

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Nutrición y Bromatología



**VEGETALES SILVESTRES DE USO ALIMENTARIO :
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y
VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Patricia Morales Gómez

Bajo la dirección de los doctores
Montaña Cámara Hurtado
M^a Cortes Sánchez Mata

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Nutrición y Bromatología II



**VEGETALES SILVESTRES DE USO ALIMENTARIO.
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y VALORACIÓN
DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA MORALES GÓMEZ

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Nutrición y Bromatología II



**VEGETALES SILVESTRES DE USO ALIMENTARIO.
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y VALORACIÓN DE LA
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

TESIS DOCTORAL

PATRICIA MORALES GÓMEZ

Para optar al Grado de Doctor, con mención Europea,

Directoras:

Dra. Montaña Cámara Hurtado y Dra. M^a Cortes Sánchez Mata.

Madrid, Junio 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
Bromatología

M^a DOLORES TENORIO SANZ, PROFESORA TITULAR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA QUE:

El presente trabajo de investigación titulado **“Vegetales silvestres de uso alimentario. Determinación de compuestos bioactivos y valoración de la capacidad antioxidante”** se ha realizado en este Departamento bajo la dirección de las doctoras Montaña Cámara Hurtado y M^a de Cortes Sánchez Mata, y constituye la Memoria que presenta la licenciada Dña. Patricia Morales Gómez para optar al Grado de Doctor, con mención europea.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a treinta de mayo de dos mil once.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
Bromatología

MONTAÑA CÁMARA HURTADO y M^a DE CORTES SÁNCHEZ MATA, PROFESORAS TITULARES DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, EN EL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN QUE:

Dña. Patricia Morales Gómez, ha realizado bajo su dirección y en este Departamento el trabajo que lleva por título **“Vegetales silvestres de uso alimentario. Determinación de compuestos bioactivos y valoración de la capacidad antioxidante”** y que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor, con mención europea.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a treinta de mayo de dos mil once.

A Rafa
A mi Familia



Campos de Primavera (Claude Monet, 1887)

AGRADECIMIENTOS

Poder agradecer y resumir todos los buenos momentos y palabras de apoyo recibidas durante estos años en unas pocas líneas, quizá sea la reflexión “más difícil” de toda la tesis.

Antes de nada quiero dedicarles unas líneas a mis Directoras, la Dra. Montaña Cámara Hurtado y Dra. M^a Cortes Sánchez Mata, agradecerles de todo corazón su dedicación, apoyo, esfuerzo y sobre todo su confianza durante estos años. Gracias a ellas, hoy por hoy soy quien soy, profesional, personal y académicamente hablando, Gracias por confiar en mí y brindarme la oportunidad de trabajar a vuestro lado!!!

Quiero agradecer y dedicarles expresamente esta tesis a mi familia, a mi hermana, por su cariño y por todos esos buenos momentos; a mis padres, por su apoyo y ayuda constante, por inculcarme valores hoy en día tan importantes como son el tesón, en mi caso “cabezonería”, la paciencia, el respeto y la constancia. También quiero agradecerle a mi familia “política” las palabras de cariño y apoyo recibidas durante estos años. Así como, y no por ello menos importante, también agradecerle y dedicarle esta tesis al que en escasas semanas será mi marido, Rafa, por su paciencia, ayuda y cariño, por todas esas horas dedicadas a “echarme una mano”, por escucharme y animarme siempre!! sobre todo en estos dos últimos años tan ajetreados...

Me gustaría agradecerle a todo el departamento, ya mi “tercera” casa, su amable acogida durante esta etapa, a todas las profesoras, por los ánimos recibidos por los pasillos, especialmente a la Dra. Esperanza Torija y Dra. M^a Cruz Matallana por su preocupación y palabras de apoyo recibidas.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. M^a Teresa Orzáez y Dra. Virginia Fernández, por su cercanía, sus ánimos, palabras de cariño y buenos consejos recibidos durante estos años, especialmente durante el “spring” final.

Deseo sinceramente agradecerle a la Dra. Carmen Díez, profesora que durante todos estos años fue mi directora de departamento, su disponibilidad, su apoyo y sus palabras de cariño.

De igual manera, agradecerle a la actual directora de departamento, Dra. Dolores Tenorio, por su preocupación e interés, sobre todo durante esta última etapa.

Agradecerles a mis compañeros del Departamento, Lula, Patri, Pepe, Rebe, Brigi, Esther, Seomara, etc. todos los buenos momentos vividos con ellos durante estos años.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Francisco Javier Tardío Pato, investigador principal de proyecto “Valoración productiva y nutricional de plantas silvestres comestibles de uso tradicional en España” (CGL2006-09546/BOS, MEC-Plan Nacional I+D+i), por hacer posible la realización del presente trabajo, al igual que a todos los miembros del equipo de investigación del proyecto, al Dr. Ramón Morales, Dr. Manuel Pardo de Santayana, Dra. Laura Aceituno, Dra. Susana González y María Molina, por haber llevado a cabo el arduo trabajo de identificar, recolectar y acondicionar las muestras, así como por ayudarnos con sus conocimientos etnobotánicos sobre las mismas.

También quiero agradecerles a los profesores Dr. Daniel Sánchez y a M^a Dolores Saco del Dto. de Fisiología Vegetal II, su ayuda para comprender algunos aspectos botánicos y fisiológicos importantes de la tesis. Y a la Dr. Elvira López-Oliva, profesora de la sección departamental de Fisiología animal, por facilitarnos algunos de los reactivos necesarios para la puesta a punto de la metodología.

Deseo agradecerles, de todo corazón, a la Dra. Ana María Carvalho y a la Dra. Isabel C.R.F. Ferreira, la oportunidad que me brindaron de realizar una estancia predoctoral tan provechosa junto a ellas en el Instituto politécnico de Bragança (Escola Superior Agrária), por su fabulosa acogida durante esos meses, y por su inestimable ayuda y comprensión; Igualmente, mi más sincero agradecimiento a la Dra. Lillian Barros por todas las horas de laboratorio dedicadas a enseñarme la metodología, por su ayuda y colaboración durante los meses que duró la estancia, así mismo deseo agradecerles a todas aquellas personas que me ayudaron durante esos meses, Sonia, Soraia..., muy especialmente a Esther por su amable acogida.

Igualmente, me gustaría agradecer a la Universidad Internacional Valenciana (VIU), tanto a la institución como a mis compañeros, la posibilidad de poderme incorporar al mundo académico, las facilidades y los ánimos para poder culminar este trabajo.

En general, a todas aquellas personas que de un modo u otro me han alentado y apoyado durante el proceso, que han convivido conmigo y “mi tesis”, a las que agradezco profundamente todo el apoyo brindado, animo y cariño recibido. A todos MIL GRACIAS!!!

RESUMEN

La Tesis Doctoral presentada, que lleva por título **“Vegetales silvestres de uso alimentario. Determinación de compuestos bioactivos y valoración de la capacidad antioxidante”** tiene como objetivo principal el estudio de vegetales silvestres, tradicionalmente consumidos en España, para la caracterización de contenido en distintos compuestos bioactivos (hidro y liposolubles) y la valoración de su potencial actividad biológica, mediante la medida de capacidad antioxidante (utilizando distintas metodologías), con el fin de potenciar su consumo tradicional o su utilización como posibles fuentes de ingredientes funcionales. Para dar cumplimiento a este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos parciales: 1) Optimización de los distintos métodos analíticos para la caracterización de las muestras objeto de estudio, y en especial puesta a punto de la metodología de análisis del ácido fólico y folatos. 2) Caracterización de compuestos de interés nutricional y funcional de naturaleza hidrófila (contenido de vitamina C, ácido fólico y folatos, ácidos orgánicos, contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales) y lipófila (ácidos grasos esenciales y no esenciales, y tocoferoles), en las plantas silvestres objeto del estudio. 3) Valoración de la capacidad antioxidante de las mismas, mediante diferentes ensayos *in vitro* (DPPH, poder reductor, inhibición de la decoloración del β -caroteno y TBARS). 4) Valoración de la influencia del tratamiento térmico en el contenido de algunos compuestos bioactivos como es la vitamina C, ácidos orgánicos y vitamina B9 (ácido fólico y folatos).

Se han caracterizado un total de 20 especies vegetales silvestres diferentes, recolectadas en dos localidades diferentes de la Comunidad de Madrid y en al menos dos temporadas consecutivas. De entre las especies que se pueden consumir crudas, una ración de 100 g de hinojo (*Foeniculum vulgare*) puede cubrir el 50 % de las IDR de vitamina C para adultos, y más del 100 % de las IDR de ácido fólico; la colleja (*Silene vulgaris*) aporta gran cantidad de ácido fólico, duplicando, con una ración de 100 g, las IDR para adultos. Respecto al contenido en compuestos liposolubles, la acedera (*Rumex papillaris*) es una buena fuente de ácidos grasos poliinsaturados y tocoferoles totales, mientras que en el caso del α -tocoferol, se puede considerar a la colleja (*Silene vulgaris*) por su contribución a la dieta. Respecto a aquellas que se consumen cocinadas, el lupio (*Tamus communis*) y el espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*), siguen siendo una buena fuente de vitamina C (100 g cubren más del 50 % de las IDR para adultos); y en el caso del espárrago triguero cocido, también se cubre este porcentaje de las IDR de ácido fólico.

Las plantas silvestres comestibles estudiadas son en muchos casos, muy buenas fuentes de vitamina C y vitamina B₉ (ácido fólico). Por ello es importante la conservación de estos recursos genéticos, bien en su forma silvestre, para el cultivo *in situ*, o *ex situ* en bancos de germoplasma, con el fin de preservar y revalorizar su uso alimentario, como parte de nuestras tradiciones gastronómicas y fuente de nutrientes y compuestos bioactivos de interés en nuestra dieta.

SUMMARY

The present work is focus on the study of wild vegetables, traditionally consumed in Spain, with the aim of characterizing the contents of different bioactive compounds (hydrophilic and lipophilic) and the evaluation of potential biological activity as antioxidant capacity (using different methodologies), so as to recuperate its traditional consumption or to be used as possible sources of functional ingredients. The following partial objectives have been established: 1) Optimization of the analytical methods for chemical characterization of vegetables, specially for folic acid and folates (pteroyl-polyglutamates) analysis in plants; 2) Characterization of the contents of hydrophilic bioactive compounds in wild plants subject to this study: vitamin C, vitamin B9 (folic acid and folates), organic acids, phenolics and total flavonoids; 3) Characterization of the contents of lipophilic bioactive compounds in wild plants subject to this study: fatty acids (essential and non-essential) and vitamin E (tocopherols); 4) Assessment of the antioxidant capacity of the wild plants under study, via different in vitro assays; 5) Assessment of the influence of boiling on in the contents of some bioactive compounds such as vitamin C (AA y ADHA), organic acids and vitamin B9 (folic acid and folates) in the studied wild edible plants.

A total of 20 wild vegetables have been considered, collected in two different locations of Central Spain, and at least during two consecutive periods.

As many of them can be eaten raw, 100 g of *Foeniculum vulgare* can provide 50 % of vitamin C daily requirements for adults, and more than 100 % of folates daily requirements; *Silene vulgaris* also provides a high amount of folic acid (100 g can fulfill double of the daily amount required). Regarding lipophilic compound, *Rumex papillaris* is a good source o polyunsaturated fatty acids and tocopherols, while for α -tocopherol, *Silene vulgaris* is considered as a good source.

In the case of the species that should be cooked before consumption, *Tamus communis* and *Asparagus acutifolius* are still good sources of vitamin C after cooking (retaining in 100 g an amount equivalent to 50 % of recommended dietary intake), and in the case of cooked *Asparagus acutifolius*, also 50 % of folates recommended dietary intake is covered).

In the light of the results obtained, edible wild plants, although subjected to natural variability, are very interesting resources to be preserved, either as wild plants, in situ cultivation, or ex situ in germoplasm banks, with the aim of preserving and revalorize their food use as part of our gastronomic traditions and sources of nutrients and bioactive compounds to improve the nutritional quality of the diet.

ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS

MTHF	Metiltetrahidrofolato	PDA	Detector de fotiodo
MTHF-DG	Metiltetrahidrofolato-Diglutamato	PteGlu	ácido pteroilglutámico
MTHF- MG	Metiltetrahidrofolato-Monoglutamato	PteGlu	Poliglutamatos
E α T	Equivalentes de α -tocoferol	RA	Retención Aparente
AA	Ácido ascórbico	SPE	Extracción en fase sólida
AAR	Ácido araquidónico	SAX	Intercambió anicónico fuerte
AC	Ácido cítrico	SOD	Superóxido dismutasa
ACN	Acetonitrilo	TBA	Acido Tiobarbitúrico
ADHA	ácido dehidroascórbico	TBARS	Especies reactivas frente al ácido tiobarbitúrico
AGE	Ácidos grasos esenciales	THF	Tetrahidrofolato
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados	U.A.	Unidades de Absorbancia
AGS	Ácidos grasos Saturados	UV	Ultra violeta
AGMIs	Ácidos grasos Monoinsaturados		
AGPIs	Ácidos grasos Poliinsaturados		
AGL	Ácido gamma Linolénico		
AL	Ácido linoléico		
ALA	Ácido α -linolénico		
AO	Acido oxálico		
AP	Ácido palmítico		
ATP	Adenosín trifosfato		
BHT	Butilhidroxitolueno		
Cateq	Catequina		
DHF	Ácido dihidrofólico o dihidrofolato		
DPPH	Radical 2,2difenil-1-picrilhidrazil		
EAGs	Equivalentes de ácido Gálico		
ECV	Enfermedad cardiovascular		
EC	Equivalentes de catequina		
EC ₅₀	Concentración inhibitoria 50%		
FBP	Proteínas de unión a folatos		
FL	Fluorescencia		
AF	Ácido fumárico		
GC-FID	Cromatografía de Gases, con detección de ionización de llama.		
AG	Ácido glutámico		
GPx	glutatió peroxidasa		
HDL	Lipoproteínas de alta densidad		
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución		
IDR	Ingestas Diarias Recomendadas		
LC	Cromatografía líquida		
LDL	Lipoproteínas de baja densidad		
AM	Ácido Máfico		
MDA	Malondialdehído		
OMS	Organización Mundial de la Salud		

ÍNDICE

Pág.

A. PARTE GENERAL	1
1. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS SILVESTRES EN LA ALIMENTACIÓN	3
2. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN VEGETALES	15
2.1 Ácido ascórbico y Dehidroascórbico - Vitamina C	20
2.2 Ácido fólico - Vitamina B ₉	27
2.3 Tocoferoles - Vitamina E	32
2.4 Ácidos orgánicos	37
2.5 Ácidos grasos	39
2.6 Compuestos fenólicos	47
2.7 Actividad antioxidante	49
B. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	55
3. OBJETIVOS	57
4. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	61
C. MATERIALES Y MÉTODOS	67
5. MUESTREO	69
5.1. Descripción de las muestras	73
6. METODOLOGÍA ANALÍTICA	93
6.1. Humedad	97
6.2. pH	97
6.3. Acidez titulable.....	98
6.4. Determinación del contenido de vitamina C y ácidos orgánicos	98
6.5. Determinación de ácido fólico y folatos (Vitamina B ₉)	104
6.6. Determinación de ácidos grasos	117
6.7. Determinación de tocoferoles (Vitamina E)	121
6.8. Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales.....	124
6.9. Actividad antioxidante	128
6.10. Estudios estadísticos aplicados	139
D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	141
7. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN VERDURAS SILVESTRES DE HOJA	145
7.1. Humedad	149
7.2. pH y acidez titulable	152
7.3. AA y ADHA: Vitamina C	156
7.4. Ácidos orgánicos	162
7.5. Ácido fólico y folatos: Vitamina B ₉	172
7.6. Ácidos grasos	175
7.7. Tocoferoles: Vitamina E	182
7.8. Compuestos fenólicos y flavonoides totales	186
7.9. Capacidad antioxidante	189

8. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN VERDURAS SILVESTRES DE BROTES, TALLOS TIERNOS Y BULBO	199
8.1. Húmedad	200
8.2. pH y acidez titulable	204
8.3. AA y ADHA: Vitamina C	208
8.4. Ácidos orgánicos	214
8.5. Ácido fólico y folatos: Vitamina B ₉	222
8.6. Ácidos grasos	224
8.7. Tocoferoles: Vitamina E	229
8.8. Compuestos fenólicos y flavonoides totales	232
8.9. Capacidad antioxidante	235
9. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE VERDURAS SILVESTRES ANALIZADAS	243
9.1 Estudio de correlaciones	269
9.2 Estudio de componentes principales	275
9.3 Estudio Cluster	281
10. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN EL CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS, VITAMINA C Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN VEGETALES SILVESTRES COMESTIBLES: <i>Rumex pulcher</i> L., <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke., <i>Asparagus acutifolius</i> L., <i>Bryonia dioica</i> Jacq., <i>Humulus lupulus</i> L. y <i>Tamus communis</i> L.	283
10.1. Parámetros fisicoquímicos	289
10.2. Ácido Ascórbico y Ácido Dehidroascórbico: Vitamina C	291
10.3. Ácidos orgánicos	296
10.4. Ácido fólico y folatos: Vitamina B ₉	300
E. CONCLUSIONES	303
F. WILD EDIBLE VEGETABLES: BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES..	311
11. IMPORTANCE OF WILD PLANTS IN HUMAN NUTRITION	313
12. OBJECTIVES	323
13. WORK PLAN	325
14. CONCLUSIONS	329
G. BIBLIOGRAFÍA	333
ANEXO I. TRABAJOS DERIVADOS DEL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	359

A. PARTE GENERAL

1. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS SILVESTRES EN LA ALIMENTACIÓN

Desde los inicios de la humanidad, el hombre ha obtenido sus recursos alimenticios, cazando, pescando, o recolectando setas y plantas silvestres (hierbas, raíces, frutos, semillas, etc.). Durante el Paleolítico fue recolector y cazador. Su dieta era sencilla pero muy variada y equilibrada y sus primeros métodos de cocinado fueron muy sencillos y rudimentarios, sometiendo el alimento a la acción directa del fuego, o calentándolo sobre piedras que estaban en contacto con el mismo. En el Paleolítico medio, el hombre ya tenía una organización tribal; cazaba animales de mayor tamaño como mamuts y rinocerontes, y además pescaba. En el Paleolítico superior, los pobladores de la tierra machacaban o trituraban los granos, y vivían en campamentos al aire libre, en la boca de las cuevas y en abrigos rupestres. (Ladizinsky, 1998; Cubero et al., 2006; Harlan, 1992).

Las plantas silvestres han sido fundamentales para la subsistencia de las civilizaciones durante la prehistoria hasta los comienzos de la agricultura, y continúan siéndolo para los pocos pueblos cazadores-recolectores que aún sobreviven, así como para las sociedades agrícolas en tiempos de malas cosechas o épocas de penuria, al ser un recurso alimenticio abundante, en su mayoría de fácil recolección, así como en el caso de algunos frutos y semillas, de fácil conservación (Martínez, 2001; Cubero et al., 2006; Tardío et al., 2006).

Los estudios sobre sociedades preagrícolas nos demuestran cómo el hombre al conocer la localización y estacionalidad de los distintos recursos alimenticios de su entorno, inició la manipulación de su medio ambiente para hacerlo más productivo, lo que paulatinamente desembocó en lo que hoy conocemos como Agricultura.

El origen de la agricultura, tuvo lugar coincidiendo con un cambio ambiental muy importante, la última glaciación (hace aproximadamente unos 10.000 años), lo que supuso la “domesticación” de las especies vegetales, en respuesta a la necesidad de alimentar a una población creciente a través de la manipulación de los cultivos. Se denomina “domesticación de los cultivos” al proceso que implica la intervención del hombre en beneficio propio para adaptar especies silvestres (que ya aprovechaba), a un entorno

modificado, para obtener un mayor rendimiento de las mismas. Ya en el Neolítico la domesticación de los cultivos coincidió con el inicio del sedentarismo, inicialmente de forma complementaria a la caza y a la recolección, debido en gran parte, al aumento del número de grupos poblacionales. A partir de entonces, el hombre ha tratado de continuar este proceso de domesticación con el objetivo de obtener cada vez un mayor rendimiento de los cultivos; dicho proceso de manipulación es lo que hoy en día conocemos como mejora genética (Cubero et al., 2006).

Los ancestros vegetales silvestres al ser sometidos al proceso de cultivo han ido sufriendo microevoluciones, que han provocado en ellas una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y genéticos tan profundos que en muchos casos resulta muy difícil reconocer al progenitor silvestre (Tardío et al., 2002). Los núcleos centrales de domesticación se dieron, en la zona del Creciente Fértil en Oriente Próximo, en China, en Mesoamérica y en Sudamérica, en los llamados centros de Vavilov (figura 1.1). Desde estas zonas iniciales de domesticación, los cultivos se fueron difundiendo por todo el mundo siguiendo los flujos de migración humanos, en los que las semillas domesticadas acompañaron a los hombres en sus viajes (Casañas, 2010).



Figura 1.1.- Representación geográfica de los centros de Vavilov. (1) Chino, (2) Indo-malasio, (3) Indo Afganiano (Asia Central), (4) Próximo Oriente, (5) Mediterráneo, (6) Abisinio, (7) México (América Central), (8) Sudamericano (8a: Perú-Ecuador-Bolivia, 8b: Chile, 8c: Brasil-Paraguay). Vavilov, 1949/50.

La domesticación de un cultivo generalmente implica una pérdida de competitividad en áreas no cultivadas respecto a sus ancestros silvestres, variando en función de la especie (Casañas, 2010). Dentro de esta evolución surge y desaparece la variabilidad agrícola como respuesta a los cambios en el entorno en el que se cultiva. Este proceso continuo de generación y pérdida de diversidad se da en la Naturaleza como respuesta a la evolución natural. El problema surge cuando se incrementa drásticamente el proceso de pérdida de diversidad desapareciendo especies (principalmente silvestres) a lo largo del tiempo. De forma análoga, desde la domesticación de los cultivos en el Neolítico han aparecido nuevas especies y nuevas variedades cultivadas, al igual que otras han ido desapareciendo. El número de especies empleadas por las sociedades cazadoras-recolectoras (según datos etnográficos) fue superior a 1400, aunque muy pocas pudieron ser producidas en cantidades suficientes para tener un impacto importante en la dieta actual.

A pesar de que durante miles de años de agricultura el hombre ha conseguido generar una cantidad ingente de diversidad cultivada, hasta hace poco más de un siglo, especies y variedades aparecían o desaparecían en procesos aparentemente lógicos o normales y que conocemos como erosión genética, porque con cada variedad que cae en el olvido perdemos también genes y combinaciones de los mismos (Casañas, 2010; Esquinas, 2010). Un claro ejemplo lo tendríamos en la llegada de los europeos a América. Como consecuencia de ello se produjo un intercambio de cultivos, quizá de los más importantes de la historia, que permitieron la incorporación a la dieta y agricultura europea de alimentos como la patata, el maíz, el pimiento, el tomate, las judías, etc., desapareciendo casi por completo otras como el salsifí, la chirivía o el apio caballar (Nuez y Hernández Bermejo, 1992; Nuez, 2010).

Actualmente, el problema de la desaparición y marginación de especies y variedades no afecta sólo a disponibilidad de la misma, sino a la posibilidad de emplearla en el futuro en procesos de mejora genética, así como la pérdida de un importante patrimonio agrícola, siendo ésta una de las consecuencias más graves que deriva de los procesos de mejora

genética actuales, los cuales parten de una diversidad genética muy restringida, junto a la actual distribución de semilla en “monocultivo”, consecuencia de la industrialización de la agricultura. Así, cada vez existe una menor diversidad genética en el campo, y esto contribuye a incrementar en gran medida el riesgo de vulnerabilidad genética (NAS, 1972) y, por tanto, la probabilidad de una notable pérdida de producción de alimentos. Por todo ello, la FAO aconseja que se conserven los sistemas de cultivo tradicionales, que se recuperen especies menores y marginadas y que se vuelva a llevar al campo la diversidad que existía en las variedades tradicionales (FAO, 2001).

La “mejora tecnológica” ha traído consigo la desaparición, desde principios de siglo hasta ahora, del 75% de la diversidad genética de los cultivos más importantes (FAO, 1998s; Esquinas, 2010). De ahí la importancia de conservar y preservar los “recursos fitogenéticos”, existen dos estrategias ampliamente extendidas: la conservación “*in situ*” y la conservación “*ex situ*”. La conservación “*in situ*” promueve la conservación de los ecosistemas y hábitats naturales, manteniendo y recuperando las poblaciones de especies silvestres propias de cada región, mientras que la conservación “*ex situ*”, consiste en la inclusión de sus semillas en los llamados bancos de germoplasma o de semillas que son centros, generalmente oficiales, donde se recoge y almacena material genético (a menudo en peligro de extinción), procedente de los centros fitogenéticos o de los agricultores. El inconveniente de estos bancos de germoplasma es que suelen situarse en universidades o centros de investigación, excesivamente centralizados, donde los agricultores no logran acceder. Por todo ello es interesante que ambos sistemas de conservación se complementan entre sí, con el apoyo y la cooperación de gobiernos, instituciones y empresas (Cubero et al., 2006; Esquinas, 2010).

Entendemos como “variedades silvestres”, a aquellos materiales que constan de cierta integridad genética, reconocibles morfológicamente (tradicional y etnobotánicamente conocidas por multitud de nombres diferentes en función de la zona geográfica) y que difieren de las cultivadas en su adaptación al tipo de suelo, fecha de siembra y

maduración, altura, valor nutritivo, uso y otras propiedades (FAO, 1996; Nuez, 2010) Gracias a estas características de adaptación, estas variedades han formado sistemas homeostáticos en los que algunos individuos han mantenido niveles aceptables de producción ante cualquier agresión del medio, como plagas, enfermedades o accidentes climatológicos (FAO, 1996).

Hoy en día la práctica de recolectar plantas silvestres ha perdido importancia en la mayoría de los países, aunque no del todo. Existen algunas verduras silvestres que aún constituyen una parte importante de la alimentación, principalmente del mundo rural. En muchos países, la recolección sigue siendo importante, pues, a pesar de disponer de verduras cultivadas, se aprecian mucho las variedades silvestres y éstas se siguen vendiendo con frecuencia en los mercados locales (Ertug, 2004).

En las zonas rurales de España y Portugal, así como en otros países europeos, es frecuente aprovechar los recursos naturales locales, como son las plantas y hongos, como complemento de los alimentos básicos agrícolas. Las plantas comestibles son elementos indispensables de cada cultura y por tanto son un elemento predominante del paisaje creado por los hombres en los últimos siglos (Heinrich et al., 2006a,b).

En España, el uso de las plantas silvestres es más o menos local, exceptuando la actual afición a las setas y quizás a algunas verduras cuyo uso tradicional se halla más extendido geográficamente y que aún hoy en día se encuentra relativamente vigente, como es el caso de los espárragos trigueros (*Asparagus acutifolius*), colleja (*Silene vulgaris*) o cardillo (*Scolymus hispanicus*). Algunas de estas especies han llegado incluso a cultivarse, pero cayeron en desuso por la competencia con otras variedades más productivas, limitándose su uso a la recolección en el campo.

En efecto, en nuestro país y otros países de Europa, a la vez que la globalización uniformiza las costumbres y valores, se observa actualmente un aprecio y valoración de las identidades y tradiciones locales, incluida la cocina tradicional (Pardo de Santayana y

Gómez Pellón, 2003). De hecho, frente al auge de la llamada “comida rápida” (*fast food*), ha surgido un nuevo movimiento denominado “comida lenta” (*slow food*) que está redescubriendo los productos y platos de la tradición gastronómica europea (Pieroni et al., 2005). Así, en los últimos años está aumentando la elaboración casera y la comercialización a pequeña escala de ciertos productos locales elaborados con plantas silvestres, como mermeladas y licores elaboradas con frutos silvestres o incluso conservas de verduras silvestres (Pardo de Santayana y San Miguel, 2006). Por ejemplo, en la comunidad Valenciana el uso de algunas especies ha pasado a formar parte del patrimonio gastronómico como es el caso del plato típico de Polinyà de Xúquer (*la Fenollà*), que incluye el hinojo (*Foeniculum vulgare*) entre sus principales ingredientes (Morales, 2002; Pretel y Obón, 2009). El uso tradicional de las plantas silvestres, como la acelga silvestre (*Beta vulgaris*), el espárrago o el hinojo está muy extendido por toda la península y especialmente en la Comunidad de Madrid, cocidas y/o rehogadas junto con otros ingredientes huevo o jamón (Tardío et al, 2002).

Al mismo tiempo, las empresas hortofrutícolas que utilizan los grandes canales de distribución no dejan de lanzar al mercado frutas exóticas y “nuevas” verduras, como por ejemplo los canónigos (*Valerianella locusta*), oruga o “rúcola” (*Eruca vesicaria*), rúcola silvestre (*Diplotaxis tenuifolia*) o berros de tierra (*Barbarea verna*), la mayoría de ellas con escasa tradición de consumo en nuestro país, pero que están adquiriendo una creciente aceptación.

Cerca de 7.000 especies de plantas en todo el mundo se cultivan o cosechan para la alimentación o para medicina popular, procedentes de la vegetación silvestre (FAO, 1998; Esquinas, 2010). Estas especies olvidadas e infrautilizadas por lo general crecen en regiones con condiciones climáticas específicas (como son las pertenecientes a la cuenca mediterránea), que pueden tener gran importancia para la subsistencia de los pequeños agricultores. Aunque el uso de verduras silvestres ha continuado disminuyendo paralelamente al desarrollo de la agricultura, especialmente debido a los nuevos contextos

socio-económicos, algunas especies silvestres aún se consumen actualmente (Tardío, 2010).

Debido a esta falta de atención, su valor potencial se subestima y no pueden ser explotadas adecuadamente, lo que les pone en peligro de erosión genética. Las especies silvestres tienen una gran versatilidad en el manejo y el consumo, y pueden tener un gran potencial como fuente de colores y sabores inusuales, así como por su composición química y nutricional, especialmente por los compuestos bioactivos que presentan, que justifican la necesidad de preservar sus usos tradicionales, como una alternativa entre la variedad de hortalizas actualmente disponibles y también como fuentes de suplementos dietéticos o alimentos funcionales. Para que estas razones sean reconocidas en todo el mundo debe potenciar su investigación, tanto desde el punto de vista nutricional y fitoterapéutico, como de su potencial agroindustrial (Zeghichi et al 2003; Ansari et al 2005).

Hoy en día, existe un interés cada vez mayor en plantas silvestres en Europa por sus beneficios potenciales para la salud humana, como se ha demostrado por diferentes estudios con el apoyo de la Comisión Europea (Tumino et al., 2002; Heinrich et al., 2006a,c).

En los últimos años varios autores han realizado diversos estudios químicos y bioquímicos con la finalidad de evaluar el potencial nutricional de estas especies silvestres que tradicionalmente formaban parte de la dieta de nuestros antepasados y que aún están presentes en nuestra dieta actual.

Los diferentes estudios etnobotánicos relacionados con las plantas silvestres comestibles realizados en España, Europa y países cercanos, nos permiten un mejor conocimiento y comprensión de la importancia, tanto social como nutricional, de los mismos. Dichos estudios, podrían suponer una proyección a medio plazo sobre el sistema productivo del

medio rural, abriendo nuevos campos de desarrollo de los recursos naturales de la zona (Tardío et al., 2002).

Así, diferentes autores han evaluado la composición nutritiva de verduras silvestres comestibles como *Allium schoenoprasum*, *Apium graveolens*, *Asparagus acutifolius*, *Beta maritima*, *Borrago officinalis*, *Bryonia dioica*, *Bryonia cretica*, *Carduus pycnocephalus*, *Cichorium intybus*, *Diploaxis eruroides*, *Echium vulgare*, *Foeniculum vulgare*, *Glechoma hederacea*, *Lepidium sativum*, *Origanum vulgare*, *Papaver rhoeas*, *Petromarula pinnata*, *Ranunculus ficaria*, *Rumex sp.*, *Rumex obtusifolius*, *Scolymus hispanicus*, *Silene vulgaris*, *Sinapis incana*, *Sinapis nigra*, *Sonchus oleraceus*, *Tamus communis*, *Taraxacum spp.*, *Thymus mastichina* y *Urtica dioica* (Alarcón, 2006; Barros et al., 2009; Barros et al., 2010a; Conforti et al., 2008; Conforti et al., 2009; Guil et al., 1996a,b; Guil et al., 2003; Hinneburg et al., 2006; Martins et al., 2011; Mata et al., 2007; Pieroni et al., 2002a,b; Salvatore, 2005; The local Food-nutraceuticals consortium, 2005; Trichopoulou, 2000a,b; Vasilopoulou, 2011; Vardavas et al., 2006a,b; Zeghichi et al., 2003).

Algunos de ellos han demostrado su potencial como fuente de ácidos grasos esenciales como son el ácido linoleico y linolénico de especies silvestres de procedencia española, portuguesa y griega. Otros, se han centrado en su importancia como fuente de compuestos bioactivos con o sin actividad vitamínica, tales como ácido ascórbico, ácidos orgánicos, tocoferoles, carotenoides, vitamina K, esteroides, fenoles y flavonoides, así como su capacidad antioxidante mediante diferentes métodos *in vitro*. Por otro lado, Trichopoulou (2000a) y Zeghichi et al. (2003) describieron el contenido en minerales de diferentes plantas silvestres comestibles de Creta.

Existen algunos estudios relativos a la composición nutricional de platos típicos ya elaborados a partir de plantas silvestres, como es el caso de diferentes pasteles vegetales elaborados en Creta (Grecia) a partir de *Allium schoenoprasum*, *Ammi majus*, *Daucus carota*, *Foeniculum vulgare*, *Papaver rhoeas*, *Petromarula pinnata*, *Rumex sp.*, *Sonchus*

oleraceus, *Tordylium apulum*, así como otros vegetales cultivados (Trichopoulou, 2000a; Vasilopoulo, 2011). Este tipo de estudios aportan una visión más completa del aporte de estos vegetales silvestres como parte integrada de la dieta.

Sin embargo, diferentes autores han reconocido que existen importantes carencias en los conocimientos científicos del potencial nutricional de muchas especies silvestres comestibles (Barros et al., 2009; Conforti, 2009; Trichopoulou et al., 2000a,b; Vasilopoulo et al., 2011; Vardavas et al., 2006a,b, entre otros). Los datos científicos sobre la composición química de muchos vegetales comestibles de origen silvestre son relativamente escasos dado que muestran resultados parciales y en muchos casos el número de muestras es limitado. También carecemos de información relativa a la caracterización desde el punto de vista nutricional de muchas de las especies tradicionalmente consumidas en España, dada la variabilidad que presentan estas especies por su carácter silvestre, siendo en muchos casos variedades locales y autóctonas de ciertas regiones, que pueden por tanto ser diferentes a las especies recolectadas y consumidas en otros países, ya sean especies de origen italiano, portugués, etc.

Este es el caso de especies como: *Anchusa azurea*, *Apium nodiflorum*, *Chondrilla juncea*, *Humulus lupulus*, *Montia fontana*, *Rumex papillaris*, *Rumex pulcher* y *Silybum marianum*, sobre las cuales actualmente no existen estudios de composición nutricional ni caracterización química, a pesar de contar con un elevado número de citas en cuanto a consumo en nuestro país, como demuestran algunos estudios etnobotánicos (Tardío et al., 2002; Tardío et al., 2006; Pardo de Santayana et al., 2007).

Por todo ello, creemos que es necesario estudiar en profundidad el potencial que estos productos silvestres pueden aportar a la diversificación de la dieta, contribuyendo al desarrollo rural sostenible de muchas regiones españolas, y a la conservación de las tradiciones gastronómicas.

2. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN VEGETALES

El consumo de frutas y hortalizas frescas cubren un elevado porcentaje de los requerimientos diarios de algunas vitaminas y minerales, pero sus efectos beneficiosos no se deben únicamente a la presencia de un solo componente, sino al efecto sinérgico de los distintos componentes presentes en las mismas. Estas interacciones pueden ser positivas, favoreciendo la absorción de determinados nutrientes (por ejemplo la presencia de vitamina C mejora la absorción intestinal del hierro; tocoferoles y vitamina C tienen un efecto sinérgico, así como el ácido fólico con la vitamina C y con la vitamina B₁₂) o negativa (el ácido oxálico disminuye la absorción del calcio). Por ello es conveniente seleccionar frutas y verduras lo más diversas posibles para poder obtener así todos los nutrientes necesarios para nuestro organismo en cantidades suficientes (Lampe, 1999; Chew, 1995; Marchioli, 1999; Cámara et al., 2003; FAO, 2001).

Se considera “componente bioactivo” de un alimento a aquel que aporta un beneficio para la salud más allá de las consideraciones propias de la nutrición básica. Estos componentes se encuentran en general en pequeñas cantidades en los productos de origen vegetal. Se puede considerar como componentes bioactivos, tanto a algunas vitaminas y minerales, como a otros compuestos no nutrientes presentes fundamentalmente en plantas (fitoquímicos) que inducen efectos metabólicos derivados de su actividad biológica constatada en modelos de laboratorio, y asociada a efectos beneficiosos sobre la salud humana, como por ejemplo mejoría de funciones fisiológicas o reducción de riesgo de padecer enfermedades (Olmedilla y Granado, 2007).

Dentro de los compuestos fitoquímicos beneficiosos para la salud humana se podrían destacar a las vitaminas C, E, K, vitaminas del grupo B, el ácido fólico; minerales, como el hierro, zinc, calcio, selenio; carotenoides (tanto los que poseen actividad provitamínica A como los que no la poseen); compuestos fenólicos (flavonoides, cinamatos y taninos), glucosinolatos y fitoesteroles (cuadro 2.1), etc. Muchos de los compuestos mencionados son capaces de actuar por diversos mecanismos (quizás el más conocido sea el

antioxidante), así como interactuar de forma sinérgica o antagónica entre si (Olmedilla et al., 2001).

Entre las diversas actividades biológicas que pueden realizar estos componentes presentes en los alimentos, se deben diferenciar:

- las ejercidas por los nutrientes a los niveles de ingesta, recomendados con el objetivo de cubrir necesidades metabólicas (en relación con la función).
- o considerar otras actividades en relación con la prevención de enfermedades crónicas o para lograr un óptimo estado de salud, siendo requeridas para este segundo objetivo, en general, cantidades superiores a las habitualmente aportadas por medio de una dieta variada (Olmedilla y Granado, 2007).

Cuadro 2.1.- Principales compuestos fitoquímicos presentes en frutas y verduras y fuentes más importantes de los mismos (Cámara et al., 2003)

Ácido ascórbico		Folatos		Carotenoides	
Cítricos Fresas Kiwi Melón	Coliflor Coles de Bruselas Espinacas Guisastes Judías verdes Perejil Pimiento Rapollo	Fresas Naranja Plátano	Coles de Bruselas Hortalizas de hoja verde Acelga Berro Endibias Perejil Puerro	Albaricoque Cerezas Kiwi Mandarina Melón Naranja Níspero Pomelo rojo Sandía	Acelgas Berro Espinacas Judías verdes Lechuga Maíz Perejil Pimiento Tomate Zanahoria
Vitamina E		Compuestos azufrados		Compuestos fenólicos	
Coles de Bruselas Espinacas Guisantes Lechuga Perejil Pimientos tomate		Ajo Berros Brócoli Coles de Bruselas Lombarda Coliflor Rábanos Rapollo		Albaricoque Arándanos Cerezas Ciruela Fresas Limón Mandarina Manzanas Melocotón Moras Naranja Peras Pomelo Uvas	Apio Berenjenas Brócoli Cebolla Coles Judías Lombarda Puerro Pimientos Tomate

La suposición de que los nutrientes antioxidantes pueden jugar un papel preventivo frente a diversos tipos de patologías como es el cáncer, o las enfermedades cardiovasculares, se basa en evidencias científicas que sugieren que estos compuestos funcionan como antioxidantes, moduladores de la respuesta inmune y modificadores de procesos inflamatorios (Ferreira et al., 2009). Aunque la hipótesis antioxidante es muy popular y el contenido en vitamina C, E y en polifenoles, es elevado en alimentos característicos de la Dieta Mediterránea, no hay que olvidar que el efecto protector de una elevada ingesta de frutas y hortalizas frente al cáncer parece depender de múltiples sustancias y mecanismos de acción implicados, que pueden ser complementarios y sinérgicos entre sí, tales como la

inducción de enzimas detoxificantes, inhibición en la formación de nitrosaminas, unión y dilución de carcinógenos en el tracto gastrointestinal, alteración del metabolismo hormonal, etc. (Block et al., 1992; Olmedilla et al., 2001).

Muchas vitaminas, ocupan un lugar destacado como compuestos bioactivos con actividad antioxidante en los alimentos, actuando, mediante distintos mecanismos, como agente protector es frente a patologías cutáneas por fotocarcinogénesis (Tebbe, 2001), enfermedad cardiovascular, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, etc. (Halliwell, 2001). El contenido de vitaminas en las verduras y hortalizas es muy variable, depende de la estación del año, de la fertilidad del suelo, así como de las condiciones en que se realiza su posterior almacenamiento tras la recolección (Prohens et al., 2005). En este tipo de productos destaca especialmente la presencia de vitaminas hidrosolubles, siendo la vitamina C la que se encuentra en mayor proporción.

2.1.- Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico: Vitamina C

El concepto de vitamina C engloba a dos compuestos: ácido ascórbico (AA; 2,3 - ácido endiol-L-gulonic-γ-lactona) y su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (ADHA), ambos altamente solubles en agua (Figura 2.1.1). El AA y su monoanión (ascorbato) son considerados como potentes antioxidantes, ya sea por su acción en los alimentos, o en el cuerpo humano por la destrucción de los radicales libres de oxígeno.

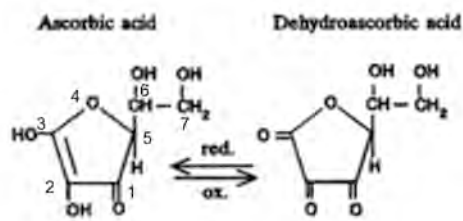


Figura 2.1.1.- Estructura química de la vitamina C (Sánchez-Mata, 2000)

La importancia nutricional de la vitamina C como una vitamina esencial está bien establecida, los antiguos egipcios, griegos y romanos ya sufrían los efectos derivados de su deficiencia, la enfermedad que siglos después sería denominada como escorbuto, cuyos síntomas se explican fundamentalmente por la formación inadecuada de colágeno, que tiene lugar debido a la disfunción de las enzimas prolina/lisina hidroxilasa, las cuales requieren el ascorbato como cofactor en la modificación post-translacional del colágeno.

Entre el siglo XV y XVI, el escorbuto fue una enfermedad bastante habitual entre los marineros, quienes durante las largas travesías por mar comenzaban a desarrollar sus síntomas: hemorragias capilares, encías sangrantes, pérdida de piezas dentales, disminución en la capacidad de curación de heridas, depresión y fatiga. En 1497, Vasco de Gama describió los síntomas del escorbuto con motivo de su viaje desde Europa hasta las Américas, donde más de la mitad de sus tripulantes fallecieron a causa de esta enfermedad. Poco a poco se hizo evidente que el escorbuto atacaba sólo a quienes no consumían alimentos frescos. En 1536, el explorador francés Jacques Cartier durante su travesía a través del río helado St. Lawrence, observó que más del 90% de la tripulación presentó síntomas que describió de la siguiente forma "las extremidades de las víctimas se debilitó hinchada y descolorida, mientras que sus encías sangraban profusamente pútridas". A esta enfermedad los navegantes españoles la llamaron "la peste de las naos" y existen registros de que los portugueses e ingleses también la conocían (Gerber, 2001). Posteriormente, en 1747 el escocés James Lind, demostró que la enfermedad se podía evitar o curar con el consumo de frutas cítricas. Este hallazgo llevó a la introducción de alimentos frescos, sobre todo de cítricos en las raciones de los marinos, disminuyéndose así la incidencia de esta enfermedad (Gerber, 2001).

Si bien no fue hasta 1928 cuando el científico húngaro Szent-Györgyi aisló el factor nutricional de los alimentos que evitaba el escorbuto, al que denominó vitamina antiescorbuto o ácido hexurónico, por sus propiedades químicas. Al poco tiempo, en 1933, la estructura de este ácido fue definida gracias al trabajo combinado de Howorth, Hirst y

colaboradores llegándose posteriormente al consenso de denominarse vitamina C (Gerber, 2001). El descubrimiento de esta vitamina fue de gran importancia ya que se demostró por primera vez que la alimentación podría considerarse como una de las primeras formas de tratar la enfermedad. Fue Linus Pauling (Premio Nobel de Medicina y de la Paz) quien en 1970 abogó por el consumo de grandes dosis de vitamina C para evitar patologías como la gripe, entre otras infecciones virales, mejorar la salud en general e incluso estableció la influencia de la ingesta de megadosis de esta vitamina con la prevención del cáncer y/o del envejecimiento (Pauling, 1971).

El AA se caracteriza por ser un compuesto muy inestable, ya que al abrirse el anillo lactónico pierde su actividad biológica, produciéndose una reducción del contenido neto de vitamina C en el vegetal. La oxidación tiene lugar con gran facilidad durante el procesado de los alimentos en presencia de oxígeno, siendo esta dependiente del pH, ya que la forma ionizada es más sensible que la forma no ionizada. Así, el dianión, que se forme en proporciones significativas es necesario un pH alcalino (que no suele encontrarse en los alimentos), es la forma más sensible (De Leenheer, 2000).

En el caso concreto de los vegetales frescos, la mayoría de la vitamina C se encuentra como ácido ascórbico (AA), mientras el resto tiende a estar en la forma oxidada, ácido dehidroascórbico (ADHA).

En el proceso de oxidación del AA, éste pasa de ascorbato a dehidroascorbato, dicha reacción es reversible, por lo que en principio, el dehidroascorbato mantiene su valor como vitamina C. Sin embargo, la lactona correspondiente al dehidroascorbato es mucho menos estable que la del ascorbato, por lo que se hidroliza fácilmente para producir ácido 2,3-dicetogulónico, que posteriormente puede degradarse por descarboxilación. Estas reacciones de oxidación pueden estar catalizadas por la enzima ascorbato oxidasa, abundante en algunos vegetales, cuyo pH óptimo de actuación está en torno a 4,5 - 5,5, de

ahí que dado el pH ácido de la mayoría de los vegetales (especialmente en la frutas) la isoforma principal en los mismos sea el AA (Maccarrone, 1993).

El proceso de oxidación que sufre el AA también se ve favorecido en presencia de metales, especialmente cobre y hierro (Jacob, 1988). De manera que, en ausencia total de metales, el ácido ascórbico es relativamente estable, incluso en presencia de oxígeno (De Leenheer, 2000). El AA puede hidrolizarse también debido a reacciones no oxidativas, especialmente en medio ácido (entre pH 3 y 4), por apertura del anillo lactónico y posterior descarboxilación. Este efecto puede ser importante en alimentos en conserva. En cualquier caso, a igualdad de temperatura esta reacción es mucho más lenta que la de oxidación (De Leenheer, 2000), donde ni el ácido 2,3-dicetogulónico ni sus productos de degradación tienen ya actividad vitamínica C (Nyyssonen, 2000).

Absorción, transporte, metabolismo y funciones fisiológicas de la vitamina C

La absorción de vitamina C tiene lugar a nivel intestinal mediante transporte activo saturable (ATP y sodio dependiente), una vez absorbido, el AA se acumula en los tejidos en forma de ascorbato. El mecanismo de transporte del ADHA (10 veces más rápido que el del AA), está mediado por transportadores de glucosa y su posterior reducción intracelular, por la glutarredoxina (tioltransferasa) (Levine et al., 1996). La vitamina C, en forma de ascorbato, es metabolizada en el hígado donde parte será reabsorbida de forma activa en los túbulos renales, de forma proporcional a la concentración, alcanzando la saturación a partir de ingestas de 1 g/día (FAO, 2001; Levine et al., 1996).

Existe una relación sigmoideal entre las concentraciones de la ingesta y el nivel en plasma de la vitamina C, de manera que una ingesta superior a 30 mg, supone un aumento de las concentraciones plasmáticas hasta 60 $\mu\text{mol/l}$, alcanzándose la meseta en torno a 80 $\mu\text{mol/l}$, valor que representa el umbral renal (Figura 2.1.2). En el rango habitual de ingesta diaria (30 a 180 mg / día), la absorción suele ser completa, aunque puede disminuir hasta 75% debido a diferentes factores de competencia con los alimentos, como puede ser la

gran diferencia de pH entre éstos y los jugos gástricos, un elevado contenido en fibra, principalmente insoluble, un elevado contenido de grasa y/o bien otros componentes que pudieran ejercer un impedimento estérico impidiendo su absorción.

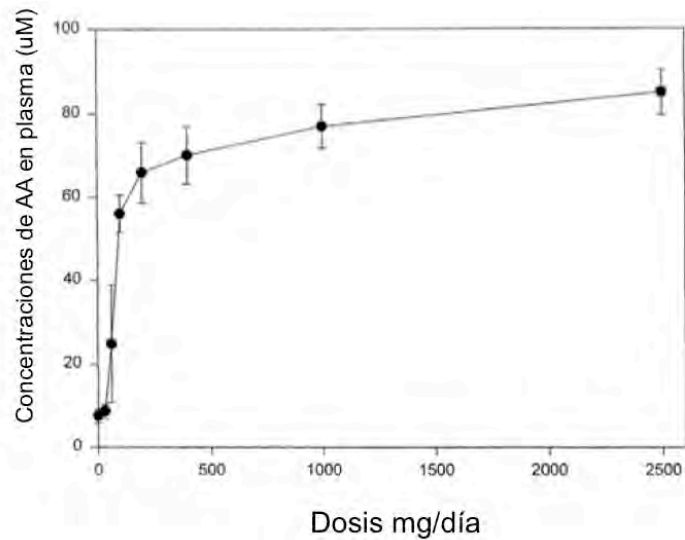


Figura 2.1.2.- Cinética plasmática del ácido ascórbico (FAO, 2001)

Las principales funciones de la vitamina C son:

- Actúa como donador de electrones específico para ocho enzimas, tres de las cuales participan en la hidroxilación de colágeno, dos en la biosíntesis de la carnitina, compuesto indispensable para que los ácidos grasos de cadena larga entren a la mitocondria y sean empleados como fuentes de energía; una en la biosíntesis de norepinefrina, otra en la síntesis de hormonas péptidicas y en el metabolismo de la tirosina (FAO, 2001; Halliwell, 2001).
- A nivel molecular, el ácido ascórbico es un importante agente reductor involucrado en numerosas reacciones de óxido-reducción y transferencia de electrones. Tiene gran importancia como agente antioxidante en diversas reacciones tanto intracelulares como extracelulares. Es por ello que previene la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, reduce los radicales libres aportando un átomo de hidrógeno (Woods, 2001; FAO, 2001; Halliwell, 2001), y también se ha indicado su papel en la disminución del daño oxidativo en las paredes vasculares (Díaz et al., 1997). Puede actuar a nivel del estómago o duodeno, desactivando metabolitos reactivos de oxígeno o previniendo la formación de compuestos mutagénicos como las nitrosaminas, con la consiguiente protección contra cánceres gástricos (Correa, 1992; Marchioli, 1999).
- Incrementa la absorción de hierro en el intestino delgado, al aumentar la absorción de hierro no hemo soluble y disminuir o prevenir el efecto quelante de los fitatos u otros compuestos que compiten para su absorción (Hallberg et al., 1987; Halliwell, 2001)
- Ayuda a mantener la integridad del tejido conectivo, el tejido óseo y la dentina de los dientes (Leboy et al., 1989; Halliwell, 2001).
- También interviene en la función inmune ya que es transportada en los neutrófilos y linfocitos (Padh, 1990; Halliwell, 2001).

Además el ácido ascórbico (AA), es un cofactor importante en numerosas reacciones, presentando un alto potencial redox, tanto de forma individual como asociado a otros compuestos antioxidantes (cuadro 2.1.1).

Cuadro 2.1.1.- Algunas funciones del ácido ascórbico como cofactor enzimático
(Halliwell, 2001)

Cofactor de la enzima	Función de la enzima
Prolil/lisil hidroxilasa	Modificación post-tranlacional del colágeno
β-Butirotetain hidroxilasa, ε-N-trimetil-lisina hidroxilasa	Síntesis de carnitina
Dopamina β-monooxigenasa	Síntesis de noradrenalina
Peptidil-glicin α-hidrosilmonooxigenasa	Amidación de extremos glicéricos peptídicos
	Catabolismo de tirosina
Metabolismo del Hierro	
Regulación de recaptación y secuestro del hierro	Reducción de Fe(III) a Fe (II) favoreciendo la absorción intestinal. Puede que estimule la síntesis de ferritina promoviendo el almacenamiento del hierro en las células

Necesidades y recomendaciones de vitamina C

Las ingestas recomendadas de vitamina C en España son, en la actualidad de 60 mg/día, aunque los expertos recomiendan que debería aumentarse en función de las diferentes situaciones fisiológicas del individuo. Según Food and Nutrition Board (FNB) las recomendaciones de ingesta establecidas para dicha vitamina están en torno a 75-90 mg/día (Trumbo, 2002).

La vitamina C abunda en los frutos cítricos como la naranja (15 mg/100g de porción comestible), la mandarina (35 mg/100g) , el limón (50 mg/100g), el pomelo (36 mg/100g), además del kiwi (59 mg/100g), y las fresas (25 mg/100g), y entre las hortalizas destaca el pimiento verde (131 mg/100g), el perejil (190 mg/100g) y las coles de Bruselas (100 mg/100g).

Sin embargo, en estudios relacionados con la vitamina C, muy a menudo sólo se hace referencia al contenido de AA, con la consiguiente subestimación de la actividad total de vitamina C, o al contenido global de la misma, sin datos sobre la distribución de ambas formas (AA y ADHA). La determinación por separado de AA y DHAA en los alimentos proporciona información completa sobre el perfil de la vitamina C, teniendo en cuenta que la forma reducida de la vitamina C (AA) es la forma más estable en los tejidos biológicos, y a la que se le atribuyen los efectos antioxidantes (Schaffer et al., 2005; Vardavas et al., 2006b).

2.2.- Ácido fólico y sus sales: Vitamina B₉

El término vitamina B₉, se aplica a una serie de vitámeros con actividad biológica equivalente al ácido fólico y sus sales. El ácido fólico fue aislado por primera vez en 1941 de las hojas de ciertas plantas, como la espinaca, de donde toma su nombre (Mitchell et al, 1941; Davis y Nicol, 1988). Es un compuesto soluble en agua, sintetizado por plantas y microorganismos, pero no por el ser humano (Mebart, 2006).

El ácido fólico (pteroilglutámico) es una molécula constituida por un anillo de pteridina unido por un puente metileno a un residuo de ácido *p*-aminobenzoico que a su vez se une por enlace amida a un residuo de ácido glutámico (Figura 2.2.1). Los distintos folatos se diferencian en el anillo de pteridina, que puede presentar varias formas reducidas y varios tipos de sustituciones, en el residuo de *p*-aminobenzoglutamato, que puede presentar unidos en enlace peptídico un número variable de residuos de glutamato, presentándose de forma conjugada con poliglutamatos de ácido PteGlu, en función del tipo de alimento (Scott, 1999; Varela, 1999).

El anillo de pteridina puede encontrarse parcial o completamente reducido, dando lugar a los siguientes compuestos:

- Ácido dihidrofólico o dihidrofolato (7, 8-H₂PteGlu_n; DHF)
- Ácido tetrahidfólico o tetrahidrofolato (5,6,7,8-H₄PteGlu_n; THF)

El ácido fólico, a su vez, puede estar metilado en las posiciones 5 y/o 10, formando los siguientes compuestos (figura 2.2.1):

- 5-formil-H₄PteGlu_n
- 10-formil- H₄PteGlu_n
- 5,10-metenil-H₄PteGlu_n
- 5,10-metilén-H₄PteGlu_n
- 5-metil-H₄PteGlu_n (5-CH₃-THF).

Estos compuestos, a su vez pueden tener uno o varios residuos de ácido glutámico unidos por enlace peptídico, dando lugar a monoglutamatos, diglutamatos, triglutamatos, etc., pudiendo llegar hasta ocho moléculas de ácido glutámico terminales. Los más frecuentes en el organismo son los mono-, penta- y hexaglutamatos.

Los distintos folatos se diferencian entre si por el anillo de pteridina, que puede presentar varios tipos de sustituciones y en varios estados de reducción. A su vez, en el residuo de p-aminobenzoglutamato, puede presentar un número variable de restos de glutamato unidos mediante enlace peptídico; los más frecuentes en los alimentos son los mono-, di-, penta- y hexaglutamatos (Scott, 1999; Varela, 1999).

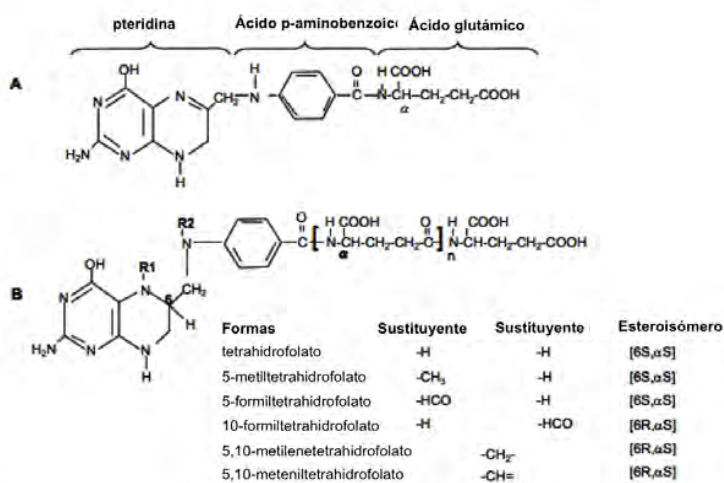


Figura 2.2.1.- Estructura del ácido fólico (A) y sus derivados (B) (FAO, 2001)

Los folatos son sensibles a la luz, al calor y son fácilmente oxidables, de manera que la cocción supone una destrucción de hasta un 80% de los mismos (Lucock, 2000; Joubert et al, 2002; Mebart, 2006). En los alimentos con elevadas concentraciones de vitamina C (ácido ascórbico), ésta ejerce su función antioxidante, limitando o disminuyendo la oxidación de estas moléculas y por lo tanto evitando la disminución de su biodisponibilidad en el alimento (Lucock, 2000).

Absorción, transporte, metabolismo y funciones fisiológicas del ácido fólico y folatos

En los alimentos, los folatos están en forma de poliglutamatos (PteGlu_n), los cuales no pueden ser absorbidos directamente por la mucosa intestinal del duodeno y yeyuno, teniendo que ser previamente hidrolizados. Dicha hidrólisis tiene lugar en el borde del cepillo de la mucosa intestinal, mediante la pteroilmonoglutamato carboxilasa (deconjugasa), enzima capaz de hidrolizar los poliglutamatos hasta sus correspondientes unidades monoméricas (Halsted, 1980; Gregory, 1997; Cuskelly et al, 1996; FAO, 2001).

El ácido tetrahidrofólico, en forma de monoglutamato, es la única forma disponible y absorbible por nuestro organismo (Scott, 1994a,b). Dicha absorción tiene lugar en la superficie del epitelio intestinal a través de un sistema de transporte activo saturable y dependiente del pH, así como por un sistema de transporte pasivo cuando las concentración en el lumen intestinal es demasiado elevada (Lucock, 2000).

Una vez en el enterocito, el THF se transforma en 5-MetilTHF (5MTHF), forma fisiológicamente activa de esta vitamina, siendo ésta la forma activa que circulara en el plasma, de forma libre (el 10%) o unida a proteínas (Herbert et al., 1962; Lucock, 2000; Selhub et al., 1993; FAO, 2001).

Una de las funciones del ácido fólico más estudiadas en los últimos años es su relación con el metabolismo de la homocisteína, aminoácido sulfurado altamente reactivo, e intermediario del metabolismo de la metionina. Los niveles elevados de homocisteína se consideran como un factor de riesgo independiente para el daño aterosclerótico y aterotrombótico, al inducir la aterosclerosis a través de la proliferación de células del músculo liso, la activación de las plaquetas, la trombogénesis, la disfunción endotelial y la síntesis de colágeno (Shai et al, 2004; Vanizor Kural, 2003). De hecho, el 20-30% de los pacientes con enfermedad aterosclerótica tienen hiperhomocisteinemia y un ligero incremento de la homocisteína plasmática se ha correlacionado con un aumento en el riesgo cardiovascular del 10-20% (Ducros et al., 2002; Frick et al., 2003; Sydow y Boger, 2001).

La importancia nutricional del ácido fólico también estriba en sus efectos preventivos de diversas patologías, incluidos diversos tipos de tumores (Gerber, 2001), y algunas enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Ames indicó en 2001 que la falta de ácido fólico, entre otras vitaminas, induce una excesiva incorporación de uracilo en el ADN, lo que conduce a la ruptura de los cromosomas, y puede inducir daños celulares importantes.

El metabolismo del ácido fólico es crítico en el desarrollo embrionario, debido a su actividad en el ciclo de metilación necesario para la formación de los tejidos, encontrándose este compuesto íntimamente relacionado con la aparición de defectos en la formación del tubo neural, así como en los abortos recurrentes (Montgomery et al., 2003). Se ha demostrado (Steegers, 1995) que los defectos fetales del tubo neural podrían deberse a un desequilibrio en el metabolismo de la homocisteína materno y/o embrionario, desempeñando el ácido fólico un papel esencialmente importante en estos procesos (Refsum, 1998; Varela, 2008; Zittoun, 1998).

Necesidades y requerimientos de ácido fólico y sus derivados (Vitamina B₉)

Las mujeres embarazadas son propensas a desarrollar una deficiencia de ácido fólico, probablemente debido a que sus demandas de folatos se ven aumentadas en los tejidos en formación fetales y maternos (Shojania, 1984). Otros factores que provocan la deficiencia de folato incluyen una dieta poco equilibrada y deficitaria en este compuesto, o la hemodilución fisiológica del embarazo debido al aumento del aclaramiento plasmático y a las influencias hormonales.

Las ingestas recomendadas de esta vitamina para el normal funcionamiento del organismo están en torno a 65-200 µg/día para niños de hasta 8 años de edad y 400 µg/día para adultos, viéndose estas recomendaciones aumentadas hasta 600 µg/día en estados fisiológicos de la mujer como el embarazo y la lactancia (Trumbo, 2002). Al establecer dichas recomendaciones, hay que tener en cuenta la baja biodisponibilidad y la gran inestabilidad química de los folatos naturales, susceptibles de oxidación. Es por ello que se realiza la fortificación de los alimentos como cereales para el desayuno, harina, etc. con ácido fólico sintético, que es mucho más estable y biodisponible.

Dadas las características de hidrosolubilidad del ácido fólico y sus folatos, la toxicidad del mismo es bastante baja. No obstante como en otros tipos de nutrientes y/o vitaminas existen unas dosis máximas tolerables a partir de las cuales puede producirse algún tipo

de patologías y/o alteraciones fisiológicas que condicionen el normal funcionamiento del organismo. Trumbo et al. (2002) establecieron el límite tolerable de consumo de ácido fólico en 1000 mg/día en adultos.

Los folatos están presentes en la mayoría de los alimentos, como en el hígado, extractos de levadura y en las verduras, especialmente las de hoja verde (como es el caso de los vegetales silvestres), como son los berros (214 µg/100g de porción comestible), la escarola (267 µg/100g), las acelgas (196 µg/100g) y las espinacas (140 µg/100g) así como en algunas legumbres (frijol rojo la soja, 394 µg/100g y 370 µg/100g respectivamente) (Moreiras et al., 2010). Las frutas, aunque en menor medida, también pueden ser una fuente en ácido fólico relativamente importante, como es la naranja (37 µg/100g), la frambuesa (33 µg/100g), el plátano (22 µg/100g) y las fresas (20µg/100g). Algunos alimentos de bajo contenido en folatos (tales como el pan, las patatas y los productos lácteos frescos), debido a su elevado consumo, representan también un aporte interesante de folatos por la frecuencia y regularidad de consumo de los mismo (Lucock, 2000; Joubert et al, 2002).

2.3.- Tocoferoles y tocotrienoles: Vitamina E

La vitamina E es una vitamina liposoluble, descubierta en 1922 por Evans y Bishop (Trumbo, 2002; Traber, 2007). Vitamina E es el término empleado para designar a una familia de compuestos químicamente relacionados como son, los tocoferoles y tocotrienoles. Las cuatro isoformas del tocoferol (α , β , γ y δ -tocoferol) tienen un anillo fitilo saturado con 16 átomos de carbono en la cadena lateral (figura 2.3.1), mientras que sus homólogos tocotrienoles se diferencian estructuralmente de los tocoferoles por tener tres enlaces dobles en la cadena lateral (FAO, 2001).

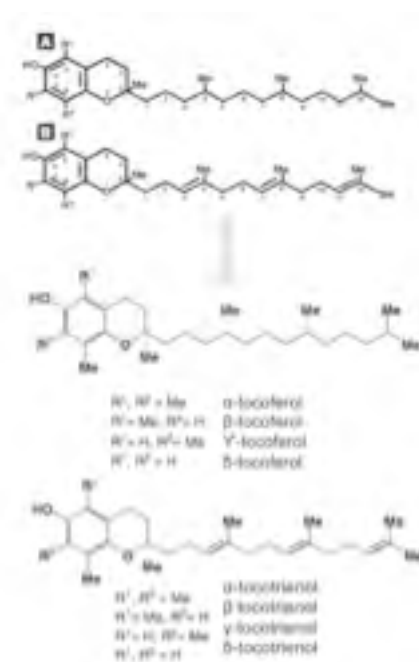


Figura 2.3.1.- Estructura química de tocoferoles (A) y tocotrienoles (B); modificado de Horvath et al., (2006); Se, et al., (2006)

Los tocoferoles son nutrientes de origen natural, con capacidad antioxidante, que juegan un papel importante al inactivar los radicales libres producidos a raíz de la actividad celular y derivados de los distintos factores de estrés. De sus cuatro isoformas, el α -tocoferol es el que presenta mayor actividad vitamínica E y capacidad antioxidante, al ser capaz de inhibir la propagación de cadena de radicales libres en el proceso de peroxidación lipídica, mediada por su propia conversión en productos oxidados (Tucker y Townsend, 2005). Además es la isoforma más activa debido a su absorción y distribución preferencial en el organismo humano (Caretto et al., 2010). La vitamina E puede proteger contra procesos degenerativos, como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Burton y Traber, 1990; Kamal Eldin y Appelqvist, 1996; Schwenke, 2002).

