

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA



UNIVERSITAS
Miguel Hernández

“TRABAJO DE FIN DE MÁSTER”

DETERMINACIÓN DE METALES Y DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE EN TUNA (*OPUNTIA FICUS-INDICA MILL*):
MICROBIOTA Y SALUD

CURSO:

2020/2021

ALUMNA:

Medico Beviá, Ana María

TUTORA:

García García, Elena

Beltrá García-Calvo, Marta

ELCHE – ESPAÑA

2021

Dña. Elena García García, Doctora y Profesora Titular del área de Nutrición y Bromatología, del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Dña. Marta Beltrá García-Calvo, Doctora y Profesora Asociada del área de Nutrición y Bromatología, del Departamento de Biología Aplicada de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“DETERMINACIÓN DE METALES Y DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN TUNA (*OPUNTIA FICUS-INDICA* MILL): MICROBIOTA Y SALUD”

Y que constituye la Memoria del Trabajo de Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

Dña. Ana María Medico Beviá

Ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Bioingeniería.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 1 de septiembre de 2021.

Fdo.: Prof. Elena García García

Fdo.: Prof. Marta Beltrá García-Calvo

RESUMEN

El nopal, (*Opuntia ficus-indica*), pertenece a la familia Cactaceae. Su distribución geográfica cubre principalmente México y Latinoamérica; en España, la tuna se distribuye especialmente a lo largo de la costa mediterránea. Estudios recientes han demostrado que el consumo de *Opuntia ficus-indica* tiene importantes beneficios para la salud, principalmente por sus propiedades antioxidantes.

La microbiota intestinal es considerada una nueva diana para la prevención y manejo nutricional de alteraciones inflamatorias y metabólicas asociadas a enfermedades crónicas no transmisibles. Así mismo, estudios recientes demuestran que la obesidad está asociada con un desequilibrio en la microbiota.

Los metales de la dieta, como nutrientes críticos, tienen el potencial de cambiar la distribución y la función de la microbiota. Varios estudios señalan cómo las concentraciones luminales de los metales de la dieta, cambian las poblaciones microbianas en los intestinos. Las disbiosis inducidas por metales pesados pueden afectar a las funciones metabólicas y fisiológicas, contribuyendo así, en parte, al desarrollo o progresión de diversas enfermedades en el hospedador.

Así mismo, los polifenoles pueden prevenir o revertir la progresión de los procesos de la enfermedad a través de distintos mecanismos. En particular, la relación entre los polifenoles y la microbiota intestinal, recientemente revelada gracias a herramientas basadas en ADN y la secuenciación de última generación, reveló el papel regulador central de los polifenoles dietéticos y sus metabolitos intestinales en el metabolismo energético del huésped y enfermedades relacionadas. Se destaca el poder de los fitoquímicos dietarios que se transforman en metabolitos que ejercen actividades biológicas en ocasiones con mayor potencia que las moléculas iniciales. Investigaciones recientes encontraron que el aumento de la dosis de prebióticos, entre los que se encontrarían los polifenoles de la fruta, condujo a cambios significativos en las colonias bacterianas de la microbiota intestinal.

Evidencias suficientes mostraron que la dieta puede alterar la composición microbiana intestinal y los componentes de los alimentos como los polifenoles, pueden aumentar o disminuir las especies microbianas beneficiosas y nocivas en la microbiota intestinal. El objetivo de este estudio es determinar la cantidad de metales presentes en cladodio, pulpa y piel de *Opuntia ficus-indica*, así como la capacidad antioxidante medida a través de los polifenoles, flavonoides y carotenos. Y como la presencia o ausencia de antioxidantes y de metales, podría afectar a la calidad o funcionalidad de la microbiota intestinal.

Palabras clave: *Opuntia*, metales, capacidad antioxidante, microbiota, salud, nopal.

ABSTRACT

The nopal, (*Opuntia ficus-indica*), belongs to the Cactaceae family. Its geographical distribution mainly covers Mexico and Latin America; in Spain, the prickly pear is especially distributed along the Mediterranean coast. Recent studies have shown that the consumption of *Opuntia ficus-indica* has important health benefits, mainly due to its antioxidant properties.

The intestinal microbiota is considered a new target for the prevention and nutritional management of inflammatory and metabolic disorders associated with chronic non-communicable diseases. Likewise, recent studies show that obesity is associated with an imbalance in the microbiota.

Dietary metals, as critical nutrients, have the potential to change the distribution and function of the microbiota. Several studies indicate how the luminal concentrations of metals in the diet change the microbial populations in the intestines. Heavy metal-induced dysbiosis can affect metabolic and physiological functions, thus contributing, in part, to the development or progression of various diseases in the host.

Likewise, polyphenols can prevent or reverse the progression of disease processes through different mechanisms. In particular, the relationship between polyphenols and the gut microbiota, recently revealed thanks to DNA-based tools and state-of-the-art sequencing, revealed the central regulatory role of dietary polyphenols and their gut metabolites in host energy metabolism and related diseases. The power of dietary phytochemicals that are transformed into metabolites that exert biological activities at times with greater potency than the initial molecules is highlighted. Recent research found that increasing the dose of prebiotics, including fruit polyphenols, led to significant changes in the bacterial colonies of the gut microbiota.

Sufficient evidence showed that diet can alter the intestinal microbial composition and food components such as polyphenols can increase or decrease beneficial and harmful microbial species in the intestinal microbiota. The objective of this study is to determine the amount of metals present in cladodes, pulp and skin of *Opuntia ficus-indica*, as well as the antioxidant capacity measured through polyphenols, flavonoids and carotenes. And as the presence or absence of antioxidants and metals, it could affect the quality or functionality of the intestinal microbiota.

Keywords: *Opuntia*, metals, antioxidant capacity, microbiota, health, nopal.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	7
1.1. Actividad biológica y aplicaciones en la salud de los componentes de <i>Opuntia ficus-indica</i>	7
1.2. Relación entre microbiota y compuestos con actividad biológica presentes en <i>Opuntia s.s.</i>	9
1.2.1. Metales en la dieta y microbiota intestinal.....	9
1.2.2. La microbiota y su relación con los antioxidantes de la dieta	10
1.3. Compuestos con actividad antioxidante de interés, encontrados en <i>Opuntia ficus-indica</i>	12
1.3.1. Betalaínas.....	12
1.3.2. Carotenoides.....	13
1.3.3. Polifenoles.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	17
3.1. Encuesta de frecuencia de consumo de <i>Opuntia ficus-indica</i>	17
3.2. Materiales y métodos empleados para la determinación de metales.....	17
3.2.1. Equipos de laboratorio empleados.....	17
3.2.2. Obtención y procesamiento de las muestras para ser analizadas.....	19
3.2.2.1. Liofilización.....	20
3.2.2.2. Molienda.....	20
3.2.2.3. Digestión y mineralización.....	21
3.2.3. Determinación de metales por ICP-MS.....	21
3.3. Material y métodos empleados para la determinación de la capacidad antioxidante.....	24
3.3.1. Cuantificación de polifenoles totales.....	24
3.3.2. Análisis de flavonoides por el método de cloruro de aluminio.....	26
3.3.3. Análisis de polifenoles y flavonoides por HPLC.....	29
3.3.4. Análisis de betalaínas.....	30
3.3.5. Análisis de carotenoides por HPLC.....	31
3.3.6. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Encuesta de frecuencia de consumo de <i>Opuntia ficus-indica</i>	34
4.2. Determinación de metales por ICP-MS.....	38
4.3. Determinación de la capacidad antioxidante.....	46
5. CONCLUSIONES.....	53
6. BIBLIOGRAFIA.....	54
7. ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El nopal (*Opuntia ficus-indica*), comúnmente conocido, entre otros nombres, como higuera, palera, tuna, chumbera, es una especie arbustiva del género *Opuntia* de la familia de las cactáceas y está presente en zonas áridas y semiáridas. En los últimos tiempos, se han publicado numerosos estudios sobre los beneficios nutricionales y de salud de esta cactácea (El-Mostafa et al., 2014). Esta planta es notablemente rica en polifenoles, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos. Los compuestos identificados y sus derivados han mostrado poseer actividad por su ingesta en humanos, muy relevantes incluyendo la antiinflamatoria, antioxidante, hipoglucémica, antimicrobiana y neuroprotectora, entre otras.

El género *Opuntia*, incluye especies que producen frutas comestibles muy nutritivas, así como, tallos, conocidos como cladodios, los cuales son consumidos como vegetales. México es considerado uno de los lugares con mayor diversidad genética de los nopales (géneros *Opuntia spp* y *Nopalea spp*).

La tuna (el fruto), tiene tres componentes que pueden ser utilizados comercialmente: las semillas, la cáscara y la pulpa. Contiene aproximadamente un 85% de agua, un 15% de azúcares, un 0.3% de cenizas y menos del 1% de proteína. La pulpa es una fuente de minerales y varios aminoácidos (alanina, arginina y asparagina), vitaminas como las vitaminas C (ácido ascórbico), E, K y β -carotenos, también incluye flavonoides y betalaínas, los cuales son responsables de la actividad antioxidante (Cota-Sánchez et al., 2016).

Varios autores han realizado estudios acerca de la composición química de la tuna (Sawaya et al., 1983); (Sepúlveda & Sáenz, 1990); (Ewaidah & Hassan, 1992); Cacioppo, 1992; Sáenz et al., 1995a; (de Chávez et al., 1995); (Vélez-Gutierrez & Rodríguez-Garay, 1996); (Vélez-Gutierrez & Rodríguez-Garay, 1996); (Sáenz & Sepúlveda, 2001)).

1.1. Actividad biológica y aplicaciones en la salud de los componentes de *Opuntia ficus-indica*

Una serie de actividades biológicas han sido estudiadas y atribuidas a *Opuntia*, entre ellas, algunas con potencial en aplicaciones en la salud y otras en aplicaciones en nutrición. En los próximos párrafos se describen las actividades más destacadas.

Medicinalmente la tuna y sus extractos se han usado en el tratamiento de la diabetes, el colesterol y enfermedades del sistema inmune. Los polisacáridos extraídos de *Opuntia ficus-indica* han sido usados

para proteger al hígado del daño producido por los pesticidas organofosforados, en la medicina tradicional China se ha usado para el tratamiento del dolor y la inflamación y como agente contra las picaduras de serpientes (Cota-Sánchez et al., 2016).

Quizás las actividades de *Opuntia* con aplicaciones en la salud humana más importantes son la actividad anti ulcerosa, la antiinflamatoria, la neuroprotectora, la antitumoral, la antiviral, la antidiabética, la hepatoprotectora, la actividad contra el daño renal y la antioxidante (Kaur, 2012).

En el caso concreto de las betalaínas presentes en la tuna, tienen un gran número de actividades entre las que se encuentran la actividad antioxidante, siendo esta actividad aún mayor que la de las antocianinas y la vitamina C, participan en la captación de radicales libres. Se ha estudiado su actividad beneficiosa en el cáncer de ovario y cáncer cervical y enfermedades cardiovasculares debido a que regulan las lipidemias, ya que inhiben la mieloperoxidasa, induciendo nitrato oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por captación de radicales lipo peroxilo. Así mismo, disminuyen el colesterol, los triglicéridos y LDL, incrementando las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Disminuyen los niveles de glucosa y el índice aterogénico. También se ha evidenciado actividad antimalárica debido a que actúan como agentes quelantes de los iones Ca^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+} , los cuales bloquean el transportador intracelular de colina de los parásitos. La actividad antimicrobiana de las betalaínas puede deberse a sus efectos adversos sobre la estructura, función y permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos, lo que eventualmente conduce a su muerte celular (Gengatharan et al., 2015).

Son numerosos los estudios llevados a cabo para recabar información sobre la composición mineral de la tuna, en el caso concreto de la tabla (**Tabla 1**), recopila la información proporcionada por los siguientes estudios: (1) (Askar & El Samahy, 1981). (2) (de Chávez et al., 1995). (3) (Sawaya et al., 1983). (4) (Sepúlveda & Sáenz, 1990). (5) (Vélez-Gutierrez & Rodríguez-Garay, 1996).

A continuación se muestra la composición mineral de la parte comestible de las tunas cultivadas en diferentes países.

Mineral	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
Ca	24,4	49,0	27,6	12,8	-
Mg	98,4	85,0	27,7	16,1	-
Fe	-	2,6	1,5	0,4	-
Na	1,1	5,0	0,8	0,6	1,64
K	90,0	220	161	217,0	78,72
P	28,2 ^a	-	15,4	32,8	-

Tabla1. Composición mineral de la pulpa de tuna (mg/100 g)

Por otra parte, los aceites de la semilla de la tuna previenen la diabetes inducida por aloxan en el ratón por administración oral debido a la inhibición de formación de radicales libres, o bien por la captación de los radicales producidos, por sus efectos sinérgicos de los compuestos antioxidantes y la capacidad de los ácidos grasos poliinsaturados para mejorar las células pancreáticas (Habtemariam, 2019). El extracto DWJ504 de las semillas de la tuna reduce la esteatosis hepática y la inflamación mediante la regulación de la lipogénesis hepática de novo y polarización de macrófagos contra la esteatohepatitis no alcohólica experimental inducida en ratones con una dieta alta en grasas (Kang et al., 2016).

1.2. Relación entre la microbiota y compuestos con actividad biológica encontrados en *Opuntia ficus-indica*

1.2.1. Metales en la dieta y microbiota intestinal:

Como ya se ha comentado, el intestino es un ecosistema complejo en el que cientos de especies bacterianas interactúan y llenan distintos nichos. Al igual que con cualquier ecosistema, la disponibilidad de recursos es una fuerza poderosa que dicta la estructura de la población y la limitación de los recursos impulsa la competencia entre especies e incluso individuos (Lopez & Skaar, 2018). Por ejemplo, la disponibilidad de oxígeno durante la inflamación provoca una interrupción, o disbiosis, de la microbiota al favorecer la expansión de Enterobacteriaceae.

En el caso del hierro, en la dieta tiene una eficiencia de absorción inferior al 20%, dejando la mayor parte de la absorción de hierro dentro de la luz intestinal a la microbiota (Jaeggi et al., 2015). Sin embargo, los estudios que examinan los efectos del hierro en la dieta sugieren que el hierro impulsa cambios en la microbiota que pueden resultar en una mayor susceptibilidad a las infecciones (Constante et al., 2017) (Jaeggi et al., 2015). Por ejemplo, la suplementación con hemo (una molécula de porfirina que contiene hierro) reduce la abundancia relativa de Firmicutes (Constante et al., 2017), que contiene miembros de la clase Clostridia, productor beneficioso de butirato.

Por otra parte, se han confirmado las complejas interacciones entre la microbiota intestinal y los metales pesados (MP), en los últimos años, especialmente en 2019 y 2020, el estudio de la relación entre ambos, ha aumentado enormemente. La exposición a metales pesados altera la microbiota intestinal y, a su vez, la microbiota intestinal afecta a la biotransformación de los metales pesados y por lo tanto sus efectos tóxicos. Por ejemplo, en ratones el Cd induce disbiosis intestinal que agrava la lesión hepática al aumentar la permeabilidad intestinal (Liu et al., 2020). Se trata de una relación bidireccional, donde la microbiota intestinal afecta la absorción y el metabolismo de los MP y puede afectar a la integridad de

la barrera intestinal, que a su vez, vuelve a afectar a la absorción de MP. La exposición a MP altera la composición, función y perfil metabólico de la microbiota intestinal. Hay evidencia epidemiológica de que los MP contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades metabólicas, y que la etiología y la progresión de éstas se deben a las alteraciones de la microbiota intestinal inducidas por los MP(Alonso, 2019).

A su vez, la microbiota intestinal altera la absorción y el metabolismo de los MP al actuar como una barrera física para la absorción de éstos y al alterar el pH, el equilibrio oxidativo y las concentraciones de enzimas de desintoxicación o proteínas involucradas en el metabolismo de MP. Se ha demostrado que los probióticos reducen la absorción de MP en el tracto intestinal, mejorando el “secuestro” (la desintoxicación) de los MP intestinales, esto lo logran modificando la expresión de las proteínas transportadoras de metales y manteniendo la función de barrera intestinal (Alonso, 2019).

1.2.2. La microbiota y su relación con los antioxidantes de la dieta:

Los polifenoles de la dieta pueden ser metabolizados por la microbiota intestinal del huésped a compuestos bioactivos, que a su vez pueden alterar dicha microbiota e influir en la salud del huésped (Koudoufio et al., 2020). Durante muchos años, los beneficios para la salud de los polifenoles se han atribuido a su capacidad antioxidante como captadores de radicales libres. Más recientemente se ha descrito que los polifenoles activan otras vías de señalización celular que no están relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) sino que están involucradas en la regulación metabólica (Sandoval et al., 2020). Es interesante, aunque todavía no se comprende bien, que se están acumulando pruebas sobre la influencia de los polifenoles de la dieta, percibidos como xenobióticos, sobre la modulación de la microbiota y la salud del colon.

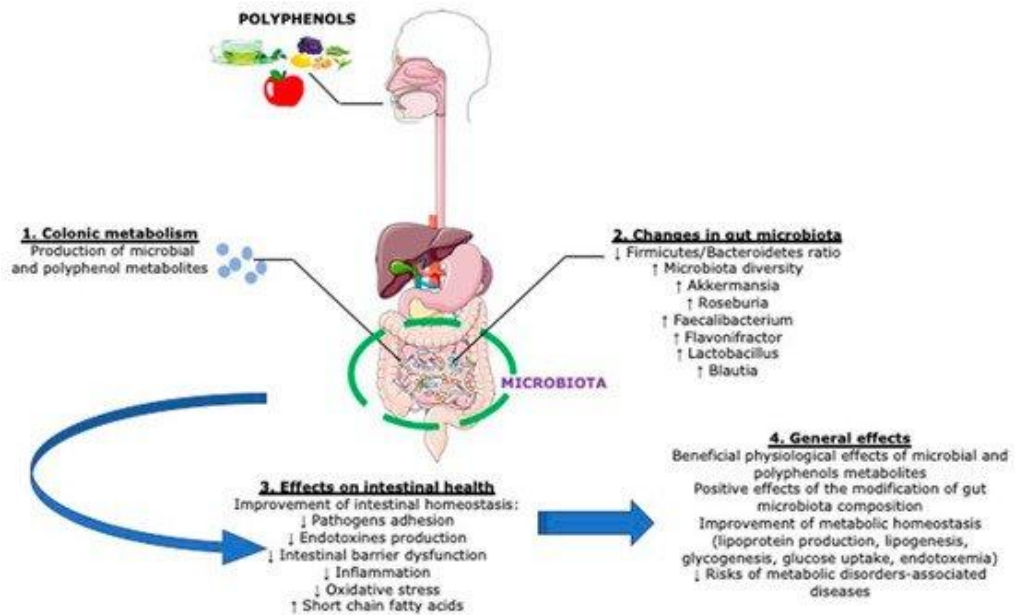


Figura 1. Acciones beneficiosas resultantes de la interacción entre polifenoles y microbiota intestinal.

Tal y como se muestra en la **Figura 1** (Koudoufio et al., 2020), donde se pueden observar diversas acciones beneficiosas resultantes de la interacción entre polifenoles y la microbiota intestinal.

Los estudios también han demostrado que la ingesta de polifenoles modula el perfil microbiano intestinal y regula la salud del huésped manteniendo la homeostasis, demostrando propiedades prebióticas. Sus efectos sobre el organismo del huésped son significativos, a pesar de su presencia en baja concentración (Mithul Aravind et al., 2021). Esta actividad prebiótica favorece el crecimiento de las bacterias beneficiosas, resultando en una menor disponibilidad de nutrientes para las bacterias patógenas, actuando así como agentes antimicrobianos frente a ellas (Espín et al., 2017).

El mayor consumo de alimentos ricos en polifenoles y su biodisponibilidad reduce el riesgo de diversas enfermedades crónicas no transmisibles (Espín et al., 2017). Los polifenoles ejercen estas actividades modulando enzimas críticas de los procesos metabólicos. Un estudio destaca que, mientras que los polifenoles mejoran la composición, diversidad y funciones de la microbiota, a través de sus acciones prebióticas, la microbiota intestinal los transforma en eficientes reguladores bioactivos capaces de optimizar la salud cardiometabólica en individuos sanos, al tiempo que alivia y mitiga el síndrome metabólico (SM) en los pacientes (Koudoufio et al., 2020). En términos de los efectos prebióticos beneficiosos, los polifenoles ejercen el resultado mejorando el crecimiento y establecimiento de bacterias probióticas como *Bifidobacteriaceae* y *Lactobacillaceae* e inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas como *E. coli*, *Clostridium perfringens* y *Helicobacter pylori* (Mithul Aravind et al., 2021).

Por otro lado, la microbiota intestinal mejora la homeostasis intestinal y la salud cardiometabólica al producir metabolitos polifenólicos. Los metabolitos polifenólicos, producidos por la microbiota intestinal una vez absorbidos y dirigidos a los tejidos y órganos diana, contribuyen a la salud metabólica, a través de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, al prevenir o reducir el riesgo de desarrollar varios trastornos cardiometabólicos (TCM), en gran medida el SM. En las últimas dos décadas, las estrategias para limitar los efectos nocivos del SM se han centrado en un régimen de dieta que contenga frutas naturales, verduras, cereales integrales, legumbres, probióticos, vitamina C, vitamina E y ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (Spahis et al., 2018) (Sabaté & Wien, 2015) (Esmailzadeh et al., 2005) (Mallappa et al., 2012).

La quercetina, es un polifenol perteneciente a los derivados de flavonoles, la cual ha atraído mucho interés del medio biomédico debido a sus propiedades beneficiosas en la prevención de enfermedades, a pesar de su limitada biodisponibilidad debido a su baja solubilidad, débil estabilidad en el tracto gastrointestinal superior y su rápido metabolismo. Sin embargo, las moléculas de quercetina que no pueden absorberse en el intestino delgado llegan al colon y las bacterias luminales las metabolizan en una serie de ácidos fenólicos (Blumberg et al., 2016). De hecho, las propiedades promotoras de la salud observadas en la quercetina podrían explicarse por los metabolitos mediados por la microbiota.

Por otro lado, la disminución de peso en la obesidad, un elemento importante en el desarrollo de SM, en respuesta al consumo de alimentos ricos en polifenoles, se ha atribuido al papel de sus metabolitos en el aumento del consumo de energía a través de la modulación de la diferenciación celular y la termogénesis en el tejido adiposo (Mele et al., 2017).

A continuación, se describen los contenidos en algunos compuestos de interés, tanto de la tuna de *Opuntia spp*, como de algunos otros componentes de la planta.

1.3. Compuestos con actividad antioxidante de interés, encontrados en *Opuntia ficus-indica*

El fruto o tuna, puede distinguirse por su color, el cual puede ser verde, amarillo, naranja y/o rojo, o bien por su forma y por la presencia o ausencia de espinas. Contiene un gran número de semillas, podría decirse que aproximadamente del 30 al 40% del peso húmedo de la fruta. Sin embargo, generalmente no son aprovechadas. Estas semillas, representan una importante fuente de ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, polifenoles, flavonoides y taninos. La semilla contiene un 25% de fibra cruda, la cual ha sido estudiada en cuanto a sus propiedades tecnofuncionales, principalmente su capacidad de absorción de agua y aceite, alcanzándose 1.6 y 7.1 g/g de harina, respectivamente, lo que posiciona

a la harina de semilla de tuna dentro de las mejores harinas usadas en alimentos para retención de agua y aceite. Adicionalmente se le determinó un 65% de fibra dietética total; siendo una alternativa viable en comparación con fuentes tradicionales.

El aprovechamiento de la tuna, genera una gran cantidad de residuos ya que la piel no se consume como alimento, pero podría servir como una posible fuente de grasas y proteína para consumo animal debido a que contiene un 3.8% (en base húmeda) de lípidos. La piel, también contiene componentes nutricionalmente importantes como los carotenos y tocoferoles (vitamina E). Los niveles de vitamina E en alta concentración y los α -tocoferoles constituyen aproximadamente un 80.5%, los β -tocoferoles un 10.2%, los γ -tocoferoles un 8% y los δ -tocoferoles un 1.20%. También se ha detectado vitamina K1 (1.09g/Kg) (Ramadan & Mörsel, 2003).

Se destaca, por haber sido objeto de los experimentos realizados para determinar la capacidad antioxidante de *Opuntia ficus-indica*: las betalaínas, los carotenoides y los polifenoles de los cuales se ha destacado los flavonoides.

1.3.1. Betalaínas

Las **betalaínas**, son pigmentos naturales hidrosolubles con nitrógeno en su estructura (**Figura 2**), que se sintetizan a partir del aminoácido tirosina. Las betalaínas se dividen en dos grupos: las betacianinas, las cuales contienen un residuo de ciclo-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA) y exhiben una coloración rojo-violeta; y betaxantinas, las cuales contienen diferentes cadenas laterales de aminoácidos o aminas y exhiben una coloración amarillo-naranja. Estos compuestos, tienen aplicación como colorantes naturales en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. En concreto, la betanina es el compuesto responsable del color rojo autorizado y clasificado como colorante natural de los alimentos. En las últimas décadas se han estudiado las propiedades saludables de estos compuestos, entre las que se pueden destacar su actividad antioxidante, antidiabética, antiinflamatoria y anticancerígena (Mancha et al., 2019).

