y el cladodio.
K	Los valores obtenidos son iguales tanto para la pulpa, piel y el cladodio.
Mg	Los valores obtenidos son iguales tanto para la piel como para la pulpa, pero ambos son estadísticamente diferentes de los obtenidos del cladodio.
Na	Los valores obtenidos son iguales tanto para la pulpa, piel y el cladodio.
Pb	Los valores obtenidos son iguales tanto para la pulpa, piel y el cladodio.
Zn	Los valores obtenidos son iguales tanto para la pulpa como para el cladodio, pero ambos se diferencian estadísticamente de los valores obtenidos de la piel.

Tabla 10: Interpretación de resultados de la Tabla 9

Como vemos en la tabla 9, podemos decir que en el *Opuntia ficus-indica* liofilizado, el mineral que encontramos en mayor concentración es el calcio, seguido por el potasio y el magnesio. En cuanto a que parte posee mayor cantidad, el cladodio tiene más calcio y magnesio ($5,0707e+06$ y $1,0105e+04$ mg/Kg), mientras que la pulpa tiene más potasio ($3,9640e+04$ mg/Kg) y es la piel la que tiene más cantidad de Al, Fe y Na ($1,9049e+01$, $1,8977e+02$ y $1,3685e+02$ mg/Kg, respectivamente). En cuanto al resto de elementos, no existen diferencias entre las muestras de pulpa, piel y cladodio.

d. DECLARACIONES NUTRICIONALES Y DE SALUD

Revisando todas las cantidades de minerales encontrados en *Opuntia ficus-indica*, sobre los que se podría alegar en declaraciones nutricionales tal como se resume en la página web de BADALI¹⁶ sobre lo que se describe en el reglamento europeo N.º 1924/2006¹⁷.

Podemos decir que: 100 gramos de *Opuntia ficus-indica* liofilizado, se considera rico y una importante fuente de diversos minerales, como es el caso de: el potasio, el calcio, el hierro y el magnesio ya que en todos los casos superan los valores mínimos para ser ricos en estos elementos.

Con todos estos datos, podríamos declarar que el consumo regular de *Opuntia ficus-indica* liofilizado, podría tener beneficio en algunas de las funciones corporales en las que participan estos minerales, como son, coagulación sanguínea, mantenimiento de huesos y dientes, crecimiento y desarrollo en niños, neurotransmisión o funcionamiento de músculos normal, funcionamiento del sistema nervioso y el mantenimiento de la tensión arterial, formación de glóbulos rojos y de hemoglobina, transporte de oxígeno en el cuerpo, funcionamiento del sistema inmunitario o desarrollo cognitivo en los niños, utilidad en el metabolismo energético, y equilibrio electrolítico.

Por otro lado, el *Opuntia ficus-indica* liofilizado, posee un bajo contenido de Na o sal, ya que no supera la cantidad máxima establecida en la declaración. Por la tanto, no se considera una fuente de sodio y así su consumo contribuye a mantener la tensión arterial normal.

e. COMPARACIÓN DE RESULTADOS CON ESTUDIOS PREVIOS

Si comparamos los datos obtenidos en este trabajo con los obtenidos en publicaciones de otros autores, aunque como ya se ha dicho anteriormente, los estudios son escasos.

Santiago-Lorenzo MR, et al. 2016⁸, determinaron concentraciones de Mn (81.38 mg kg⁻¹) y de Zn (44.11 mg kg⁻¹) que son mayores a las obtenidas en nuestro estudio, tal vez se deba esto a la fertilización mineral y orgánica previa que utilizaron.

Zúñiga-Tarango et al. (2009)¹⁴ reportaron concentraciones (% de ms) de 6.2, 5.4 y 1.0 para K, Ca y Mg, respectivamente, y de 172.6, 17 y 29.3 mg kg⁻¹ para Fe, Cu y Zn, con la fertilización mineral. Con excepción de Fe, Cu y Zn, los valores obtenidos en este estudio los superan.

En el estudio de El-Beltagi HS, et al. 2019¹⁰, se vio que la pulpa es más rica en K, Mg y Ca (410.7, 18.6 y 49.04 mg/100g, respectivamente) que la piel, pero

posee menor cantidad de Na. Sin embargo, las muestras de pulpa y piel analizadas en este estudio superan estos valores, incluso la piel posee más cantidad de Mg que la pulpa.