A efectos de la dieta, la actividad de la vitamina E se expresa como equivalentes de α -tocoferol (E α T), donde la actividad de 1 mg de *D*- α -tocoferol corresponde a un equivalente

de α -tocoferol. Para calcular los equivalentes de α -tocoferol correspondientes en niveles de actividad a las otras isoformas naturales de vitamina E debemos multiplicar por 0,5 cada miligramo de β -tocoferol, por 0,1 para el γ -tocoferol y por 0,3 para los tocotrienoles naturales. Mientras que para cualquiera de los compuestos sintéticos se debe multiplicar por 0,74.

Absorción, transporte, metabolismo y principales funciones de la Vitamina E

El carácter liposoluble de la vitamina E hace que su absorción en el intestino sea inicialmente dependiente de una adecuada función del páncreas y la secreción biliar que permite su esterificación, y la formación de sus correspondientes micelas de “acetato de tocoferol” miscibles en agua (Florez, 2003; Traber, 2007), que serán absorbidas por difusión pasiva a través de la membrana de las células del borde en cepillo del enterocito. Así se incorporarán a los quilomicrones, previa ruptura de sus correspondientes ésteres, siendo posteriormente secretados al torrente sanguíneo unidos a lipoproteínas HDL y VLDL (Traber, 2007). De ahí será transportado al tejido adiposo y muscular donde la mayoría de α -tocoferol podrá entrar posteriormente en las células de los tejidos periféricos dentro de la lipoproteína a través del receptor HDL (Traber, 2007).

En el parénquima hepático, puede metabolizarse o reincorporarse al plasma a través de la proteína de transferencia específica del α -tocoferol (α -TTP). A diferencia de otras vitaminas liposolubles, la vitamina E no se acumula íntegramente, sino que se metaboliza en el hígado para ser excretada en la orina, y la bilis y de ahí será eliminada por las heces (Brigelius-Flohe y Traber, 1999; Traber, 2007).

La vitamina E es un ejemplo de antioxidante de naturaleza fenólica, siendo estas moléculas capaces de donar fácilmente, a los radicales libres, átomos de hidrógeno del grupo hidroxilo perteneciente a la estructura del anillo. De este modo su acción como antioxidante se produce mediante la donación de un átomo de hidrógeno a los radicales

peroxilo de moléculas de lípidos insaturados, formando un hidroperóxido y un radical tocoferoxilo, que reacciona con los radicales peroxilo de otros tocoferoxilo formando aductos más estables (Traber, 2007)

Algunas de las funciones atribuidas a la vitamina E se deben a su capacidad antioxidante, su intervención en procesos de señalización celular, así como su capacidad de disminuir los problemas de infertilidad asociados a déficits en la espermatogénesis, etc. (Brigelius-Flohe y Traber, 1999; Azzi, 2004).

El papel biológico más importante de la vitamina E es proteger a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y otros componentes de las membranas celulares y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación por radicales libres. La vitamina E se encuentra principalmente dentro de la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares. Es particularmente eficaz en la prevención de la peroxidación lipídica, impidiendo la acumulación de niveles elevados de productos derivados de dicho proceso que están asociados a numerosas enfermedades y condiciones clínicas (Duthie, 1993).

Necesidades y requerimientos de vitamina E

La deficiencia de vitamina E es rara en los seres humanos. La deficiencia grave de tocoferol en animales de laboratorio ha demostrado causar problemas de degeneración neuronal en el tronco cerebral, la médula espinal y los nervios periféricos, así como una cierta pérdida de fibras mielinizadas (Florez, 2003; Berman, 2004). En humanos, los problemas relacionados con la deficiencia de esta vitamina pueden presentarse en prematuros de bajo peso y en niños ó adultos con problemas de malabsorción de grasas de modo que pueden sufrir problemas neurológicos, neuropatías periféricas, ataxia, miopatías esqueléticas, retinopatías y problemas de respuesta inmune (Florez, 2003).

Los niveles normales de tocoferol en plasma son entre 6 y 14 mg/ml. El consumo a través de la dieta es aproximadamente de hasta 40 UI (26,7mg) al día. Trumbo et al., en 2002

establecieron los niveles diarios de ingesta de esta vitamina necesarios para el normal funcionamiento del organismo, en 4-7 mg/día para niños de hasta 8 años de edad, y 15 mg/día para adultos, viéndose aumentadas estas necesidades en situaciones como la lactancia materna.

A pesar del carácter lipófilo de esta vitamina, su acumulación en el organismo es relativamente escasa y por lo tanto su toxicidad es relativamente baja. Trumbo et al., (2002), establecieron 100 mg/día como el nivel máximo tolerable de vitamina E en adultos. Las dosis superiores a 3000 UI/día (2000 mg/día) pueden provocar reacciones adversas, afectando al metabolismo de la vitamina A y K, y dando lugar a debilidad muscular, cefalea, visión borrosa, molestias gastrointestinales, creatinuria y disfunción de las gónadas (Florez, 2003).

Por otro lado, algunas personas con abetalipoproteinemia, un trastorno hereditario poco común que está asociado a una mala absorción de grasas en la dieta, requiere la suplementación con grandes dosis de vitamina E (aproximadamente 100 mg/kg o 5-10 g/día).

Son numerosos los alimentos que contienen vitamina E en su composición, frutos secos como las nueces, semillas oleaginosas y aceites vegetales como el de oliva se consideran fuentes importantes de α -tocoferol (Olmedilla et al., 2001), así como, algunos vegetales como los espárragos, las espinacas, los berros, el brécol y el tomate, con contenidos entre 1,2 y 2,5 mg de vitamina E por 100g de porción comestible (Moreiras et al., 2010). Algunos autores han puesto de manifiesto la relevancia de algunos vegetales silvestres (*Foeniculum vulgare*, *Asparagus acutifolius*, *Bryonia dioica*, *Tamus communis*, entre otros), como una buena fuente de vitamina E (Barros et al., 2010a; Martins et al., 2011).

2.4.- Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son moléculas de bajo peso molecular que se caracterizan por contener uno o más grupos carboxilo en su estructura, lo que les aporta unas propiedades físico-químicas concretas, jugando un papel importante en la percepción general del sabor en los alimentos.

En las plantas, son compuestos intermedios en el metabolismo de moléculas de mayor peso molecular, tales como hidratos de carbono, lípidos y péptidos (Chou y Patrick, 1976; Horsley, 1977; Kuiters y Sarink, 1986). El metabolismo de los ácidos orgánicos es fundamental a nivel celular incluyendo la producción de energía, o la formación de precursores para la biosíntesis de aminoácidos (Baziramakenga, 1994).

Los ácidos orgánicos se sintetizan principalmente en las mitocondrias a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs (figura 2.4.1), y en menor medida como parte del ciclo del glioxilato. Los ácidos orgánicos están presentes en la mitocondria y son preferentemente almacenados en la vacuola (Fig. 2.4.2), donde su excreción debe ajustarse a su participación en determinadas funciones fisiológicas (López-Bucio, 2000), de modo que los niveles de ácidos orgánicos no sólo varían entre las especies, sino que también varían entre los distintos tejidos de la planta. Además, la acumulación de estos compuestos se ve aumentada de forma importante en respuesta al estrés ambiental al que se pueda ver sometida la planta.

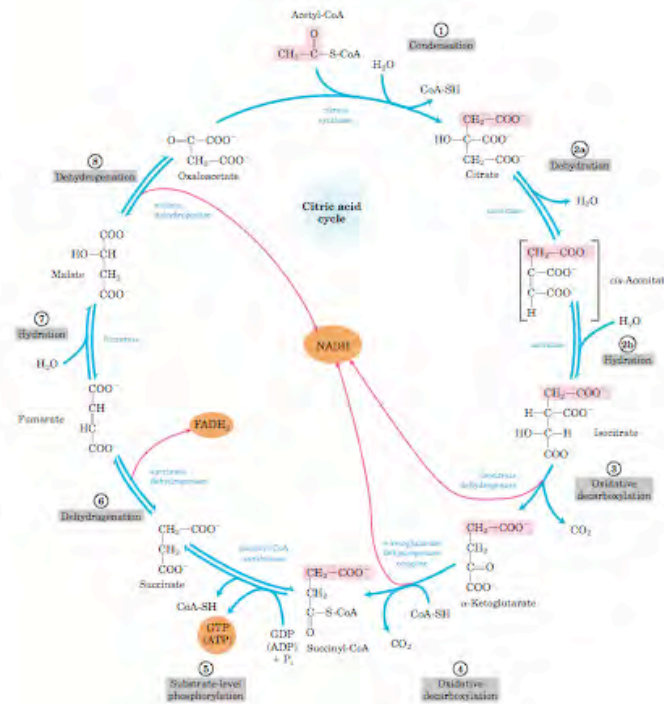


Figura 2.4.1.- Principales ácidos orgánicos presentes en los vegetales, Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Lehninger, 2011)

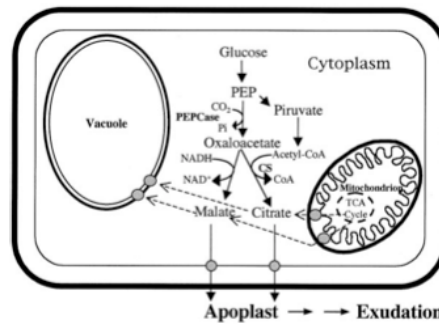


Figura 2.4.2.- Formación de ácidos orgánicos en la célula vegetal (López-Bucio, 2000)

Los ácidos orgánicos ejercen un papel importante en el equilibrio osmótico de la planta, así como en el ajuste y control del exceso de cationes en el medio. También participan en los mecanismos regulatorios de los que dispone la planta para hacer frente a las deficiencias de nutrientes, la tolerancia a metales y la defensa frente a patógenos (López-

Bucio et al., 2000; Squeira et al., 1991). Los ácidos orgánicos no solo actúan como intermediarios en el metabolismo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sino que varios estudios han demostrado que las plantas emplean estos compuestos como mecanismos de detoxificación a través de quelación y reacciones de intercambio de ligando frente a diferentes metales pesados como el plomo, aluminio, cadmio, etc. que están presentes en el medio ambiente (Bruckert, 1970; Fox y Comerford, 1990; Ryan et al., 2001).

Algunos de estos ácidos pueden comportarse como antioxidantes, siendo capaces de deslocalizar la carga electrónica procedente de los llamados radicales libres (López-Bucio et al., 2000; Wills et al., 1998).

Dentro de los ácidos orgánicos, el ácido oxálico ha demostrado presentar algunos problemas de toxicidad (siendo 5 g la dosis letal para un adulto), dado que puede interferir en la absorción de calcio así como contribuir a la formación de cálculos renales de oxalato con la consiguiente alteración de las funciones renales y problemas asociados. Por ello, para evitar problemas de descalcificación ósea, algunos autores recomiendan que la relación de la ingesta del ácido oxálico en la dieta no supere en 2,5 veces a la ingesta de calcio (Guil et al., 1996b; Guil et al., 1997).

2.5.- Ácidos grasos

Los ácidos grasos están constituidos por una cadena hidrocarbonada en la que el grupo metilo (CH_3) se denomina extremo ω o n y el grupo carboxilo extremo Δ . Se pueden clasificar de acuerdo con la presencia de dobles enlaces en la cadena carbonada (saturados, monoinsaturados o poliinsaturados), el número o posición del primer doble enlace (ω -3, ω -6 y ω -9) y configuración de los dobles enlaces (*cis* y *trans*). Como se muestra en el cuadro 2.5.1 y 2.5.2, los ácidos grasos pueden variar en longitud de 2 a 80 átomos de carbono, pero los compuestos más típicamente presentes en los vegetales constan de 14, 16, 18, 20 y 22 átomos de carbono (Mataix, 2003).

Estos compuestos pueden ser almacenados en el organismo como triglicéridos o formando parte de las membranas como fosfolípidos u otros lípidos de cadena compleja. Son un componente de carácter esencial para el organismo aportando fluidez, flexibilidad y permeabilidad selectiva a las membranas celulares, así como en la adaptación al frío, en la defensa frente a patógenos, la endocitosis y exocitosis, interviniendo también en la actividad enzimática asociada a membranas, etc. (Wallis et al., 2002).

Los ácidos grasos juegan un papel importante en la nutrición humana. En particular, los ácidos grasos insaturados se asocian con un menor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV), inflamatorias y enfermedades autoinmunes como el asma, la enfermedad de Crohn y la artritis y ciertos tipos de cáncer, incluidos los de colon, mama y próstata (Simopoulus, 2002).

Cuadro 2.5.1.- Ácidos grasos saturados presentes en los alimentos (Mataix y Gil, 2002)

Ácidos Grasos Saturados (AGS) - Nombre común	Nomenclatura sistemática
Ácido butírico (C4:0)	Butanoico
Ácido Caprónico (C6:0)	Hexanoico
Ácido caprílico (C8:0)	Octanoico
Ácido cáprico (C10:0)	Decanoico
Ácido undecanoico (C11:0)	
Ácido láurico (C12:0)	Dodecanoico
Ácido tridecanoico (C13:0)	
Ácido mirístico (C14:0)	Tetradecanoico
Ácido pentadecanoico (C15:0)	
Ácido palmítico (C16:0)	Hexadecanoico
Ácido heptadecanoico (C17:0)	
Ácido esteárico (C18:0)	Octadecanoico
Ácido araquídico (C20:0)	Eicosanoico
Ácido heneicosanoico (C21:0)	
Ácido behénico (C22:0)	Docosanoico
Ácido tricosanoico (C23:0)	
Ácido lignocérico (C24:0)	Tetracosanoico

Dentro de los ácidos grasos saturados (AGS), el palmítico (AP) es uno de los más abundantes en algunos alimentos y uno de los más controvertidos, dado que por su

naturaleza de AGS está contraindicado su consumo en pacientes con alto riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, por favorecer la agregación plaquetaria y la formación de las células espumosas causantes de las placas de ateroma. La Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que existen evidencias de que la ingesta alimentaria de AP aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, French et al., en 2002, demostró que el ácido palmítico no presenta ningún efecto hipercolesterolémico si la ingesta de ácido linoleico (AL) es superior al 4,5% del total de la energía ingerida.

Cuadro 2.5.2.- Ácidos grasos insaturados presentes en los alimentos (Mataix y Gil, 2002)

Nombre común	Nomenclatura sistemática
Ácidos Grasos Monoinsaturados (AGMIs)	
Ácido miristoleico (C14:1)	Ácido <i>Cis</i> -5-tetradecenoico
Ácido palmitoleico (C16:1)	Ácido <i>Cis</i> -9-hexadecenoico
Ácido oleico (C18:1n9c)	Ácido <i>Cis</i> -9-octadecenoico
Ácido elaídico (C18:1n9t)	Ácido <i>Trans</i> -9-octadecenoico
Ácido gadoleico (C20:1c)	Ácido <i>Cis</i> -9-eicosaenoico
Ácido gondoico (20:1c)	Ácido <i>Cis</i> -11-eicosaenoico
Ácido erúcico (C22:1n9)	Ácido <i>Cis</i> -13-docosenoico
Ácido nervonico (C24:1)	
Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGPIs)	
Ácido linoleico (C18:2n6c)	Ácido 9,12-octadecadienoico
Ácido γ -linolénico (C18:3n6)	Ácido 6, 9, 12-octadecatrienoico
Ácido estearidónico (C18:4)	Ácido 6,9,12,15-ocatadecatetraenoico
Ácido α -linolénico (C18:3n3)	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico
Ácido <i>Cis</i> -11,14-eicosadienoico (C20:2c)	
Ácido dinomo- γ -linolénico C20:3n6)	Ácido 8,11,14-eicosatrienoico
Ácido <i>Cis</i> -11,14,17-eicosatrienoico (C20:3n3)	
Ácido araquidónico (C20:4n6)	Ácido 5,9,11,14-eicosatetraenoico
Ácido Timnodónico (C20:5n3)	Ácido 5, 8, 11,14,17-eicosapentaenoico
Ácido <i>Cis</i> -13,16- docosadienoico (C22:2)	
Ácido artrénico (C22:4)	Ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico
Ácido osmond (C22:5)	Ácido 4,7,10,13,16-docosapentanoico
Ácido clupanodónico (C22:5)	Ácido 7,10,13,16,19- docosapentanoico
Ácido clupadónico (C22:6n3)	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico

El ácido oleico es el representante fundamental de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) en la dieta. Comparte con el resto de ácidos grasos el sistema de desaturasas y

elongasas, aunque con menor afinidad; de hecho, el ácido oleico genera pocos derivados de cadena larga, al menos en situaciones fisiológicas. Del ácido oleico se derivan eicosanoides con actividad vasodilatadora y antiagregante. A nivel lipídico, origina una reducción de triglicéridos, del colesterol total y unido a LDL, así como una disminución de la oxidación del mismo, con el beneficio añadido de ser una de las pocas sustancias conocidas capaces de inducir la elevación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

El contenido de grasa presente en las verduras es generalmente bajo. A pesar de ello, la espinaca, pimiento (rojo y verde), judías verdes, etc. presentan niveles en torno a 0,030 g/100g de porción comestible de algunos ácidos como ácido palmítico (C16:0), linoleico (C18:2) y algo superiores del α -linolénico (ALA, C18:3), en torno a 0,149 g/100g para la espinaca (Moreiras, et al., 2010). El ALA es abundante, en general, en los vegetales de hoja verde, y es el precursor de los ácidos grasos ω -3 de cadena larga (Voet y Voet, 2004). Según Simopoulos (2002), las plantas silvestres comestibles contienen un buen equilibrio de ácidos grasos ω -6 y ω -3, conteniendo más ALA que las cultivadas.

La mayoría de los ácidos grasos pueden ser sintetizados por las plantas. Los vegetales contienen desaturasas capaces de insertar dobles enlaces en las posiciones 3, 6 y 9 respecto del grupo metilo terminal, mientras que en los animales y concretamente en el hombre, las desaturasas sólo son capaces de introducir dobles enlaces en posiciones específicas más allá del carbono 6. Por lo tanto, hay una serie de ácidos grasos que el hombre no es capaz de sintetizar, denominados ácidos grasos esenciales (AGE), pero imprescindibles y necesarios para el normal funcionamiento fisiológico en los seres humanos, y que deben ser, por tanto, adquiridos a través de la dieta.

Entre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los de la serie ω -3 y ω -6, como son los ácidos grasos esenciales ácido α -linolénico (ALA, C18: 3 n-3) y linoleico (AL, C18: 2 n-6), son precursores en la biosíntesis de los eicosanoides, tales como el ácido

icosapentanoico y docosahexaenoico, compuestos que participan en una amplia gama de funciones metabólicas (Voet y Voet, 2004).

Ciertos AGMI se obtienen a partir del palmítico (16:0) y del esteárico (18:0), mediante la $\Delta 9$ -desaturasa los AGMI más abundantes del organismo, como son el ácido palmitoleico (16:1, $\omega 7$) y el oleico (18:1, $\omega 9$), respectivamente, que junto con los ácidos grasos esenciales AL y ALA son los precursores de otros ácidos grasos insaturados (Figura 2.5.2).

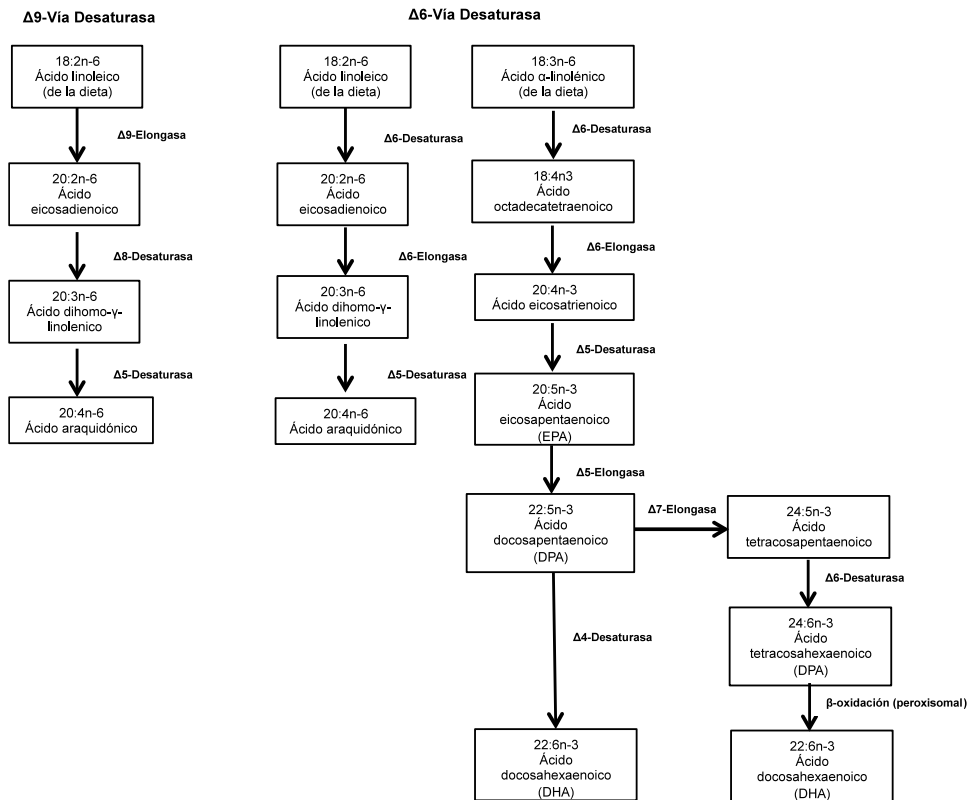


Figura 2.5.2.- Metabolismo de los ácidos grasos esenciales; Adaptado de Napier & Sayanova (2005); J. Lunn y H. E. Theobald (2006)

La síntesis de los AGPI se lleva a cabo en el hígado, intestino, cerebro y retina mediante sucesivas reacciones de elongación y desaturación catalizadas por la enzima ácido graso elongasa y la $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasa; La $\Delta 6$ -desaturasa es la enzima condicionante de la ruta

biosintética de ácidos grasos (Wallis et al., 2002; Qui, 2003), pudiendo estar esta síntesis limitada por alguna patología asociada a los órganos implicados.

Absorción, transporte, metabolismo y funciones fisiológicas de los ácidos grasos

Las grasas procedentes de la dieta deben ser emulsionadas (por la bilis secretada en el intestino delgado) para ser absorbidas por los enterocitos, mediante la formación de micelas dispersables y miscibles en agua, permitiendo así que las lipasas pancreáticas escindan los ácidos grasos en la posición sn-1 y sn-3 de los triglicéridos. Así se forman los ácidos grasos libres, un 2-monoacilglicerol, y cantidades muy limitadas de glicerol, que se absorben por difusión a través de la pared intestinal. Dicho proceso de digestión de las grasas es muy eficiente, absorbiéndose más del 95% de la grasa dietética (Sanders y Emery 2003).

Los ácidos grasos esenciales, así como los derivados de los AGPI de cadena larga ω -6 y ω -3 son fundamentales en los diferentes estadios de crecimiento del hombre, desde la gestación, lactancia e infancia, siendo imprescindibles para la formación y crecimiento de todos los tejidos, principalmente del nervioso.

Los efectos ateroprotectores derivados de la ingesta de AGPI ω -3 provienen principalmente de la incorporación de los mismos a los fosfolípidos de las membranas de las células, sustituyendo parcialmente el ácido araquidónico (AA, C20: 4 ω -6) en las membranas cardiovasculares, como sustrato inicial para la producción de eicosanoides (prostaglandina I3), que es equipotente a la prostaciclina como agente antiagregante.

Los intermediarios derivados del metabolismo de los AGPI ω -3 son menos protrombóticos y vasoconstrictores que los derivados procedentes del araquidónico (ω -6). El contenido de ácidos grasos de las plaquetas origina la producción de tromboxano-A2 a partir de los ácidos grasos de la familia ω -6, o de tromboxano-A3 a partir de los de la familia ω -3. Este último posee un efecto proagregante menor que el tromboxano-A2, reduciendo, por

tanto, la agregación plaquetaria y la trombosis (Lunn y Theobald, 2006; Florez, 2003).

La cantidad de ácido araquidónico en los tejidos dependerá del contenido en ALA y AL, y por lo tanto de la competencia a la hora de acceder a las enzimas involucradas en el proceso de desaturación y elongación. De modo que la relación entre ALA a AL en la dieta es muy importante tanto desde el punto de vista nutricional como en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Guil-Guerrero y Rodríguez-García, 1999).

Necesidades y requerimientos de ácidos grasos esenciales

Por lo anteriormente indicado, se recomienda consumir un mínimo de 1% de la energía en forma de ácidos grasos poliinsaturados ω -6 y el 0,2% en de ω -3. El AL y ALA son ácidos grasos esenciales únicamente adquiridos mediante la dieta. Por ello la ingesta adecuada para niños de hasta 8 años de edad es de 4,4 a 10 mg/día de AL y 0,4 a 0,9 mg/día de ALA; los adultos varones necesitan consumir 17 y 1,6 mg/día respectivamente, mientras que las mujeres necesitan ingerir 12 y 1,1 mg/día de AL y ALA respectivamente, viéndose estas necesidades aumentadas en determinadas situaciones fisiológicas como el embarazo y la lactancia.

Las dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados se han asociado con mejoras en el control glucémico. Asimismo, los ácidos grasos insaturados, AGMI y AGPI ω -3, pueden estar asociados con la disminución del riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer, incluyendo los cánceres del colon, mama y próstata. Sin embargo, el nivel de evidencia no se considera suficiente para formular recomendaciones concretas en este sentido (Lunn y Theobald, 2006; Florez, 2003).

Aunque las dietas de los países del Mediterráneos pueden variar, los AGMI típicamente representan el 16-29% de la ingesta energética (Kris-Etherton, 1999). Sin embargo, es necesario aumentar nuestro consumo de ω -3 AGPI de cadena larga y disminuir la ingesta

de AGS, , lo que reduciría el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Lunn y Theobald, 2006; Florez, 2003).

Desafortunadamente, el balance de AGPI ω -3 y ω -6 en la dieta occidental ha cambiado sustancialmente en los últimos 100 años, alejándonos del patrón de la Dieta Mediterránea (Ward y Singh, 2005), siendo los ácidos grasos poliinsaturados ω -6 los predominantes. La alta cantidad de ácidos grasos ω -6 en la dieta occidental (principalmente ácido araquidónico) da lugar a los productos procedentes del metabolismo de los eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, ácidos grasos hidroxilados, y lipoxinas, que contribuyen a la formación de trombos y ateromas, y trastornos inflamatorios (Simopoulos, 2002).

Como indicaron Ward y Singh en 2005, es recomendable una baja proporción de ácidos grasos ω -6/ ω -3 en la dieta para reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades crónicas de alta prevalencia nuestra sociedad. Las cantidades excesivas de ácidos grasos poliinsaturados ω -6, y en consecuencia una muy alta proporción del ratio ω -6/ ω -3 elevado, promueve un aumento del riesgo de padecer enfermedades asociadas a un aumento del metabolismo de los eicoanoides, mientras que altos niveles de AGPI ω -3 y por lo tanto una baja proporción del ratio ω -6/ ω -3 ejercen efectos supresores sobre ellos.

2.6.- Compuestos Fenólicos: Fenoles y Flavonoides

Los compuestos fenólicos agrupan a un amplio grupo de moléculas caracterizadas por poseer un anillo aromático con al menos un sustituyente hidroxilo y una cadena lateral. Poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante.

Se trata de un grupo de compuestos producto del metabolismo secundario de las plantas, como productos finales de las vías shikimato y acetato, desde moléculas relativamente sencillas (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides) a compuestos altamente polimerizados como las ligninas, melaninas, taninos, etc. (Bravo, 1998).

Dentro de la planta ejercen funciones de defensa frente a invasiones microbianas, frente a enfermedades, dan lugar a características como el aroma, astringencia, coloración de flores y frutos, etc. (Waterhouse, 2002). Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos son bien conocidas, jugando un papel vital en la estabilidad de los productos alimenticios, así como en los mecanismos de defensa antioxidante de los sistemas biológicos (Nijveldt et al., 2001). En estas reacciones el radical fenoxilo resultante es relativamente estable, siendo capaz de deslocalizar la carga electrónica por resonancia y por tanto de evitar el inicio de una reacción en cadena.

Los compuestos fenólicos se pueden dividir en dos grandes grupos (figura 2.6.1 a y b):

- Compuestos flavonoides: están formados por dos ciclos bencénicos (A y B) unidos por un anillo heterocíclico oxigenado (C). En función del grado de insaturación y sustitución del anillo central, se pueden clasificar a su vez en: flavan-3-oles, antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina), flavonas (crisina, rutina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanonas (herperidina, naringenina), catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina) y dihidroflavonoles.

- Compuestos no-flavonoides: incluyen los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, estilbenos, etc.

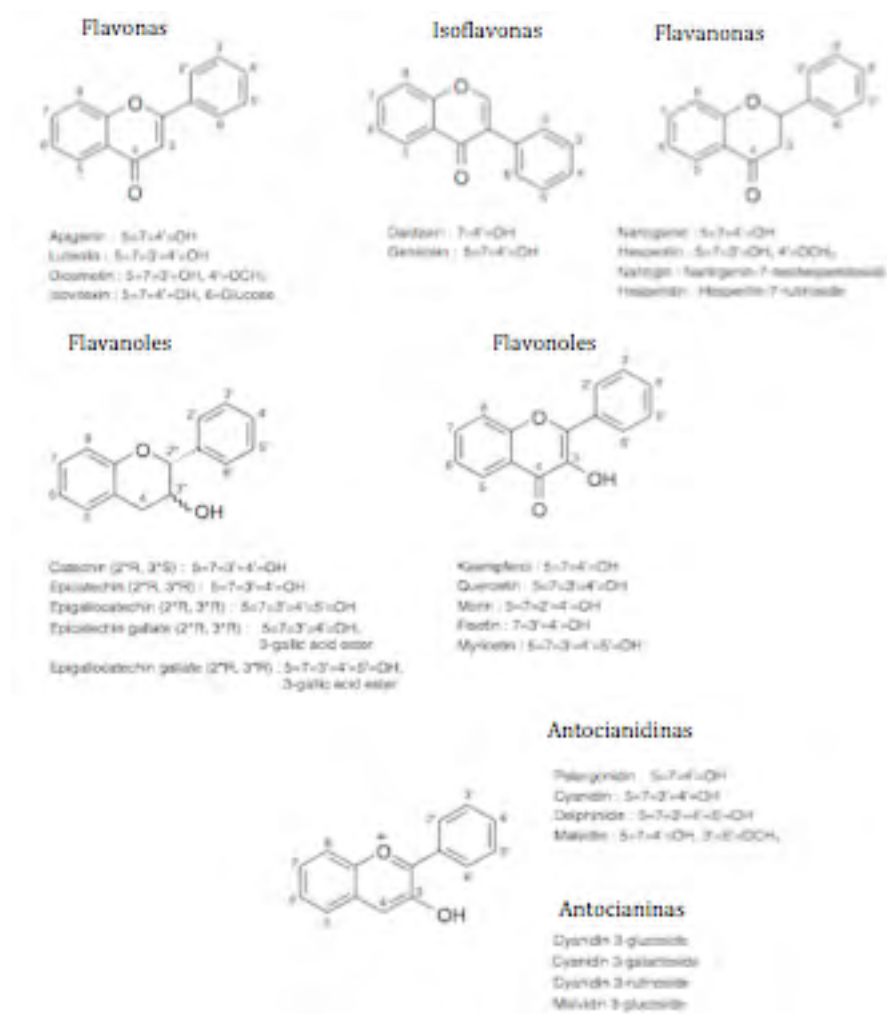


Figura 2.6.1a.- Principales fenoles y flavonoides presentes en vegetales (Laguerre et al., 2007)

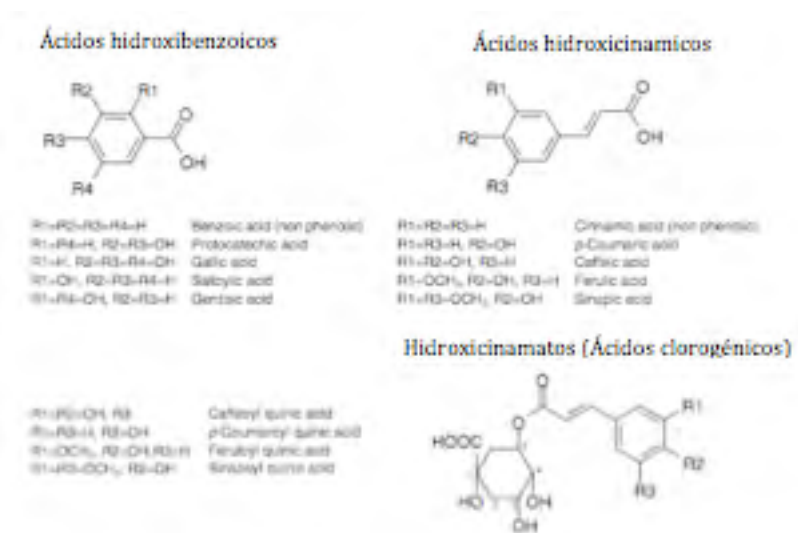


Figura 2.6.1b.- Principales fenoles y flavonoides presentes en los vegetales (Laguerre et al., 2007)

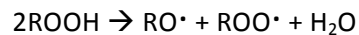
2.7.- Actividad antioxidante

Los procesos oxidativos suponen transferencias de electrones, es decir, pérdidas de cargas negativas. En este proceso participan enzimas (catalasas y deshidrogenasas) que se encuentran en las mitocondrias y actúan en varias etapas de la cadena respiratoria, siendo un proceso habitual dentro del metabolismo celular (Halliwell, 1999). En la cadena respiratoria el oxígeno capta electrones generando energía en forma de ATP, y dando lugar a los denominados radicales libres (sustancias que poseen uno o más electrones desapareados). Estos son compuestos muy reactivos que tienden a captar un electrón de moléculas biológicas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre al quedarse con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño molecular, en membranas celulares y tejidos (Halliwell, 1999).

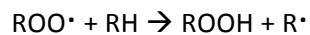
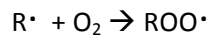
En condiciones patológicas o en presencia de compuestos pro-oxidantes, los ROS se producen en grandes cantidades (Halliwell, 1996b, 1999). El estrés oxidativo causa la producción de especies de oxígeno altamente reactivas (ROS), como son los compuestos: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicales hidroxilo (OH^{\bullet}), radical oxido nitroso (NO^{\bullet}), radicales alquiloxi (RO^{\bullet}), y otras especies como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno atómico (O^{\bullet}), que se originan ya sea de forma exógena o endógena (Ferreira et al., 2009).

El mecanismo de oxidación tiene lugar en tres etapas bien diferenciadas: En la etapa de iniciación se forman los radicales libres que reaccionan y se transforman en otros radicales durante la etapa de propagación y que finalmente se transformaran en productos más estables durante la etapa de terminación.

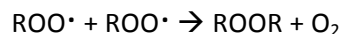
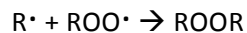
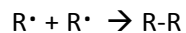
Etapa de iniciación:



Etapa de propagación:



Etapa de terminación:



El radical superóxido, en particular, se produce por la pérdida de electrones de las cadenas de transporte de electrones en la mitocondria y los sistemas microsomales del citocromo P450 así como por los fagocitos activados, como parte de la defensa inmunitaria primaria

en respuesta a sustancias extrañas o para combatir la infección por microorganismos. El óxido nítrico (NO) puede producirse a partir de L-arginina (presente en casi todos los tejidos de mamíferos) por la óxido nítrico sintasa. El NO en concentraciones normales ejerce su función fisiológica, sirviendo como mediador para que los macrófagos expresen actividad citotóxica frente microorganismos y células neoplásicas. Pero en altas concentraciones de óxido nítrico, éste puede reaccionar con el anión superóxido sin necesidad de catalizador, formando el compuesto denominado peroxinitrito, el cual se considera como una especie de nitrógeno potencialmente dañina pudiendo reaccionar a través de diferentes mecanismos (Fridovich, 1983; Moncada y Higgs, 1993; FAO, 2001; Pacher, 2007; Ferreira et al., 2009).

Los ROS junto con otros pro-oxidantes (como los iones de Cu y Fe) pueden modificar el equilibrio oxidativo en las células. Algunos ejemplos lo constituyen la luz solar, el humo de tabaco, contaminación ambiental, ejercicio extremo, así como la presencia de xenobióticos en el organismo o situaciones relacionadas con diversas enfermedades.

Cuando la generación de ROS excede la capacidad antioxidante del organismo, se producen lesiones celulares y metabólicas a través de su acción sobre las proteínas, lípidos y ADN, dando lugar a una amplia variedad de procesos fisiopatológicos. De hecho, la producción descontrolada de radicales libres se ha relacionado con más de cien enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos, cataratas, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias, cáncer y el proceso de envejecimiento en sí mismo, así como varios tipos de cáncer (Ames et. al, 1993; Halliwell, 1996a; Shah y Channon, 2004; Valko et al., 2006; Yang et al., 2008).



Figura 2.7.1.- Causas y consecuencias del estrés oxidativo (Ferreira et al., 2009)

Los tejidos contienen una serie de enzimas intracelulares con capacidad antioxidante como son la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT) capaces de modular el estrés oxidativo. La SOD facilita la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno, manteniendo las concentraciones de superóxido lo suficientemente bajas para evitar la formación de peroxinitrito, mientras que las CAT y GPx son capaces de transformar el peróxido de hidrógeno en agua. Además de estos sistemas enzimáticos, la célula dispone de moléculas antioxidantes de carácter endógeno como el glutatión (Finkel y Holbrook, 2000), la coenzima-Q reducida. Los antioxidantes exógenos de mayor relevancia presentes en la dieta, son los carotenoides, ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) y compuestos fenólicos, que previenen la oxidación del colesterol-LDL reduciendo el riesgo de alteraciones coronarias, además de tener efecto anticancerígeno al inhibir la formación de sustancias carcinogénicas (Strain y Benzie, 1999).

Los antioxidantes son compuestos capaces de retrasar o inhibir la oxidación de un sustrato pudiéndolos clasificar en dos grandes grupos según su mecanismo de acción (Halliwell, 1999):

- Antioxidantes primarios: capaces de neutralizar las reacciones en cadena, reaccionando con los radicales libres convirtiéndolos en compuestos termodinámicamente estables.

- Antioxidantes secundarios: son aquellos que actúan retardando el inicio de las reacciones en cadenas formadoras de los hidroperóxidos.

La mayoría de los antioxidantes biológicos actúan de modo que al aceptar un electrón no apareado, el radical libre intermedio formado tiene una vida media relativamente larga en el entorno biológico normal. Los antioxidantes naturales pueden proteger el cuerpo humano de los radicales libres y retardar el progreso de muchas enfermedades crónicas, así como alteraciones en el propio alimento (Kinsella et al, 1993; Lai et al, 2001).

Varios estudios científicos recientes confirman que el consumo de frutas y vegetales, por su contenido en nutrientes antioxidantes, es actualmente una de las estrategias más efectivas y seguras en la prevención de enfermedad cardiovascular y otras enfermedades degenerativas (Block et al., 1992; Gerber et al, 2002; Di Matteo y Esposito, 2003).

En el alimento así como en el cuerpo humano, los compuesto antioxidantes ejercen un efecto sinérgico entre si (Chew, 1995; Nagaoka et al., 2007). Existen mecanismos para recuperar la vitamina C de manera similar a los de la vitamina E. La regeneración de la vitamina C dependerá de la existencia en plasma de células metabólicamente activas capaces de realizar dicha reducción; así en los tejidos atróficos o tejidos expuestos a la inflamación, la viabilidad celular puede fallar y con ello la posibilidad de reciclar la vitamina C. En el caso de la vitamina E, se cree que se orienta con la estructura del anillo quinol en la superficie externa de las gotículas de grasa plasmática (es decir, en contacto con la fase acuosa) para que pueda mantenerse en su forma reducida activa mediante la circulación de agentes reductores como la vitamina C (Bendich, 1986). Dentro de las membranas biológicas, se cree que la vitamina E se intercala con los fosfolípidos para brindar protección a los AGPI frente a la oxidación. La vitamina E es muy eficaz en la prevención de la auto-oxidación de lípidos, como es el caso de la inhibición de la oxidación de las lipoproteínas LDL (FAO, 2001).

Según Bendich (1986), en 1941 se demostró que la vitamina C por sí sola no era efectiva en la prevención de la auto-oxidación *in vitro* de la grasa. Asimismo, se demostró que la función ejercida por la vitamina E sola era muy inferior al efecto producido por la presencia simultánea de ambas vitaminas, siendo la vitamina C la responsable de la "regeneración" de la vitamina E mediante la reducción del radical α -tocoferoxilo producido cuando la vitamina E "secuestra" un radical peroxilo, recuperándose así la capacidad antioxidante de la vitamina E frente al resto de radicales presentes en el medio.

Por lo tanto, se cree que el radical tocoferoxilo formado por la oxidación de α -tocoferol es lo suficientemente estable para permitir su reducción por la vitamina C para regenerarse, evitándose así la oxidación de los AGPIs cercanos. Del mismo modo las formas oxidadas de vitamina C, el radical libre ascorbilo y dehidroascorbato, se puede reciclar de nuevo a ascorbato por la GSH o la enzima reductasa dehidroascorbato.

Dada la importancia de todos estos mecanismos biológicos, en los alimentos se hace necesario profundizar en los aspectos relativos al contenido de compuestos bioactivos en los vegetales que forman parte de nuestra dieta, con el fin de fomentar el conocimiento y empleo de los mismos y potenciar así sus propiedades nutricionales y/o funcionales.

B. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

3. OBJETIVOS

El consumo de vegetales silvestres es de gran interés ya que permite la diversificación de la alimentación y el mantenimiento de la identidad cultural y gastronómica de cada región. Además muchos de estos vegetales pueden ser alimentos con un gran potencial nutricional y fuente de compuestos bioactivos a la dieta. Sin embargo, los estudios científicos sobre verduras silvestres desde el punto de vista nutricional son escasos. Por todo ello, el presente trabajo de investigación tiene como **objetivo principal**:

El estudio de vegetales silvestres comestibles tradicionales de la Comunidad de Madrid, mediante la caracterización del contenido en compuestos bioactivos y la valoración de su potencial actividad biológica (capacidad antioxidante), con el fin de potenciar su consumo tradicional y valorándolos como posible fuente de ingredientes funcionales.

Para ello se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Optimización de los distintos métodos analíticos para la caracterización de las muestras objeto de estudio, y en especial puesta a punto de la metodología de análisis del ácido fólico y sus correspondientes folatos (pteroil-poliglutamatos).
2. Caracterización del contenido de compuestos de interés nutricional y funcional de naturaleza hidrófila en las especies objeto de estudio: vitamina C, vitamina B₉ (ácido fólico y folatos), ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y flavonoides totales.
3. Caracterización del contenido de compuestos de interés nutricional y funcional de naturaleza lipófila en las especies objeto de estudio: ácidos grasos (esenciales y no esenciales) y vitamina E (tocoferoles).
4. Valoración de la capacidad antioxidante de las plantas silvestres objeto del estudio, mediante diferentes ensayos *in vitro*.

5. Valoración de la influencia del tratamiento térmico en el contenido de algunos compuestos bioactivos de algunas de las especies que se consumen cocinadas: vitamina C, ácidos orgánicos y vitamina B₉ (ácido fólico y folatos).

El presente trabajo, forma parte del proyecto CGL2006-09546/BOS: “Valoración productiva y nutricional de plantas silvestres comestibles de uso tradicional en España”, MEC (Plan Nacional I+D+i), cuyo investigador principal es el Dr. Francisco Javier Tardío Pato, del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA).

4. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

1) Selección de muestras:

Con el fin de dar cumplimiento a los objetivos propuestos, en una primera fase se seleccionaron las muestras objeto de estudio, considerando su disponibilidad y adecuación a los objetivos propuestos según los criterios del grupo de investigadores expertos en etnobotánica (procedentes del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario, Real Jardín Botánico de Madrid y la Universidad Autónoma de Madrid). Como se muestra en el cuadro 4.1, se han seleccionado un total de 20 especies vegetales silvestres comestibles.

2) Selección de los parámetros y optimización de la metodología analítica:

- Parámetros físico-químicos: humedad, pH y acidez titulable.
- Compuestos bioactivos hidrosolubles: ácido ascórbico y dehidroascórbico (vitamina C), ácidos orgánicos, ácido fólico y derivados (vitamina B₉), fenoles y flavonoides totales.
- Compuestos bioactivos liposolubles: ácidos grasos, tocoferoles (vitamina E).
- Valoración de la actividad biológica *in vitro* de los compuestos bioactivos: actividad antioxidante

3) Aplicación de los métodos de análisis a las muestras

4) Valoración de la influencia del tratamiento térmico en el contenido de algunos compuestos bioactivos:

Se ha evaluado la variación debida al procesado en los contenidos de vitamina C, ácidos orgánicos y vitamina B₉ (ácido fólico), en seis de las especies estudiadas, seleccionadas por poseer contenidos elevados de estos compuestos y por ser tradicionalmente consumidas cocinadas.

Dichas especies fueron:

- *Asparagus acutifolius* L.
- *Bryonia dioica* Jacq.
- *Humulus lupulus* L.
- *Silene vulgaris* (Moench) Garcke
- *Rumex pulcher* L.
- *Tamus communis* L.

Algunas de las determinaciones llevadas a cabo en el presente trabajo, se realizaron como parte de una estancia internacional de investigación predoctoral, realizada en el Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, pertenecientes al Departamento de Biología y Biotecnología (DBB) del Centro de Investigaçã de Montanha (CIMO), Escola Superior Agrária de Bragança entre el 22 de Junio y el 30 de Septiembre bajo la dirección de la Dra. Ana María Carvalho, Profesora y coordinadora del DBB.

Cuadro 4.1.- Especies silvestres seleccionadas en el presente estudio (Tardío et al., 2002)

Especies	Familia	Nombre Común	Parte comestible	Forma de consumo
<i>Apium nodiflorum</i> (L.) Lag.	Umbelliferae	Berraza	Tallos tiernos con hojas	Cruda
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Umbelliferae	Hinojo	Tallos tiernos con hojas	Cruda y cocinada
<i>Montia fontana</i> L.	Portulacaceae	Corujas	Tallos tiernos con hojas	Cruda
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke.	Caryophyllaceae	Collejas	Tallos tiernos con hojas	Cruda y cocinada
<i>Anchusa azurea</i> Mill.	Boraginaceae	lenguaza	Hojas basales	Cruda
<i>Beta maritima</i> L.	Chenopodiaceae	Acelga silvestre	Hojas basales	Cocinada
<i>Chondrilla juncea</i> L.	Asteraceae	Ajonjera	Hojas basales	Cruda
<i>Cichorium intybus</i> L.	Asteraceae	Achicoria	Hojas basales	Cocinada
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Papaveraceae	Amapola	Hojas basales	Cruda y cocinada
<i>Rumex papillaris</i> Boiss. & Reut.	Polygonaceae	Acedera	Hojas basales	Cruda
<i>Rumex pulcher</i> L.	Polygonaceae	Romaza	Hojas basales	Cocinada
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Asteraceae	Cerraja	Hojas basales	Cruda y cocinada
<i>Taraxacum obovatum</i> (Willd) D.C.	Asteraceae	Diente de león	Hojas basales	Cruda
<i>Scolymus hispanicus</i> L.	Asteraceae	Cardillo	Hojas Basales Peladas	Cruda y cocinada
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Asteraceae	Cardo o cardincha	Hojas Basales Peladas y brotes tiernos	Cruda y cocinada
<i>Asparagus acutifolius</i> L..	Lilaeaceae	Espárrago triguero	Brotes tiernos	Cocinada
<i>Humulus lupulus</i> L.	Cannabaceae	Espárrago de zarza	Brotes tiernos con hojas pequeñas	Cocinada
<i>Tamus communis</i> L.	Dioscoreaceae	Lupios	Brotes tiernos con hojas pequeñas	Cocinada
<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	Cucurbitaceae	Espárrago de nuez	Brotes tiernos con hojas pequeñas	Cocinada
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	Lilaeaceae	Ajoporro	Bulbo y parte apical de las hojas	Cocinada

C. MATERIALES Y MÉTODOS

5. MUESTREO

Como se ha indicado anteriormente, en el presente trabajo, han sido estudiadas 20 especies silvestres de consumo tradicional en la Comunidad Autónoma de Madrid (ver cuadro 5.1) la provincia de Segovia (Ituero y Lama) y Guadalajara (Pioz), tradicionalmente empleadas en alimentación. Dichas muestras fueron identificadas por botánicos expertos y recolectadas en sus hábitats naturales, seleccionando para ello al menos 2 localidades y dos años diferentes y consecutivos (2007 a 2008). En algunos casos al tratarse de especies silvestres hubo problemas de baja producción, no pudiéndose recolectar alguna de ellas en el 2007 en ambas localidades, por lo que para garantizar la representatividad de los resultados se decidió realizar otro muestreo complementario en 2009. De este modo se evaluaron un total de 90 muestras frescas.

De cada especie se recolectaron al menos 500 gramos de porción comestible a partir de al menos 25 individuos de cada especie, escogidos al azar, en el estadio de desarrollo más adecuado para el consumo (en general, a partir de mediados de marzo a finales de mayo).

Las zonas de recolección fueron las que se indican en el cuadro 5.1 y que aparecen señaladas en el mapa de la Figura 5.1.

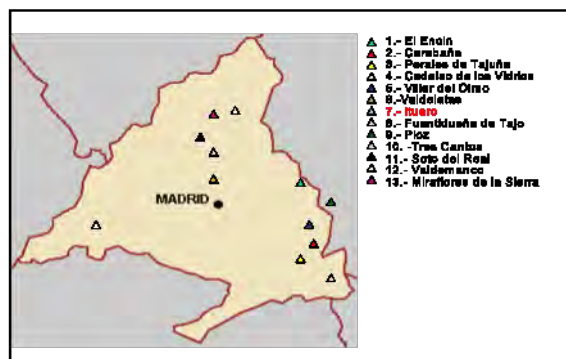


Figura 5.1.- Mapa representativo de la situación de las localidades empleadas para la recolección de las muestras

Cuadro 5.1.- Relación de localidades donde se realizó la recolección de las muestras, para cada año de muestreo y para cada especie

Especies	2007		2008		2009	
	Localidad A	Localidad B	Localidad A	Localidad B	Localidad A	Localidad B
<i>Apium nodiflorum</i> (L.) Lag.	Perales de Tajuña	-	Perales de Tajuña	Villar del Olmo	Perales de Tajuña	Villar del Olmo
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Perales de Tajuña	Valdelatas	Perales de Tajuña	Valdelatas		
<i>Montia fontana</i> L.	Ituero y Lama (Segovia)	-	Ituero y Lama (Segovia)	Pto Canencia	Ituero y Lama (Segovia)	Puerto de Canencia
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke.	Cadalso de los Vidrios	Villar del Olmo	Cadalso de los Vidrios	Villar del Olmo	Cadalso de los Vidrios	-
<i>Anchusa azurea</i> Mill.	-	Villar del Olmo	Cadalso de los Vidrios	Villar del Olmo	Cadalso de los Vidrios	Villar del Olmo
<i>Beta maritima</i> L.	El Encín	Carabaña	El Encín	Morata de Tajuña		
<i>Cichorium intybus</i> L.	El Encín	Valdelatas	El Encín	Valdelatas		
<i>Rumex papillaris</i> Boiss. & Reut.	Cadalso de los Vidrios	Valdemanco	Cadalso de los Vidrios	Valdemanco	Valdelatas	-
<i>Rumex pulcher</i> L.	El Encín	Valdelatas	El Encín	Valdelatas	El Encín	-
<i>Taraxacum obovatum</i> (Willd.) DC.	Villar del Olmo	Valdelatas	Villar del Olmo	Valdelatas		
<i>Chondrilla juncea</i> L.	Valdelatas	Pioz	Valdelatas	Pioz		
<i>Papaver rhoeas</i> L.	El Encín	Valdelatas	El Encín	Valdelatas		
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	-	El Encín	Cadalso de los Vidrios	El Encín	Cadalso de los Vidrios	El Encín
<i>Scolymus hispanicus</i> L.	Valdelatas	Fuentidueña	Valdelatas	Fuentidueña		
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	El Encín	Valdelatas	El Encín	Valdelatas		
<i>Asparagus acutifolius</i> L.		Valdelatas	El Encín	Valdelatas	El Encín	Valdelatas
<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	Valdelatas	El Encín	Valdelatas	El Encín	-	El Encín
<i>Humulus lupulus</i> L.	El Encín	Miraflores de la Sierra	El Encín	Miraflores de la Sierra	El Encín	-
<i>Tamus communis</i> L.	Tres Cantos	Soto del Real	Tres Cantos	Soto del Real	Tres Cantos	-
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	El Encín	Cadalso de los Vidrios	El Encín	Cadalso de los vidrios		

5.1.- DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

Familia Boraginaceae

Anchusa azurea Mill.

Planta perennante con uno o varios tallos, hispida, con indumento simple de pelos rígidos. Hojas basales lanceoladas, formando una roseta caduca en la fructificación, hasta de 11-20 x 2,5-3 cm de ancho; tallos de hasta 120-150 cm, erectos y abundantemente ramificados en la parte superior; hojas caulinares agudas, con margen ligeramente sinuado-dentado, rara vez oblanceoladas. Flores con corola azul o azul-violáceo intenso, brillantes, rara vez blancas o rosadas, con tubo de 6,5-8 mm (Valdés *in* Flora ibérica, vol. 11 inéd.; Tardío et al., 2002).

Para el uso culinario y gastronómico de esta especie se emplean sus hojas basales cocinadas formando parte de diferentes guisos, o simplemente aderezadas con aceite y vinagre. En el Líbano se emplean sus inflorescencias y hojas a modo de infusión para el tratamiento de problemas gastrointestinales (Tardío et al., 2002; El Beyrouthy et al., 2008).



Figura 5.1.1.- *Anchusa azurea* (autor: J. Tardío)

Familia Cannabaceae

Humulus lupulus L.

Es una planta rizomatosa, trepadora, con tallos aéreos anuales largos y volubles, de hasta 5-10 m de altura, lampiños pero con prominencias duras; hojas relativamente grandes, hasta 17,5 × 18,5 cm, generalmente opuestas, pecioladas y ampliamente cordadas en la base. Es una planta dioica, con pies masculinos que incluyen flores pequeñas, verdosas, dispuestas en racimos ramificados y brácteas de 6 × 2 mm; los pies femeninos presentan inflorescencias femeninas con flores reducidas únicamente al pistilo, solitarias o en pequeñas cimas dispuestas en las axilas de brácteas fuertemente imbricadas y cortamente pedunculadas (Catalán *in* Flora ibérica, vol. 3, 1993; Tardío et al., 2002).

Además del importante uso de las inflorescencias del lúpulo en la industria cervecera, se consumen sus brotes tiernos previamente cocidos, en guisos, en tortilla, o en revuelto (Tardío et al., 2006; 2010).



Figura 5.1.2.- *Humulus lupulus* (autor: J. Tardío)

Familia Caryophyllaceae

Silene vulgaris (Moench) Garcke

Planta herbácea vivaz, de 35-80 cm de altura, glabra, a veces estolonífera, con raíces gruesas y tuberosas; tallos erectos, fuertes, blanquecinos o verdosos en la mitad inferior; hojas coriáceas, agudas, de hasta 85 × 22 mm, las inferiores pecioladas, oblanceoladas y frecuentemente con un margen cubierto de pelos cortos. Inflorescencia generalmente multiflora con flores de pétalos de blancos o rosa pálido, de limbo hendido; cáliz globoso característico que persiste en la fructificación (Talavera *in* Flora ibérica, vol. 2, 1990; Tardío et al., 2002).

En alimentación, de ésta especie se emplean sus tallos tiernos con hojas cocinadas , en tortilla, añadiéndolas al potaje. También se emplean en el pastel vegetal italiano “erbete” y a veces incluso crudas en ensalada (Tardío et al., 2002; 2006; Pardo-de-Santayana, 2007; Cornara et al., 2009).



Figura 5.1.3.- *Silene vulgaris* (autor: M. Molina)

Familia Asteraceae

Chondrilla juncea L.

Planta vivaz, con roseta de hojas basales que suele secarse cuando se desarrolla el tallo florífero. Hojas lanceoladas, con el borde ampliamente dentado y con algunas protuberancias marginales de escasa consistencia. Tallos floríferos de color blanquecino con pequeñas espinas rígidas en su parte inferior, que posteriormente ramifica ampliamente dando ramas de aspecto junciforme de color verde, con pequeñas hojitas de forma linear, alargadas y estrechas. Flores son amarillas reunidas en capítulos paucifloros muy estrechos.

Según los estudios etnobotánicos realizados en España, concretamente en la Comunidad de Madrid y en la zona de Zamora y Salamanca, se emplean sus hojas basales o brotes tiernos con hojas (según la región) crudas en ensalada (González et al., 2010; Tardío et al., 2002, 2010).



Figura 5.1.4.- *Chondrilla juncea* (autor: J. Tardío)

***Cichorium intybus* L.**

Hierba perenne, cubierta de tricomas cortos. Consta de una potente raíz pivotante de la que todos los años en primavera brota una roseta de hojas caducas. Hojas basales lanceoladas, ampliamente dentadas hasta hacerse pinnatipartidas, con dientes agudos; hojas superiores enteras algo lobuladas, sésiles y que abrazan al tallo; tallos floríferos rígidos, de hasta 1 m de altura y con recorrido zigzagueante; capítulos con todas las flores liguladas de azul intenso, a veces blanquecinas.

En medicina tradicional los usos atribuidos a la achicoria, se deben a sus propiedades beneficiosas en el tratamiento de desordenes digestivos, como antihipertensivo, diurético y laxante suave, empleándose sus las hojas basales y en algunos casos los brotes tiernos de la achicoria en función del país o la región, actualmente únicamente se han realizado estudios etnobotánicos en Italia, Albania y España (Comunidad de Madrid y Granada). Por otro lado, desde el punto de vista culinario, de esta especie se emplean sus hojas basales cocidas en guisos (Guarrera et al., 2005; Pieroni, 2005; Tardío et al., 2006; Conforti et al., 2009; Benítez, 2010; Tardío et al., 2002, 2010).



Figura 5.1.5.- *Cichorium intybus* (autor: J. Tardío)

***Scolymus hispanicus* L.**

Planta herbácea perenne, que desarrolla una gruesa raíz. Hojas basales en roseta, con un largo y grueso pecíolo, tomentoso y frecuentemente coloreado de rojo. El limbo foliar es hendido, con marcas de color verde claro y bordes algo espinosos. Los tallos floríferos puede alcanzar hasta 1 m y tienen muchas hojas sésiles, alternas, rígidas y punzantes. Los capítulos están situados en las axilas de las hojas y protegidos por fuertes brácteas espinosas; Cada capítulo está constituido por numerosas flores liguladas de color fuertemente amarillo-anaranjando (Tardío et al., 2002).

Del cardillo, únicamente hay estudios etnobotánicos realizados en España (Comunidad de Madrid y la zona de Zamora y Salamanca), los cuales referencian que para el uso alimentario de esta especie se emplean sus hojas basales, previamente peladas, en guisos y/o rehogadas con aceite, o bien con huevos revueltos o en tortilla. A veces también se consumen crudas (González et al., 2010; Tardío et al., 2006, 2010).



Figura 5.1.6.- *Scolymus hispanicus* (autor: J. Tardío)

Silybum marianum (L.) Gaertn.

Planta anual muy vigorosa, con hojas basales de gran tamaño, alabeadas, de color verde oscuro con extensas vetas blancas en las nervaduras, y con el borde espinoso. Su gran inflorescencia es similar a una alcachofa, aunque las brácteas involucrales más externas presentan fuertes y largas espinas retrorsas. Sus flores son flosculosas de color rosa o púrpura, con cinco estambres soldados. Sus frutos son aquenios de 6 a 7 mm, de color oscuro, con un vilano simple y fugaz.

En gastronomía se emplean sus hojas basales previamente peladas, cocidas, tanto rehogadas, fritas, como en sopas (Pieroni et al., 2002a,b; Tardío et al., 2006, 2010).



Figura 5.1.7.- *Silybum marianum* (autor: J. Tardío y M. Molina)

***Sonchus oleraceus* L.**

Hierba anual, laticífera, que no alcanza los 2 m de altura, con hojas lampiñas, generalmente pinnado-lobuladas o pinnado-divididas, con lóbulos triangulares sin espinas o casi inapreciables, con el lóbulo terminal mayor que los laterales. Los capítulos presentan flores liguladas de color amarillo.

De esta especie se consumen sus hojas basales crudas en ensalada o cocinada a modo de guisos (Tardío et al., 2006; Pieroni et al., 2002 a,b; Cornara et al., 2009; Scherrer et al., 2005).



Figura 5.1.8.- *Sonchus oleraceus* (autor: M. Molina)

Taraxacum obovatum (Willd.) DC.

Hierba perenne, escaposa, laticífera, con una importante raíz carnosa. Hojas numerosas y pecioladas, dispuestas en una roseta basal, con forma de obovada a ovado-lanceolada, a veces enteras, pero generalmente dentadas, con los dientes desiguales dirigidos hacia la base, profundos, que llegan hasta el nervio; lampiñas o, a veces, tomentoso-aracnoideas en el nervio central. Los capítulos son floríferos solitarios en el extremo de tallos huecos de hasta 40 cm de longitud; todas las flores liguladas, de color amarillo dorado a azafranado, con el envés verdoso. Aquenios con un largo pico en cuyo extremo presentan vilano (Galán in Flora ibérica, vol. 16 inéd.; Tardío et al., 2002).

Desde el punto de vista culinario, se emplean sus hojas basales tanto crudas (como aperitivo o en ensalada), como cocidas (Pieroni et al., 2002 a,b; Cornara et al., 2002; Tardío, 2006, 2010; Pardo de Santayana, 2007).



Figura 5.1.9.- *Taraxacum obovatum* (autor: J. Tardío)

Familia Cucurbitaceae

Bryonia dioica Jacq.

Planta herbácea vivaz, con raíz tuberosa. Tallos trepadores volubles, de sección cuadrangular y más o menos tomentosos y fibrosos. Hojas de hasta 12 × 12 cm, pecioladas, similares a las de la vid aunque menos consistentes, palmatilobadas, acorazonadas en la base, con zarcillos muy retorcidos de hasta 15 cm, simples. Es una especie dioica, donde la inflorescencia masculina se presenta en racimos de hasta 17 flores y pedúnculos glandulosos; las femeninas, en corimbos de hasta 7 flores y pedúnculos glabros o glandulosos. Las flores masculinas presentan lóbulos calicinos de 3-4 mm, lanceolados y acuminados; corola de 8-13 mm con lóbulos que alternan con los anteriores, triangulares y glandulosos en su cara interna; mientras que las flores femeninas corolas de 3,5-6,5 mm con estilos de 3,5-4,5 mm (P. Catalán *in* Flora Ibérica, vol. 3, 1993; Tardío et al., 2002).

De dicha especie se consumen tradicionalmente sus brotes tiernos con hojas cocidos (guisados) salteados con aceite y vinagre o en sopas de ajo (Tardío et al., 2002; Pardo de Santayana et al., 2007; Carvalho y Morales, 2010)



Figura 5.1.10.- *Bryonia dioica* (autor: J. Tardío)

Familia Dioscoreaceae

Tamus communis L.

Hierba vivaz y perenne, glabra, con tubérculo de 20 cm o más de longitud, cilíndrico o irregular, de color oscuro. Tallos de hasta 4 m o más de altura, trepadores, volubles, cilíndricos, longitudinalmente estriados y ramificados. Hojas generalmente enteras, a veces notablemente trilobadas, agudas, de un verde brillante. Se trata de una especie dioica cuyas inflorescencias masculinas son ramificadas, laxas, de hasta 35 cm, plurifloras, mientras que las femeninas son más cortas, miden hasta 7 cm y son paucifloras; los tépalos de las flores masculinas miden $2-4,1 \times 0,7-1,6$ mm, y son de color verde amarillento; los tépalos de las flores femeninas miden $1,7-3 \times 0,5-1,5$ mm y son verdosos. Los frutos miden 0,6-1,5 cm de diámetro, son globosos o subglobosos y de un color rojo intenso en la madurez (Segarra & Catalán *in* Flora ibérica, vol. 21, 2005; Tardío et al., 2002).

Desde el punto de vista gastronómico, se emplean sus brotes tiernos cocinados en diferentes guisos, así como en tortillas (Tardío et al., 2002).

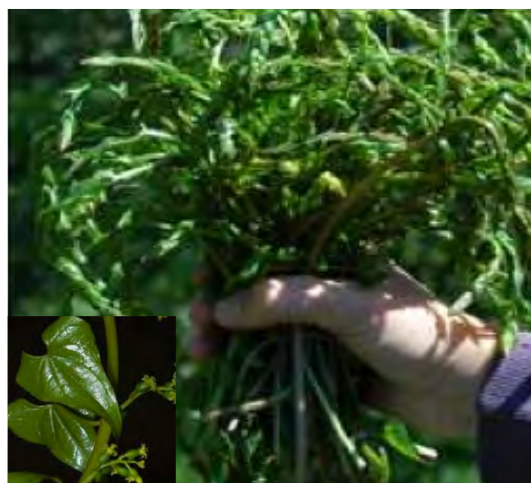


Figura 5.1.11.- *Tamus communis* (autor: J. Tardío)

Familia Liliaceae

Allium ampeloprasum L.

Planta vivaz de hasta 1 metro de altura, cuyos bulbos miden 13-43 x 11-45 mm. Son de esféricos a ovoides, solitarios; por lo general con 1 a 30-50 bulbillos de 4,7-8,5 x 3,5-6 mm, sésiles o cortamente pedunculados, con una túnica externa coriácea, lisa, de un color grisáceo. Su tallo es de 12 a 138 cm, de sección circular y macizo. Sus hojas están dispuestas a lo largo de la mitad inferior del tallo, son glabras y carecen de pecíolo. Inflorescencia en umbela de 23-90 x 24-90 mm, esférica o hemisférica, densa, con alrededor de 32-360 flores ovoides, a veces sustituidas parcialmente por bulbillos. Sus tépalos son más o menos ovados, obtusos o apiculados, en general presentan un gran número de papilas en el dorso y en los márgenes, blanquecinos, rosados o purpúreos, con el nervio medio de un color más intenso (Aedo *in* Flora ibérica, vol. 20 inéd.; Tardío et al., 2002).

Para el uso gastronómico de esta especie se emplea su bulbo y la parte inferior del tallo, consumiéndose crudo directamente o con ensalada, guisado y/o en tortilla a modo de revuelto (Tardío et al., 2002).