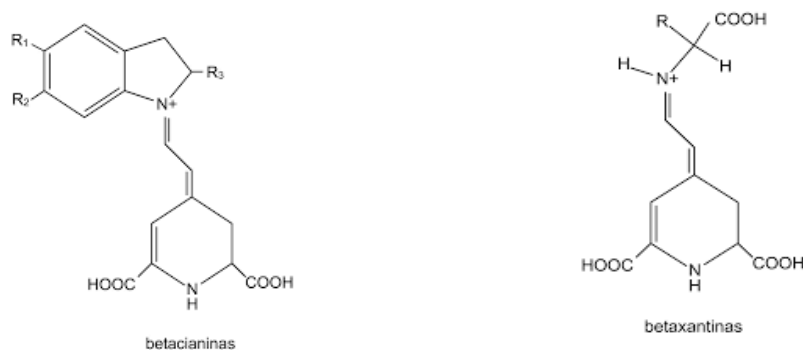


Figura 2. Estructura química de las betalaínas.

1.3.2. Carotenoides

Los **carotenoides**, son tetraterpenos naturales derivados de la unión de 8 unidades de isopreno, que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono. En general los carotenoides se clasifican en dos grandes grupos: carotenoides compuestos sólo de carbono e hidrógeno que se denominan carotenos y los que contienen oxígeno que se denominan xantofilas. Los carotenoides pueden presentar una estructura acíclica o cíclica de cinco o seis carbonos en uno o ambos extremos de la molécula. Dado el gran número de dobles enlaces de la cadena central, los carotenoides pueden existir en conformaciones cis/trans, aunque la más estable y por tanto presente en la naturaleza es la trans. Su cromóforo característico (al menos diez dobles enlaces conjugados) explica su coloración amarilla o anaranjada y su enorme sensibilidad a la oxidación.

En la figura siguiente (**Figura 3**), se muestra la estructura de seis carotenoides: el α -caroteno, β -caroteno y licopeno, pertenecen al grupo de carotenos y la β -criptoxantina, luteína y zeaxantina al de xantofilas.

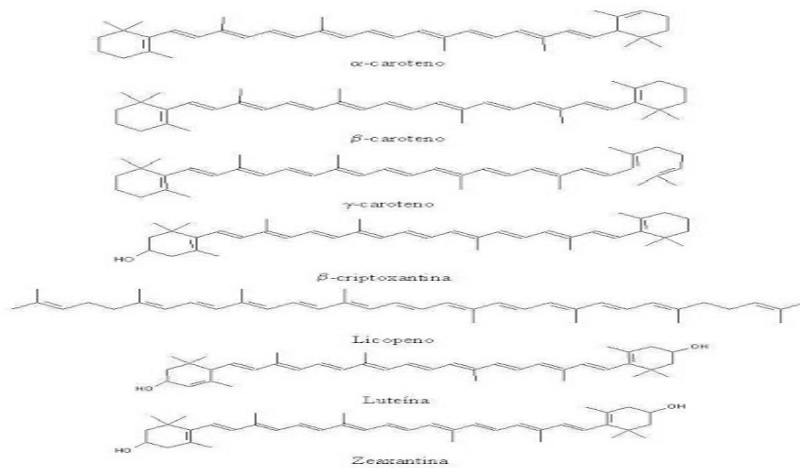


Figura 3. Estructura química de los carotenoides.

La luteína (**Figura 4**) pertenece al grupo de las xantofilas, de fórmula general $C_{40}H_{56}O_2$ y nombre sistemático β, ϵ -carotene-3,3'-diol. Este pigmento carotenoides es uno de los principales componentes de vegetales verdes, frutas de color naranja y yema de huevo, donde se puede encontrar libre o esterificada con ácidos grasos. La fuente más importante son los pétalos de flores de Tagete (*Tagete erecta*), en donde la luteína está químicamente ligada a varios tipos de ácidos grasos como el ácido láurico, mirístico y palmítico. Al saponificar el extracto de Tagete, se obtiene luteína libre. Específicamente los pigmentos carotenoides son compuestos liposolubles, que normalmente se extraen con solventes orgánicos tales como: acetona, éter de petróleo, benceno, hexano, éter dietílico, cloroformo, etanol y metanol (desventajas como: la degradación y pérdida de los componentes

bioactivos). La luz, el oxígeno y la alta temperatura promueven la degradación e isomerización de la luteína.

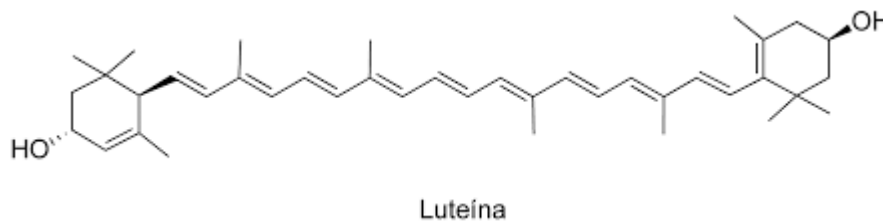


Figura 4. Estructura química de la luteína.

1.3.3. Polifenoles

Los **polifenoles**, son metabolitos secundarios de las plantas y son ricos en muchos alimentos vegetales como frutas, verduras, cereales y bebidas de café y té. Los polifenoles y fenólicos a menudo se usan indistintamente en la literatura. Según las características estructurales, los polifenoles / fenólicos se clasifican en ácidos fenólicos como el ácido benzoico y derivados del ácido cinámico, flavonoides y no flavonoides como estilbenos, lignanos y ácidos elágicos. Los flavonoides son el esqueleto difenilpropano de los polifenoles (Mithul Aravind et al., 2021). Los **flavonoides** son pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas, al consumirlos obtenemos de ellos propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. De esta última, principalmente, radica su función en el sistema nervioso, pues se ha visto relación de protección en enfermedades neurodegenerativas (Jiménez et al., 2009).

Dentro de los flavonoides, distinguimos los glicósidos de flavonol o flavonoides, son los flavonoides más ampliamente distribuidos en las plantas que forman parte de la dieta. Pueden variar en su color desde el blanco hasta el amarillo. Están representados principalmente por la quercetina, el kaempferol y la miricetina. La isorhamnetina, el derivado metilado de la quercetina, es también bastante común. (**Figura 5**).

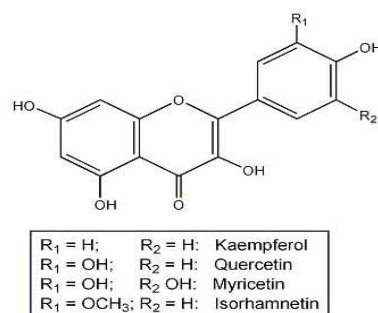


Figura 5. Resumen de la estructura de los flavonoles.

Los flavonoles se encuentran en las plantas casi siempre en forma de conjugados glicosilados. (Figura 6).

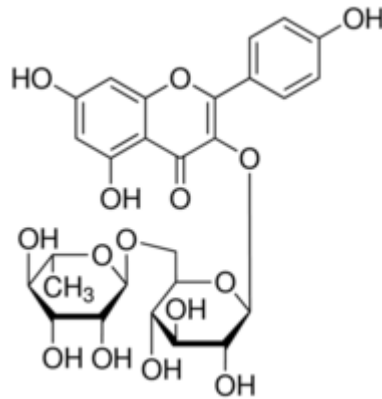


Figura 6. Estructura del Kaempferol 3-O- β -rutinoside.

Debido a que el Nopal, por sus posibles propiedades nutricionales podría ser perceptivo de incluirse, aumentar su consumo o utilizarse como suplemento en la dieta tradicional de distintos países como compuesto activo en la prevención de ciertas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares), se ha considerado interesante estudiar ciertos nutrientes presentes en *Opuntia ficus-indica* y su posible relación con la microbiota intestinal humana.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de fin de Máster (TFM), es determinar la concentración de metales, así como, la concentración de compuestos bioactivos antioxidantes, en pulpa, piel y cladodio de *Opuntia ficus-indica*. Así mismo, este objetivo nos permite plantear otros objetivos más específicos, tales como:

- Conocer los hábitos de consumo de *Opuntia ficus-indica*, para ello, se ha llevado a cabo una encuesta dirigida a la población general.
- Determinar la relación entre sus propiedades y su composición cuantitativa, es decir, en que parte de la planta se encuentran en mayores proporciones aquellos compuestos de interés.
- Y como la presencia o ausencia de antioxidantes y de metales, podría afectar a la calidad o funcionalidad de la microbiota intestinal.

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Encuesta de frecuencia de consumo de *opuntia*

La encuesta de frecuencia de consumo de *Opuntia*, fue redactada por el equipo de investigación en calidad y seguridad alimentaria de la Universidad Miguel Hernández perteneciente al campus de Orihuela. Esta encuesta consta de 13 preguntas (disponibles en el apartado de resultados), sobre variables sociodemográficas y sobre el consumo y grado de conocimiento de *Opuntia ficus-indica*. Para su contestación, debido al confinamiento parcial por la Covid-19, fue distribuida a través de redes sociales, a la población general. En concreto se elaboró un cuestionario con la aplicación de cuestionarios de Google y posteriormente se distribuyó a través de la App WhatsApp.

3.2. Materiales y métodos empleados para la determinación de metales

3.2.1. Equipos de laboratorio empleados:

La **balanza** que se ha utilizado para pesar las muestras de *Opuntia ficus-indica* es una balanza de precisión Mettler AE 240 (Estados Unidos).

Para la digestión de las muestras se utilizó una placa **Thermobloc Falc**, donde se introducen los tubos de cristal Pyrex que contienen las muestras. 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 se realizó con un **ICP-MS** (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente), Thermo Scientific ICP-MS Agilent 7500 series (**Figura 7**) propiedad del Dr. Eugenio Vilanova. Es una técnica relativa y altamente sensible 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 y 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 los elementos y las concentraciones son determinadas mediante una curva de calibración.



Figura 7: Equipo ICP-MS del laboratorio del Dr. Eugenio Vilanova.

Los **sistemas de extracción localizada**, o campana extractora, dispositivo mecánico cuya finalidad es captar los contaminantes liberados en un foco. Las campanas capturan, contienen y expulsan al exterior las emisiones generadas por sustancias químicas peligrosas y protegen al operador contra proyecciones y salpicaduras y permite la entrada de aire limpio, facilitando la renovación de aire del laboratorio ya que crea una depresión en el laboratorio que evita la salida de contaminantes a zonas anexas.

El **liofilizador** (Figura 8). Se trata de un método de conservación de alimentos, que consiste en deshidratar alimentos previamente congelados, y eliminando el hielo mediante un ligero calentamiento en vacío, así la transformación es directa de hielo a vapor sin pasar por el estado líquido.



Figura 8: Liofilizador. Cámara seca y condensador con circuito de refrigeración.

El liofilizador consta de tres partes, la cámara seca o cámara de liofilización es 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 vacío. Otra parte es el condensador con circuito de refrigeración, el cual 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). Por último tenemos, el sistema de vacío (**Figura 9**), el vacío se produce con una bomba de aceite que trabaja sobre 10-12 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 en la sublimación.



Figura 9: Bomba de vacío acoplada al liofilizador.

Otra herramienta empleada en el procesamiento de las muestras para la determinación de metales ha sido el **molinillo de café**, herramienta empleada en cocina para moler los granos de café, que puede usarse para moler otros alimentos.

3.2.2. Obtención y procesamiento de las muestras para ser analizadas:

Las muestras de *Opuntia ficus-indica* se recogieron en la zona del campo de Elche, concretamente en Salades (**Figura 10**) en el mes de octubre, se trata de muestras ya maduras, ya que el mejor mes para su **recolección** óptima es entre agosto y septiembre.



Figura 10. 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 lavaron los frutos y los cladodios, para eliminar las espinas y la tierra, se escurrieron y se secaron con papel absorbente. Seguidamente se cortaron la pulpa, la piel y los cladodios en trozos pequeños de aproximadamente 0,5 cm de diámetro y luego se guardaron en envases de plástico inerte, se evita utilizar papel de aluminio, para evitar una posible migración de minerales del papel de aluminio a la muestra. Una vez rotulados y llenos los recipientes con las muestras correspondientes, se utilizaron 2,5 frutos o partes de 2,5 cladodios por bote, se conservaron a - 80°C hasta su posterior liofilización.

3.2.2.1. Liofilización:

Todo el proceso de **liofilización** se realizó bajo el mismo protocolo, tanto para la pulpa, y la piel, como para el cladodio o tallo. Para ello se necesitó el 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 8**. 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, el cual se conservó a una temperatura negativa de -80°C.

3.2.2.2. Molienda:

Posteriormente se procedió a **molienda** de las muestras con el molinillo de café, hasta la obtención de un polvo muy fino (**Figura 11**).



Figura 11. Muestras de grano muy fino obtenido después del paso de la muestra liofilizada por el molinillo de **café**. Polvo de pulpa (amarillo), piel (naranja) y cladodios (verde).

Una vez obtenido el polvo fino, se homogeneizaron las muestras, así se evita la variabilidad entre los frutos o cladodios seleccionados, se procedió a mezclar tres muestras diferentes (cada una de las muestras 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 análisis final.

3.2.2.3. Digestión y mineralización:

Previo al análisis de las muestras mediante la técnica de ICP-MS, se procedió a la **digestión y mineralización** de las muestras. En este caso se utilizó, la mineralización por calentamiento en bloque de digestión

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 el bloque, 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 de contaminación.

Para la **digestión** de las muestras de pulpa, piel y cladodios, se pesaron 0,5g de las distintas muestras liofilizadas y siempre por triplicado, en tubos de plástico, se etiquetaron como pulpa (Pu); piel (Pi) y las de cladodio (Cl) (cada una de las muestras corresponde a la mezcla de 7,5 muestras sin liofilizar). Una vez pesadas las muestras se añaden 5mL de HNO_3 al 65 % (v/v). La mezcla se somete a una primera etapa de digestión en el Thermobloc a una temperatura de 60°C durante 30 min y en una segunda etapa a 120°C durante 180 min. Una vez pasado este tiempo, se dejaron enfriar y posteriormente se les sometió a una segunda digestión, pero esta vez se añadió 1mL de ácido perclórico al 60%, se volvieron a colocar en el Thermobloc a 120°C durante 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 10mL, enrasando a 10mL con agua ultra-pura Milli-Q. Las disoluciones así obtenidas (**Figura 12**) se conservaron a 4°C , para posteriormente medir su contenido de elementos minerales mediante la técnica ICP-MS.



Figura 12. Preparación de las muestras para ser analizadas.

3.2.3. Determinación de metales 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. El uso del 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 múltiples elementos. Los metales así analizados son 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 ICP- MS plasma inductivamente acoplado, se forma un plasma de gas argón, obtenido por la interacción de un campo de radiofrecuencia 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 problema en forma de aerosol. Los átomos de la muestra están sometidos a temperaturas entre 6000-8000°K, consiguiéndose una disociación casi completa y lográndose una reducción de las interferencias químicas. 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 cuantificándolos.

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

1. Elementos que presumiblemente no se encontraran presentes en *Opuntia ficus-indica*.
2. Que se tratara de mono isótopos.

Con estos patrones, se realizó 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 (Pi). La disolución Pi, se distribuyó mediante el uso de dispensador automático a tubos Falcon con 1 ml de Pi cada uno; 3 tubos para cada una de las muestras de cladodio, 3 para cada una de las muestras de piel, 3 para cada una de las muestras de pulpa, 15 tubos para los patrones de calibración y 10 tubos para blancos de laboratorio y para reserva. Se tomaron 5 ml de cada muestra problema y se agregaron a los tubos previamente preparados con 1 ml de Pi,

La señal de medida del ICP-MS, se obtiene a partir de las cuentas por segundo de cada disolución seriada del patrón. Para conseguir las curvas de calibrado correspondientes de 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 10nM 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 como patrones una serie de elementos a concentraciones 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.

3.3. Materiales y métodos empleados para la determinación de la capacidad antioxidante

3.3.1. Cuantificación de polifenoles totales:

El procedimiento de extracción para la cuantificación de polifenoles totales y actividad antioxidante se preparó según lo descrito por (Wojdyło et al., 2008). El contenido en fenoles totales (TPC) se midió utilizando el método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por (Chong et al., 2013) (**Figura 13**).

Se procedió a la preparación de un extracto, los experimentos se realizaron por triplicado, tomándose muestras de liofilizado de piel, cladodio y pulpa. En el caso de la piel, se pesó aproximadamente 0,1g de muestra liofilizada, se agregó una preparación de disolvente MeOH + HCl 1,5N, obteniéndose finalmente un volumen final de extracto de 6ml.

El ácido gálico es usualmente utilizado como estándar para producir la curva de calibración. El contenido fenólico total se expresa en equivalentes de ácido gálico (GAE) (**Figura 14**).

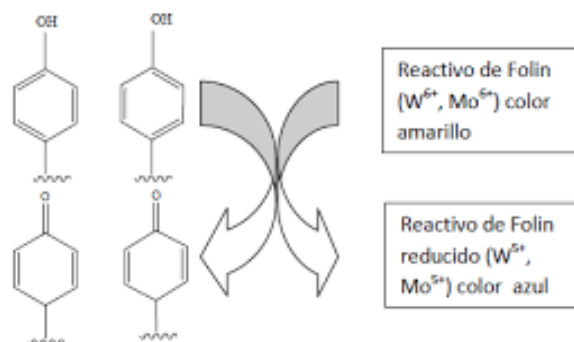


Figura 13. Reacción ensayo de **Folin-Ciocalteu**.

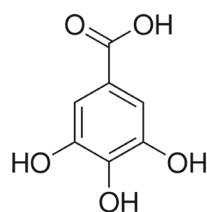


Figura 14. Molécula de ácido gálico.

La preparación de las soluciones se describe a continuación:

- Reactivo Folin-Ciocalteu 10% (v/v): Se diluye 1ml de reactivo de Folin-Ciocalteu/Folin-Denis en 9 ml de agua desionizada.
- Carbonato de sodio al 2% (p/v): se disuelve 2g de carbonato de sodio en 100ml de agua desionizada-
- Solución madre ácido gálico: se disuelven 10mg de ácido gálico en un matraz volumétrico de 25ml con metanol. Se debe anotar el peso exacto de ácido gálico y calcular su concentración dependiendo la riqueza.
- Soluciones patrón: a partir de la solución madre de ácido gálico preparar los patrones mediante dilución seriada 2/3. (**Figura 15**).
- Solución muestra: se transfieren 70 - 100 mg de solución madre a un tubo con tapón de 10mL. Se agregan 5ml de metanol y 1ml de HCl 1,5N. Se somete a ultrasonidos durante 30 minutos a 45°C. Se hace pasar la solución a través de un filtro si es necesario. Las cantidades de muestra se deben ajustar según los resultados iniciales.
- Se prepararon tres muestras de cada producto a analizar.

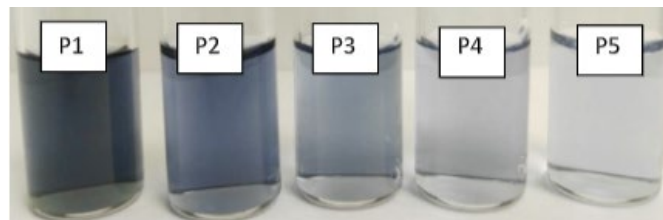


Figura 15. Análisis colorimétrico, recta patrón de ácido gálico

Finalmente para llevar a cabo el procedimiento de análisis, en un tubo de vidrio se han añadido 100µL de la solución muestra/patrón y 1ml del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10%, pasados 8 minutos se ha añadido 1ml de carbonato de sodio al 2% y 1ml de agua. Se homogeniza mediante agitación manual y se incuba a temperatura ambiente durante 1h. Para los blancos se, prepara un tubo que contenga todos los reactivos, pero sin adición de muestra, con 100µL de metanol, 1ml del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% y 1ml de carbonato de sodio al 2% y, por otro lado, se prepara un tubo que contenga 1ml de agua (en remplazo del reactivo de Folin-Ciocalteu), 100µL de la solución muestra y 1ml de carbonato de sodio al 2%

Trascurrido una hora, se procede a leer la absorbancia en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 765nm. Los resultados se expresan como equivalente de ácido gálico, que es la referencia en la curva de calibración.

3.3.2. Análisis de flavonoides por el método de cloruro de aluminio

El uso de cloruro de aluminio (AlCl_3) en el diagnóstico de la presencia de determinados grupos químicos se empleó primero para antocianinas. En 1954, Harborne sugirió el uso de cloruro de aluminio para la determinación espectrofotométrica de la presencia de determinados grupos químicos en flavonoides.

Recientemente, se ha propuesto el uso de métodos espectrofotométricos para la determinación de flavonoides totales en las plantas, utilizando AlCl_3 . En 1992 desarrollaron un método para determinar el contenido de flavonoides en una planta mediante la adaptación del método descrito por Dowd en 1959 para quercetina, que se basa en el uso de cloruro de aluminio. Éste último ha sido el método empleado.

El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en presencia de metanol. El complejo se forma con los grupos hidroxil-cetona vecinos (**Figura 16**). Se produce, en el análisis espectrofotométrico, un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales. Se utiliza como patrón la quercetina (**Figura 17**) y los resultados se expresan como equivalentes de mg de quercetina/g muestra.

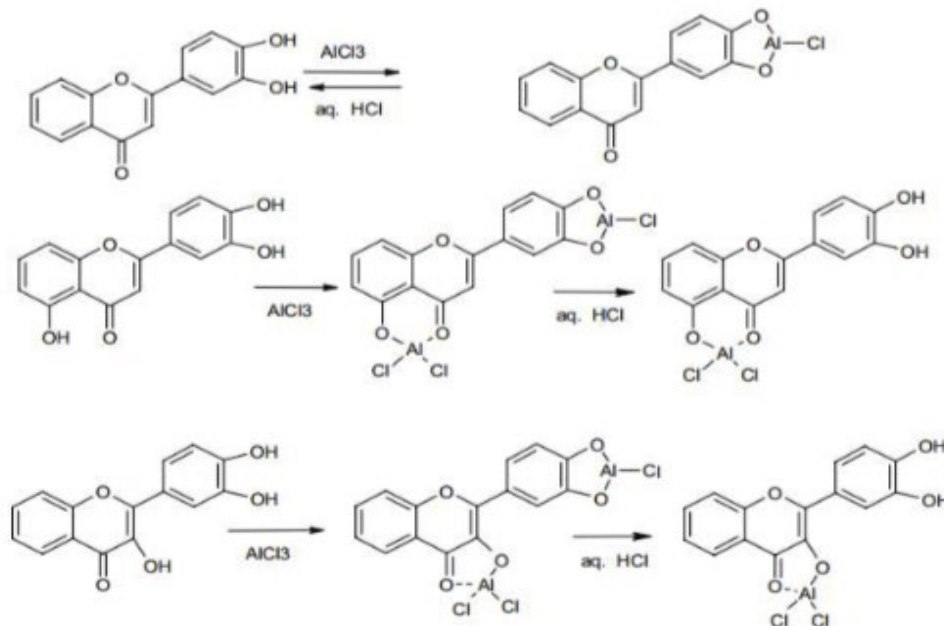
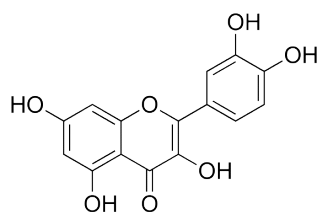


Figura 16. Reacciones método colorimétrico de cloruro de aluminio.



Quercetina

Figura 17. Estructura de la Quercetina.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Diluyente: se prepara la cantidad necesaria de metanol:agua (60:40).
- Soluciones patrón de quercetina: se prepara una solución madre diluyendo 50mg de quercetina en el diluyente en un matraz volumétrico de 50mL, someter unos minutos a ultrasonidos si es necesario. Las cantidades son aproximadas, se debe tener en cuenta el peso exacto para realizar los cálculos y la riqueza. Se realiza una dilución de 1:5 para preparar el patrón 1 y a continuación, a partir del patrón 1 se realizan diluciones seriadas a 1:2 para preparar los 4 patrones siguientes (**Figura 18**).
- Solución muestra: se transfieren 70 - 100mg de la solución patrón de quercetina a un tubo con tapón de 10mL. Se agregan 5ml de metanol y 1ml de HCl 1,5N. Se somete a ultrasonidos durante 30 minutos a 45°C. Se pasa la solución a través de un filtro si es necesario. Las cantidades de muestra se deben ajustar según los resultados iniciales. Se deben preparar tres muestras de cada producto a analizar. Es importante realizar un estudio preliminar para comprobar que la concentración de la muestra es la adecuada. Si la absorbancia de la muestra queda por encima o por debajo en la recta patrón se deben ajustar las cantidades.
 - Solución cloruro de aluminio del 10%: se pesan 2g de tricloruro de aluminio, se añaden en un matraz volumétrico de 20ml y se disuelven con agua destilada a volumen. Se somete a ultrasonidos si es necesario.
 - Solución de acetato de potasio 1M: se pesan 1.963g de acetato de potasio, se añaden en un matraz volumétrico de 20ml y se disuelven con agua destilada a volumen. Se somete a ultrasonidos si es necesario.