7. ENCUESTA REALIZADA

Se ha realizado dos encuestas a la comunidad Marroquí residente en el Éste de Marruecos (Oujda), donde sabíamos que el consumo de ***Opuntia ficus-indica*** es elevado. Se ha entrevistado a un total de 89 personas. La recogida de datos se llevó a cabo durante el periodo comprendido entre el 18/12/2019 y el 12/01/2020. A cada persona se le explicó y se le tradujo de manera individual las encuestas ya que estaban escritas en Castellano.

Para llevar a cabo este estudio, se realizaron dos cuestionarios diferentes:

- A) Variables socio-demográficas y de la presencia de dolencia o enfermedad visual (Tabla 11).
- B) Frecuencia de consumo de ***Opuntia ficus-indica*** (Tabla 12).

Una vez obtenidas todas las respuestas, se realizó un análisis estadístico, mediante el sumatorio de todas respuestas de igual contestación y el cálculo de los porcentajes de respuestas con respecto al total.

Las personas entrevistadas en la encuesta (Tabla 11) están repartidas por igual, tanto hombres como mujeres, de todos ellos, el 92% tiene menos de 65 años, pero una parte importante son jóvenes ya que el 45% de los encuestados tienen una edad menor o igual a 35 años. También podemos deducir que la mayor parte vive con 4 o más personas y que el 35% son personas activas, seguido de un 26% de estudiantes, siendo el 6% de personas jubiladas, aunque alrededor del 16% son personas con actividad no remunerada y el 18% de las personas están en situación de desempleo. También cabe destacar que alrededor del 88% de personas no usa prótesis oculares (gafas), siendo este dato muy positivo para su futuro estudio, ya que nuestro objetivo final es relacionar los posibles beneficios del consumo de ***Opuntia ficus-indica*** a nivel de salud sobre todo salud ocular.

DATOS DEL ENTREVISTADO			
Preguntas	Opciones de las preguntas	N.º de personas que ha respondido	Porcentaje
Género	Hombre	45	50,5%
	Mujer	44	49,5%
Intervalo de edad	<35	40	44,9%
	35-65	42	47,2%
	>65	7	7,9%
¿Cuántas personas viven en casa?	1	2	2,2%
	2	3	3,4%
	3	15	16,9%
	4	36	40,5%
	5 o más	33	37%
¿Actualmente se Encuentra..?	Trabajando	31	34,8%
	Desempleado	16	18%
	Estudiante	23	25,9%
	Jubilado	5	5,6%
	Actividad no remunerada	14	15,7%
¿Usa gafas?	Sí	11	12,4%
	No	78	87,6%
¿Qué tipo de gafas?	Miopía	4	4,5%
	Hipermetropía	2	2,2%
	Presbicia	3	3,4%
	Astigmatismo	2	2,2%
	Progresivas	0	0%

Tabla 11. Datos de personas entrevistadas obtenidos de la encuesta realizada.

En cuanto al cuestionario de consumo de *Opuntia ficus-indica* (Tabla 12), se puede ver que el 100% de las personas entrevistadas conocen este alimento y únicamente el 2,3% no lo consume y es debido a problemas gástricos, (como estreñimiento) o problemas de inapetencia (porque no les gusta su sabor).

Alrededor del 87%, no conoce los beneficios sobre la salud del consumo de nopal, pero la mayoría (75,3%) cree que su consumo tiene algún efecto positivo en la salud. Al 100% de la muestra, le resulta fácil encontrarlos y le gustaría que sus hijos lo consumiesen en el comedor. Asimismo, el 74,2% lo compra en el mercado, consumiéndolo recién recolectado, y piensa que fresco es más rico en elementos esenciales para el buen funcionamiento del organismo. No todos conocen exactamente la temporada del nopal, el 4,5% piensa en Junio, 21,3%

Agosto, y la mayoría (el 74,2%) cree que es Julio, un pequeño porcentaje de la población entrevistada conoce la época de recolección óptima (agosto).