Figura 5.1.12.- *Allium ampeloprasum* (autor: M. Molina)

***Asparagus acutifolius* L.**

Planta perenne, arbustiva, con tallos leñosos en la parte inferior, de hasta 2 m de longitud. Posee un rizoma grueso y carnoso del cual brotan, generalmente en primavera, los nuevos tallos con hojas escamosas dispuestas en espiral, lo que vulgarmente se conoce como “espárragos”. Estos tallos al desarrollarse producen numerosas ramas, en las que las hojas, apenas perceptibles, son estrechas y escamosas y están acompañadas de numerosas espinas rígidas y cortas. Las flores son pequeñas, amarillas y pedunculadas y, tras la fecundación, desarrollan una baya esférica negra y tóxica.

La parte comestible, en este caso, son los brotes tiernos cocidos de ésta especie, en guisos o en tortilla y/o revuelto (Tardío et al., 2002).



Figura 5.1.13.- *Asparagus acutifolius* (autor: J. Tardío)

Familia Papaveraceae

Papaver rhoeas L.

Planta anual, hispida, rara vez glabrescente. Sus tallos miden de entre 7 a 100 cm, erectos, más o menos ramosos. Hojas de 0,5-25 × 0,1-15 cm, pinnatífidas, pinnatipartidas o 1-2 pinnatisectas, rara vez subenteras; segmentos foliares oval-lanceolados, más o menos acuminados, el terminal por lo general es 1 a 3 veces mayor que los laterales. Los pecíolos foliares y los tallos están cubiertos con pelos patentes blancos, amarillentos o purpúreos, raramente adpresos. Corolas con pétalos de 0,8-5 × 0,5-8 cm, suborbiculares, de color rojo intenso, raramente blancos, rosados o violáceos y con manchas basales purpúreo-negruzcas. Fruto en cápsula subglobosa, redondeada en la base, más o menos estriada, glabra o con tricomas esparcidos (Díaz González *in* Flora ibérica, vol. 1, 1986).

Se han realizado estudios etnobotánicos sobre el uso de esta especie, en diversos países de la cuenca mediterránea, principalmente en Italia, Argelia, Albania, Chipre y en España (Comunidad de Madrid y Granada). En alimentación, se emplean las hojas basales de la amapola cocinadas en diferentes guisos como la “minestra” y pasteles como es el “frittate” italiano y a veces crudas en ensaladas. Las semillas también se utilizan en panadería. En medicina tradicional, se puede emplear en problemas respiratorios, digestivos, contra sarampión y principalmente como somnífero y tranquilizante (Viegi et al., 2003; Pieroni, 2005; Scherrer et al., 2005; González-Tejero et al., 2008; Conforti et al., 2009; Benítez, 2010; Tardío, 2002, 2010).



Figura 5.1.14.- *Papaver rhoeas* (autor: M. Molina)

Familia Polygonaceae

Rumex papillaris Boiss. & Reut.

Planta vivaz, densamente papilosa o glabrescente, de hasta 100 a 120 cm de longitud, con tallos numerosos, erectos, simples y estriados. Sus hojas basales miden entre 25-165 × 6-45 mm, con limbo oblongo u oblongo-lanceolado, más o menos carnosas; sus lóbulos basales generalmente son divergentes, bífidos; presentan pecíolos igual o más largo que la lámina; hojas caulinares oblongas u oblongo-trianguulares, las medias y superiores son subsésiles. Las inflorescencias son oblongas, con ramas medias e inferiores repetidamente ramificadas, y las inferiores a veces son distantes. Las flores masculinas y femeninas son pequeñas y verdosas, agrupadas en racimos abiertos y laxos. Los frutos son secos, monospermos, nucciformes, de sección triangular y rodeados de tres valvas membranosas (López González *in* Flora ibérica, vol. 2, 1990; Tardío et al., 2002).

Las hojas basales de esta especie se consumen, tanto crudas a modo de aperitivo o en ensaladas (Tardío et al., 2002).

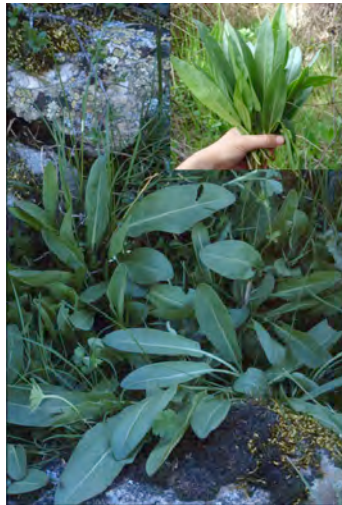


Figura 5.1.15.- *Rumex papillaris* (autor: J. Tardío)

***Rumex pulcher* L.**

Planta vivaz, perenne, de hasta 60 a 80 cm de longitud, papilosa en los pecíolos y nervios de las hojas (envés foliar). Los tallos son erectos, surcado-estriados, más o menos flexuosos. Hojas basales de 10-200 × 5-60 mm, ovado-oblongas o lanceolado-oblongas, algo carnosas, redondeadas o subcordadas en la base; los márgenes foliares son, con frecuencia, ondulados; las primeras hojas (externas) generalmente son panduriformes. La inflorescencia es laxa, con ramas divaricadas, arqueadas o flexuosas; las inferiores a veces son ramosas; las piezas externas del perianto fructífero miden entre 1,5 a 2 mm con valvas de ovado-triángulares u ovado-oblongas a ovado-orbiculares, gruesas, y con nervadura muy gruesa y prominente. Frutos secos, monospermos, nucciformes, de 2 a 3,5 mm y color pardo-rojizo oscuro (López González *in* Flora ibérica, vol. 2, 1990; Tardío et al., 2002). Según los estudios etnobotánicos realizados sobre la romaza en España (Comunidad de Madrid y la zona de Zamora y Salamanca), para uso culinario, se emplean sus hojas basales que se consumen cocinadas en diferentes guisos con otros vegetales, sopas, como condimento en salsas, etc. (González et al., 2010; Tardío et al., 2002, 2010).



Figura 5.1.16.- *Rumex pulcher* (autor: J. Tardío)

Familia Portulacaceae

Montia fontana L.

Hierba anual o vivaz de hábitat anfibio, con tallos generalmente de 5 a 50 cm, ramificados en los nudos inferiores y con ramas muy delgadas. Sus hojas miden 3-20 × 1,5-6,5 mm, son uninervias, oblongo-espátuladas o linear-espátuladas, de ordinario redondeadas en el ápice, atenuadas en la base y con margen hialino. Las inflorescencias son cimas terminales y laterales con flores muy pequeñas, de color blanco y reunidas en grupos terminales o laterales; la flor consta de 3 sépalos de 0,75-1 mm de longitud, ovados u ovado-orbitulares, redondeados en el ápice, persistentes; corola de 5 pétalos, desiguales, 1,6-2 × 0,4-0,5 mm, ovados, unidos en la base formando un tubo de 0,25 mm y redondeados en el ápice. El fruto es una cápsula subglobosa de 1,5-2 mm de diámetro (Paiva & Villanueva *in* Flora ibérica, vol. 2, 1990; Tardío et al., 2002).

Se consumen los tallos tiernos con hojas de esta especie, tanto crudas, en ensalada, como cocinada en guisos (Tardío et al., 2002; Carvalho y Morales, 2010). Desde el punto de vista medicinal, se emplea por sus propiedades diuréticas y antirreumáticas (Carvalho y Morales, 2010).



Figura 5.1.17.- *Montia fontana* (autor: M. Molina)

Familia Chenopodiaceae

***Beta maritima* L.**

Hierba perenne, anual, glabra o ligeramente hirsuta. Tallos de 20 a 80 cm, ramificados, a veces desde la base, postrados o erectos. Hojas de 3-12 × 1,5-8 cm, ovado-rómbicas o lanceoladas, cuneadas; las hojas inferiores están claramente pecioladas y presentan el margen algo crespado; las superiores son pequeñas y subsésiles. Su inflorescencia es espiciforme, a veces muy ramificada, constituida por glomérulos axilares de 1-8 flores; brácteas floríferas lanceoladas o lineares, menores que los glomérulos e incluso poco perceptibles hacia el ápice. Las flores son muy pequeñas, de 1,5-3 mm de diámetro, con 5 tépalos verdosos o rojizos, con margen escarioso estrecho, aquillado y de ápice incurvo (Gutiérrez Bustillo *in* Flora ibérica, vol. 2, 1990; Tardío et al., 2002).

La mayoría de los estudios etnobotánicos sobre la acelga silvestres han sido realizados en Italia, seguido de en España únicamente encontramos estudios en la Comunidad de Madrid, Zamora/Salamanca y en Granada, y Chipre, en ambos países tradicionalmente se consumen sus hojas basales cocinada, en tortilla o como ingrediente en la “minestra”, en el caso de Italia, otro de los usos aplicados a ésta especie desde el punto de vista de la medicina tradicional, empleándose en el tratamiento de problemas digestivos, dolor de garganta, quemaduras y abscesos, así como en el tratamiento de la anemia (Pieroni et al., 2002a,b; Scherrer et al., 2005; Guarrera et al., 2005; González-Tejero et al., 2008; González et al., 2010; Benítez, 2010; Tardío et al., 2002, 2010).



Figura 5.1.18.- *Beta maritima* (autor: J. Tardío)

Familia Apiaceae

Apium nodiflorum (L.) Lag.

Planta herbácea perenne, glabra. Tallos de hasta de 100 cm de longitud, con nudos inferiores prostrados y enraizantes, pero erectos en el resto, finamente asurcados. Hojas compuestas, imparipinnadas, con 3 a 13 segmentos sésiles, de 0,3-10 cm, lanceolados u ovados, serrados o crenados, a menudo algo lobados. Las flores son diminutas con pétalos blanquecinos, agrupadas en umbelas compuestas, y opuestas a las hojas, con 3 a 15 radios de 0,3-2 cm, subiguales, y con pedúnculos de 1 a 8 mm, mucho más cortos que los radios. Sus umbélulas forman radios de 1 a 2 mm en la fructificación y presentan de 5 a 7 bracteólas (Knees *in* Flora ibérica, Vol. 10, 2003; Tardío et al., 2002).

Para el uso alimentario y gastronómico de esta especie, se emplean sus hojas basales crudas en ensaladas (Tardío et al., 2006).



Figura 5.1.19.- *Apium nodiflorum* (autor: M. Molina)

***Foeniculum vulgare* Mill.**

Planta vivaz, perenne, aromática, de olor y sabor anisado, cuyos tallos de 50 a 250 cm, son erectos, estriados, sólidos, ramificados en la mitad superior, glaucos, glabros y sin restos fibrosos en la base. Sus hojas basales y medias miden entre 10×35 cm, 3 a 4-pinnatisectas, de contorno triangular, pecioladas, glabras, ampliamente divididas, con divisiones de último orden 5-40 × 0,3-0,6 mm, lineares; las hojas superiores se reducen a un pequeño apéndice más corto que la vaina y son glabras. Sus flores son minúsculas de color amarillo, en umbelas compuestas terminales y laterales, con 2 a 44 radios de 2-7,5 cm, desiguales y glabros, que constan de 12 a 40 radios de 2 a 10 mm, glabros. Los frutos, de 3-9 × 2-2,5 mm, son ovoides y glabros (Aedo *in* Flora ibérica, Vol. 10, 2003; Tardío et al., 2002).

Del hinojo se puede consumir tanto sus hojas y tallos (parte aérea) como sus semillas, tanto de forma cruda, aperitivos y en ensaladas, como previamente cocinado, formando parte de diferentes guisos italianos como “risotto”, “minestra”, pastel “castagneccio” (semillas), “pasnoti” y “gattatin”, así como aromatizante en el aceite de oliva, diferentes licores y tés. Desde el punto de vista medicinal, se puede emplear frente a problemas gastrointestinales, en forma de infusión, como sedante, empleándose la parte apical de los tallos, así como en problemas dermatológicos, respiratorios y mentales (Pieroni et al., 2002; Viegi et al., 2003; Scherrer et al., 2005; Pardo-de-Santayana, 2007; González-Tejero, 2008; Conforti et al., 2009; Cornara et al., 2009; Carvalho y Morales, 2010; González et al., 2010; Tardío et al., 2002, 2010).



Figura 5.1.20.- *Foeniculum vulgare* (autor: M. Molina)

6. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Como se ha indicado anteriormente, de cada una de las muestras analizadas se recolectaron al menos 500 gramos de porción comestible a partir de al menos 25 individuos distintos, escogidos al azar en cada temporada y zona de muestreo.

Las plantas recién recolectadas se limpiaron “in situ” en la forma habitual separando la parte comestible (en el caso de *Scolymus hispanicus* y *Silybum marianum*, se pelaron convenientemente, dejando sólo la vaina comestible). Que se transportó en un plazo de tiempo inferior a 24 h, y manteniendo la cadena de frío al laboratorio de análisis, donde se procedió a la trituración y homogeneización de las mismas en estado fresco. Una parte del producto homogeneizado se empleó para las determinaciones físico-químicas (humedad, pH y acidez titulable), así como la vitamina C en sus dos formas activas (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico).

Por otro lado, parte del producto fresco se sometió a liofilización, protegido de la luz para asegurar su conservación durante el período de tiempo necesario para completar todos los análisis. Las muestras liofilizadas se trituraron y homogeneizaron guardándose en recipientes herméticos en oscuridad, y a -20°C para evitar la alteración del producto. A partir de estos productos liofilizados, se preparó una muestra compuesta de cada especie, conteniendo cantidades iguales del material de cada año y de cada una de las localidades sujetas al estudio, empleadas en algunas de las determinaciones.

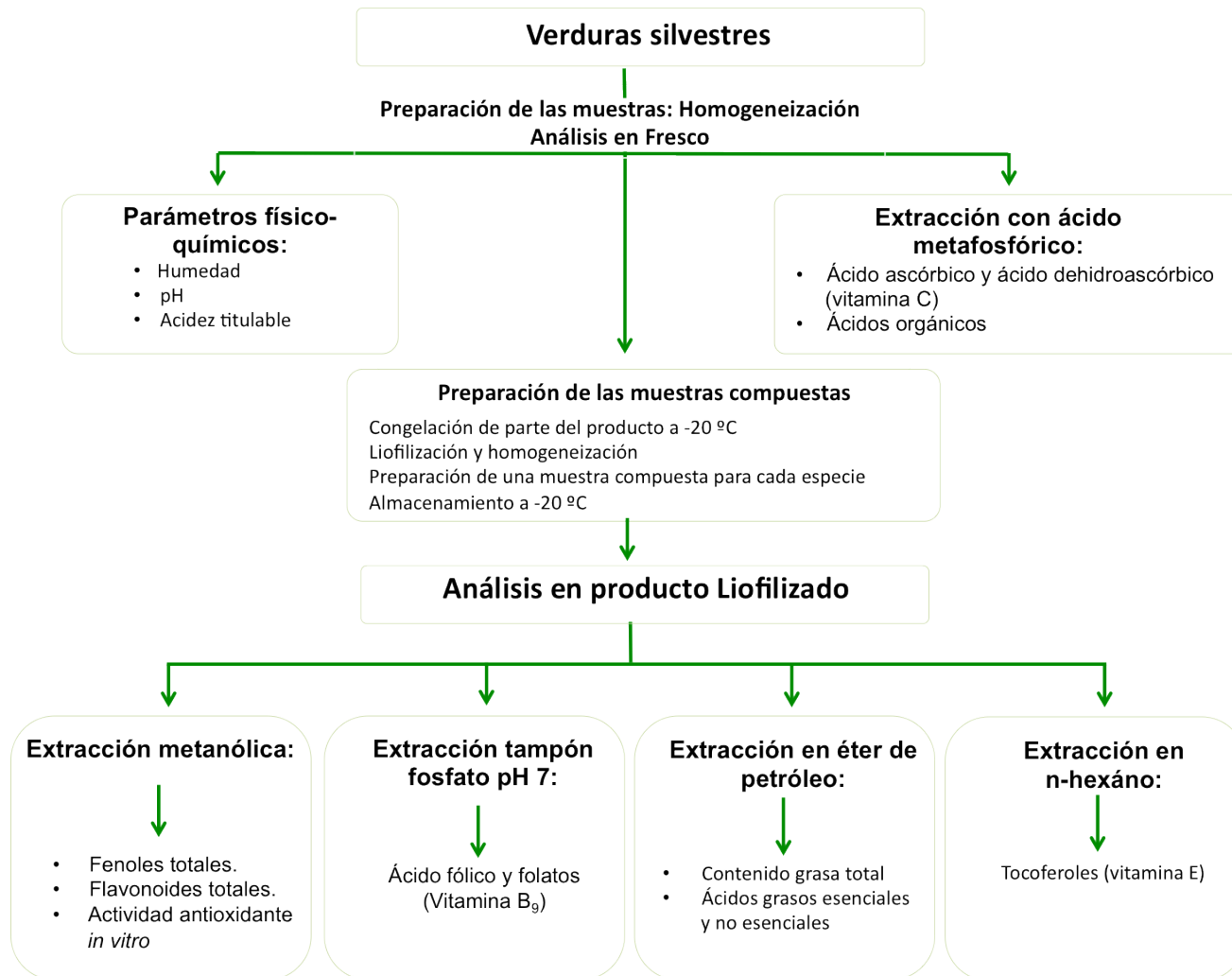


Figura 6.1.- Esquema del plan de trabajo

6.1. Humedad

Se determinó por desecación en estufa a 105 °C (984.25-AOAC, 2005): se pesaron 5 g de muestra fresca en cápsulas previamente desecadas y taradas, y se llevó a estufa de desecación a 105 °C, durante 6 - 7 horas, hasta la total eliminación del agua presente en la muestra (pesada constante). El contenido de agua en las muestras objeto de estudio se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (g/100 g)} = [(P' - P'') / (P' - P)] \times 100$$

Donde:

$$\left\{ \begin{array}{l} P = \text{Peso (g) de la cápsula vacía.} \\ P' = \text{Peso (g) de la cápsula + muestra fresca.} \\ P'' = \text{Peso (g) de la cápsula + muestra desecada.} \end{array} \right.$$

6.2. pH

Se llevó a cabo la medida potenciométrica en pHmetro modelo MicropH-2000 (Crison Instruments). El equipo se ajustó con las disoluciones tampón de pH 4 y 7 a la temperatura de trabajo; a continuación se efectuó la lectura del pH de la muestra. Para ello se tomó una cantidad de unos 5 g de muestra homogeneizada y se diluyó con 50 ml de agua; se mezcló y se dejó reposar 10 minutos para medir a continuación el pH (981.12 A.O.A.C., 2005).

6.3. Acidez titulable

Se valoró de la acidez debida a los ácidos presentes en la muestra por volumetría ácido-base (942.15-A.O.A.C., 2005). A partir de la mezcla preparada para medir el pH (5g de muestra homogeneizada diluidos con agua destilada) se neutralizó la acidez con NaOH N/10 de factor conocido, valorando por potenciometría hasta pH de 8,1. La acidez se expresó como ml de NaOH 0,1N necesarios para neutralizar los ácidos presentes en 100 g muestra fresca.

6.4. Determinación del contenido de vitamina C y ácidos orgánicos

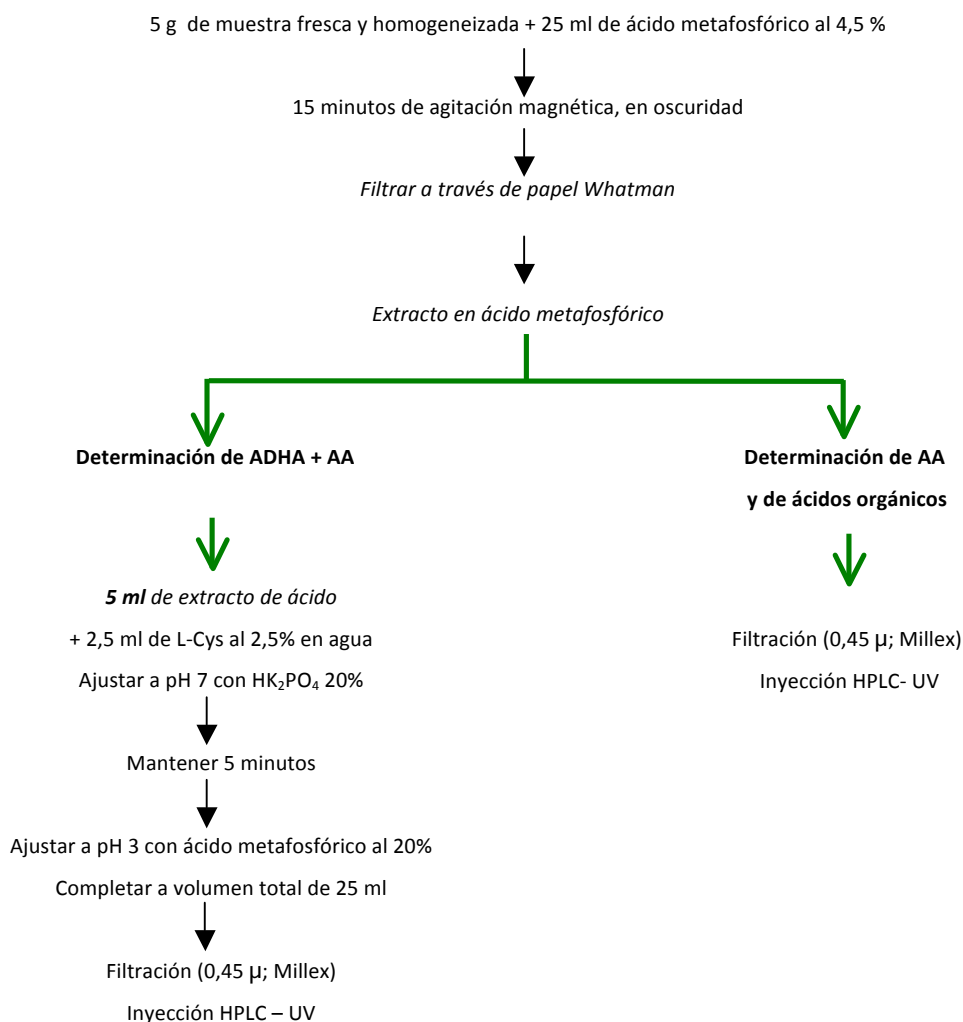
La vitamina C puede presentarse en los alimentos en forma de ácido L-ascórbico (AA) ó en su forma oxidada, como ácido dehidro L-ascórbico (ADHA), con la misma actividad vitamínica (Garad, 1970). En las muestras seleccionadas, se llevó a cabo la determinación tanto del ácido ascórbico como de la vitamina C total, calculándose por diferencia el contenido de ácido dehidroascórbico. En estudios relacionados con la vitamina C, muy a menudo sólo se hace referencia al contenido de AA, con la consiguiente subestimación de la actividad total de vitamina C; o bien al contenido global de la vitamina C, sin tener por tanto información sobre la distribución de ambas formas (AA y ADHA). La determinación por separado de AA y DHAA en los alimentos proporciona información completa sobre el perfil de la vitamina C, teniendo en cuenta que la forma reducida de la vitamina C (AA) es la forma más estable en los tejidos biológicos, y a la que se le atribuye los efectos antioxidantes (Schaffer et al., 2005; Vardavas et al., 2006b).

En las muestras, se llevó a cabo la extracción de la vitamina C en medio ácido y posterior separación del ácido ascórbico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección UV (Vázquez *et al.*, 1994; Sánchez-Mata *et al.*, 2000). Dado que el ADHA, prácticamente no absorbe en el UV, para su cuantificación por esta técnica, es necesario la reducción del ADHA a AA, utilizándose para ello diversos agentes reductores,

como L-cisteína (Arella *et al.*, 1997), homocisteína (Petersen y Berends, 1993), ditioneitol (Esteve *et al.*, 1997), u otros compuestos con grupos tioles. En el presente trabajo se escogió la L-cisteína como agente reductor del ADHA, por su rapidez y eficacia de reducción, llevándose así a cabo la determinación de la vitamina C total.

El método empleado para la extracción y determinación de la vitamina C se muestra en el esquema siguiente (esquema 1).

Esquema 1.- Extracción y determinación de vitamina C (AA) y ácidos orgánicos (AO)



A la cantidad de AA obtenido tras la reducción con L-cisteína, es decir al valor que representa el contenido total de Vitamina C (AA y ADHA) se restó la cantidad de AA presente de forma natural en la muestra, obteniéndose con ello, por diferencia, el dato correspondiente a la cantidad de ADHA presente en las muestras vegetales estudiadas.

Tabla 6.4.1.- Equipo y condiciones cromatográficas para la determinación de AA, ADHA y AO

Equipo cromatográfico para la determinación del AA, ADHA y AO:	
<ul style="list-style-type: none"> • Bomba isocrática: Mod. PU II (SMI). • Inyector automático: Jasco.mod AS-1555. • Columna Sphereclone ODS (2), 5 µm; 4,6 x 300 mm (Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.). • Detector: UV-visible detector (Thermo Separation Spectra Series UV100). • Software: Cromanec XP (Micronec, Spain). 	
Condiciones cromatográficas AA y ADHA	Condiciones cromatográficas AO
<ul style="list-style-type: none"> • Fase móvil: H₂SO₄ 1,8 mM, pH de 2,5 a 2,6. • Flujo: 0,9 ml/min. • Longitud de onda de trabajo: 245 nm. • Temperatura: Ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fase móvil: H₂SO₄ 1,8 mM, pH de 2,5 a 2,6. • Flujo: 0,4 ml/min. • Longitud de onda de trabajo: 215 nm. • Temperatura: Ambiente.

La figura 6.4.1 muestra el perfil cromatográfico y la recta de calibrado de una solución patrón de vitamina C, observándose el pico del AA a un tiempo de 4,50 minutos.

La cuantificación del ácido ascórbico presente en las muestras se realizó comparando las áreas obtenidas para las muestras analizadas con las obtenidas a partir de la recta patrón preparada diariamente.

La recta de calibrado se preparó diariamente a partir de una disolución madre de ácido ascórbico en ácido metafosfórico con una concentración de 1 mg/ml, dada la gran variabilidad del contenido de AA en las muestras problema se realizaron varias rectas con diferentes rangos de concentraciones, entre concentraciones finales de entre 10 a 200 $\mu\text{g/ml}$ (figura 6.1.1).

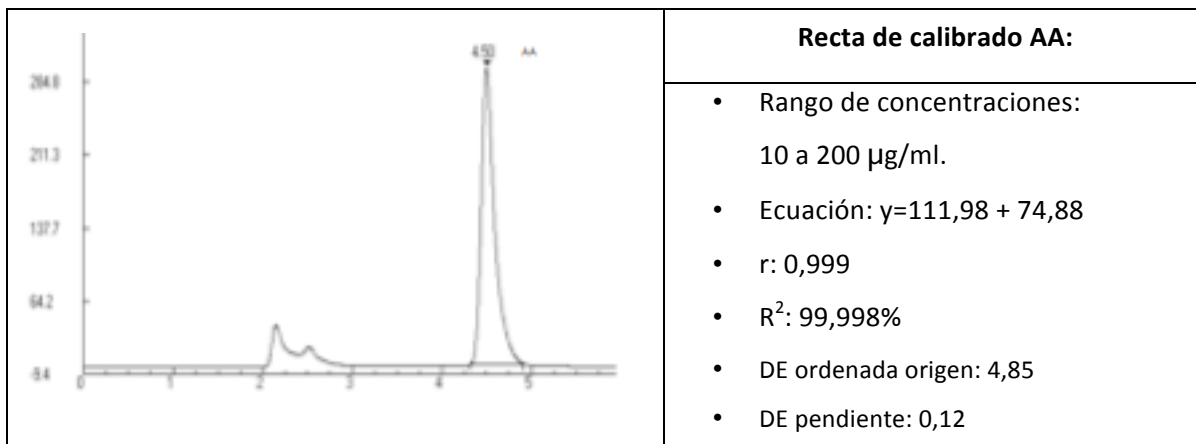


Figura 6.4.1.- Perfil cromatográfico de solución patrón de vitamina C y recta de calibrado del patrón de vitamina C (AA)

DE (Desviación estandar).

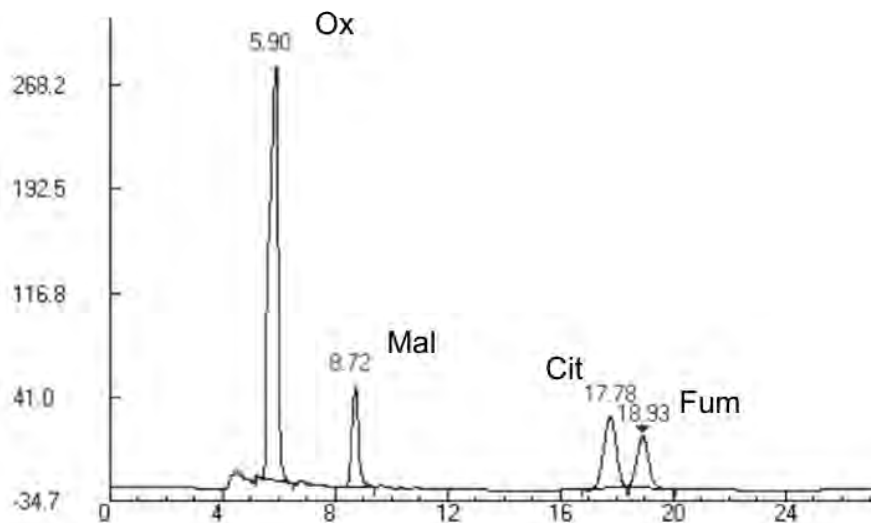
Respecto a los ácidos orgánicos, a partir de la información bibliográfica consultada, sobre las posibles rutas metabólicas de los vegetales (ciclo de Krebs, ciclo del ácido cítrico y el del ácido sikimico), se estudio la posible presencia de los siguientes ácidos orgánicos en las muestras, mediante el análisis de soluciones de patrones externos:

Tabla 6.4.2.- Relación de ácidos orgánicos estudiados y sus correspondientes tiempos de retención en las condiciones cromatográficas aplicadas

Ácido Orgánico	Tiempos de retención (min)
Ácido oxálico	5,90
Ácido glutámico	6,66
Ácido tartárico	7,12
Ácido oxalacético	7,32
Ácido quínico	7,43
Ácido málico	8,72
Ácido isocítrico	9,44
Ácido sikímico	9,45
Ácido malónico	9,46
Ácido salicílico	9,49
Ácido ascórbico	9,57
Ácido oxoglutarico	9,93
Ácido <i>keto</i> -glutarico	10,00
Ácido <i>pyro</i> -glutarico	16,44
Ácido cítrico	17,78
Ácido fumárico	18,93
Ácido succínico	19,84
Ácido gálico	40,99
Ácido glutámico	41,84

En las condiciones de análisis, se pudieron identificar y cuantificar en las muestras analizadas los siguientes ácido orgánicos: ácido oxálico, ácido glutámico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido fumárico y el ácido succínico. La figura 6.4.2 muestra el perfil cromatográfico de una solución patrón múltiple y las rectas de calibración de los ácidos orgánicos estudiados.

Perfil cromatográfico patrón múltiple AO



Ácido oxálico (Ox), Ácido málico (Mal), Ácido cítrico (Cit) y Ácido fumárico (Fum).

	Recta de calibrado ácido oxálico:	Recta de calibrado ácido glutámico:	Recta de calibrado ácido málico:	Recta de calibrado ácido cítrico:	Recta de calibrado ácido fumárico:	Recta de calibrado ácido succínico:
Rango de concentraciones:	20 a 120 µg/ml	20 a 120 µg/ml	20 a 120 µg/ml	20 a 120 µg/ml	20 a 120 µg/ml	20 a 120 µg/ml
Ecuación:	$Y = 218,51x + 366,98$	$y = 374,36x + 21,50$	$Y = 248,28x + 41,33$	$Y = 187,89x + 57,49$	$Y = 188,28 + 39,67$	$Y = 687,27 + 115,60$
r:	0,9984	0,99981	0,9981	0,9998	0,9987	0,9975
R ² :	99,84%	99,98%	99,81%	99,98%	99,87%	99,75%
DE ordenada origen:	635,71	34,33	98,04	71,55	78,44	280,21
DE pendiente:	8,65	0,42	1,33	1,15	1,06	4,50

Figura 6.4.2.- Rectas de calibración de los ácidos orgánicos identificados en las muestras problema (DE: desviación estándar)

6.5.- Determinación de ácido fólico y folatos: Vitamina B₉

La determinación del ácido fólico y folatos en los alimentos es muy compleja, debido al amplio grupo de compuestos que se engloban bajo este nombre. Los distintos folatos se diferencian entre sí por el anillo de pteridina, que puede presentar varios tipos de sustituciones y en varios estados de oxidación. A su vez, en el residuo de p-aminobenzoglutamato, puede presentar un número variable de restos de glutamato unidos mediante enlace peptídico; los más frecuentes en los alimentos son los mono-, di-, penta- y hexaglutamatos (Scott, 1999; Varela, 1999).

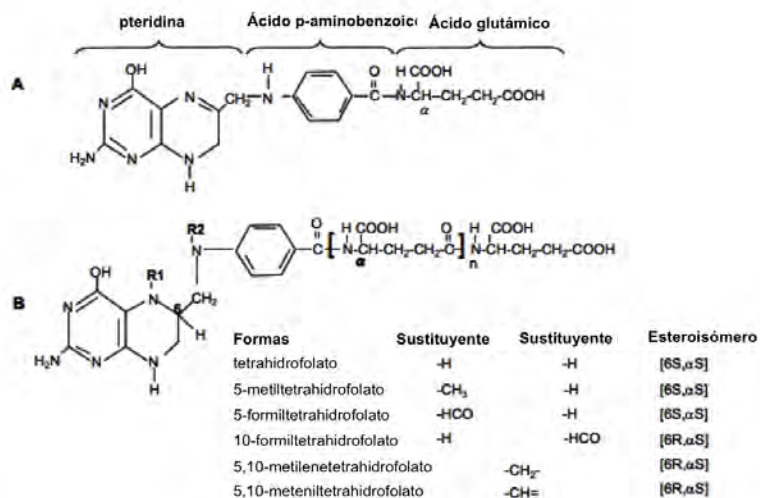


Figura 6.5.1.- Estructura del ácido fólico (A) y sus derivados (B) (FAO, 2001)

Dependiendo de la muestra, así como de la naturaleza y el propósito del ensayo, los métodos de análisis para el ácido fólico y sus análogos se pueden agrupar en determinaciones biológicas, microbiológicas, cromatográficas y químicas (cuadro 6.5.1).

Cuadro 6.5.1.- Ventajas y desventajas de los diferentes métodos para la determinación de folatos (Arcot y Shrestha, 2005)

Método	Ventajas	Limitaciones
Microbiológicos	Bajo coste, respuesta similar para todos los isómeros (folatos); gran sensibilidad (concentraciones inferiores a nanogramos).	No específico, interferencias de otros compuestos; requiere instalaciones adecuadas.
HPLC	Gran especificidad, permite identificación de todos los isómeros (folatos) de forma independiente.	Elevado coste de equipos, patrones de los diferentes isómeros (folatos). Gran complejidad de preparación de las muestras, requiere purificación por SPE/SAX o FBP.
Inmunoensayos	Rapidez, relativamente barato, gran especificidad.	Posible variación de resultados en función del Kit empleado, corta vida media de los kits, no permite cuantificar poliglutamatos, respuesta individual para monoglutamatos puede variar.

Aunque los métodos microbiológicos, que miden la cantidad de folato presente en las muestras en función de la velocidad de crecimiento microbiano, han sido muy empleados en el pasado, en la actualidad ha caído en desuso debido a su baja especificidad, ya que el crecimiento microbiano también puede verse estimulado o inhibido por otras sustancias diferentes al ácido fólico (Arcot y Shrestha, 2005).

Actualmente se emplean preferentemente los métodos cromatográficos (HPLC), pero a su vez existen diferentes modalidades en función del equipo disponible (HPLC-Diod Array; HPLC-Fluorescencia; HPLC-UV y/o LC-espectrofotometría de Masas), de los compuestos a objeto de estudio y del propósito del ensayo. Mediante estas técnicas cromatográficas se pueden separar y analizar las diferentes formas del ácido fólico presentes en los

alimentos, de modo que se pueden cuantificar los distintos derivados del ácido pteroilglutámico (5-MTHF; 5,10-MTHF; 5-CHOTHF; 5,10-CHOTHF), generalmente en forma de monoglutamatos; o bien analizarse una única forma, normalmente el 5MTHF, con diferencia del número de glutamatos (mono-; di-; etc). Para ello será necesario el tratamiento enzimático que permita la hidrólisis de los poliglutamatos presentes en el alimento en mono o diglutamatos, así como la transformación de todas las formas reducidas en un único compuesto (derivatización). Por lo que los métodos previos de preparación de la muestra, serán diferentes en función de las formas de folatos que se desee evaluar.

Se trata, por tanto de métodos analíticos de gran complejidad, y con muchas variantes, como puede comprobarse en el Cuadro 6.5.2.

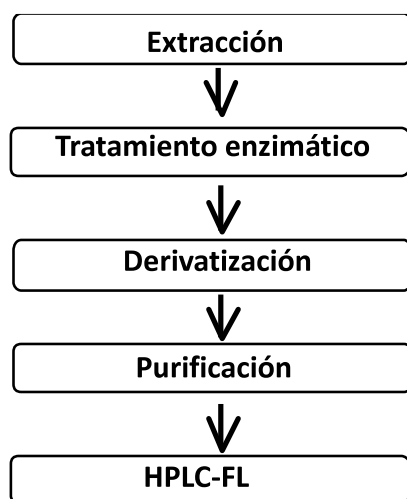
Cuadro 6.5.2a.- Revisión bibliográfica de la metodología determinación del ácido fólico y sus folatos

Compuestos	Extracción	Deconjugación	Purificación	Fase Móvil	Gradiente	Columna	Detector	Tiempo de retención	Referencia
5MTHF	Tampón fosfato 0,1 M; pH 6,0	Tri-enzimático: α -amilasa + Proteasa + deconjugasa (suero de rata)	SPE/SAX; Eluyente: tampón fosfato 0,1M + NaCl 1M + ACN 25% + 2mercapto-etanol 10 mM + AA 10 mM; pH 6	Tampón fosfato 33mM (pH 2,2)/ACN; Flujo: 0,8 ml/min	100% 5min; 80/20 20min; 70/30 5 min; 100% 10min	Adsorbosphere HSC18	FL	5MTHF (21 min)	Phillips et al., 2005
THF, 5-MTHF	Tampón potásico 0,1M + Mercaptoetanol 10mM + AA 10mM + 10 mg/L Azida sódica. pH 6	Plasma de rata o plasma humano	SPE/SAX Eluyente: tampón fosfato 0,1 M + NaCl 1M en 250 ml/l ACN; pH 6,	Tampón fosfato 30mM (pH 2,2)/ACN	99/1 isoc 5 min 80/20 grad 20 min 60/40 grad 5 min 99/1 isoc 5min	Adsorbosphere C18 HS	FL	THF (20 min) 5-MTHF (15min)	Doherty et al., 2003
THF; 5MTHF	Tampón fosfato + 1% AA + 0,1 % BAL; pH 6,1.	α -amilasa + deconjugasa (suero de rata)	SPE/SAX; Eluyente acetato sódico : 0,1 mol/l + NaCl 10% + AA 1% + 2,3 dimercapto-1-propanol 0,1% (BAL)	Tampón fosfato 30mM (pH 2,3)/ACN; Flujo: 0,4 ml/min	94/6 isoc 5 min; 75/25 grad 20 min	Zorbax SB c8 column	FL	THF (15min), 5MTHF (16min),	Holte Stea et al., 2006
THF; 5MTHF; 5CHO-THF; 10CHO-THF		Tri-enzimático: α -amilasa + Proteasa + Suero de Rata				Thermo Electron-Corporation AquasilC18 column	FL; UV; PDA; LC-Mass		Johansson et al., 2008
THF 5-MTHF 5-CHO-THF	Tampón fosfato K_2HPO_4 (75 mM) + AA 52mM + 0,1% 2-mercaptoetanol; pH 6	Deconjugasa: Riñón de cerdo pH 4,9	SPE/SAX; Eluyente: NaCl (10%) + acetato sódico (1%)	ACN/ tampón 30mM; pH 2,2; Flujo: 0,8 ml/min	90/10 isoc 4 min; 76/24 grad 8 min 76/24 isoc 3 min; 90/10	Shandon Hypersil ODS	FL (240nm-356nm); UV (290 nm)	THF: 9 Min 5-MTHF: 11min 5-CHO-THF: 12 min	Vahteristo et al., 1996a
				Flujo: 0,5 ml/min	91/9 grad isoc 75/25 grad 14 min	Spherisorb ODS		THF: 20min 5-MTHF: 22,5min 5-CHO-THF: 26 min	Vahteristo et al., 1996b
THF, 5MTHF, 5CHO-THF	Tampón fosfato 0,1 M + AA 2% + 2-mercaptoethanol 0,1 %. pH=6,1	Deconjugasa: Riñón de cerdo	SPE/SAX Eluyente: acetato sódico 0,1 mol/l + NaCl 10% + AA 1% + 2mercapto-etanol (0,1%)	Tampón fosfato 33mM (pH 2,3)/ACN; Flujo: 0,4 ml/min	94/6 Isoc 5min; 75/25 grad 20 min	Lichrospher 100 RP-18 o Zorbax SB C8	FL	THF (16min), 5-MTHF (17min), 5CHO- H_A -folato (22min)	Jastrebova et al., 2003
THF, 5MTHF, 5CHO-THF	Según Vahteristo, et al., 1996a	Deconjugasa: Riñón de cerdo	SPE/SAX; Eluyente: acetato sódico 0,1 M + NaCl (10%) + AA 1%	Tampón fosfato 33mM (pH2,2)/ACN; Flujo: 0,8 ml/min	90/10 4min isoc; 85/15 8 min grad; 90/10 3min	Tracer Extrasil ODS2; Precolumna: TR-C160-1 ODS	FL	THF (5min), 5MTHF (6min), 5CHO-THF (8min)	Rodríguez-Bernardo de Quiros et al., 2004
THF; 5MTHF; 5-CHO-THF; 10-CHO-THF; PteDiglutamato	Tampón HPES (50 mmol/l), CHES (50mmol/l) + AA 2% + mercaptoetanol 10 mmol/l; pH 7,85	Tri-enzimático: α -amilasa + proteasa + deconjugasa (suero de rata)	Columnas de afinidad con FBP; Eluyente: 1 M piperacina + AA 0,2% + 2-mercaptoetanol 10mM	Tampón fosfato 33 mM (pH 2,3)/ACN; flujo: 1 ml/min	95/5 isoc 8 min; 82,5/17,5 grad 25 min.	Phenomenex Ultramex C18	PDA	THF (27 min); 5MTHF (21,1 min); 10-CHO-THF (21,9); 5-CHO-THF (84,7 min).	Pfeiffer et al., 1997
THF 5MTHF (1-8) 10-CHO-PteGlu 5-CHO- H_A PteGlu PteGlu	Tampón fosfato 100mM + AA 1%; pH 7	Tri-enzimático: α -amilasa + Proteasa + deconjugasa (Suero de Rata o riñón de cerdo o páncreas de pollo)	Columna de afinidad con FBPs; Eluyente: trifluoroacetico 20 mM + ditioeritritol 20 mM + AA (25%) + KOH (600 g/l)	Tampón fosfato 33mM (pH 2,2)/ACN; Flujo: 0,8 ml/min	100/100 isoc; 90/10 15min; 80/20 5min grad; 80/20 isoc 5 min; 100/100 isoc 20 min	Lichrospher 100 RP-18 endcapped precolumna: RP 18	FL	5-MTHF-Glu (20 min); 5-MTHF-Glu ₂ (16,5 min)	Ndaw et al., 2001

En el presente trabajo se ha seleccionado el método de HPLC-FL para la determinación de ácido fólico y folatos en las plantas objeto de estudio, por su sensibilidad y especificidad.

Por todo lo anteriormente expuesto, la determinación de ácido fólico en los alimentos por HPLC-FL debe incluir las siguientes fases:

Esquema 2.- Fases del proceso determinación ácido fólico en alimentos



6.5.1.- Proceso de extracción

Según los trabajos de otros autores, se probaron diferentes tampones para optimizar las condiciones de extracción:

- Tampón fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 100 mM, a pH 4,4
- Tampón fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), 100 mM, a pH 7
- Triz-Buffer, 66 mM, a pH 7,8.

Del mismo modo, se estudiaron diferentes temperaturas de extracción (37º, 80º y 100º C). Se comprobó que los mayores rendimientos de extracción se obtenían mediante el

tampón fosfato de pH 7, a 80°C. Esta temperatura permitió desnaturalizar las proteínas y romper los sistemas celulares liberando los folatos. Se prefirió el empleo de pH neutro dado que se ha descrito que los pH ácidos conjuntamente con el tratamiento térmico pueden degradar los folatos presentes en los alimentos (Quinlivan et al., 2006).

Así, la extracción de los pteroil-poliglutamatos se realizó según el siguiente esquema.

Esquema 3.- Proceso de extracción de folatos

0,8 g muestra liofilizada + 25 ml tampón fosfato 100 mM (pH 7)



Incubación a 80°C durante 15 min.



Centrifugación 7000 rpm (15 min)

6.5.2.-Tratamiento enzimático

Tal y como se ha indicado anteriormente, la preparación y tratamiento de las muestras está condicionada por el tipo de compuesto que se desee analizar, si se desea evaluar las diferentes formas de reducción en las que se puede presentar los folatos (figura 6.5.1), dejando fijo el número de glutamatos unidos a la molécula, será necesario aplicar un tratamiento enzimático a las muestras para hidrolizar los diferentes poliglutamatos presentes en los alimentos hasta monoglutamatos y/o diglutamatos.

Para la deconjugación de los diferentes poliglutamatos existen dos tipos de deconjugasas (Quinlivan et al., 2006):

- Exopeptidasas: únicamente hidrolizan los glutamatos terminales, dando lugar a monoglutamatos como producto final, como es el caso de las enzimas de suero de rata, plasma humano y el riñón de cerdo.

- Endopeptidasas: hidrolizan enlaces entre glutamatos internos, dando lugar a diglutamatos, como es el caso de la deconjugasa del páncreas de pollo.

El rendimiento de la reacción no es el mismo para ambos sistemas, estando muy condicionado por el pH del medio, de modo que el pH óptimo para pteroilpoli- γ -glutamato hidrolasa del plasma humano y del riñón de cerdo es 4,5, mientras que para el páncreas de pollo en tampón fosfato es de 7 a 7,5 y para el suero de rata de 6,2 a 7,4. El rendimiento del proceso de deconjugación llevado a cabo por las enzimas del riñón de cerdo es muy inferior al de los otros sistemas enzimáticos, de modo que del suero de rata y del páncreas de pollo en condiciones óptimas presentan un 98% y 86% de eficacia, respectivamente, frente al 55% que presenta la (de)conjugasa del riñón de cerdo (Ndaw et al., 2001). La deconjugasa del páncreas de pollo únicamente hidroliza de poliglutamatos (n 1 \rightarrow 8) hasta diglutamatos (n2), mientras que la de suero de rata realiza la hidrólisis hasta monoglutamatos, y dado que en los vegetales los folatos se acumulan en forma de pteroil-poliglutamatos, en el presente estudio se optó por el uso combinado de dos sistemas enzimáticos: el suero de rata y el páncreas de pollo, para obtener una hidrólisis completa de todas la formas de folatos presentes en las muestras, hasta monoglutamatos y diglutamatos.

En el método de hidrólisis aplicado en este trabajo, una alícuota de 5 ml del sobrenadante obtenido del proceso de extracción se incubó durante 3 horas a 37°C en agitación con 500 μ l de suero de rata (Sigma-Aldrich) y 1 ml de solución de páncreas de pollo (Pel Freeze, Arkansas) 1 mg/ml, p:v en agua).

6.5.3.- Proceso de derivatización

El proceso de derivatización se emplea para transformar las diferentes formas en las que se puede presentar el ácido fólico en los alimentos (10-CHO-THF; 5-CHO-THF; 5,10-metilenTHF, etc.) en 5-Metil-Tetrahidrofólico. En el presente estudio se empleó el

procedimiento de derivatización a 5-Metil-Tetrahidrofólico (Mono y diglutamato) recomendado por (Ndaw et al., 2001).

Esquema 4.- Proceso de derivatización aplicado

5 ml de extracto deconjugado (en tampón fosfato 100mM, pH 7)

+ 15 ml Tris-Buffer 66 mM (pH 7,8)

+ 1ml 2-octanol

+ 10 ml NaBH₄ 32 mM



Agitar y reposo 10 minutos

Ajustar el pH a 7,4 con ACH 5M



Adicionar 80 µl formaldehído 37%



Homogeneizar durante 1 min



Adicionar 10 ml NaBH₄ 32 mM



Ajustar el pH < 1 con HCl 37%

Reposo 10 minutos



Ajustar pH a 5 con NaOH 5M

Reposo 20 minutos



Enrasar a 50 ml Tris-Buffer 66 mM (pH 7,8)

En dicho proceso, se emplea el NaBH_4 como agente reductor, inicialmente para reducir el doble enlace en posición C_8 y posteriormente tras el proceso de metilación en posición C_5 ; el proceso de metilación tiene lugar en la posición C_8 empleándose para ello el formaldehído. El octanol se emplea para evitar la formación excesiva de espuma.

6.5.4.- Proceso de purificación

El proceso de purificación tiene como objetivo separar selectivamente las diferentes especies de folatos, aislándolas del resto de componentes presentes en las muestras que pudieran interferir en la determinación de los mismos. Para ello se pueden emplear columnas que contienen la proteína específica (FBPs) a la que se unen selectivamente las distintas especies del ácido fólico (Ndaw, et al., 2001), o cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) de intercambio aniónico fuerte (SAX) (Vahteristo, 1996a; Vahteristo, 1996b; Jastrebova et al., 2003; Rodríguez-Bernardo et al., 2004; Phillips et al., 2005). En el presente trabajo se optó por el uso de un sistema SPE/SAX probando diferentes eluyentes, propuestos por Ndaw et al. (2001) y Jastrebova et al. (2003):

- Eluyente A: 20 mM ácido trifluoroacético + 20 mM ditioeritritol + AA (25%) + KOH (600 g/l)
- Eluyente B: 0,1 mol/l acetato sódico + NaCl 10% en agua (p/v) + AA 1% en agua (p/v)

Se comprobó la eficacia de recuperación de los folatos retenidos en el cartucho SAX, mediante ensayo con patrones, en el cual se observó que dicha eficacia del proceso cuando se usa el eluyente A fue un 50,7% menor que para el eluyente B, por lo que se seleccionó este último (B) para el análisis de las muestras.

Así, en el presente trabajo se emplearon cartuchos SAX (Scharlab) previamente activados con 5 ml de metanol y 5 ml de agua destilada a un flujo de 2 ml/min (Jastrebova et al., 2003). Una vez acondicionado el cartucho, se hizo pasar una alícuota de 10 ml de muestra

derivatizada a través del cartucho, a un flujo de 1 ml/min aproximadamente. Posteriormente se adicionaron 5 ml de agua destilada para arrastrar las posibles impurezas. Los folatos retenidos fueron eluidos con 5 ml de eluyente (solución B) a un flujo de 1 ml/min.

El extracto obtenido se filtro a través de una membrana de PVDF de 0,45 μm de diámetro de poro, previo a su inyección en HPLC-FL.

6.5.5.- Cromatografía

El ácido fólico (ácido pteroilglutámico) y sus respectivos poliglutamatos ($n\ 1\rightarrow 8$) fueron caracterizados en las muestras de estudio mediante HPLC-Fluorescencia, empleándose dos patrones comerciales de folatos :

- 5-MTHF-monoglutamato (Schircks laboratories; ref. 16252).
- Ácido pteroil-diglutamito (Schircks laboratories; ref. 16235).

Para comprobar las propiedades físico-químicas y condiciones óptimas de absorbancia y emisión de fluorescencia de ambos patrones, se evaluaron tanto por HPLC-UV como por HPLC-FL, comprobándose que la emisión de fluorescencia se debe al grupo metilo en posición 5 del ácido pteroil glutámico (5-metil-pteroilglutámico). Se comprobó que el patrón comercial del ácido pteroil diglutámico no emite fluorescencia, ni tampoco sus poliglutamatos ($n\ 1\rightarrow 8$), siendo necesario derivatizarlo previa para obtener el correspondiente compuesto fluorescente (ácido 5-Metil-tetrahidrofólico).

Para conseguir la mejor separación y cuantificación de los patrones seleccionados, se estudiaron diferentes tampones en la fase móvil, así como diferentes gradientes. Las **condiciones cromatográficas** óptimas fueron las siguientes:

- Fase móvil:
 - o Eluyente A: Tampón fosfato $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mM; pH 4,4
 - o Eluyente B: Acetonitrilo (ACN)
- Gradiente empleado (A/B): 94/6 isocrático 5 min \rightarrow 94/6 a 75/25 en 10 min \rightarrow 75/25 isocrático 10 min \rightarrow 75/25 a 94/6 en 1 seg \rightarrow 94/6 isocrático, 20 min (para recuperar condiciones).

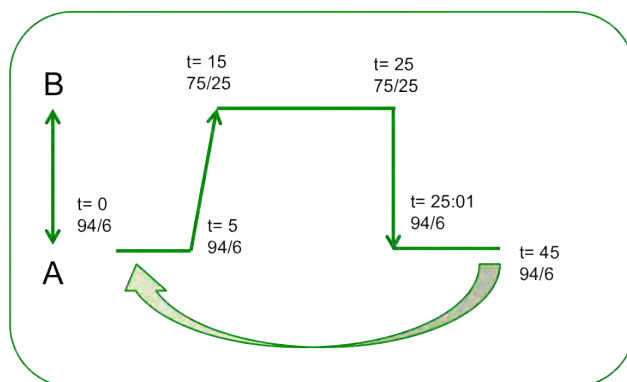


Figura 6.5.1.- Esquema del gradiente aplicado al análisis de ácido fólico y folatos por HPLC-FL. (A)

Eluyente A, (B) Eluyente B

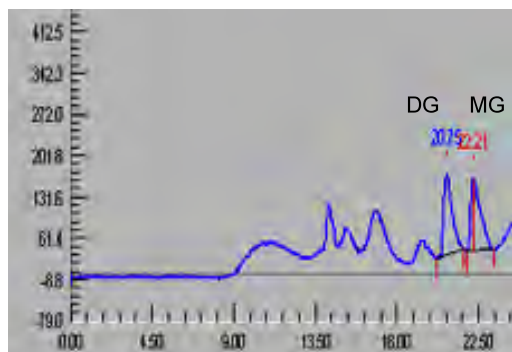
- Flujo: 0,4 ml/min
- λ excitación de 295 nm; λ emisión de 356 nm

Equipo cromatográfico

- Bomba de gradiente: Beta 10 (Ecom).
- Inyector automático: Jasco. mod AS-1555.
- Columna: Lichrospher 100 RP 18 endcapped (Merck) 250 x 5 mm, 5 μ .
- Detector: Fluorescencia (FP-2020 Plus, Jasco).
- Software: Biocrom 2000, versión 3.0.

Con estas condiciones se consiguió separar los dos patrones diferentes de folatos, obteniéndose cromatogramas como los que aparecen en la figura 6.5.2, donde además puede apreciarse la buena linealidad del método aplicado.

Perfil cromatográfico de un patrón de SMTHF (mono y diglutamato)



5MTHF- Diglutamato

5MTHF- Monoglutamato

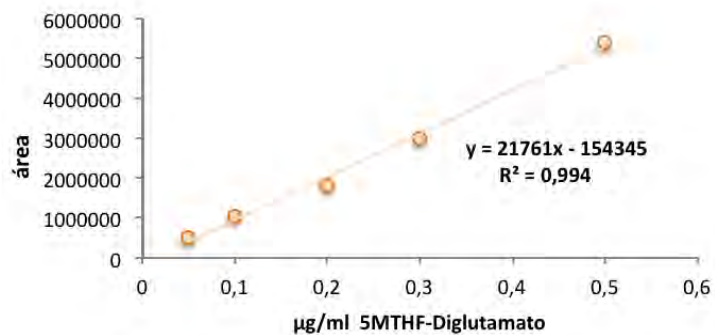


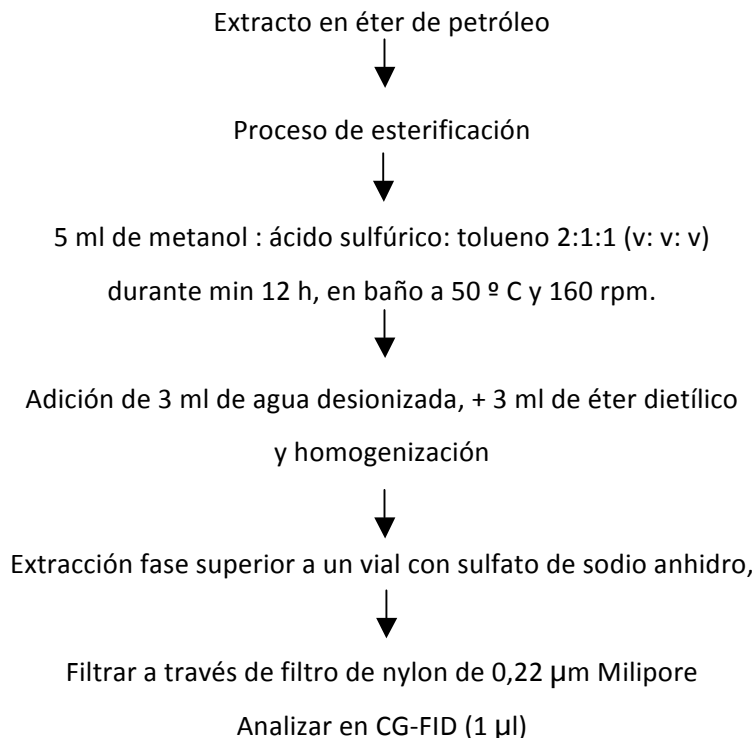
Figura 6.5.2.- Perfil cromatográfico y rectas de calibrado de patrones de: 5MTHF-Monoglutamato y 5MTHF-Diglutamato. 5MTHF (5 metil tetrahidrofólico)

6.6. Determinación de ácidos grasos

El contenido de grasa total se determinó mediante la extracción de una cantidad conocida de muestra liofilizada con éter de petróleo, por el método de Soxhlet, de acuerdo a procedimiento recomendado por la AOAC (1995). A partir de dicha extracción etérea se llevó a cabo la determinación de los ácidos grasos, previo proceso de esterificación (metilación), de los ácidos grasos presentes en el extracto con 5 ml de metanol:ácido sulfúrico:tolueno (2:1:1, v:v:v), durante al menos 12 h en un baño a 50 ° C y 160 rpm. Posteriormente se adicionaron 3 ml de agua desionizada, para facilitar la separación de fases. Los ácidos grasos presentes en la fase lipídica se recuperaron adicionando 3 ml de éter dietílico y posterior agitación en vortex, y la fase esterificada se pasó por con un vial de sulfato de sodio anhidro, para eliminar el agua. La muestra se recuperó en un vial de teflón previa filtración a través de un filtro Milipore de nylon de 0,2 micras (esquema 5).

Los ácidos grasos se determinaron posteriormente por cromatografía de Gases, con detección de ionización de llama (GC-FID) / columna capilar (ISO 5509:2000; Barros et al., 2007).

Esquema 5.- Determinación de ácidos grasos



Equipo y condiciones cromatográficas

- Cromatografo de gases: modelo DANI GC 1000 con un split / splitless y un FID.
- Columna: 30 m × 0,32 mm de diámetro, 0,25 m, 50% phenylmethylpolysiloxane cyanopropilo-metil-50% (Macherey-Nagel, Düren, Alemania).
- Programa de temperatura del horno: temperatura inicial de la columna fue de 50 ° C, durante 2 minutos, subida de 10 ° C / min en pista a 240 ° C y se mantuvo durante 11 min.
- Gas portador (hidrógeno) el caudal fue de 4,0 ml / min (0,61 bar), medido a 50 ° C, la inyección de Split (1:40) se llevó a cabo a 250 ° C.

La identificación y cuantificación se realizó comparando los tiempos de retención relativos con los de un patrón múltiple de ácidos grasos (FAME- reference standard mixture 37; standard 47885-U; SIGMA®), cuyas proporciones relativas se recogen en el cuadro 6.6.1, y su perfil cromatográfico en las condiciones utilizadas se puede observar en la figura 6.6.1. Los picos fueron procesados utilizando el software 1.7 CSWDataApex y los resultados se expresaron como porcentaje relativo de cada uno de los ácidos grasos en las muestras objeto de estudio.

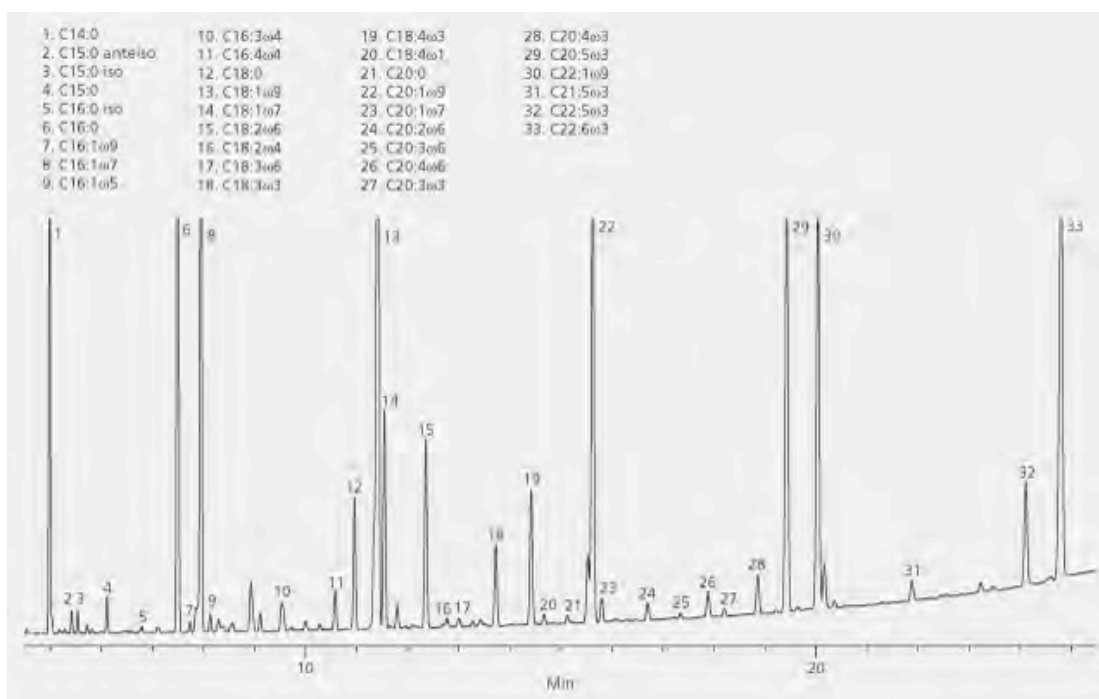


Figura 6.6.1.- Perfil cromatográfico patrón de ácidos grasos – FAME (GS-FID)

Cuadro 6.6.1.- Patrón mezcla de ácidos grasos esterificados empleado como estándar (FAME- reference standard mixture 37; standard 47885-U)

Compuestos		% pt.	Compuestos		% pt.
1	Metil ester del ácido <i>cis</i> -13,16-Docosadienoico	2%	24	Metil myristato	4%
2	Metil ester del ácido <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico	2%	25	Metil myristoleato	2%
3	Metil ester del ácido <i>cis</i> -11,14-Eicosadienoico	2%	26	Metil oleato	4%
4	Metil ester del ácido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico	2%	27	Metil octanoato	4%
5	Metil ester del ácido <i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoico	2%	28	Metil palmitato	6%
6	Metil ester del ácido <i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoico	2%	29	Metil palmitoleato	2%
7	Metil ester del ácido <i>cis</i> -11-Eicosenoico	2%	30	Metil pentadecanoato	2%
8	Metil <i>cis</i> -10-heptadecenoato	2%	31	Metil <i>cis</i> -10-pentadecenoato	2%
9	Metil hexanoato	4%	32	Metil estearato	4%
10	Metil γ -linolenato	2%	33	Metil tricosenoato	2%
11	Metil araquidato	4%	34	Metil tetracosanoato	4%
12	Metil araquidonato	2%	35	Metil tridecanoato	2%
13	Metil behenato	4%	36	Metil undecanoato	2%
14	Metil butirato	4%	37	Metil <i>cis</i> -15-tetracosenoato	2%
15	Metil decanoato	4%			
16	Metil dodecanoato	4%			
17	Metil elaidato	2%			
18	Metil erucato	2%			
19	Metil heneicosanoato	2%			
20	Metil heptadecanoato	2%			
21	Metil linoleato	2%			
22	Metil linolelaidato	2%			
23	Metil linolenato	2%			

6.7. Determinación de Tocoferoles: Vitamina E

El contenido de tocoferoles se determinó siguiendo un procedimiento previamente optimizado y descrito por Barros et al. (2008).

Se realizó una extracción en n-hexano, partiendo de 500 mg de muestra liofilizada a la que se le adicionó 100 µl de solución de BHT (butilhidroxitolueno) en n-hexano (10 mg/ml) y 250 µl del estándar interno (solución de tocol en hexano, 2,0 mg/ml). Posteriormente se homogenizó con metanol (4 ml), agitando vigorosamente mediante vortex durante 1 min.

Una vez obtenida la solución de partida, se procedió a la extracción, adicionando 4 ml de n-hexano, seguido de homogenización durante un minuto. A continuación se adicionaron 2 ml de solución saturada de NaCl en agua para favorecer la migración de los tocoferoles a la fase lipófila (n-hexano). La mezcla fue homogeneizada durante 1 min y posteriormente centrifugada a baja temperatura durante 5 minutos a 6185 rpm (Centrifuga refrigerada Centurión K24OR-2003), la capa superior fue transferida cuidadosamente a un vial, repitiéndose el proceso de extracción dos veces más a partir del residuo obtenido tras la centrifugación (esquema 6). Todo el proceso se llevó a cabo a baja temperatura y en recipientes de topacio, para evitar la degradación de los tocoferoles.

La combinación de los extractos se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno para posteriormente, ser redissueltos en 1 ml de n-hexano deshidratado con sulfato de sodio anhidro. Se filtro a través de un filtro de 0,22 micras y se transfirió a un vial topacio para su análisis por HPLC.

Esquema 6.- Extracción y determinación de tocoferoles en n-hexano

0,5 g de muestra liofilizada + 100 μ l de solución BHT (10 mg/ml en hexano)

+ 250 μ l patrón interno (2,0 μ g/ml tocol en hexano)



+ 4 ml metanol frío, homogeneizar en vortex (1 min)



+ 4 ml n-hexano frío, homogeneizar en vortex (1 min)



+ 2 ml de solución saturada de NaCl frío



Homogeneizar en vortex (1 min)

Centrifugar (5 min, 6185 rpm)



Extraer la capa superior (hexano)

y transferirla a un vial con sulfato sódico anhidro



Re-extraer el residuo dos veces más con hexano

y combinar los extractos.