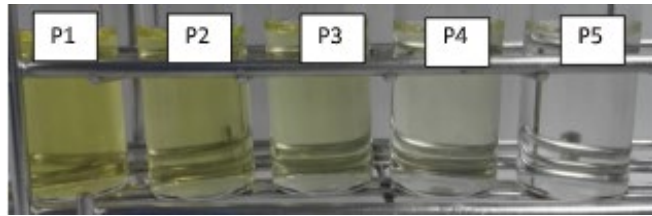


Figura 18. Análisis colorimétrico, recta patrón de Quercetina.

Para llevar a cabo el procedimiento de análisis, en un tubo de ensayo con tapón adecuadamente etiquetado o rotulado, se agrega 500µL de solución muestra/patrón se mezclan con 4mL de diluyente, 100µL de cloruro de aluminio al 10% y 100µL de acetato de potasio 1M. Se debe preparar un tubo adicional por cada muestra o patrón que servirá de blanco de la muestra, donde se sustituyen los 100µL triclorigen de aluminio al 10% por 100µL de metanol y se sigue el mismo procedimiento. Los tubos preparados se tapan y se homogenizan correctamente. Después se incuban a temperatura ambiente y protegidos de la luz durante 30 minutos, finalmente se filtra la solución resultante para evitar la presencia de partículas en suspensión y se mide la absorbancia a 415nm.

La rutina, también llamada rutósido, soforina o por su nombre en inglés rutin, es un flavonoide del tipo glucósido, reconocido también como quercetin-3-rutinósido. A través de la hidrólisis enzimática da lugar a otros dos elementos, como la rutinosa y la quercetina. El primero de ellos se trata de un disacárido, mientras que el segundo es el flavonoide.

A partir de estos valores se calcula el porcentaje de flavonas y flavonoles como % de quercetina/g producto. Para ello, se debe interpolar la concentración de cada una de las rectas patrón. Es importante corregir las absorbancias teniendo en cuenta los diferentes blancos medidos.

3.3.3. Análisis de polifenoles y flavonoides por HPLC

El material que se ha empleado para llevar a cabo este análisis ha sido tubos de ensayo, pipetas, puntas de pipeta, vasos de precipitados, jeringas, viales y tapones HPLC y filtros de membrana de 0,45 µm. Los reactivos que se han empleado, han sido acetonitrilo NAS: 75-05-8, metanol NCAS: 67-56-1, ácido fosfórico NCAS: 7664-38-2, agua Milli-Q, estándar Quercetina NCAS: 6151-25-3, estándar Kaempferol NCAS: 520-18-3, estándar Isorhamnetina NCAS: 480-19-3 y ácido clorhídrico NCAS: 7647-01-0. A su vez los equipos que se han empleado, han sido el ultrasonidos, la balanza, el HPLC Agilent 1260, con columna ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6 x 100mm (3,5µm) y el baño o thermobloque.

Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución muestra: se transfieren 70-100mg de extracto a un tubo con tapón de 10ml. Se agregan 5ml de metanol y 1ml de HCl 1,5N. Se somete a ultrasonidos durante 30 minutos a 45°C. Calentar en un baño de vapor durante 25 minutos (poner papel de aluminio para evitar la luz) y enfriar a temperatura ambiente en un baño de hielo. Se filtra con filtro de membrana de 0,45µm.
- **Fase móvil A: Ácido fosfórico 0,1% (Tabla 2)**
- **Fase móvil B: Metanol (Tabla 2)**
- Solución estándar de Quercetina: 20mg en 50ml de metanol, dilución 1/100
- Solución estándar de Kaempferol: 10mg en 20ml de metanol, dilución 1/100.
- Solución estándar de Isorhamnetina: 10mg en 250ml de metanol, dilución 1/4.

Tiempo (min)	A. fosfórico 0,1% (%)	Metanol (%)
0	95	5
15	70	30
30	70	30
40	50	50
50	50	50
55	0	100
60	0	100
61	95	5
66	95	5

Tabla 2. Análisis de polifenoles y flavonoides. Gradiente para las fases móviles.

Para el análisis cromatográfico se ha utilizado el HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity, con las siguientes condiciones de trabajo, columna ZORBAX Eclipse Plus C18 4,6 x 100mm (3,5µm), a una temperatura de 40°C. La detección se realiza con el detector UV a 254nm y 360nm (flavonoides). La velocidad de flujo de 1mL/min y el volumen de inyección de 10µL. Finalmente se establece el gradiente para las fases móviles (ver **Tabla 2**).

3.3.4. Análisis de betalaínas

El contenido de betacianinas y betaxantinas se ha cuantificado según lo descrito por Castellanos-Santiago y Yahia (2008)(Castellanos-Santiago & Yahia, 2008), mediante la lectura de absorbancia de los extractos a 538 y 483nm.

Para preparar la solución muestra, se pesan cerca de 300mg de muestra liofilizada, los cuales se transfieren a un matraz volumétrico de 25ml, posteriormente se añaden 20ml de metanol y todo ello se somete a ultrasonidos durante 30 minutos y se diluye con metanol hasta completar los 25ml. A continuación, se mide la absorbancia a 535 y 480nm (utilizando metanol como blanco). A la hora de proceder al análisis, se lleva a cabo la conversión de las unidades de absorbancia en unidades de concentración, para ello se ha utilizado la siguiente ecuación:

$$B \text{ (mg/g)} = (x \text{FD} \times \text{PM} \times \text{V}) / (\epsilon \times \text{P} \times \text{L}),$$

Donde:

B es betacianinas o betaxantinas (es la absorbancia a 538nm para betacianinas y 483nm para betaxantinas),

FD es el factor de dilución al momento de leer en el espectrofotómetro,

PM es el peso molecular (Betanina= 550g/mol e Indicaxantina= 308g/mol),

V es el volumen del extracto,

ε es el coeficiente de extinción molar (Betanina= 60.000L/mol.cm, e Indicaxantina= 48.000L/mol.cm)

L es la longitud de la celda (1cm).

3.3.5. Análisis de carotenoides por HPLC

Tomando especial precaución en el manejo de la muestra, debido a que los carotenoides sufren degradación por el calor, por lo cual, se deben evitar exposiciones prolongadas al mismo. Durante las extracciones y separaciones por cromatografía, se utilizan solventes que luego es necesario eliminar; por ello se recomienda el uso de solventes de bajo punto de ebullición y evaporar a presión reducida. No es recomendable llegar a temperaturas mayores de 40°C. Debido a la susceptibilidad de los carotenoides a ser oxidados, se recomienda trabajar en atmósferas inertes (nitrógeno).

La preparación de las soluciones se describe a continuación:

- Diluyente: 50 mg/L Butilhidroxitolueno en metanol.
- Solución estándar de Luteína: 5mg de Luteína en 25ml de Hexano: acetato de etilo 3:1. Se realiza una dilución 1/10.
- Solución muestra: Tras realizar estudios iniciales, se pesan 137mg y se trasvasan a un tubo de ensayo con tapón se añaden 3 ml de agua desionizada, 200μL de proteasa y 50mg de butilhidroxitolueno. Se somete a ultrasonidos durante 30 minutos a 40°C. Se deja enfriar los tubos a temperatura ambiente. Se añaden 3ml de acetato de etilo y se agita vigorosamente. Se

centrifuga durante 5 minutos a 3000rpm. Se guarda la capa superior y a la capa inferior se le añaden 3ml de acetato de etilo y se repite el proceso de extracción hasta que la capa superior sea incolora (mínimo 3 extracciones). Se juntan todas las capas superiores extraídas, se filtra o centrifuga para eliminar precipitados y se evapora el disolvente en el rotavapor a 30°C. Se resuspende el producto obtenido en diluyente (50mg/L Butilhidroxitolueno en metanol). Se filtra con filtro de jeringa de 0,45µm.

- Fase móvil A: Metanol: terc-butil metil éter: agua (80:12:2) 0,04% acetato de amonio.
- Fase móvil B: Metanol: terc-butil metil éter: agua (8:92:2) 0,04% acetato de amonio.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
5	100	0
7	90	10
27	50	50
27,5	0	100
29	0	100
30	100	0
35	100	0

Tabla 3. Análisis de carotenoides. Gradiente para las fases móviles.

El análisis cromatográfico se ha llevado a cabo en el HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity, utilizando las siguientes condiciones experimentales, columna Acclaim C30 4,6 x 2500mm (5µm) a una temperatura de 40°C. La detección se realiza con el detector UV a 450nm. La velocidad de flujo es de 0,95mL/min y el volumen de inyección de 20µL. Finalmente se establece el gradiente para las fases móviles (**Tabla 3**).

3.3.6. Determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS

El método ABTS + se llevó a cabo según lo descrito por Re et al. (1999). Consiste en evaluar la capacidad de las muestras para atrapar el radical catiónico ABTS ●+. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en milimoles equivalentes de Trolox/g muestra.

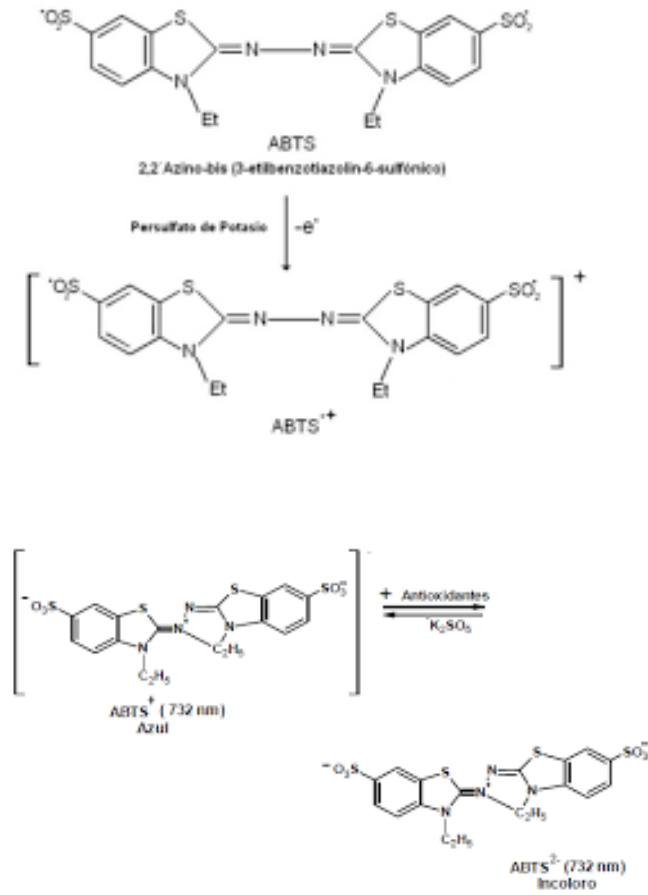


Figura 19. Formación del radical ABTS.

La preparación de las soluciones se describe a continuación:

- Solución muestra: se transfieren 70-100mg de extracto a un tubo con tapón de 10mL. Se agregan 5ml de metanol y 1ml de HCl 1,5N. Se somete a ultrasonidos durante 30 minutos a 45°C. Se pasa la solución a través de un filtro si es necesario. Las cantidades de muestra se deben ajustar según los resultados iniciales. Se deben preparar tres muestras de cada producto a analizar. Es importante realizar un estudio preliminar para comprobar que la concentración de la muestra es la adecuada. Si la absorbancia de la muestra queda por encima o por debajo en la recta patrón se deben ajustar las cantidades.
- ABTS 7mM: Para preparar 10ml, se disuelven 0,0384g de sal amónica cristalizada de ABTS en 10ml de agua destilada (valores aproximados, se calcula la concentración según la cantidad pesada).
- Solución persulfato potásico 2,45mM: Para preparar 100ml, se disuelven 0,0662g del reactivo en 100 ml de agua destilada (valores aproximados, se calcula la concentración según la cantidad pesada).

Para preparar el radical ABTS ●+ se mezclan a partes iguales la solución de ABTS 7mM y la de persulfato potásico 2,45mM. El persulfato potásico y el ABTS reaccionan estequiométricamente (1:0.5). La mezcla se mantiene en oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 horas para la formación del radical (solución azul-verde). Esta solución es estable durante dos días. La solución de ABTS ●+ se diluye con etanol o buffer (pH 7,4) para obtener una absorbancia de 0,7 a 734nm (esto se consigue mezclando 2,5ml de la solución del radical con aproximadamente 100ml de etanol).

Para realizar la curva patrón de Trolox, inicialmente se prepara la solución madre disolviendo 38mg de Trolox en 25ml de metanol al 50%, se somete a ultrasonidos si es necesario. A partir de esta solución se hacen las diluciones (**Tabla 4**) que serán los distintos puntos de la recta. El patrón se debe preparar cada vez que se vaya a medir, ya que es inestable. Cada muestra preparada y los patrones se analizan por triplicado ya que los resultados son muy variables.

	Concentración Trolox (μM)*
P1	1200
P2	600
P3	300
P4	150
P5	75

Tabla 4. Diluciones realizadas para la curva patrón Trolox.

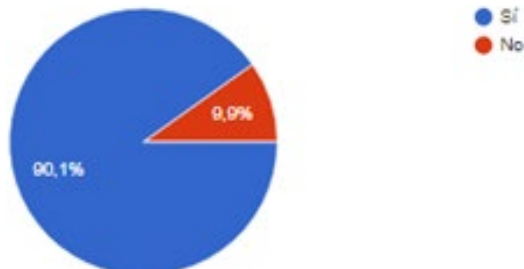
*Concentración aproximada, depende de la cantidad pesada de patrón y de la riqueza.

Finalmente para llevar a cabo el análisis, se mezclan 3mL de la solución resultante (radical ABTS ●+) con 30 μL de la muestra o solución patrón a analizar, homogeneizando adecuadamente para que la reacción tenga lugar. Se utiliza metanol como blanco. Se mide a 734nm la absorbancia inicial (antes de añadir la muestra) y la absorbancia final a los 6 minutos, la diferencia de lectura de las dos absorbancias es el % de inhibición y se interpola con una curva de calibración de Trolox; los resultados son expresados como equivalentes de Trolox (μM equivalente de Trolox/g producto).

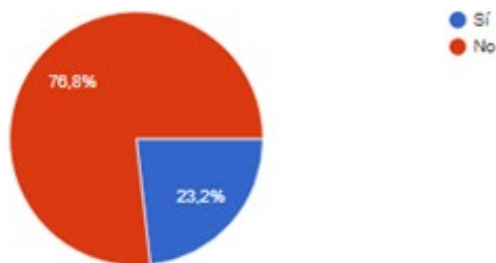
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Encuesta de frecuencia de consumo de *Opuntia ficus-indica*

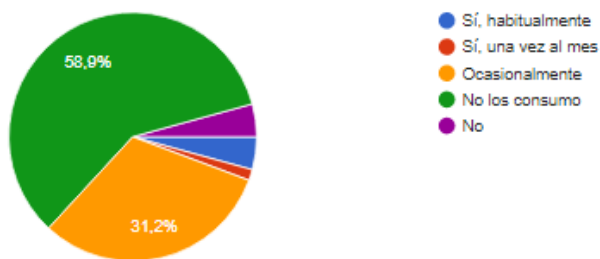
1. ¿Conoce los higos chumbos? Número de respuestas: 142 respuestas.



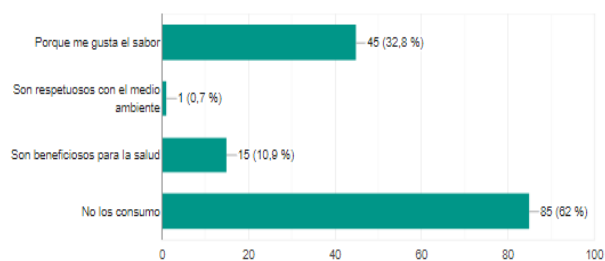
2. ¿Conoce Vd. los beneficios del higo chumbo? Número de respuestas: 142 respuestas.



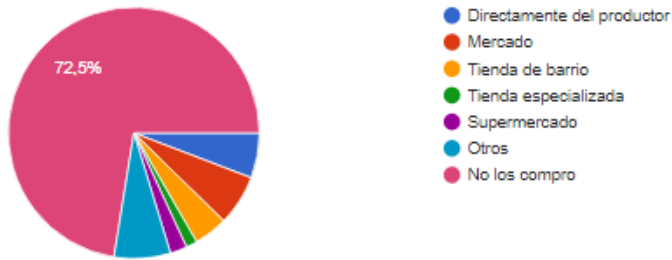
3. ¿Consume higos chumbos? (Marcar solo una opción). Número de respuestas: 141 respuestas.



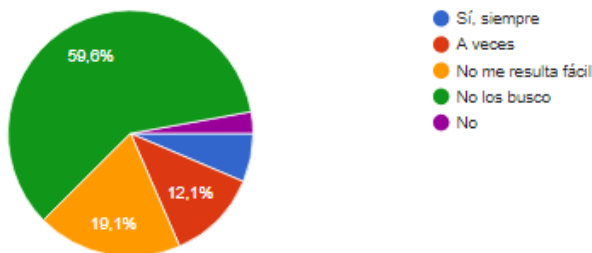
4. ¿Por qué consume higos chumbos? (Marcar una o más opciones). Número de respuestas: 137 respuestas.



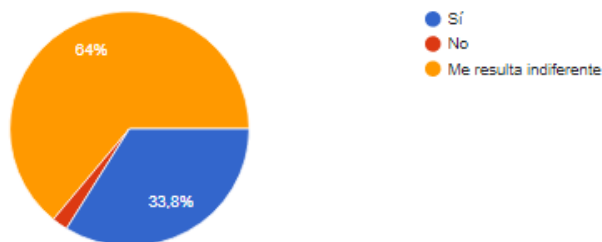
5. ¿En qué tipo de establecimiento compra generalmente los higos chumbos? Número de respuestas: 138 respuestas.



6. ¿Le resulta fácil encontrar higos chumbos? (Marcar solo una opción).
Número de respuestas: 141 respuestas.



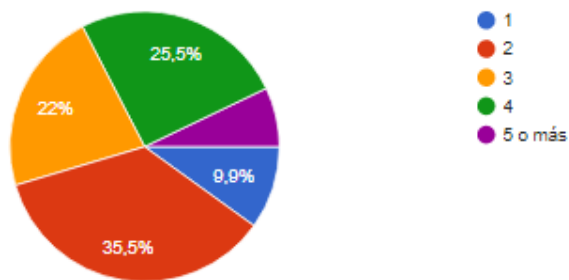
7. ¿Le gustaría que sus hijos consumiesen higos chumbos en el comedor del colegio? (Marcar solo una opción). Número de respuestas: 139 respuestas.



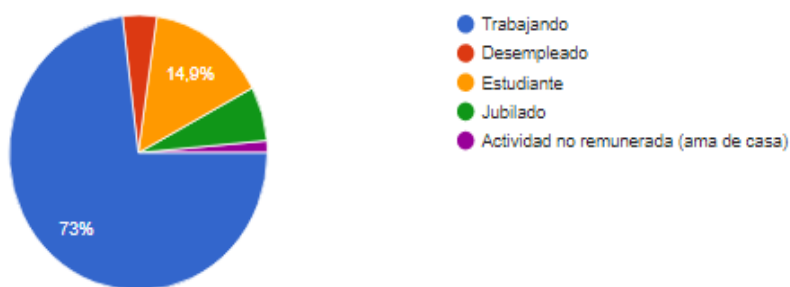
8. No consume higos chumbos porque... Número de respuestas: 94 respuestas. (Algunas fueron)...

No me gustan
No los conozco
Porque en mi casa no habian habitualmente
No tengo costumbre
No son fáciles de encontrar, ni de comer
Apenas los conozco

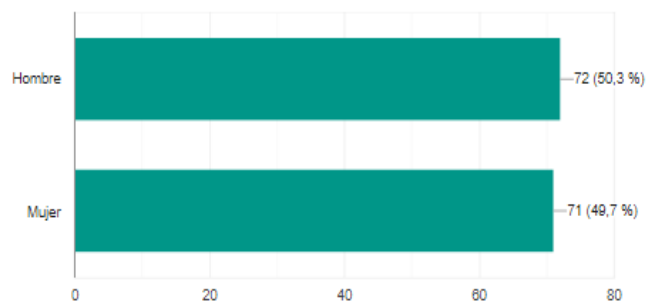
9. ¿Cuántas personas viven en su casa incluido usted? Número de respuestas: 141 respuestas



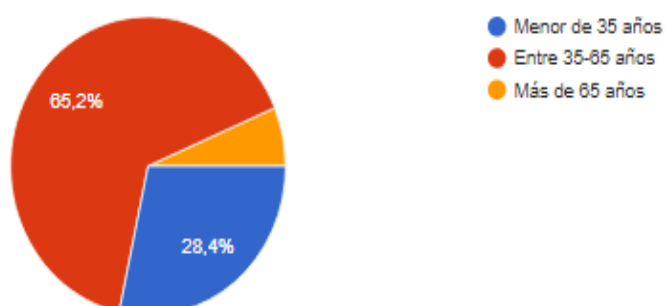
10. ¿Actualmente se encuentra...? Número de respuestas: 141 respuestas



11. Género. Número de respuestas: 143 respuestas



12. Su edad está comprendida en el intervalo de... Número de respuestas: 141 respuestas



En relación a las encuestas realizadas para conocer el hábito de consumo de *Opuntia ficus-indica*, los resultados indican que se trata de un producto prácticamente desconocido por la población en general, a pesar de que la encuesta fue realizada en su mayoría por personas en una franja de edad entre los 35 y los 65 años (65,2%). A pesar de que el 90,1% de las 142 respuestas obtenidas a la pregunta de si conocían el “higo chumbo” (nombre común de la tuna) han resultado ser afirmativas, cerca de 89 personas respondieron negativamente a la pregunta de si lo consumían, es decir el 63,2% no consume ni siquiera de manera ocasional tuna.

No es de extrañar que en el caso de la pregunta acerca del conocimiento de las cualidades beneficiosas para la salud, aproximadamente el 77% asegurara no conocerlas. Por ello solo el 15% de los encuestados afirma consumir el higo chumbo o tuna por el hecho de “ser bueno para la salud”.

Parece no resultar fácil encontrar el fruto en los puntos de venta más habituales, un amplio porcentaje de los que afirmaron consumirlo lo obtienen directamente de la planta, es decir de producción propia. El mercado de tipo municipal parece ser la alternativa al autoabastecimiento, quizá en supermercados al tener menos demanda de este producto, no se encuentra con facilidad (59,6% de los encuestados) y puede que en parte debido a esto cerca del 72,5% no los compra.

A cerca de la cuestión relacionada con la falta de consumo de tuna la cual se trataba de una pregunta de respuesta corta, la mayoría de las respuestas tienen que ver con el difícil acceso al fruto, bien por desconocimiento o por no haberlo consumido de manera habitual en el seno familiar.

4.2. Determinación de metales por ICP-MS

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 las tablas que se muestran a continuación (**Tablas 5, 6 y 7**). Los valores están expresados en µg/L de muestra.

Los resultados obtenidos en esta investigación, indican que la pulpa es una buena fuente de minerales, en mayor proporción, de calcio, magnesio, potasio y fósforo. Los metales hallados en mayor concentración han sido $K > Ca > Mg > Na$, tanto en pulpa y piel, como en cladodio, en el caso concreto de este último, también destacan justo por detrás del Na, $Fe > Mn > Zn$. La **tabla 8** muestra como el K es el mineral presente en mayor concentración tanto en piel como en pulpa como en cladodio, seguido del

calcio y el magnesio, siguiendo estos dos últimos la siguiente relación: $Ca > Mg$ en piel y cladodio; y $Mg > Ca$ en pulpa.

Tal y como se observa, estos resultados coinciden con la información recogida en otros estudios llevados a cabo sobre la composición mineral de la tuna, de *Opuntia ficus-indica*. En el apartado de introducción, en la **tabla 1**, se observa información proporcionada acerca de la composición mineral de *Opuntia ficus-indica* por los siguientes estudios: (1) (Askar & El Samahy, 1981). (2)(de Chávez et al., 1995). (Sawaya et al., 1983). (4) (Sepúlveda & Sáenz, 1990). (5) (Vélez-Gutierrez & Rodríguez-Garay, 1996). En concreto, (Feugang et al., 2006), que investigó la composición de la pulpa en el fruto de *Opuntia* y consideró su pulpa como una buena fuente de minerales, en particular calcio, magnesio, potasio y fósforo (Cota-Sánchez et al., 2016). En otro estudio llevado a cabo por (El Kossori et al., 1998) en el cual se compara la concentración de elementos minerales entre pulpa, piel y semillas, una vez más podemos observar coincidencia con los resultados obtenidos en este estudio, donde el mineral en mayor concentración es el K, seguido de Ca y Mg, y encontrándose también en mayor proporción en piel que en pulpa.

El papel que juegan los micronutrientes en la salud humana es esencial; el Zn se encuentra presente en todos los órganos, tejidos, fluidos y secreciones del cuerpo humano. Aproximadamente 83 % del Zn en el cuerpo está presente en el músculo y hueso, y 95 % se encuentra a nivel intracelular y desempeña una función importante en más de 300 enzimas, incluidas las de ADN (Jackson, 1989). Por su parte, el Mn es importante debido a que muchas enzimas dependen de él para producir metaloenzimas, las cuales participan en el uso de la glucosa y en la degradación de proteínas y grasas; se almacena principalmente en los huesos, aunque también se le encuentra en los riñones y el hígado(Grotto & Molinari Tato, 2014) (Santiago-Lorenzo et al., 2016).