FRECUENCIA DE CONSUMO DE <i>OPUNTIA FICUS-INDICA</i>			
Preguntas	Opciones a las preguntas	N.º de personas que han respondido	Porcentaje
¿Conoce los higos chumbos?	Sí	89	100%
	No	0	0%
¿Conoce usted los beneficios de los higos chumbos?	Sí	12	13,5%
	No	77	86,5%
¿Consume higos chumbos?	Sí habitualmente	46	51,7%
	Sí una vez a la semana	35	39,3%
	Sí una vez al mes	6	6,7%
	No	2	2,3%
¿Por qué consume higos chumbos?	Calidad mayor	18	20,2%
	Respetuoso con el medio ambiente	4	4,5%
	Beneficioso para la salud	67	75,3%
¿En qué tipo de establecimiento compra generalmente los higos chumbos?	Directamente del productor	0	0
	Mercado	66	74,2%
	Tienda de barrio	23	25,8%
	Tienda especializada	0	0
	Supermercado	0	0
	Otros	0	0
¿Le resulta fácil encontrar higos chumbos?	Sí siempre	89	100%
	A veces	0	0
	No	0	0
¿Le gustaría que sus hijos consumiesen higos chumbos en el comedor escolar?	Sí	89	100%
	No	0	0
¿Por qué no consume higos chumbos?	Mal sabor	1	
	Produce estreñimiento	1	
¿Sabe usted cuándo es la temporada de los higos chumbos?	Junio	4	4,5%
	Julio	66	74,2%
	Agosto	19	21,3%

Tabla 12. Datos de consumo de *Opuntia ficus-indica* obtenidos en la encuesta realizada

8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten inferir las siguientes conclusiones.

1. La Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) es una técnica selectiva y rápida para la determinación de los elementos minerales en matrices como *Opuntia ficus-indica*. La idoneidad del método se ha puesto de manifiesto con los resultados obtenidos en el estudio de parámetros analíticos del mismo.
2. El proceso de digestión ácida aplicado es rápido y resulta adecuado para las muestras determinadas en este estudio.
3. Las muestras, de forma general, presentan una mayor concentración en macroelementos. El Ca es el más alto de todos, aunque es significativamente superior en cladodio. Seguidamente, encontramos el K y Mg, siendo el K más elevado en la pulpa y el Mg en cladodios. También cabe destacar la piel por su alta concentración en Na.
4. Respecto a los elementos traza, tanto los esenciales como los no esenciales se puede concluir que el Fe, es el que se encuentra en una concentración superior, seguido de Ni y Zn en cladodios y Cr y Cu en pulpa.
5. En cuanto a los elementos tóxicos, la piel presenta una concentración superior de Al, mientras que los cladodios poseen una elevada cantidad de Cd. Por lo tanto, podemos decir que la parte comestible, la pulpa, es la menos tóxica ya que presenta menos cantidad de elementos tóxicos.
6. El *Opuntia ficus-indica* liofilizado es una fuente importante de elementos esenciales, necesarios para el funcionamiento normal del organismo.
7. Por lo tanto, las distintas partes liofilizadas de este alimento, (piel, fruto o cladodio), podrían ser incorporados en la elaboración de alimentos o suplementos alimenticios.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Andreu L, Nuncio-Jáuregui N, Carbonell-Barrachina AA, Legua P, Hernández F. Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. *J Sci Food Agric*. 2018;98(4):1566-73. doi: 10.1002/jsfa.8628.
2. ZENTENO-RAMIREZ, Gabriela et al. Evaluación de azúcares y fibra soluble en el jugo de variantes de tunas (*Opuntia* spp.). *Agrociencia*. 2015;49(2):141-52.
3. Jack A. Nutrient Guide. Food Composition Tables for more than 400 natural and conventional foods, Amberwaves, 2011
4. Jack A. AMERICA'S VANISHING NUTRIENTS: Decline in Fruit and Vegetable Quality Poses Serious Health and Environmental Risks, Amberwaves, 2005.
5. Torres-Ponce RL, Morales-Corral D, Ballinas-Casarrubias M, Nevarez-Moorillon GV. Nopal: semi-desert plant with applications in pharmaceuticals, food and animal nutrition. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*. 2015;6(5):1129-42.
6. Qiu YK, Zhao YY, Dou de Q, Xu BX, Liu K. Two new alpha-pyrone and other components from the cladodes of *Opuntia dillenii*. *Arch Pharm Res*. 2007;30(6):665-9.
7. Ferrer A. Intoxicación por metales. *Anales Sis San Navarra*. 2003; 26(Suppl1): 141-153.
8. Santiago-Lorenzo MR, López-Jiménez A, Saucedo-Veloz C, Cortés-Flores JI, Jaén-Contreras D, Suárez-Espinosa J. NUTRITIONAL COMPOSITION OF TENDER CACTUS STEMS PRODUCED UNDER MINERAL AND ORGANIC FERTILIZATION. *Rev. Fitotec. Mex*. 2016;39(4): 403 – 407.
9. Guevara-Arauz JC. Efectos biofuncionales del Nopal y la Tuna. *Horticultura internacional*. 2009;71:18-24
10. El-Beltagi H, Mohamed H, Elmelegy A, Eldesoky S, Safwa G. Phytochemical screening, antimicrobial, antioxidant, anticancer activities and nutritional values of cactus (*Opuntia ficus indica*) pulp and peel. *Fresenius Environ. Bull*. 2019;28(2A):1545–62.
11. FAO, Food and Agricultural Organization, 2018. In: Inglese, P., Mondragon, C., Nefzaoui, A., Sáenz, C. (Eds.), *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*. FAO, Roma, Italy.
12. Ammar I, Ennouri M, Bali O, Attia H. Characterization of two prickly pear species flowers growing in Tunisia at four flowering stages. *LWT - Food Science and Technology* 2014 November 2014;59(1):448-454. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.002>