Evaporar extractos hasta sequedad con corriente de nitrógeno



Redisolver extracto en 1 ml de n-hexano



Filtrar a través de filtro LC 0,22 μ m,

Inyectar en HPLC (10 μ l).

Equipo cromatográfico

- Bomba isocrática de Smartline 1000 (Knauer, Alemania), con sistema desgasificador Smartline gerente de 5000.
- Inyector automático AS-2057
- Columna: poliamida II (250 x 4,6 mm) de columna de fase normal de YMC Aguas (Japón)
- Detectores conectados en serie:
 - Detector de ultravioleta 2500 UV (Knauer, Alemania): 295 nm
 - Detector de fluorescencia FP-2020 (Jasco, Japón): λ excitación a 290 nm y λ emisión a 330 nm.
- Software: DataApex, 2.4 Software

Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: n-hexano : acetato de etilo (70:30, v/v)
- Flujo: 1 ml/min
- Temperatura: 30^o (horno 7971 R Grace oven)
- Volumen de inyección: 10 μ l

Las cuatro isoformas (α , β , γ y δ -tocoferol) fueron separadas e identificados por HPLC-FL mediante la comparación con estándares (α y δ -tocoferol de SIGMA[®]; β y γ -tocoferol y el tocol de METRAYA[®]). Se empleó un patrón interno de concentración conocida (tocol) para comprobar el normal funcionamiento del proceso. La cuantificación se realizó mediante la comparación de áreas obtenidas a partir de las rectas de calibrado realizadas con los patrones de cada una de las isoformas analizadas, el rango de concentraciones fue de 0,25-8 μ g/ml, y se obtuvieron rectas de calibrado R^2 superiores al 99,9% en todos los casos. La figura 6.7.1 muestra el perfil cromatográfico del patrón múltiple de todas las isoformas.

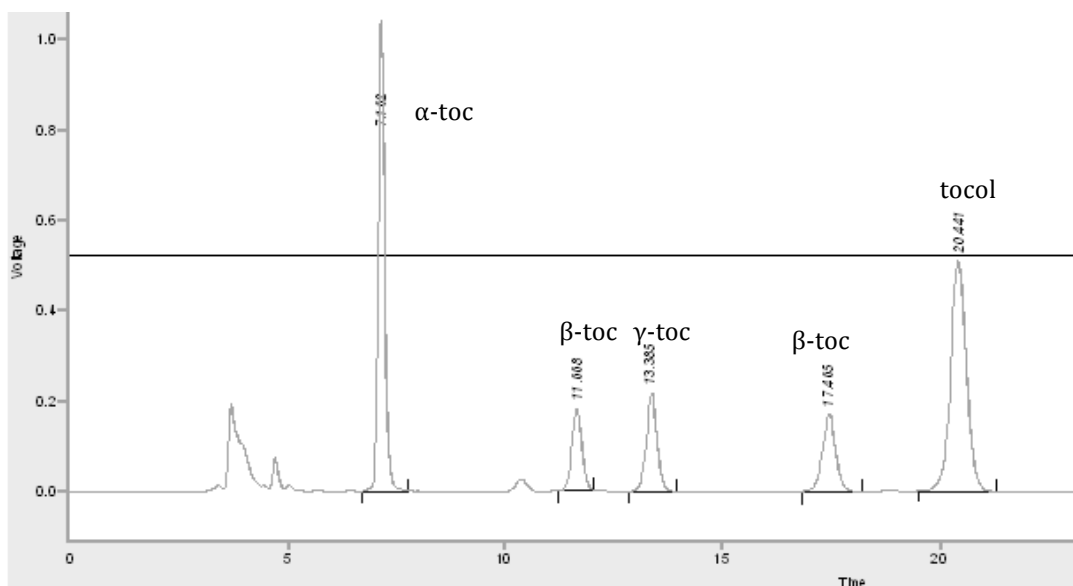
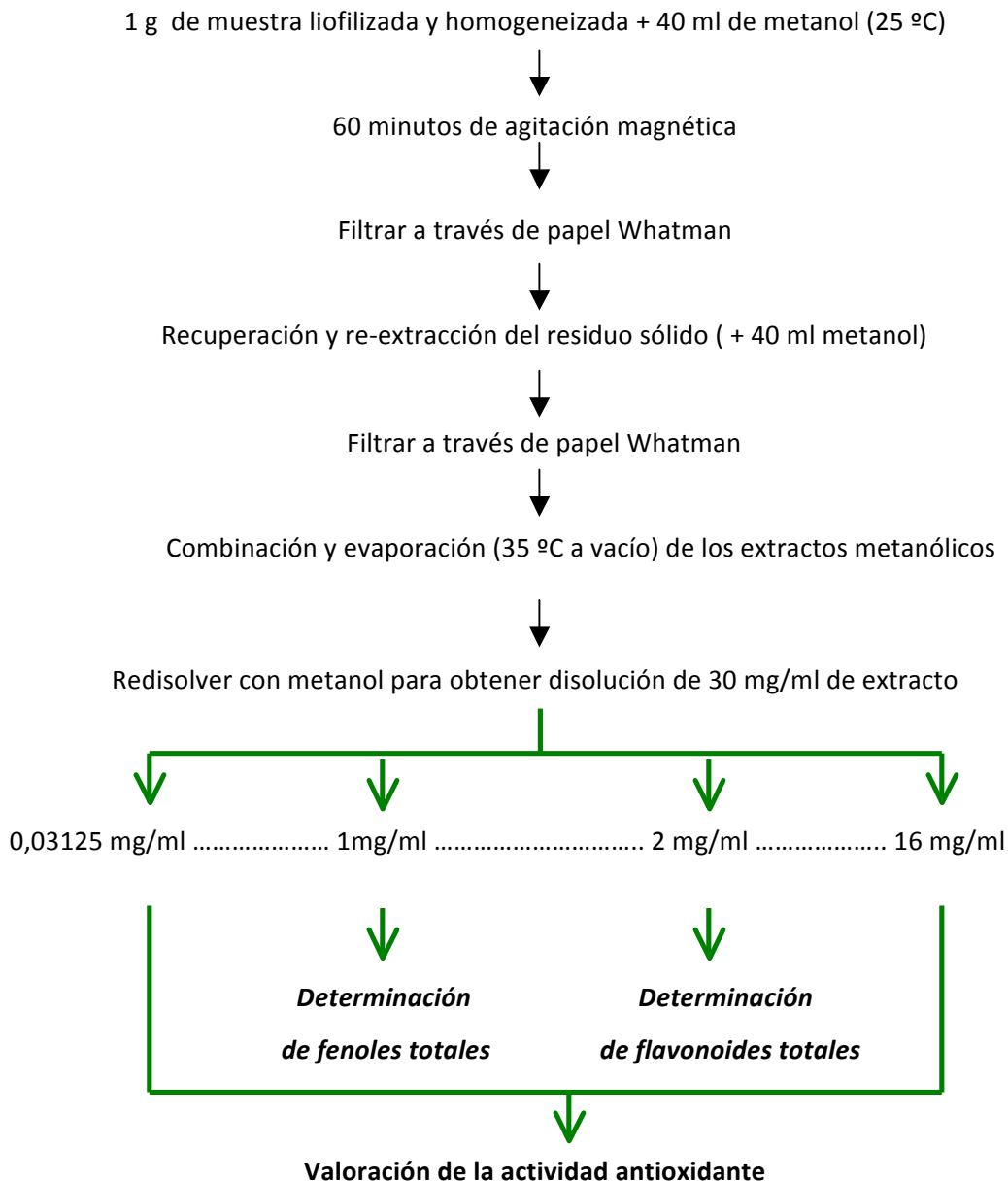


Figura 6.8.1.- Cromatograma del patrón múltiple. α (α -toc), β (β -toc), γ (γ -toc) y δ -tocoferol (δ -toc); Tocol (patrón interno)

6.8. Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides totales

La determinación del contenido de fenoles y flavonoides totales, así como la valoración de la capacidad antioxidante *in vitro*, se realizó a partir de diferentes diluciones procedentes de un extracto metanólico de los materiales vegetales. Para ello se procedió a la extracción de la muestra (según el siguientes esquema) para obtener una concentración final de 30 mg/ml de extracto, a partir de la cual se realizaron diferentes diluciones (desde 0,03125 mg/ml a 16 mg/ml) que se emplearon en la valoración del contenido en fenoles y flavonoides totales así como en los distintos ensayos de medida de la actividad antioxidante. Dichas diluciones se almacenaron a 4 °C hasta la ejecución de los análisis.

Esquema 7.- Extracción metanólica y preparación de diluciones

Los **fenoles totales** fueron determinados mediante el método descrito por Wolfe et al. (2003) con algunas modificaciones. A partir de la dilución 1 mg/ml del extracto metanólico, se tomó una alícuota (0,5 ml) al que se adicionó 2,5 ml de reactivo Folin–Ciocalteu (previamente diluido en agua 1:10; v/v) y 2 ml de carbonato sódico (75 g/l).

Los tubos fueron agitados (vortex) durante 15 segundos y posteriormente incubados a 40°C durante 30 minutos hasta la formación de coloración, determinando los fenoles totales por espectrofotometría, a 765 nm (espectrofotómetro AnalytikJena 200).

Esquema 8.- Determinación de compuestos fenólicos

0,5 ml de la dilución de 1 mg/ml del extracto metanólico

+ 2,5 ml de reactivo Folin–Ciocalteu (diluido en agua 1:10; v/v en agua)

+ 2 ml de Na₂CO₃ (75 g/l)

Homogeneizar en vortex (15 seg)

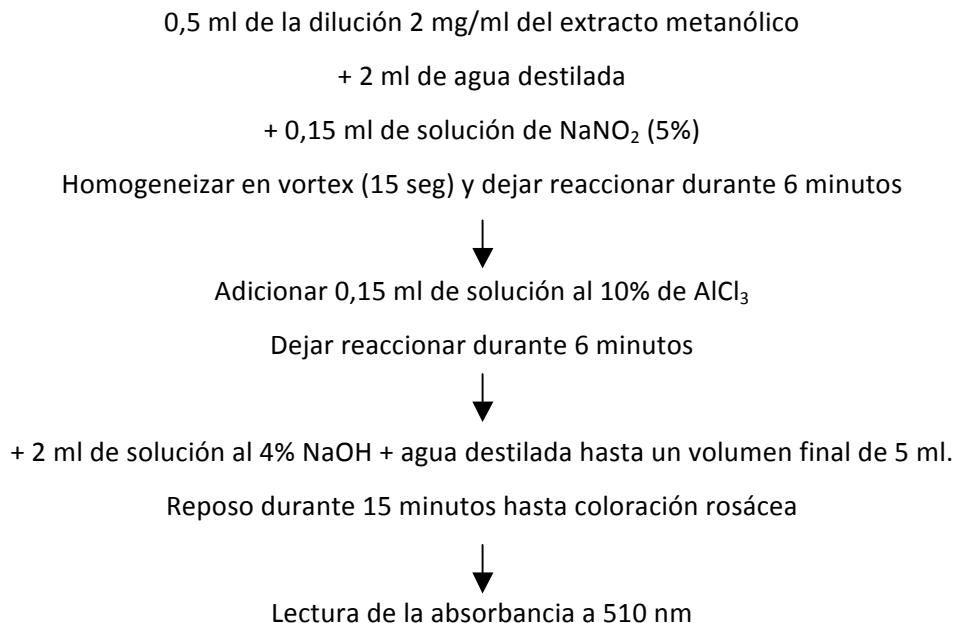
Incubación a 40 °C durante 30 minutos



Lectura de absorbancia a 765 nm

Para la cuantificación del contenido total de fenoles se utilizó una recta de calibrado de ácido gálico como estándar, cuyo rango de concentraciones fue de 0,05 a 0,8 mM (tabla 6.8.1), los resultados obtenidos fueron expresados en mg de equivalentes de ácido gálico (EAGs) por gramo de extracto y mg de EAG/100g de muestra fresca.

La determinación de los **flavonoides totales** fue llevada a cabo mediante el método descrito por Jia et al. (1999) con algunas modificaciones. A partir de la dilución de 2mg/ml del extracto metanólico, se tomó una alícuota de 0,5 ml que fue diluida con 2 ml de agua destilada, posteriormente se adicionaron 0,15 ml de solución de NaNO₂ (5%). Después de 6 min, se añadió 0,15 ml de solución al 10% de AlCl₃, dejando progresar la reacción durante otros 6 minutos. Posteriormente se adicionaron 2 ml de solución al 4% NaOH e inmediatamente después se añadieron agua destilada hasta un volumen final de 5 ml. Después de homogeneizar y esperar 15 minutos, se midió la intensidad del color espectrofotométricamente a 510 nm (espectrofotómetro AnalytikJena 200).

Esquema 9.- Determinación de flavonoides totales

El contenido total de flavonoides se cuantificó a partir de recta de calibración de (+)-Catequina cuyo rango de concentraciones fue de 0,0156 a 1,0 mM (tabla 6.8.1) , los resultados fueron expresados como mg de equivalentes de (+)-Catequina (ECs) por gramo de extracto y mg EC/100g muestra fresca.

Tabla 6.8.1.- Rectas calibrado de ácido gálico y catequina.

	Recta calibrado ácido gálico	Recta calibrado catequina
Rango de concentraciones:	0,05 a 0,8 mM	0,0156 a 1,0 mM
Ecuación:	$y=1,848x + 0,014$	$y=0,9186x + 0,0003$
r:	0,997	0,999
R ² :	99,686%	99,999%
DE ordenada en el origen:	0,037	0,002
DE pendiente:	0,082	0,005

6.9. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

Existen diferentes metodologías para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, aunque no existe consenso en cuanto al método universal que pueda medir la capacidad antioxidante de todas las muestras de forma precisa y cuantitativa debido a la presencia de compuestos con diferente solubilidad, y al hecho de realizar su actividad sobre diferentes sistemas oxidativos (Prior et al., 2005).

La valoración de la capacidad antioxidante *in vitro* de las muestras objeto de estudio se realizó a partir del extracto metanólico previamente descrito en el apartado 6.5, evaluando de la capacidad antioxidante total y la inhibición de la peroxidación lipídica.

La actividad antioxidante total se evaluó frente al radical DPPH y la capacidad de reducir el hierro:

- Método de DPPH
- Poder reductor ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$)

Para analizar la capacidad de la inhibición de la peroxidación lipídica se emplearon los métodos:

- Inhibición de la decoloración del β -caroteno
- TBARS

En la discusión de los datos relativos a la capacidad antioxidante *in vitro*, emplearemos el parámetro EC_{50} , correspondiente a la concentración del extracto metanólico (mg/ml) capaz de inhibir al 50% cualquier proceso oxidativo, incluyendo los correspondientes a la cadena de radicales libres y/o al proceso de peroxidación lipídica (Sánchez-Moreno et al., 1998).

Para calcular la concentración inhibitoria 50 (EC₅₀) se empleó la siguiente ecuación:

$$EC_{50} = [(x_2 - x_1)/(y_2 - y_1)] \times (50 - y_1) + x_1$$

Donde:

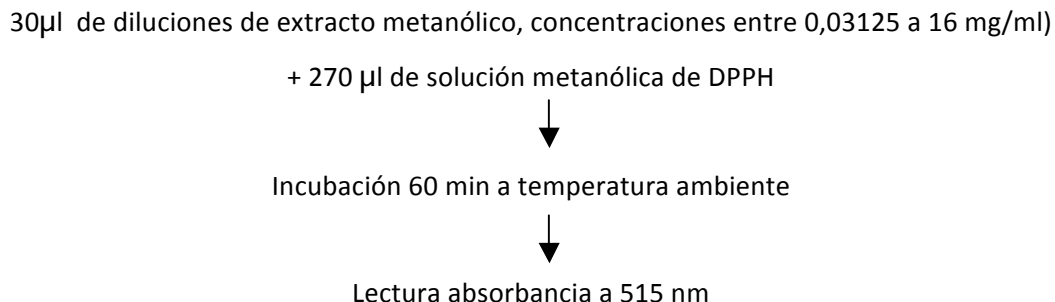
- x₁: concentración (mg/ml) del extracto cuyo porcentaje de inhibición es inferior al 50%
- x₂: concentración (mg/ml) del extracto cuyo porcentaje de inhibición es superior al 50%
- y₁: porcentaje inhibitorio inferior al 50%
- y₂: porcentaje inhibitorio superior al 50%

a.- Método DPPH (radical 2,2difetil-1-picrilhidrazil)

En este método se evalúa el grado de captación de un radical orgánico como es el DPPH, en presencia del antioxidante (Brand-Williams et al., 1995), valorándose espectrofotométricamente la decoloración del reactivo radical, a una longitud de onda de 515 nm.

Según el método descrito previamente por Hatano et al. (1986) y posteriormente modificado por Barros et al. (2008), la reacción fue llevada a cabo en microplacas de 96 pocillos. En cada uno de los pocillos se adicionaron 30 µl de las diferentes concentraciones, rango de concentraciones de 0,03125 a 16 mg/ml dependiendo de la muestra de estudio, empleándose 6 diluciones en total, así como 30 µl de metanol como blanco. Posteriormente se adicionó 270 µl de una disolución de DPPH en metanol (6×10⁻⁵ mol/l) y la mezcla se dejó incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, para posteriormente evaluar la reducción de los radicales DPPH, midiendo su absorbancia a 515 nm mediante un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments, Inc.).

Esquema 10.- Ensayo DPPH



La actividad antiradicalaria fue calculada y expresada como el porcentaje de decoloración del DPPH, empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad antiradicalaria (\%)} = [(A_{\text{DPPH}} - A_s) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

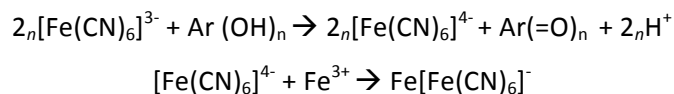
Donde:

- A_s es la absorbancia de la solución en la que el extracto de la muestra problema se adicionó a una determinada concentración.
- A_{DPPH} corresponde a la absorbancia del blanco (Metanol).

El extracto cuya concentración inhibió al 50% la captación de radicales DPPH (EC_{50}) fue calculado a partir de la ecuación.

b.- Método del poder reductor ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$)

El método se basa en la evaluación de la capacidad de los compuestos antioxidantes de reducir al hierro (Fe^{3+} a Fe^{2+}), midiéndose para ello el cambio de coloración producido en el ligando cromogénico, selectivamente unido al anión férrico.



La especie oxidantes Fe^{3+} -L, el $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$, en presencia de compuestos antioxidantes $[\text{Ar}(\text{OH})_n]$, dará lugar a la reducción de la ferrocianina ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) y al antioxidante oxidado $[\text{Ar}(=\text{O})_n]$, una vez estabilizada la ferrocianina mediante Fe^{3+} (FeCl_2), ésta actuará como compuesto cromogénico (azul Prusia). La coloración producida se mide espectrofotométricamente a 690 nm (Berker et al., 2010).

Para ello, según la metodología descrita por Barros et al. (2010b), se emplearon diferentes concentraciones de los extractos metanólicos. Diferentes alícuotas de 0,5 ml de cada concentración se mezclaron con 0,5 ml de buffer sodio fosfato (200 mmol/l, pH 6,6) y 0,5 ml de ferrocianuro potásico (1% p/v, en agua). La mezcla fue incubada durante 20 minutos a 50 °C, empleándose 0,5 ml de ácido tricloroacético (10% p/v, en agua) para frenar la reacción.

Posteriormente, una alícuota (0,8 ml) de la mezcla fue transferida a cada pocillo (en microplacas de 48 pocillos), se adicionó 0,8 ml de agua desionizada y 0,16 ml de cloruro férrico (0,1% p/v), Midiéndose la absorbancia a 690 nm mediante un lector de microplaca.

Esquema 11.- Ensayo Poder reductor ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$)

0,5 ml de las diluciones de extracto metanólico,
concentraciones entre 0,03125 a 16 mg/ml

+ 0,5 ml buffer sodio fosfato (200 mmol/l, pH 6,6)

+ 0,5 ml ferrocianuro potásico (1% p/v, en agua)



Incubación 20 min a 50 °C



+ 0,5 ml ácido tricloroacético (10%, p/v en agua)



Transferencia de alícuotas de 0,8 ml a
microplaca de 48 pocillos



+ 0,8 ml de agua desionizada

+ 0,16 ml de cloruro férrico (0,1% p/v, en agua)



Lectura absorbancia a 690 nm

La actividad antiradicalaria del poder reductor, se calcula a partir de la diferencia de absorbancias entre el blanco y la muestra problema.

$$\text{Actividad antiradicalaria} = (A_B - A_S)$$

Donde:

- A_S es la absorbancia de la solución en la que el extracto de la muestra problema se adicionó a una determinada concentración.
- A_B corresponde a la absorbancia del blanco (Metanol).

Posteriormente se calculó, el correspondiente EC_{50} para cada extracto (planta silvestre) a partir de la siguiente ecuación.

$$EC_{50} = [(x_2 - x_1)/(y_2 - y_1)] \times (0,5 - y_1) + x_1$$

Para este ensayo, la concentración inhibitoria 50 (EC_{50}) es aquella que proporciones una absorbancia de 0,5.

c.- Método de Inhibición de la decoloración del β -caroteno

El ensayo de decoloración del β -caroteno implica la medición de la decoloración del β -caroteno a 470 nm por acción de los productos derivados del proceso de oxidación del ácido linoleico (Laguerre et al., 2007).

Para ello es necesario el empleo una emulsión formada por ácido linoleico y β -caroteno (Fig. 6.9.1), utilizando el Tween-80 para favorecer la dispersión de dichos compuestos.

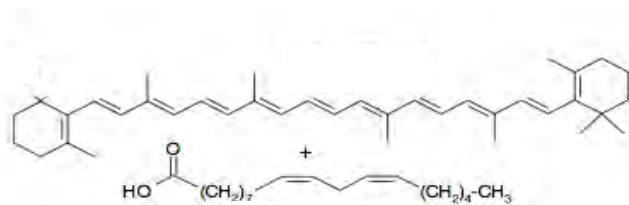
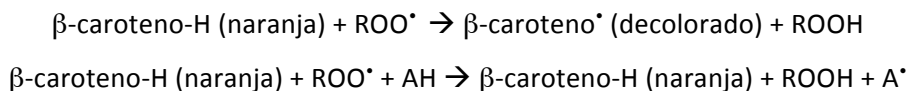


Figura 6.9.1.- Principales componentes empleados en el método de Inhibición de la decoloración del β -caroteno

La oxidación del ácido linoleico es inespecífica y catalizada por el calor (50 °C). La adición de extractos que contenga antioxidantes, favorece el retraso de la decoloración del β -caroteno por inhibición de la oxidación del ácido linoleico (Laguerre et al., 2007). Teniendo lugar las siguientes reacciones:

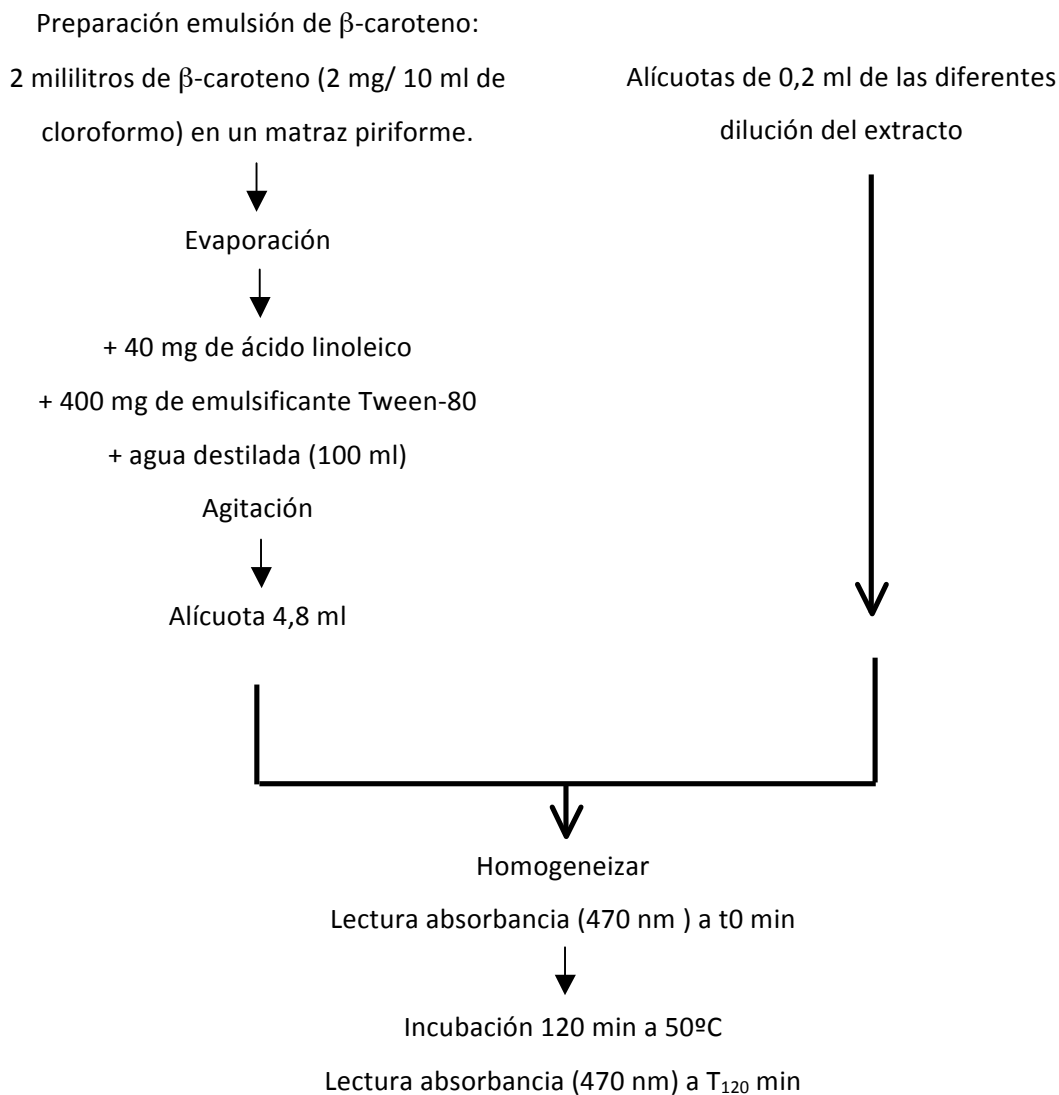


Donde ROO^* es el radical del ácido linoleico, AH el compuesto antioxidante presente en la muestra y A^* dicho compuesto antioxidante oxidado.

Según Barros et al. (2010b), se debe preparar previamente una solución de β -caroteno, añadiéndose 2 mililitros de β -caroteno (2 mg/ 10 ml de cloroformo) en un matraz piriforme, para la posterior evaporación del cloroformo (mediante rotavapor a 40 °C). Tras este proceso se añadieron 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de emulsificante Tween-80 y agua destilada (100 ml), homogeneizándose por agitación vigorosa. Una alícuota (4,8 ml) de la emulsión fue transferida en diferentes tubos, a los cuales previamente se les adicionó alícuotas de (0,2 ml) de las diferentes concentraciones del extracto.

Los tubos fueron agitados (vortex) e incubados al baño maría a 50 °C durante 120 min. Una vez que la emulsión fue adicionada a cada uno de los tubos, se determinó espectrofotométricamente (a 470 nm) la decoloración de la solución a tiempo 0 (T_0) y tras el periodo de incubación a 120 minutos (T_{120}), empleándose como blanco una solución de β -caroteno.

Esquema 12.- Ensayo de inhibición de la decoloración del β -caroteno



La inhibición de la decoloración del β -caroteno (I.D. β -carot) fue calculada empleando la siguiente ecuación:

$$\text{I.D. } \beta\text{-carot} = (\text{contenido de } \beta\text{-caroteno a } T_{120} \text{ respecto al contenido a } T_0) \times 100.$$

Posteriormente se calculó el EC₅₀ (la concentración de extracto que inhibe al 50% la decoloración del β-caroteno), a partir de los valores de porcentajes de inhibición de la decoloración del β-caroteno frente a las diferentes concentraciones del extracto

d.- Inhibición de la peroxidación lipídica empleando el ácido tiobarbitúrico como sustancia reactiva (TBARS = Tiobarbituric Acid Reactive Species)

Dicha metodología se desarrolló en la década de 1940, siendo ampliamente empleada tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Se trata de evaluar la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído, formado a partir de la descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, formándose un cromóforo rojo con absorción máxima a 532 nm.

El resultado del complejo coloreado se forma por condensación de 2 moles de TBA y 1 mol de malondialdehído (Fig. 6.8.2), bajo la influencia de la temperatura y pH del medio.

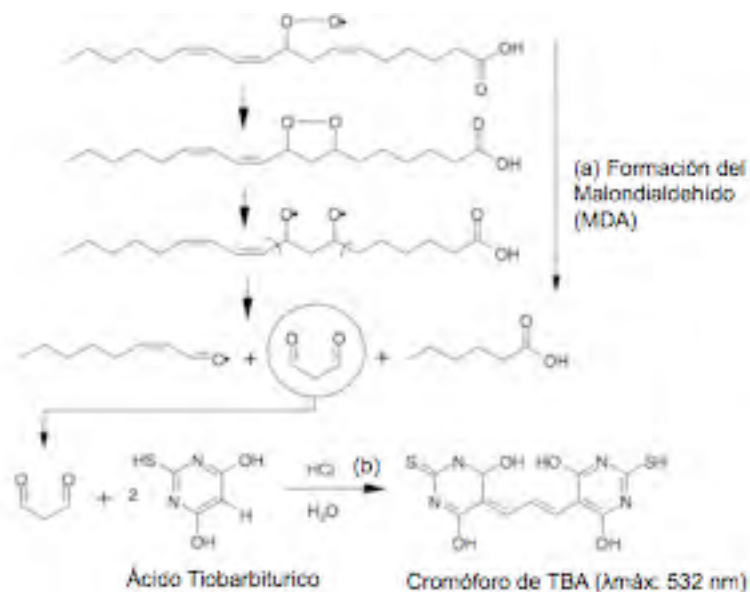


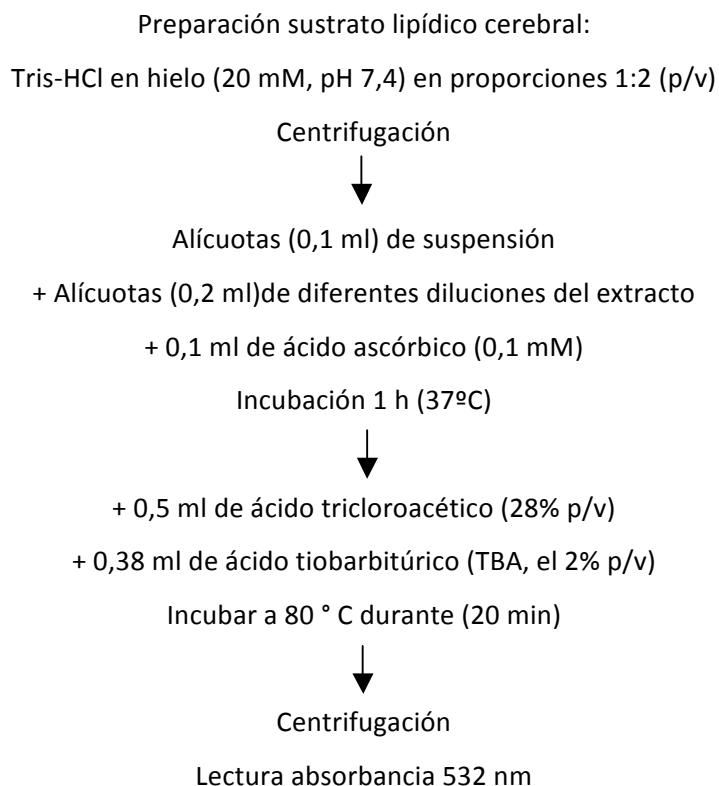
Figura 6.8.2.- (a) Formación del Malondialdehído a partir de los radicales peroxilo del ácido graso C18 tri-insaturado; (b) Formación del cromóforo de TBA; a partir del TBA y MDA (Laguerre et al., 2007)

Para la valoración de la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica de las muestras problema, mediante la utilización del ácido tiobarbitúrico, como sustrato lipídico se empleó materia cerebral obtenido de cerdos (*Sus scrofa*) de peso corporal de 150 kg, previamente homogeneizado con en tampón Tris-HCl en hielo (20 mM, pH 7,4) en proporciones 1:2 (p/v). El homogeneizado de tejido cerebral fue centrifugado a 3000g durante 10 minutos, recuperándose el sobrenadante.

Se incubaron alícuotas de 0,2 ml de las diferentes concentraciones de los extractos con alícuotas (0,1 ml) del sobrenadante, en presencia de 0,1 ml de FeSO₄ (10 µM) y 0,1 ml de ácido ascórbico (0,1 mM) a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se adicionaron 0,5 ml de ácido tricloroacético (28% p/v) para parar la reacción, seguido de 0,38 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA, el 2% p/v) y se llevó la mezcla a incubar a 80 °C durante 20 min.

Una vez finalizada la incubación, se centrifugarán los tubos a 3000G durante 10 minutos, para eliminar las proteínas precipitadas del sobrenadante, midiéndose la intensidad de color en el mismo, debida a la formación del complejo del malondialdehído (MDA) con el TBA por espectrofotometría a 532 nm.

Esquema 13.- Ensayo de Inhibición de la peroxidación lipídica empleando el ácido tiobarbiturico (TBARs)



La inhibición de la peroxidación lipídica (%) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Relación de inhibición (\%)} = [(A \times B) / A] \times 100\%$$

Donde: A y B fueron la absorbancia del control y la solución del extracto, respectivamente.

La concentración del extracto que inhibe al 50% (EC₅₀) la peroxidación lipídica se calculó a partir de la anterior ecuación.

6.10.- Estudios estadísticos aplicados

Con el fin de llevar a cabo una interpretación objetiva de los resultados obtenidos se realizaron diferentes estudios estadísticos. Para ellos se ha utilizado el programa estadístico *STATGRAPHICS plus versión 5.1.* para Windows.

6.10.1.- Análisis de la varianza (ANOVA)

El tratamiento de los datos mediante el test de análisis de la varianza, permite saber si las diferencias entre medias de dos ó más grupos son ó no debidas al azar. El F-ratio ó estadístico F de Fisher obtenido a partir de la ANOVA, es el cociente de la estimación entre los grupos ó dentro de ellos. Se obtiene en cada caso el nivel de significación; si el valor p es menor ó igual a 0,05, se rechazaría la hipótesis nula (que supone que todas las medias son iguales), aceptándose la hipótesis alternativa y por tanto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones comparadas.

El Test de ANOVA univariante llevado a cabo, permite, una vez que se ha comprobado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones comparadas, determinar qué medias son significativamente similares o diferentes unas de otras, estableciéndose con ellos grupos homogéneos de medias, utilizando un test de **contraste múltiple de rango**. En este caso, el test utilizado ha sido el de Duncan ó procedimiento de las menores diferencias significativas entre medias (en adelante LSD), estableciendo un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) de modo que se establecen puntos coincidentes para poblaciones similares y no coincidentes para poblaciones que presentan variaciones estadísticamente significativas.

6.10.2.- Estudio de correlaciones canónicas

El **método multivariable de Correlaciones Canónicas** (correlaciones producto de Pearson) se fundamenta en encontrar las combinaciones lineales de grupos de variables fuertemente relacionado entre sí, es decir, que presentan la correlación más alta entre ellos, estableciendo una relación lineal entre ambas variables. Para ello presenta las diferentes correlaciones resultantes en la matriz de datos, la cual contiene el rango de estos coeficientes de correlación (con valores entre -1 a +1), y el P-valor que comprueba la importancia estadística de las correlaciones estimadas, donde P-valores por debajo de 0,05 indican importancia estadística de correlaciones no-cero para un nivel de confianza del 95%.

6.10.3.- Estudio de componentes principales

El análisis de componentes principales estudia la correlación entre todos los resultados obtenidos referentes a las muestras analizadas, considerando como variables a los distintos parámetros evaluados y como “componentes” a unas nuevas variables independientes entre sí, de manera que unas pocas variables (componentes principales) permitirán caracterizar los productos objeto de este estudio (especies silvestres), ya que cada componente está formado por combinación de variables correlacionadas entre si.

6.10.4.- Estudio de cluster

Para evaluar las posibles relaciones existentes entre las distintas especies silvestres consideradas en el presente estudio se ha realizado el análisis clúster considerando los valores medios obtenidos, para cada parámetro.

Los clusters son grupos de observaciones con características similares. El procedimiento aplicado ha sido una clasificación jerárquica aglomerativa siguiendo el criterio de Ward (Everitt, 1980) que permitió la obtención de un dendograma.

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la organización de la discusión de los resultados obtenidos, las especies objeto de estudio se han dividido en dos grandes grupos, en función de su parte comestible.

- Especies silvestres cuya parte comestible son las hojas:

- Especies cuyas hojas se consumen enteras: *Anchusa azurea* Mill., *Beta maritima* L., *Chondrilla juncea* L., *Cichorium intybus* L., *Papaver rhoeas* L., *Rumex papillaris* Boiss & Reut., *Rumex pulcher* L., *Sonchus oleraceus* L., *Taraxacum obovatum*
- Especies cuyas hojas se consumen peladas: *Scolymus hispanicus* L. y *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

- Especies silvestres cuya parte comestible principal es diferente de las hojas, aunque pueda incluirlas en baja proporción:

- Tallos tiernos con hojas: *Apium nodiflorum* (L.) Lag., *Foeniculum vulgare* Mill., *Montia fontana* L. y *Silene vulgaris* (Moench) Garcke.
- Brotes tiernos con o sin hojas pequeñas: *Asparagus acutifolius* L., *Bryonia dioica* Jacq., *Humulus lupulus* L. y *Tamus communis* L.
- Bulbo y parte inferior del tallo: *Allium ampeloprasum* L.

En todas ellas se ha realizado la caracterización de los parámetros físico-químicos y compuestos bioactivos analizados, además de evaluar la influencia de factores externos ambientales (climatológicos y edafogeográficos), y en algunos casos, del tratamiento culinario de cocción en los parámetros que pudieran verse más afectados (Tabla D.1).

Tabla D.1.- Resumen de las determinaciones analíticas realizadas sobre las muestras objeto de estudio.

Determinaciones	Caracterización de las especies silvestres	Influencia de los factores ambientales	Influencia del tratamiento térmico
Humedad			
pH			
Acidez titulable			
Ácido ascórbico y dehidroascórbico (Vitamina C)			
Ácidos orgánicos			
Ácido fólico y folatos (Vitamina B ₉)			
Fenoles y flavonoides totales			
Ácidos grasos			
Tocoferoles (Vitamina E)			
Actividad antioxidante <i>in vitro</i>			

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos en el presente trabajo, los resultados obtenidos se han agrupado en cuatro capítulos diferentes:

1. Compuestos bioactivos y parámetros físico-químicos en las especies silvestres de hoja.
2. Compuestos bioactivos y parámetros físico-químicos en las especies silvestres cuyas partes comestibles son distintas de las hojas: tallos tiernos con hojas, brotes tiernos con o sin hojas, y bulbos.
3. Estudio comparativo de todas las especies silvestres entre sí.
4. Influencia del tratamiento térmico en el contenido de ácidos orgánicos, vitamina C y ácido fólico, en algunas especies silvestres que tradicionalmente se consumen cocinadas.

**7. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y
PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS EN VERDURAS
SILVESTRES DE HOJA**

Las verduras silvestres incluidas en el presente estudio, son aquellas cuya parte comestible son las hojas basales: *Anchusa azurea*, *Beta maritima*, *Cichorium intybus*, *Chondrilla juncea*, *Papaver rhoeas*, *Rumex papillaris*, *Rumex pulcher*, *Scolymus hispanicus*, *Silybum marianum*, *Sonchus oleraceus* y *Taraxacum obovatum*. Dentro de este grupo se diferencian las especies cuyas hojas basales se pelan de forma previa a su consumo como son *Scolymus hispanicus*, *Silybum marianum*, tal y como se aprecia en el cuadro 7.1 y la figura 7.1, que recoge el detalle de la porción comestible en cada caso.

Cuadro 7.1.- Plantas silvestres comestibles de hoja incluidas en este capítulo (Tardío et al., 2002)

Especies	Familia	Nombre Común	Parte comestible	Forma de consumo
<i>Anchusa azurea</i> Mill.	Boraginaceae	Lenguaza	Hojas basales	Cruda
<i>Beta maritima</i> L.	Chenopodiaceae	Acelga silvestre	Hojas basales	Cocinada
<i>Chondrilla juncea</i> L.	Asteraceae	Ajonjera	Hojas basales	Cruda
<i>Cichorium intybus</i> L.	Asteraceae	Achicoria	Hojas basales	Cocinada
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Papaveraceae	Amapola	Hojas basales	Cruda y cocinada
<i>Rumex papillaris</i> Boiss. & Reut.	Polygonaceae	Acedera	Hojas basales	Cruda
<i>Rumex pulcher</i> L.	Polygonaceae	Romaza	Hojas basales	Cocinada
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Asteraceae	Cerraja	Hojas basales	Cruda y cocinada
<i>Taraxacum obovatum</i> (willd) D.C.	Asteraceae	Diente de león	Hojas basales	Cruda
<i>Scolymus hispanicus</i> L.	Asteraceae	Cardillo	Hojas Basales Peladas	Cruda y cocinada
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Asteraceae	Cardo o cardincha	Hojas Basales Peladas y brotes tiernos	Cruda y cocinada



Figura 7.1.- Detalle de las partes de la planta analizadas para cada una de las especies silvestres de hoja estudiadas en este capítulo

7.1.- Humedad – materia seca

En la figura 7.1.2 se muestran los valores medios de **humedad** de las especies silvestres estudiadas durante las temporadas 2007 al 2009. Como se puede observar, el agua representa un 80 – 90% del peso fresco de las verduras analizadas, valores que se encuentran dentro del contenido hídrico normal de verduras y hortalizas. Destacan las especies *Anchusa azurea* y *Silybum marianum* por ser las que presentan el mayor porcentaje medio de humedad (90,32 y 93,44%, respectivamente), mientras que *Chondrilla juncea* y *Rumex pulcher*, son las que menor contenido de agua presentan. En el caso del cardo mariano la parte comestible es la penca carnosa de la hoja, en la que cabe esperar un alto contenido hídrico. Dichos resultados están de acuerdo con lo indicado por otros autores (en un rango de materia seca de 7-29%) para diferentes especies silvestres de las hortalizas de hoja (Guil et al., 1997; Escudero y de Arellano, 2003).

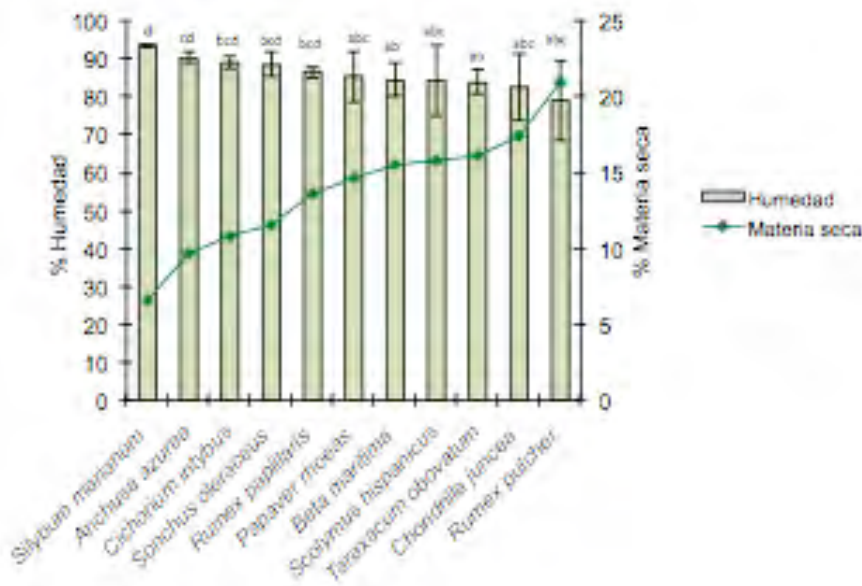


Figura 7.1.2.- Contenido medio de humedad y materia seca de las verduras silvestres de hoja. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), $n > 12$.

El contenido de humedad de las especies silvestres es en general inferior al de sus parientes cultivados, presentando por lo tanto un contenido superior de materia seca en las variedades silvestres. Estas diferencias son más patentes en el caso de la acelga silvestre (*Beta maritima*) la cual presenta un 84,51% de humedad frente a *Beta vulgaris*, cultivada, con un 92,2%. Otras especies mostraron una variación menos acusada, como es el caso de la achicoria (*Cichorium intybus*), donde su pariente cultivado presenta un 94% de humedad frente al 89,10% mostrado por la especie silvestre al igual que en el diente de león (*Taraxacum* ssp) donde su variedad cultivada presentó un 89% de humedad, un 5,11% superior al de su pariente silvestre (*Taraxacum obovatum*) (Souci et al., 2008).

Si bien la humedad es un parámetro físico-químico que puede estar condicionado por las variaciones meteorológicas, periodos de sequía y de lluvia, a las que se ve sometida la planta. *Silybum marianum* fue la especie que mostró una mayor estabilidad de una temporada a otra en ambas localidades. En general (tabla 7.1.1), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre temporadas, a excepción de la achicoria, el cardillo y la romaza, en las que se observó que la humedad del 2008 y 2009 (en el caso de la lenguaza y la romaza) fue significativamente menor ($p < 0,05$) al del primer año de recolección (2007), menos en el caso del cardillo, que presentó valores superiores en 2008. Al comparar distintas localidades de muestreo para un mismo año de recolección, el cardo (*Silybum marianum*) presentó valores muy estables, mientras que en el caso de la acelga silvestre (*Beta maritima*), la amapola (*Papaver rhoeas*), la acedera (*Rumex papillaris*), la romaza, (*Rumex pulcher*) la cerraña (*Sonchus oleraceus*) y el diente de león (*Taraxacum obovatum*), se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de humedad, con variaciones de hasta 12 a 20% entre muestras procedentes de diferentes localidades para un mismo año, especialmente en el caso *Chondrilla juncea* (ajonjera) y *Scolymus hispanicus* (cardillo).

Dichas oscilaciones en el contenido hídrico son esperables en este tipo de muestras, expuestas a diferentes factores ambientales que condicionan su contenido hídrico.

Tabla 7.1.1.- Contenido de humedad (% en peso fresco) de las verduras silvestres de hoja analizadas en el presente estudio

Especie	Humedad (%)					
	Localidad A			Localidad B		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009
<i>Anchusa azurea</i>	-	90,04 ^{ab} (0,35)	90,23 ^b (0,65)	92,73 ^c (0,63)	88,87 ^a (0,65)	89,71 ^{ab} (0,12)
<i>Beta maritima</i>	85,04 ^{ab} (0,13)	85,47 ^{ab} (0,41)	-	89,13 ^b (0,44)	78,39 ^a (5,62)	-
<i>Papaver rhoeas</i>	89,78 ^d (0,06)	65,96 ^a (1,23)	-	73,74 ^b (1,70)	85,53 ^c (0,18)	-
<i>Rumex papillaris</i>	88,04 ^b (0,02)	84,76 ^a (0,50)	89,66 ^b (0,03)	87,39 ^b (0,01)	85,59 ^{ab} (0,30)	-
<i>Rumex pulcher</i>	89,06 ^b (0,03)	86,07 ^b (1,23)	88,16 ^b (0,14)	86,90 ^b (1,71)	69,42 ^a (1,67)	-
<i>Chondrilla juncea</i>	88,25 ^b (0,05)	86,64 ^a (1,95)	-	90,27 ^c (0,16)	90,70 ^c (0,22)	-
<i>Cichorium intybus</i>	89,30 ^c (0,01)	87,43 ^b (0,23)	-	88,74 ^c (0,31)	73,30 ^a (4,39)	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	90,79 ^{bc} (0,39)	90,78 ^c (0,06)	90,78 ^c (0,06)	-	83,19 ^a (1,43)	87,97 ^b (0,31)
<i>Taraxacum obovatum</i>	86,71 ^b (0,22)	86,75 ^b (0,19)	-	84,95 ^a (0,30)	80,57 ^a (1,19)	-
<i>Scolymus hispanicus</i>	80,33 ^b (1,24)	90,24 ^c (0,47)	-	70,31 ^a (0,42)	92,71 ^c (0,06)	-
<i>Silybum marianum</i>	93,60 ^a (0,14)	93,84 ^a (0,26)	-	92,24 ^a (0,65)	93,51 ^a (0,16)	-

Valores expresados como: media (desviación estándar, n-1), n=3. En cada fila, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

7.2.- pH y la acidez titulable

El **pH y la acidez titulable** son parámetros indicadores del contenido de compuestos de carácter ácido que presentan las muestras, como es el caso de los ácidos orgánicos. Como se aprecia en la figura 7.2.1, los valores de pH de las hojas basales de las plantas silvestres estudiadas oscilan en un rango amplio (3,07 a 6,97) siendo el grupo de especies pertenecientes a la familia de las compuestas (Asteraceae) las que muestran valores de pH más homogéneos, con valores de 5,2 a 5,7.

La especie más ácida (con un pH en torno a 3,1) es *Rumex papillaris* que a su vez destacó por presentar los niveles más elevados de acidez titulable. Esto se correlaciona con su sabor ácido característico, del cual toma su nombre común, la acedera. Por el contrario, la especie menos ácida es *Anchusa azurea*, con un pH en torno a 6,9 y una acidez titulable de 5,49 ml de NaOH (0,1 N)/100g muestra.

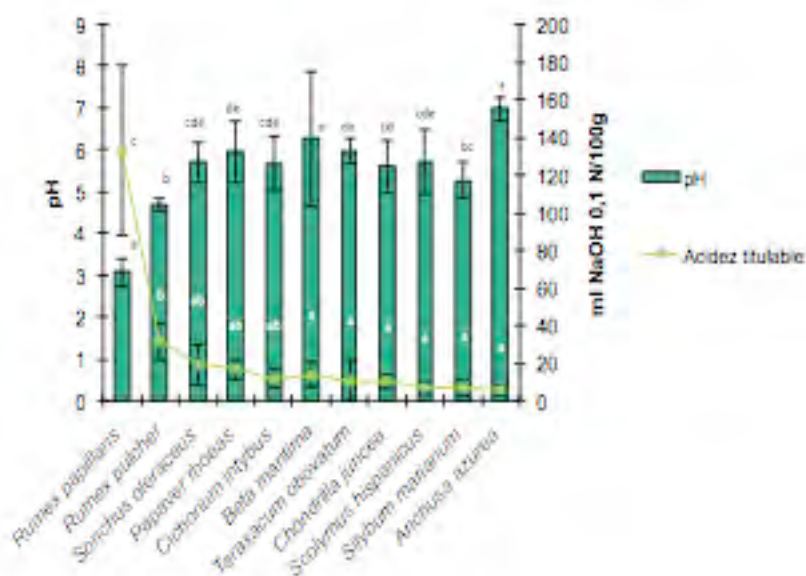


Figura 7.2.1.- Valores medios de pH y acidez titulable (ml NaOH 0,1 N/100g muestra) de las verduras silvestres de hoja. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), $n > 12$.

La variación de los valores del pH y de la acidez titulable de las especies silvestres de hoja, teniendo en cuenta tanto la variable año como la variable localidad, se muestra en las tablas 7.2.1 y 7.2.2. En el caso del pH, este parámetro fue relativamente estable para una misma especie, de una temporada a otra. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de la acelga silvestre, la amapola y el diente de león, que presentaron valores superiores de pH en 2008 respecto del 2007, así como la cerraja (*Sonchus oleraceus*) por presentar una variación del pH de 4,87 en 2008 a 6,14 en 2009, y la achicoria (pH de 4,72 y 6,22, respectivamente). Al tener en cuenta los resultados correspondientes a las distintas localidades de muestreo, se observó que especies como la acelga silvestre, la acedera, el cardillo, la cerraja y el diente de león se vieron más influidos por la localidad de recolección que otras especies; y de una manera más clara, la ajonjera y la cerraja, que presentaron valores de pH de alrededor de una unidad superior pH superiores en el Pioz y Valdelatas, respectivamente, mientras que la achicoria presentó un pH menos ácido en el Encín.

La **acidez titulable**, junto al contenido de ácidos orgánicos, es uno de los parámetros que mayor variación presentó al comparar los distintos años de recolección, encontrándose valores en muchos casos significativamente superiores ($p < 0,05$) en 2007 en comparación con el 2008 y 2009. Destaca la acedera (*Rumex papillaris*) especie muy ácida (con pH en torno a 2,7) que mostró un valor significativamente inferior de la acidez titulable con una diferencia de en torno a 100 ml NaOH 0,1 N/100g muestra en 2008 respecto a 2007 en una de las localidades. Respecto a la variable localidad, se observaron variaciones significativas ($p < 0,05$) en el valor de acidez de todas las muestras, a excepción de *Beta marítima*, *Rumex pulcher* y *Scolymus hispanicus*.

La acidez fue inferior en ajonjera, cerraja y cardillo recolectados en Pioz, Valdelatas y Fuentidueñas, respectivamente, lo que concuerda con valores de pH más altos en el año 2007 respecto a 2008.

Tabla 7.2.1.- Valores de pH para cada localidad y año de recolección de las verduras silvestres de hoja analizadas en el presente estudio

Especie	pH					
	Localidad A			Localidad B		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009
<i>Anchusa azurea</i>	-	7,19 ^c (0,08)	6,97 ^b (0,01)	6,43 ^a (0,08)	7,16 ^{bc} (0,04)	7,13 ^{bc} (0,11)
<i>Beta maritima</i>	6,21 ^b (0,03)	6,33 ^b (0,02)	-	5,95 ^a (0,06)	6,60 ^c (0,16)	-
<i>Papaver rhoeas</i>	6,22 ^b (0,03)	6,36 ^b (0,01)	-	4,82 ^a (0,55)	6,42 ^b (0,09)	-
<i>Rumex papillaris</i>	2,90 ^b (0,02)	3,62 ^e (0,02)	3,44 ^d (0,01)	3,03 ^c (0,03)	2,73 ^a (0,04)	-
<i>Rumex pulcher</i>	4,56 ^a (0,07)	4,87 ^c (0,08)	4,67 ^{ab} (0,06)	4,78 ^{bc} (0,02)	4,53 ^a (0,02)	-
<i>Chondrilla juncea</i>	4,58 ^a (0,04)	5,70 ^b (0,15)	-	5,98 ^c (0,06)	6,08 ^c (0,02)	-
<i>Cichorium intybus</i>	6,21 ^d (0,02)	6,04 ^c (0,02)	-	4,62 ^a (0,01)	5,78 ^b (0,03)	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	4,87 ^a (0,08)	5,95 ^{bc} (0,01)	4,88 ^a (0,08)	-	5,97 ^c (0,01)	6,14 ^c (0,03)
<i>Taraxacum obovatum</i>	5,93 ^b (0,02)	6,39 ^c (0,07)	-	5,58 ^a (0,05)	6,00 ^b (0,04)	-
<i>Scolymus hispanicus</i>	4,52 ^a (0,02)	5,68 ^b (0,03)	-	6,06 ^c (0,04)	6,49 ^d (0,01)	-
<i>Silybum marianum</i>	5,38 ^b (0,13)	5,39 ^b (0,53)	-	4,65 ^a (0,11)	5,58 ^b (0,01)	-

Valores expresados como: Media (desviación estándar, n-1), n=3. En cada fila, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 7.2.2.- Valores de acidez titulable para cada localidad y año de recolección de las verduras silvestre de hoja analizadas en el presente estudio

Especie	Acidez titulable (ml NaOH 0,1 N)					
	Localidad A			Localidad B		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009
<i>Anchusa azurea</i>	-	4,42 ^{ab} (0,20)	5,74 ^b (0,73)	10,38 ^c (1,34)	2,98 ^a (0,24)	4,05 ^{ab} (0,05)
<i>Beta maritima</i>	7,27 ^a (0,27)	16,19 ^b (0,24)	-	22,58 ^c (1,16)	8,70 ^a (0,39)	-
<i>Papaver rhoeas</i>	16,06 ^{ab} (1,78)	15,51 ^{ab} (1,20)	-	23,90 ^c (2,46)	13,89 ^a (5,32)	-
<i>Rumex papillaris</i>	168,13 ^d (13,21)	60,03 ^a (2,96)	106,80 ^b (0,31)	150,73 ^c (10,35)	152,92 ^c (9,41)	-
<i>Rumex pulcher</i>	43,30 ^d (2,09)	37,98 ^{cd} (0,12)	25,45 ^b (2,30)	33,60 ^c (2,95)	15,11 ^a (0,09)	-
<i>Chondrilla juncea</i>	15,49 ^c (0,56)	9,96 ^b (1,16)	-	6,30 ^a (0,05)	8,28 ^{ab} (0,08)	-
<i>Cichorium intybus</i>	3,66 ^a (0,56)	14,71 ^b (0,75)	-	16,74 ^b (0,36)	13,12 ^b (3,48)	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	-	35,44 ^c (2,93)	20,21 ^b (0,52)	12,09 ^a (2,93)	9,48 ^a (0,33)	9,48 ^a (0,33)
<i>Taraxacum obovatum</i>	16,35 ^c (0,50)	3,76 ^a (0,43)	-	6,29 ^b (0,07)	16,31 ^c (1,01)	-
<i>Scolymus hispanicus</i>	12,07 ^c (1,18)	6,51 ^b (0,22)	-	5,83 ^b (0,45)	2,98 ^a (0,33)	-
<i>Silybum marianum</i>	11,60 ^b (2,17)	3,39 ^a (0,53)	-	10,05 ^b (1,46)	2,77 ^a (0,26)	-

Valores expresados como: Media (desviación estándar, n-1), n=3. En cada fila, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

7.3.- Vitamina C (ácido ascórbico AA y ácido dehidroascórbico ADHA)

Como se mencionó anteriormente, el interés nutricional de ácido ascórbico (AA) no sólo proviene de su actividad como **vitamina C**, junto con su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (ADHA), sino también por ser un potente antioxidante, ya sea en el propio alimento o *in vivo* en el cuerpo humano, siendo capaz de neutralizar los posibles radicales libres presentes en el medio.

La vitamina C abunda en los alimentos de origen vegetal, destacando entre las hortalizas el pimiento verde (131 mg/100g), perejil (190 mg/100g) y las coles de Bruselas (100 mg/100g) (Moreiras et al., 2010).

Respecto al contenido medio de **vitamina C total** (correspondiente a la suma de AA + DHAA) de los vegetales silvestres de hoja objeto de estudio, se encontraron diferencias significativas entre las mismas ($p < 0,05$), siendo la especie *Silybum marianum* la especie que presentó un menor contenido total (2,73 mg/100g) mientras que en *Rumex pulcher* se encontró el contenido medio más alto de dicha vitamina (35,07 mg/100g), seguida por *Papaver rhoeas* (31 mg/100g), como se muestra en la figura 7.4 y tabla 7.4 a,b.

El AA fue la principal isoforma encontrada por término medio en *Rumex pulcher* y *Rumex papillaris* (representando un 57,66 y 55,33% respectivamente, del contenido de vitamina C total). Ambas isoformas estuvieron repartidas prácticamente a partes iguales en *Papaver rhoeas* y *Beta marítima*. Por el contrario, en *Anchusa azurea* y en las especies pertenecientes a la familia de las Asteraceas, la principal isoforma fue el ADHA; representando el AA en estos casos menos del 2,99 % del contenido total de vitamina C (incluso a veces aparece en cantidades traza, estando toda la vitamina C en su forma oxidada). Además, estas especies fueron las que presentaron niveles más bajos de vitamina C total, diferenciándose muy claramente las especies que se consumen peladas (es decir únicamente se consumen sus pencas, como es el caso de *Scolymus hispanicus* y

Silybum marianum, por sus bajos contenidos de vitamina C total (3,29 mg/100g y 2,73 mg/100g, respectivamente) y de la forma reducida (AA), con valores de 1,10 mg/100g y 0,35 mg/100g respectivamente. Esto puede ser indicativo de que la vitamina C en los vegetales está frecuentemente localizada, en niveles superiores, en los tejidos foliares como ya indicó Loewus (1999).

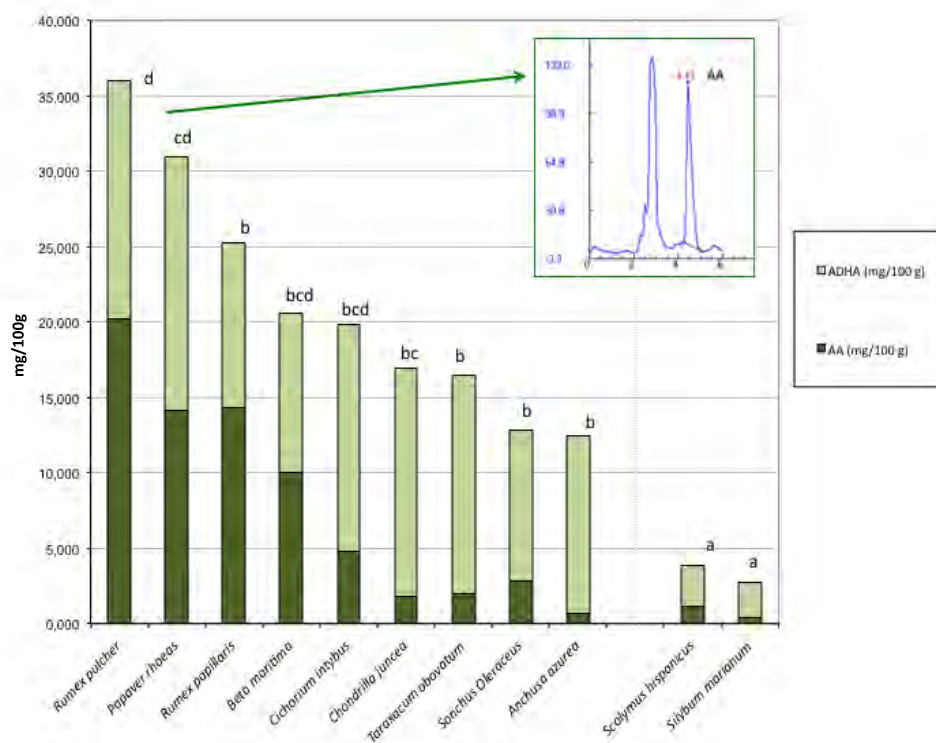


Figura 7.3.1.- Contenido medio de vitamina C total, AA y ADHA (mg/100g) en las verduras silvestres de hoja y perfil cromatográfico de ácido ascórbico presente en *Rumex pulcher*. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), $n > 12$.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por distintos autores, los valores de vitamina C totales encontrados en *Taraxacum obovatum*, en el presente estudio (16,72 mg/100g, donde 14,48 mg/100g son de ADHA) son diferentes e inferiores a los encontrados por Escudero y De Arellano (2003), quienes establecieron valores de 53 mg/100g en algunas muestras de origen argentino de dicha especie.

Vardavas et al. (2006b) analizó el contenido de vitamina C total de especies silvestres de origen cretenses, de la familia de las compuestas, como *Cichorium intybus*, *Scolymus hispanicus*, *Sonchus oleraceus* y *Taraxacum* sp., encontrando niveles superiores de dicha vitamina en comparación con las especies españolas, a excepción de la achicoria que presentó valores similares a los del presente estudio (23 mg/100g) y destacando especialmente el cardillo, el cual presentó una concentración 10 veces superior (38 mg/100g). Por el contrario, en especies como *Beta maritima* y *Papaver rhoeas*, los valores indicados por este autor son significativamente inferiores a las de sus parientes de procedencia española, un 40 y 55% menos respectivamente (Vardavas et al., 2006b).

Si comparamos ahora los contenidos de vitamina C de las plantas silvestres con sus parientes cultivados (Souci et al., 2008), algunas especies silvestres presentaron valores inferiores a las cultivadas, como es el caso de la acelga silvestre (*Beta maritima*) respecto a *Beta vulgaris*, con valores de 21,36 y 39 mg/100g, respectivamente; o del diente de león, en el cual la especie silvestre (*Taraxacum obovatum*) presenta un contenido muy inferior (16,72 mg/100g) al que presenta la especie cultivada (*Taraxacum officinale*) con 68 mg/100g. En otros casos como la achicoria (*Cichorium intybus*) el contenido de vitamina C en la especie silvestre es algo más del doble que en la variedad cultivada (19,80 y 8,7 mg/100g respectivamente).

El contenido de vitamina C total para cada localidad y año, de cada muestra considerada en este estudio se muestra en las tablas 7.3.1. a y b.