La bibliografía consultada pone de manifiesto el efecto hepatoprotector que se atribuyó al elevado contenido de antioxidantes y algunos minerales (Mn, Fe y Zn), los cuales pudieron actuar de diferente manera en la restauración hepática mediante la estabilización de las membranas celulares, neutralizando radicales libres y regulando los niveles de enzimas desintoxicantes (Arauz, 2009). En concreto los valores obtenidos para estos minerales, han sido mayores para el Fe, seguido de Zn y finalmente de Mn. El hierro se encuentra en mayor proporción en la piel, sin embargo las mayores proporciones de Mn y Zn las encontramos en cladodio.

El B participa en el mantenimiento y desarrollo adecuado de los huesos, al participar en el metabolismo del calcio, magnesio y fósforo, y se le asocia con la mejora en la respuesta del sistema inmunitario ante determinadas afecciones, lo que es útil para aumentar las defensas (Nielsen, 1997). Según (Grotto &

Molinari Tato, 2014), mantener una dieta alta en frutas, verduras, frutos secos y granos enteros es la mejor opción para obtener estos nutrientes. De ahí la importancia de consumir nopalitos verdura que además contienen fibra, clorofila, vitamina C, carbohidratos y proteínas, según indican (Guzmán Loayza & Chávez, 2007) y (Maki-Díaz et al., 2015; Santiago-Lorenzo et al., 2016).

	Concentración de las muestras (µg/L)																				
	Li	Be	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Ni	Co	Cu	Zn	Mo	Ag	Cd	Tl	Pb	Bi
Pi1	1,10E+01	5,73E-02	1,42E+04	1,14E+06	7,78E+03	7,65E+06	3,28E+06	1,02E+01	1,66E+02	4,97E+02	7,05E+03	1,43E+02	8,30E+00	4,13E+02	1,22E+03	2,30E+01	9,63E+00	4,54E-01	2,78E-01	8,23E+00	3,55E-01
Pi2	1,62E+01	9,65E-02	1,96E+04	1,27E+06	9,92E+03	8,06E+06	3,34E+06	1,74E+01	3,03E+02	5,20E+02	9,51E+03	2,10E+02	9,00E+00	4,74E+02	1,24E+03	2,40E+01	1,60E+01	6,01E-01	3,18E-01	9,31E+00	2,06E-01
Pi3	1,10E+01	7,68E-02	1,65E+04	9,02E+05	9,61E+03	6,03E+06	2,83E+06	1,25E+01	1,96E+02	3,93E+02	7,41E+03	1,48E+02	6,44E+00	4,83E+02	1,22E+03	1,67E+01	1,16E+01	5,65E-01	2,68E-01	1,04E+01	2,69E-01
Pi4	1,36E+01	0,00E+00	2,27E+04	1,30E+06	1,15E+04	8,53E+06	3,49E+06	1,88E+01	2,19E+02	5,49E+02	1,01E+04	1,65E+02	8,63E+00	6,63E+02	1,89E+03	2,35E+01	1,30E+01	1,26E+00	3,88E-01	1,31E+01	2,36E-01
Pi5	8,84E+00	0,00E+00	1,26E+04	8,24E+05	8,07E+03	5,64E+06	2,70E+06	9,79E+00	1,66E+02	3,85E+02	7,62E+03	1,24E+02	6,00E+00	3,04E+02	8,24E+02	1,54E+01	1,04E+01	1,24E-01	2,34E-01	9,79E+00	2,01E-01
Pi6	1,96E+01	1,36E-01	2,45E+04	1,52E+06	1,14E+04	9,53E+06	3,68E+06	2,27E+01	3,54E+02	6,23E+02	1,22E+04	2,39E+02	9,89E+00	5,65E+02	1,21E+03	2,77E+01	1,80E+01	5,91E-01	3,26E-01	1,09E+01	1,83E-01
Pi7	1,61E+01	0,00E+00	2,38E+04	1,64E+06	1,17E+04	5,04E+06	3,96E+06	2,14E+01	3,05E+02	6,76E+02	1,22E+04	2,09E+02	1,03E+01	5,98E+02	1,69E+03	2,96E+01	1,79E+01	7,38E-01	3,83E-01	1,00E+01	1,23E-01
Pi8	1,58E+01	0,00E+00	2,35E+04	1,61E+06	1,14E+04	9,97E+06	3,90E+06	2,08E+01	2,99E+02	6,49E+02	1,16E+04	2,06E+02	1,01E+01	5,88E+02	1,66E+03	2,86E+01	1,70E+01	7,73E-01	3,83E-01	9,60E+00	1,29E-01
Pi9	1,70E+01	2,79E-02	2,25E+04	1,39E+06	1,20E+04	9,02E+06	3,62E+06	2,14E+01	3,00E+02	6,03E+02	1,30E+04	1,99E+02	9,24E+00	5,68E+02	1,47E+03	2,65E+01	1,58E+01	4,03E-01	3,74E-01	1,22E+01	1,42E-01
Pi10	9,87E+00	0,00E+00	1,27E+04	1,69E+06	7,31E+03	8,93E+06	3,91E+06	9,39E+00	2,96E+02	6,11E+02	1,08E+04	2,00E+02	8,58E+00	4,76E+02	1,25E+03	3,00E+01	1,50E+01	6,31E-01	2,90E-01	1,19E+01	1,77E-01
Pi11	9,28E+00	0,00E+00	2,26E+04	1,78E+06	6,97E+03	9,43E+06	3,93E+06	8,78E+00	2,26E+02	6,09E+02	1,10E+04	1,64E+02	8,09E+00	5,85E+02	1,38E+03	3,05E+01	1,24E+01	5,86E-01	3,20E-01	1,01E+01	1,27E-01
Pi12	5,45E+00	0,00E+00	8,92E+03	1,13E+06	5,82E+03	6,28E+06	3,13E+06	4,69E+00	1,45E+02	4,11E+02	4,11E+03	1,12E+02	5,28E+00	4,27E+02	1,05E+03	1,93E+01	9,01E+00	2,51E-01	2,29E-01	6,75E+00	1,11E-01
Pi13	6,36E+00	0,00E+00	1,11E+04	1,32E+06	6,85E+03	7,28E+06	3,39E+06	5,70E+00	1,81E+02	4,70E+02	7,90E+03	1,27E+02	6,27E+00	3,68E+02	1,08E+03	2,22E+01	1,03E+01	6,21E-01	2,70E-01	1,02E+01	1,68E-01
Pi14	8,86E+00	0,00E+00	1,56E+04	1,87E+06	7,61E+03	9,68E+06	4,05E+06	9,51E+00	2,31E+02	6,20E+02	7,14E+03	1,64E+02	8,24E+00	5,14E+02	1,34E+03	3,15E+01	1,31E+01	6,72E-01	3,20E-01	9,55E+00	1,19E-01
Pi15	6,57E+00	0,00E+00	1,06E+04	1,29E+06	6,23E+03	6,96E+06	3,30E+06	6,17E+00	2,15E+02	4,53E+02	8,34E+03	1,48E+02	6,34E+00	3,64E+02	9,96E+02	2,30E+01	1,25E+01	4,08E-01	2,36E-01	2,50E+01	2,31E-01
Pi16	1,41E+01	4,24E+00	9,67E+03	1,29E+06	6,34E+03	7,03E+06	3,28E+06	1,11E+01	1,91E+02	4,50E+02	5,80E+03	1,23E+02	9,83E+00	3,44E+02	1,00E+03	2,66E+01	1,33E+01	2,29E+00	1,88E+00	9,99E+00	1,68E+00
Pi17	6,67E+00	0,00E+00	1,03E+04	1,39E+06	6,60E+03	7,47E+06	3,40E+06	6,23E+00	1,98E+02	4,63E+02	6,13E+03	1,43E+02	6,53E+00	3,69E+02	1,07E+03	2,39E+01	1,20E+01	3,27E-01	2,68E-01	8,91E+00	1,41E-01
Pi18	1,25E+01	1,81E+00	1,21E+04	1,15E+06	5,82E+03	6,27E+06	3,12E+06	7,32E+00	1,73E+02	4,22E+02	6,68E+03	1,21E+02	7,17E+00	3,17E+02	1,05E+03	2,12E+01	1,12E+01	1,58E+00	9,17E-01	8,20E+00	7,35E-01
Pi19	8,28E+00	5,91E-01	1,10E+04	1,18E+06	6,06E+03	6,36E+06	3,15E+06	5,05E+00	1,64E+02	4,06E+02	6,29E+03	1,18E+02	6,03E+00	3,12E+02	1,03E+03	1,92E+01	1,00E+01	8,09E-01	3,98E-01	9,04E+00	5,35E-01
Pi20	8,86E+00	3,83E-01	1,25E+04	9,28E+05	6,82E+03	6,36E+06	2,92E+06	7,85E+00	1,73E+02	4,04E+02	7,00E+03	1,17E+02	5,34E+00	3,26E+02	1,04E+03	1,78E+01	9,09E+00	6,82E-01	3,19E-01	9,01E+00	2,70E-01
Pi21	9,11E+00	2,64E-01	1,22E+04	9,93E+05	7,01E+03	6,53E+06	2,96E+06	7,86E+00	1,79E+02	4,07E+02	5,95E+03	1,23E+02	5,57E+00	3,29E+02	9,88E+02	1,77E+01	9,87E+00	1,24E+00	2,66E-01	8,49E+00	2,27E-01
Pi22	7,90E+00	0,00E+00	1,26E+04	1,01E+06	6,73E+03	6,85E+06	3,07E+06	6,83E+00	1,77E+02	4,37E+02	5,73E+03	1,23E+02	5,52E+00	3,48E+02	1,13E+03	1,93E+01	1,05E+01	5,25E-01	2,51E-01	7,38E+00	2,06E-01
Pi23	9,88E+00	2,77E-02	1,27E+04	9,31E+05	8,63E+03	6,17E+06	2,88E+06	1,10E+01	1,60E+02	4,07E+02	7,55E+03	1,07E+02	5,39E+00	3,22E+02	1,05E+03	1,65E+01	9,57E+00	5,65E-01	2,66E-01	8,60E+00	1,23E-01
Pi24	1,01E+01	8,67E-02	1,93E+04	1,45E+06	8,85E+03	9,41E+06	3,79E+06	1,20E+01	2,33E+02	5,98E+02	8,11E+03	1,54E+02	7,63E+00	4,88E+02	1,55E+03	2,73E+01	1,33E+01	1,23E+00	3,01E-01	1,15E+01	1,56E-01
Pi25	7,69E+00	0,00E+00	1,27E+04	9,18E+05	7,26E+03	6,33E+06	2,90E+06	7,76E+00	1,62E+02	4,01E+02	5,85E+03	1,13E+02	5,03E+00	3,01E+02	1,02E+03	1,73E+01	9,89E+00	3,32E-01	2,09E-01	8,42E+00	1,42E-01
Pi26	7,53E+00	0,00E+00	9,70E+03	1,12E+06	5,80E+03	6,26E+06	3,12E+06	4,71E+00	1,39E+02	4,06E+02	6,96E+03	9,99E+01	5,28E+00	3,07E+02	1,08E+03	2,04E+01	8,31E+00	7,89E-01	2,25E-01	8,08E+00	1,13E-01
Pi27	1,01E+01	0,00E+00	1,77E+04	1,13E+06	8,32E+03	7,49E+06	3,27E+06	1,12E+01	2,36E+02	4,84E+02	7,39E+03	1,49E+02	6,70E+00	3,82E+02	1,38E+03	2,22E+01	1,33E+01	5,65E-01	2,11E-01	8,26E+00	2,67E-01
Pi28	1,11E+01	0,00E+00	1,82E+04	1,18E+06	8,53E+03	7,87E+06	3,35E+06	1,16E+01	2,45E+02	5,00E+02	7,82E+03	1,57E+02	6,82E+00	3,88E+02	1,42E+03	2,31E+01	1,41E+01	6,36E-01	2,08E-01	8,56E+00	1,61E-01
Pi29	1,17E+01	0,00E+00	1,90E+04	1,49E+06	9,73E+03	9,32E+06	3,75E+06	1,47E+01	2,83E+02	6,09E+02	1,15E+04	1,81E+02	8,11E+00	4,56E+02	1,18E+03	2,70E+01	1,51E+01	5,45E-01	2,52E-01	9,03E+00	1,44E-01
Pi30	1,11E+01	0,00E+00	2,12E+04	1,35E+06	8,88E+03	8,77E+06	3,60E+06	1,26E+01	2,56E+02	5,52E+02	8,30E+03	1,65E+02	7,51E+00	4,24E+02	1,18E+03	2,54E+01	1,46E+01	3,88E-01	2,40E-01	8,10E+00	1,37E-01

Tabla 5. Concentración de metales obtenidas por ICP-MS en µg/L, en muestras de Opuntia ficus-indica liofilizado. Pi=piel.

	Concentración de las muestras (µg/L)																				
	Li	Be	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Ni	Co	Cu	Zn	Mo	Ag	Cd	Tl	Pb	Bi
Pu1	6,07E+00	8,49E-01	3,12E+03	1,81E+05	4,17E+02	4,84E+05	2,00E+05	0,00E+00	6,49E+00	1,54E+02	9,32E+01	3,86E+01	2,26E+00	1,87E+02	2,30E+03	1,10E+01	1,32E+00	1,24E+00	1,13E+00	1,17E+01	1,05E+00
Pu2	4,10E+00	1,26E-01	4,48E+03	2,27E+05	3,97E+02	5,85E+05	2,45E+05	0,00E+00	7,05E+00	1,79E+02	1,01E+02	3,83E+01	1,55E+00	1,99E+02	1,50E+03	9,70E+00	8,44E-01	3,93E-01	5,17E-01	6,82E+00	4,14E-01
Pu3	4,58E+00	0,00E+00	4,97E+03	2,83E+05	4,79E+02	6,56E+05	2,39E+05	0,00E+00	7,48E+00	2,42E+02	2,07E+03	5,27E+01	1,42E+00	2,61E+02	2,16E+03	1,38E+01	6,93E-01	6,67E-01	2,42E-01	7,90E+00	2,16E-01
Pu4	2,79E+00	0,00E+00	2,52E+03	1,52E+05	2,62E+02	3,87E+05	1,68E+05	0,00E+00	3,19E+00	1,35E+02	1,16E+02	3,00E+01	8,81E-01	1,49E+02	2,00E+03	8,34E+00	4,34E-01	2,71E-01	1,61E-01	8,32E+00	1,40E-01
Pu5	2,86E+00	0,00E+00	3,02E+03	1,79E+05	2,15E+02	5,06E+05	1,99E+05	0,00E+00	5,05E+00	1,45E+02	1,28E+03	3,30E+01	7,47E-01	1,74E+02	1,15E+03	8,94E+00	3,51E-01	0,00E+00	9,41E-02	2,90E+00	7,64E-02
Pu6	2,61E+00	0,00E+00	2,47E+03	1,88E+05	3,15E+02	4,84E+05	1,91E+05	0,00E+00	4,72E+00	1,51E+02	1,40E+03	3,36E+01	7,83E-01	1,73E+02	1,28E+03	9,68E+00	3,37E-01	3,78E-01	8,79E-02	5,57E+00	6,17E-02
Pu7	2,22E+00	0,00E+00	2,40E+03	1,42E+05	2,74E+02	3,42E+05	1,42E+05	0,00E+00	3,28E+00	1,19E+02	1,26E+02	2,84E+01	5,56E-01	1,22E+02	1,50E+03	7,10E+00	2,84E-01	1,85E-01	5,47E-02	1,52E+01	5,79E-02
Pu8	2,22E+00	0,00E+00	2,48E+03	1,48E+05	2,65E+02	3,51E+05	1,51E+05	0,00E+00	1,96E+00	1,23E+02	4,88E+01	2,64E+01	6,08E-01	1,27E+02	1,20E+03	6,33E+00	2,30E-01	1,49E-01	6,16E-02	6,62E+00	7,59E-02
Pu9	2,89E+00	0,00E+00	3,93E+03	2,50E+05	4,09E+02	5,79E+05	2,18E+05	0,00E+00	6,02E+00	1,97E+02	1,72E+03	4,46E+01	9,96E-01	2,44E+02	2,55E+03	1,22E+01	3,03E-01	4,34E-01	8,14E-02	1,15E+01	6,53E-02
Pu10	2,14E+00	0,00E+00	1,96E+03	1,43E+05	2,58E+02	3,68E+05	1,55E+05	0,00E+00	2,85E+00	1,23E+02	1,13E+02	2,83E+01	6,68E-01	1,42E+02	1,11E+03	8,14E+00	2,02E-01	0,00E+00	7,36E-02	8,51E+00	3,69E-02
Pu11	3,07E+00	0,00E+00	3,61E+03	6,49E+05	9,07E+02	4,04E+06	2,32E+06	0,00E+00	6,27E+00	2,93E+02	2,32E+03	2,26E+01	2,48E+00	2,11E+02	7,31E+02	1,02E+01	1,62E-01	7,33E-02	2,92E-01	7,36E+00	8,04E-02
Pu12	3,76E+00	0,00E+00	5,37E+03	7,63E+05	1,13E+03	4,30E+06	2,46E+06	2,40E-01	6,88E+00	3,29E+02	2,62E+03	2,87E+01	2,98E+00	2,61E+02	1,89E+03	1,02E+01	2,62E-01	4,44E-01	2,83E-01	1,25E+01	9,46E-02
Pu13	3,52E+00	0,00E+00	4,99E+03	7,23E+05	1,15E+03	4,23E+06	2,41E+06	3,50E-02	7,19E+00	2,95E+02	2,37E+03	2,68E+01	2,79E+00	2,47E+02	2,02E+03	1,04E+01	2,38E-01	5,05E-01	2,62E-01	1,17E+01	1,03E-01
Pu14	3,41E+00	0,00E+00	5,07E+03	6,79E+05	1,10E+03	3,79E+06	2,32E+06	0,00E+00	5,91E+00	2,93E+02	2,38E+03	2,61E+01	2,70E+00	2,65E+02	1,35E+03	9,27E+00	2,20E-01	1,80E-01	2,55E-01	1,03E+01	1,45E-01
Pu15	3,33E+00	0,00E+00	4,16E+03	6,80E+05	1,10E+03	4,13E+06	2,34E+06	0,00E+00	6,43E+00	2,95E+02	2,46E+03	2,44E+01	2,65E+00	2,36E+02	8,61E+02	8,62E+00	2,13E-01	0,00E+00	2,51E-01	9,09E+00	9,16E-02
Pu16	3,41E+00	0,00E+00	4,38E+03	6,73E+05	1,10E+03	3,91E+06	2,28E+06	0,00E+00	7,57E+00	2,80E+02	2,29E+03	2,81E+01	2,36E+00	2,38E+02	7,91E+02	8,34E+00	2,99E-01	0,00E+00	2,20E-01	7,62E+00	7,34E-02
Pu17	6,22E+00	0,00E+00	1,50E+04	9,31E+05	3,07E+03	5,17E+06	2,68E+06	9,32E-01	1,02E+01	3,79E+02	2,97E+03	3,26E+01	3,33E+00	3,30E+02	1,09E+03	1,15E+01	2,72E-01	3,78E-02	2,84E-01	8,53E+00	6,93E-02
Pu18	5,01E+00	0,00E+00	7,76E+03	1,06E+06	4,82E+03	5,84E+06	3,05E+06	1,59E+00	1,04E+01	4,27E+02	3,75E+03	4,11E+01	4,17E+00	3,72E+02	2,11E+03	1,41E+01	2,89E-01	1,65E-01	3,20E-01	1,22E+01	1,50E-01
Pu19	3,26E+00	0,00E+00	4,63E+03	7,43E+05	1,04E+03	4,65E+06	2,52E+06	0,00E+00	7,46E+00	3,40E+02	2,46E+03	3,14E+01	2,95E+00	3,07E+02	7,98E+02	1,06E+01	2,03E-01	0,00E+00	2,66E-01	8,82E+00	8,78E-02
Pu20	3,83E+00	0,00E+00	6,05E+03	1,02E+06	1,28E+03	5,78E+06	2,91E+06	6,74E-01	1,08E+01	4,18E+02	3,48E+03	3,89E+01	3,78E+00	3,40E+02	1,28E+03	1,30E+01	2,61E-01	1,04E-01	3,02E-01	1,21E+01	1,05E-01
Pu21	2,68E+00	0,00E+00	5,20E+03	3,09E+05	5,37E+02	1,11E+06	2,88E+05	0,00E+00	6,42E+00	2,73E+02	2,14E+03	5,91E+01	1,38E+00	2,82E+02	3,02E+03	1,28E+01	2,36E-01	6,36E-01	7,83E-02	1,12E+01	9,18E-02
Pu22	2,86E+00	0,00E+00	5,45E+03	2,78E+05	7,14E+02	9,74E+05	2,71E+05	0,00E+00	8,15E+00	2,56E+02	1,46E+03	6,04E+01	1,20E+00	2,70E+02	3,07E+03	1,30E+01	2,29E-01	2,36E-01	6,98E-02	1,17E+01	6,93E-02
Pu23	4,62E+00	0,00E+00	6,61E+03	3,44E+05	5,14E+02	1,30E+06	3,12E+05	0,00E+00	1,04E+01	2,48E+02	1,85E+03	6,56E+01	1,39E+00	3,07E+02	1,65E+03	1,40E+01	2,67E-01	0,00E+00	8,76E-02	4,44E+00	5,74E-02
Pu24	2,43E+00	0,00E+00	2,84E+03	1,96E+05	3,31E+02	7,55E+05	2,18E+05	0,00E+00	6,88E+00	1,75E+02	1,92E+03	4,57E+01	7,59E-01	1,74E+02	1,35E+03	9,33E+00	2,19E-01	0,00E+00	4,72E-02	5,23E+00	5,51E-02
Pu25	2,62E+00	0,00E+00	4,57E+03	2,97E+05	6,14E+02	9,57E+05	2,62E+05	0,00E+00	8,45E+00	3,18E+02	1,96E+03	6,51E+01	1,20E+00	3,03E+02	2,86E+03	1,56E+01	3,18E-01	4,44E-01	7,63E-02	8,62E+00	6,06E-01
Pu26	2,54E+00	0,00E+00	3,71E+03	2,55E+05	3,19E+02	8,25E+05	2,26E+05	0,00E+00	7,70E+00	2,27E+02	2,71E+03	5,27E+01	9,17E-01	2,40E+02	1,67E+03	1,34E+01	2,76E-01	0,00E+00	5,03E-02	4,52E+00	4,76E-02
Pu27	1,99E+00	0,00E+00	3,47E+03	2,37E+05	4,20E+02	7,98E+05	2,28E+05	0,00E+00	4,65E+00	2,45E+02	8,63E+01	5,34E+01	9,25E-01	2,49E+02	2,17E+03	1,21E+01	2,11E-01	0,00E+00	7,18E-02	5,76E+00	5,79E-02
Pu28	2,41E+00	0,00E+00	4,43E+03	2,72E+05	5,95E+02	8,91E+05	2,41E+05	0,00E+00	7,14E+00	2,65E+02	9,00E+01	5,30E+01	9,84E-01	2,68E+02	4,43E+03	1,25E+01	2,13E-01	1,13E+00	8,42E-02	1,69E+01	9,03E-02
Pu29	2,17E+00	0,00E+00	3,86E+03	2,63E+05	3,43E+02	9,54E+05	2,48E+05	0,00E+00	6,18E+00	2,12E+02	1,94E+03	4,69E+01	1,05E+00	2,04E+02	1,80E+03	1,10E+01	1,92E-01	0,00E+00	7,22E-02	5,57E+00	4,15E-02
Pu30	2,29E+00	0,00E+00	3,98E+03	2,88E+05	3,75E+02	9,70E+05	2,57E+05	0,00E+00	7,70E+00	2,59E+02	3,26E+03	5,33E+01	1,19E+00	2,35E+02	2,08E+03	1,42E+01	2,12E-01	0,00E+00	6,23E-02	7,04E+00	7,31E-02

Tabla 6. Concentración de metales obtenidas por ICP-MS en µg/L, en muestras de Opuntia ficus-indica liofilizado. Pu=pulpa.