13. Prieto-García F, Prieto Méndez J, Acevedo Sandoval OA, Canales Flores RA, Marmolejo Santillán Y. Chemical and physical characterization of *Opuntia* spp. seeds grown in Hidalgo State, Mexico. *Ciencia e investigación agraria*. 2016;43(1):143-150. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202016000100013>
14. Zúñiga-Tarango R, Orona-Castillo I, Vázquez C, Murillo-Amador B, Salazar-Sosa E, López-Martínez JD, et al. Root growth yield and mineral concentration of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. under different fertilization treatments. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 2009;11:53-68.
15. Bouzoubaâ Z, Essoukrati Y, Tahrouch S, Hatimi A, Gharby S, Harhar H. Phytochemical study of prickly pear from southern Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. June 2016;15(2):155-161. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.09.002>
16. BADALI web de nutrición. Universidad Miguel Hernández BADALI.umh.es
17. REGLAMENTO (CE) No 1924/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:012:0003:0018:ES:PDF>)



10. ANEXOS

Anexo I: Encuesta de Frecuencia de consumo de Opuntia.



ENCUESTA N.º

Soy una estudiante de la UMH y estoy realizando un estudio sobre los hábitos de consumo de higo chumbo (*OPUNTIA FICUS-INDICA*). Le agradecemos su colaboración y le aseguramos que sus respuestas solo se utilizarán con fines estadísticos y que serán tratados con total confidencialidad. Muchas gracias por su colaboración.

1. ¿Conoce los higos chumbos? (Marcar solo una opción)
 - Sí
 - No
2. ¿Conoce Vd. los beneficios del higo chumbo?
 - Sí
 - NO
 - Cite algunos.....
3. ¿Consume higos chumbos? (Marcar solo una opción)
 - Sí, habitualmente
 - Sí, una vez a la semana
 - Sí, una vez al mes
 - No
4. ¿Por qué consume higos chumbos? (Marcar una o más opciones)
 - Porque la calidad es mayor
 - Son respetuosos con el medio ambiente
 - Son beneficiosos para la salud
5. ¿En qué tipo de establecimiento compra generalmente los higos chumbos?
 - Directamente del productor
 - Mercado
 - Tienda de barrio
 - Tienda especializada
 - Supermercado
 - Otros
6. ¿Le resulta fácil encontrar higos chumbos? (Marcar solo una opción)
 - Sí, siempre
 - A veces
 - No
7. ¿Le gustaría que sus hijos consumiesen higos chumbos en el comedor del colegio? (Marcar solo una opción)
 - Sí
 - No
8. No consume higos chumbos porque.....
9. ¿Sabe usted cuándo es la temporada de higos chumbos? Indique el mes/meses.....

DATOS DEL ENTREVISTADO

10. Género

- Hombre
- Mujer

11. Su edad está comprendida en el intervalo de:

- Menor de 35 años
- Entre 35-65 años
- Más de 65 años

12. ¿Cuántas personas viven en su casa incluido usted?

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5 o más

13. ¿Actualmente se encuentra...?

- Trabajando
- Desempleado
- Estudiante
- Jubilado
- Actividad no remunerada (ama de casa)

14. ¿Usa gafas?

- Sí
- No

15. En caso afirmativo indique el tipo.....