Tabla 7.3.1a.- Contenido de ácido ascórbico (AA), dehidroascórbico (ADHA) y vitamina C total en las verduras silvestres de hoja pertenecientes a la familia Asteraceae, analizadas en el presente estudio

Especie	Vitamina C (mg/100 g)				
	Año	Loc.	AA	ADHA	Vitamina C total
<i>Chondrilla juncea</i>	2007	A	3,55 ^c (0,20)	18,45 ^b (0,00)	22,11 ^c (0,00)
		B	0,57 ^a (0,01)	10,56 ^a (0,72)	11,14 ^a (0,73)
	2008	A	1,15 ^b (0,02)	17,96 ^b (0,35)	18,98 ^b (0,27)
		B	Tr.	13,80 ^{ab} (0,37)	13,80 ^{ab} (0,37)
<i>Cichorium intybus</i>	2007	A	7,00 ^c (0,28)	15,16 ^{ab} (0,48)	22,15 ^c (0,47)
		B	1,45 ^a (0,53)	18,83 ^b (1,74)	20,29 ^b (1,31)
	2008	A	3,45 ^b (0,77)	16,58 ^{ab} (0,71)	20,02 ^b (1,33)
		B	7,61 ^c (0,67)	10,07 ^a (1,75)	16,72 ^a (1,70)
<i>Sonchus oleraceus</i>	2007	A	2,82 ^{ab} (0,79)	7,87 ^a (1,40)	10,72 ^a (0,61)
		B	1,55 ^{ab} (0,48)	9,60 ^{ab} (1,95)	11,04 ^a (2,11)
	2008	A	4,03 ^b (0,21)	11,80 ^{bc} (2,77)	13,99 ^a (0,04)
		B	4,21 ^b (0,39)	13,16 ^{bc} (0,15)	17,37 ^{ab} (0,30)
	2009	B	0,71 ^a (0,01)	21,15 ^c (2,45)	21,85 ^b (2,43)
<i>Taraxacum obovatum</i>	2007	A	1,84 ^a (0,50)	10,70 ^a (1,28)	12,53 ^a (1,00)
		B	1,46 ^a (0,40)	17,65 ^b (0,92)	19,53 ^b (1,19)
	2008	A	1,46 ^a (0,18)	10,43 ^a (1,29)	11,89 ^a (1,42)
		B	2,27 ^a (0,15)	19,99 ^c (2,12)	22,94 ^b (1,74)
<i>Scolymus hispanicus</i>	2007	A	0,41 ^a (0,71)	1,14 ^{ab} (1,97)	1,55 ^{ab} (2,68)
		B	0,98 ^b (0,09)	3,81 ^c (0,67)	4,83 ^c (0,61)
	2008	A	Tr.	0,91 ^a (0,37)	0,91 ^a (0,37)
		B	Tr.	2,80 ^b (0,20)	2,80 ^{ab} (0,20)
<i>Silybum marianum</i>	2007	A	1,04 ^b (0,19)	1,90 ^a (0,29)	2,94 ^b (0,17)
		B	nd	1,87 ^a (0,14)	1,87 ^a (0,14)
	2008	A	0,49 ^a (0,18)	2,73 ^b (0,13)	3,08 ^b (0,17)
		B	Tr.	3,05 ^b (0,16)	3,05 ^b (0,15)

Valores expresados como: Media (desviación estándar, n-1), n=3. En cada columna y para cada especie, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Loc (localidad); Tr (trazas: $< 5 \mu\text{g}/100\text{g}$)

Tabla 7.3.1b.- Contenido medio de ácido ascórbico (AA), dehidroascórbico (ADHA) y Vitamina C total en las verduras silvestres de hoja pertenecientes a otras familias, analizadas en el presente estudio

Especie	Vitamina C (mg/100 g)				
	Año	Loc.	AA	ADHA	Vitamina C total
<i>Anchusa azurea</i>	2007	B	0,62 ^{ab} (0,04)	4,81 ^a (0,43)	5,41 ^a (0,41)
	2008	A	0,55 ^a (0,06)	16,58 ^b (2,23)	17,13 ^b (2,25)
		B	0,81 ^{bc} (0,05)	12,93 ^{ab} (0,96)	13,74 ^{ab} (0,92)
	2009	A	0,99 ^c (0,17)	15,75 ^b (0,01)	16,74 ^{ab} (0,15)
		B	1,39 ^d (0,04)	16,64 ^b (0,29)	18,03 ^b (0,33)
<i>Beta maritima</i>	2007	A	10,37 ^b (0,23)	9,89 ^{ab} (1,45)	20,26 ^a (1,26)
		B	10,02 ^b (0,75)	8,47 ^{ab} (5,33)	18,49 ^a (4,57)
	2008	A	11,74 ^c (0,24)	14,04 ^b (2,44)	25,78 ^a (2,66)
		B	7,82 ^a (0,81)	9,90 ^a (0,68)	19,87 ^a (1,82)
<i>Papaver rhoeas</i>	2007	A	12,52 ^a (0,52)	5,64 ^a (2,27)	18,15 ^a (1,88)
		B	14,49 ^b (0,77)	16,15 ^c (0,96)	30,65 ^c (1,24)
	2008	A	12,29 ^a (1,68)	15,37 ^b (0,82)	27,67 ^b (2,37)
		B	17,14 ^c (1,29)	30,11 ^d (0,53)	47,63 ^d (2,11)
<i>Rumex papillaris</i>	2007	A	22,49 ^b (3,30)	2,85 ^a (2,41)	25,35 ^b (0,89)
		B	7,81 ^a (0,50)	14,42 ^c (0,79)	22,22 ^{ab} (1,26)
	2008	A	6,61 ^a (1,65)	9,64 ^a (0,86)	21,07 ^{ab} (2,69)
		B	19,15 ^b (2,24)	12,40 ^b (1,30)	31,21 ^c (4,37)
	2009	A	3,15 ^a (0,05)	16,21 ^d (0,74)	18,93 ^a (0,15)
<i>Rumex pulcher</i>	2007	A	24,16 ^b (0,72)	4,27 ^a (3,33)	28,69 ^a (2,54)
		B	16,73 ^a (1,92)	12,98 ^b (1,89)	29,71 ^a (3,75)
	2008	A	22,25 ^b (1,23)	17,88 ^c (3,74)	40,13 ^b (3,49)
		B	16,65 ^a (1,90)	22,33 ^c (0,98)	38,98 ^b (1,75)
	2009	A	30,78 ^c (0,72)	16,09 ^{bc} (0,17)	46,47 ^c (0,11)

Valores expresados como: Media (desviación estándar, n-1), n=3. En cada columna y para cada especie, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).
Loc (localidad).

El ácido ascórbico es un parámetro muy condicionado por variables ambientales; en este sentido, el contenido tanto de vitamina C total como de cada una de sus formas activas, en muestras de la misma especie recolectadas en diferentes lugares y años, fue muy variable (tabla 7.3.1.a y b), llegando a alcanzar coeficientes de variación intraespecie de 49,79% (en el caso de *Anchusa azurea*). En este sentido, en el caso de la comparativa entre temporadas, se observó que la achicoria (*Cichorium intybus*), la lenguaza (*Anchusa azurea*), la ajonjera (*Chondrilla juncea*), la cerraja (*Sonchus oleraceus*), la amapola (*Papaver rhoeas*) y la romaza (*Rumex pulcher*) presentaron una variación significativa ($p < 0,05$) en el contenido de vitamina C total en 2008 respecto del 2007, concretamente, destaco la cerraja por presentar valores superiores ($p < 0,05$) en el 2009, respecto del 2008 y éste respecto del 2007, asimismo, el cardo (*Silybum marianum*) presentó valores significativamente superiores ($p < 0,05$) en el 2008 respecto del 2007. Asimismo, teniendo en cuenta la variable localidad, la ajonjera, la amapola, la acedera la cerraja y el diente de león mostraron las mayores variaciones destacando El Encín, Cadalso de los Vidrios y Valdelatas por ser las localidades en las que se observaron valores superiores en el contenido total de vitamina C para las especies anteriormente mencionadas. De entre todas ellas destacó, el diente de León *Rumex pulcher* por presentar una diferencia de en torno a 18 mg/100 g entre localidades, al igual que la amapola (*Papaver rhoeas*) por presentar valores significativamente superiores (diferencia de 12 a 20 mg/100g) entre ambos años.

La acelga silvestre (*Beta maritima*) presentó valores muy estable de vitamina C total entre localidades y años, así como respecto al reparto de ambas formas (con niveles parecidos), predominando a veces uno u otro en función del muestreo.

En general, a pesar de las variaciones encontradas en el total de vitamina C, se mantuvo el predominio de la forma AA o ADHA, para una misma especie, con la única excepción de la muestra de *Rumex papillaris* que presentó diferencias en las proporciones de ambas isoformas en las diferentes muestras analizadas.

7.4.- Ácidos orgánicos

Los **ácidos orgánicos** son compuestos imprescindibles para el normal funcionamiento del metabolismo en las plantas, y algunos de ellos pueden tener actividad biológica como antioxidantes debido a su capacidad de quelar o secuestrar metales, y por lo tanto, un impacto positivo en la salud humana (Seabra et al., 2006).

Hasta la fecha, no se han encontrado referencias bibliográficas relativas al perfil de ácidos orgánicos diferentes al ácido oxálico, en vegetales silvestres comestibles.

En las muestras objeto de estudio se identificaron el ácidos oxálico, glutámico, málico, cítrico, fumárico y succínico. A modo de ejemplo la figura 7.4.1 muestra el perfil cromatográfico típico de los ácidos orgánicos en *Rumex papillaris*.

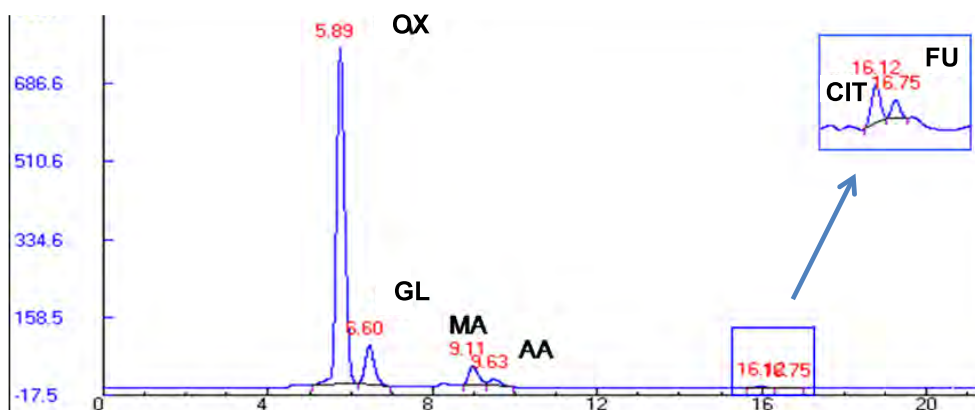


Figura 7.4.1.- Perfil cromatográfico de ácidos orgánicos de *Rumex papillaris*. Ácido oxálico (OX), Ácido glutámico (GL), ácido málico (MA), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (CIT) y ácido fumárico (FU).

Como se observa en la figura 7.4.2, el contenido total en ácidos orgánicos varía mucho en función de la especie estudiada ($p < 0,05$), desde los 0,2 g/100g aprox. presentes en *Chondrilla juncea* a los 1,2 g/100g aprox. observados en *Silybum marianum*.

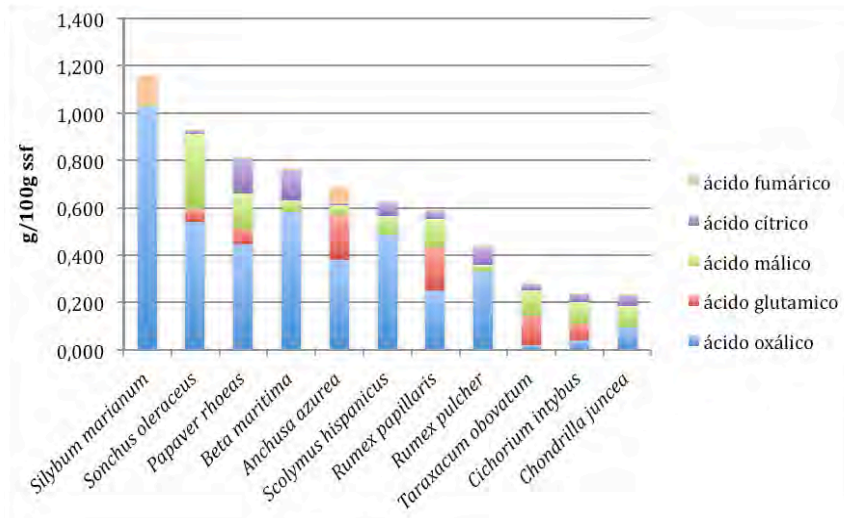


Figura 7.4.2.- Contenido de ácidos orgánicos (g/100g) de las verduras silvestres de hoja

El ácido oxálico ha sido descrito como el ácido orgánico mayoritario en muchas verduras de hoja, tanto silvestres como cultivadas (Guil et al., 1996b). En el presente estudio, el ácido oxálico, se presentó como el ácido orgánico mayoritario en todas de las especies silvestres de hoja analizadas, a excepción de *Taraxacum obovatum* y *Cichorium intybus*, cuyo ácido orgánico principal fue el ácido málico, presentando valores de 110 y 90 mg/100 g sobre materia fresca.

El ácido oxálico en las plantas, se forma a través de diferentes fuentes y/o rutas biosintéticas, donde ciertos ácidos pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarbónicos (isocítrico, oxalacético y glicólico) pueden intervenir en la síntesis de este ácido, además, del ácido ascórbico y el glioxilato, que son donadores de carbono en la síntesis de ácidos orgánicos. Son una de las principales fuentes para la síntesis del ácido oxálico en las plantas (tanto en las plantas C3 o C4) principalmente el ácido ascórbico, mediante su degradación no enzimática en ácido oxálico y ácido L-treonico, tal y como se ha comprobado por marcadores C^{14} en especies de géneros como *Beta*, *Rumex*, *Chenopodium*, *Spinacia*, etc., observándose la acumulación de ácido oxálico en las mismas (Loewus, 1999).

En algunas plantas de la familia de las Compuestas, Euforbiáceas, Quenopodiáceas, Zigofiláceas, Portulacáceas o Liliáceas, los ácidos orgánicos cobran especial importancia, (especialmente los ácidos oxálico, málico y aspártico), debido a que algunas especies de dichas familias incorporan el HCO_3^- y CO_2 atmosférico mediante el ciclo carboxílico C4 (por lo que se las conoce como plantas C4), sintetizando moléculas de cuatro átomos de carbono como son el ácido málico y aspártico, partir del fosfoenolpiruvato (PEP) por acción de la PEP-carboxilasa. El ácido oxalacético es un compuesto intermedio muy inestable por lo que rápidamente se transforma en ácido málico y aspártico, que serán transportados a la vaina, acumulándose en sus vacuolas. Así, las plantas C4 presentan concentraciones superiores de estos ácidos orgánicos respecto a las plantas C3 (plantas con ciclo carboxílico normal). Algo similar ocurre en las plantas CAM (*Crassulacean acid metabolism*) entre las que destacan las plantas suculentas y otras especies pertenecientes a las familias de las Liliáceas y Portulacáceas; las cuales han desarrollado un mecanismo de supervivencia ante épocas de sequía.

El ácido oxálico suele presentarse en mayores proporciones en las plantas en desarrollo y crecimiento, dada su intervención en el ciclo de Calvin para la síntesis de azúcares y aminoácidos. Las especies silvestres estudiadas fueron recolectadas en las primeras etapas del desarrollo foliar, dado que es en ese estadio como se consumen tradicionalmente, por lo que es asumible que las concentraciones de este ácido orgánico se encuentre en mayores proporciones, especialmente en las plantas C4 por su especial sistema de asimilación del CO_2 , que incide en el metabolismo de los ácidos orgánicos, como ya se ha comentado anteriormente (Baceló Goll et al., 1995; Lea y Leegood, 1997). En el presente estudio, los contenidos de ácido oxálico oscilaron entre 20 mg/100g a 1030 mg/100g (*Taraxacum obovatum* y *Silybum marianum*, respectivamente).

La presencia de oxalatos en las plantas puede interferir con la absorción de calcio y contribuir a la formación de cálculos renales de oxalato en el cuerpo. Aunque el ácido oxálico tiene una toxicidad relativamente baja (con 5 g como dosis mínima letal para un

adulto), su efecto negativo en la reducción de la disponibilidad de calcio en la dieta y su contribución a la formación cálculo de oxalato cálcico en los riñones es bien conocido, recomendándose que la relación entre ácido oxálico/calcio no sea superior a 2,5 en los alimentos, para evitar este efecto negativo (Guil et al., 1996b). Desde este punto de vista, se deben incluir en la dieta los alimentos con contenidos bajos de ácido oxálico, para evitar la posibilidad de efecto de formación de complejos de oxalato cálcico y sus efectos negativos.

Dicho ácido orgánico fue el mayoritario dentro de las especies de *Rumex*, estando estos resultados de acuerdo con los presentados en otras especies de *Rumex* estudiadas anteriormente por otros autores (Guil et al., 1997). Los valores de ácido oxálico publicados en especies cultivadas del diente de león *Taraxacum officinale*, están en torno a 24 mg/100 g (Souci et al., 2008), similares a los que presentan otras especies silvestres cercanas.

El cardillo y el cardo fueron dos de las especies con niveles más elevadas de ácido oxálico (490 mg/100g y 1030 mg/100g). En muchas especies, los ácidos orgánicos una vez sintetizados en el mesófilo de la hoja son acumulados en la vaina, y concretamente en estos casos, al consumirse únicamente sus pencas, es de esperar la presencia de niveles elevados de este ácido, en las mismas (Barcelló Coll et al., 1995).

En relación a la acelga silvestre, ésta presentó un contenido medio de ácido oxálico de 582 mg/100g, valor similar al de la especie cultivada, cercanos a la especie cultivada (*Beta vulgaris*), con valores de 650 mg/100g (Souci et al., 2008). Otros autores han obtenido niveles similares a los obtenidos en el presente estudio, en muestras de acelga silvestre recolectadas en zonas del sureste de España. Los elevados valores de ácido oxálico obtenidos para esta especie concuerdan también con lo indicado por Chai and Liebman (2005), los cuales establecieron valores de 1145 mg/100g en crudo para la acelga cultivada (*Beta vulgaris*).

El ácido glutámico, se encontró en seis de las once las especies silvestres de hoja, tal y como se muestra en la figura 7.4.2 y tabla 7.4.1.a y b, con valores medios en torno a 40 mg/100g a 200 mg/100 g sobre sustancia fresca, destacando *Anchusa azurea* y *Rumex papillaris*, respectivamente.

Para el ácido cítrico, los niveles medios detectados en las especies estudiadas oscilaron entre 1 mg/100g encontrados en el cardo mariano (*Silybum marianum*) frente a los 149 mg/100 g en la amapola (*Papaver rhoeas*). El ácido fumárico en las especies silvestres de hoja presentó valores inferiores a 123 mg/100 g en *Silybum marianum*, no siendo detectado en las especies pertenecientes al género *Rumex*.

Como se ha comentado anteriormente, los ácidos orgánicos son compuestos cuya síntesis está muy supeditada a las condiciones de estrés al que se ve sometida la planta, y a las condiciones geográficas y climatológicas de su entorno (Nakata, 2003). Varios estudios demuestran que las plantas utilizan los ácidos orgánicos y sus sales (como citrato y malato) en mecanismos que les permiten tolerar y eliminar metales pesados como el plomo, aluminio, cadmio, etc. que están presentes en el medio ambiente (Ryan et al., 2001; Yang, et al., 2002). Asimismo, dada su íntima relación con el ciclo fotosintético, su síntesis también se ve influida por el balance hídrico y la exposición lumínica a la que se ve expuesta la planta (López-Bucio et al., 2000).

Tabla 7.4.1a.- Ácidos orgánicos cuantificados en las verduras silvestres de hoja de la familia Asteraceae (g/100g) estudiadas

Especie	Ácidos orgánicos (g/100 g)						
	Año	Loc.	Ácido oxálico	Ácido glutámico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido fumárico
<i>Chondrilla juncea</i>	2007	A	0,02 ^a (0,00)	nd	0,01 ^a (0,00)	Tr.	Tr.
		B	0,02 ^a (0,00)	nd	0,03 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,00)	Tr.
	2008	A	0,30 ^b (0,01)	nd	0,11 ^b (0,05)	0,01 ^a (0,01)	nd
		B	0,05 ^a (0,00)	nd	0,19 ^b (0,03)	0,14 ^b (0,01)	nd
<i>Cichorium intybus</i>	2007	A	0,02 ^a (0,00)	0,03 ^a (0,01)	0,03 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	Tr.
		B	0,01 ^a (0,00)	0,03 ^a (0,00)	0,06 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,00)	Tr.
	2008	A	0,09 ^b (0,01)	0,06 ^b (0,01)	0,15 ^b (0,04)	0,08 ^b (0,01)	Tr.
		B	0,07 ^b (0,02)	0,08 ^b (0,01)	0,15 ^b (0,01)	0,02 ^a (0,00)	Tr.
<i>Sonchus oleraceus</i>	2007	A	0,10 ^a (0,02)	0,01 ^a (0,00)	0,09 ^a (0,01)	0,01 ^a (0,00)	Tr.
		B	0,39 ^b (0,12)	nd	0,20 ^{ab} (0,10)	0,02 ^a (0,01)	Tr.
	2008	A	0,39 ^b (0,05)	0,05 ^b (0,00)	0,05 ^a (0,00)	0,47 ^b (0,04)	0,04 ^a (0,00)
		B	0,84 ^c (0,03)	nd	0,40 ^b (0,16)	nd	Tr.
<i>Taraxacum obovatum</i>	2007	A	0,02 ^a (0,01)	0,04 ^a (0,00)	0,06 ^a (0,01)	0,01 ^a (0,00)	Tr.
		B	0,01 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,00)	0,10 ^{ab} (0,03)	0,01 ^a (0,00)	Tr.
	2008	A	0,03 ^a (0,00)	0,10 ^a (0,03)	0,05 ^a (0,00)	Tr.	nd
		B	0,01 ^a (0,00)	nd	0,17 ^b (0,01)	0,03 ^a (0,01)	Tr.
<i>Scolymus hispanicus</i>	2007	A	0,08 ^a (0,01)	nd	0,09 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	Tr.
		B	0,05 ^a (0,00)	nd	0,07 ^a (0,00)	Tr.	Tr.
	2008	A	0,72 ^b (0,01)	nd	0,07 ^a (0,00)	0,15 ^c (0,02)	nd
		B	1,27 ^c (0,14)	nd	0,09 ^a (0,00)	0,06 ^b (0,01)	nd
<i>Silybum marianum</i>	2007	A	0,26 ^b (0,02)	nd	Tr.	Tr.	0,01 ^a (0,00)
		B	0,19 ^a (0,00)	nd	Tr.	Tr.	0,22 ^c (0,08)
	2008	A	2,20 ^d (0,04)	nd	Tr.	nd	0,14 ^b (0,01)
		B	1,19 ^c (0,01)	nd	Nd	nd	0,13 ^b (0,01)

Valores expresados como: Media (desviación estándar, n-1) n=3. En cada fila, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Loc. (localidad); nd (no detectado); Tr. (trazas: < 5 mg/100g).

Tabla 7.4.1.b.- Ácidos orgánicos cuantificados en las verduras silvestres de hoja de otras familias (g/100g) estudiadas

Especie	Ácidos orgánicos (g/100 g)							
	Año	Loc.	Ácido oxálico	Ácido glutámico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido fumárico	
<i>Anchusa azurea</i>	2007	B	0,01 ^a (0,00)	0,22 ^a (0,04)	0,02 ^a (0,00)	0,016 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	
		A	0,48 ^{ab} (0,06)	nd	0,05 ^a (0,00)	nd	0,06 ^{ab} (0,00)	
	2008	B	0,64 ^b (0,03)	0,19 ^a (0,02)	0,19 ^b (0,02)	0,029 ^b (0,00)	0,07 ^{ab} (0,01)	
		A	0,47 ^{ab} (0,07)	nd	0,05 ^a (0,00)	nd	0,09 ^{ab} (0,01)	
	2009	B	0,37 ^{ab} (0,02)	nd	0,06 ^a (0,01)	nd	0,13 ^b (0,00)	
		A	0,22 ^a (0,43)	nd	0,01 ^a (0,00)	0,03 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	
<i>Beta maritima</i>	2007	C	0,20 ^a (0,01)	nd	0,01 ^a (0,00)	0,33 ^d (0,04)	0,01 ^a (0,00)	
		A	1,07 ^b (0,03)	nd	0,17 ^b (0,00)	0,14 ^c (0,01)	nd	
	2008	B	0,99 ^b (0,05)	nd	nd	0,08 ^b (0,01)	nd	
		A	0,20 ^a (0,01)	0,08 ^a (0,02)	0,06 ^a (0,01)	0,03 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	
<i>Papaver rhoeas</i>	2007	B	0,17 ^a (0,03)	0,11 ^a (0,01)	0,10 ^a (0,01)	0,41 ^b (0,03)	0,01 ^a (0,00)	
		A	0,63 ^b (0,07)	0,07 ^a (0,01)	0,14 ^a (0,05)	0,03 ^a (0,01)	Tr.	
	2008	B	0,85 ^c (0,05)	nd	0,28 ^b (0,01)	0,09 ^a (0,01)	Tr.	
		A	0,06 ^a (0,01)	0,34 ^b (0,00)	0,03 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	Tr.	
<i>Rumex papillaris</i>	2007	B	0,03 ^a (0,01)	0,26 ^{ab} (0,12)	0,02 ^a (0,01)	Tr.	Tr.	
		A	0,26 ^b (0,00)	0,18 ^a (0,01)	0,05 ^a (0,00)	0,03 ^a (0,00)	nd	
	2008	B	0,36 ^c (0,01)	nd	0,32 ^c (0,02)	nd	nd	
		A	0,56 ^d (0,07)	nd	0,16 ^b (0,02)	0,10 ^b (0,02)	Tr.	
	<i>Rumex pulcher</i>	2007	A	0,13 ^b (0,02)	nd	0,01 ^a (0,00)	0,03 ^a (0,00)	nd
			B	0,05 ^a (0,01)	nd	0,01 ^a (0,00)	0,05 ^a (0,01)	nd
2008		A	0,42 ^c (0,05)	nd	0,05 ^b (0,01)	0,15 ^c (0,00)	nd	
		B	0,36 ^c (0,00)	nd	0,11 ^c (0,02)	0,09 ^b (0,00)	nd	
2009	A	0,73 ^d (0,02)	nd	Tr.	nd	nd		

Valores expresados como: Media (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna y para cada especie, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Loc. (localidad); nd (no detectado); Tr. (trazas: < 5 mg/100g)

Si comparamos el contenido de ácidos orgánicos teniendo en cuenta la variable año y localidad, en 2008 y 2009 se detectaron niveles mucho más elevados que en 2007 ($p < 0,05$), especialmente en los valores de ácido oxálico (AO) a excepción del diente de león, cuyos valores permanecieron bastante estables. Destacan las especies silvestres pertenecientes a la familia Portulacaceae y Asteraceae, como *Beta maritima* o *Sonchus oleraceus* mostrando valores superiores en 2008 y 2009 en ambas localidades. Dentro de la familia de las compuestas (Asteraceae) también destacan la achicoria (*Cichorium intybus*), el cardillo (*Scolymus hispanicus*) y el cardo (*Silybum marianum*), con grandes diferencias en el contenido de ácidos orgánicos. También destacan otras especies, como *Rumex papillaris* (acedera), *Rumex pulcher* (romaza) y *Papaver rhoeas* (amapola), que presentaron valores significativamente superiores en la tercera y segunda temporada de recolección.

Teniendo en cuenta la variable localidad, no se observaron diferencias significativas en el contenido de ácido oxálico, a excepción de la acelga silvestre, destacando la localidad de Morata por observarse un mayor contenido de ácido oxálico para esta especie.

Según Massey (2007), hay por lo menos tres causas biológicas diferentes responsables de la variaciones en el contenido de oxalato en los vegetales: la parte de la planta, las diferencias genéticas entre los cultivares y las condiciones de cultivo.

En nuestro caso, las razones de las diferencias encontradas pueden deberse tanto a diferencias genéticas entre las dos poblaciones de plantas seleccionadas, así como debido a diferencias en las condiciones ambientales. En el presente trabajo, se observaron diferencias en las condiciones climáticas a que se vieron sometidas las muestras objeto de estudio. Así, comparando los datos proporcionados por el instituto nacional de meteorología (AEMET-Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino) para 2008 respecto del 2007, se apreciaron mayores temperaturas medias en los meses de recolección (marzo-abril), mientras que las precipitaciones medias fueron menores en el

mes de marzo, y superiores en el mes de abril. Dichas variaciones climáticas podrían haber condicionado la fenología o estado de desarrollo y por lo tanto la actividad metabólica de las plantas, así como la concentración de compuestos como son los ácidos orgánicos, implicados en el desarrollo, y maduración de la planta, pudiendo ser la causa de los mayores niveles de ácidos orgánicos observados en las especies estudiadas durante el 2008.

Además, dado el carácter silvestre de las especies estudiadas, el momento óptimo de recolección está condicionado al grado de maduración aparente de las mismas, pudiendo variar ligeramente de una temporada a otra. En 2008 se retrasó la fecha de recolección (entre 2 y 15 días) en la mayoría de especies silvestres de hoja, debido al lento crecimiento que experimentaron las plantas durante ese año. Teniendo en cuenta que la recolección se suele realizar antes de la floración de las mismas, en los momentos previos al incremento de la actividad metabólica, esto puede suponer que en poco tiempo, pueden variar notablemente, lo que pudiera influir en la mayor o menor presencia de estos compuestos. Otros factores también pueden condicionar los niveles de ácido oxálico en algunas especies; en el caso concreto de *Beta vulgaris*, tal y como indicaron Franceschi y Horner (1980) y posteriormente Caliskan (2000), las concentraciones en iones nitrato y amonio del medio pueden condicionar los niveles de ácido oxálico en la planta, donde altas concentraciones de estos nutrientes puede favorecer la inhibición de la oxidación del ácido oxálico, y la acumulación de dicho ácido en la planta. Dicha afirmación corrobora lo anteriormente mencionado sobre la importancia del ratio nitrato/amonio con la concentración de ácido oxálico en la planta.

El ácido glutámico mostró un comportamiento más o menos homogéneo, siendo solo identificado y cuantificado en la achicoria, la cerraja, el diente de león, la lenguaza, la amapola y la acedera, no observándose diferencias estadísticamente significativas en su contenido al comparar distintas épocas ni localidades de recolección. Únicamente *Sonchus*

oleraceus presentó variabilidad estadísticamente significativa, con valores superiores ($p < 0,05$) para las muestras recolectadas en El Encín.

Respecto al contenido de ácido málico, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temporadas, a excepción del cardillo (*Scolymus hispanicus*), el cardo (*Silybum marianum*) y el diente de león (*Taraxacum obovatum*). Si bien, dicha variación fue menos acusada que para el ácido oxálico, especialmente en especies como la acelga silvestre (*Beta maritima*), la achicoria (*Cichorium intybus*), la ajonjera (*Chondrilla juncea*) y la cerraja (*Sonchus oleraceus*), presentando diferencias de una temporada a otra, en torno a 110-300 mg/100g en función de la especie y de la localidad, destacando la achicoria y la cerraja. Asimismo, otras especies presentaron valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) en el contenido de ácido málico, como es el caso de la acedera, la romaza y la amapola silvestre (de hasta 300 mg/100g). Respecto a la influencia entre localidades, únicamente se observó variación significativa ($p < 0,05$) en el contenido de este ácido en el caso de la cerraja y el diente de león, las cuales mostraron valores superiores para las muestras recolectadas en las localidades de Cadalso de los Vidrios y Valdelatas, respectivamente.

Para el ácido cítrico, se observó la misma dinámica que para el resto de ácidos orgánicos ya mencionados, con valores significativamente superiores en 2008 y 2009 respecto a 2007, en el caso de *Chondrilla juncea*, *Rumex papillaris* y *Scolymus hispanicus*, destacando el cardillo con hasta 150 mg/100g más para las muestras recolectadas en Valdelatas. Teniendo en cuenta la influencia de la localidad en el contenido de dicho ácido orgánico, únicamente se observó variación estadísticamente significativa *Chondrilla juncea* y *Sonchus oleraceus*, mostrando valores superiores en el caso de las muestras recolectadas en el Pioz y Valdelatas, respectivamente. Esta influencia se observa especialmente en la acelga silvestre donde la acumulación de ácido oxálico, mediada por la concentración de ciertos nutrientes en el suelo, tal y como se ha mencionado anteriormente, favorece la formación de otros ácidos orgánicos como el ácido cítrico e isocítrico vía ciclo de Krebs

(Barceló Coll et al., 1995). Dicha variabilidad puede deberse al carácter silvestre de las muestras de estudio, de modo que se ven condicionadas tanto a factores propios del suelo, como es la riqueza en nutrientes, y las condiciones climatológicas.

7.5.- Ácido fólico y folatos

La importancia nutricional del **ácido fólico y sus folatos** deriva de sus efectos preventivos frente a diversas patologías, incluidos diversos tipos de tumores, enfermedad cardiovascular (debido a que reduce los niveles de homocisteína), y algunas enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Gerber, 2001; Sydow y Boger, 2001).

Los folatos están presentes en la mayoría de los alimentos, especialmente en las verduras de hoja verde, como son los berros (214 µg/100g de porción comestible), la escarola (267 µg/100g), las acelgas (196 µg/100g) y las espinacas (140 µg/100g) (Moreiras et al.,2010).

Los contenidos relativos al contenido de **ácido fólico y folatos** de las muestras analizadas en el presente estudio, se calcularon a partir de la integración de los picos cromatográficos de 5MTHF-monoglutamato y 5MTHF-diglutamato (tabla 7.5.1 y figura 7.5.1).

Tabla 7.5.1.- Contenido de ácido fólico y folatos (mg/100g) en las especies silvestres de hoja analizadas en el presente estudio

<i>Especie</i>	5MTHF-DG	5MTHF-MG	Folatos totales
<i>Anchusa azurea</i>	0,916 (0,053)	0,001 (0,000)	0,917 ^g (0,053)
<i>Beta maritima</i>	0,525 (0,065)	0,001 (0,000)	0,525 ^e (0,065)
<i>Papaver rhoeas</i>	0,249 (0,005)	0,005 (0,002)	0,254 ^{bc} (0,002)
<i>Rumex papillaris</i>	0,307 (0,001)	0,006 (0,004)	0,313 ^{cd} (0,003)
<i>Rumex pulcher</i>	0,737 (0,149)	0,007 (0,000)	0,744 ^f (0,150)
<i>Chondrilla juncea</i>	0,116 (0,050)	0,001 (0,001)	0,118 ^{ab} (0,052)
<i>Cichorium intybus</i>	0,439 (0,010)	0,001 (0,000)	0,440 ^{de} (0,010)
<i>Sonchus oleraceus</i>	0,281 (0,038)	Tr.	0,281 ^{bcd} (0,037)
<i>Taraxacum obovatum</i>	0,553 (0,086)	0,003 (0,000)	0,556 ^e (0,084)
<i>Scolymus hispanicus</i>	0,310 (0,011)	0,003 (0,000)	0,313 ^{cd} (0,008)
<i>Silybum marianum</i>	0,068 (0,001)	Tr.	0,068 ^a (0,002)

Valores expresados como: media (desviación estándar, n-1). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

5MTHF-DG (5-metiltetrahidrofólico-diglutamato), 5MTHF- MG (5-metiltetrahidrofólico-monoglutamato).

Tr. (trazas: $< 0,5 \mu\text{g}/100\text{g}$)

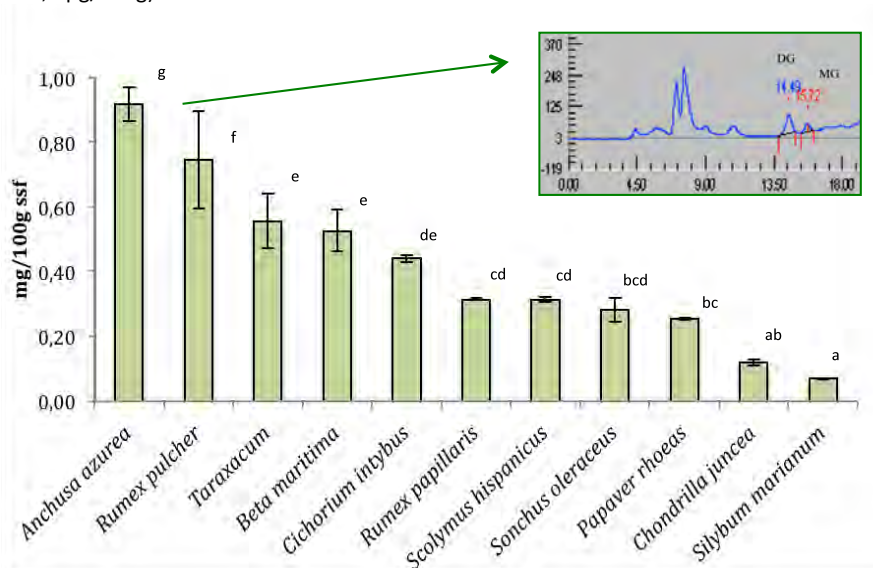


Figura 7.5.1.- Contenido total de folatos en las especies silvestres de hoja y perfil cromatográfico de folatos en *Anchusa azurea*. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

MG (5MTHF-Monoglutamato); DG(5MTHF-Diglutamato).

Anchusa azurea fue la especie que presentó un mayor contenido de folatos totales (0,917 mg/100g), seguido por *Rumex pulcher* (0,744 mg/100g), mientras que *Silybum marianum* y *Chondrilla juncea* presentaron los contenidos más bajos (0,068 y 0,118 mg/100g respectivamente).

Hasta la fecha no existen datos bibliográficos relativos al contenido de ácido fólico y folatos de las especies silvestres comestibles, con los que comparar nuestros resultados, existiendo solamente referencias bibliográficas relativas al contenido de ácido fólico y folatos de algunos parientes cultivados de algunas de las especies estudiadas, como es el caso la acelga cultivada (*Beta vulgaris*), con valores entre 0,030 y 0,045 mg/100g según Souci et al., 2008 y Miyamoto, 1973, respectivamente, mientras que otros autores indicaron contenidos superiores de 0,144 mg a 0,290 mg/100g (según Taguchi, 1972 y Iwatani et al., 2003, respectivamente), ambos valores muy inferiores a los obtenidos en su variedad silvestre (*Beta maritima*, 0,525 mg/100g), al igual que en el caso de *Cichorium intybus* y *Taraxacum obovatum*, ambas especies silvestres presentaron cantidades superiores (0,440 mg/100g y 0,556 mg/100g, respectivamente) que sus parientes cultivados *Cichorium intybus*, *Cichorium endivia* y *Taraxacum officinale*, presentando niveles de 0,050 mg/100g, 2643 pmol/g y 3219 pmol/g, respectivamente (Souci et al., 2008; Wang et al., 2010).

Considerando que las recomendaciones diarias de ingesta de vitamina B₉ están alrededor de 400 µg (Trumbo, 2002), podemos afirmar que las especies silvestres de hoja que se han analizado en el presente estudio, son una muy buena fuente de ácido fólico y folatos, dado que superan con creces las IDR (ingestas diarias recomendadas), destacando el lenguaza (*Anchusa azurea*) que aporta hasta el doble de la IDR en adultos.

7.6.- Ácidos grasos

Respecto a la caracterización de las especies silvestres de hoja estudiadas, en relación a su contenido de **compuestos lipófilos** hay que mencionar que el extracto etéreo de todas ellas fue relativamente bajo, de 1,5 g/100 g o inferior, siendo *Silybum marianum* la especie que presentó los valores más bajos ($p < 0,05$), en torno a 0,26 g/100 g, y *Chondrilla juncea* la especie que presentó mayor contenido de grasa total, 1,5 g/100g seguido por *Sonchus oleraceus* con 1,28 g/100g.

A partir de la fracción lipídica extraída, se estudió por cromatográfica de gases el perfil de ácidos grasos esenciales y no esenciales de dichos vegetales. Se identificaron y cuantificaron un total de treinta **ácidos grasos** diferentes (Tabla 7.6.1) siendo los ácidos grasos mayoritarios el ácido α -linolénico (ALA, C18:3n3), linoleico (AL, C18:2n6) y el ácido palmítico (PA, C16:0), a excepción de la especie *Sonchus oleraceus* cuyo ácido graso mayoritario fue el ácido γ -linolénico (AGL, C18:3n6) (Tabla 7.6.1; figuras 7.6.1 y 7.6.2).

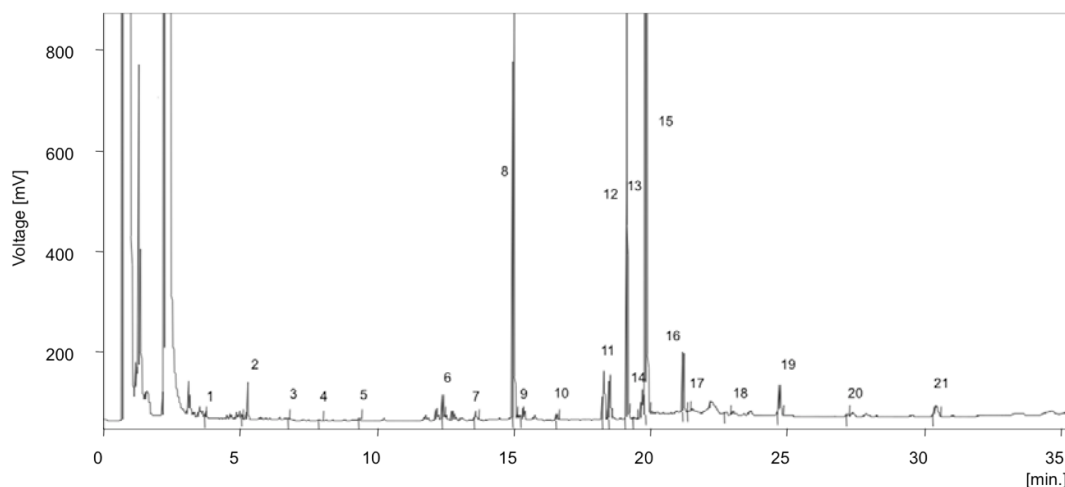


Figura 7.6.1.- Perfil cromatográfico de los ácidos grasos de *Chondrilla juncea*. 1. C6:0; 2. C8:0; 3. C10:0; 4. C11:0; 5. C12:0; 6. C14:0; 7. C15:0; 8. C16:0; 9. C16:1; 10. C17:0; 11. C18:0; 12. C18:1; 13. C18:2n6; 14. C18:3n3; 15. C18:3n6; 16. C20:0; 17. C20:1; 18. C20:3n6+21:0; 19. C22:0; 20. C23:0; 21. C24:0.

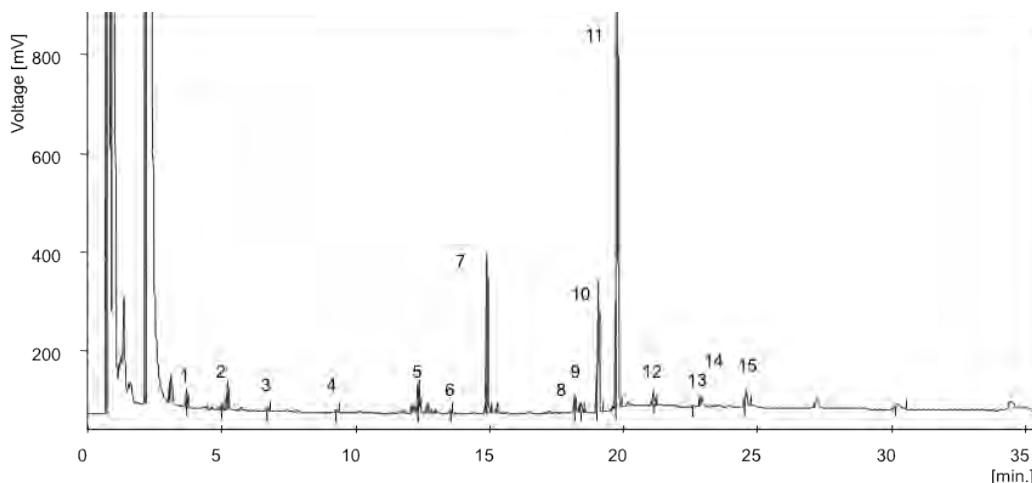


Figura 7.6.2.- Perfil cromatográfico de los ácidos grasos de *Sonchus oleraceus*. 1. C6:0; 2. C8:0; 3. C10:0; 4. C12:0; 5. C14:0; 6. C15:0; 7. C16:0; 8. C18:0; 9. C18:1n9c; 10. C18:2n6c; 11. C18:3n6; 12. C20:0; 13. C20:3n3; 14. C21:0; 15. C21:0; 16. C24:0.

El ácido palmítico (AP) es uno de los ácidos grasos saturados más comúnmente presentes en animales y plantas. En la Tabla 7.6.1 se muestran los valores de este ácido graso correspondientes a las especies de hoja estudiadas, donde el valor más bajo se presentó en la lenguaza (*Anchusa azurea*) con valores de 10,45%, mientras que el porcentaje más elevado de AP se encontró en el cardo mariano (*Silybum marianum*) con un 28,69%. Otros ácidos grasos saturados (AGS) caracterizados en las especies silvestres objeto de estudio fueron el ácido esteárico (C18:0) y el ácido lignocérico (C24:0) cuyos niveles más altos se observaron en *Silybum marianum* (5,05% y 3,36% respectivamente), así como el ácido behénico (C22:0) que se identificó en todas las muestras, a excepción de *Taraxacum obovatum*, mostrando en el cardillo (*Scolymus hispanicus*) su valor más elevado (2,31%) dentro de las especies estudiadas en este apartado.

El ácido graso monoinsaturado más abundante en las verduras silvestres de hoja fue el ácido oleico (C18:1) presente en todas las muestras con valores entre 0,92% en *Sonchus oleraceus*, a 6,41% en *Scolymus hispanicus*.

El ácido linoleico (AL) y el ácido α -linolénico (ALA) se encuentran entre los ácidos grasos poliinsaturados predominantes en las especies silvestres según estudios previos realizados sobre diferentes especies silvestres comestibles (Barros et al., 2010a). Se ha demostrado que una adecuada ingesta de estos dos ácidos grasos esenciales, puede contribuir a reducir la prevalencia de enfermedades como el asma (Oddy et al., 2004), pudiendo también prevenir la trombosis y la aterosclerosis (Hu y kits, 2001) y reducir el riesgo de cáncer de pulmón (Xia et al., 2005).

El AL se encontró en todas las muestras estudiadas, con valores desde 12,16% en *Anchusa azurea* a 31,01% en *Silybum marianum*. El ALA apareció en todas las especies a excepción de en *Sonchus oleraceus*, alcanzaron los valores más altos en *Papaver rhoeas* (64,98%), seguido de *Anchusa azurea* (64,74%), mientras que el porcentaje más bajo se encontró en *Silybum marianum* (21,60%).

En el caso de *Sonchus oleraceus*, el ácido γ -linolénico (AGL, C18:3n6), se encontró en proporciones bastante elevadas (66,31%). Este resultado discrepa de los resultados publicados por Vardavas et al. (2006a) y Guil et al. (1996a) en otras muestras de origen cretenses y español (zona centro) de la misma especie, donde establecían que el ácido graso mayoritario para la cerraja (*Sonchus oleraceus*) es el ALA (54,5% y 43,6% respectivamente), mientras que el AGL se encontraba en porcentajes inferiores.

Nuestros resultados pueden explicarse por el hecho de que el AGL es un metabolito del ácido linoleico (AL, 18:2n6), concretamente es un metabolito intermediario en el proceso de conversión de AL en ácido araquidónico (AA, 20:4n6) (Barceló-Coblijn y Murphy, 2009). El alto contenido de GLA en *Sonchus oleraceus* podría por lo tanto deberse a una actividad extremadamente alta de Δ 6-desaturasa, que transforman al AL en AGL durante la conversión de AA (20:4n6). Dicha hipótesis viene respaldada por los bajos niveles de AL (13,78%) presentes en *Sonchus oleraceus*. De esta manera, estas muestras de *Sonchus oleraceus* puede contribuir a la dieta por ser rica en AGL, su ausencia en la dieta se ha

relacionado con enfermedades, como la neuropatía diabética, artritis reumatoide, así como enfermedades cardiovasculares, reproductivas y autoinmunes (Russo, 2009).

Por otra parte, es importante destacar la presencia de otros ácidos grasos poliinsaturados, tales como el ácido eicosatrienoico (C20:3n6) y eicosapentaenoico (C20:5n3).

Los resultados obtenidos en este estudio, parecen estar en concordancia con los resultados obtenidos de otros autores que han estudiado algunos vegetales silvestres comunes a los nuestros, como es el caso de *Beta maritima* (Guil et al., 1996a), *Taraxacum obovatum*, *Scolymus hispanicus* y *Cichorium intybus* (Guil et al., 1996a). Dichos autores establecieron al AP, AL y ALA como los ácidos grasos mayoritarios, representando el ácido α -linolénico el 50%, aproximadamente.

Por otro lado, se han comparado los resultados obtenidos en nuestro estudio con datos publicados sobre sus parientes cultivados, como es el caso de *Cichorium intybus*, y de *Taraxacum officinale* (Souci et al., 2008). El AP se encontró presente en ambas especies, siendo el AL el ácido graso mayoritario en *Cichorium intybus*, mientras que en *Taraxacum officinale* fue el ALA. Dichos resultados están en concordancia con los obtenidos en el presente estudio a excepción de las muestras de *Cichorium intybus*, donde el ALA fue el ácido graso principal. Esto podría deberse a factores externos relacionados con las condiciones de cultivo, entre otros.

Tabla 7.6.1.- Contenido relativo de ácidos grasos (%) en vegetales silvestres de hoja analizadas en el presente estudio

	<i>Anchusa azurea</i>	<i>Beta maritima</i>	<i>Chondrilla juncea</i>	<i>Cichorium intybus</i>	<i>Papaver rhoeas</i>	<i>Rumex papillaris</i>	<i>Rumex pulcher</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Taraxacum obovatum</i>	<i>Scolymus hispanicus</i>	<i>Silybum marianum</i>
C6:0	nd	nd	0,10 (0,00)	nd	0,11 (0,04)	0,05 (0,02)	0,02 (0,00)	0,44 (0,19)	nd	0,22 (0,00)	nd
C8:0	nd	0,09 (0,02)	0,04 (0,00)	0,06 (0,01)	0,01 (0,01)	0,02 (0,01)	0,05 (0,01)	0,14 (0,07)	0,01 (0,01)	0,39 (0,07)	nd
C10:0	0,07 (0,02)	0,08 (0,01)	0,05 (0,01)	0,07 (0,02)	0,06 (0,02)	0,03 (0,01)	0,12 (0,01)	0,14 (0,05)	0,09 (0,01)	0,21 (0,05)	0,19 (0,07)
C11:0	0,01 (0,00)	nd	0,04 (0,00)	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)	nd	0,01 (0,00)	nd	0,01 (0,00)	nd	nd
C12:0	0,07 (0,02)	0,06 (0,00)	0,05 (0,02)	0,05 (0,01)	0,14 (0,04)	0,10 (0,02)	0,23 (0,02)	0,15 (0,03)	0,35 (0,05)	0,24 (0,01)	0,48 (0,09)
C13:0	0,01 (0,00)	nd	nd	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)	nd	0,01 (0,00)	nd	nd	nd	nd
C14:0	0,35 (0,02)	0,42 (0,00)	0,58 (0,05)	0,37 (0,08)	0,63 (0,07)	0,51 (0,35)	0,39 (0,01)	1,53 (0,32)	0,80 (0,07)	0,79 (0,00)	0,99 (0,32)
C14:1	0,16 (0,02)	0,06 (0,04)	nd	0,08 (0,09)	0,22 (0,01)	2,75 (0,33)	0,14 (0,14)	nd	0,25 (0,01)	nd	nd
C15:0	0,12 (0,00)	0,15 (0,03)	0,22 (0,03)	0,22 (0,04)	0,19 (0,03)	0,74 (0,04)	0,24 (0,02)	0,09 (0,01)	0,25 (0,04)	0,57 (0,05)	1,04 (0,00)
C16:0	10,45 (0,62)	11,03 (0,15)	12,96 (0,47)	10,64 (0,63)	9,66 (0,39)	11,20 (0,32)	9,30 (0,11)	10,43	11,83 (0,09)	20,65 (0,85)	28,69 (1,60)
C16:1	0,14 (0,01)	0,11 (0,00)	0,11 (0,00)	0,13 (0,04)	0,16 (0,01)	0,20 (0,09)	0,21 (0,01)	nd	0,21 (0,00)	1,43 (0,15)	nd
C17:0	0,22 (0,01)	0,21 (0,01)	0,38 (0,02)	0,24 (0,01)	0,24 (0,00)	0,21 (0,01)	0,33 (0,00)	nd	0,57 (0,01)	1,26 (0,00)	1,30 (0,06)
C18:0	1,67 (1,19)	1,67 (0,01)	2,17 (0,03)	1,39 (0,06)	1,46 (0,01)	0,80 (0,06)	1,73 (0,03)	1,58 (0,15)	2,45 (0,03)	3,91 (0,13)	5,05 (0,41)
C18:1n9	2,20 (0,00)	3,51 (0,01)	1,91 (0,01)	1,61 (0,04)	1,36 (0,00)	5,80 (0,14)	4,22 (0,01)	0,92 (0,10)	3,24 (0,01)	6,41 (0,07)	3,86 (0,10)
C18:2n6	12,16 (0,11)	21,28 (0,04)	19,92 (0,17)	21,14 (0,06)	16,53 (0,01)	22,79 (0,19)	17,03	13,78	17,64 (0,08)	26,44 (0,26)	31,01 (0,63)
C18:3n6	1,46 (0,03)	nd	0,13 (0,00)	0,33 (0,00)	nd	nd	nd	66,31	0,16 (0,00)	nd	nd
C18:3n3	64,74 (0,23)	57,80 (0,03)	56,27 (0,13)	60,45 (0,41)	64,98 (0,07)	51,77 (0,14)	62,97	nd	58,53 (0,23)	30,55 (0,23)	21,60 (0,25)
C20:0	1,64 (0,17)	0,46 (0,04)	2,31 (0,15)	0,63 (0,00)	1,03 (0,06)	0,27 (0,15)	0,44 (0,07)	1,25 (0,22)	0,56 (0,12)	1,58 (0,24)	nd
C20:1	0,17 (0,01)	0,25 (0,00)	0,04 (0,00)	0,05 (0,00)	0,05 (0,01)	0,19 (0,02)	0,14 (0,01)	nd	0,09 (0,02)	0,15 (0,00)	nd
C20:2	nd	nd	nd	nd	0,20 (0,14)	0,25 (0,13)	0,15 (0,04)	nd	nd	0,21 (0,02)	nd
C20:3n6	1,69 (1,18)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C20:3n3+C21:0	0,21 (0,02)	0,16 (0,03)	0,21 (0,03)	0,17 (0,04)	0,15 (0,01)	0,13 (0,06)	0,16 (0,09)	0,14 (0,04)	0,22 (0,02)	0,47 (0,05)	nd
C20:5n3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,09 (0,02)	nd	nd	nd	nd
C22:0	1,25 (0,06)	1,02 (0,03)	1,54 (0,21)	1,00 (0,19)	1,69 (0,10)	0,76 (0,04)	0,91 (0,07)	2,28 (0,28)	0,99 (0,01)	2,31 (0,13)	2,43 (1,27)
C22:1n9	0,07 (0,01)	0,06 (0,00)	nd	nd	nd	0,06 (0,01)	0,07 (0,02)	nd	nd	nd	nd
C22:2	nd	0,09 (0,01)	nd	nd	nd	0,11 (0,01)	nd	nd	nd	nd	nd
C22:6n3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C23:0	0,02 (0,03)	0,11 (0,01)	0,16 (0,01)	0,14 (0,00)	0,05 (0,01)	0,05 (0,02)	0,08 (0,01)	nd	0,17 (0,02)	0,32 (0,21)	nd
C24:0	0,72 (0,09)	1,38 (0,08)	0,81 (0,15)	1,16 (0,05)	1,10 (0,12)	1,18 (0,04)	0,90 (0,06)	0,83 (0,14)	1,51 (0,07)	1,72 (0,08)	3,36 (0,30)
C24:1	0,40 (0,03)	nd	nd	0,08 (0,09)	nd	0,05 (0,01)	0,06 (0,03)	nd	0,08 (0,02)	0,20 (0,10)	nd
Extracto etéreo (%)	0,93	0,70	1,50	0,92	1,03	1,11	0,72	1,28	1,16	0,64	0,26

Valores expresados como: Media (desviación estándar, n-1) n=3. Leyenda: Ácido Caproico (C6:0); Ácido caprylico (C8:0); Ácido caprico (C10:0); Ácido undecanoico (C11:0); Ácido láurico (C12:0); Ácido tridecanoico (C13:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido miristoleico (C14:1); Ácido pentadecanoico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido heptadecanoico (C17:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido γ -linolénico (C18:3n6); Ácido α -linolénico (C18:3n3); Ácido arachídico (C20:0); Ácido eicosenoico (C20:1c); Ácido cis-11.14-eicosadienoico (C20:2c); Ácido cis-8.11.14-eicostrienoico (C20:3n6); Ácido cis-11.14.17-eicosatrienoico y Ácido heneicosanoico (C20:3n3 + C21:0); Ácido cis-5. 8. 11. 14. 17-eicosapentaenoico (C20:5n3); Ácido heneicosanoico (C21:0); Ácido behenic0 (C22:0); Ácido erucico (C22:1n9); Ácido cis-13. 16- docosadienoico (C22:2); Ácido cis- 4. 7. 10. 13. 16. 19 – docosahexaenoico (C22:6n3); Ácido tricosanoicp (C23:0); Ácido lignoceric0 (C24:0); Ácido nervonico (C24:1). nd: no detectado.

Para evaluar el interés nutricional de las especies silvestres analizadas en lo relativo al perfil de ácidos grasos, se han calculado, los porcentajes de cada grupo de ácidos grasos (AGS, AGM y AGP), la relación entre AGP/AGS y las proporciones de ω -6/ ω -3. Dichos resultados se muestran en la Tabla 7.6.2; la Figura 7.6.3 muestra la contribución de cada grupo de ácidos grasos en todas estas especies estudiadas.

Tabla 7.6.2. Contribución de cada tipo de ácidos grasos en las especies silvestres de hoja analizadas en el presente estudio

	Total AGS (%)	Total AGMI (%)	Total AGPI (%)	AGPI/AGS	ω -6/ ω -3
<i>Anchusa azurea</i>	16,59 ^a (0,82)	3,15 ^c (0,02)	80,26 ^{ef} (0,85)	4,85 ^e (0,29)	0,24 ^a (0,02)
<i>Beta maritima</i>	16,68 ^a (0,02)	4,00 ^d (0,03)	79,33 ^e (0,01)	4,76 ^e (0,00)	0,37 ^e (0,00)
<i>Chondrilla juncea</i>	21,41 ^c (0,02)	2,06 ^b (0,01)	76,53 ^d (0,02)	3,57 ^c (0,00)	0,35 ^d (0,00)
<i>Cichorium intybus</i>	15,96 ^a (0,52)	1,95 ^b (0,00)	82,09 ^f (0,10)	5,14 ^{ef} (0,05)	0,35 ^d (0,00)
<i>Papaver rhoeas</i>	16,37 ^f (0,22)	1,78 ^b (0,01)	81,85 ^f (0,23)	5,00 ^{ef} (0,08)	0,25 ^a (0,00)
<i>Rumex papillaris</i>	15,91 ^a (0,11)	9,03 ^g (0,30)	75,05 ^c (0,27)	4,72 ^e (0,04)	0,44 ^e (0,00)
<i>Rumex pulcher</i>	14,77 ^a (0,09)	4,83 ^e (0,15)	80,39 ^{ef} (0,06)	5,44 ^f (0,03)	0,27 ^b (0,00)
<i>Sonchus oleraceus</i>	18,85 ^b (0,73)	0,92 ^a (0,10)	80,23 ^{ef} (0,68)	4,26 ^d (0,20)	511,5 ^h (20,86)
<i>Taraxacum obovatum</i>	19,58 ^{bc} (0,28)	3,67 ^{cd} (0,04)	76,55 ^d (0,32)	3,91 ^{cd} (0,07)	0,30 ^c (0,00)
<i>Scolymus hispanicus</i>	34,16 ^d (0,53)	8,19 ^f (0,03)	57,66 ^b (0,56)	1,69 ^b (0,04)	0,85 ^f (0,00)
<i>Silybum marianum</i>	43,53 ^e (0,98)	3,86 ^d (0,10)	52,61 ^a (0,87)	1,21 ^a (0,05)	1,44 ^g (0,01)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

AGS (ácidos graso saturados); AGMI (ácidos grasos monoinsaturados); AGPI (ácidos grasos poliinsaturados).

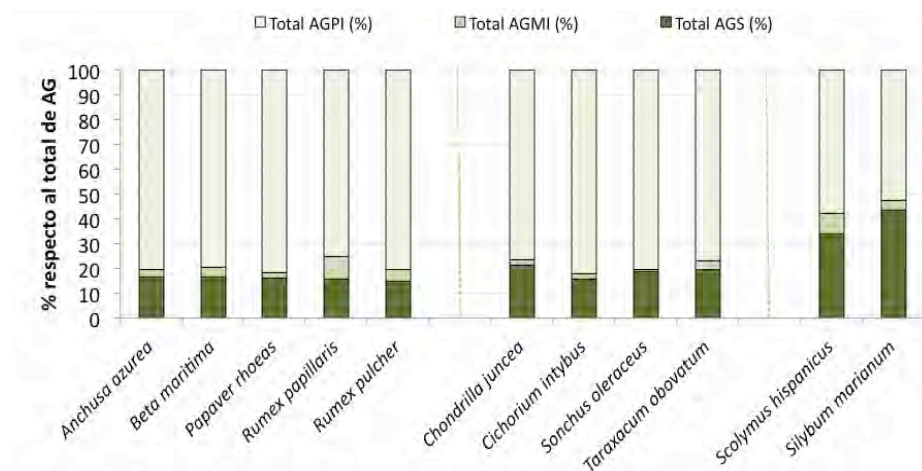


Figura 7.6.3. Contribución de de AGS, AGMI y AGPI respecto al contenido total de ácidos grasos presentes en los vegetales silvestres de hoja analizadas en el presente estudio

AGS (ácidos graso saturados); AGMI (ácidos grasos monoinsaturados); AGPI (ácidos grasos poliinsaturados).

Como se puede observar en la Tabla 7.6.2 y figura 7.6.3, las especies silvestres cuyas de hojas basales que se consumen peladas presentan los mayores niveles de ácidos grasos saturados (AGS) en comparación con el resto de especies silvestres de hoja ($p < 0,05$), siendo *Silybum marianum* la que presentó el valor más alto para el total de ácidos grasos saturados (SFA) en torno a 43,53%, mientras que *Rumex pulcher* presentó el menor valor con un 14,77%, aunque hay que tener en cuenta que la cantidad de grasa total (extracto etéreo) en el cardo mariano es la más baja (0,26 g/100 g).

En lo que respecta al contenido total de ácidos grasos monoinsaturados, tal y como se observa en la tabla 7.6.2, *Rumex papillaris* presentó el valor más alto (9,03%) en contraste con *Sonchus oleraceus* y *Tamus communis* (0,92%), mientras que el contenido total de ácidos grasos poliinsaturados, en la achicoria (*Cichorium intybus*) fue más elevado (82,09%) y *Silybum marianum* presentó el más bajo (52,61%).

Se ha demostrado que una baja proporción de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en la dieta, inferior a 0,45%; así una valor bajo en la relación AGPI/AGS, podría considerarse

como un factor de riesgo importante en cardiopatías coronarias (McGee et al., 1984; Russo, 2009). La "típica" dieta mediterránea se caracteriza por tener una baja proporción en ácidos grasos saturados (AGS) y alta en ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Como se puede observar en la Tabla 7.9 todas las muestras analizadas revelan una relación de AGPI/AGS superior a 1,2, en particular, *Rumex pulcher* (5,44), *Cichorium intybus* (5,14) y *Papaver rhoeas* (5,00) que alcanzaron los valores más altos.

Por otro lado, cada vez es más evidente que la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados ω -6 y la relación entre los ácidos grasos ω -3 y ω -6 tienen efectos importantes para la salud, la preocupación por la relación entre los ω -6/ ω -3 vienen impulsada por una baja ingesta de ácidos grasos ω -3, aunque el consumo de ω -6 se encuentra dentro de las recomendaciones (Ward y Singh, 2005). Simopoulos (2002) afirmó que proporciones de ω -6/ ω -3 en torno a valores de 2-3/1 suprime la inflamación en pacientes con artritis reumatoide; en torno a 5/1 tiene un efecto beneficioso en pacientes con asma, mientras que una proporción de 10/1 puede ser negativo. Como se muestra en la Tabla 7.9, todas las muestras presentaron niveles relativamente bajos de la relación ω -6/ ω -3 (ligeramente más altos para las hojas que se consumen peladas), siendo en todos los casos inferiores a 1,5, a excepción de *Sonchus oleraceus*, presentó un valor bastante elevado (511,5) debido a sus elevado contenido de GLA.

7.7.- Tocoferoles (Vitamina E)

Los **tocoferoles** (vitamina E) en los vegetales silvestres de hoja, son nutrientes de origen natural, con capacidad antioxidante que juegan un papel importante al inactivar los radicales libres producidos por la actividad celular y derivados de los distintos factores de estrés. Siendo una de sus principales funciones la de proteger a los AGPI y otros componentes de las membranas celulares y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la oxidación por radicales libres (Duthie, 1993).

Son numerosos los alimentos que contienen vitamina E en su composición, destacando los frutos secos como las nueces, semillas oleaginosas y aceites vegetales, y algunos vegetales como los espárragos, las espinacas, los berros, el brécol y el tomate, con contenidos entre 1,2 y 2,5 mg de vitamina E por 100g de porción comestible (Moreiras et al., 2010).

Las cuatro isoformas (α , β , γ y δ -tocoferoles) fueron identificadas en las especies estudiadas. La figura 7.7.1 muestra, a modo de ejemplo, un perfil cromatográfico de tocoferoles en *Sonchus oleraceus*, y la figura 77.2 muestra el contenido de tocoferoles en las muestras analizadas.

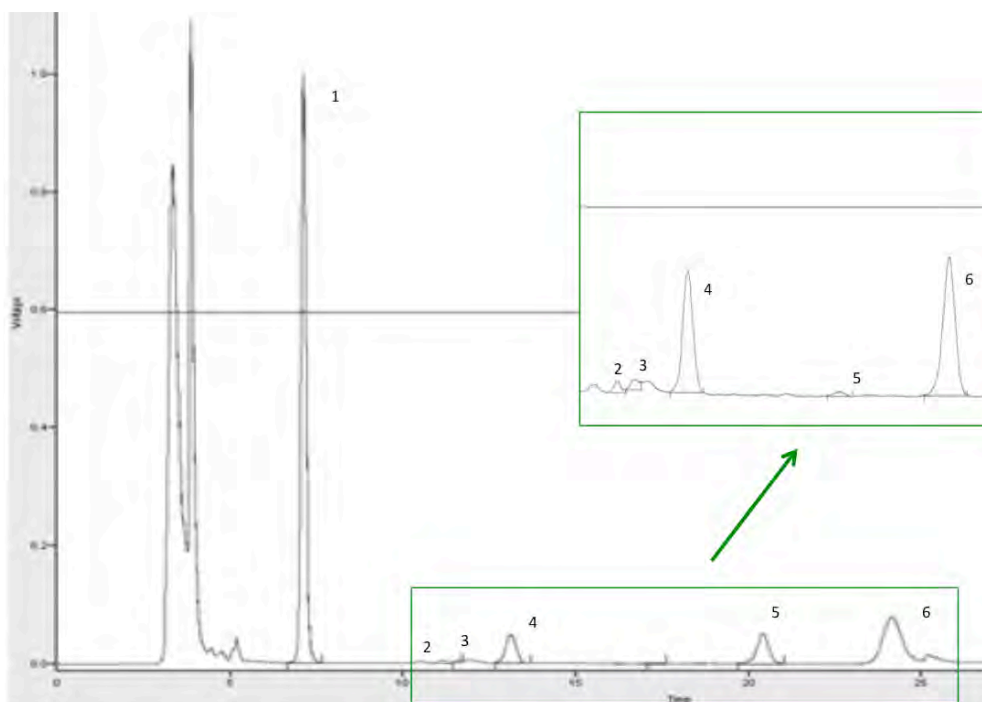


Figure 7.7.1.- Perfil cromatográfico HPLC-fluorescencia de *Sonchus oleraceus*. (1) α -tocoferol; (2) BHT (butilhidroxitolueno); (3) β -tocoferol; (4) γ -tocoferol; (5) δ - tocoferol; (6) P.I. – Patrón interno (tocol).