Concentración de las muestras (µg/L)																					
	Li	Be	Na	Mg	Al	K	Ca	V	Cr	Mn	Fe	Ni	Co	Cu	Zn	Mo	Ag	Cd	Tl	Pb	Bi
Cl1	3,57E+00	0,00E+00	4,02E+03	1,36E+06	7,30E+02	3,09E+06	3,47E+06	0,00E+00	1,30E+01	5,08E+02	3,45E+03	2,82E+01	4,99E+00	2,33E+02	1,46E+03	3,46E+01	4,20E-01	9,51E-01	5,06E-01	5,45E+00	3,00E-01
Cl2	3,16E+00	0,00E+00	4,20E+03	1,61E+06	6,50E+02	3,39E+06	3,81E+06	0,00E+00	1,29E+01	5,64E+02	3,48E+03	3,41E+01	5,51E+00	2,38E+02	1,74E+03	3,74E+01	4,84E-01	1,01E+00	2,34E-01	8,37E+00	1,03E-01
Cl3	2,31E+00	0,00E+00	2,74E+03	7,95E+05	4,82E+02	1,80E+06	2,71E+06	0,00E+00	1,59E+01	3,08E+02	2,38E+03	1,91E+01	2,65E+00	1,47E+02	1,37E+03	1,96E+01	2,69E-01	9,10E-01	1,62E-01	5,28E+00	8,12E-02
Cl4	3,02E+00	0,00E+00	5,81E+03	2,05E+06	8,53E+02	4,45E+06	4,30E+06	0,00E+00	1,73E+01	6,73E+02	4,91E+03	4,42E+01	6,61E+00	3,58E+02	2,32E+03	5,01E+01	5,10E-01	1,20E+00	2,81E-01	1,01E+01	8,75E-02
Cl5	2,13E+00	0,00E+00	3,01E+03	8,54E+05	5,20E+02	1,97E+06	2,81E+06	0,00E+00	7,19E+00	3,48E+02	2,10E+03	2,14E+01	3,24E+00	1,38E+02	1,20E+03	2,13E+01	2,81E-01	4,49E-01	1,70E-01	4,87E+00	6,35E-02
Cl6	2,47E+00	0,00E+00	4,06E+03	1,35E+06	7,49E+02	3,11E+06	3,58E+06	0,00E+00	1,15E+01	5,12E+02	3,73E+03	2,89E+01	4,93E+00	2,32E+02	2,32E+03	3,48E+01	4,26E-01	9,81E-01	2,20E-01	1,03E+01	1,05E-01
Cl7	2,58E+00	0,00E+00	5,70E+03	1,91E+06	7,38E+02	4,23E+06	4,20E+06	0,00E+00	1,50E+01	6,50E+02	3,76E+03	3,62E+01	6,51E+00	2,94E+02	2,04E+03	4,64E+01	4,93E-01	1,22E+00	2,68E-01	5,23E+00	5,62E-02
Cl8	1,90E+00	0,00E+00	3,13E+03	1,15E+06	5,67E+02	2,73E+06	3,32E+06	0,00E+00	1,01E+01	4,46E+02	2,48E+03	2,76E+01	4,17E+00	2,09E+02	1,82E+03	3,03E+01	3,04E-01	9,86E-01	1,99E-01	6,27E+00	8,10E-02
Cl9	3,90E+00	0,00E+00	1,16E+04	1,97E+06	8,12E+02	4,69E+06	4,44E+06	0,00E+00	1,76E+01	6,98E+02	4,14E+03	4,20E+01	7,39E+00	3,37E+02	2,13E+03	4,96E+01	5,21E-01	1,28E+00	2,72E-01	6,64E+00	5,77E-02
Cl10	5,11E+00	0,00E+00	1,75E+04	2,49E+06	9,32E+02	5,65E+06	4,95E+06	0,00E+00	2,22E+01	3,63E+03	5,82E+03	5,11E+01	8,95E+00	4,31E+02	2,88E+03	6,28E+01	6,56E-01	1,87E+00	3,11E-01	7,54E+00	8,30E-02
Cl11	2,45E+00	0,00E+00	6,08E+03	2,00E+06	1,05E+03	5,00E+06	4,53E+06	0,00E+00	1,38E+01	6,10E+02	2,97E+03	4,24E+01	6,88E+00	4,32E+02	3,47E+03	7,12E+01	2,98E-01	2,08E+00	3,71E-01	6,55E+00	5,92E-02
Cl12	3,09E+00	0,00E+00	8,43E+03	2,87E+06	1,12E+03	6,61E+06	5,78E+06	2,60E-01	2,06E+01	3,69E+03	4,19E+03	5,79E+01	1,04E+01	5,68E+02	4,30E+03	8,91E+01	4,13E-01	2,83E+00	4,20E-01	6,88E+00	7,21E-02
Cl13	3,06E+00	0,00E+00	9,00E+03	2,37E+06	1,23E+03	5,70E+06	5,08E+06	3,73E-01	1,52E+01	6,99E+02	3,62E+03	4,84E+01	8,64E+00	5,32E+02	3,11E+03	7,57E+01	3,89E-01	2,56E+00	3,71E-01	4,54E+00	6,00E-02
Cl14	3,49E+00	0,00E+00	9,98E+03	2,64E+06	1,32E+03	6,71E+06	5,62E+06	1,18E+00	1,91E+01	3,58E+03	4,52E+03	5,57E+01	1,02E+01	6,04E+02	3,34E+03	7,94E+01	3,99E-01	2,63E+00	3,39E-01	4,13E+00	6,43E-02
Cl15	1,92E+00	0,00E+00	5,37E+03	1,82E+06	9,62E+02	4,31E+06	4,31E+06	0,00E+00	1,69E+01	6,34E+02	3,12E+03	3,72E+01	6,67E+00	3,25E+02	2,49E+03	4,96E+01	5,93E-01	1,24E+00	2,21E-01	5,74E+00	5,11E-02
Cl16	3,10E+00	0,00E+00	9,11E+03	2,44E+06	1,23E+03	5,79E+06	5,12E+06	6,94E-01	1,49E+01	1,98E+03	3,72E+03	4,61E+01	8,68E+00	5,41E+02	3,16E+03	7,56E+01	3,41E-01	2,40E+00	3,79E-01	4,55E+00	6,65E-02
Cl17	2,33E+00	0,00E+00	6,02E+03	1,73E+06	1,15E+03	4,30E+06	4,38E+06	0,00E+00	1,31E+01	5,48E+02	3,00E+03	3,46E+01	6,41E+00	3,85E+02	2,52E+03	5,40E+01	3,60E-01	1,46E+00	2,67E-01	4,19E+00	6,27E-02
Cl18	2,74E+00	0,00E+00	8,86E+03	2,71E+06	1,11E+03	6,40E+06	5,35E+06	2,31E-01	6,16E+01	3,84E+03	4,69E+03	5,54E+01	1,06E+01	4,74E+02	3,82E+03	7,17E+01	2,77E-01	2,21E+00	2,80E-01	7,23E+00	8,68E-02
Cl19	3,80E+00	0,00E+00	1,11E+04	3,57E+06	5,18E+03	8,13E+06	6,06E+06	1,82E+00	4,07E+01	4,60E+03	5,93E+03	6,82E+01	1,31E+01	6,13E+02	4,15E+03	9,05E+01	7,46E-01	2,66E+00	3,48E-01	7,80E+00	6,35E-02
Cl20	2,95E+00	0,00E+00	9,01E+03	2,36E+06	1,03E+03	5,60E+06	5,15E+06	0,00E+00	1,86E+01	7,16E+02	3,83E+03	4,76E+01	8,92E+00	5,16E+02	3,11E+03	7,40E+01	4,62E-01	2,24E+00	3,10E-01	4,92E+00	5,24E-02
Cl21	2,45E+00	0,00E+00	6,47E+03	3,52E+06	1,13E+03	8,44E+06	6,35E+06	6,26E-01	2,94E+01	4,55E+03	5,57E+03	6,62E+01	1,35E+01	6,29E+02	4,10E+03	9,31E+01	5,27E-01	3,11E+00	3,67E-01	7,32E+00	6,48E-02
Cl22	3,20E+00	0,00E+00	1,23E+04	3,62E+06	5,54E+03	8,53E+06	6,43E+06	2,04E+00	4,26E+01	4,76E+03	6,34E+03	7,47E+01	1,40E+01	6,33E+02	3,95E+03	8,68E+01	9,91E-01	2,54E+00	3,34E-01	6,98E+00	9,54E-02
Cl23	2,72E+00	0,00E+00	1,20E+04	3,03E+06	1,27E+03	7,29E+06	5,77E+06	2,02E+00	3,38E+01	4,15E+03	5,07E+03	6,43E+01	1,19E+01	5,23E+02	4,47E+03	7,60E+01	8,46E-01	2,42E+00	2,88E-01	8,42E+00	8,12E-02
Cl24	2,68E+00	0,00E+00	6,82E+03	2,25E+06	1,11E+03	5,46E+06	4,96E+06	2,24E-01	2,32E+01	3,46E+03	4,83E+03	4,53E+01	8,50E+00	4,00E+02	3,27E+03	5,69E+01	6,10E-01	1,66E+00	2,26E-01	1,24E+01	6,65E-02
Cl25	3,42E+00	0,00E+00	9,63E+03	3,33E+06	1,35E+03	7,76E+06	6,12E+06	1,44E+00	3,60E+01	4,45E+03	7,47E+03	6,84E+01	1,30E+01	5,81E+02	3,71E+03	7,92E+01	9,30E-01	2,38E+00	2,75E-01	7,82E+00	6,88E-02
Cl26	2,52E+00	0,00E+00	6,68E+03	2,19E+06	1,05E+03	5,51E+06	4,84E+06	0,00E+00	2,31E+01	2,09E+03	5,48E+03	4,42E+01	8,59E+00	4,65E+02	3,23E+03	5,54E+01	4,09E-01	1,56E+00	2,27E-01	2,51E+01	1,15E-01
Cl27	3,21E+00	0,00E+00	1,02E+04	4,63E+06	5,15E+03	1,04E+07	6,93E+06	2,53E+00	2,92E+01	5,39E+03	6,74E+03	8,08E+01	1,72E+01	8,27E+02	5,59E+03	1,21E+02	4,29E-01	3,10E+00	4,37E-01	6,77E+00	6,68E-02
Cl28	2,91E+00	0,00E+00	7,80E+03	2,65E+06	1,26E+03	6,10E+06	5,13E+06	2,50E-01	1,73E+01	7,36E+02	3,59E+03	4,99E+01	8,64E+00	5,30E+02	3,69E+03	8,85E+01	4,82E-01	2,58E+00	4,17E-01	7,18E+00	7,99E-02
Cl29	2,40E+00	0,00E+00	6,33E+03	2,09E+06	1,05E+03	4,88E+06	4,66E+06	0,00E+00	1,45E+01	6,12E+02	3,76E+03	4,31E+01	7,26E+00	4,18E+02	3,05E+03	6,97E+01	3,62E-01	2,31E+00	3,62E-01	6,49E+00	6,53E-02
Cl30	2,32E+00	0,00E+00	7,76E+03	2,10E+06	1,07E+03	4,90E+06	4,79E+06	0,00E+00	1,51E+01	6,21E+02	3,07E+03	4,09E+01	6,94E+00	4,72E+02	3,06E+03	6,79E+01	3,72E-01	2,18E+00	3,11E-01	5,37E+00	6,48E-02

Tabla 7. Concentración de metales obtenidas por ICP-MS en µg/L, en muestras de Opuntia ficus-indica liofilizado. Cl=cladodio.

Una vez se obtuvo los resultados de las concentraciones, se utilizaron 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 analizan los datos con el test estadístico o prueba de Kolmogórov-Smirnov, test de normalidad, cuya hipótesis nula, H0, 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 H0 (hipótesis nula) →Distribución normal.
- Si p-valor<0,05 rechazamos H0 (hipótesis nula) →Distribución no normal.

Los datos obtenidos en la prueba de Kolmogorov-Smirnov (**Tabla 8**), Como no todos los datos siguen una distribución normal, se decide utilizar test no paramétricos para todos los minerales, obteniéndose los siguientes resultados.

Elementos	TEST DE KOLMOGOROV-SMIRNOV					
	D			P valor		
	Piel	Pulpa	Cladodio	Piel	Pulpa	Cladodio
Ag	1,31E-01	3,26E-01	1,81E-01	2,06E-01	7,02E-09	1,30E-02
Al	1,41E-01	2,65E-01	4,19E-01	1,31E-01	1,02E-05	4,66E-15
Be	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Bi	3,54E-01	3,60E-01	2,73E-01	1,44E-10	5,82E-11	4,34E-06
Ca	1,01E-01	3,95E-01	8,12E-02	6,02E-01	2,43E-13	8,82E-01
Cd	2,40E-01	2,17E-01	1,49E-01	1,25E-04	9,18E-04	8,90E-02
Co	1,16E-01	2,13E-01	1,47E-01	3,82E-01	1,25E-03	9,71E-02
Cr	1,45E-01	1,27E-01	2,10E-01	1,10E-01	2,46E-01	1,63E-03
Cu	1,44E-01	1,22E-01	8,77E-02	1,18E-01	3,06E-01	8,04E-01
Fe	1,82E-01	1,86E-01	1,59E-01	1,24E-02	9,40E-03	5,00E-02
K	1,36E-01	3,13E-01	9,73E-02	1,65E-01	3,94E-08	6,65E-01
Li	1,58E-01	1,66E-01	1,17E-01	5,47E-02	3,40E-02	3,72E-01
Mg	9,75E-02	2,83E-01	8,97E-02	6,61E-01	1,53E-06	7,79E-01
Mn	1,55E-01	9,92E-02	3,29E-01	6,47E-02	7,43E-01	4,78E-09
Mo	9,98E-02	8,66E-02	1,03E-01	6,24E-01	8,20E-01	5,74E-01
Na	2,26E-01	2,19E-01	1,04E-01	4,17E-04	8,12E-04	5,58E-01
Ni	1,49E-01	1,62E-01	9,30E-02	8,93E-02	4,32E-02	7,30E-01
Pb	2,46E-01	1,08E-01	2,57E-01	7,17E-05	5,03E-01	2,42E-05
V	1,69E-01	4,64E-01	3,03E-01	2,94E-02	2,20E-16	1,38E-07
Zn	1,58E-01	1,24E-01	1,07E-01	5,32E-02	2,85E-01	5,12E-01
B	1,52E-01	1,24E-01	4,31E-01	7,51E-02	2,76E-01	5,60E-16
Ti	2,01E-01	1,76E-01	1,07E-01	3,31E-03	1,87E-02	5,19E-01
Ga	8,26E-02	3,25E-01	7,34E-02	8,67E-01	8,07E-09	9,48E-01
As	1,34E-01	1,39E-01	1,38E-01	1,83E-01	1,48E-01	1,50E-01
Se	9,05E-02	9,91E-02	8,44E-02	7,67E-01	6,36E-01	8,46E-01
Rb	1,47E-01	3,91E-01	3,62E-01	9,53E-02	5,33E-13	4,75E-11
Sr	1,31E-01	3,48E-01	8,82E-02	2,07E-01	3,51E-10	7,98E-01
In	3,09E-01	4,18E-01	3,70E-01	6,74E-08	5,23E-15	1,33E-11
Sn	1,63E-01	1,30E-01	1,89E-01	3,96E-02	2,21E-01	7,68E-03
Sb	1,23E-01	1,41E-01	1,45E-01	2,88E-01	1,31E-01	1,11E-01

Tabla 8. Test de normalidad Si p-valor > 0,05 aceptamos distribución normal.

Elemento	Piel			Pulpa			Cladodio			p-valor			
	Test de Kruskal Wallis			Test de Kruskal Wallis			Test de Kruskal Wallis						
	Mediana	RIQ 25%	RIQ 75%	Mediana	RIQ 25%	RIQ 75%	Mediana	RIQ 25%	RIQ 75%				
Li	9.98	a	8.42	12.32	2.88	b	2,45E+00	3,70E+00	2.83	b	2,45E+00	3,19E+00	<0,01
Be	0,00E+00	a	0,00E+00	8,40E-02	0,00E+00	a	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	a	0,00E+00	0,00E+00	<0,01
B	8E+03	a	7,04E+03	1,01E+04	4,84E+00	a	3,688.5	5,31E+00	1,38E+01	b	11,092.5	18,492.5	<0,01
Na	1,35E+04	a	1,21E+04	1,95E+04	4,27E+03	b	3,20E+03	5,05E+03	7,29E+03	c	5,72E+03	9,50E+03	<0,01
Mg	1,28E+06	a	1,12E+06	1,44E+06	2,80E+05	b	2,04E+05	6,77E+05	2,22E+06	c	1,84E+06	2,70E+06	<0,01
Al	7,70E+03	a	6,75E+03	9,43E+03	4,97E+02	b	3,34E+02	1,08E+03	1,06E+03	b	8,22E+02	1,23E+03	<0,01
K	7,37E+06	a	6,33E+06	8,89E+06	9,56E+05	b	5,80E+05	4,01E+06	5,48E+06	c	4,30E+06	6,56E+06	<0,01
Ca	3,32E+06	a	3,12E+06	3,67E+06	2,53E+05	b	2,18E+05	2,32E+06	4,89E+06	c	4,30E+06	5,55E+06	<0,01
Sc	9,00E+01	a	9,00E+01	9,00E+01	9,00E+01	a	9,00E+01	9,00E+01	9,00E+01	a	9,00E+01	9,00E+01	NA
Ti	1,80E+01	a	1,40E+01	2,23E+01	8,30E+00	b	6,85E+00	1,10E+01	1,90E+01	a	1,60E+01	2,38E+01	<0,01
V	9,98E+00	a	7,43E+00	1,25E+01	0,00E+00	b	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	b	0,00E+00	5,63E-01	<0,01
Cr	2,06E+02	a	1,73E+02	2,53E+02	6,88E+00	b	5,94E+00	7,66E+00	1,73E+01	b	1,46E+01	2,32E+01	<0,01
Mn	4,77E+02	a	4,08E+02	6,02E+02	2,52E+02	a	1,76E+02	2,94E+02	7,08E+02	b	6,11E+02	3,68E+03	<0,01
Fe	7,58E+03	a	6,75E+03	9,93E+03	1,95E+03	b	4,15E+02	2,44E+03	3,80E+03	c	3,46E+03	5,03E+03	<0,01
Co	7,00E+00	a	6,01E+00	8,51E+00	1,29E+00	b	9,19E-01	2,61E+00	8,54E+00	a	6,54E+00	1,04E+01	<0,01
Ni	1,48E+02	a	1,23E+02	1,65E+02	3,85E+01	b	2,85E+01	5,27E+01	4,48E+01	b	3,65E+01	5,56E+01	<0,01
Cu	4,00E+02	a	3,33E+02	4,87E+02	2,42E+02	b	1,90E+02	2,69E+02	4,49E+02	a	3,28E+02	5,38E+02	<0,01
Zn	1,18E+03	a	1,05E+03	1,37E+03	1,66E+03	b	1,22E+03	2,15E+03	3,11E+03	c	2,32E+03	3,70E+03	<0,01
Ga	4,15E+01	a	3,44E+01	4,83E+01	3,55E+00	b	2,53E+00	1,78E+01	1,33E+02	c	9,21E+01	1,75E+02	<0,01
As	4,61E+00	a	3,36E+00	6,10E+00	1,88E+00	b	1,27E+00	2,41E+00	4,57E+00	a	2,38E+00	5,48E+04	<0,01
Se	9,05E+00	a	8,05E+00	1,04E+01	2,66E+00	b	1,74E+00	3,84E+00	1,07E+01	a	8,14E+00	1,27E+01	<0,01
Rb	1,17E+03	a	9,45E+02	1,50E+03	1,21E+02	b	1,14E+02	4,26E+02	1,86E+02	b	1,69E+02	9,48E+02	<0,01
Sr	3,96E+04	a	3,53E+04	4,66E+04	5,32E+03	b	4,07E+03	2,47E+04	1,05E+05	c	9,00E+04	1,29E+05	<0,01
Y	9,00E+01	a	9,00E+01	9,00E+01	9,00E+01	a	9,00E+01	9,00E+01	9,00E+01	a	9,00E+01	9,00E+01	NA
Mo	2,31E+01	a	1,93E+01	2,69E+01	1,08E+01	b	9,29E+00	1,29E+01	6,88E+01	c	4,96E+01	7,84E+01	<0,01
Ag	1,24E+01	a	1,01E+01	1,45E+01	2,62E-01	b	2,15E-01	3,02E+05	4,27E-01	b	3,64E-01	5,25E-01	<0,01
Cd	5,96E-01	a	4,71E-01	7,64E-01	1,57E-01	b	0,00E+00	4,23E-01	2,13E+00	c	1,23E+00	2,51E+00	<0,01
In	2,01E-01	a	1,37E-01	3,31E-01	2,08E-02	b	1,68E-02	3,28E-02	3,54E-02	b	2,72E-02	4,52E-02	<0,01
Sn	5,95E+00	a	4,13E+00	9,95E+00	4,70E-01	b	3,15E-01	6,38E-01	6,30E-01	b	3,78E-01	9,28E-01	<0,01
Sb	3,75E-01	a	2,96E-01	4,25E-01	1,06E-01	b	6,44E-02	1,69E-01	2,33E-01	c	1,70E-01	2,67E-01	<0,01
Cs	0,00E+00	a	0,00E+00	2,58E-02	0,00E+00	a	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	a	0,00E+00	0,00E+00	1,82E-02
Ba	1,60E+03	a	1,38E+03	1,82E+03	2,63E+02	b	2,16E+02	1,18E+03	6,86E+03	c	5,50E+03	8,10E+03	<0,01
Ce	2,70E+02	a	2,00E+02	3,68E+02	1,00E+02	b	6,60E+01	1,48E+02	2,35E+02	c	1,50E+02	2,90E+02	<0,01
W	5,00E-02	a	4,00E-02	6,73E-02	7,05E-03	b	5,20E-03	9,98E-03	1,90E-02	c	1,70E-02	2,78E-02	<0,01
Re	1,65E-01	a	1,40E-01	1,90E-01	1,10E-01	b	9,93E-02	1,80E-01	1,50E-01	ab	1,00E-01	2,20E-01	1,46E-02
Au	4,90E-03	a	0,00E+00	9,78E-03	4,00E-03	ab	0,00E+00	6,10E-03	0,00E+00	b	0,00E+00	4,60E-03	6,88E-02
Tl	2,74E-01	a	2,42E-01	3,24E-01	9,10E-02	b	7,25E-02	2,65E-01	2,99E-01	ab	2,42E-01	3,66E-01	<0,01
Pb	9,18E+00	a	8,44E+00	1,02E+01	8,52E+00	ab	6,67E+00	1,16E+01	6,71E+00	b	6,00E+00	7,74E+00	<0,01
Bi	1,73E-01	a	1,38E-01	2,34E-01	7,84E-02	ab	6,26E-02	1,05E-01	6,67E-02	b	6,35E-02	8,25E-02	<0,01
Th	3,61E-01	a	2,31E-01	4,88E-01	1,23E-02	b	6,63E-03	1,21E-01	5,69E-02	b	4,16E-02	7,09E-02	<0,01
U	3,22E-01	a	2,23E-01	4,63E-01	4,40E-02	b	3,14E-02	1,14E-01	2,26E-01	c	1,85E-01	2,70E-01	<0,01

Tabla 9. Resumen de los análisis estadísticos. Mediana. RIQ 25%: valor del intercuartílico 25%. RIQ 75%: valor del intercuartílico 75%. P- valor: p-valor del test estadístico no paramétricos Kruskal-Wallis. ANOVA: "a", "b", "c", letras distintas implican varianzas distintas.