El α -tocoferol se considera como la isoforma más activa de la vitamina E (Caretto et al., 2010), siendo a su vez la más abundante en las especies silvestres de hoja analizadas

(entre 1,70 y 0,02 mg/100g), a excepción de las siguientes especies: *Cichorium intybus* cuya isoforma predominante fue el γ -tocoferol (1,88 mg/100g) y *Silybum marianum* donde el δ -tocoferol fue la isoforma más abundante (0,10mg/100g), tal como puede apreciarse en la tabla 7.7.1. Dichos resultados coinciden con los previamente obtenidos por otros autores en diferentes estudios realizados en otras especies silvestres (Varadavas et al., 2006; Barros et al., 2010b).

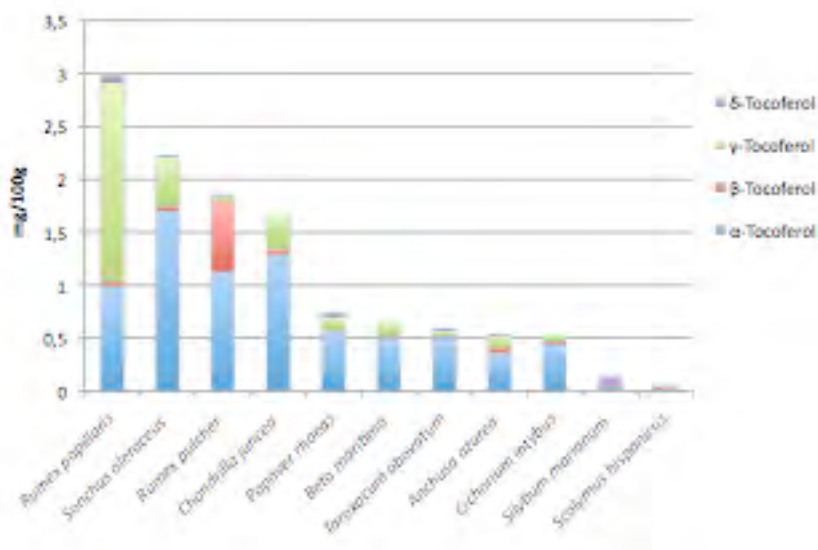


Figura 7.7.2.- Contenido total de tocoferoles y sus isoformas en vegetales silvestres cuyas hojas basales son tradicionalmente consumidas. Las diferentes letras indican significación estadística ($p < 0,05$).

Tabla 7.7.1.- Composición de tocoferoles (mg/100g) en las especies silvestres analizadas en el presente estudio

Especie	α -Tocoferol	β -Tocoferol	γ -Tocoferol	δ -Tocoferol	Totales
<i>Anchusa azurea</i>	0,36 ^{abc} (0,08)	0,05 ^a (0,00)	0,11 ^a (0,02)	0,01 ^a (0,00)	0,48 ^b (0,09)
<i>Beta maritima</i>	0,51 ^{abc} (0,02)	0,01 ^a (0,00)	0,14 ^a (0,00)	Tr.	0,63 ^b (0,15)
<i>Chondrilla juncea</i>	0,57 ^{bc} (0,18)	0,01 ^a (0,01)	0,12 ^a (0,01)	0,05 ^c (0,01)	0,74 ^b (0,21)
<i>Cichorium intybus</i>	0,99 ^c (0,11)	0,04 ^a (0,01)	1,88 ^c (0,09)	0,08 ^c (0,00)	2,98 ^e (0,19)
<i>Papaver rhoeas</i>	1,13 ^c (0,06)	0,66 ^b (0,13)	0,05 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,01)	1,87 ^{cd} (0,19)
<i>Rumex papillaris</i>	1,29 ^d (0,44)	0,05 ^a (0,02)	0,34 ^b (0,13)	nd	1,67 ^{cd} (0,58)
<i>Rumex pulcher</i>	0,44 ^{abc} (0,02)	0,03 ^a (0,01)	0,07 ^a (0,00)	nd	0,54 ^b (0,02)
<i>Sonchus oleraceus</i>	1,70 ^d (0,05)	0,04 ^a (0,01)	0,47 ^b (0,03)	0,01 ^a (0,00)	2,22 ^d (0,06)
<i>Taraxacum obovatum</i>	0,51 ^{abc} (0,02)	0,01 ^a (0,00)	0,05 ^a (0,00)	0,03 ^b (0,01)	0,60 ^b (0,01)
<i>Scolymus hispanicus</i>	0,02 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	Tr.	0,05 ^a (0,00)
<i>Silybum marianum</i>	0,04 ^{ab} (0,00)	Tr.	0,01 ^a (0,00)	0,10 ^d (0,00)	0,15 ^a (0,00)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1). En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

nd (no detectado); Tr (trazas: $< 5 \mu\text{g}/100\text{g}$)

Dentro de las especies silvestres de hoja, *Rumex papillaris*, presentó el mayor contenido de tocoferoles totales (2,98 mg/100g), destacando por presentar niveles excepcionalmente altos de γ -tocoferol. Le siguen *Sonchus oleraceus* (2,22 mg/100 g), con los niveles más altos de α -tocoferol respecto a las demás especies (1,70 mg/100 g), y *Rumex pulcher*, que destacó por ser la única especie con niveles destacables de β -tocoferol ($p < 0,05$). Estos resultados son indicativos de que estas dos especies (la ajonjera y la cerraja) son las que probablemente presentan mayor actividad vitamínica E de las incluidas en este capítulo, por presentar altos contenidos de α -tocoferol.

Por otro lado, *Scolymus hispanicus* y *Silybum marianum*, en las que se consume únicamente la penca, destacaron por presentar los contenidos más bajos de tocoferoles totales ($p < 0,05$) respecto a las especies donde se consume la totalidad de la hoja sin

necesidad de pelarlas previamente (0,15 mg/100 g y 1,08 mg/100 g, respectivamente). Nuevamente, este tipo de compuestos podría estar asociado a los tejidos foliares de los vegetales.

El δ -tocoferol se encontró en todas las verduras de hoja estudiadas a excepción de *Chondrilla juncea* y *Cichorium intybus*, y con valores por debajo de 0,01 mg/100g para la acelga silvestre (*Beta maritima*) y el cardillo (*Scolymus hispanicus*) (Tabla 7.10).

Hoy en día existe poca información disponible sobre el contenido de tocoferoles de los parientes cultivados de las especies silvestres estudiadas; solo existe información disponible sobre el contenido de tocoferoles para *Taraxacum officinale*. Souci et al. (2008) hacen referencia al contenido total de tocoferoles totales (2,5 mg/100 g), siendo el α -tocoferol, la única isoforma caracterizada (2,5 mg/100 g); dichos valores son superiores al que presenta su análoga silvestre (0,51 mg/100 g).

Vardavas et al. (2006b) realizó un estudio similar a este en algunas especies silvestres de Creta (*Cichorium intybus*, *Beta marítima*, *Papaver rhoeas*, *Scolymus hispanicus*, *Sonchus oleraceus* y *Taraxacum* sp.). En dicho estudio únicamente se analizaron las isoformas α y γ -tocoferol de toda la parte aérea de la planta, concluyendo que el α -tocoferol fue la isoforma predominante en las especies silvestres estudiadas, lo que coincide con los resultados del presente estudio.

7.8.- Compuestos fenólicos y flavonoides totales

Los **compuestos fenólicos** son un grupo de compuestos, producto del metabolismo secundario de las plantas, cuyas propiedades antioxidantes juegan un papel importante tanto en la estabilidad de los alimentos, como en los mecanismos de defensa antioxidante de los sistemas biológicos (Nijveldt et al., 2001). Multitud de estudios indican la

importancia de las plantas, ya sean cultivadas o silvestres, en la alimentación por su elevado contenido de compuestos fenólicos.

Para una correcta interpretación y discusión de los resultado, en el presente estudio se procedió a calcular el contenido de **compuestos fenólicos y flavonoides** expresados de dos formas diferentes, por un lado como meq de ácido gálico/100g y meq de catequina/100 respectivamente (ambos sobre sustancia fresca), tal y como se muestra en la figura 7.8.1, y por otro lado como meq de ácido gálico/g extracto metanólico y meq de catequina/g extracto metanólico tal y como se indica en la tabla 7.8.1.

Como se puede observar en la figura 7.8.1, las especies silvestres cuyas hojas se consumen peladas fueron las que menor ($p < 0,05$) contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides presentaron, de modo que el cardo (*Silybum marianum*) presentó para los fenoles totales, 11,55 meq de ácido gálico/100g de muestra fresca, y 3,51 meq de catequina/100g, respectivamente. Mientras que la achicoria (*Cichorium intybus*) y la acelga (*Beta marítima*) destacaron por ser las especies silvestres de hoja que mayor contenido total de compuestos fenólicos presentaron (430 y 358 meq de ácido gálico/100g, respectivamente), así como las que mayor contenido de flavonoides mostraron (183 y 124 meq catequina/100g muestra).

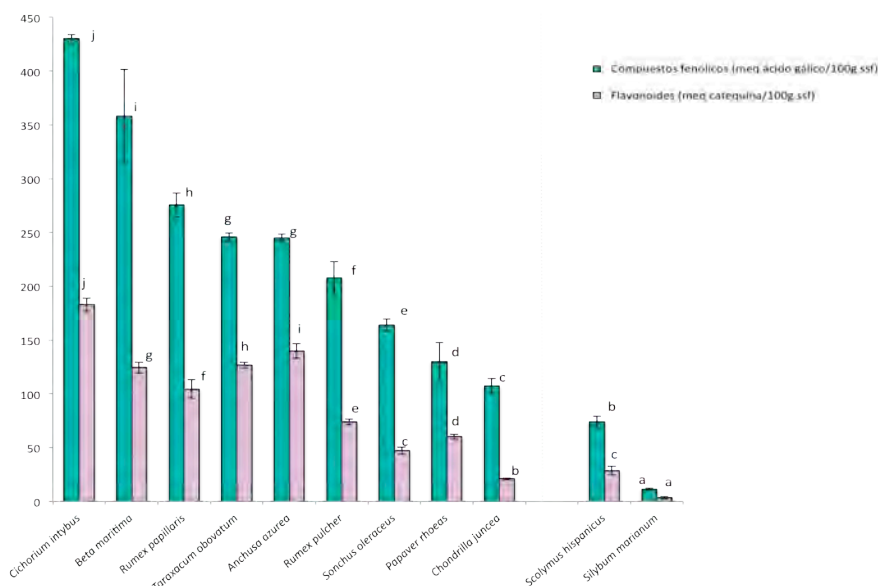


Figura 7.8.1.- Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales en los vegetales silvestres estudiados. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 7.8.1.- Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales analizadas en el presente estudio

Especie	Compuestos fenólicos totales (meq AG/g extracto)	Flavonoides (meq Cateq/g extracto)
<i>Anchusa azurea</i>	148,62 ^h (2,00)	84,81 ⁱ (4,03)
<i>Beta maritima</i>	61,91 ^e (7,51)	21,55 ^e (0,87)
<i>Papaver rhoeas</i>	25,86 ⁱ (3,52)	12,00 ^c (0,46)
<i>Rumex papillaris</i>	104,18 ^g (4,17)	39,49 ^h (3,26)
<i>Rumex pulcher</i>	73,44 ^j (5,32)	26,14 ^f (0,87)
<i>Chondrilla juncea</i>	37,66 ^c (2,40)	7,43 ^b (0,28)
<i>Cichorium intybus</i>	73,68 ^f (0,66)	31,35 ^g (1,00)
<i>Sonchus oleraceus</i>	51,33 ^d (1,75)	14,83 ^d (0,98)
<i>Taraxacum obovatum</i>	58,26 ^e (0,90)	30,03 ^g (0,66)
<i>Scolymus hispanicus</i>	21,51 ^b (1,51)	8,39 ^b (1,12)
<i>Silybum marianum</i>	3,72 ^a (0,36)	1,13 ^a (0,27)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). AG (ácido gálico); Cateq (catequina).

Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio, con lo publicado por Conforti et al. (2009) al analizar muestras de *Cichorium intybus*, *Papaver rhoeas* y *Sonchus oleraceus* procedentes de Italia, se observa que el contenido de compuestos fenólicos totales (190 mg EAG/g, 72 mg EAG/g y 61 mg EAG/g, respectivamente) es ligeramente superior en las plantas de procedencia italiana que en las muestras recolectadas en española estudiadas en el presente trabajo. Mientras que el contenido de flavonoides totales (10 mg EC/g de extracto metanólico, 4,68 mg EC/g de extracto metanólico y 32,93 mg EC/g extracto metanólico) es inferior en el caso de las plantas de origen italiano a excepción de *Sonchus oleraceus*. Respecto a la relación entre flavonoides/fenoles totales, en las especies de Italia fue mucho menor para la achicoria y la amapola que para de origen español, con valores en torno a 0,0527 mg EC/g, 0,065 mg EC/g y similares para la cerraja (0,531 mg EC/g).

Como se puede observar en la figura 7.8.1 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en cuanto al contenido de fenoles y flavonoides totales en las especies silvestres con hojas peladas (*Scolymus hispanicus* y *Silybum marianum*) con respecto al resto de especies silvestres estudiadas en este capítulo. Esto podría atribuirse a que al eliminar la parte exterior de la hoja dejando únicamente la penca como parte comestible de las mismas, se eliminan junto con otros compuestos bioactivos (vitamina C, tocoferoles) gran parte del contenido de fenoles y flavonoides que pudieran localizarse mayoritariamente en los tejidos foliares.

7.9.- Capacidad antioxidante.

Para valorar la capacidad antioxidante de las muestras objeto de estudio se aplicaron distintos métodos analíticos *in vitro* (DPPH, poder reductor, inhibición de la decoloración del β -caroteno, TBARS).

Para discutir los resultados obtenidos las especies estudiadas se dividieron en dos grandes subgrupos, comparando por un lado las especies pertenecientes a la familia Asteraceae y por otro lado el resto de especies silvestres de hoja pertenecientes a otras familias (ver figuras 7.9.1a y b correspondientes a diferentes curvas de cinética de los ensayos de capacidad antioxidante realizados).

La valoración de la actividad antioxidante total se ha realizado mediante el ensayo de DPPH y del poder reductor (PR).

Podemos comprobar que para el ensayo del DPPH (valoración de la actividad antioxidante total) las especies que no pertenecieron a la familia de las Asteraceae presentan cinéticas de saturación a concentraciones inferiores, alcanzando el 80% de capacidad inhibitoria a concentraciones entre 2 y 4 mg/ml de extracto, a excepción de *Papaver rhoeas* que alcanzo dicho porcentaje a 16 mg/ml. *Anchusa azurea* fue la especie que presentó mayor capacidad antioxidante, alcanzando dicho porcentaje de capacidad inhibitoria a 0,0625 mg/ml. Respecto a las especies silvestres pertenecientes a la familia Asteraceae, todas alcanzaron el 80% de capacidad inhibitoria a concentraciones superiores a 4 mg/ml, siendo *Silybum marianun* la especie silvestre que peor resultados presentó, alcanzando únicamente el 61,15% de la capacidad inhibitoria a 16 mg/ml.

En relación al método del poder reductor (PR), todas las hojas analizadas no pertenecientes a la familia Asteraceae presentaron cinéticas de saturación a concentraciones iguales o inferiores a 4 mg/ml, a excepción de *Papaver rhoeas* que alcanzó su meseta de saturación a 8 mg/ml. Mientras que las especies pertenecientes a la familia de las compuestas (Asteraceae) *Scolymus hispanicus*, *Silybum marianum* y *Sonchus oleraceus* alcanzaron su meseta de saturación a concentraciones superiores a 16 mg/ml; Siendo *Chondrilla juncea*, *Cichorium intybus* y *Taraxacum obovatum* las únicas especies pertenecientes a este subgrupo que alcanzaron su punto de saturación a 4 mg/ml de extracto.

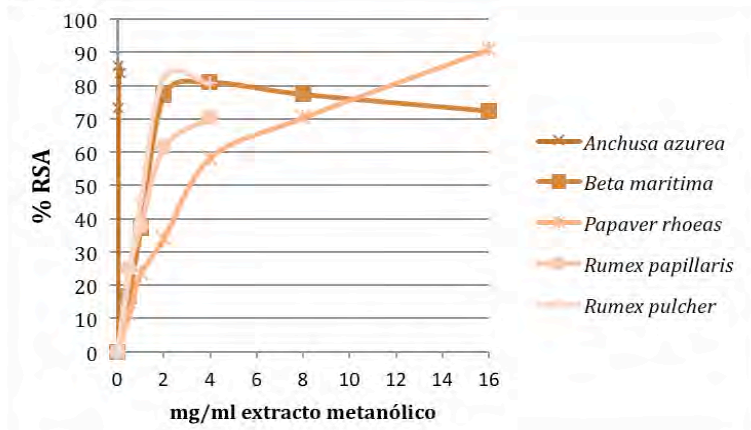
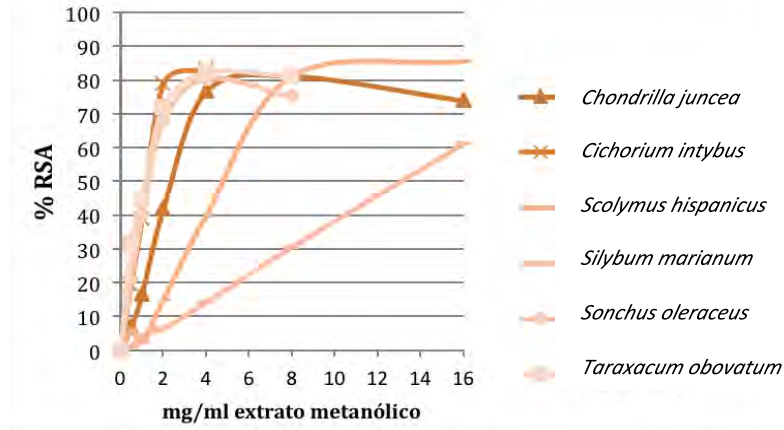
La evaluación de la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica se valoró mediante la aplicación del ensayo de inhibición de la decoloración del β -caroteno y del TBARS.

Los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la decoloración del β -caroteno fueron muy similares a los de la valoración de la actividad antioxidante total, donde se observó que las especies no pertenecientes a la familia Asteraceae, de este grupo únicamente *Beta maritima* y *Rumex papillaris* fueron las dos especies que a 2 mg/ml de concentración del extracto no alcanzaron el 80% de la capacidad inhibitoria frente a este método, pero presentando porcentajes bastante cercanos, de 76,45 y 75,53% respectivamente.

En el caso de las especies pertenecientes a la familia Asteraceae, se observó para este método, a excepción de *Cichorium intybus* y *Sonchus oleraceus*, que a una concentración de 2 mg/ml de extracto éstas no alcanzaban el 80% de la capacidad inhibitoria, destacando *Scolymus hispanicus* y *Silybum marianum* por presentar los menores porcentajes de inhibición a dicha concentración (47,88 y 60,02%, respectivamente).

Para el método TBARS, se observa una mayor variabilidad de resultados, donde con 0,125 mg/ml de extracto (concentración máxima estudiada para este método) únicamente especies *Papaver rhoeas* y *Rumex pulcher* presentaron porcentajes de inhibición cercanos al 80% para dicha concentración, en torno al 73 y 78%, respectivamente, y sólo tres especies pertenecientes a la familia Asteraceae alcanzaron el 80% de la capacidad inhibitoria para este método (*Cichorium intybus*, *Scolymus hispanicus* y *Sonchus oleraceus*).

Cinética del ensayo DPPH



Cinética del ensayo Poder Reductor

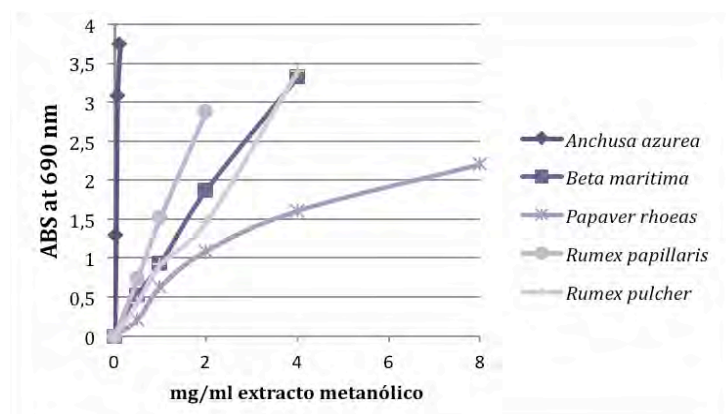
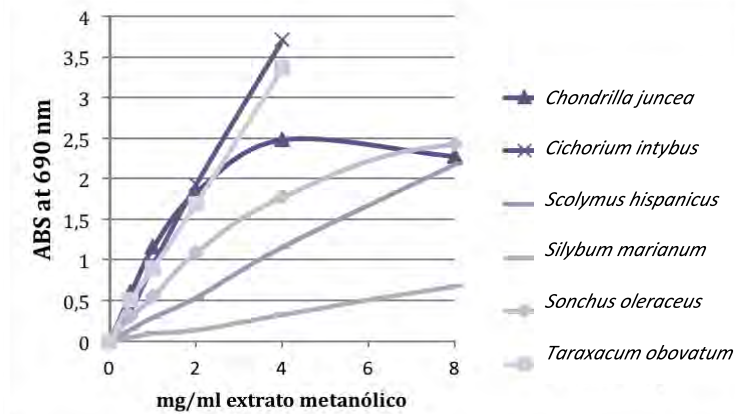
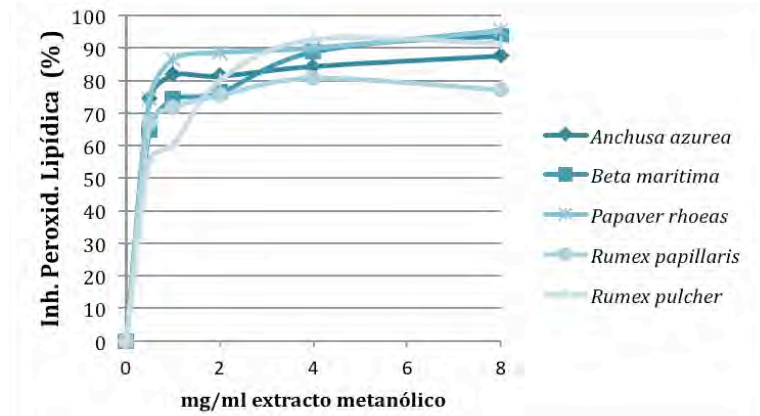
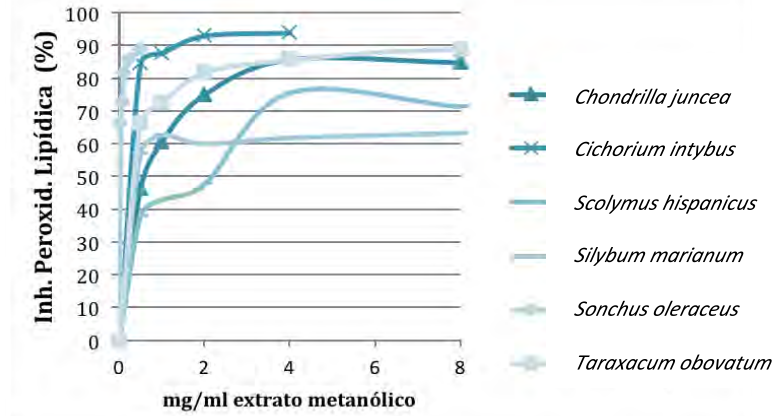


Figura 7.9.1a.- Cinéticas obtenidas a partir de los ensayos de capacidad antioxidante in vitro (DPPH y PR) realizados sobre las hojas de especies silvestres analizadas

Cinética del ensayo de Inhibición de la decoloración del β - Caroteno



Cinética del ensayo TBARS

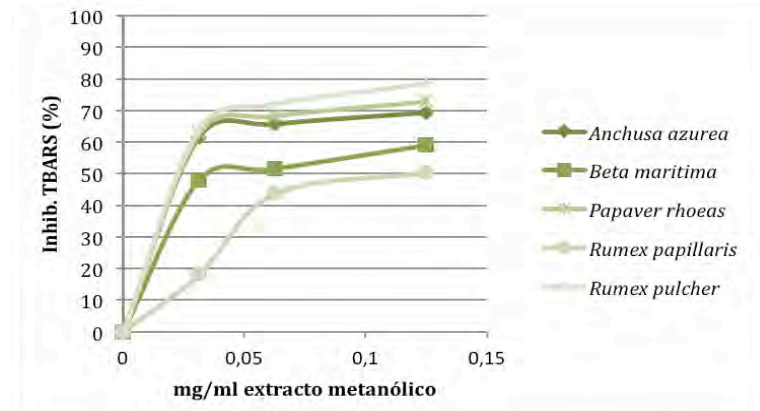
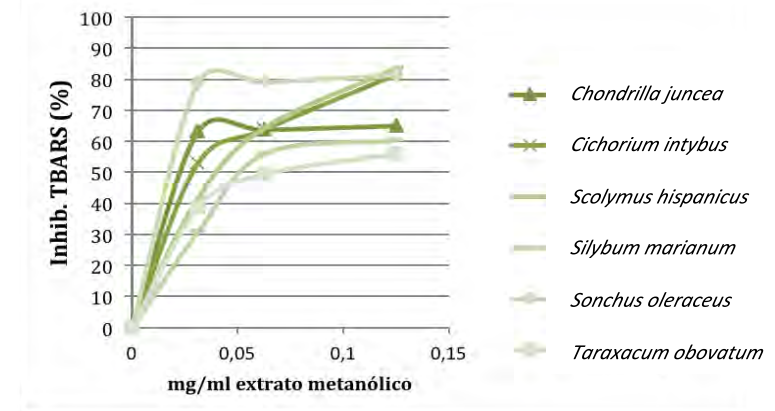


Figura 7.9.1b.- Cinéticas obtenidas a partir de los ensayos de capacidad antioxidante *in vitro* (I.D. β -caroteno y TBARS) realizados sobre las especies analizadas

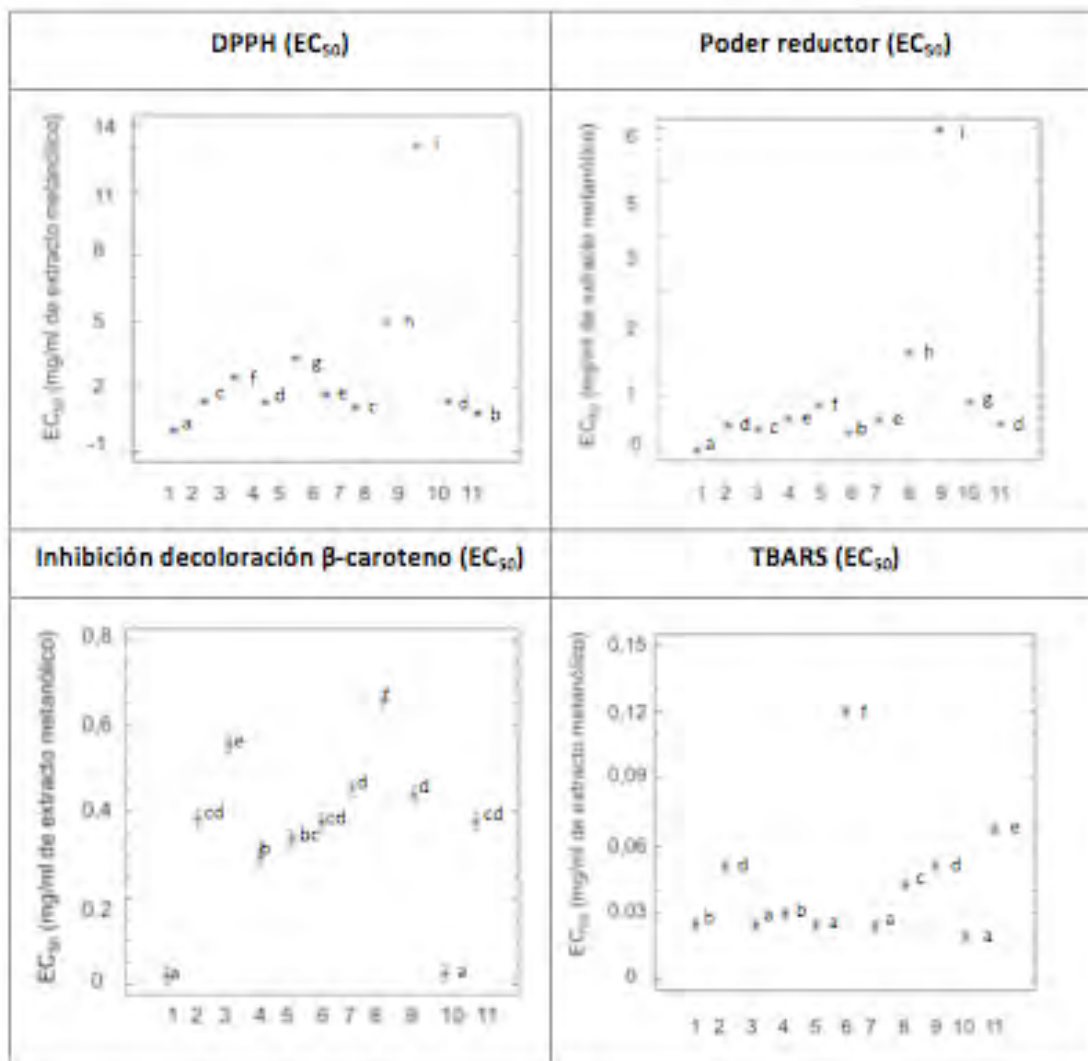


Figura 7.9.2.- Test de Duncan ($p < 0,05$) para EC₅₀ (mg/ml extracto metanólico) de las especies silvestres de hojas. Donde: *Anchusa azurea* (1), *Beta marítima* (2), *Chondrilla juncea* (3), *Cichorium intybus* (4), *Papaver rhoeas* (5), *Rumex papillaris* (6), *Rumex pulcher* (7), *Scolymus hispanicus* (8), *Silybum marianum* (9), *Sonchus oleraceus*(10) y *Taraxacum obovatum* (11).

Anchusa azurea presentó la mayor capacidad antioxidante medida por tres de los métodos empleados en el presente estudio (DPPH, poder reductor e inhibición de la decoloración del β-caroteno), así como también muy buenos resultados para el ensayo del TBARS, lo

cual nos indica el gran potencial que presenta dicha especie como protector frente al estrés oxidativo y a la peroxidación lipídica.

Las especies de hojas peladas, que son las que menor capacidad antioxidante presentan frente al ensayo del DPPH y al del poder reductor, con valores de EC_{50} de 4,97 mg/ml y 5,97 mg/ml, respectivamente, para el *Scolymus hispanicus*, y valores de EC_{50} de 13,09 mg/ml y 1,82 mg/ml para *Silybum marianum*, lo cual concuerda con el bajo contenido de antioxidantes hidrófilos como el ácido ascórbico, fenoles y flavonoides totales que presentan. Sin embargo, en el caso del ensayo del TBARS, *Silybum marianum* y *Scolymus hispanicus* (figura 7.9.2; EC_{50} de 0,02 mg/ml y 0,04 mg/ml) presentaron una elevada capacidad antioxidante, similar a la de *Chondrilla juncea* y *Papaver rhoeas*. Estos resultados pueden ser indicativos de su potencial de estas especies frente a la inhibición de la peroxidación lipídica, lo que estaría relacionado con una mayor capacidad antioxidante en fase lipófila. Mientras que para este método *Rumex papillaris* y *Taraxacum obovatum* fueron las especies que presentaron los mayores niveles de EC_{50} y por lo tanto menor capacidad de inhibición frente a este método. Además, confirma la necesidad de efectuar diferentes metodologías para conocer el comportamiento antioxidante de un compuesto químico.

Según “The local Food Nutraceuticals Consortium” (2005), estudio que incluye información sobre la actividad antioxidante de algunas especies silvestres europeas, presentaron para muestras de *Silybum marianum* (recolectadas en España) presentó un porcentaje de inhibición de 30 a 49% para el DPPH con 1 mg/ml de extracto metanólico, lo que indicaría, por tanto, una capacidad antioxidante superior a la encontrada en el presente estudio. Por otro lado, Conforti et al. (2009) publicaron, , valores superiores de capacidad antioxidante medida frente al ensayo del DPPH para *Cichorium intybus*, *Papaver rhoeas* y *Sonchus oleraceus* (EC_{50} de 0,026; 0,049 y 0,164 mg/ml, respectivamente) recogidas en Italia, las cuales presentaron una mayor actividad antioxidante en comparación con las especies presentadas en este trabajo.

**8. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
Y PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS
EN BROTES, TALLOS Y BULBOS**

En este capítulo se discuten los resultados relativos a las especies estudiadas en las que la parte comestible principal es diferente de las hojas, aunque pueda incluirlas en baja proporción, que se han agrupado en tres grupos como se refleja a continuación (tabla 8.1 y figura 8.1):

- Tallos tiernos con hojas: *Apium nodiflorum* (L.) Lag., *Foeniculum vulgare* Mill., *Montia fontana* L. y *Silene vulgaris* (Moench) Garcke.
- Brotes tiernos con o sin hojas pequeñas: *Asparagus acutifolius* L., *Bryonia dioica* Jacq., *Humulus lupulus* L. y *Tamus communis* L.
- Bulbo y parte inferior del tallo: *Allium ampeloprasum* L.

Tabla 8.1.- Especies silvestres estudiadas en el presente capítulo (Tardío et al., 2002)

Especie	Familia	Nombre Común	Parte comestible	Forma de consumo
<i>Apium nodiflorum</i> (L.) Lag.	Umbelliferae	Berraza	Tallos tiernos con hojas	Cruda
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Umbelliferae	Hinojo	Tallos tiernos con hojas	Cruda y cocinada
<i>Montia fontana</i> L.	Portulacaceae	Corujas	Tallos tiernos con hojas	Cruda
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke.	Caryophyllaceae	Collejas	Tallos tiernos con hojas	Cruda y cocinada
<i>Asparagus acutifolius</i> L.	Lilaeaceae	Espárrago triguero	Brotes tiernos	Cocinada
<i>Humulus lupulus</i> L.	Cannabaceae	Espárrago de zarza	Brotes tiernos con pequeñas hojas	Cocinada
<i>Tamus communis</i> L.	Dioscoreaceae	Lupios	Brotes tiernos con pequeñas hojas	Cocinada
<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	Cucurbitaceae	Espárrago de nuez	Brotes tiernos con pequeñas hojas	Cocinada
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	Lilaeaceae	Ajoporro	Bulbo y parte basal del tallo	Cocinada



Apium nodiflorum (L.)
Lag.



Foeniculum vulgare
Mill.



Montia fontana L.



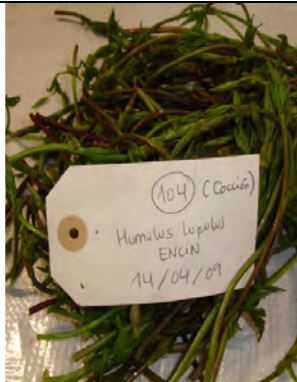
Silene vulgaris (Moench)
Garcke.



Asparagus acutifolius L.



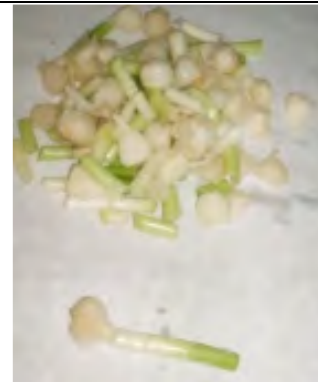
Bryonia dioica Jacq



Humulus lupulus L.



Tamus communis L.



Allium ampeloprasum L.

Figura 8.1.- Detalle de las partes de la planta analizadas para cada una de las especies silvestres de tallos, brotes y bulbo estudiadas en este capítulo

8.1.- Humedad – Materia Seca

El contenido de **humedad** correspondiente a las especies silvestres de tallo, brote y bulbo estudiadas en el presente trabajo, se muestran en la figura 8.1.1 así como en la tabla 8.1.1.

Los valores presentados se encuadran dentro de los valores normales para las hortalizas así como para las verduras de hoja, ya comentadas en el capítulo anterior. Destaca *Apium nodiflorum* y *Montia fontana* ($p < 0,05$) por ser las especies que presentaron un mayor contenido de agua (hay que tener en cuenta que *Montia fontana* es una planta acuática). Por el contrario, *Allium ampeloprasum* fue la que menor contenido de humedad (y por lo tanto mayor porcentaje de materia seca) mostró (21,68%), lo que se puede atribuir al distinto tipo de tejido que constituye, en esta especie, la parte comestible; en efecto dicho contenido de agua se encuentra dentro de la normalidad para los bulbos de otras especies cultivadas como son *Allium sativum* y *Allium porrum*, los cuales presentan valores de materia seca y humedad, de 64% y 86%, respectivamente (Souci et al, 2008).

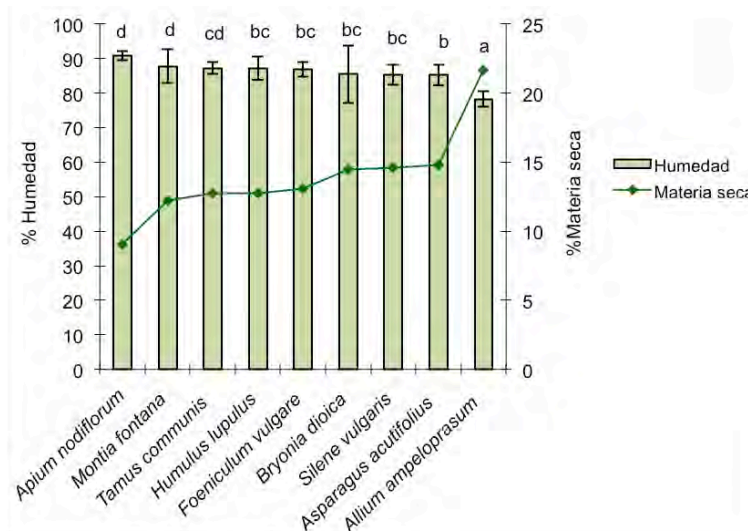


Figura 8.1.1.- Valores medios de humedad y materia seca de las especies silvestres de tallos, brotes y bulbo
Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), $n > 12$.

Según otros estudios realizados sobre especies silvestres de origen portugués (hinojo, espárragos triguero, de zarza y de nuez), los contenidos en humedad son similares al de las especies recolectadas en España, con valores en torno a 82-84%, a excepción del hinojo de origen portugués, el cual contiene casi un 10% menos de agua (Barros et al., 2010a; Martins et al., 2011). Por otro lado, comparando nuestros resultados con la información disponible para sus parientes cultivados, en el caso del hinojo (*Foeniculum vulgare*), los valores medios de humedad son los mismos para ambos (85%), mientras que para el espárrago triguero (*Asparagus officinalis*) se observa mayor variación, con una diferencia de hasta un 8% respecto a su homólogo silvestre, (Souci et al., 2008).

En el estudio comparativo de los resultados de humedad obtenidos durante los diferentes muestreos anuales se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para todas las especies recogidas en el presente estudio, a excepción de *Silene vulgaris*, la cual presentó valores homogéneos en todas las muestras recolectadas en Cadalso de los Vidrios, independientemente de la temporada.

Por otro lado, únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) del contenido de humedad entre localidades de recolección para el ajoporro (*Allium ampeloprasum*), siendo en la localidad de Cadalso de los vidrios donde las muestras presentaron los valores más elevados de humedad.

Tabla 8.1.1.- Contenido de humedad (% en peso fresco) en las especies silvestres de tallo, brote y bulbo analizadas en el presente estudio

Especie	Humedad (%)					
	Localidad A			Localidad B		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009
<i>Apium nodiflorum</i>	90,02 ^b (0,52)	92,45 ^c (0,26)	91,61 ^{bc} (0,35)	-	89,56 ^a (7,67)	92,83 ^c (0,67)
<i>Foeniculum vulgare</i>	90,70 ^c (0,15)	86,03 ^a (0,23)	-	86,39 ^b (0,37)	85,09 ^a (0,14)	-
<i>Montia fontana</i>	90,07 ^c (0,15)	85,09 ^a (0,14)	91,91 ^d (0,09)	86,39 ^b (0,37)	86,03 ^b (0,23)	92,60 ^e (0,09)
<i>Silene vulgaris</i>	86,69 ^{ab} (0,23)	85,68 ^{ab} (4,81)	86,10 ^{ab} (0,06)	88,09 ^b (0,14)	80,42 ^a (0,68)	-
<i>Asparagus acutifolius</i>	-	86,54 ^{bc} (0,20)	86,91 ^b (0,06)	80,09 ^a (1,54)	87,25 ^c (0,13)	85,36 ^{bc} (0,11)
<i>Bryonia dioica</i>	89,45 ^c (0,14)	70,94 ^a (2,36)	-	89,83 ^c (0,13)	86,65 ^b (0,88)	90,70 ^c (0,13)
<i>Humulus lupulus</i>	87,89 ^b (0,13)	85,05 ^{ab} (1,83)	86,21 ^{ab} (0,07)	84,30 ^a (1,52)	92,78 ^c (0,78)	-
<i>Tamus communis</i>	86,22 ^{ab} (0,45)	89,00 ^c (0,33)	88,33 ^b (0,63)	84,65 ^a (2,30)	88,15 ^b (0,16)	-
<i>Allium ampeloprasum</i>	81,50 ^d (0,02)	78,10 ^c (0,19)	-	76,02 ^a (0,10)	77,68 ^b (0,17)	-

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1) n=3; En cada fila, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

8.2.- pH y acidez titulable

En relación al **pH**, como se aprecia en la figura 8.2.1 y en tabla 8.2.1, los valores de **pH** de los vegetales silvestres estudiados en el presente capítulo son similares a los encontrados para las verduras de hoja estudiadas en el capítulo anterior, aunque en un rango más estrecho, entre 5,62 para *Montia fontana* a 6,20 para *Apium nodiflorum*.

Sin embargo, los valores correspondientes a la **acidez titulable** (Tabla 8.2.2) fueron muy diferentes entre los vegetales estudiados. En este caso *Apium nodiflorum* fue la especie con menor acidez titulable, 7,69 ml NaOH 0,1 N/100g muestra, mientras que *Humulus lupulus* fue la especie más ácida (23,58 ml NaOH 0,1 N/100g muestra). Aunque los valores de acidez están igualmente en el rango observado para las verduras de hoja, no se observan, en este caso, valores tan extremos como se apreciaron para *Rumex papillaris*.

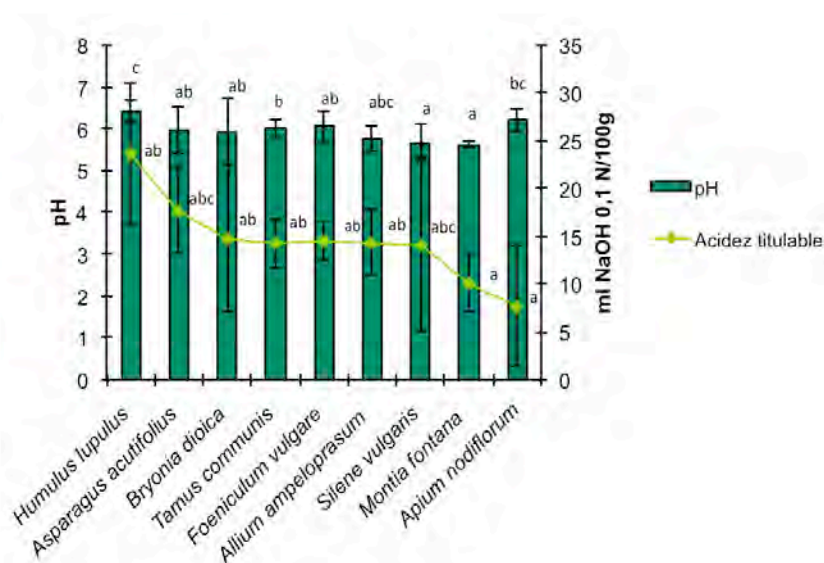


Figura 8.2.1.- Valores medios del pH y acidez titulable (ml NaOH 0,1 N/100g muestra), especies silvestres de tallos, brotes y bulbo. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), $n > 12$.

Si bien los valores de pH son muy homogéneos, al comparar los valores del pH según la localidad y el año de recolección (tabla 8.2.1), se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para todos los brotes tiernos, así como para la berraza (*Apium nodiflorum*) y la colleja (*Silene vulgaris*), presentando valores significativamente superiores en el 2008 respecto del 2007, a excepción del espárrago de zarza (*Humulus lupulus*) donde los valores superiores de pH se observaron en la primera temporada de recolección (2007) respecto de las posteriores. Destaca el espárrago de nuez (*Bryonia dioica*) por presentar una diferencia de pH de entre 1,1 - 1,9 unidades de pH. En el estudio comparativo por localidades, *Allium nodiflorum*, *Foeniculum vulgare*, *Humulus lupulus* y *Silene vulgaris* presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Por el contrario, *Montia fontana* destacó por presentar valores de pH muy estables en todas las muestras analizadas, sin diferencias estadísticamente significativas debidas ni a la localidad ni al año de recolección.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los valores de acidez titulable entre temporadas. Si comparamos los resultados de acidez titulable obtenidos en los diferentes muestreos, se observaron variaciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre temporadas (siendo, generalmente superiores los valores en el primer año de recolección) en todas las especies excepto en la colleja (*Silene vulgaris*), el espárrago de zarza (*Humulus lupulus*) y el hinojo (*Foeniculum vulgare*); este último presentó valores homogéneos de acidez en todas las muestras analizadas. En este sentido destacaron *Apium nodiflorum* y, nuevamente, *Bryonia dioica*, por presentar las variaciones más acusadas.

Tabla 8.2.1.- Valores de pH de las especies silvestres de tallo, brote y bulbo analizadas en el presente estudio

Especie	pH					
	Localidad A			Localidad B		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009
<i>Apium nodiflorum</i>	5,74 ^a (0,02)	6,44 ^b (0,07)	6,26 ^b (0,02)	-	6,28 ^b (0,07)	6,27 ^b (0,32)
<i>Foeniculum vulgare</i>	5,71 ^b (0,01)	5,86 ^c (0,02)	-	5,74 ^{bc} (0,02)	5,47 ^a (0,09)	-
<i>Montia fontana</i>	5,58 ^a (0,05)	5,67 ^a (0,01)	5,49 ^a (0,05)	-	5,66 ^a (0,31)	5,72 ^a (0,02)
<i>Silene vulgaris</i>	5,67 ^b (0,06)	5,97 ^c (0,02)	5,90 ^c (0,02)	4,93 ^a (0,02)	5,86 ^c (0,01)	-
<i>Asparagus acutifolius</i>	-	6,44 ^d (0,01)	6,17 ^b (0,01)	4,97 ^a (0,02)	6,09 ^{bc} (0,07)	6,05 ^c (0,01)
<i>Bryonia dioica</i>	4,93 ^a (0,04)	6,80 ^c (0,04)	-	5,33 ^a (0,35)	6,43 ^{bc} (0,01)	6,14 ^b (0,01)
<i>Humulus lupulus</i>	6,34 ^b (0,01)	6,49 ^c (0,01)	6,09 ^a (0,02)	6,82 ^d (0,03)	6,38 ^b (0,01)	-
<i>Tamus communis</i>	5,90 ^a (0,02)	6,28 ^b (0,05)	5,81 ^a (0,03)	5,82 ^a (0,04)	6,24 ^b (0,02)	-
<i>Allium ampeloprasum</i>	6,09 ^b (0,05)	5,91 ^b (0,03)	-	5,43 ^a (0,04)	5,61 ^a (0,17)	-

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1), n=3. En cada fila, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabla 8.2.2.- Valores de acidez titulable de las especies silvestres de tallo, brote y bulbo analizadas en el presente estudio

Especie	Acidez titulable (ml NaOH 0,1 N/100 g de muestra)					
	Localidad A			Localidad B		
	2007	2008	2009	2007	2008	2009
<i>Apium nodiflorum</i>	18,79 ^c (0,44)	3,00 ^a (0,19)	5,64 ^b (0,20)	-	5,57 ^b (0,61)	5,46 ^b (0,27)
<i>Foeniculum vulgare</i>	15,49 ^a (0,38)	14,45 ^a (0,55)	16,22 ^a (0,74)	16,17 ^a (1,89)	11,79 ^a (0,60)	-
<i>Montia fontana</i>	6,33 ^a (0,37)	13,93 ^d (0,19)	11,26 ^c (0,62)	-	8,05 ^b (0,24)	11,06 ^c (0,41)
<i>Silene vulgaris</i>	28,57 ^c (2,27)	10,42 ^{ab} (0,41)	14,24 ^b (0,54)	3,64 ^a (0,11)	13,69 ^b (0,29)	-
<i>Asparagus acutifolius</i>	-	10,36 ^a (2,02)	19,58 ^b (0,23)	22,47 ^c (0,58)	17,16 ^b (1,21)	18,86 ^{bc} (0,30)
<i>Bryonia dioica</i>	23,95 ^d (1,26)	10,65 ^b (0,71)	16,93 ^c (0,29)	3,79 ^a (0,38)	18,67 ^c (1,32)	-
<i>Humulus lupulus</i>	26,32 ^c (0,35)	34,12 ^d (1,37)	24,16 ^c (1,25)	15,06 ^a (0,66)	18,24 ^b (0,57)	-
<i>Tamus communis</i>	16,21 ^b (0,69)	10,89 ^a (0,30)	16,93 ^b (0,29)	15,64 ^b (1,59)	11,99 ^a (1,95)	-
<i>Allium ampeloprasum</i>	10,04 ^a (1,12)	16,87 ^b (2,23)	-	13,22 ^a (0,21)	17,27 ^b (2,27)	-

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1), n=3. En cada fila, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

8.3.- Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico (vitamina C)

Como se ha comentado anteriormente, la vitamina C, se encuentra en los alimentos en forma de ácido ascórbico (AA) y dehidroascórbico (DHAA). La figura 8.3.1 y tabla 8.3.1a y b muestran el contenido de ambas isoformas, así como la variación experimentada en función del año y localidad de recolección de las muestras.

Respecto al **contenido total de vitamina C** (correspondiente a la suma de AA + DHAA) dentro del grupo de verduras silvestres estudiadas en este capítulo, dichos valores oscilan entre 6,69 mg/100g a 59,33 mg/100g (para *Allium ampeloprasum* y *Tamus communis*, respectivamente). En ambos casos la isoforma mayoritaria fue el AA, representando un 64,12% y 74,80% del total de vitamina C para dichas especies.

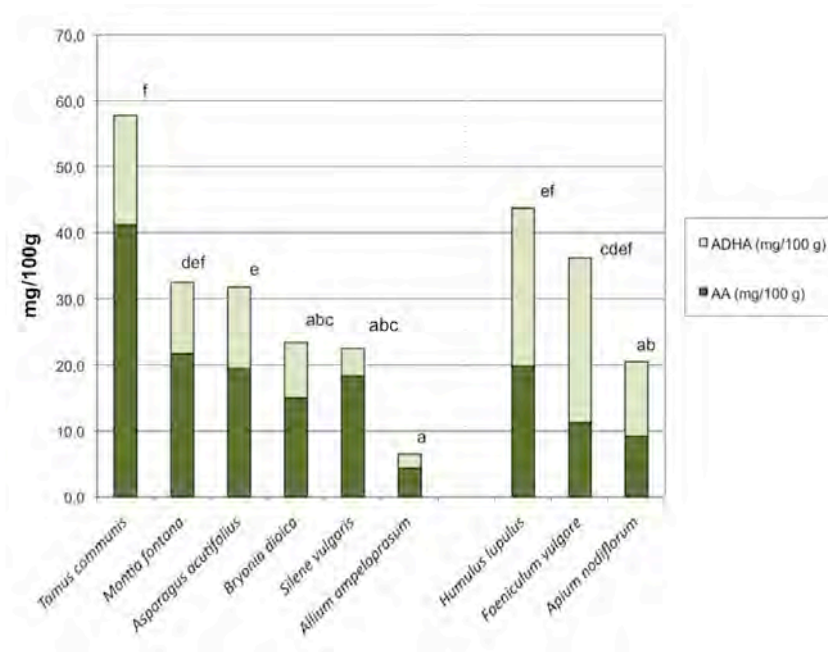


Figura 8.3.1.- Contenido medio de Vitamina C total, AA y ADHA (mg/100g) en las verduras silvestres estudiadas. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), $n > 12$.

En general, tal y como se observa en la figura 8.3.1, los brotes tiernos con hojas fueron los que presentaron mayor contenido de vitamina C total, destacando *Tamus communis* entre todas las demás especies. En el caso de las verduras constituidas por tallos tiernos con hojas, la especie que mayor contenido de vitamina C total presentó fue *Foeniculum vulgare* (36,285 mg/100g).

De todas las especies estudiadas, solamente en los tallos con hojas de *Foeniculum vulgare* y *Apium nodiflorum*, se presentó el ADHA como forma mayoritaria de la vitamina C (de forma análoga a lo que ocurría en las hojas basales de *Anchusa azurea* y en las especies de Asteraceae estudiadas con el capítulo anterior), representando en torno al 60 % del contenido total de esta vitamina. En la mayoría de las muestras, el AA representó siempre más del 30,7%, alcanzando en *Montia fontana* contribuciones del 83,5%.

Hay que tener en cuenta que algunas partes de *Tamus communis* contienen saponinas (diosgenina), al igual que algunas partes de *Bryonia dioica* pueden contener glucósidos triterpenos, y proteínas inactivantes de ribosomas, responsable de su toxicidad (Hylands y Kosugi, 1982; Siegall et al., 1994; Hadad y Moradi, 2005). Sin embargo, estas dos especies han sido tradicionalmente consumidas desde hace siglos en la zona del Mediterráneo (Tardío et al., 2006). Hay que tener en cuenta que en ambos casos, la parte comestible son los brotes jóvenes, que son las partes menos tóxicas de estas plantas, ya que los principios tóxicos son más abundantes en otros órganos de la planta, tales como los frutos y las partes subterráneas. Por otra parte, estas especies siempre se consumen tras un proceso térmico de cocción, que supone la destrucción de los principios tóxicos (Biglino y Nano 1965; Couplan, 1990;. Lin et al 2006).

Debido a la presencia de dichos compuestos tóxicos en algunos órganos de estas especies, *Tamus communis* y *Bryonia dioica* se encuentran incluidas en la Orden SCO/190/2004, de 28 de enero, por la que se establece la lista de plantas cuya venta al público queda prohibida o restringida por razón de su toxicidad. Esta disposición, del Ministerio de

Sanidad y Consumo español, cuyo ámbito de aplicación es el comercio (especialmente en forma de fórmulas magistrales, preparados oficinales o cepas homeopáticas de diversas plantas y sus extractos, entre las que se incluyen estas especies), no incluye, sin embargo, el uso alimentario a nivel particular. De hecho y dado que los brotes de lupio y de espárrago de nuez contienen niveles medios de vitamina C superiores a 24 mg/100 g, y especialmente elevados en el caso del lupio, su consumo puede estar justificado, siempre que se lleve a cabo una correcta identificación de las especies y las partes de las mismas que pueden ser consumidas sin riesgo para la salud, y se cocinen adecuadamente, tal como se viene haciendo de forma tradicional en muchas zonas del área mediterránea.

Otros autores (Barros et al., 2009) estudiaron el contenido de vitamina C de las diferentes partes aéreas del hinojo silvestre procedente de Portugal, indicando para sus tallos un contenido de 18,17 mg/100g (sss), que es aproximadamente la mitad del contenido encontrado en el presente estudio. Por otro lado, Vardavas et al. (2006b) indicó valores de vitamina C total de 101 mg/100g ssf en especies de hinojo silvestre recolectadas en la isla de Creta, valores muy superiores a los encontrados en las muestras estudiadas. Los mismos autores indicaron valores de vitamina C total de 20 mg/100g y 18 mg/100g para otras especies silvestres similares a las nuestras, como son *Bryonia cretica* y *Apium graveolens*, respectivamente, valores similares a los encontrados en sus parientes recolectados en España.

En relación a los brotes tiernos con hojas, Salvatore (2005) publicó valores de vitamina C de 15,64 mg/100g de vitamina C total, en *Asparagus acutifolius* silvestre de origen griego, de los cuales 14,87 mg/100g eran de AA, aproximadamente la mitad del contenido encontrado en las especies de procedencia española. Martins et al. (2011), por su parte, indicó valores de 142 mg/100g sss para la misma especie procedente de Portugal. Estos resultados tan dispares indican la amplia variabilidad a que está sujeta esta especie, en cuanto a su contenido total de vitamina C.

Martins et al. (2011), indicó no haber encontrado presencia de vitamina C en brotes tiernos de *Bryonia dioica* y *Tamus communis* de origen portugués, mientras que nuestras muestras mostraron elevadas concentraciones de esta vitamina (tal y como se muestra en la tabla 8.5). Hay que indicar que dicha determinación la realizaron en la planta seca, pudiéndose haber degradado esta vitamina durante el proceso de desecación, o con posterioridad al mismo, por su elevada inestabilidad a la oxidación inducida por la exposición a factores ambientales como calor, luz y oxígeno.

Si comparamos los resultados de contenido de vitamina C presente en plantas silvestres, con sus parientes cultivados, en el caso del hinojo, los valores de vitamina C total y la relación AA/DHAA obtenidos en nuestro estudio están de acuerdo con los valores obtenidos para las variedades cultivadas de la misma especie (8,7 a 34 mg/100 g; Koudela y Petříková, 2008), mientras que según Souci et al. (2008) el hinojo cultivado presenta valores muy superiores a las silvestres, en torno a 93 mg/100g, alrededor de 2,5 veces más que su pariente silvestre. Hay que tener en cuenta que estos datos se refieren a tallo, brotes y hojas, mientras que en el presente estudio únicamente se analizan los tallos tiernos por ser la parte más frecuentemente consumida. Por otro lado, las variedades cultivadas del espárrago triguero (*Asparagus officinalis*), presentan valores ligeramente inferiores a su pariente silvestre, 20 mg/100g, mientras que *Allium ampeloprasum* presentó valores relativamente bajos de esta vitamina, siendo dichos valores similares a los encontrados en alguno de sus antecesores cultivados como es *Allium sativum*, el cual presentó en torno a 14 mg/100g sf (Souci et al., 2008).

8.3.1a.- Contenido de ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (ADHA) y vitamina C total (mg/100g) de las especies silvestres de tallos analizadas en el presente estudio

Especie	Vitamina C (mg/100 g)				
	Año	Loc.	AA (mg/100g)	ADHA (mg/100g)	Vitamina C total (mg/100g)
<i>Apium nodiflorum</i>	2007	A	14,44 ^d (1,24)	8,26 ^b (0,53)	22,70 ^b (1,39)
	2008	A	4,53 ^a (0,75)	7,28 ^b (2,02)	11,81 ^a (1,68)
		B	7,74 ^b (0,70)	2,44 ^a (0,58)	9,51 ^a (1,28)
	2009	A	11,39 ^c (0,15)	21,96 ^d (1,79)	33,35 ^c (1,58)
		B	6,40 ^b (0,59)	18,40 ^c (1,47)	21,15 ^b (2,45)
<i>Foeniculum vulgare</i>	2007	A	10,68 ^{ab} (0,19)	16,14 ^a (3,05)	26,82 ^a (3,13)
		B	16,94 ^b (0,36)	37,00 ^c (2,65)	54,14 ^c (2,79)
	2008	A	3,31 ^a (0,03)	21,99 ^b (0,72)	25,31 ^a (0,71)
		B	13,71 ^b (1,79)	25,16 ^b (0,09)	38,87 ^b (1,93)
<i>Montia fontana</i>	2007	A	23,74 ^b (0,11)	12,00 ^{bc} (1,30)	35,74 ^b (1,37)
	2008	A	33,56 ^d (0,93)	nd	33,56 ^b (0,93)
		B	7,20 ^a (0,17)	17,98 ^c (1,00)	22,77 ^a (1,44)
	2009	A	45,42 ^e (1,07)	6,08 ^{ab} (1,37)	49,23 ^c (2,83)
		B	27,62 ^c (0,24)	3,26 ^a (0,17)	30,38 ^b (0,30)
<i>Silene vulgaris</i>	2007	A	27,66 ^d (1,78)	nd	27,66 ^b (1,78)
		B	16,37 ^b (0,32)	9,80 ^{ab} (2,76)	26,32 ^b (3,05)
	2008	A	8,42 ^a (0,26)	2,46 ^a (0,07)	10,88 ^a (0,19)
		B	20,60 ^c (1,08)	4,47 ^{ab} (0,00)	26,63 ^b (3,28)
	2009	A	13,90 ^{ab} (0,96)	13,90 ^b (0,90)	25,11 ^b (0,46)

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna y para cada especie, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). nd (no detectado).

8.3.1b.- Contenido de ácido ascórbico (AA), ácido dehidroascórbico (ADHA) y vitamina C total (mg/100g) de las especies silvestres de brote y bulbo analizadas en el presente estudio

Especie	Vitamina C (mg/100 g)				
	Año	Loc.	AA (mg/100g)	ADHA (mg/100g)	Vitamina C
<i>Asparagus acutifolius</i>	2007	B	26,36 ^b (0,88)	0,84 ^a (0,76)	27,71 ^{ab} (0,92)
	2008	A	7,66 ^a (0,35)	34,03 ^b (4,26)	38,22 ^{bc} (3,28)
		B	24,36 ^b (0,74)	2,43 ^a (1,18)	26,01 ^a (2,44)
	2009	A	29,29 ^b (0,03)	26,02 ^b (0,60)	56,67 ^d (0,58)
		B	33,19 ^c (0,11)	8,72 ^a (0,43)	40,20 ^c (2,15)
<i>Bryonia dioica</i>	2007	A	20,27 ^{bc} (0,87)	3,86 ^a (2,72)	24,13 ^b (2,43)
		B	15,16 ^b (0,25)	13,03 ^b (0,00)	28,19 ^c (0,00)
	2008	A	4,57 ^a (0,92)	13,66 ^b (1,33)	18,24 ^a (1,38)
		B	21,04 ^c (2,08)	3,09 ^a (0,14)	24,79 ^b (2,32)
	2009	A	11,99 ^b (0,31)	13,67 ^b (1,69)	25,67 ^b (2,01)
<i>Humulus lupulus</i>	2007	A	14,45 ^a (1,70)	27,58 ^b (0,21)	42,03 ^{ab} (1,69)
		B	11,12 ^a (1,08)	28,63 ^b (0,62)	39,32 ^{ab} (0,80)
	2008	A	34,50 ^b (1,81)	16,06 ^{ab} (2,74)	49,52 ^b (12,82)
		B	17,04 ^a (0,12)	12,83 ^a (3,35)	29,87 ^a (3,50)
	2009	A	37,25 ^b (0,19)	23,22 ^b (0,85)	60,95 ^c (0,13)
<i>Tamus communis</i>	2007	A	52,37 ^{bc} (0,99)	27,30 ^c (1,10)	79,44 ^d (0,18)
		B	48,73 ^b (2,30)	22,08 ^c (3,11)	70,81 ^c (5,41)
	2008	A	28,99 ^a (3,29)	10,24 ^b (3,29)	41,42 ^a (0,20)
		B	36,78 ^a (4,26)	7,19 ^b (2,39)	46,42 ^a (0,55)
	2009	A	56,87 ^c (0,21)	1,56 ^a (0,11)	58,57 ^b (0,37)
<i>Allium ampeloprasum</i>	2007	A	4,23 ^b (0,23)	3,83 ^a (0,21)	8,06 ^a (0,41)
		B	3,49 ^b (0,26)	1,15 ^a (0,16)	4,77 ^a (0,01)
	2008	A	7,89 ^c (1,17)	3,16 ^a (2,36)	11,54 ^b (1,23)
		B	1,58 ^a (0,27)	0,43 ^a (0,17)	2,39 ^a (0,61)

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna y para cada especie, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). nd (no detectado).

El ácido ascórbico es un parámetro muy condicionado por variables ambientales; en este sentido el contenido, tanto vitamina C como de cada una de sus formas activas, en muestras de la misma especie recolectadas en diferentes lugares y años, fue muy variable (tabla 8.3.1a,b), llegando a alcanzar coeficientes de variación de 59,5%. El efecto debido a

la temporada solo se manifestó de una forma clara en *Tamus communis*, en la que las muestras recolectadas en 2007 fueron más ricas en vitamina C que las recolectadas en 2008 y 2009. En cuanto al efecto de la localidad, el estudio estadístico pone de manifiesto que la vitamina C fue más abundante en las muestras de *Foeniculum vulgare* recolectadas en Valdelatas, así como en las de *Asparagus acutifolius*, y *Humulus lupulus*, recolectadas en El Encín.

Las especies más estables, en cuanto al contenido total de vitamina C fueron *Bryonia dioica* y *Silene vulgaris*, aunque el reparto de las dos isoformas (AA y ADHA) fue muy irregular, manteniendo, sin embargo, un contenido total muy parecido en todas las muestras para cada especie. Por el contrario el perfil de ambas isoformas fue constante en la mayor parte de las especies; así *Tamus communis*, *Silene vulgaris*, *Montia fontana*, *Asparagus acutifolius* y *Allium ampeloprasum* se caracterizaron por presentar al AA como isoforma mayoritaria en todos los casos, independientemente de la temporada o localidad de muestreo, mientras que en el caso de *Foeniculum vulgare* la isoforma mayoritaria fue siempre el ADHA.

8.4.- Ácidos orgánicos

Respecto a otros **ácidos orgánicos**, como se ha comentado en el capítulo anterior, son compuestos muy condicionados por el metabolismo de la planta, pudiendo presentar actividad biológica en el hombre por diferentes mecanismos (Seabra et al., 2006).

La figura 8.4.1 muestra, a modo de ejemplo, el perfil cromatográfico de los ácidos orgánicos encontrados en los brotes tiernos de *Montia fontana*.