Elemento	Resultados ANOVA				Interpretación de resultados del test de ANOVA
		Piel	Pulpa	Cladodio	
Los valores analizados nos indican que son diferentes estadísticamente para pulpa, piel y cladodio.					
Na	abc	1,35E+04	4,27E+03	7,29E+03	La mayor concentración se encuentra en: Cl > Pu > Pi
Mg	abc	1,28E+06	2,80E+05	2,22E+06	Cl > Pi > Pu
K	abc	7,37E+06	9,56E+05	5,48E+06	Pi > Cl > Pu
Ca	abc	3,32E+06	2,53E+05	4,89E+06	Cl > Pi > Pu
Fe	abc	7,58E+03	1,95E+03	3,80E+03	Pi > Cl > Pu
Zn	abc	1,18E+03	1,66E+03	3,11E+03	Cl > Pu > Pi
Ga	abc	4,15E+01	3,55E+00	1,33E+02	Cl > Pi > Pu
Sr	abc	3,96E+04	5,32E+03	1,05E+05	Cl > Pi > Pu
Mo	abc	2,31E+01	1,08E+01	6,88E+01	Cl > Pi > Pu
Cd	abc	5,96E-01	1,57E-01	2,13E+00	Cl > Pi > Pu
Sb	abc	3,75E-01	1,06E-01	2,33E-01	Pi > Cl > Pu
Ba	abc	1,60E+03	2,63E+02	6,86E+03	Cl > Pi > Pu
Ce	abc	2,70E+02	1,00E+02	2,35E+02	Pi > Cl > Pu
W	abc	5,00E-02	7,05E-03	1,90E-02	Pi > Cl > Pu
U	abc	3,22E-01	4,40E-02	2,26E-01	Pi > Cl > Pu
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.					
Li	abb	9.98	2.88	2.83	La mayor concentración se encuentra en: Pi > Pu > Cl
Al	abb	7,70E+03	4,97E+02	1,06E+03	Pi > Cl > Pu
V	abb	9,98E+00	0,00E+00	0,00E+00	Pi ya que no se detecta en Pu ni Cl
Cr	abb	2,06E+02	6,88E+00	1,73E+01	Pi > Cl > Pu
Ni	abb	1,48E+02	3,85E+01	4,48E+01	Pi > Cl > Pu
Rb	abb	1,17E+03	1,21E+02	1,86E+02	Pi > Cl > Pu
Ag	abb	1,24E+01	2,62E-01	4,27E-01	Pi > Cl > Pu
In	abb	2,01E-01	2,08E-02	3,54E-02	Pi > Cl > Pu
Sn	abb	5,95E+00	4,70E-01	6,30E-01	Pi > Cl > Pu
Th	abb	3,61E-01	1,23E-02	5,69E-02	Pi > Cl > Pu
Se puede observar que entre piel y cladodio no hay diferencia estadística, pero ambos se diferencian de los resultados obtenidos en pulpa.					
Ti	aba	1,80E+01	8,30E+00	1,90E+01	La mayor concentración se encuentra en: Cl > Pi > Pu
Co	aba	7,00E+00	1,29E+00	8,54E+00	Cl > Pi > Pu
Cu	aba	4,00E+02	2,42E+02	4,49E+02	Cl > Pi > Pu
As	aba	4,61E+00	1,88E+00	4,57E+00	Pi > Cl > Pu
Se	aba	9,05E+00	2,66E+00	1,07E+01	Cl > Pi > Pu
Los valores obtenidos son estadísticamente iguales para piel y pulpa, pero ambos son diferentes de los obtenidos en el cladodio.					
B	aab	8E+03	5E+00	1E+01	La mayor concentración se encuentra en: Pi Cl > Pu
Mn	aab	5E+02	3E+02	7E+02	Cl > Pi ≈ Pu
Los valores son estadísticamente iguales tanto en pulpa y piel como en cladodio.					
Be	aaa	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	Pi = Pu = Cl
Sc	aaa	9,00E+01	9,00E+01	9,00E+01	Pi = Pu = Cl
Y	aaa	9,00E+01	9,00E+01	9,00E+01	Pi = Pu = Cl
Cs	aaa	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	Pi = Pu = Cl
Los valores son estadísticamente iguales para piel y cladodio, pero distintos para pulpa, Y a su vez, los valores son iguales para pulpa y cladodio, pero distintos para piel.					
Re	a b ab	1,65E-01	1,10E-01	1,50E-01	Pi ≠ Pu; Pi ≈ Cl; Pu ≈ Cl La mayor concentración se encuentra en: Pi ≥ Cl > Pu
Tl	a b ab	2,74E-01	9,10E-02	2,99E-01	Pi ≠ Pu; Pi ≈ Cl; Pu ≈ Cl Cl ≥ Pi > Pu
Los valores son estadísticamente iguales para piel y pulpa, pero distintos para cladodio. Y a su vez, los valores son iguales para pulpa y cladodio pero diferentes para piel.					
Au	a ab b	4,90E-03	4,00E-03	0,00E+00	Pi ≈ Pu ≠ Cl; Pu ≈ Cl ≠ Pi La mayor concentración se encuentra en: Pi > Pu
Pb	a ab b	9,18E+00	8,52E+00	6,71E+00	Pi ≈ Pu ≠ Cl; Pu ≈ Cl ≠ Pi Pi > Pu > Cl
Bi	a ab b	1,73E-01	7,84E-02	6,67E-02	Pi ≈ Pu ≠ Cl; Pu ≈ Cl ≠ Pi Pi > Pu > Cl

Tabla 10. Interpretación de resultados de la tabla 9. Resumen del análisis de varianzas (test de ANOVA). Pi= piel, Pu= pulpa, Cl= Cladodio.

4.3. Determinación de la capacidad antioxidante

Capacidad antioxidante por el método de ABTS

Muestra	Capacidad antioxidante ABTS*
Piel 1	42,4
Piel 2	31,2
Piel 3	35,0
Tallo 1	16,6
Tallo 2	15,4
Tallo 3	16,2
Pulpa 1	16,6
Pulpa 2	16,7
Pulpa 3	15,2

Tabla 11. Capacidad antioxidante por el método de ABTS. (mmoles equivalentes de Trolox/g muestra)

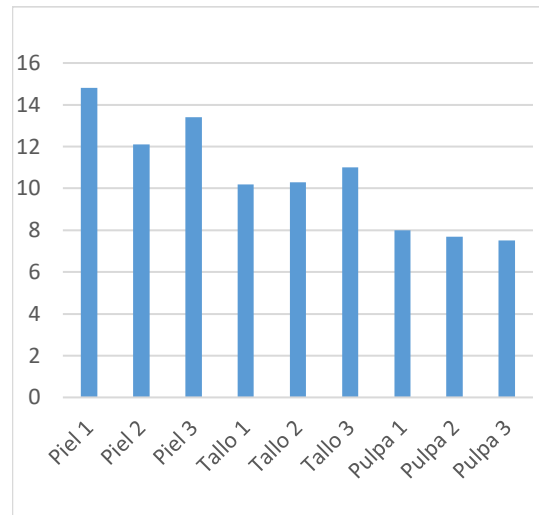


Figura 20. Capacidad antioxidante por el método de ABTS. (mmoles equivalentes de Trolox/g muestra)

Teniendo en cuenta los valores promedio (calculados en base a los resultados de la **Tabla 11**) obtenidos en este ensayo, los cuales son: 36,20 para piel, 16,07 para tallo y 16,17 para pulpa (expresados como mmoles equivalentes de Trolox/g), podemos afirmar que la mayor eficiencia frente a este radical ABTS^{•+} y por tanto mayor capacidad antioxidante, se encontró en la piel del fruto, seguido de la pulpa del mismo y finalmente en tallo, aunque con una concentración similar entre estos dos últimos tal y como se observa en la **Figura 20**.

Polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Muestra	Polifenoles Totales*
Piel 1	14,8
Piel 2	12,1
Piel 3	13,4
Tallo 1	10,2
Tallo 2	10,3
Tallo 3	11,0
Pulpa 1	8,0
Pulpa 2	7,7
Pulpa 3	7,5

Tabla 12. Polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. (mg equivalentes de Ácido gálico/g muestra)*

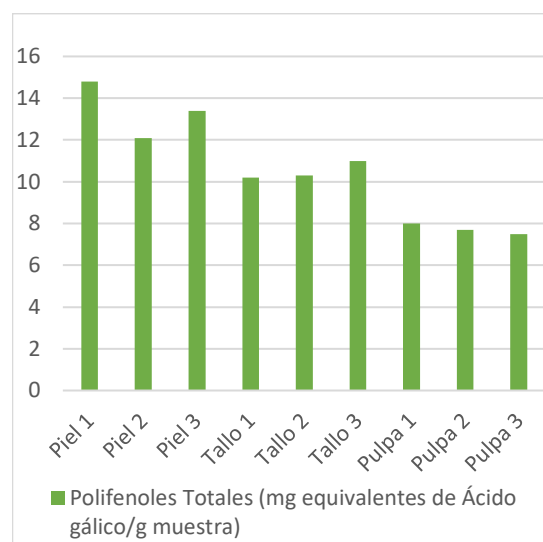


Figura 21. Polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Una vez más la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu refleja la mayor presencia de éstos en la piel de la tuna y en cladodio.

Flavonoides totales por el método de Cloruro de Aluminio

Muestra	Flavonoides totales*
Piel 1	2,5
Piel 2	1,4
Piel 3	1,5
Tallo 1	0,6
Tallo 2	1,2
Tallo 3	1,0
Pulpa 1	0
Pulpa 2	0
Pulpa 3	0

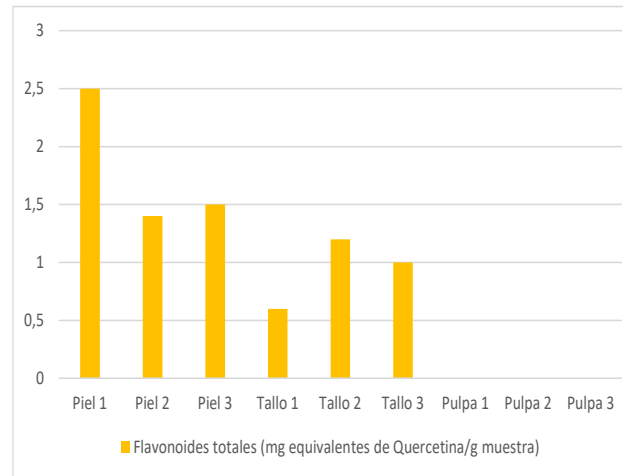


Figura 22. Flavonoides totales por el método de Cloruro de Aluminio.

Tabla 13. Flavonoides totales por el método de Cloruro de Aluminio. (mg equivalentes de Quercetina/g muestra)

El siguiente diagrama de barras, agrupa la información obtenida en los tres análisis anteriores:

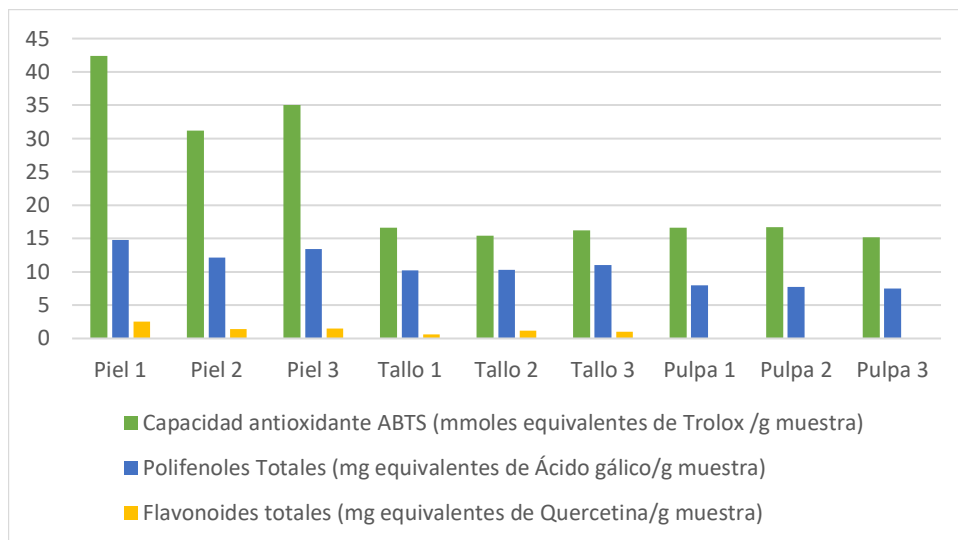


Figura 23. Análisis capacidad antioxidante, polifenoles totales y flavonoides totales.

A simple vista, observando la **Figura 23** podemos concluir que la piel presenta mayor capacidad antioxidante en el caso de los tres ensayos llevados a cabo y citados anteriormente. En relación a la capacidad antioxidante de polifenoles y flavonoides totales, medida a través de mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra y mg equivalentes de quercetina/g de muestra respectivamente, dicha concentraciones son ligeramente superiores en piel con respecto a tallo y pulpa, y en el caso de éstos dos últimos los valores son muy similares. A continuación vamos a poder ver las concentraciones de los compuestos fenólicos de interés medidos en pulpa piel y cladodio (tallo), y tal y como evidencia la **Figura 23**, la presencia de estos estos compuestos fenólicos es mucho menor en tallo e incluso llegando a no ser detectada en pulpa.

Polifenoles y flavonoides por el método de HPLC:

Debido a que las muestras no se han purificado es posible que los compuestos fenólicos se encuentren unidos a proteínas y lípidos. Por ello, al realizar un primer análisis se detecta una escasa cantidad de compuestos fenólicos. Se realiza un tratamiento a las muestras mediante hidrólisis ácida y calor, con ello se consigue detectar una mayor cantidad de compuestos fenólicos, con el inconveniente de que se pueden degradar algunos compuestos, por ejemplo, los flavonoides se encuentran mayoritariamente formando glucósidos y, por tanto, al realizar la hidrólisis se detectarán únicamente las agliconas, pero nos da una idea de la composición en flavonoides. **Se adjuntan los cromatogramas como ANEXO.**

Resultado de la muestra de piel 1

Quercetina: 93,2 µg/g muestra

Kaempferol: 44,9 µg/g muestra

Isorhamnetina: 1684,6 µg/g muestra

Resultado de la muestra de piel 2

Quercetina: 85,7 µg/g muestra

Kaempferol: 38,6 µg/g muestra

Isorhamnetina: 1103,2 µg/g muestra

Resultado de la muestra de piel 3

Quercetina: 84,2 µg/g muestra

Kaempferol: 47,2 µg/g muestra

Isorhamnetina: 1095,5 µg/g muestra

Resultado de la muestra de tallo 1

Quercetina: 0

Kaempferol: 50,2 µg/g muestra

Isorhamnetina: 219,5 µg/g muestra

Resultado de la muestra de tallo 2

Quercetina: 57,3 µg/g muestra

Kaempferol: 80,8 µg/g muestra

Isorhamnetina: 1274,7 µg/g muestra

Resultado de la muestra de tallo 3

Quercetina: 0

Kaempferol: 56,5 µg/g muestra

Isorhamnetina: 406,1 µg/g muestra

Resultado de la muestra de pulpa 1

No se detecta quercetina, kaempferol ni isorhamnetina.

Resultado de la muestra de pulpa 2

No se detecta quercetina, kaempferol ni isorhamnetina.

Resultado de la muestra de pulpa 3

No se detecta quercetina, kaempferol ni isorhamnetina.

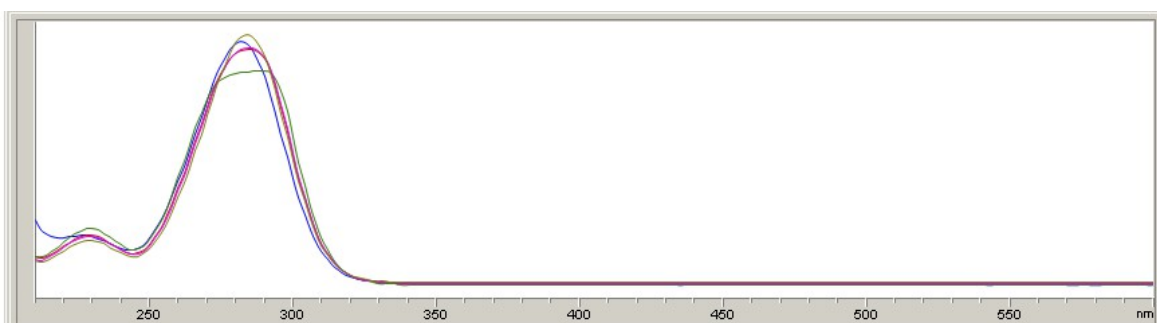
Muestra	Quercetina ($\mu\text{g/g}$ muestra)	Kaempferol ($\mu\text{g/g}$ muestra)	Isorhamnetina ($\mu\text{g/g}$ muestra)
Piel 1	93,2	44,9	1684,6
Piel 2	85,7	38,6	1103,2
Piel 3	84,2	47,2	1095,5
Tallo 1	0	50,2	219,5
Tallo 2	57,3	80,8	1274,7
Tallo 3	0	56,5	406,1
Pulpa 1	0	0	0
Pulpa 2	0	0	0
Pulpa 3	0	0	0

Tabla 14. Tabla resumen de flavonoides detectados por la técnica de HPLC.

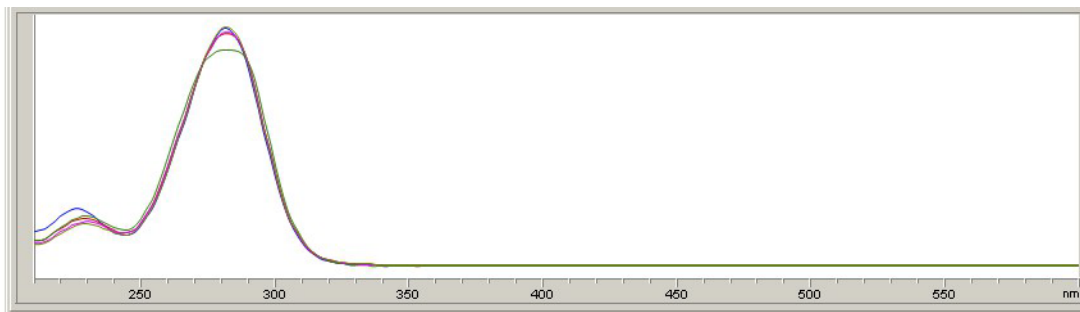
La bibliografía consultada coincide con nuestros resultados, en concreto refleja que el contenido en Kaempferol, Quercetina e Isorhamnetina como responsables de la fuerte capacidad antioxidante atribuida al contenido en flavonoides (junto a los carotenoides), constituye uno de los aspectos para considerar este un fruto prometedor (Cota-Sánchez et al., 2016).

En todas las muestras se detecta una serie de compuestos que eluyen a 4,0 minutos, 8,6 minutos y 13,1 minutos. No se ha podido determinar de qué compuestos se trata, también podrían ser los productos de degradación de moléculas de mayor tamaño, ya que se ha realizado un tratamiento ácido a las muestras. Los espectros de absorción son los siguientes:

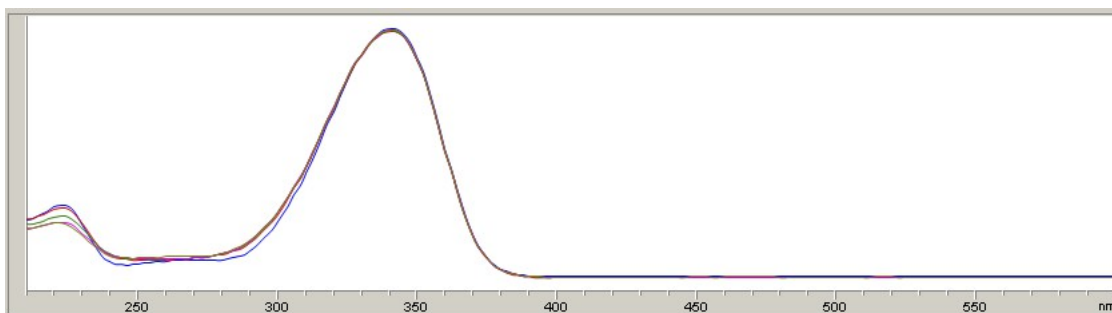
- Pico 4,0 min (máximo absorción: 280nm)



- Pico a 8,6 min (274nm)



- Pico a 13,1 min (máximo absorción: 340nm)



Análisis de betalaínas

Muestra	Betaxantina*	Betacianina*	Total Betalaínas*
Piel 1	359,3	21,4	380,7
Piel 2	369,0	20,9	389,9
Piel 3	374,9	21,3	396,1
Tallo 1	157,5	57,8	215,3
Tallo 2	156,2	52,8	209,0
Tallo 3	189,1	54,2	243,3
Pulpa 1	517,3	17,2	534,5
Pulpa 2	461,2	17,4	478,7
Pulpa 3	505,7	25,2	530,9

Tabla 15. Betalaínas analizadas. ($\mu\text{g/g}$ muestra)*

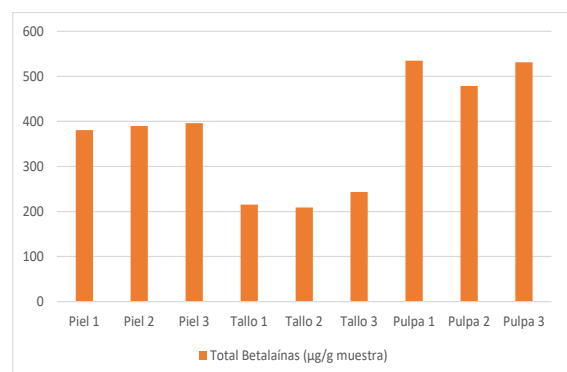


Figura 24. Betalaínas detectadas en piel, tallo y pulpa. Total Betalaínas ($\mu\text{g/g}$ muestra).

En el caso concreto de las betalaínas totales los resultados obtenidos en este estudio y reflejados en la **Figura 24**, muestran una mayor concentración de las mismas en pulpa, seguida de piel y finalmente de

tallo lo cual tiene mucho sentido ya que las betalaínas son pigmentos, responsables de los colores de flores y frutos de plantas como las cactáceas. Entre la betalaínas analizadas, encontramos en mayor proporción Betaxantina, distribuida de mayor a menor proporción en pulpa, piel y tallo. En el caso de la Betacianina, ésta se encuentra en mayor proporción en el tallo, seguido de piel y finalmente de pulpa.

Carotenoides detectados por la técnica de HPLC

Para la preparación de la muestra se ha realizado un tratamiento enzimático con proteasa seguido de una extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Finalmente, se ha evaporado el disolvente en el rotavapor a baja temperatura y se ha reconstituido con 50 mg/L butilhidroxitolueno en metanol.

En los cromatogramas adjuntos en **Anexo I**, se observa que aparecen picos muy similares en todas las muestras, siendo el pico mayoritario el que eluye a 5,4 minutos.

Estándar luteína:

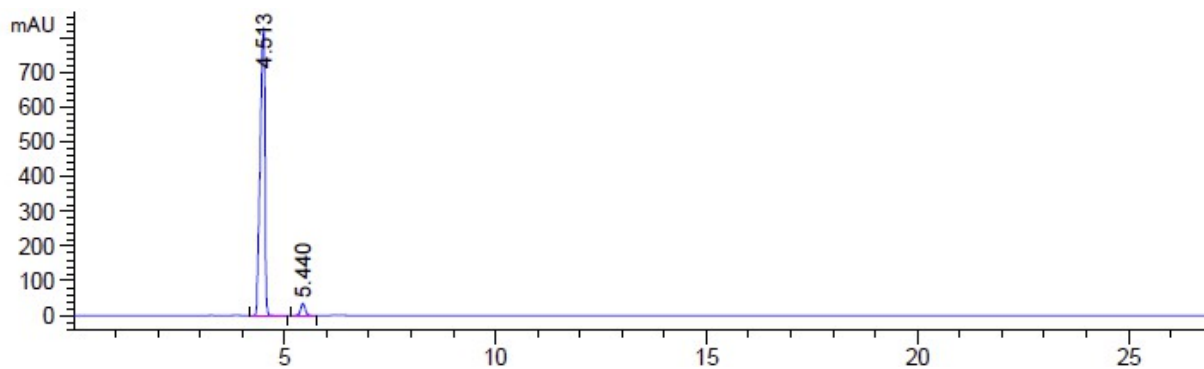
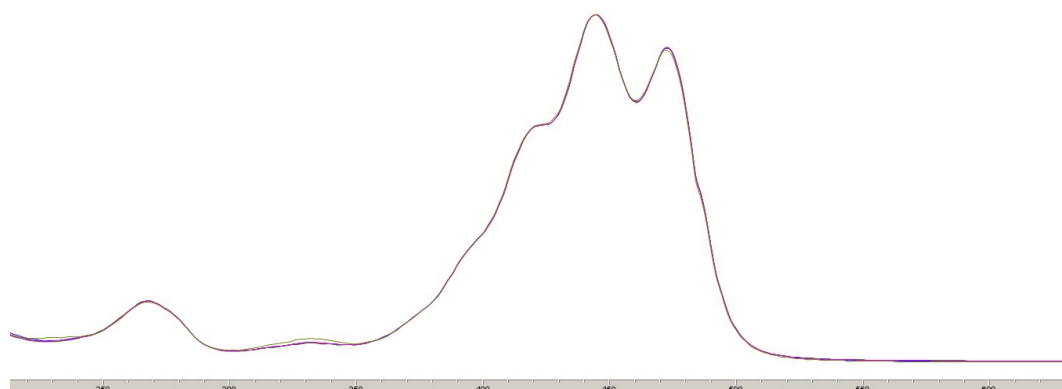


Figura 25. Cromatograma resultado de estándar de luteína.

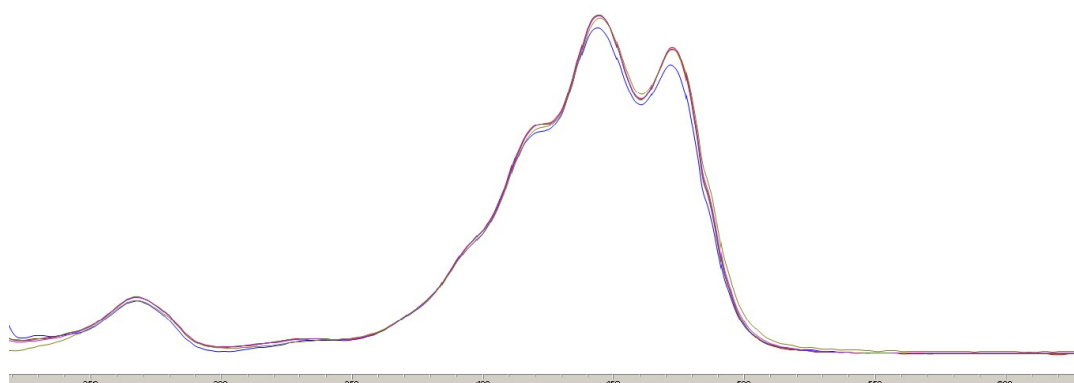
Espectros de absorción Luteína:

- Máximos de absorción: 422nm, 455 nm, 470 nm



Pico mayoritario muestras (5,4 minutos):

- Máximos de absorción: 423nm, 446 nm, 472 nm



En las muestras no se detecta luteína, pero el pico que aparece a 5,4 minutos se trata de un carotenoide con una estructura muy similar a la luteína, ya que los espectros de absorción son muy parecidos. Para tener una idea de la cantidad de carotenoides presente en las muestras, se va a calcular la concentración teniendo en cuenta el estándar de luteína. Los resultados se expresan como μg equivalentes de Luteína /g muestra.