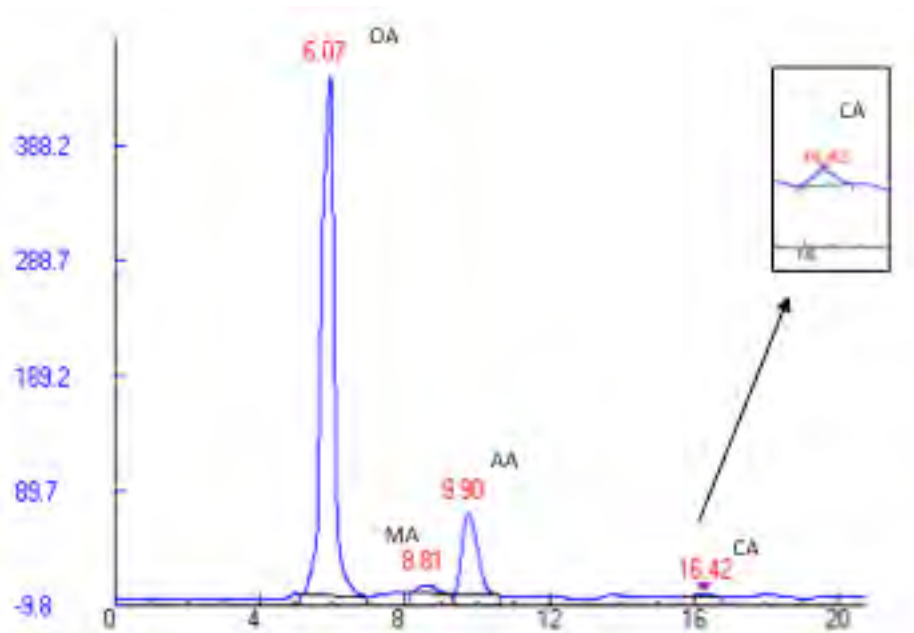


Figura 8.4.1.- Perfil cromatográfico de ácidos orgánicos de *Montia fontana*. Ácido Oxálico (OA), ácido Málico (MA), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (CA)

La tabla 8.4.1 a y b, y figura 8.4.2, presentan los valores de los ácidos orgánicos identificados y cuantificados en las especies silvestres estudiadas en este capítulo.

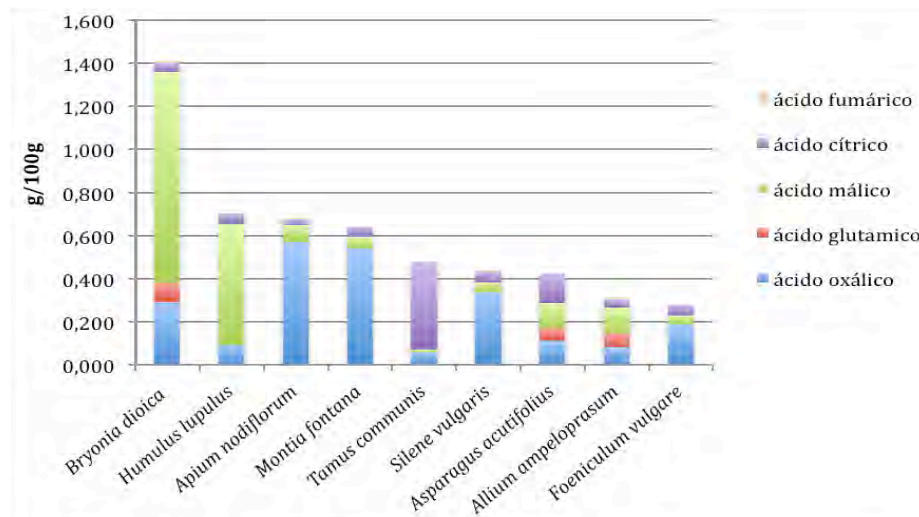


Figura 8.4.2.- Contenido de ácidos orgánicos (g/100g) de las especies silvestres analizadas en el presente estudio

Como se ha comentado anteriormente, algunas especies pertenecientes a ciertas familias como Portulacáceas y Liliáceas, corresponden a las llamadas plantas C4, que presentan una incorporación del CO₂ atmosférico mediante mecanismos diferentes a los habituales en otras plantas (plantas C3), sintetizándose ácidos orgánicos como vía de reserva de CO₂ en la planta. De este modo, compuestos como el ácido oxálico, málico y aspártico cobran especial importancia, así como otros ácidos orgánicos que pudieran derivar (vía ciclo de Krebs o por otras vías) a partir de estos compuestos, como es el caso del ácido oxálico.

Como se observa en la figura 8.4.2, el contenido y perfil de ácidos orgánicos varía mucho en función de la especie estudiada, destacando *Bryonia dioica* por presentar el mayor contenido medio de ácidos orgánicos (1430 mg/100g), frente a los casi 350 mg/100g que se presentaron en *Foeniculum vulgare*.

Dicha variabilidad también se observó respecto al ácido orgánico mayoritario, siendo el perfil de ácidos orgánicos, generalmente, constante para cada especie. En el caso de los tallos con hojas fue el ácido oxálico, con valores medios de 570 mg/100g, 540 mg/100g, 340 mg/100g y 190 mg/100g, para *Apium nodiflorum*, *Montia fontana*, *Silene vulgaris* y *Foeniculum vulgare*, respectivamente. La mayor parte de las especies estudiadas en el capítulo anterior, cuya parte comestible estuvo constituida por hojas basales, también presentaron como ácido mayoritario el oxálico (excepto *Taraxacum obovatum* y *Cichorium intybus*, con bajos contenidos de ácidos orgánicos y en las que no destacó de forma clara ningún ácido). El hecho de que las muestras que contienen hojas poseen unos mayores niveles de ácido oxálico, podría ser atribuido a un predominio del ácido oxálico en los tejidos foliares de los vegetales (los encargados de realizar la fotosíntesis), mientras que en otros tipos de tejidos, otros compuestos entrarían a formar parte de esta fracción (en los brotes tiernos y el bulbo, los niveles de dicho ácido estuvieron en todos los casos por debajo de 290 mg/100 g). Esto coincide con lo indicado por Gupta et al., (2005) para las hojas basales de especies silvestres procedentes de Nigeria, con valores de entre 1080 a

1410 mg/100g de ácido oxálico en especies silvestres, de los géneros *Trianthema*, *Boerhania*, *Digera* y *Amarantus*, procedentes de Nigeria.

El ácido glutámico únicamente fue cuantificado en *Allium ampeloprasum*, *Asparagus acutifolius* y *Bryonia dioica*. Por otro lado, el ácido málico destacó como ácido orgánico mayoritario en los brotes tiernos de *Bryonia dioica* y *Humulus lupulus*, estando en concentraciones relativamente bajas en el grupo de tallos silvestres (por debajo de 80 mg/100g).

El contenido del ácido cítrico en los vegetales silvestres estudiados en el presente capítulo oscila entre 30 mg/100g para la berraza a 410 mg/100g para el lupio, siendo en el caso de *Tamus communis*, el ácido orgánico mayoritario.

Los brotes de espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*) y los bulbos de ajoporro (*Allium ampeloprasum*) presentaron los contenidos totales de ácidos orgánicos más bajos, con valores medios de 420 y 310 mg/100g, respectivamente, sin que pueda destacarse de forma clara un ácido mayoritario para estas especies.

El ácido fumárico y succínico, en comparación con el resto de ácidos orgánicos, son compuestos minoritarios en las especies silvestres en general y concretamente en las estudiadas en el presente trabajo. El ácido fumárico fue encontrado en casi todas las especies en niveles traza, siendo únicamente cuantificado en mayor proporción en algunas de las muestras correspondientes a dos especies silvestres de brote: *Tamus communis* (240 mg/100g) y *Bryonia dioica* (10 mg/100g). Algo similar ocurre para el ácido succínico, detectándose únicamente en *Asparagus acutifolius* (10 mg/100g).

8.4.1a.- Contenido de ácidos orgánicos (g/100g) en las especies silvestres de tallo analizadas en el presente estudio

<i>Especie</i>	<i>Año</i>	<i>Loc.</i>	Ácido oxálico	Ácido glutámico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido fumárico	Ácido succínico
<i>Apium nodiflorum</i>	2007	A	0,11 ^a (0,02)	nd	0,03 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,01)	Tr.	nd
	2008	A	0,92 ^b (0,34)	nd	0,05 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,01)	nd	nd
		B	0,53 ^{ab} (0,01)	nd	0,04 ^a (0,00)	nd	Tr.	nd
	2009	A	0,90 ^b (0,03)	nd	0,13 ^b (0,00)	0,01 ^a (0,03)	Tr.	nd
		B	0,63 ^{ab} (0,30)	nd	0,14 ^b (0,01)	0,07 ^b (0,00)	Tr.	nd
<i>Foeniculum vulgare</i>	2007	A	0,12 ^a (0,01)	nd	0,01 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	Tr.	nd
		B	0,40 ^b (0,02)	nd	0,02 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	Tr.	nd
	2008	A	0,47 ^c (0,02)	nd	nd	0,08 ^b (0,00)	Tr.	nd
		B	0,10 ^a (0,00)	nd	nd	0,10 ^b (0,00)	Tr.	nd
<i>Montia fontana</i>	2007	A	0,04 ^a (0,00)	nd	nd	nd	nd	nd
	2008	A	0,34 ^b (0,00)	nd	0,14 ^b (0,01)	0,03 ^a (0,00)	nd	nd
		B	0,99 ^c (0,03)	nd	0,02 ^a (0,00)	0,10 ^b (0,00)	nd	Tr.
	2009	A	0,25 ^{ab} (0,03)	nd	0,10 ^b (0,00)	0,02 ^a (0,00)	nd	nd
		B	0,95 ^c (0,00)	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Silene vulgaris</i>	2007	A	0,02 ^a (0,01)	nd	0,01 ^a (0,00)	Tr.	Tr.	nd
		B	0,22 ^b (0,01)	nd	0,02 ^a (0,00)	Tr.	Tr.	nd
	2008	A	0,23 ^b (0,01)	nd	0,06 ^b (0,01)	0,06 ^a (0,00)	nd	nd
		B	0,80 ^d (0,03)	nd	0,10 ^c (0,01)	nd	Tr.	nd
	2009	A	0,45 ^c (0,03)	nd	nd	0,12 ^a (0,01)	Tr.	nd

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna y para cada especie , diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Nd (no detectado); Tr. (trazas: <5 mg/100g).

8.4.1b.- Contenido de ácidos orgánicos (g/100g) en las especies silvestres de brote y bulbo analizadas en el presente estudio

<i>Especie</i>	Año	Loc.	Ácido oxálico	Ácido glutámico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido fumárico	Ácido succínico
<i>Asparagus acutifolius</i>	2007	B	0,20 ^b (0,04)	0,04 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,01)	0,03 ^a (0,01)	Tr.	0,01 (0,00)
	2008	A	0,07 ^a (0,01)	nd	0,04 ^a (0,01)	0,10 ^a (0,01)	Tr.	nd
		B	0,10 ^{ab} (0,00)	nd	0,06 ^b (0,00)	0,09 ^a (0,00)	nd	nd
	2009	A	0,10 ^{ab} (0,01)	0,11 ^b (0,01)	0,22 ^c (0,04)	0,33 ^b (0,05)	Tr.	nd
		B	0,12 ^{ab} (0,03)	0,04 ^a (0,00)	0,19 ^{bc} (0,06)	0,13 ^a (0,11)	Tr.	nd
<i>Bryonia dioica</i>	2007	A	0,12 ^a (0,01)	0,07 ^b (0,00)	Tr.	Tr.	Tr.	nd
		B	0,08 ^a (0,01)	0,05 ^a (0,00)	nd	0,02 ^a (0,00)	0,01 (0,00)	nd
	2008	A	0,44 ^{bc} (0,02)	nd	1,64 ^a (0,06)	nd	Tr.	nd
		B	0,63 ^c (0,08)	nd	1,75 ^a (0,09)	0,05 ^b (0,00)	Tr.	nd
	2009	A	0,36 ^b (0,02)	0,11 ^c (0,00)	1,71 ^a (0,04)	0,06 ^b (0,01)	Tr.	nd
<i>Humulus lupulus</i>	2007	A	0,05 ^a (0,00)	nd	0,30 ^a (0,08)	nd	nd	nd
		B	0,07 ^a (0,00)	nd	0,29 ^a (0,00)	nd	nd	nd
	2008	A	0,19 ^b (0,02)	nd	1,04 ^b (0,17)	nd	Tr.	nd
		B	0,16 ^b (0,02)	nd	0,88 ^b (0,26)	0,09 ^a (0,00)	Tr.	nd
	2009	A	0,08 ^a (0,02)	nd	0,76 ^b (0,17)	0,12 ^a (0,03)	Tr.	nd
<i>Tamus communis</i>	2007	A	0,01 ^a (0,00)	nd	0,01 ^a (0,00)	0,23 ^a (0,02)	nd	nd
		B	0,01 ^a (0,00)	nd	0,01 ^a (0,00)	0,21 ^a (0,00)	nd	nd
	2008	A	0,06 ^b (0,00)	nd	nd	nd	tr.	nd
		B	0,09 ^b (0,00)	nd	nd	nd	nd	nd
	2009	A	0,08 ^b (0,01)	nd	nd	nd	0,24 (0,01)	Tr.
<i>Allium ampeloprasum</i>	2007	A	0,01 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	Tr.	nd
		B	Tr.	Tr.	0,01 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	Tr.	nd
	2008	A	0,24 ^b (0,00)	0,16 ^b (0,01)	0,27 ^b (0,05)	0,06 ^b (0,00)	nd	
		B	0,08 ^{ab} (0,02)	0,03 ^a (0,01)	0,21 ^b (0,07)	0,04 ^a (0,02)	nd	nd

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna y para cada especie, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Nd (no detectado); Tr. (trazas:<5 mg/100g).

Tal y como se observa en la tabla 8.4.1a,b, de un año a otro de muestreo se ha producido una variación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de algunos ácidos orgánicos, como es el caso del ácido oxálico. Dicho compuesto presentó variaciones en todas las especies

estudiadas a excepción del lupio (*Tamus communis*). En la mayor parte de las especies se observaron valores significativamente superiores ($p < 0,05$) en 2008 y 2009, con respecto a 2007, a excepción del espárrago triguero que presentó un mayor contenido de ácido oxálico en 2007. Destaca *Bryonia dioica*, *Humulus lupulus* y *Asparagus acutifolius*, observándose diferencias de hasta 550 mg/100g, 140 mg/100g y 80 mg/100g, respectivamente entre los contenidos de ácido oxálico en 2007 y 2009.

La coruja (*Montia fontana*) fue la única especie que presentó variaciones estadísticamente significativas en el contenido de ácido oxálico entre localidades, destacando el Puerto de Canencia por presentar los valores más elevados ($p < 0,05$), próximos a 1000 mg/100g. Esta especie, junto con *Apium nodiflorum* (muestras recolectadas en Villar del Olmo en 2008 y 2009) fue la que alcanzó los contenidos de ácido oxálico más elevados.

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la variación encontrada en el contenido de ácido oxálico de las especies estudiadas puede deberse a las variaciones ambientales a que se vieron sometidas: las variaciones en la temperatura y precipitaciones medias observadas para el mismo periodo de recolección pueden condicionar la fenología o estado de desarrollo de la planta, lo que condiciona en gran medida la actividad metabólica y concentración de compuestos como son los ácidos orgánicos, implicados en el desarrollo, y maduración de la planta. En esta línea, estudios realizados sobre *Portulaca oleracea*, especie perteneciente a la misma familia que *Montia fontana*, demostraron que el contenido de ácido oxálico estaba relacionado con la concentración de nitrógeno total y la proporción de nitrato/amonio del sustrato de crecimiento de la planta. Así, la disminución de la concentración de nitrógeno total y por lo tanto el aumento del ratio de nitrato/amonio puede incrementar el contenido ácido oxálico en la misma (Fontana et al 2006; Palaniswamy et al 2002). Este hecho podría estar relacionado con las grandes diferencias encontradas en el contenido de ácido oxálico de las partes comestibles de esta y otras especies, cuando se analizan muestras procedentes de diferentes lugares y temporadas.

Al igual que para el ácido oxálico, gran parte de las especies silvestres estudiadas mostraron una variación significativa ($p < 0,05$) del contenido de ácido málico, a excepción de la coruja (*Montia fontana*). En las demás especies los valores fueron significativamente superiores en la segunda y tercera temporada de recolección, menos en el caso de el lupio (*Tamus communis*), donde los valores superiores se observaron en el 2007; concretamente para el lupio este ácido únicamente se cuantificó en dicha temporada. Destacó *Humulus lupulus*, *Allium ampeloprasum* y *Bryonia dioica*, por ser las especies en las que en mayor medida se incrementaron los valores de ácido málico entre temporadas, con variaciones de hasta 700 mg/100g y 200 mg/100g. *Bryonia dioica* destacó especialmente, ya que no presentó prácticamente ácido málico en 2007, mientras que en el 2008 y 2009 se encontraron niveles superiores a 1000 mg/100g.

En el caso del ácido cítrico, se observaron valores significativamente superiores ($p < 0,05$) en el 2008 y 2009 para la mayoría de las especies donde se encontró. Destacó el espárrago triguero que presentó valores de hasta 5 veces superiores (20 a 100 mg/100g) entre temporadas. Asimismo hay que resaltar que las muestras de espárrago de nuez (*Humulus lupulus*) y lupio (*Tamus communis*) presentaron ausencia de este compuesto en una de las temporadas estudiadas. No observándose grandes variaciones entre localidades.

Por último, en el caso del ácido fumárico, destacaron el lupio y el espárrago de nuez por ser las únicas especies donde se cuantificó este compuesto en algunas de las temporadas estudiadas.

8.5.- Ácido fólico y folatos

El contenido de **ácido fólico y folatos** de las muestras analizadas en el presente estudio, cuantificados en forma de 5MTHF monoglutamato y diglutamato, se muestran en la tabla 8.5.1 y figura 8.5.1.

Los niveles de folatos en estas especies fueron elevados en la mayor parte de las especies, encontrándose en el mismo rango que los detectados para las verduras de hoja comentadas en el capítulo anterior. *Silene vulgaris* (figura 8.5.1) fue la especie que presentó un mayor contenido de folatos totales (0,848 mg/100g), seguido por *Asparagus acutifolius* y *Foeniculum vulgare* (0,481 mg/100g y 0,470 mg/100g, respectivamente), mientras que *Montia fontana* y *Tamus communis* presentaron los contenidos más bajos (0,060 y 0,065 mg/100g, respectivamente).

Tabla 8.5.1.- Contenido de ácido fólico y folatos (mg/100g) en las especies silvestres de tallo, brote y bulbo analizadas en el presente estudio

<i>Especie</i>	5MTHF-DG	5MTHF-MG	Folatos totales
<i>Apium nodiflorum</i>	0,185 (0,002)	Tr.	0,185 ^{ab} (0,002)
<i>Foeniculum vulgare</i>	0,488 (0,000)	0,001 (0,000)	0,470 ^{bc} (0,019)
<i>Montia fontana</i>	0,053 (0,000)	0,006 (0,000)	0,060 ^a (0,000)
<i>Silene vulgaris</i>	0,844 (0,106)	0,004 (0,002)	0,848 ^d (0,107)
<i>Asparagus acutifolius</i>	0,479 (0,197)	0,002 (0,001)	0,481 ^c (0,197)
<i>Bryonia dioica</i>	0,070 (0,005)	0,002 (0,000)	0,072 ^a (0,005)
<i>Humulus lupulus</i>	0,246 (0,044)	0,002 (0,000)	0,248 ^{ab} (0,044)
<i>Tamus communis</i>	0,059 (0,000)	0,006 (0,000)	0,065 ^a (0,000)
<i>Allium ampeloprasum</i>	0,242 (0,050)	0,003 (0,002)	0,246 ^{ab} (0,052)

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1), n=3. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Tr. (trazas: $< 5 \mu\text{g}/100\text{g}$)

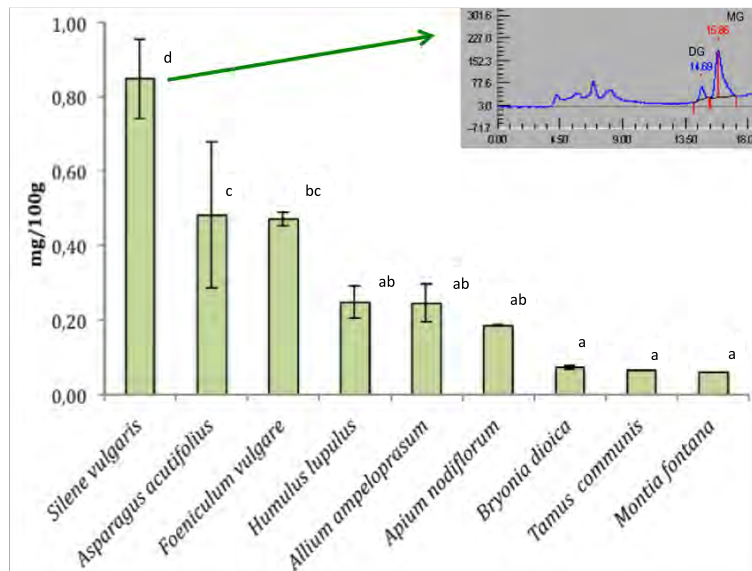


Figura 8.5.1.- Contenido total de folatos en las especies silvestres de tallos, brotes y bulbo estudiadas.

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), $n > 12$.

MG (5MTHF-Monoglutamato); DG (5MTHF-Diglutamato).

Como ocurre con otros parámetros, hasta la fecha, no existen datos bibliográficos relativos al contenido de ácido fólico y folatos de las especies silvestres estudiadas, con los que comparar nuestros resultados. Solo se pueden comparar con los datos bibliográficos de contenido de ácido fólico y folatos de los parientes cultivados de algunas de las especies estudiadas, para el hinojo, la especie silvestre presenta algo más de cuádruple (0,470 mg/100g) de la concentración de folatos encontrada en su pariente cultivado (0,100 mg/100g).

Algo similar ocurre para el espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*) y del ajoporro (*Allium ampeloprasum*). Para el espárrago triguero, la especie silvestre presentó 0,481 mg/100g frente a los 0,095 mg/100g y 0,108 mg/100g encontrados en la especie cultivada (*Asparagus officinalis*) según Soongsongkiat et al. (2010); En el caso del ajoporro su pariente cultivado (*Allium porrum*) presenta concentraciones muy inferiores de folatos

(0,103 mg/100g, según Souci et al., 2008), mientras que los bulbos de otra especie del mismo género (*Allium tuberosum*) presentaron niveles de 0,045 mg/100g y 0,150 mg/100g, según Miyamoto (1973) y Iwatani et al. (2003), respectivamente.

8.6.- Ácidos grasos

Respecto a la caracterización de **compuesto lipófilo** de las especies silvestres analizadas en el presente estudio, todas mostraron un contenido de extracto etéreo relativamente bajo, inferior a 2g/100 g peso fresco, siendo *Montia fontana* la especie que presentó más grasa (1,91 g/100g), seguida por *Tamus communis* con 1,24 g/100g, mientras que *Allium ampeloprasum* fue la especie que presentó los valores más bajos, en torno a 0,51 g/100 g. A partir de la fracción lipófila extraída para evaluar grasa total, se estudió cromatográficamente el perfil de ácidos grasos de dichos vegetales. Se identificaron y cuantificaron un total de treinta ácidos grasos diferentes (Tabla 8.8), siendo los mayoritarios, al igual que para las especies silvestres de hoja, el ácido α -linolénico (ALA, C18:3n3), linoleico (LA, C18:2n6) y el ácido palmítico (PA, C16:0).

La figura 8.6.1 muestra, a modo de ejemplo, el perfil de ácidos grasos que se encuentran en *Tamus communis*.

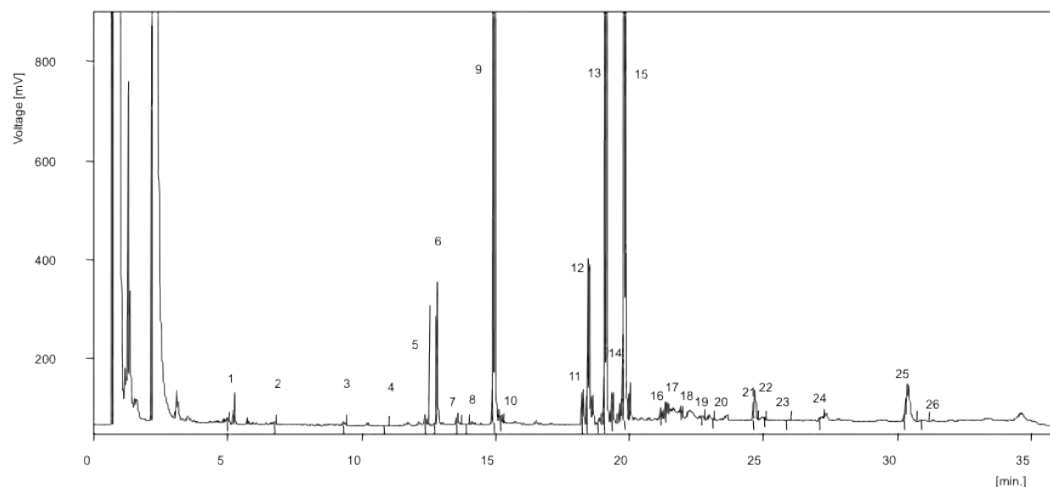


Figura 8.6.1.- Perfil cromatográfico de los ácidos grasos de *Tamus communis*. 1. C8:0; 2. C10:0; 3. C12:0; 4. C13:0; 5. C14:0; 6. C14:1; 7. C15:0; 8. C16:0; 9. C16:1; 10. C17:0; 11. C18:0; 12. C18:1n9c; 13. C18:2n6c; 14. C18:3n6; 15. C18:3n3; 16. C20:0; 17. C20:1c; 18. C20:2c; 19. C20:3n3+C21:0; 20. C20:5n3; 21. C22:0; 22. C22:1n9; 23. C22:2; 24. C23:0; 25. C24:0; 26. C24:1.

Como se muestra en la Tabla 8.6.1, dentro de los ácidos grasos saturados (AGS), el palmítico (AP) fue el mayoritario en las especies estudiadas, donde los porcentajes más elevados se encontraron en *Asparagus acutifolius* (28,65%) seguido de *Allium ampeloprasum* (26,42%). El contenido de este ácido graso en los tallos fue de entre 11,33 y 18,15% (respectivamente para *Montia fontana* y *Silene vulgaris*), mientras que para los brotes los valores oscilan algo más, entre 14,91 a 28,65%, en *Tamus communis* y *Asparagus acutifolius*, respectivamente.

Otros AGS presentes en todas las especies estudiadas fueron el ácido esteárico (C18:0), cuyos niveles más altos fueron observados en *Allium ampeloprasum* (3,30%); el ácido behénico (C22:0), que alcanzó su valor más alto en *Humulus lupulus* (2,86%); así como el ácido lignocérico (C24:0), que también se identificó en todas las muestras, observándose el mayor porcentaje en *Tamus communis* (2,14%). El ácido graso monoinsaturado (AGMI)

más abundante en las especies silvestres fue el ácido oleico (C18: 1), que aparece en todas las muestras con un rango de 1,21% en *Bryonia dioica* a 7,39% en *Allium ampeloprasum*.

Entre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), el AL y ALA fueron los predominantes en la mayoría las especies. El primero (AL) se identificó en todas las muestras, con valores desde 6,48% en *Bryonia dioica* a 53,45% en *Allium ampeloprasum*. Mientras que para el ALA se observaron los valores más altos en *Bryonia dioica* con 67,78% (dentro de los brotes) y con 37% para *Foeniculum vulgare* (dentro de los tallos), no siendo detectado en *Allium ampeloprasum*. Por otra parte, es importante destacar la presencia de otros ácidos grasos poliinsaturados, tales como eicosatrienoico (C20:3n6), eicosapentaenoico (C20:5n3) y docosahexaenoico (C22:6n3); este último sólo se identificó en *Foeniculum vulgare* (Tabla 8.8) de entre todas las verduras estudiadas, incluidas las de hoja.

En general, nuestros resultados parecen estar de acuerdo con los obtenidos por otros autores, como por ejemplo en el caso de *Asparagus acutifolius*, *Bryonia dioica*, *Foeniculum vulgare*, *Silene vulgaris* y *Tamus communis* (Alarcón et al, 2006; Barros et al, 2010a; Martins et al., 2011; Vardavas et al, 2006a). En todos ellos, los ácidos grasos mayoritarios fueron (AP, AL, ALA), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el AL fue el ácido graso principal en *Asparagus acutifolius* y *Tamus communis*, mientras que en *Humulus lupulus* y *Bryonia dioica* el predominante fue el ALA, sobre todo en la segunda especie, donde casi alcanzó el 70% del contenido total de ácidos grasos (véase la tabla 8.6.1).

Por otro lado, se han comparado los datos obtenidos en el presente estudio con los publicados sobre algunas de las especies que se cultivan, como *Foeniculum vulgare* y *Asparagus officinalis* (Souci et al., 2008). El AP se ha identificado en ambas especies cultivadas, el AL fue el ácido graso principal en *Foeniculum vulgare* y en *Asparagus officinalis*, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Tabla 8.6.1.- Contenido relativo de ácidos grasos (%) en los vegetales silvestres de tallos, brotes y bulbo estudiados

	<i>Apium nodiflorum</i>	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Montia fontana</i>	<i>Silene vulgaris</i>	<i>Asparagus acutifolius</i>	<i>Bryonia dioica</i>	<i>Humulus lupulus</i>	<i>Tamus communis</i>	<i>Allium ampeloprasum</i>
C6:0	nd	0,41 (0,02)	nd	0,11 (0,03)	nd	0,02 (0,01)	0,20 (0,05)	nd	nd
C8:0	0,73 (0,09)	0,42 (0,02)	0,05 (0,01)	0,06 (0,02)	0,21 (0,05)	0,08 (0,05)	0,05 (0,01)	0,05 (0,00)	0,33 (0,07)
C10:0	0,20 (0,01)	0,12 (0,01)	0,07 (0,03)	0,05 (0,02)	0,39 (0,06)	0,05 (0,03)	nd	0,04 (0,00)	0,21 (0,02)
C11:0	0,29 (0,01)	nd	nd	0,09 (0,03)	nd	0,00 (0,00)	nd	nd	0,05 (0,01)
C12:0	nd	0,08 (0,01)	0,18 (0,07)	0,44 (0,14)	0,45 (0,05)	0,08 (0,04)	0,05 (0,01)	0,06 (0,00)	0,18 (0,03)
C13:0	nd	0,03 (0,01)	nd	0,01 (0,01)	nd	nd	nd	0,01 (0,00)	0,04 (0,02)
C14:0	0,69 (0,09)	0,83 (0,04)	0,60 (0,14)	1,04 (0,12)	0,72 (0,06)	0,33 (0,09)	0,49 (0,03)	0,15 (0,00)	0,64 (0,03)
C14:1	0,92 (0,09)	0,69 (0,01)	0,34 (0,09)	0,87 (0,04)	nd	0,06 (0,02)	0,08 (0,01)	0,03 (0,00)	nd
C15:0	0,35 (0,18)	0,25 (0,04)	0,36 (0,05)	0,54 (0,04)	0,63 (0,08)	0,17 (0,04)	0,10 (0,04)	0,22 (0,00)	0,55 (0,03)
C16:0	16,29 (0,96)	17,37 (0,28)	11,33 (0,98)	18,15 (0,37)	28,65 (0,02)	17,01 (1,22)	19,52 (0,61)	14,91	26,42 (0,30)
C16:1	1,10 (0,32)	0,15 (0,01)	0,34 (0,03)	0,34 (0,01)	nd	0,10 (0,00)	0,46 (0,01)	0,15 (0,00)	0,22 (0,02)
C17:0	nd	0,29 (0,00)	0,23 (0,00)	0,21 (0,02)	0,72 (0,01)	0,39 (0,02)	0,34 (0,02)	0,17 (0,00)	0,89 (0,13)
C18:0	1,77 (0,33)	1,55 (0,03)	0,99 (0,04)	1,85 (0,01)	2,70 (0,52)	2,66 (0,04)	1,60 (0,05)	0,98 (0,00)	3,30 (0,35)
C18:1n9	3,33 (0,02)	2,14 (0,08)	6,05 (0,42)	2,74 (0,10)	4,87 (0,07)	1,21 (0,03)	1,88 (0,10)	4,57 (0,01)	7,39 (0,42)
C18:2n6	24,60 (0,77)	37,01 (0,13)	18,22 (0,39)	22,26 (0,35)	42,29 (0,02)	6,48 (0,10)	29,72 (0,85)	42,45	53,45 (0,27)
C18:3n6	nd	nd	0,40 (0,01)	0,19 (0,04)	nd	nd	0,36 (0,01)	0,90 (0,01)	nd
C18:3n3	43,46 (0,08)	35,54 (0,52)	47,65 (0,23)	44,68 (0,64)	14,01 (0,54)	67,78 (1,10)	38,16 (0,02)	31,27	nd
C20:0	0,34 (0,04)	0,76 (0,01)	9,45 (1,72)	2,79 (0,05)	0,45 (0,14)	0,52 (0,00)	2,34 (0,15)	0,22 (0,01)	0,80 (0,22)
C20:1	nd	0,10 (0,02)	0,05 (0,01)	0,06 (0,02)	nd	nd	0,13 (0,01)	0,25 (0,06)	nd
C20:2	nd	0,12 (0,01)	nd	0,19 (0,00)	nd	nd	0,34 (0,09)	0,17 (0,05)	0,17 (0,02)
C20:3n6	2,64 (2,85)	nd	0,71 (0,55)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C20:3n3+C21:0	nd	0,14 (0,04)	0,14 (0,00)	0,17 (0,02)	nd	0,16 (0,01)	0,44 (0,04)	0,04 (0,00)	0,44 (0,04)
C20:5n3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,04 (0,01)	0,10 (0,01)
C22:0	1,22 (0,05)	1,02 (0,03)	1,53 (0,33)	1,03 (0,01)	2,22 (0,03)	1,04 (0,05)	2,86 (0,23)	1,01 (0,01)	2,75 (0,05)
C22:1n9	nd	nd	0,68 (0,00)	0,34 (0,03)	nd	0,26 (0,03)	nd	0,01 (0,01)	nd
C22:2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,04 (0,01)	nd
C22:6n3	nd	0,14 (0,05)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C23:0	nd	0,16 (0,03)	0,06 (0,01)	0,06 (0,02)	0,36 (0,17)	nd	nd	0,11 (0,00)	0,34 (0,07)
C24:0	2,07 (0,02)	0,69 (0,05)	0,58 (0,06)	1,74 (0,13)	1,33 (0,31)	1,58 (0,21)	0,89 (0,54)	2,14 (0,07)	1,73 (0,49)
C24:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,05 (0,01)	nd
Extracto etéreo (%)	0,74	0,76	1,91	1,31	0,99	1,39	1,08	1,24	0,51

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1), n=3. Ácido Caproico (C6:0); Ácido caprylico (C8:0); Ácido caprico (C10:0); Ácido undecanoico (C11:0); Ácido láurico (C12:0); Ácido tridecanoico (C13:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido miristoleico (C14:1); Ácido pentadecanoico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido heptadecanoico (C17:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido γ -linolénico (C18:3n6); Ácido α -linolénico (C18:3n3); Ácido arachídico (C20:0); Ácido eicosenoico (C20:1c); Ácido cis-11.14-eicosadienoico (C20:2c); Ácido cis-8.11.14-eicostrienoico (C20:3n6); Ácido cis-11.14.17-eicosatrienoico y Ácido heneicosanoico (C20:3n3 + C21:0); Ácido cis-5. 8. 11. 14. 17-eicosapentaénico (C20:5n3); Ácido eneicosanoico (C21:0); Ácido behénico (C22:0); Ácido erucico (C22:1n9); Ácido cis-13. 16- docosadienoico (C22:2); Ácido cis- 4. 7. 10. 13. 16. 19 – docosahexaenoico (C22:6n3); Ácido tricosanoico (C23:0); Ácido lignocérico (C24:0); Ácido nervónico (C24:1). nd (no detectado).

Los porcentajes de cada grupo de ácidos grasos (AGS, AGMI y AGPI), la relación entre AGPI/AGS y las proporciones de ω -6/ ω -3 se han calculado para valorar, desde un punto de vista nutricional, la calidad de la fracción de ácidos grasos de estas especies silvestres comestibles. Dichos resultados se muestran en la Tabla 8.6.2; la Figura 8.6.2 muestra la contribución de cada grupo de ácidos grasos en todas estas especies estudiadas.

Tabla 8.6.2.- Contribución de cada tipo de ácidos grasos en especies silvestres de tallo, brote y bulbo

<i>Especie</i>	Total AGS	Total AGMI	Total AGPI	AGPI/AGS	ω -6/ ω -3
<i>Apium nodiflorum</i>	23,94 ^b (1,56)	5,36 ^e (0,44)	70,70 ^{bc} (2,00)	2,96 ^{cd} (0,28)	0,63 ^a (0,05)
<i>Foeniculum vulgare</i>	23,97 ^b (0,26)	3,08 ^d (0,08)	72,95 ^c (0,32)	3,04 ^d (0,05)	1,03 ^a (0,02)
<i>Montia fontana</i>	25,42 ^b (0,87)	7,46 ^f (0,30)	67,12 ^b (1,17)	2,64 ^{bc} (0,14)	0,40 ^a (0,02)
<i>Silene vulgaris</i>	28,17 ^c (0,83)	4,35 ^d (0,14)	67,48 ^b (0,97)	2,40 ^b (0,10)	0,50 ^a (0,00)
<i>Asparagus acutifolius</i>	38,83 ^d (0,49)	4,87 ^{de} (0,07)	56,30 ^a (0,56)	1,45 ^a (0,03)	3,02 ^a (0,11)
<i>Humulus lupulus</i>	28,43 ^b (0,76)	2,55 ^b (0,10)	69,02 ^b (0,85)	2,43 ^{bc} (0,10)	0,78 ^a (0,02)
<i>Tamus communis</i>	18,85 ^a (0,73)	0,92 ^a (0,10)	80,23 ^{cd} (0,68)	4,26 ^e (0,20)	0,21 ^a (0,01)
<i>Bryonia dioica</i>	23,95 ^a (1,20)	1,63 ^e (0,02)	74,42 ^c (1,21)	3,11 ^d (0,21)	0,10 ^a (0,00)
<i>Allium ampeloprasum</i>	38,23 ^d (0,63)	7,61 ^f (0,44)	54,16 ^a (0,29)	1,42 ^a (0,03)	99,59 ^b (5,80)

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). AGS (Ácidos grasos saturados); AGMI (ácidos grasos monoinsaturados); AGPI (ácidos grasos poliinsaturados).

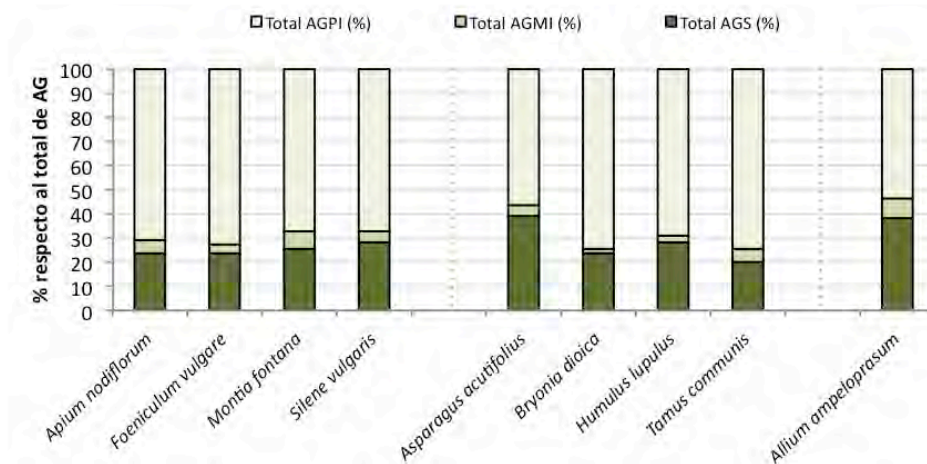


Figure 8.6.2. Contribuciones AGS, AGMI y AGPI al contenido total de ácidos grasos presentes en los vegetales silvestres estudiados

Como se puede observar en la Tabla 8.6.2 y Figura 8.6.2, *Allium ampeloprasum* fue la especie que mostró el valor más alto del total de AGS (38,23%), mientras que *Tamus communis* fue el que menor porcentaje presentó (18,85%). Los tallos fueron bastante homogéneos entre si respecto al contenido de AGS, con valores en torno al 23-28%, mientras que en los brotes, se observó una mayor variación, con valores de entre 18,85% para *Tamus communis* a 38,83% para *Asparagus acutifolius*.

Respecto a los ácidos grasos insaturados, *Allium ampeloprasum* presentó el valor más alto de AGMI (7,61%) en contraste con *Tamus communis* (0,92%), mientras que esta última especie que mostró el mayor contenido total AGPI (80,23%). De los brotes tiernos, *Asparagus acutifolius* fue el que presentó un menor contenido de AGPI (56,30%), por otro lado, para los tallos, dichos valores oscilaron entre 67% de *Montia fontana* al 72% de *Foeniculum vulgare*.

Tal y como se comentó en el capítulo anterior la relación AGPI/AGS así como ω -6/ ω -3 son buenos indicadores de la calidad de la dieta en lo referente a la ingesta de grasas. En este aspecto, destacó el ajoporro (*Allium ampeloprasum*) por presentar valores de 99,59; así como el espárrago triguero destacó entre los brotes tiernos (3,02), al igual que el hinojo (1,03) para los tallos. De todas las especies estudiadas en este capítulo, el espárrago de nuez (*Bryonia dioica*) fue la especie que menor proporción presentó (0,10), contribuyendo así mejor a un perfil lipídico, más saludable en la dieta.

8.7.- Tocoferoles (Vitamina E)

Respecto al contenido de **Vitamina E**, las cuatro isoformas (**α , β , γ y δ**) tocoferoles fueron identificadas en las muestras estudiadas. La Figura 8.7.1 muestra, a modo de ejemplo, un perfil de tocoferoles obtenidos para las collejas (*Silene vulgaris*), y la figura 8.7.2 muestra el contenido de tocoferoles totales en las muestras analizadas.

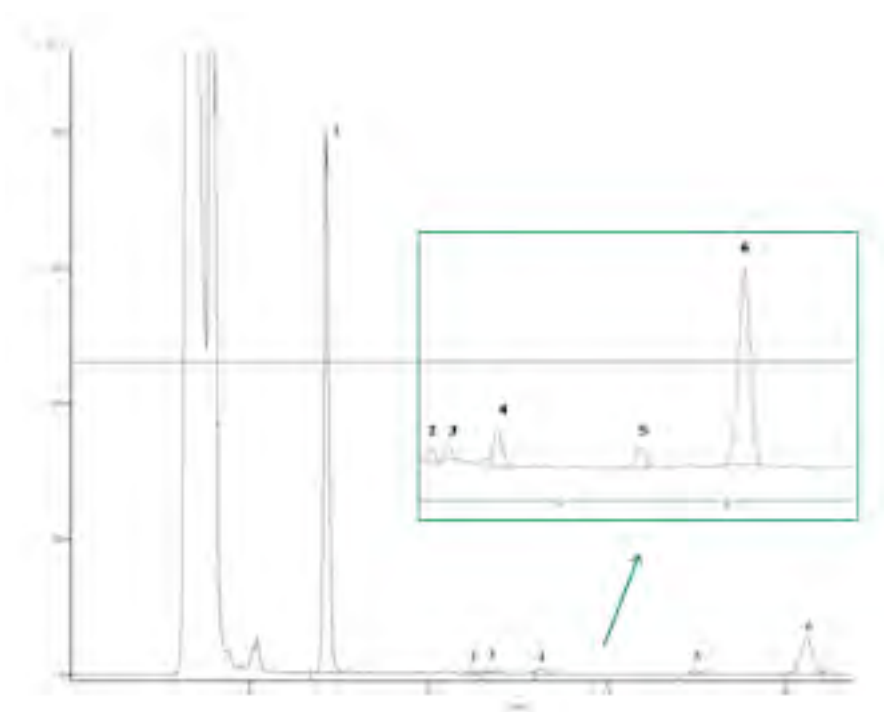


Figura 8.7.1.- Perfil cromatográfico (HPLC-FL) de *Silene vulgaris*. Picos: (1) α -tocopherol; (2) BHT (butilhidroxitolueno); (3) β -tocopherol; (4) γ -tocopherol; (5) δ -tocopherol; (6) P.I. – Patrón interno (tocol)

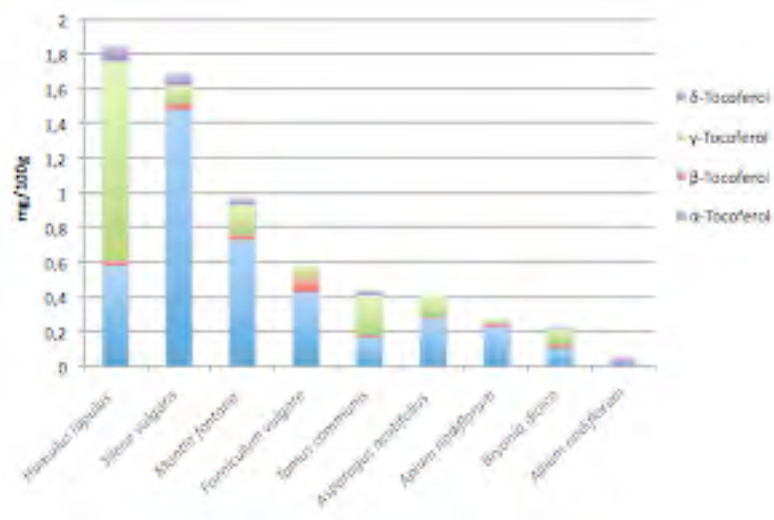


Figura 8.7.2.- Contenido total de tocoferoles y sus isoformas (mg/100g) en los vegetales silvestres analizados en el presente estudio

Tabla 8.7.1. Composición de tocoferoles (mg/100g) en las especies silvestres de tallo, brote y bulbo analizadas en el presente estudio

<i>Especie</i>	α -Tocoferol	β -Tocoferol	δ -Tocoferol	γ -Tocoferol	Total
<i>Apium nodiflorum</i>	0,23 ^b (0,00)	0,02 ^{ab} (0,00)	nd	0,02 ^a (0,00)	0,27 ^{abc} (0,00)
<i>Foeniculum vulgare</i>	0,43 ^c (0,13)	0,08 ^c (0,04)	nd	0,07 ^{ab} (0,06)	0,57 ^d (0,13)
<i>Montia fontana</i>	0,73 ^e (0,01)	0,03 ^{ab} (0,00)	0,04 ^c (0,00)	0,17 ^{cd} (0,00)	0,98 ^e (0,01)
<i>Silene vulgaris</i>	1,48 ^f (0,17)	0,04 ^{bc} (0,01)	0,07 ^d (0,00)	0,10 ^b (0,01)	1,70 ^f (0,19)
<i>Asparagus acutifolius</i>	0,28 ^{bc} (0,00)	0,01 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	0,12 ^{bc} (0,01)	0,41 ^{bcd} (0,01)
<i>Bryonia dioica</i>	0,11 ^{ab} (0,01)	0,02 ^{ab} (0,00)	0,01 ^a (0,00)	0,09 ^b (0,01)	0,23 ^{ab} (0,02)
<i>Humulus lupulus</i>	0,58 ^{de} (0,06)	0,03 ^{ab} (0,00)	0,10 ^d (0,00)	1,15 ^e (0,00)	1,83 ^f (0,07)
<i>Tamus communis</i>	0,17 ^{ab} (0,01)	0,01 ^a (0,00)	0,03 ^{bc} (0,00)	0,23 ^d (0,02)	0,46 ^{cd} (0,01)
<i>Allium nodiflorum</i>	0,03 ^a (0,01)	nd	nd	0,02 ^a (0,00)	0,05 ^a (0,01)

Valores expresados como Medias (desviación estándar, n-1), n=3. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

nd (no detectado).

El α -tocoferol fue la forma más abundante en todas las muestras estudiadas. Dado que según Caretto et al., (2010) dicha isoforma es la más activa y la que mayor actividad vitamínica posee, podemos suponer que la especie con la mayor actividad vitamínica E fue *Silene vulgaris* que presentó un contenido total de tocoferol de 1,70 mg/100g (tabla 8.7.1), donde el α -tocoferol fue la isoforma predominante (1,48 mg/100 g). Por otro lado, *Humulus lupulus* presentó el mayor contenido de tocoferoles totales (1,83 mg/100 g), aunque con una menor proporción de α -tocoferol, siendo su isoforma mayoritaria, fue el γ -tocoferol (1,15 mg/100 g).

El δ -tocoferol no se encontró en *Apium nodiflorum* ni en *Foeniculum vulgare*, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Vardavas et al. (2006b) para la berraza y Barros et al., (2009) para el hinojo. Sin embargo, las especies españolas de *Silene vulgaris* y

Foeniculum vulgare revelaron un mayor contenido de tocoferol que las muestras de procedencia portuguesa y cretense respectivamente.

Por otra parte, las muestras de *Asparagus acutifolius*, *Bryonia dioica* y *Tamus communis* procedentes de Portugal y analizadas por Martins et al. (2011) mostraron mayor contenido de tocoferoles que los brotes jóvenes recolectadas en España, siendo en ambos casos el α -tocoferol la isoforma predominante. Dicha variabilidad podría deberse a las diferentes condiciones climáticas y del suelo así como por las condiciones post-cosecha a las que se ve sometida la planta (Prohens et al., 2005). En este sentido, especies cultivadas de *Asparagus officinalis* mostraron un contenido total de tocoferoles de 2,1 mg/100 g, de los cuales 2 mg correspondieron al α -tocoferol, 50 μ g y 70 μ g al β y γ -tocoferol respectivamente, valores inferiores a su pariente silvestre (*Asparagus acutifolius*) (Souci et al., 2008). Por su parte, *Allium porrum* y *Allium sativum*, especies cultivadas próximas a *Allium ampeloprasum*, presentaron valores superiores que la especie silvestre (contenido de tocoferoles totales de 100 y 547 μ g respectivamente), siendo en ambos casos el α -tocoferol la isoforma mayoritaria.

8.8.- Compuestos fenólicos y flavonoides totales

Los **fenoles y flavonoides totales**, por sus propiedades antioxidantes tiene un papel importante en los mecanismos de defensa antioxidante de los sistemas biológicos (Nijveldt et al., 2001). Al igual que en el capítulo anterior, para una correcta interpretación y discusión de los resultado, en el presente estudio se procedió a calcular el contenido de **compuestos fenólicos y flavonoides** expresados de dos formas diferentes, por un lado como meq de ácido gálico/100g y meq de catequina/100, respectivamente, ambos sobre sustancia fresca, tal y como se muestra en la figura 8.8.1, y por otro como expresados como meq de ácido gálico/g extracto metanólico y meq de catequina/g extracto metanólico tal y como se indica en la tabla 8.8.1.

Como podemos observar en la figura 8.8.1, la coruja (*Montia fontana*) fue la especie que mayor contenido de compuestos fenólicos (237,02 meq ácido gálico/100g muestra), seguido por el hinojo (*Foeniculum vulgare*) y el espárrago de zarza (*Humulus lupulus*), mientras que la colleja (*Silene vulgaris*) y el ajoporro (*Allium ampeloprasum*) fueron las especies que menor contenido total de compuestos fenólicos presentó (62,38 y 42,24 meq de ácido gálico/100g muestra). En relación al contenido de los flavonoides, destacó *Apium nodiflorum* (143,29 meq de catequina/100g muestra) por presentar los mayores niveles ($p < 0,05$), siendo el ajoporro (*Allium ampeloprasum*) la especie que menor contenido de flavonoides presentó (6,29 meq de catequina/100g muestra).

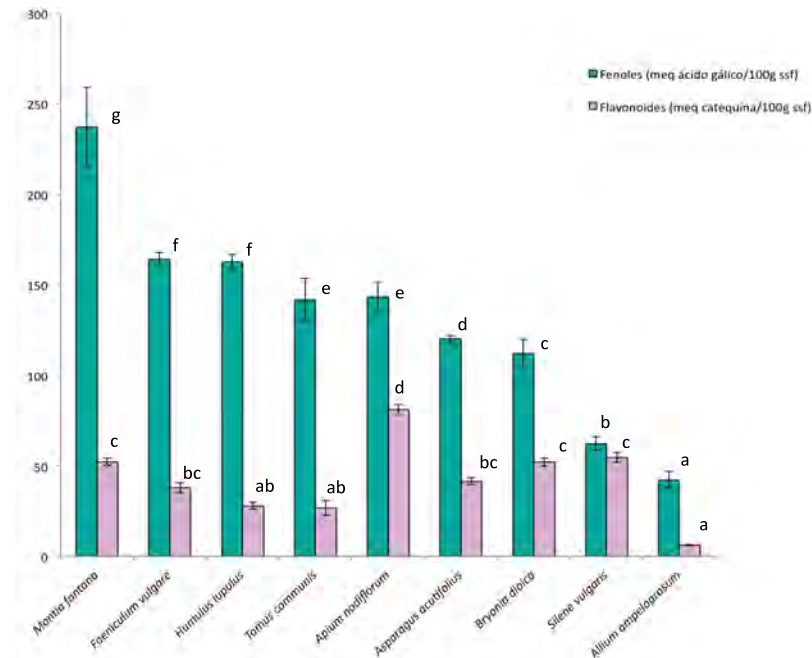


Figura 8.8.1.- Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales en las verduras silvestres estudiados. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), $n = 3$.

Tabla 8.8.1.- Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales en especies silvestres de tallo, brote y bulbo analizadas en el presente estudio

Especie	Fenoles totales (meq AG/g extracto)	Flavonoides totales (mg EC/g extracto)
<i>Apium nodiflorum</i>	80,47 ^h (4,41)	45,48 ^f (1,61)
<i>Foeniculum vulgare</i>	42,16 ^e (0,98)	9,72 ^c (0,70)
<i>Montia fontana</i>	75,53 ^h (7,05)	16,67 ^d (0,62)
<i>Silene vulgaris</i>	26,72 ^c (1,63)	21,65 ^e (5,53)
<i>Asparagus acutifolius</i>	17,60 ^b (0,29)	6,09 ^b (0,27)
<i>Bryonia dioica</i>	35,10 ^d (2,43)	16,31 ^d (0,70)
<i>Humulus lupulus</i>	55,83 ^g (1,34)	9,56 ^c (0,65)
<i>Tamus communis</i>	49,51 ^f (4,07)	9,33 ^c (1,44)
<i>Allium ampeloprasum</i>	5,77 ^a (0,63)	0,86 ^a (0,05)

Valores expresados como: Medias (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). EAG (equivalentes de ácido gálico) y EC (equivalentes de catequina).

Se han realizado varios estudios relativos a la composición de fenoles y flavonoides totales en muestras de *Foeniculum vulgare* procedentes de Portugal, Finlandia, Italia e Irán. Comparando nuestros resultados con los obtenidos por estos autores, el hinojo español mostró un mayor contenido de fenoles totales (42,16 mg EAG/g extracto) mucho mayor que el hinojo de origen portugués, iraní y finlandés (8,61 mg EAG/g de extracto, 7,74 mg EAG/g y 30,3 mg/EAG g extracto, respectivamente) pero menor que su pariente italiano (80 mg EAG/g). Aunque la especie iraní presentó menor contenido de fenoles totales, presentó una concentración superior de flavonoides totales (16,49 mg EC/g) respecto de la especie recolectada en España (Hinneburg et al., 2006; Barros et al, 2009; Conforti et al., 2009; Motamed y Naghibi, 2010).

En relación a los brotes, *Humulus lupulus* presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos (55,83 mg EAG/g de extracto), significativamente superior que los valores

indicados para la misma especie procedente de Polonia (7,14 mg EAG/g de extracto) indicado por Wojdylo et al. (2007). Comparando los espárragos triguero, de nuez y el lupio procedentes de Portugal con sus parientes procedentes de España, se observó que las muestras portuguesas presentaron un mayor contenido de compuestos fenólicos (624 mg EAG/g de extracto, 258 mg EAG/g de extracto y 759 mg EAG/g de extracto, respectivamente) y flavonoides (57,8, 18,1 150 mg EC/g de extracto, respectivamente) que las muestras de españolas (Martins et al., 2011).

En el caso del ajoporro (*Allium ampeloprasum*), estudios realizados por otros autores en otras especies de su misma familia como son *Allium cepa* y *Allium sativum*, indicaron niveles de fenoles totales en torno a 15,87 y 9 mg EAG/ g extracto, ambos superiores a los encontrados en la variedad silvestre (5,77 mg EAG/ g extracto). En el caso de los flavonoides totales únicamente *Allium cepa* presentó niveles superiores (1,31 mg EC/g extracto) respecto de la especie silvestre (0,86 mg EC/g extracto), mientras que *Allium sativum* presentó concentraciones menores para dicho compuesto (0,56 mg EC/g extracto) tal y como indicaron Gorinstein et al. (2009). Por otro lado, Santos et al. (2008) indicaron valores de 2,58 mg EAG/g extracto para el Calçot, una variedad muy similar al ajo porro típicamente consumida en Cataluña, el cual presenta niveles ligeramente inferiores al ajoporro.

8.9.- Capacidad antioxidante

Las **propiedades antioxidantes** de los vegetales estudiados fueron valoradas por diferentes métodos *in vitro*: la actividad de barrido de radicales DPPH, poder reductor y la inhibición de la peroxidación lipídica por el sistema de β -caroteno linoleato y ensayo de TBARS (Figura 8.9.1a,b). Para ello, se dividieron las especies en dos grandes subgrupos, por un lado los brotes tiernos y por otro los tallos tiernos con hojas y el bulbo.

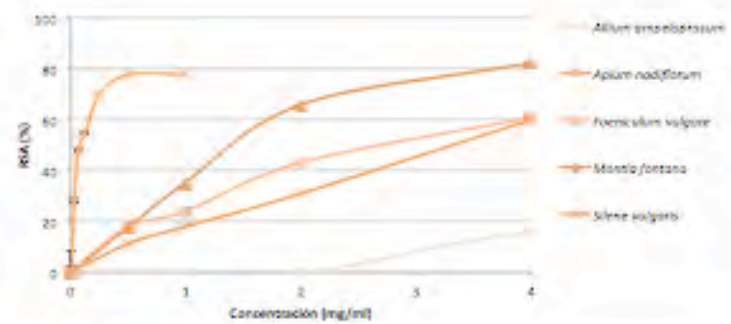
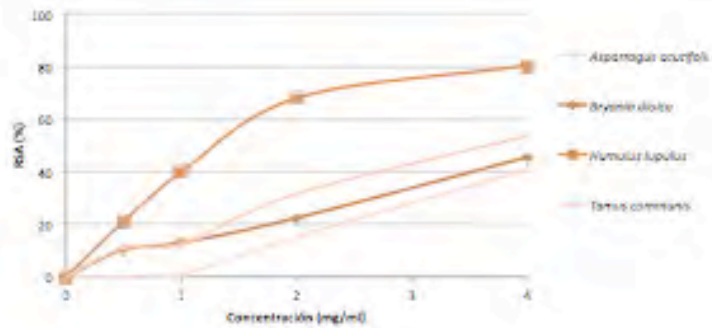
Comparando las curvas de cinética obtenida en el DPPH para cada especie, *Apium nodiflorum* fue la especie que mostró una mayor actividad antiradicalaria (RSA), medida por este método, presentando en torno al 80% de actividad inhibitoria a la concentración de 0,25 mg/ml (Figura 8.9.1a), mientras que *Montia fontana* no alcanzó el mismo nivel de inhibición (80% de RSA) hasta la concentración de 4 mg/ml. A esa misma concentración, *Silene vulgaris* y *Foeniculum vulgare* presentaron únicamente el 60% (RSA), y *Allium ampeloprasum* fue la especie que menor capacidad antioxidante presentó por este método, dado que a la concentración de 4 mg/ml no había alcanzado el 20% de inhibición (RSA).

Algo similar ocurrió para el método del poder reductor, siendo *Silene vulgaris* y *Foeniculum vulgare* las especies que presentaron la menor capacidad antioxidante, con una absorbancia inferior a 1,2 para la concentración de 2 mg/ml (Figura 8.9.1a), mientras que *Apium nodiflorum* fue la especie que mayor poder reductor presentó, alcanzando una absorbancia de 3,74 a la concentración 0,25 mg/ml.

En relación al ensayo de inhibición de la decoloración de β -caroteno, *Apium nodiflorum* fue, una vez más, la especie con mayor capacidad antioxidante, alcanzando porcentajes superiores a 85% con la concentración de 1 mg/ml, mientras que *Foeniculum vulgare* y *Allium ampeloprasum* a la concentración de 4 mg/ml únicamente alcanzaron alrededor del 60% de inhibición (Figura 8.9.1b).

Por otro lado, para el ensayo del TBARS, en general los espárragos mostraron una menor capacidad inhibitoria frente a este método, alcanzando a la concentración de 0,125 mg/ml porcentajes entre 56% (*Bryonia dioica*) al 67% (*Humulus lupulus*), al igual que en el caso del *Allium ampeloprasum* que a esa misma concentración presentó un 61,9%. Los tallos tiernos con hojas mostraron mayores porcentajes, de hasta 84% en el caso del hinojo (Figura 8.9.1b).

Cinética del ensayo de DPPH



Cinética del ensayo de poder Reductor

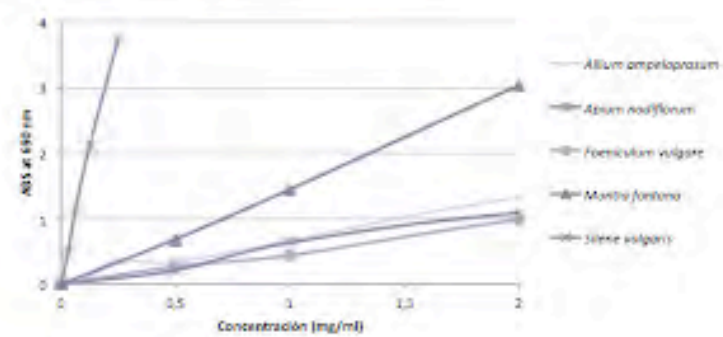
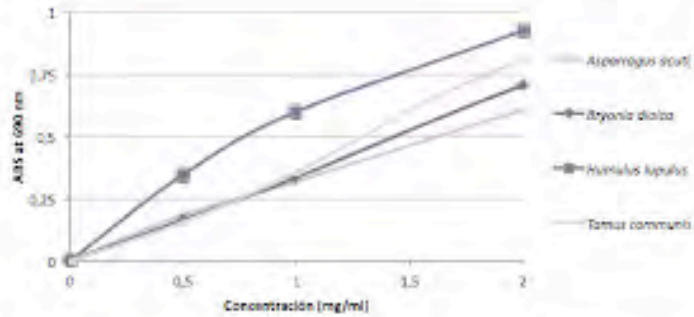


Figura 8.9.1a.- Cinéticas obtenidas a partir de los ensayos de capacidad antioxidante *in vitro* (DPPH y poder reductor) realizados sobre las partes comestibles de las especies silvestres de hoja analizadas. ABS (Absorbancia); RSA (Actividad antirradicalaria)

Cinética del ensayo de inhibición de la decoloración del β - Caroteno



Cinética del ensayo de TBARS

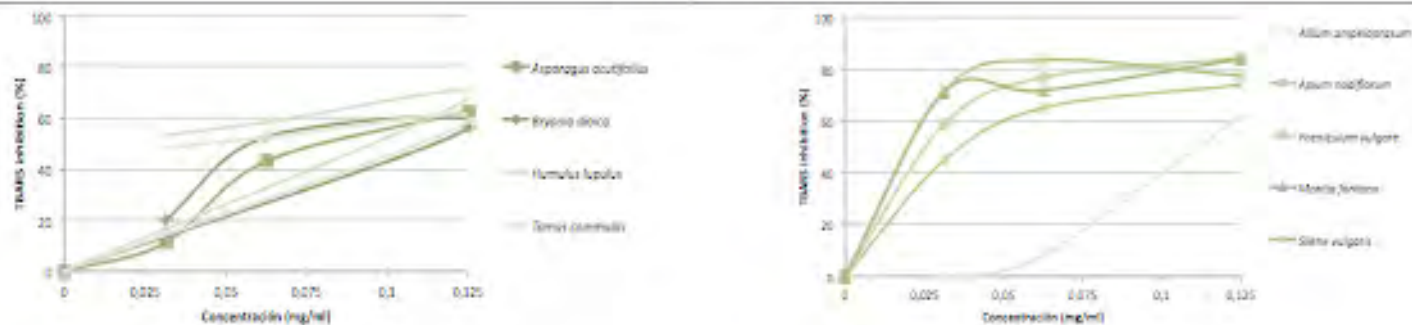


Figura 8.9.b.- Cinéticas obtenidas a partir de los ensayos de capacidad antioxidante *in vitro* (inhibición de la decoloración del β - Caroteno y TBARS) realizados sobre las partes comestibles de las especies silvestres de hoja analizadas. ABS (Absorbancia); RSA (Actividad antiradicalaria)

Para estandarizar los resultados obtenidos en este tipo de ensayos, es habitual calcular el parámetro EC_{50} . La figura 8.9.3 muestra las EC_{50} (mg/ml) correspondientes a los diferentes métodos antioxidantes *in vitro* evaluados, obteniéndose nuevamente que de entre todas las especies estudiadas en este capítulo, *Apium nodiflorum* ha presentado una mayor capacidad antioxidante.

Allium ampeloprasum fue la especie que menor capacidad antioxidante ($p < 0,05$) presentó para el ensayo del DPPH, con valores de EC_{50} de 13,09 mg/ml, mientras que *Apium nodiflorum* fue la especie que mostró la mayor capacidad antioxidante (EC_{50} de 0,02 mg/ml), al igual que para el ensayo del poder reductor, en el cual la especie que mostraron una menor capacidad antioxidante ($p < 0,05$) fue *Asparagus acutifolius* con valores de EC_{50} de 1,62.

Desde el punto de vista de inhibición de peroxidación lipídica, *Allium ampeloprasum* y *Silene vulgaris* fueron las especies que presentaron un mayor valor de EC_{50} (1,6 mg/ml y 0,62 mg/ml, respectivamente) y por lo tanto menor capacidad antioxidante para el ensayo inhibición de la decoloración de β -caroteno, mientras que *Apium nodiflorum* fue la especie que presentó mayor capacidad antioxidante con EC_{50} de 0,02 mg/ml. Respecto al TBARS, *Asparagus acutifolius* y *Bryonia dioica* fueron las especies que menor capacidad inhibitoria presentaron, con valores de EC_{50} de 0,7 y 0,8 mg/ml, respectivamente, mientras que *Foeniculum vulgare*, *Montia fontana* y *Silene vulgaris* fueron las especies que menores EC_{50} presentaron para este método (0,02 mg/ml de extracto).

Comparando nuestros resultados con los publicados por otros autores, podemos afirmar que las muestras del hinojo analizadas en este estudio (*Foeniculum vulgare*) dio valores mucho más bajos de EC_{50} que las muestras de hinojo de origen portugués analizadas por Barros et al, (2009) y Mata et al (2007), y similar actividad antioxidante frente al DPPH que el hinojo procedente de Irán (con EC_{50} de 2 mg/ml; Hinneburg et al, 2006), pero menor actividad antioxidante frente a ese mismo método y mayor capacidad de inhibición del

TBARS que el de origen italiano (0,15 mg / ml y 0,25 mg / ml) analizado por Conforti et al., (2009).