Muestra	μg equivalentes de Luteína /g
Piel 1	10,5
Piel 2	11,4
Piel 3	11,1
Tallo 1	35,4
Tallo 2	32,8
Tallo 3	44,4
Pulpa 1	3,1
Pulpa 2	2,3
Pulpa 3	2,6

Tabla 16. Carotenoides expresados como μg equivalentes de Luteína/g muestra.

Tal y como se observa en los, las muestras correspondientes a la piel presentan mayor capacidad antioxidante, mayor cantidad de polifenoles y flavonoides. Las muestras de tallo y pulpa presentan una capacidad antioxidante muy similar, aunque la pulpa contiene menor cantidad de polifenoles y no se ha detectado la presencia de flavonoides. En cambio, en la pulpa se detecta una mayor concentración de

betalaínas. Podemos afirmar que nuestros resultados se asemejan a los hallados en la revisión bibliográfica (Cota-Sánchez et al., 2016), (El-Mostafa et al., 2014), (Kolniak-Ostek et al., 2020).

Por otro lado, existen una serie de componentes que se encuentran presentes en todas las muestras, aunque no se han podido identificar. Cabría realizar un estudio más exhaustivo para determinar el compuesto del que se trata.

Por último, las muestras de tallo son las que presentan mayor cantidad de carotenoides, seguido de las muestras de piel y las muestras de pulpa son las que contienen menor cantidad de carotenoides. Se debe tener en cuenta que las muestras de pulpa se encuentran humedecidas, y por eso puede disminuir la proporción de principios activos.

5. CONCLUSIONES

La incorporación de las diferentes partes de nopal (piel, pulpa, cladodio) en nuestra alimentación, es solo un complemento a un estilo de vida saludable que tiene un efecto significativo debido a la concentración de los metales encontrados en cladodios, piel y pulpa y a su capacidad antioxidante.

Los frutos de tuna se pueden dividir en tres componentes que pueden explotarse para el procesamiento comercial: semillas, piel y pulpa.

En función de los resultados obtenidos del análisis de metales se observa que la concentración de metales en nopal varía en función de si se trata de cladodio, piel o pulpa.

En las muestras analizadas se puede destacar un alto contenido de minerales. Los minerales encontrados en mayor proporción si los ordenamos de mayor a menor cantidad, en todas las muestras, son el Potasio ($7,37E+06$ µg/L en piel), el Calcio ($4,89E+06$ µg/L en cladodio) el Magnesio ($2,22E+06$ µg/L en cladodio) y el Estroncio ($1,05E+05$ µg/L en cladodio) seguido por el Sodio ($1,35E+04$ µg/L en piel).

Si diferenciamos los tres tipos de muestras diferentes de *Opuntia ficus-indica*. Curiosamente la parte del fruto comestible o pulpa, que es la que más se consume de forma habitual, no sobresale en composición respecto al contenido de minerales, mientras que la piel tiene la mayor cantidad de K, Fe, Sb, Ce, W, U, Li, Al, V, Cr, Ni, Rb, Ag, In, Sn, Th y As. Es en el cladodio donde predominan el Na, Mg, Ca, Zn, Ga, Sr, Mo, Cd, Tl, Co, Cu, y Se.

La actividad antioxidante en *Opuntia ficus indica* se asocia con los contenidos de compuestos fenólicos que se expresan en milimoles equivalentes de Trolox/g de muestra. Siendo las concentraciones más elevadas las encontradas en piel con un valor promedio de 36,2 mmoles equivalentes de Trolox/g muestra. Y con la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocolteu que refleja la mayor presencia de estos en la piel de la tuna, seguida del cladodio. Y por último por los mg equivalentes de quercetina/g muestra. De todos los resultados obtenidos se demuestra que el contenido promedio en Kaempferol que es de 43.5 $\mu\text{g/g}$, Quercetina es de 87.7 $\mu\text{g/g}$, e Isorhamnetina de 1294.4 $\mu\text{g/g}$. Así todos estos compuestos encontrados en *Opuntia* son los responsables de la fuerte capacidad antioxidante. Encontrándose fundamentalmente todos ellos en mayor proporción en la piel.

Es por ello que este estudio se puede considerar como una contribución al conocimiento sobre la calidad nutricional y antioxidante de *Opuntia ficus-indica*. Todos los avances científicos en el campo de compuestos activos funcionales pueden servir para proteger la salud y nutrición y en paralelo para su uso en poblaciones con recursos económicos limitados. Por todo lo expuesto se puede concluir que este cultivo “subexplotado” tiene el potencial de proporcionar alimentos, bebidas y niveles aceptables de nutrición, además de un importante potencial farmacológico e ingredientes activos prometedores en la nutrición y la salud humanas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, M. (2019). Metales pesados y microbiota. <https://microecologia.es>. <https://microecologia.es/metales-pesados-y-microbiota/>
- Arauz, J. C. G. (2009). Efectos biofuncionales del. *Horticultura Internacional*, 18, 71.
- Askar, A., & El Samahy, S. (1981). Chemical composition of prickly pear fruits [figs]. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*.
- Blumberg, J. B., Basu, A., Krueger, C. G., Lila, M. A., Neto, C. C., Novotny, J. A., Reed, J. D., Rodriguez-Mateos, A., & Toner, C. D. (2016). Impact of cranberries on gut microbiota and cardiometabolic health: Proceedings of the cranberry health research conference 2015. *Advances in Nutrition*, 7(4), 759S-770S.
- Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 56(14), 5758-5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>
- Chong, C. H., Law, C. L., Figiel, A., Wojdyło, A., & Oziembłowski, M. (2013). Colour, phenolic content and antioxidant capacity of some fruits dehydrated by a combination of different methods. *Food Chemistry*, 141(4), 3889-3896.
- Constante, M., Fragoso, G., Calvé, A., Samba-Mondonga, M., & Santos, M. M. (2017). Dietary heme induces gut dysbiosis, aggravates colitis, and potentiates the development of adenomas in mice. *Frontiers in microbiology*, 8, 1809.
- Cota-Sánchez, J. H., Simmonds, M. S. J., & Preedy, V. R. (2016). Chapter 28 - Nutritional Composition of the Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) Fruit. In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 691-712). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00028-3>
- de Chávez, M. M., Chávez, A., Valles, V., & Roldán, J. A. (1995). The nopal: a plant of manifold qualities. *Plants in Human Nutrition*, 77, 109-134.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M. S., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901. <https://doi.org/10.3390/molecules190914879>
- El Kossori, R. L., Villaume, C., El Boustani, E., Sauvaire, Y., & Méjean, L. (1998). Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Plant Foods Hum Nutr*, 52(3), 263-270. <https://doi.org/10.1023/a:1008000232406>
- Esmailzadeh, A., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2005). Whole-grain consumption and the metabolic syndrome: a favorable association in Tehranian adults. *European journal of clinical nutrition*, 59(3), 353-362.
- Espín, J. C., González-Sarrías, A., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. *Biochemical pharmacology*, 139, 82-93.
- Ewaidah, E. H., & Hassan, B. H. (1992). Prickly pear sheets: a new fruit product. *International Journal of Food Science & Technology*, 27(3), 353-358.
- Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C., & Zou, C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci*, 11(1), 2574-2589.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 645-649. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>
- Grotto, D., & Molinari Tato, A. (2014). *Lo mejor que puedes comer De la A a la Z, la guía nutricional definitiva para llenarte de energía, de salud y de belleza*. Penguin Random House;.
- Guzmán Loayza, D., & Chávez, J. (2007). Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(1), 41-45.

- Habtemariam, S. (2019). Chapter 13 - The chemical and pharmacological basis of prickly pear cactus (*Opuntia* species) as potential therapy for type 2 diabetes and obesity. In *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases* (pp. 435-472). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102922-0.00013-4>
- Jackson, M. (1989). Physiology of zinc: general aspects. In *Zinc in human biology* (pp. 1-14). Springer.
- Jaeggi, T., Kortman, G. A., Moretti, D., Chassard, C., Holding, P., Dostal, A., Boekhorst, J., Timmerman, H. M., Swinkels, D. W., & Tjalsma, H. (2015). Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut*, *64*(5), 731-742.
- Jiménez, C. I. E., Martínez, E. Y. C., & Fonseca, J. G. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, *52*(2), 73-75.
- Kang, J.-W., Shin, J.-K., Koh, E.-J., Ryu, H., Kim, H. J., & Lee, S.-M. (2016). *Opuntia ficus-indica* seed attenuates hepatic steatosis and promotes M2 macrophage polarization in high-fat diet-fed mice. *Nutrition Research*, *36*(4), 369-379.
- Kaur, M. a. K. A. a. S. R. (2012). Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *2*, 15-18. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2703>
- Kolniak-Ostek, J., Kita, A., Miedzianka, J., Andreu-Coll, L., Legua, P., & Hernandez, F. (2020). Characterization of Bioactive Compounds of. *Molecules*, *25*(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235734>
- Koudoufio, M., Desjardins, Y., Feldman, F., Spahis, S., Delvin, E., & Levy, E. (2020). Insight into Polyphenol and Gut Microbiota Crosstalk: Are Their Metabolites the Key to Understand Protective Effects against Metabolic Disorders? *Antioxidants (Basel)*, *9*(10). <https://doi.org/10.3390/antiox9100982>
- Liu, Y., Li, Y., Xia, Y., Liu, K., Ren, L., & Ji, Y. (2020). The dysbiosis of gut microbiota caused by low-dose cadmium aggravate the injury of mice liver through increasing intestinal permeability. *Microorganisms*, *8*(2), 211.
- Lopez, C. A., & Skaar, E. P. (2018). The impact of dietary transition metals on host-bacterial interactions. *Cell host & microbe*, *23*(6), 737-748.
- Maki-Díaz, G., Peña-Valdivia, C. B., García-Nava, R., Arévalo-Galarza, M. L., Calderón-Zavala, G., & Anaya-Rosales, S. (2015). Características físicas y químicas de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) para exportación y consumo nacional. *Agrociencia*, *49*(1), 31-51.
- Mallappa, R. H., Rokana, N., Duary, R. K., Panwar, H., Batish, V. K., & Grover, S. (2012). Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, *16*(1), 20.
- Mancha, M. A. F., Monterrubio, A. L. R., Vega, R. S., & Martínez, A. C. (2019). Estructura y estabilidad de las betalal nas.
- Mele, L., Carobbio, S., Brindani, N., Curti, C., Rodriguez-Cuenca, S., Bidault, G., Mena, P., Zanotti, I., Vacca, M., & Vidal-Puig, A. (2017). Phenyl-γ-valerolactones, flavan-3-ol colonic metabolites, protect brown adipocytes from oxidative stress without affecting their differentiation or function. *Molecular nutrition & food research*, *61*(9), 1700074.
- Mithul Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*, *142*, 110189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110189>
- Ramadan, M. F., & Mörssel, J.-T. (2003). Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). *Food Chemistry*, *82*(3), 339-345. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00550-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00550-2)
- Sabaté, J., & Wien, M. (2015). A perspective on vegetarian dietary patterns and risk of metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition*, *113*(S2), S136-S143.
- Sáenz, C., & Sepúlveda, E. (2001). Cactus-pear juices. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, *4*, 3-10.
- Sandoval, V., Sanz-Lamora, H., Arias, G., Marrero, P. F., Haro, D., & Relat, J. (2020). Metabolic Impact of Flavonoids Consumption in Obesity: From Central to Peripheral. *Nutrients*, *12*(8). <https://doi.org/10.3390/nu12082393>

- Santiago-Lorenzo, M. d. R., López-Jiménez, A., Saucedo-Veloz, C., Cortés-Flores, J. I., Jaén-Contreras, D., & Suárez-Espinosa, J. (2016). Composición nutrimental del nopal verdura producido con fertilización mineral y orgánica. *Revista fitotecnia mexicana*, 39, 403-407. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802016000400403&nrm=iso
- Sawaya, W., Khatchadourian, H., Safi, W., & Al-Muhammad, H. (1983). Chemical characterization of prickly pear pulp, *Opuntia ficus-indica*, and the manufacturing of prickly pear jam. *International Journal of Food Science & Technology*, 18(2), 183-193.
- Sepúlveda, E., & Sáenz, C. (1990). Chemical and physical characteristics of prickly pear (*Opuntia-Ficus-Indica*) Pulp. In (Vol. 30, pp. 551-555): INST AGROQUIMICA TECH ALIMEN JAIME ROIG 11, 46010 VALENCIA, SPAIN.
- Spahis, S., Alvarez, F., Ahmed, N., Dubois, J., Jalbout, R., Paganelli, M., Grzywacz, K., Delvin, E., Peretti, N., & Levy, E. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease severity and metabolic complications in obese children: Impact of omega-3 fatty acids. *The Journal of nutritional biochemistry*, 58, 28-36.
- Vélez-Gutierrez, C., & Rodríguez-Garay, B. (1996). Microscopic analysis of polyembryony in *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 1, 39-48.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6520-6530.

7. ANEXOS:

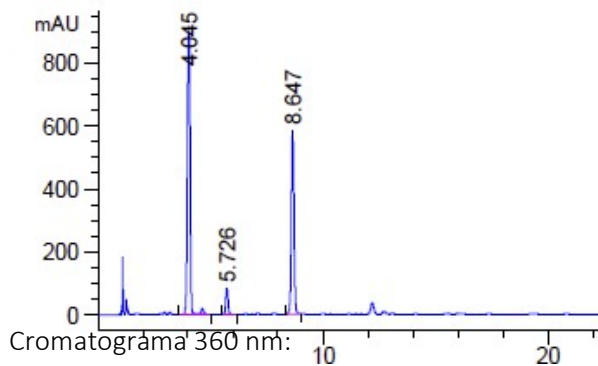
ANEXO I

Polifenoles y flavonoides HPLC

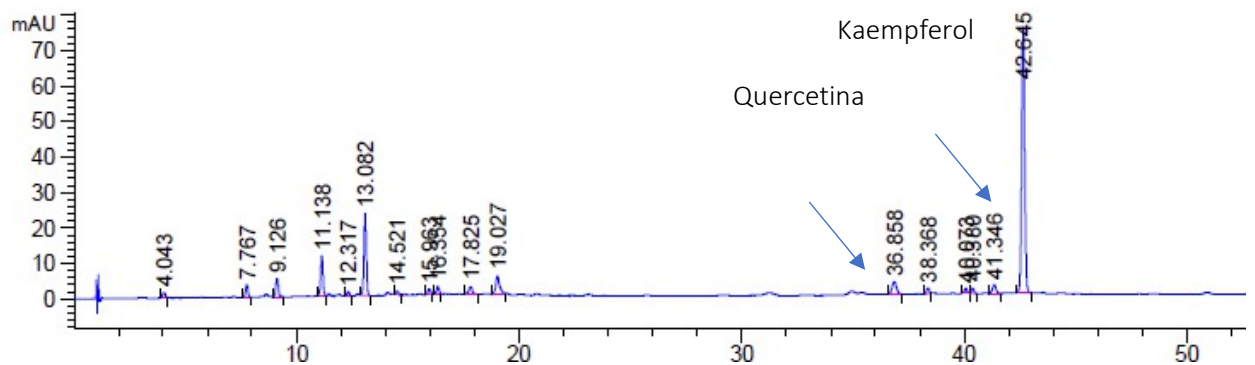
Debido a que las muestras no se han purificado es posible que los compuestos fenólicos se encuentren unidos a proteínas y lípidos. Por eso, al realizar un primer análisis se detecta una escasa cantidad de compuestos fenólicos. Se realiza un tratamiento a las muestras mediante hidrólisis ácida y calor, con ello se consigue detectar una mayor cantidad de compuestos fenólicos, pero con el inconveniente de que se pueden degradar algunos compuestos, por ejemplo, los flavonoides se encuentran mayoritariamente formando glucósidos y, por tanto, al realizar la hidrólisis se detectará únicamente las agliconas, pero nos da una idea de la composición en flavonoides.

Piel 1

Cromatograma 254 nm:



Isorhamnetina



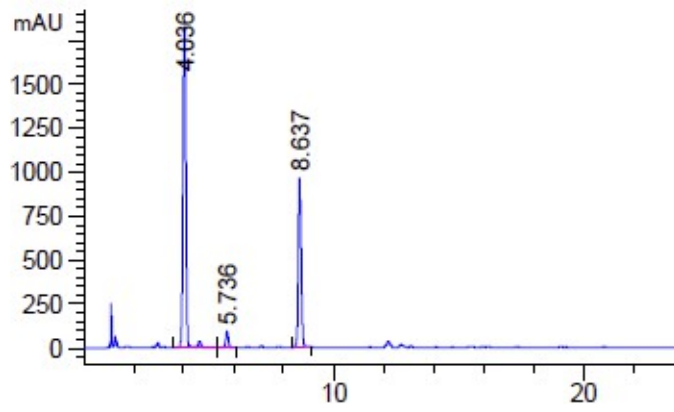
Quercetina: 93,2 µg/g muestra

Kaempferol: 44,9 µg/g muestra

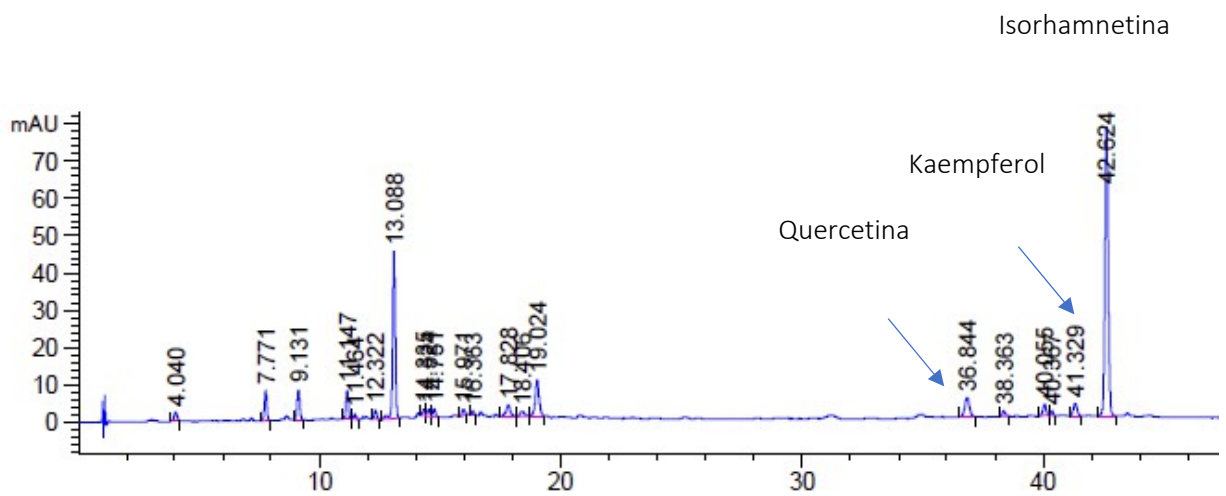
Isorhamnetina: 1684,6 µg/g muestra

Piel 2

Cromatograma a 254 nm:



Cromatograma a 360 nm:



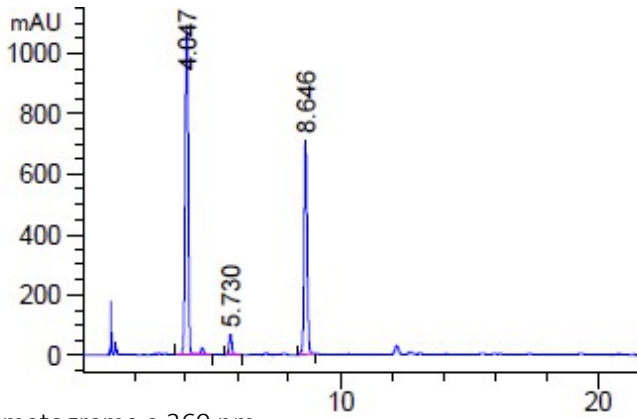
Quercetina: 85,7 $\mu\text{g/g}$ muestra

Kaempferol: 38,6 $\mu\text{g/g}$ muestra

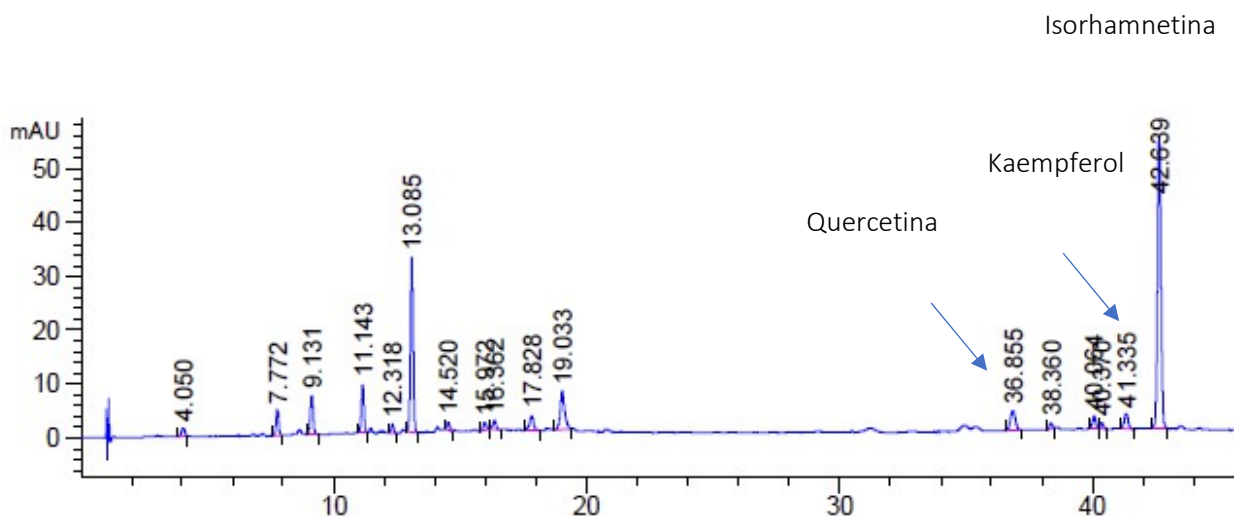
Isorhamnetina: 1103,2 $\mu\text{g/g}$ muestra

Piel 3

Cromatograma a 254 nm:



Cromatograma a 360 nm:



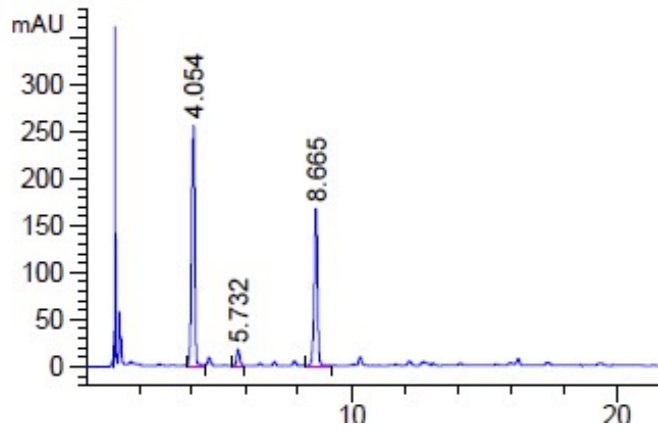
Quercetina: 84,2 $\mu\text{g/g}$ muestra

Kaempferol: 47,2 $\mu\text{g/g}$ muestra

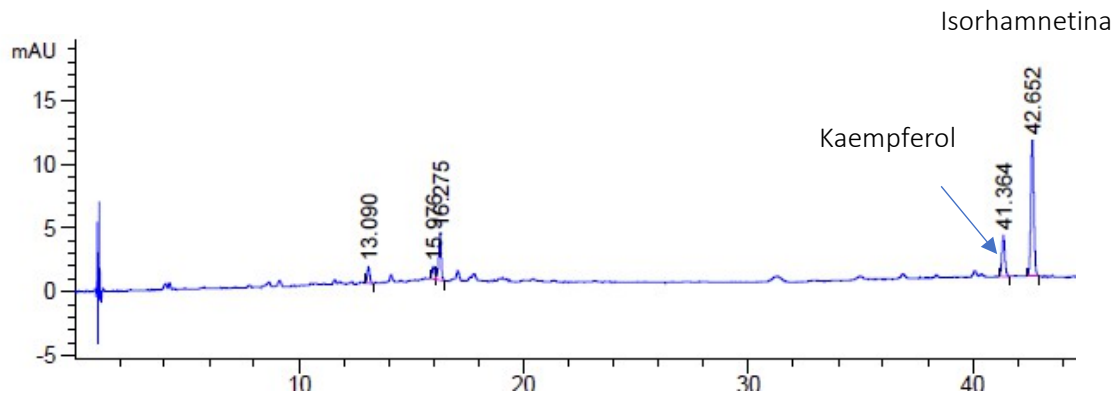
Isorhamnetina: 1095,5 $\mu\text{g/g}$ muestra

Tallo 1:

Cromatograma a 254 nm:



Cromatograma a 360 nm:

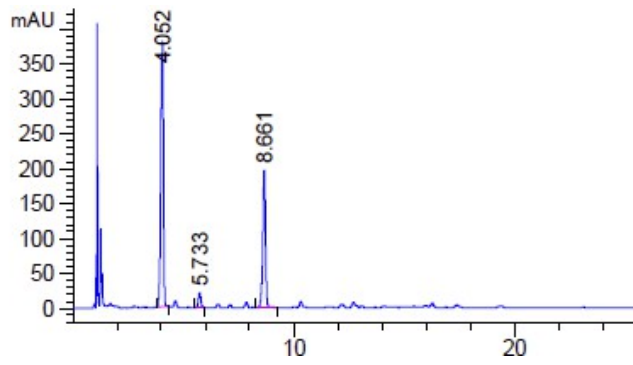


Kaempferol: 50,2 $\mu\text{g/g}$ muestra

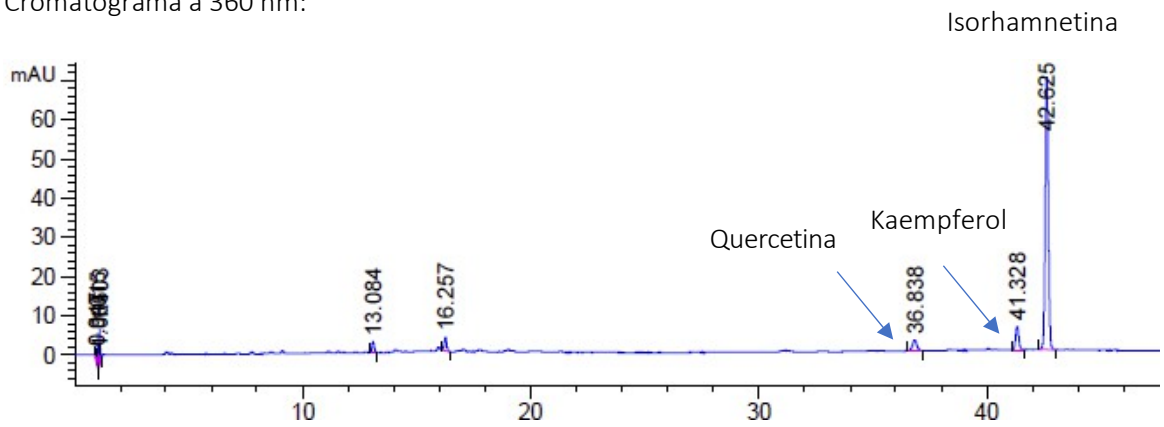
Isorhamnetina: 219,5 $\mu\text{g/g}$ muestra

Tallo 2:

Cromatograma a 254 nm:



Cromatograma a 360 nm:



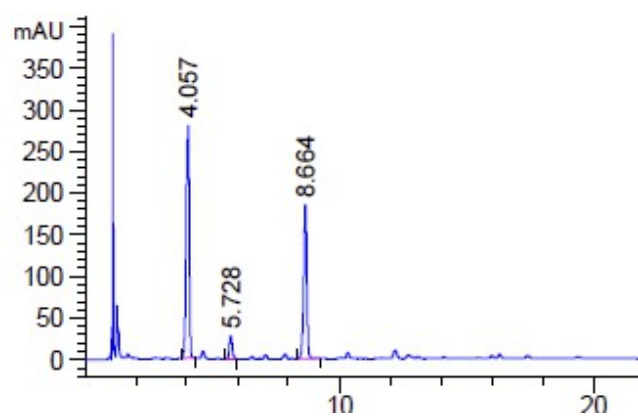
Quercetina: 57,3 $\mu\text{g/g}$ muestra

Kaempferol: 80,8 $\mu\text{g/g}$ muestra

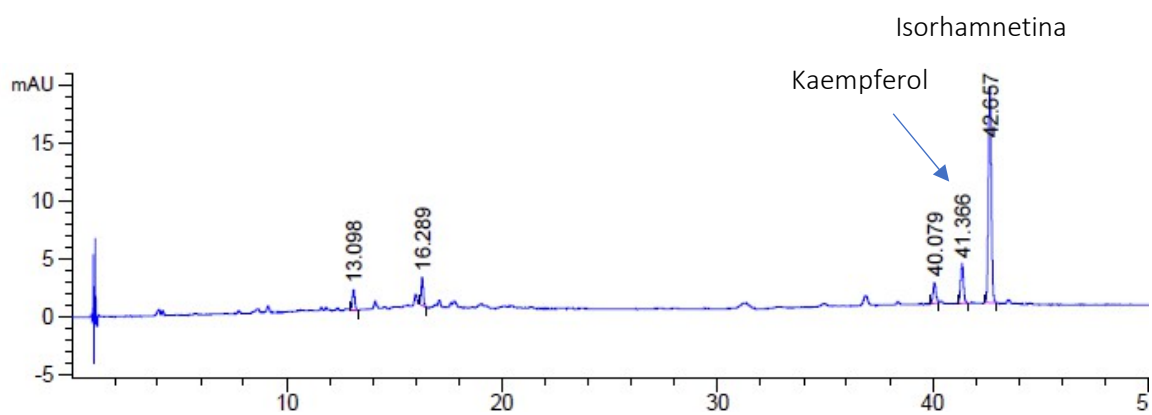
Isorhamnetina: 1274,7 $\mu\text{g/g}$ muestra

Tallo 3:

Cromatograma a 254 nm:



Cromatograma a 360 nm:

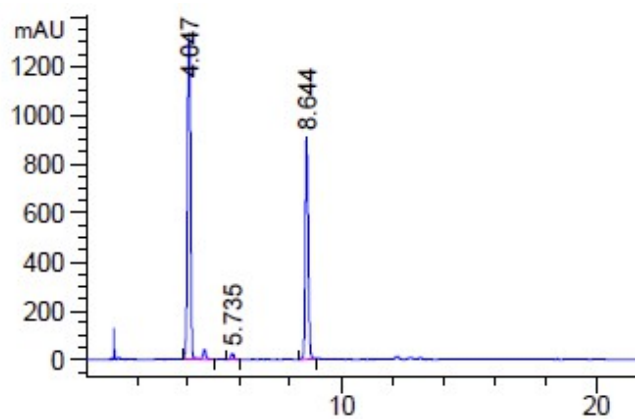


Kaempferol: 56,5 $\mu\text{g/g}$ muestra

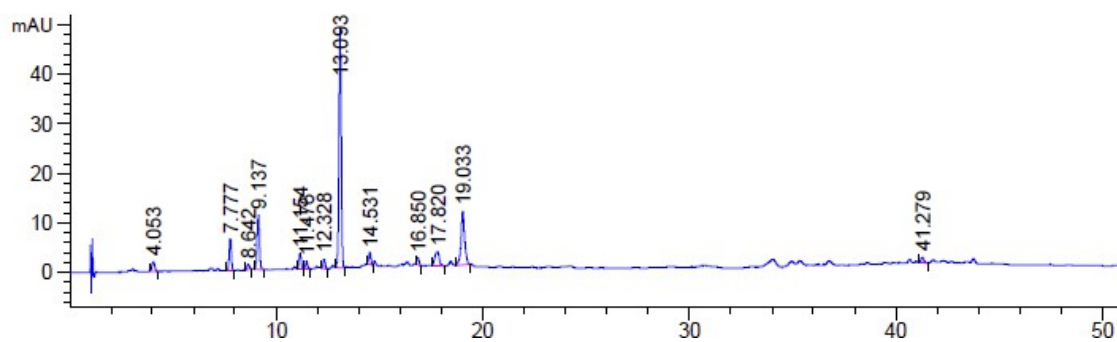
Isorhamnetina: 406,1 $\mu\text{g/g}$ muestra

Pulpa 1:

Cromatograma a 254 nm:



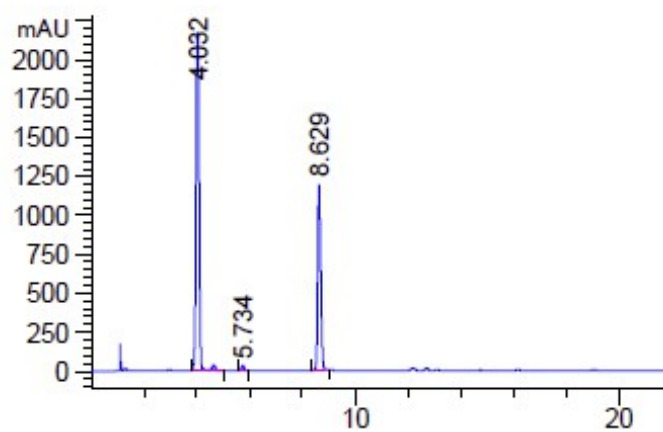
Cromatograma a 360 nm:



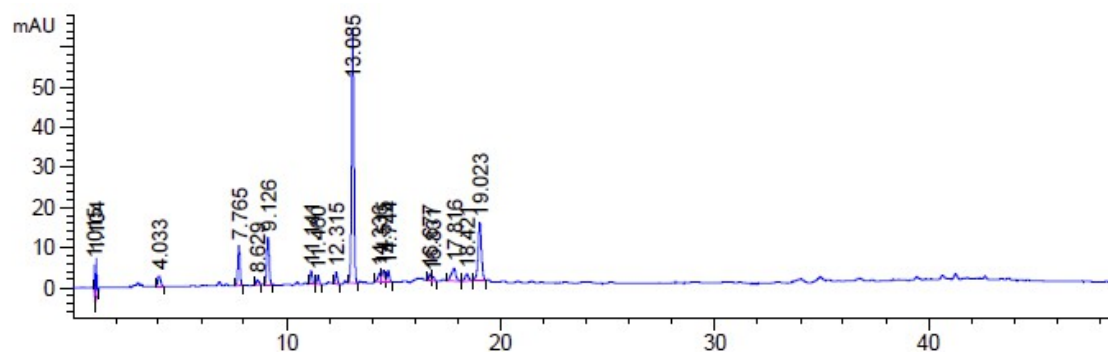
No se detecta quercetina, kaempferol ni isorhamnetina

Pulpa 2:

Cromatograma a 254 nm:



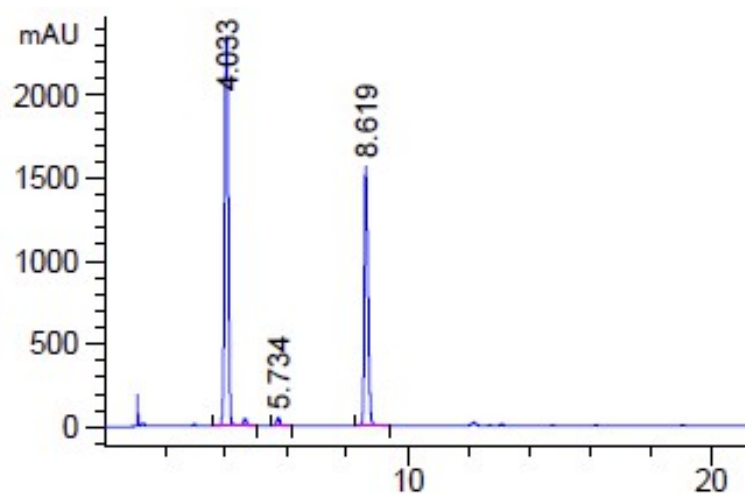
Cromatograma a 360 nm:



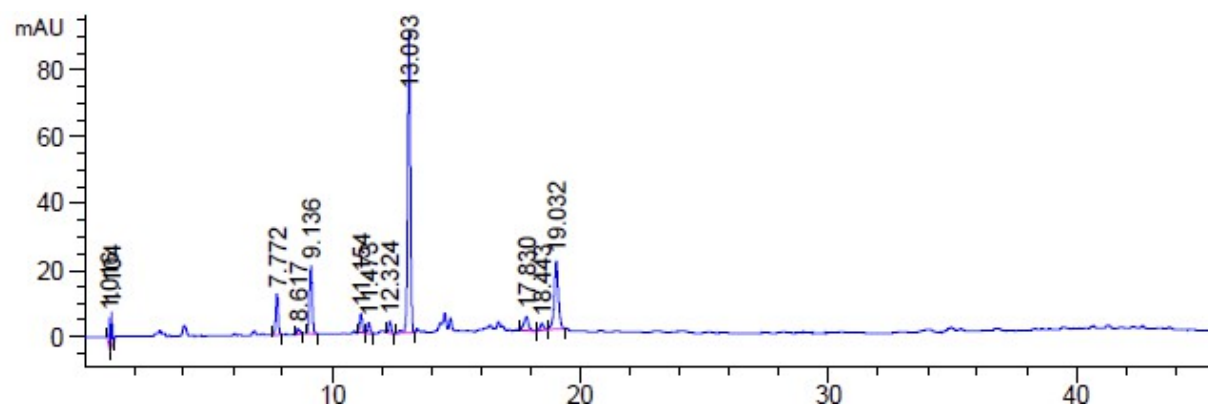
No se detecta quercetina, kaempferol ni isorhamnetina

Pulpa 3:

Cromatograma a 254 nm:



Cromatograma a 360 nm:



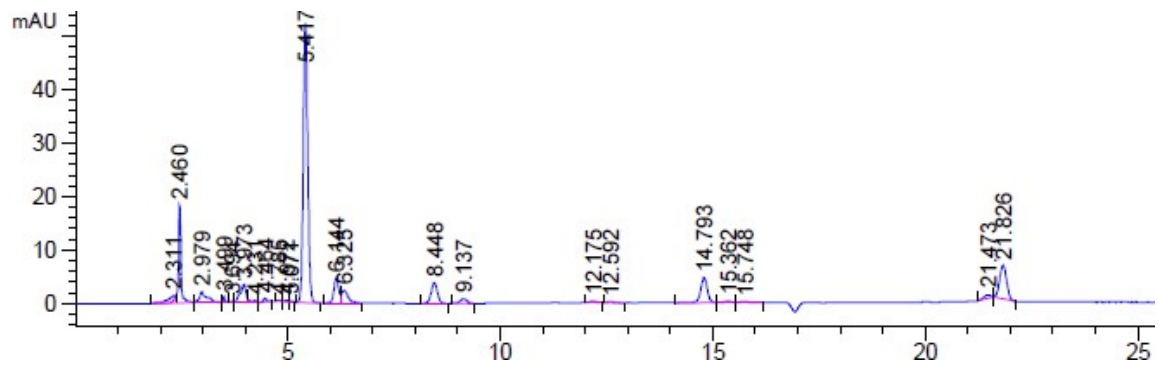
No se detecta quercetina, kaempferol ni isorhamnetina

ANEXO II

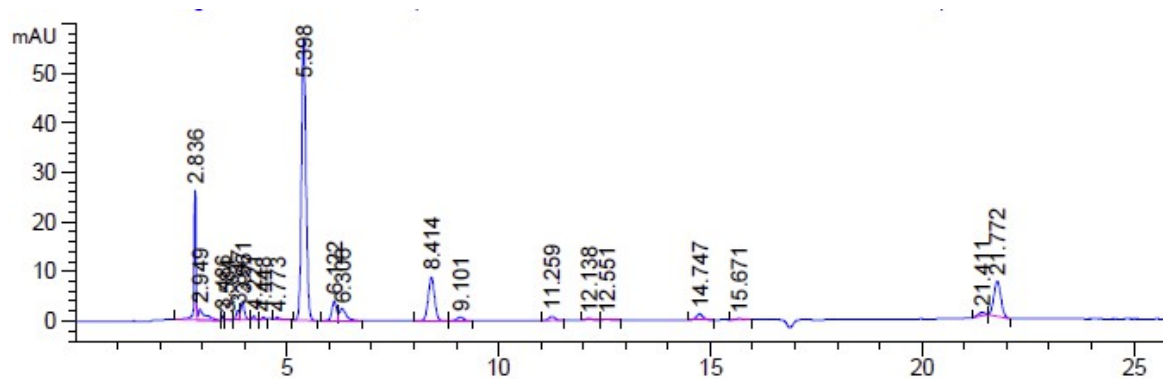
Carotenoides HPLC

Para la preparación de la muestra se ha realizado un tratamiento enzimático con proteasa seguido de una extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Finalmente, se ha evaporado el disolvente en el rotavapor a baja temperatura y se ha reconstituido con 50 mg/L butilhidroxitolueno en metanol.

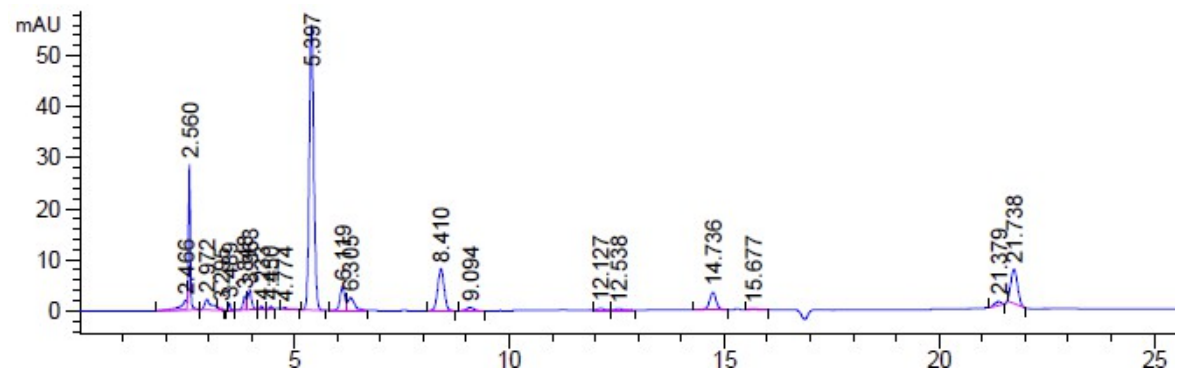
Piel 1:



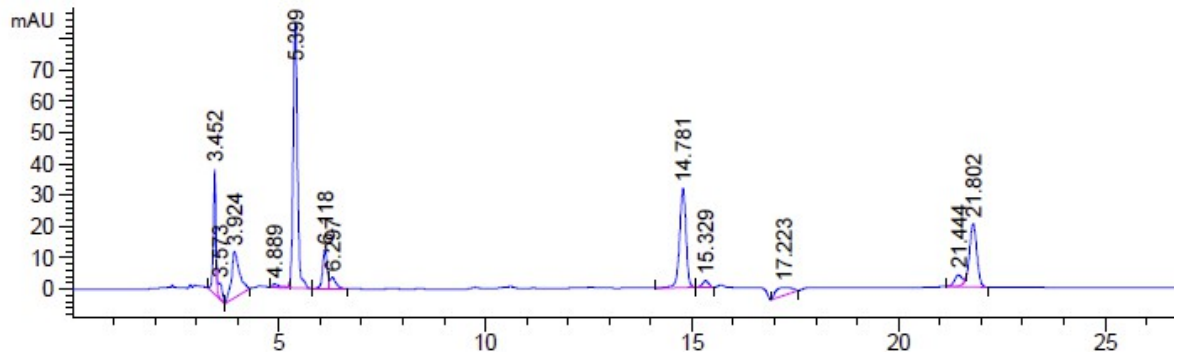
Piel 2:



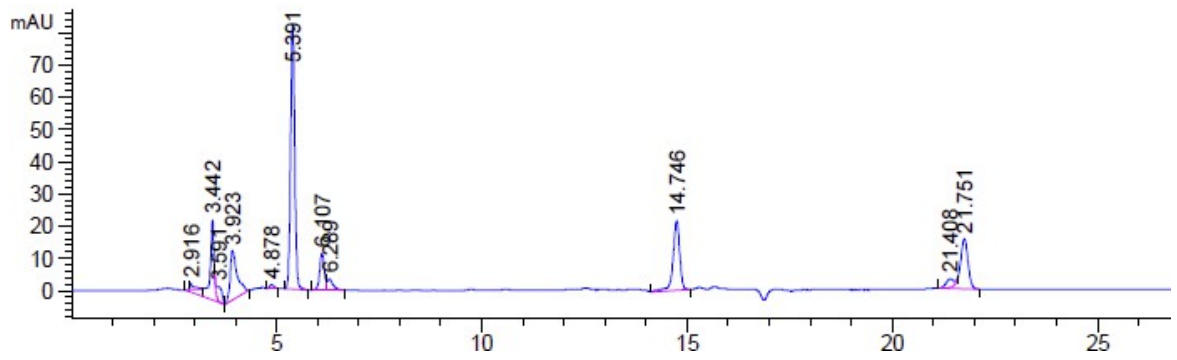
Piel 3:



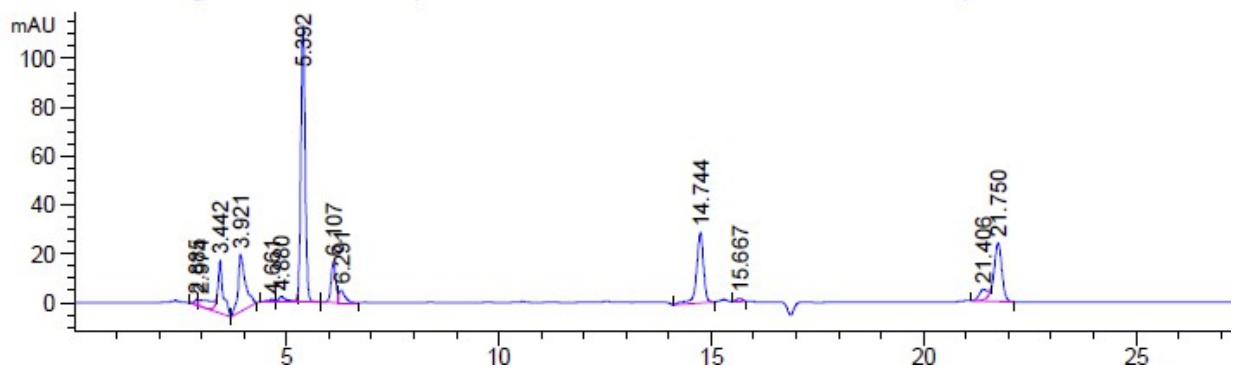
Tallo 1:



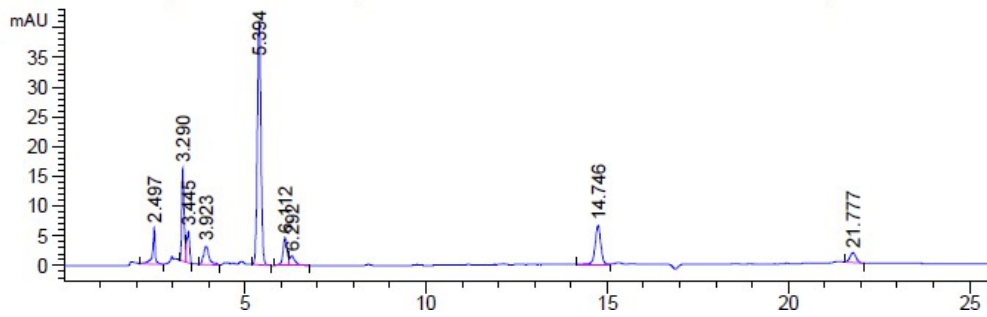
Tallo 2:



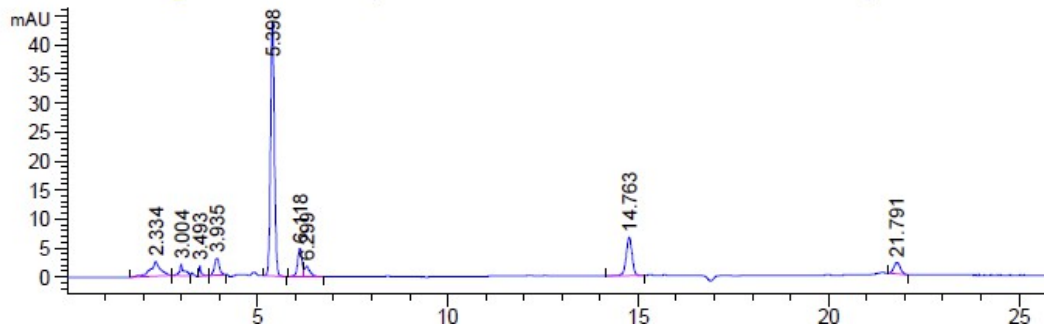
Tallo 3:



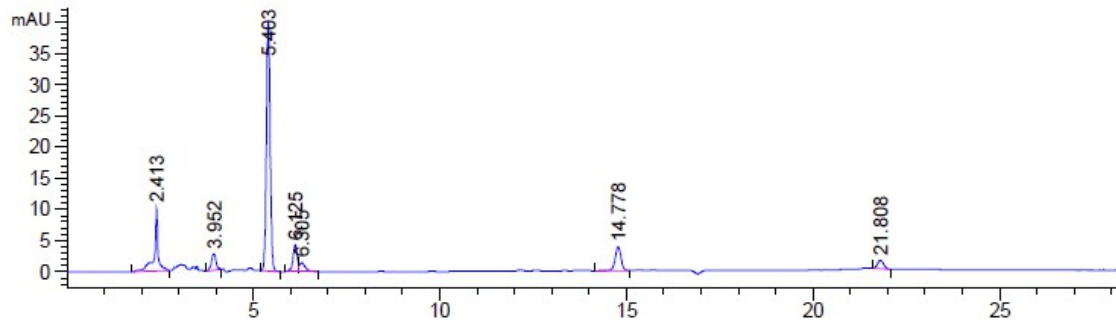
Pulpa 1:



Pulpa 2:



Pulpa 3:



Se observa que aparecen picos muy similares en todas las muestras, siendo el pico mayoritario el que eluye a 5,4 minutos.