Respecto al espárrago de nuez (*Humulus lupulus*), Wojdylo et al. (2007) analizaron especies procedentes de Polonia, indicando mayores EC_{50} (83,2 mg / ml de extracto) y por lo tanto menor actividad antioxidante frente al DPPH respecto a los resultados encontrados en este estudio.

Por otro lado, comparando con espárragos silvestres (*Asparagus acutifolius*, *Bryonia dioica* y *Tamus communis*) de origen portugués (Martins et al., 2011), éstos presentaron menores valores de EC_{50} , excepto para el ensayo de TBARS, que las especies analizadas en este trabajo.

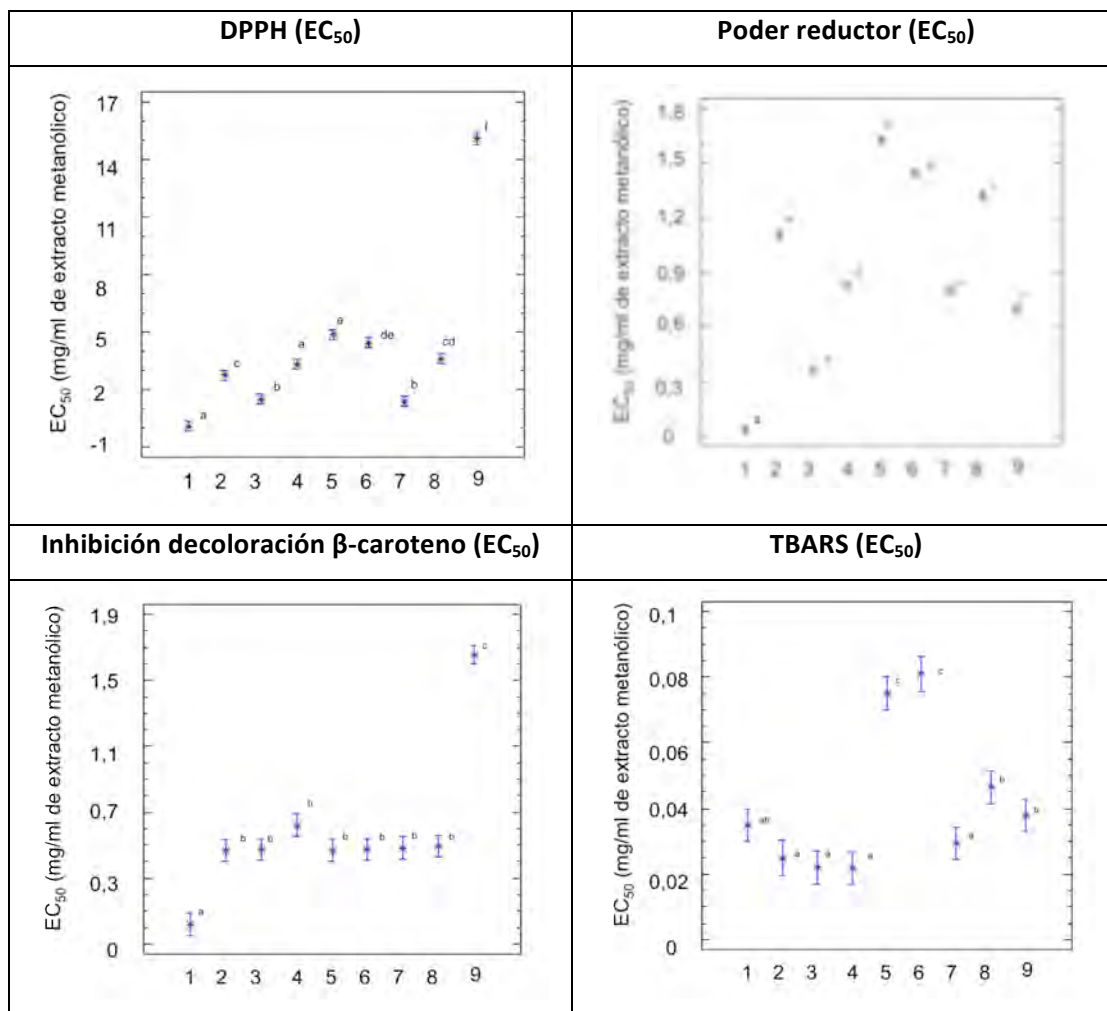


Figura 8.9.2.- Test de Duncan ($p < 0,05$) para EC₅₀ (mg/ml extracto metanólico) de las especies silvestres de hoja estudiadas. *Apium nodiflorum* (1), *Foeniculum vulgare* (2), *Montia fontana* (3), *Silene vulgares* (4), *Asparagus acutifolius* (5), *Bryonia dioica* (6), *Humulus lupulus* (7), *Tamus communis* (8), *Allium ampeloprasum* (9)

9. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE VERDURAS SILVESTRES ANALIZADAS

En este capítulo se realiza la comparación conjunta de las 20 especies de verduras silvestres más frecuentemente consumidas en la Comunidad de Madrid, que han sido objeto de estudio en este trabajo, apartado D, cuadro 5.1.

Parámetros fisicoquímicos (humedad, pH y acidez titulable)

Tal y como se muestra en la tabla 9.1, la lenguaza (*Anchusa azurea*), la berraza (*Apium nodiflorum*) y el cardo (*Silybum marianum*) destacaron, de entre todas las especies analizadas, por presentar el mayor contenido de agua (90,32 a 93,44 %), mientras que el ajoporro (*Allium ampeloprasum*) fue la especie que presentó el menor porcentaje hídrico (78,32%), y por tanto, mayor proporción de materia seca.

Respecto a la acidez, valorada mediante la acidez titulable y el pH, las especies del género *Rumex* destacaron por su elevada acidez, especialmente la acedera con un pH de 3,07 y acidez titulable de 132,92 ml NaOH 0,1N/100 g; mientras que la lenguaza (*Anchusa azurea*) fue la especie menos ácida, con valores de pH significativamente superiores al resto (6,97) y valores de acidez significativamente inferiores (5,49 ml NaOH 0,1N/100 g).

Tabla 9.1.- Valores medios de los parámetros fisicoquímicos (humedad, pH y acidez titulable) analizados en las verduras silvestres estudiadas

Especie	Humedad (%)	pH	Acidez titulable (ml NaOH 0,1 N/100g)
<i>Anchusa azurea</i>	90,32 ^{efg} (1,45)	6,97 ^h (0,30)	5,49 ^a (2,76)
<i>Beta maritima</i>	84,51 ^{bc} (4,47)	6,25 ^{fg} (1,61)	13,69 ^{abc} (6,48)
<i>Papaver rhoeas</i>	82,54 ^{bcd} (8,87)	5,96 ^{def} (0,75)	16,70 ^{abc} (5,53)
<i>Rumex papillaris</i>	89,10 ^{bcd} (1,66)	3,07 ^a (0,35)	132,92 ^e (45,29)
<i>Rumex pulcher</i>	85,36 ^b (6,77)	4,68 ^b (0,14)	31,50 ^d (9,81)
<i>Chondrilla juncea</i>	86,40 ^{def} (1,48)	5,59 ^{cd} (0,63)	9,95 ^{ab} (3,69)
<i>Cichorium intybus</i>	79,11 ^{ab} (10,67)	5,66 ^{de} (0,65)	11,96 ^{ab} (5,64)
<i>Sonchus oleraceus</i>	88,45 ^{def} (3,16)	5,70 ^{de} (0,49)	19,26 ^{bc} (10,80)
<i>Taraxacum obovatum</i>	83,89 ^{bc} (3,29)	5,97 ^{def} (0,30)	10,68 ^{ab} (6,00)
<i>Scolymus hispanicus</i>	84,15 ^{bc} (9,45)	5,69 ^{de} (0,77)	6,85 ^{ab} (3,49)
<i>Silybum marianum</i>	93,44 ^g (0,38)	5,25 ^c (0,44)	6,95 ^{ab} (4,25)
<i>Apium nodiflorum</i>	90,91 ^{fg} (1,34)	6,20 ^{fg} (0,27)	7,69 ^{ab} (6,30)
<i>Foeniculum vulgare</i>	86,89 ^{cde} (2,18)	6,04 ^{de} (0,37)	14,47 ^{abc} (1,93)
<i>Montia fontana</i>	87,78 ^{fg} (4,91)	5,62 ^d (0,09)	10,13 ^{ab} (2,97)
<i>Silene vulgaris</i>	85,39 ^{bcd} (2,92)	5,67 ^{de} (0,43)	14,11 ^{abc} (9,12)
<i>Asparagus acutifolius</i>	85,23 ^{bcccd} (2,95)	5,94 ^{def} (0,56)	17,68 ^{bc} (4,52)
<i>Bryonia dioica</i>	85,51 ^{cde} (8,28)	5,93 ^{def} (0,78)	14,80 ^{abc} (7,77)
<i>Humulus lupulus</i>	87,25 ^{cde} (3,37)	6,43 ^g (0,27)	23,58 ^d (7,42)
<i>Tamus communis</i>	87,27 ^{def} (1,79)	6,01 ^{ef} (0,23)	14,19 ^{ab} (2,55)
<i>Allium ampeloprasum</i>	78,32 ^a (2,30)	5,76 ^{de} (0,30)	14,36 ^{bc} (3,41)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1) n=15. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) Duncan test.

Compuestos bioactivos de naturaleza hidrófila (vitaminas, ácidos orgánicos, fenoles y flavonoides)

En relación al contenido de **vitamina C total**, entre todas las especies estudiadas destacaron dos especies constituidas por brotes tiernos con hojas, como son el espárrago de zarza (*Humulus lupulus*) y el lupio (*Tamus communis*), por presentar las mayores concentraciones de dicha vitamina, 42,20 y 59,33 mg/100g, respectivamente.

Ambas especies, conjuntamente con la coruja (*Montia fontana*), y el espárrago triguero (*Asapragus acutifolius*) son las especies que mayor cantidad de AA presentaron (figura 9.1), de modo que podemos afirmar que el espárrago triguero, espárrago de zarza y la coruja son una buena fuente de AA tanto en la dieta como para su potencial empleo en la industria como ingrediente funcional.

Tabla 9.2.- Contenido medio de AA, ADHA y Vitamina C total (mg/100g) de las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

Especies	AA (mg/100g)	ADHA (mg/100g)	Vitamina C total (mg/100g)
<i>Anchusa azurea</i>	0,67 ^a (0,14)	11,74 ^{def} (6,41)	12,09 ^{bcd} (6,02)
<i>Beta maritima</i>	9,99 ^{cd} (1,62)	10,63 ^{cde} (2,51)	21,36 ^{cde} (3,12)
<i>Papaver rhoeas</i>	14,11 ^d (2,25)	16,86 ^{ef} (10,06)	31,03 ^{fg} (12,29)
<i>Rumex papillaris</i>	14,28 ^{cd} (8,24)	10,96 ^{de} (5,34)	25,81 ^{ef} (6,48)
<i>Rumex pulcher</i>	20,22 ^f (3,56)	15,79 ^{def} (5,43)	35,07 ^{fg} (5,24)
<i>Chondrilla juncea</i>	1,76 ^a (1,58)	15,22 ^{de} (3,75)	16,51 ^{cd} (4,96)
<i>Cichorium intybus</i>	4,78 ^{ab} (2,82)	15,04 ^{de} (3,89)	19,80 ^{cde} (2,26)
<i>Sonchus oleraceus</i>	2,80 ^{ab} (1,24)	10,00 ^{cd} (1,64)	11,92 ^{bc} (1,81)
<i>Taraxacum obovatum</i>	1,99 ^{ab} (0,84)	14,48 ^{de} (4,82)	16,72 ^{cd} (5,40)
<i>Scolymus hispanicus</i>	1,11 ^a (0,18)	2,73 ^{ab} (0,51)	3,30 ^a (1,12)
<i>Silybum marianum</i>	0,36 ^a (0,00)	2,39 ^a (0,59)	2,74 ^a (0,58)
<i>Apium nodiflorum</i>	9,11 ^{bc} (4,14)	14,99 ^{cde} (3,36)	20,27 ^{cde} (9,99)
<i>Foeniculum vulgare</i>	11,16 ^{cd} (5,82)	25,07 ^{rfg} (8,78)	36,28 ^{fg} (13,35)
<i>Montia fontana</i>	27,64 ^g (14,08)	7,72 ^{cd} (3,84)	33,07 ^{fg} (12,73)
<i>Silene vulgaris</i>	17,41 ^{ef} (8,08)	6,95 ^c (3,79)	23,34 ^{cde} (8,03)
<i>Asparagus acutifolius</i>	24,14 ^f (9,88)	14,41 ^{ef} (4,83)	37,76 ^g (12,27)
<i>Bryonia dioica</i>	14,37 ^{de} (6,45)	9,46 ^{cde} (5,47)	24,04 ^{ef} (4,00)
<i>Humulus lupulus</i>	23,26 ^f (11,65)	23,80 ^{ef} (10,43)	42,20 ^{hg} (13,61)
<i>Tamus communis</i>	44,37 ^h (11,89)	13,51 ^{cde} (10,81)	59,33 ^h (15,99)
<i>Allium ampeloprasum</i>	4,30 ^{ab} (2,64)	2,14 ^{ab} (1,61)	6,69 ^{ab} (3,98)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1). n=15. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Duncan test.

AA (ácido ascórbico), ADHA (ácido dehidroascórbico).

Los resultados obtenidos sugieren que la síntesis y acumulación de vitamina C está asociada a los tejidos de rápido crecimiento, tejidos fotosintéticos ricos en cloroplastos, como son los brotes tiernos y el mesófilo de los tejidos foliares, en los cuales la actividad fotosintética se ve aumentada. En ellos, la síntesis del ácido ascórbico está asociada al crecimiento de la pared celular. Asimismo, el AA está estrechamente relacionados con la síntesis de otros ácidos orgánicos, empleados como reservorio de CO₂, como es el ácido oxálico, obtenido por degradación no enzimática del AA en ácido oxálico y ácido L-Treonico (Loewus, 1999).

El contenido de vitamina C total en 100g de estas especies está en el rango de las diarias recomendadas (IDR) para adultos (75 mg/día para mujeres y 90 mg/día para los hombres) según Food and Nutrition Board (2000). Destacan las especies silvestres de brotes y tallos tiernos con hojas (figura 9.1) como son *Tamus communis*, *Humulus lupulus*, *Rumex pulcher* o *Foeniculum vulgare*, donde el consumo de 100 g de su parte comestible aportaría entre el 48 y el 78 % de la IDR para adultos, al igual que algunas hojas basales como las de *Papaver rhoeas* y *Asparagus acutifolius*, las cuales cubren casi el 50% de las IDR (41,4 and 48,6%, respectivamente), por lo que estas especies pueden ser consideradas como una muy buena fuente de vitamina C en la dieta.

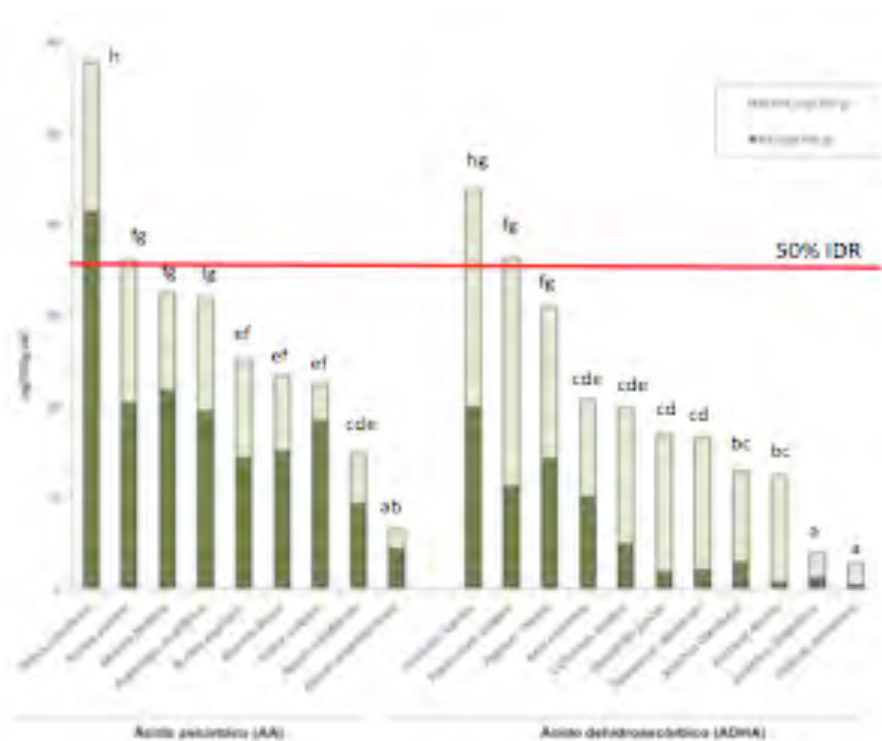


Figura 9.1.- Contenido de vitamina C total (AA + ADHA) en las verduras silvestres analizadas en el presente estudio. Las agrupaciones de las plantas silvestres se han realizado en función de la isoforma mayoritaria. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Duncan test. IDR (Ingestas diarias recomendadas).

Del resto de **ácidos de orgánicos** evaluados en el presente estudio, destacó el ácido oxálico como ácido mayoritario en gran parte de las especies (figura 9.2 y 9.3). Los valores más elevados ($p < 0,05$) se encontraron en especies como son *Silybum marianum*, *Beta marítima*, *Scolymus hispanicus*, *Sonchus oleraceus*, *Apium nodiflorum* y *Montia fontana* (especies pertenecientes a familias que incluyen a plantas de tipo C4), donde ciertos ácidos pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (como isocítrico, oxalacético y glicólico) pueden intervenir en la síntesis de este ácido orgánico (Loewus, 1999).

Tal y como se ha comentado en anteriores capítulos, en general, las especies que contienen hojas poseen mayores niveles de ácido oxálico, predominando dicho ácido en los tejidos encargados de realizar la fotosíntesis (tejidos foliares).

En efecto, en el caso concreto de las especies analizadas en el presente estudio, se puede diferenciar un grupo de especies con bajos niveles en ácido oxálico, constituido por los brotes tiernos con/sin hojas de espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*), espárrago de zarza (*Humulus lupulus*) e hinojo (*Foeniculum vulgare*), el bulbo y las hojas de diente de león (*Taraxacum obovatum*), la ajonjera (*Chondrilla juncea*) o la achicoria (*Cichorium intybus*), con valores medios de ácido oxálico inferiores a 110 mg/100g. En un segundo grupo estarían los brotes tiernos con hojas de *Brionia dioica*, los tallos tiernos de *Foeniculum vulgare* y de *Silene vulgaris*, y las hojas de *Anchusa azurea*, *Rumex pulcher* y *Rumex papillaris* con valores de entre 200 y 400 mg/100g. El conjunto formado por los tallos tiernos con hojas de *Apium nodiflorum* y *Montia fontana*, así como las hojas de *Scolymus hispanicus*, *Sonchus oleraceus*, *Beta vulgaris* y *Papaver rhoeas* mostraron valores alrededor de 500 mg/100g; mientras que las hojas peladas de *Silybum marianum* presentaron los niveles más altos (más de 1000 mg/100g).

De este modo, a efectos de recomendaciones dietéticas, las personas con problemas de calculos renales (que deben de ingerir alimentos con bajo aporte de oxalatos), podrían escoger entre las plantas silvestres aquellas cuya parte comestibles es diferente de las hojas, para minimizar la ingesta de ácido oxálico, destacando de entre las especies estudiadas, *Humulus lupulus* y *Foeniculum vulgare* porque además de presentar un bajo contenido de ácido oxálico, también presentan un alto contenido medio de vitamina C.

Tabla 9.3.- Contenido de ácidos orgánicos (g/100g) de las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

ID		Ácidos orgánicos (g/100 g)					
		Ácido oxálico	Ácido glutámico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido fumárico	Ácido succínico
1	<i>Anchusa azurea</i>	0,38 ^{cd} ef (0,26)	0,20 ^c (0,03)	0,04 ^a (0,01)	tr.	0,07 ^b (0,04)	nd
2	<i>Beta maritima</i>	0,58 ^f (0,42)	nd	0,05 ^a (0,07)	0,13 ^c (0,01)	0,01 ^a (0,00)	nd
3	<i>Papaver rhoeas</i>	0,45 ^{def} (0,31)	0,09 ^{ab} (0,02)	0,15 ^{ab} (0,09)	0,15 ^c (0,10)	tr.	nd
4	<i>Rumex papillaris</i>	0,25 ^{abcd} (0,20)	0,25 ^e (0,07)	0,12 ^a (0,02)	0,03 ^a (0,01)	nd	nd
5	<i>Rumex pulcher</i>	0,33 ^{bcdef} (0,25)	nd	0,03 ^a (0,00)	0,08 ^{ab} (0,04)	nd	nd
6	<i>Chondrilla juncea</i>	0,09 ^{ab} (0,11)	nd	0,09 ^a (0,08)	0,05 ^{ab} (0,05)	tr.	nd
7	<i>Cichorium intybus</i>	0,04 ^{ab} (0,03)	0,05 ^b (0,02)	0,09 ^a (0,05)	0,03 ^a (0,02)	tr.	nd
8	<i>Sonchus oleraceus</i>	0,54 ^{ef} (0,35)	0,04 ^b (0,02)	0,32 ^b (0,07)	0,01 ^a (0,01)	tr.	nd
9	<i>Taraxacum obovatum</i>	0,02 ^a (0,01)	0,06 ^{ab} (0,04)	0,11 ^a (0,05)	0,03 ^a (0,01)	tr.	nd
10	<i>Scolymus hispanicus</i>	0,49 ^{ef} (0,47)	nd	0,08 ^a (0,01)	0,06 ^{bc} (0,00)	tr.	nd
11	<i>Silybum marianum</i>	1,03 ^g (0,85)	nd	tr.	tr.	0,12 ^c (0,09)	nd
12	<i>Apium nodiflorum</i>	0,57 ^{ef} (0,32)	nd	0,08 ^a (0,05)	0,03 ^{ab} (0,02)	tr.	nd
13	<i>Foeniculum vulgare</i>	0,19 ^{abcd} (0,15)	nd	0,04 ^a (0,01)	0,05 ^{ab} (0,03)	tr.	nd
14	<i>Montia fontana</i>	0,54 ^{ef} (0,41)	nd	0,05 ^a (0,00)	0,04 ^{ab} (0,00)	tr.	tr.
15	<i>Silene vulgaris</i>	0,34 ^{bcdef} (0,28)	nd	0,04 ^a (0,03)	0,05 ^{ab} (0,00)	tr.	nd
16	<i>Asparagus acutifolius</i>	0,11 ^{ab} (0,04)	0,06 ^{ab} (0,03)	0,11 ^a (0,09)	0,14 ^c (0,01)	tr.	tr.
17	<i>Bryonia dioica</i>	0,29 ^{bcde} (0,22)	0,09 ^c (0,02)	0,98 ^d (0,01)	0,04 ^{ab} (0,02)	tr.	nd
18	<i>Humulus lupulus</i>	0,09 ^{ab} (0,07)	nd	0,56 ^c (0,03)	0,05 ^{ab} (0,06)	tr.	nd
19	<i>Tamus communis</i>	0,06 ^{ab} (0,02)	nd	0,01 ^a (0,01)	0,41 ^d (0,17)	tr.	nd
20	<i>Allium ampeloprasum</i>	0,08 ^{ab} (0,09)	0,07 ^{ab} (0,06)	0,12 ^a (0,02)	0,04 ^{ab} (0,01)	tr.	nd

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1). n=15; En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Duncan test.

nd (no detectado), tr (trazas: < 5 mg/100g).

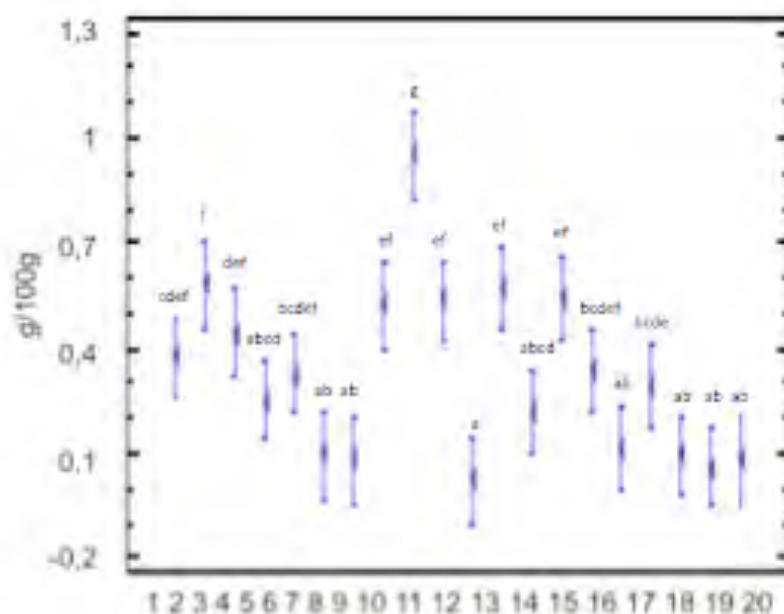


Figura 9.2.- Test de Duncan ($p < 0,05$) para ácido oxálico (g/100g) de las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

Leyenda: *Anchusa azurea* (1), *Beta maritima* (2), *Papaver rhoeas* (3), *Rumex papillaris* (4), *Rumex pulcher* (5), *Chondrilla juncea* (6), *Cichorium intybus* (7), *Scolymus hispanicus* (8), *Silybum marianum* (9), *Sonchus oleraceus*(10) y *Taraxacum obovatum* (11), *Apium nodiflorum* (12), *Foeniculum vulgare* (13), *Montia fontana* (14), *Silene vulgares* (15), *Asparagus acutifolius* (16), *Bryonia dioica* (17), *Humulus lupulus* (18), *Tamus communis* (19), *Allium ampeloprasum* (20).

En el caso de *Cichorium intybus*, *Taraxacum obovatum*, *Bryonia dioica*, *Humulus lupulus* y *Allium ampeloprasum*, el **ácido málico** fue el ácido orgánico mayoritario (figura 9.4), destacando el espárrago de nuez (*Bryonia dioica*) por ser la especie que mostró valores significativamente superiores ($p < 0,05$) de dicho compuesto (0,98 g/100g). Por otro lado, el **ácido cítrico** fue el ácido orgánico mayoritario de *Tamus communis* y *Asparagus acutifolius*, con valores de 0,41 y 0,14 g/100g, respectivamente, siendo el cardo (*Silybum marianum*) y la lenguaza (*Anchusa azurea*) las especies que menor contenido de ácido cítrico presentaron ($p < 0,05$).

El **ácido fumárico y succínico** fueron los ácidos orgánicos minoritarios caracterizados en las especies evaluadas. En el caso del ácido fumárico, los mayores niveles ($p < 0,05$) se observaron en el cardo (*Silybum marianum*), mientras que no se detectó en las especies del género *Rumex*. Y el ácido succínico fue únicamente caracterizado en *Montia fontana* y *Asparagus acutifolius*.

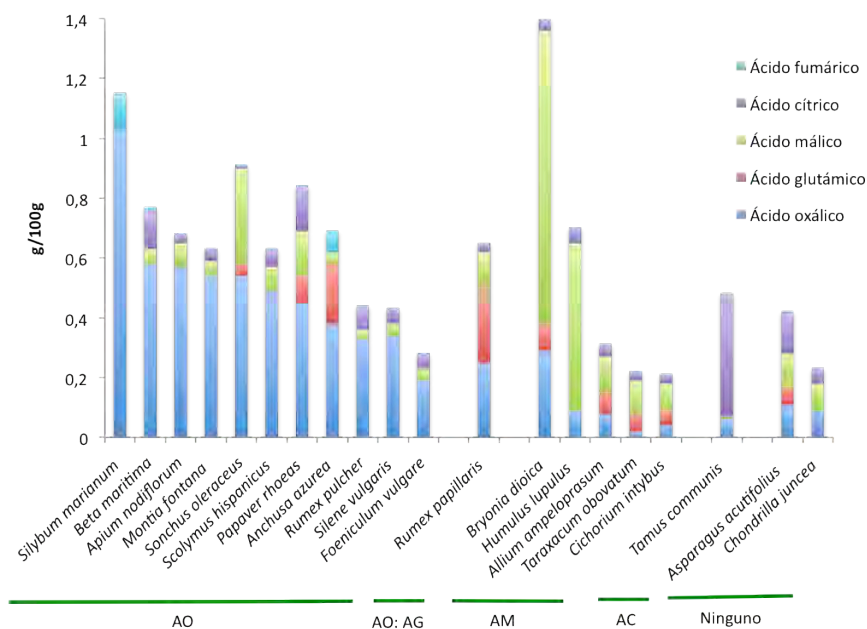


Figura 9.3.- Contenido de ácidos orgánicos en las verduras silvestres estudiadas. Las agrupaciones se han realizado en función del ácido orgánico mayoritario (AO: ácido oxálico, AG: ácido glutámico, AM: ácido málico, AC: ácido cítrico, ninguno: no destaca ningún compuesto mayoritario).

Respecto al contenido de **folatos totales (vitamina B₉)**, la coruja (*Montia fontana*), el lupio (*Tamus communis*) y el cardo (*Silybum marianum*), fueron las especies que mostraron valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) de dicha vitamina, en torno a 0,06 mg/100g. Por el contrario, destacan dos especies silvestres de hoja, como son *Anchusa azurea* y *Rumex pulcher*, así como los tallos tiernos con hojas de *Silene vulgaris*, por ser las especies que mayor contenido de folatos presentaron (0,92, 0,74 y 0,85 mg/100g, respectivamente).

Tabla 9.4.- Contenido de ácido fólico y folatos (mg 5-MTHF/100g) de las verduras silvestres analizadas en el presente estudio.

ID	Especie	Folatos totales
1	<i>Anchusa azurea</i>	0,917 ^f (0,053)
2	<i>Beta maritima</i>	0,525 ^d (0,065)
3	<i>Papaver rhoeas</i>	0,254 ^{bc} (0,002)
4	<i>Rumex papillaris</i>	0,313 ^c (0,003)
5	<i>Rumex pulcher</i>	0,744 ^e (0,150)
6	<i>Chondrilla juncea</i>	0,118 ^{ab} (0,052)
7	<i>Cichorium intybus</i>	0,440 ^{cd} (0,010)
8	<i>Sonchus oleraceus</i>	0,281 ^{bc} (0,037)
9	<i>Taraxacum obovatum</i>	0,556 ^d (0,084)
10	<i>Scolymus hispanicus</i>	0,313 ^c (0,008)
11	<i>Silybum marianum</i>	0,068 ^a (0,002)
12	<i>Apium nodiflorum</i>	0,185 ^{ab} (0,002)
13	<i>Foeniculum vulgare</i>	0,470 ^{cd} (0,019)
14	<i>Montia fontana</i>	0,060 ^a (0,000)
15	<i>Silene vulgaris</i>	0,848 ^e (0,107)
16	<i>Asparagus acutifolius</i>	0,481 ^{cd} (0,197)
17	<i>Bryonia dioica</i>	0,072 ^a (0,005)
18	<i>Humulus lupulus</i>	0,248 ^{bc} (0,044)
19	<i>Tamus communis</i>	0,065 ^a (0,000)
20	<i>Allium ampeloprasum</i>	0,246 ^{bc} (0,052)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Duncan test.

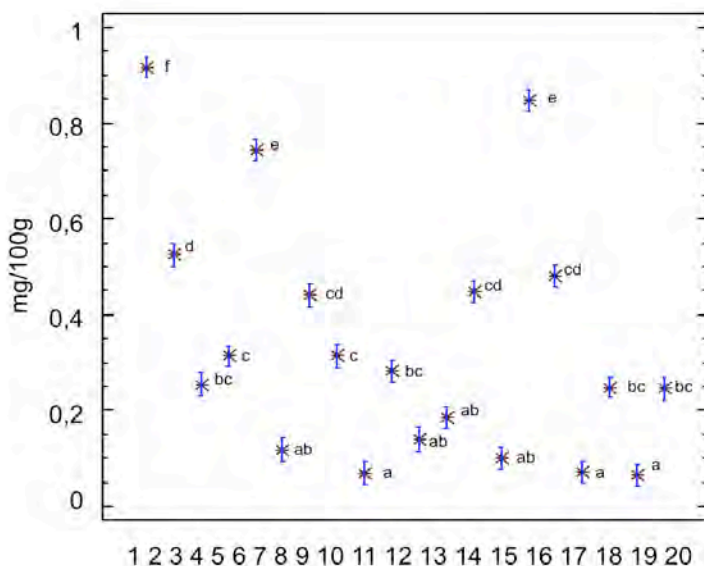


Figura 9.4.- Test de Duncan ($p < 0,05$) para el ácido fólico y folatos (mg/100g) de las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

Leyenda: *Anchusa azurea* (1), *Beta maritima* (2), *Papaver rhoeas* (3), *Rumex papillaris* (4), *Rumex pulcher* (5), *Chondrilla juncea* (6), *Cichorium intybus* (7), *Scolymus hispanicus* (8), *Silybum marianum* (9), *Sonchus oleraceus*(10) y *Taraxacum obovatum* (11), *Apium nodiflorum* (12), *Foeniculum vulgare* (13), *Montia fontana* (14), *Silene vulgares* (15), *Asparagus acutifolius* (16), *Bryonia dioica* (17), *Humulus lupulus* (18), *Tamus communis* (19), *Allium ampeloprasum* (20).

No podemos afirmar que el contenido de folatos esté condicionado al tipo de tejido y/o localización en la planta, dado que además de en las hojas basales, donde cabría esperar que hubiera elevados niveles de dicha vitamina, también se observan altas concentraciones en otros órganos de la planta analizados en el presente estudio. Sin embargo, podemos asegurar que los vegetales silvestres estudiados en el presente trabajo son una muy buena fuente de ácido fólico en la dieta, dado que las ingestas diarias recomendadas (IDR) son de 400 μg (Trumbo, 2002). Tal y como se observa en las figuras 9.4 y 9.5, en el caso de 8 de las verduras silvestres estudiadas, una ración de 100 g superaría dichas recomendaciones, llegando hasta a duplicarlas en el caso de *Anchusa*

azurea y *Silene vulgaris*; asimismo una ración de 100 g de 7 de las especies estudiadas cubren más de la mitad de dichas recomendaciones.

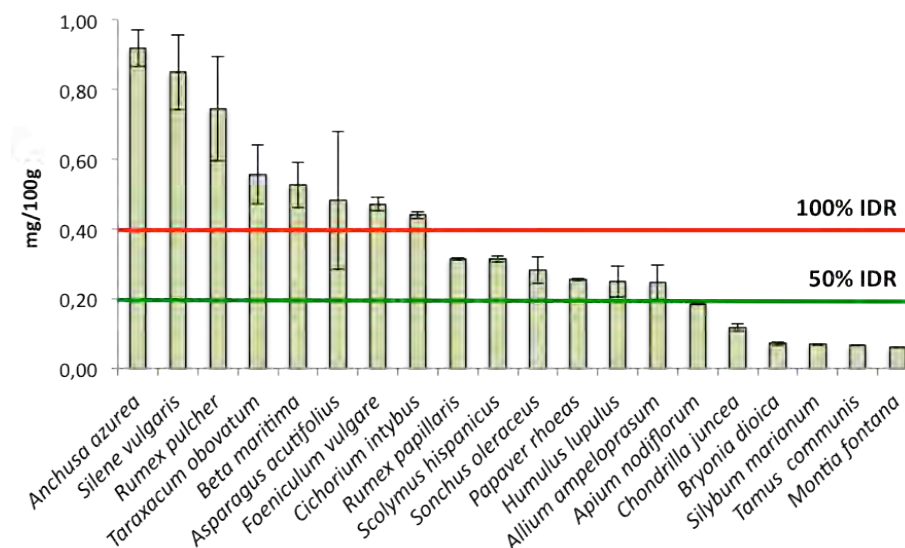


Figura 9.5.- Contenido de folatos totales en las verduras silvestres estudiadas. IDR (ingestas diarias recomendadas)

Comparando los resultados obtenidos en el presente trabajo con los datos bibliográficos relativos al contenido de ácido fólico en verduras, podemos afirmar que las verduras silvestres estudiadas, son en su mayoría una muy buena fuente de dicha vitamina, dado que casi todas superan con creces el contenido que presentan otros vegetales conocidos por ser muy ricos en estos compuestos como son las espinacas y el perejil (145 y 149 $\mu\text{g}/100\text{g}$), y en muchos casos también superan los 330 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de las endibias o los 214 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de los berros (Cámara et al., 2003); así mismo, tal y como se ha mencionado anteriormente (figura 9.5) prácticamente todas cubren las IDR para dicha vitamina.

Compuestos bioactivos de naturaleza lipófila (ácidos grasos y tocoferoles).

En el extracto etéreo de las plantas estudiadas se cuantificaron treinta ácidos grasos diferentes, destacando el ácido α -linolénico (ALA, C18:3n3), linoleico (AL, C18:2n6) y

palmítico (AP, C16:0) como los ácidos grasos principales en todas ellas, a excepción de *Sonchus oleraceus* cuyo ácido graso mayoritario fue el ácido γ -linolénico (AGL, C18 : 3n6).

Si se establecen los grupos de ácidos grasos (AGS, AGMI y AGPI) para cada especie (Tabla 9.5 y Figura 9.6), puede apreciarse que *Rumex pulcher* presentó los menores valores de SFA (14,77%), mientras que *Silybum marianum* destacó por presentar los porcentajes más elevados para dicho grupo de ácidos grasos (43,53%). Se puede observar en la figura 9.9, que las especies silvestres cuya parte comestible son los tallos tiernos con hojas (*Apium nodiflorum*, *Foeniculum vulgare*, *Montia fontana* y *Silene vulgaris*), los brotes jóvenes (*Asparagus acutifolius*, *Humulus lupulus*, *Tamus communis* y *Bryonia dioica*), así como las especies de hoja que se pelan (*Scolymus hispanicus* y *Silybum marianum*) son las que contienen un mayor porcentaje de AGS que aquellas especies cuya parte comestible son las hojas basales sin pelar ($p < 0,05$). Dentro del grupo de los ácidos grasos saturados, el más abundante de las especies silvestres estudiadas fue el ácido palmítico (AP), destacando *Silybum marianum* por presentar valores significativamente superiores ($p < 0,05$) del mismo (28,69%).

En cuanto al total de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), *Sonchus oleraceus* y *Tamus communis* presentaron los menores porcentajes (0,92%), mientras que *Rumex papillaris* destacó por presentar niveles significativamente ($p < 0,05$) superiores (9,03%). Por otro lado, respecto a los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), destacó el ácido oleico (C18: 1), encontrado en todas las muestras en un rango de 0,92 a 7,39% (en *Sonchus oleraceus* y *Allium ampelorasum*, respectivamente).

El grupo de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) fue el más representativo, con porcentajes elevados, en todas las especies silvestres estudiadas, de entre 52,61 - 82,09%, en *Silybum marianum* y *Cichorium intybus*, respectivamente. Entre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), los predominantes fueron el AL y ALA. Este último destacó en las hojas basales y tallos tiernos con hojas y los brotes tiernos de *Humulus lupulus* y

Bryonia dioica; mientras que en el caso de los brotes jóvenes de *Asparagus acutifolius* y *Tamus communis*, el AGPI mayoritario fue el AL. *Allium ampelorasum* también presentó valores significativamente superiores ($p < 0,05$) de AL (53,45%).

Tabla 9.5.- Contribución de cada tipo de ácidos grasos en las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

	Total AGS (%)	Total AGMI (%)	Total AGPI (%)	AGPI/AGS (%)	ω -6/ ω -3 (%)
<i>Anchusa azurea</i>	16,59 ^{ab} (0,82)	3,15 ^{def} (0,02)	80,26 ^k (0,85)	4,85 ⁱ (0,29)	0,24 ^a (0,02)
<i>Beta maritima</i>	16,68 ^{ab} (0,02)	4,00 ^g (0,03)	79,33 ^{ij} (0,01)	4,76 ⁱ (0,00)	0,37 ^a (0,00)
<i>Papaver rhoeas</i>	21,41 ^{de} (0,02)	2,06 ^{bc} (0,01)	76,53 ^j (0,02)	3,57 ^{fg} (0,00)	0,35 ^a (0,00)
<i>Rumex papillaris</i>	15,96 ^a (0,52)	1,95 ^{bc} (0,00)	82,09 ^{hi} (0,10)	5,14 ^{ij} (0,05)	0,35 ^a (0,00)
<i>Rumex pulcher</i>	16,37 ^a (0,22)	1,78 ^b (0,01)	81,85 ^j (0,23)	5,00 ^{ij} (0,08)	0,25 ^a (0,00)
<i>Chondrilla juncea</i>	15,91 ^a (0,11)	9,03 ^k (0,30)	75,05 ^{gh} (0,27)	4,72 ⁱ (0,04)	0,44 ^a (0,00)
<i>Cichorium intybus</i>	14,77 ^a (0,09)	4,83 ^{hi} (0,15)	80,39 ^j (0,06)	5,44 ^j (0,03)	0,27 ^a (0,00)
<i>Sonchus oleraceus</i>	18,85 ^{bc} (0,73)	0,92 ^a (0,10)	80,23 ^j (0,68)	4,26 ^h (0,20)	511,5 ^c (20,86)
<i>Taraxacum obovatum</i>	19,58 ^{cd} (0,28)	3,67 ^{efg} (0,04)	76,55 ^{hi} (0,32)	3,91 ^g (0,07)	0,30 ^a (0,00)
<i>Scolymus hispanicus</i>	34,16 ^h (0,53)	8,19 ^j (0,03)	57,66 ^c (0,56)	1,69 ^b (0,04)	0,85 ^a (0,00)
<i>Silybum marianum</i>	43,53 ^j (0,98)	3,86 ^{ig} (0,10)	52,61 ^a (0,87)	1,21 ^a (0,05)	1,44 ^a (0,01)
<i>Apium nodiflorum</i>	23,94 ^{ef} (1,56)	5,36 ⁱ (0,44)	70,70 ^{ef} (2,00)	2,96 ^{de} (0,28)	0,63 ^a (0,05)
<i>Foeniculum vulgare</i>	23,97 ^f (0,26)	3,08 ^{de} (0,08)	72,95 ^{fg} (0,32)	3,04 ^{de} (0,05)	1,03 ^a (0,02)
<i>Montia fontana</i>	25,42 ^f (0,87)	7,46 ^j (0,30)	67,12 ^d (1,17)	2,64 ^{cd} (0,14)	0,40 ^a (0,02)
<i>Silene vulgaris</i>	28,17 ^g (0,83)	4,35 ^{gh} (0,14)	67,48 ^d (0,97)	2,40 ^c (0,10)	0,50 ^a (0,00)
<i>Asparagus acutifolius</i>	38,83 ⁱ (0,49)	4,87 ^{hi} (0,07)	56,30 ^{bc} (0,56)	1,45 ^{ab} (0,03)	3,02 ^a (0,11)
<i>Bryonia dioica</i>	28,43 ^g (0,76)	2,55 ^{cd} (0,10)	69,02 ^{de} (0,85)	2,43 ^c (0,10)	0,78 ^a (0,02)
<i>Humulus lupulus</i>	18,85 ^{cd} (0,73)	0,92 ^a (0,10)	80,23 ^{gh} (0,68)	4,26 ^{fg} (0,20)	0,21 ^a (0,01)
<i>Tamus communis</i>	23,95 ^{ef} (1,20)	1,63 ^b (0,02)	74,42 ^{gh} (1,21)	3,11 ^{ef} (0,21)	0,10 ^a (0,00)
<i>Allium ampeloprasum</i>	38,23 ⁱ (0,63)	7,61 ^j (0,44)	54,16 ^{ab} (0,29)	1,42 ^{ab} (0,03)	99,59 ^b (5,80)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1). En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Duncan test.

AGS (ácidos grasos saturados), AGMI (ácidos grasos monoinsaturados), AGPI (ácidos grasos poliinsaturados).

Todas las verduras mostraron un buen ratio de AGPI/AGS, dado el elevado porcentaje de AGPI observado en las mismas (Tabla 9.5 y figura 9.6). Destaca *Cichorium intybus* con un ratio de 5,44, seguido por las especies del género *Rumex*. Asimismo, comparando la calidad nutricional de los ácidos grasos poliinsaturados, se observó que todas las verduras silvestres presentaron niveles bajos de la relación ω -6/ ω -3, excepto *Allium ampeloprasum* y *Sonchus oleraceus*, con valores significativamente superiores (99,59 y 511,5, respectivamente), debido a su elevada concentración de ácidos grasos ω 6, tales como el AL (53%) o AGL (66%), respectivamente. Para el resto de las verduras silvestres estudiadas, la relación ω -6/ ω -3 fue óptima desde el punto de vista nutricional, con valores inferiores a 3 para la mayoría de las muestras, pudiendo contribuir su consumo a mejorar la calidad nutricional de la dieta (Simolopoulos, 2002).

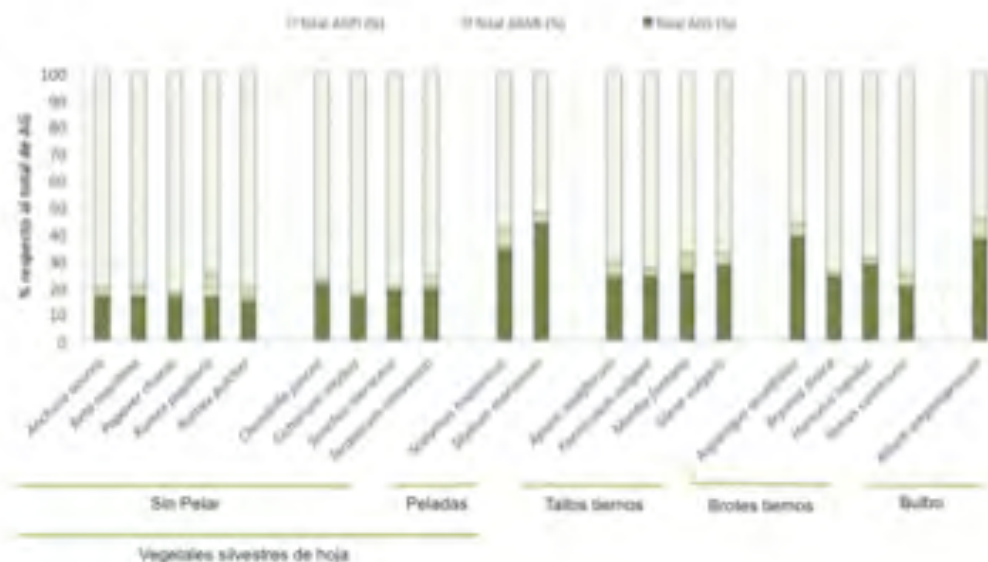


Figura 9.6.- Contribuciones AGS, AGMI y AGPI al contenido total de ácidos grasos presentes en las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

AGS (ácidos grasos saturados), AGMI (ácidos grasos monoinsaturados), AGPI (ácidos grasos poliinsaturados).

Respecto al contenido de **tocoferoles totales** (tabla 9.6 y figura 9.7) en las verduras silvestres estudiadas, destacaron las especies del género *Rumex* por presentar el mayor contenido, con valores de 2,98 y 1,87 mg/100g, junto a otras especies como *Chondrilla juncea*, *Silene vulgaris* y *Humulus lupulus* (1,67, 1,70 y 1,83 mg/100g, respectivamente).

Tal y como se puede observar en la tabla 9.6, las cuatro isoformas fueron cuantificadas en casi todas las especies, a excepción de *Allium ampeloprasum*, en la cual únicamente se cuantificó α y δ -tocoferol. El δ -tocoferol no fue cuantificado en *Chondrilla juncea*, *Cichorium intybus*, *Apium nodiflorum* y *Foeniculum vulgare*. En general la isoforma mayoritaria en las especies silvestres estudiadas fue el α -tocoferol (que presentó los contenidos más elevados en *Sonchus oleraceus*), a excepción de especies como *Rumex papillaris*, *Humulus lupulus* y *Tamus communis*, cuya isoforma mayoritaria fue el γ -tocoferol (destacando la primera por su elevado contenido). En el caso de *Silybum marianum*, la isoforma mayoritaria de fue el δ -tocoferol, mientras que *Rumex pulcher* presentó elevados contenidos de β -tocoferol.

Tabla 9.6.- Contenido de tocoferoles (mg/100g) de las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

	α -Tocoferol	β -Tocoferol	γ -Tocoferol	δ -Tocoferol	Totales
<i>Anchusa azurea</i>	0,36 ^b (0,08)	0,05 ^a (0,00)	0,11 ^a (0,02)	0,01 ^a (0,00)	0,48 ^{bc} (0,09)
<i>Beta maritima</i>	0,51 ^c (0,02)	0,01 ^a (0,00)	0,14 ^a (0,00)	tr.	0,63 ^{bcd} (0,15)
<i>Papaver rhoeas</i>	0,57 ^c (0,18)	0,01 ^a (0,01)	0,12 ^a (0,01)	0,05 ^{ab} (0,01)	0,74 ^d (0,21)
<i>Rumex papillaris</i>	0,99 ^d (0,11)	0,04 ^a (0,01)	1,88 ^e (0,09)	0,08 ^b (0,00)	2,98 ^{ef} (0,19)
<i>Rumex pulcher</i>	1,13 ^d (0,06)	0,66 ^b (0,13)	0,05 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,01)	1,87 ^{de} (0,19)
<i>Chondrilla juncea</i>	1,29 ^d (0,44)	0,05 ^a (0,02)	0,34 ^b (0,13)	nd	1,67 ^c (0,58)
<i>Cichorium intybus</i>	0,44 ^{bc} (0,02)	0,03 ^a (0,01)	0,07 ^a (0,00)	nd	0,54 ^{de} (0,02)
<i>Sonchus oleraceus</i>	1,70 ^e (0,05)	0,04 ^a (0,01)	0,47 ^c (0,03)	0,01 ^a (0,00)	2,22 ^e (0,06)
<i>Taraxacum obovatum</i>	0,51 ^c (0,02)	0,01 ^a (0,00)	0,05 ^a (0,00)	0,03 ^{ab} (0,01)	0,60 ^{abcd} (0,01)
<i>Scolymus hispanicus</i>	0,02 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,00)	0,01 ^a (0,00)	tr.	0,05 ^{ab} (0,00)
<i>Silybum marianum</i>	0,04 ^a (0,00)	tr.	0,01 ^a (0,00)	0,10 ^c (0,00)	0,15 ^{abcd} (0,00)
<i>Apium nodiflorum</i>	0,23 ^{ab} (0,00)	0,02 ^a (0,00)	0,02 ^a (0,00)	nd	0,27 ^{ab} (0,00)
<i>Foeniculum vulgare</i>	0,43 ^{bc} (0,13)	0,08 ^a (0,04)	0,07 ^{ab} (0,06)	nd	0,57 ^{ab} (0,13)
<i>Montia fontana</i>	0,73 ^{cd} (0,01)	0,03 ^a (0,00)	0,17 ^{ab} (0,00)	0,04 ^{ab} (0,00)	0,98 ^{bc} (0,01)
<i>Silene vulgaris</i>	1,48 ^d (0,17)	0,04 ^a (0,01)	0,10 ^a (0,01)	0,07 ^b (0,00)	1,70 ^{bcd} (0,19)
<i>Asparagus acutifolius</i>	0,28 ^{ab} (0,00)	0,01 ^a (0,00)	0,12 ^{ab} (0,01)	tr.	0,41 ^{ab} (0,01)
<i>Bryonia dioica</i>	0,11 ^{ab} (0,01)	0,02 ^a (0,00)	0,09 ^a (0,01)	0,01 ^a (0,00)	0,23 ^{ab} (0,02)
<i>Humulus lupulus</i>	0,58 ^{bc} (0,06)	0,03 ^a (0,00)	1,15 ^d (0,00)	0,09 ^c (0,00)	1,83 ^{cd} (0,07)
<i>Tamus communis</i>	0,17 ^{ab} (0,01)	0,01 ^a (0,00)	0,23 ^{ab} (0,02)	0,03 ^a (0,00)	0,46 ^{ab} (0,01)
<i>Allium nodiflorum</i>	0,03 (0,01) ^a	nd	nd	0,02 ^a (0,00)	0,05 ^a (0,01)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Duncan test.
nd (no detectado), tr. (trazas: $< 5 \mu\text{g}/100 \text{g}$).

hojas se consumen peladas conjuntamente con el ajoporro (*Allium ampeloprasum*), las que presentaron el menor contenido total ($p < 0,05$) de compuestos fenólicos.

Asimismo, destacó la achicoria (*Cichorium intybus*) y la lenguaza (*Anchusa azurea*) por presentar las mayores concentraciones de **flavonoides** (183 y 139 meq de catequina/100 g de muestra, respectivamente).

Tabla 9.7.- Contenido de compuestos fenólicos y flavonoides de las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

<i>Especie</i>	Compuestos fenólicos (meq AG/100 g)	Flavonoides totales (meq C/100 g)
<i>Anchusa azurea</i>	245,145 ^k (3,299)	139,892 ^g (6,647)
<i>Beta maritima</i>	358,085 ^m (43,438)	124,644 ^{fg} (5,032)
<i>Papaver rhoeas</i>	130,172 ^g (17,719)	60,405 ^{cde} (2,316)
<i>Rumex papillaris</i>	275,714 ^l (11,036)	104,511 ^f (8,628)
<i>Rumex pulcher</i>	207,936 ^j (15,063)	74,012 ^{cde} (2,463)
<i>Chondrilla juncea</i>	107,301 ^e (6,838)	21,170 ^{ab} (0,798)
<i>Cichorium intybus</i>	430,199 ⁿ (3,854)	183,045 ^h (5,839)
<i>Sonchus oleraceus</i>	164,104 ⁱ (5,595)	47,412 ^{abc} (3,133)
<i>Taraxacum obovatum</i>	245,905 ^k (3,799)	126,751 ^{fg} (2,786)
<i>Scolymus hispanicus</i>	73,948 ^d (5,191)	28,844 ^{ab} (3,850)
<i>Silybum marianum</i>	11,552 ^a (0,838)	3,509 ^a (1,118)
<i>Apium nodiflorum</i>	143,295 ^h (7,853)	80,988 ^e (2,867)
<i>Foeniculum vulgare</i>	163,991 ⁱ (3,812)	37,808 ^b (2,723)
<i>Montia fontana</i>	237,020 ^k (22,124)	52,312 ^c (1,946)
<i>Silene vulgaris</i>	62,383 ^c (3,806)	54,631 ^c (2,638)
<i>Asparagus acutifolius</i>	119,942 ^{ef} (1,976)	41,503 ^{abc} (1,840)
<i>Bryonia dioica</i>	111,943 ^{ef} (7,750)	52,017 ^c (2,232)
<i>Humulus lupulus</i>	162,725 ⁱ (3,906)	27,864 ^{ab} (1,895)
<i>Tamus communis</i>	141,746 ^h (11,652)	26,712 ^{ab} (4,123)
<i>Allium ampeloprasum</i>	42,244 ^b (4,612)	6,296 ^a (0,366)

Valores expresados como media (desviación estándar, n-1) n=3. En cada columna, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Duncan test. AG (ácido gálico); C (catequina).

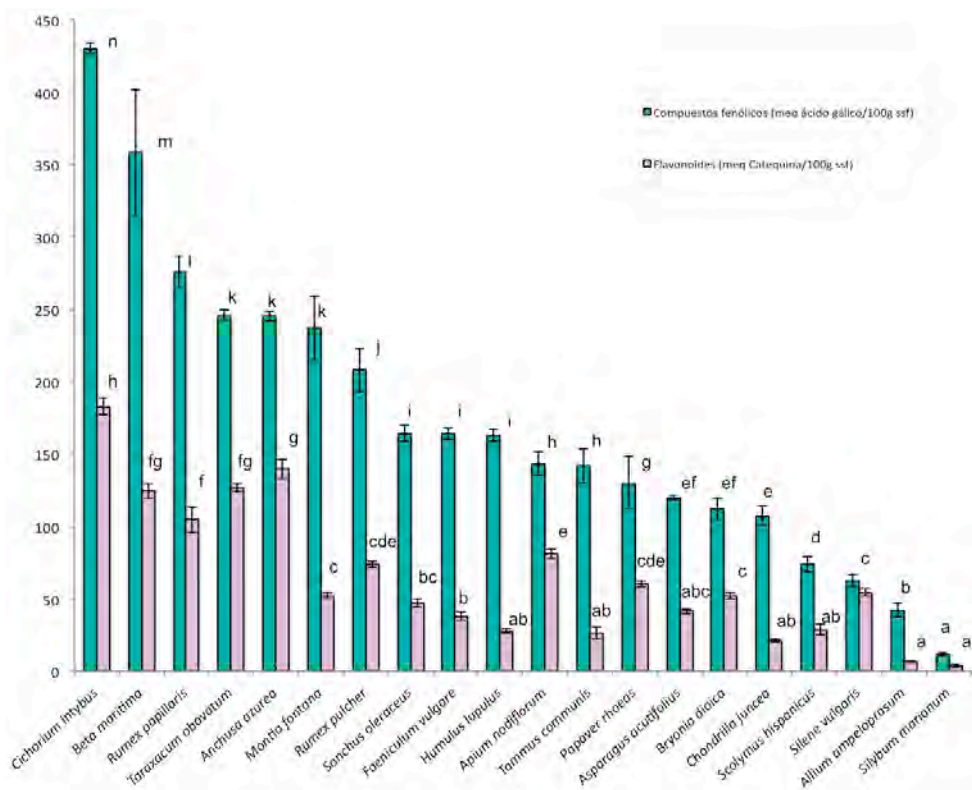


Figura 9.8.- Contenido de fenoles totales y flavonoides en las especies silvestres estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Duncan test.

Capacidad antioxidante

Respecto a los resultados de los ensayos de actividad antioxidante *in vitro*, tal y como se muestra en la figura 9.9, las especies que menores concentraciones inhibitorias al 50% (EC_{50}) presentaron (y por tanto, mayor actividad antioxidante) para los ensayos de evaluación de la actividad antioxidante total (DPPH y poder reductor) fueron la lenguaza (*Anchusa azurea*), la berraza (*Apium nodiflorum*) y el diente de león (*Taraxacum obovatum*) para el DPPH, con valores de EC_{50} de 0,02, 0,07 y 0,79 mg/ml de extracto, respectivamente, mientras que *Allium ampeloprasum* y *Silybum marianum* fueron las especies que menor actividad antioxidante presentaron para este método.

En el caso de la evaluación del poder reductor, nuevamente la lenguaza y la berraza, así como la ajonjera (*Chondrilla juncea*) y la coruja (*Montia fontana*), fueron las especies que menor EC_{50} ($p < 0,05$), con valores de EC_{50} .

En el caso de los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica, destacaron especies como la lenguaza y la berraza (*Apium nodiflorum*) por presentar los menores EC_{50} , para el ensayo de inhibición de la decoloración del β -caroteno. Por el contrario, para el TBARS, las especies que mostraron valores más bajos de EC_{50} , fueron la cerraja (*Sonchus oleraceus*), la coruja, la colleja (*Silene vulgaris*), la lenguaza, la ajonjera, la amapola (*Papaver rhoeas*), el hinojo (*Foeniculum vulgare*), el cardo (*Silybum marianum*) y la romaza (*Rumex pulcher*).

De estos resultados se obtiene que, en conjunto, la lenguaza (que además contiene un elevado contenido de compuestos fenólicos y folatos), la cerraja y la berraza, destacaron por ser las especies que mostraron la mayor capacidad antioxidante frente a los métodos estudiados.

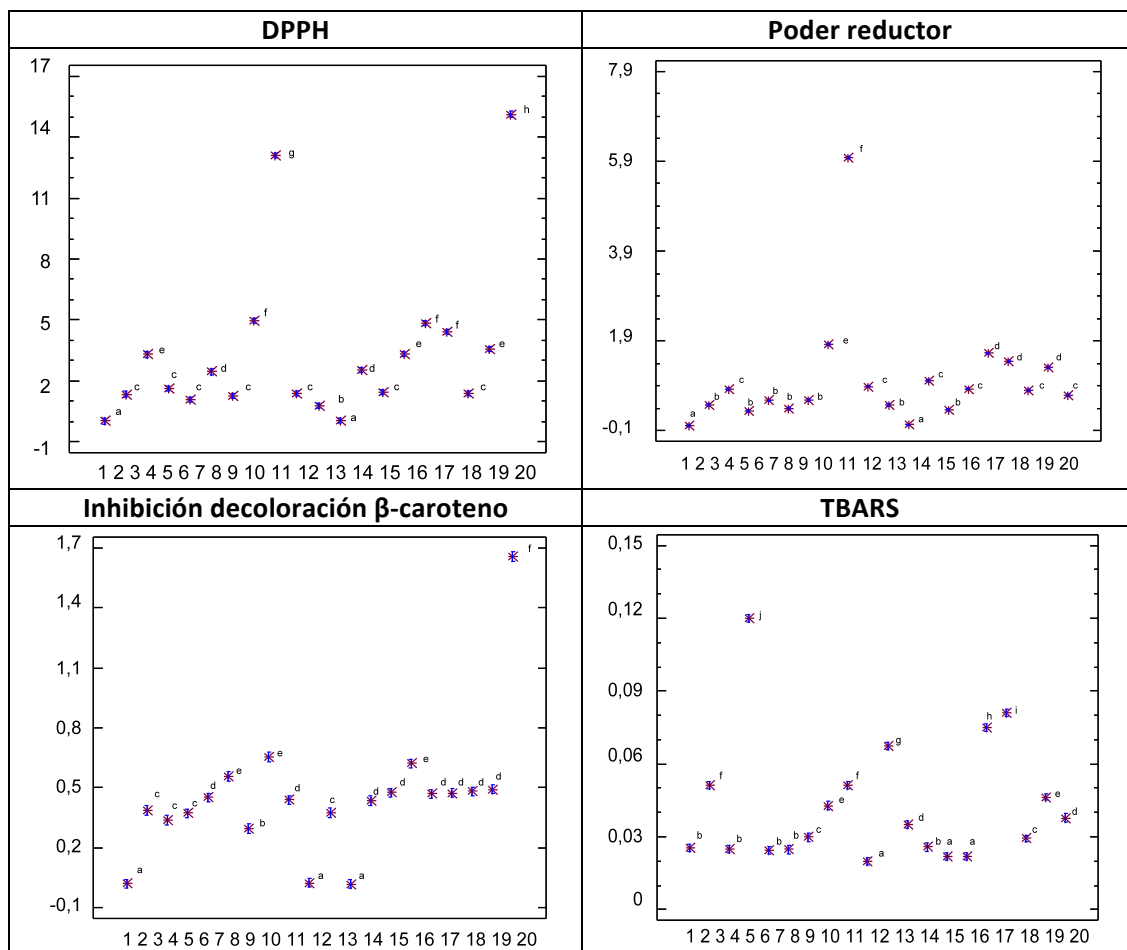


Figura 9.9.- Test de Duncan ($p < 0,05$) para EC_{50} (mg/ml extracto metanólico) de las verduras silvestres analizadas en el presente estudio

Leyenda: *Anchusa azurea* (1), *Beta maritima* (2), *Papaver rhoeas* (3), *Rumex papillaris* (4), *Rumex pulcher* (5), *Chondrilla juncea* (6), *Cichorium intybus* (7), *Scolymus hispanicus* (8), *Silybum marianum* (9), *Sonchus oleraceus*(10) y *Taraxacum obovatum* (11), *Apium nodiflorum* (12), *Foeniculum vulgare* (13), *Montia fontana* (14), *Silene vulgares* (15), *Asparagus acutifolius* (16), *Bryonia dioica* (17), *Humulus lupulus* (18), *Tamus communis* (19), *Allium ampeloprasum* (20).

9.1.- ESTUDIO DE CORRELACIONES CANÓNICAS

El análisis de correlaciones permite establecer similitudes de comportamiento de las variables consideradas en las muestras analizadas, y constituye la base del análisis multivariable de datos (estudio de los componentes principales) que pretende encontrar combinaciones de variables fuertemente relacionadas entre si.

En el presente estudio se han considerado como variables todos los parámetros analíticos evaluados. Las matrices de correlaciones obtenida (tabla 9.1.1 y 9.1.2), muestra el coeficiente de correlación obtenido entre cada par de variables (el rango de estos coeficientes (-1 a +1) miden la fuerza de relación lineal entre las variables) y el P-valor que permite valorar la significación de la correlaciones estimadas, de modo que P-valores por debajo de 0,05 indican importancia estadística de correlaciones no-cero para un nivel de confianza del 95%.

Considerando el ácido oxálico, podemos decir que existe una correlación significativa y positiva entre éste y el ácido fumárico, y negativa con el AA y con la vitamina C total. Esto se explica por el hecho de que el AA y otros ácidos orgánicos pueden ser fuentes de ácido oxálico, formando parte de las rutas biosintéticas del mismo (López-Bucio et al., 2000). Además, el ácido ascórbico (AA) se degrada de manera no enzimática en ácido oxálico y ácido L-treónico (Loewus, 1999). Tanto el ácido ascórbico, como el contenido total de vitamina C, están correlacionados de forma negativa con el ácido fumárico y glutámico, y positivamente con el ácido cítrico.

Como era de esperar, el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico, están correlacionados de forma positiva con el contenido total de vitamina C, siendo el AA la isoforma más fuertemente correlacionada ($r=0,830$; $p=0,000$) por ser la que mayoritariamente contribuye al contenido de vitamina C total.

Tanto el ácido ascórbico, como el contenido de vitamina C total están correlacionados de forma negativa con el contenido de tocoferoles totales (y todas sus isoformas excepto el β -tocoferol). Esto puede ser indicativo del efecto que ejerce la vitamina C sobre los tocoferoles a modo de protección frente a oxidación por radicales libres (Bendich, 1986; Nagaoka, 2007). Así, podemos decir que en presencia de vitamina C se ve favorecida la "regeneración" de la vitamina E, ya que el AA es capaz de reducir el radical α -tocoferoxilo que se produce cuando la vitamina E "secuestra" un radical peroxilo.

Respecto a las diferentes isoformas de los tocoferoles, éstas están fuertemente correlacionadas entre sí, siendo el α , β - y γ -tocoferol las isoformas que mayoritaria y significativamente contribuyen al contenido de tocoferoles totales con correlaciones de $r=0,9540$, $r=0,358$ y $r= 7647$, respectivamente. El contenido de tocoferoles totales está correlacionado de forma negativa con el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) e insaturados, principalmente monoinsaturados (AGMI), y especialmente el contenido de δ y γ -tocoferol con el de ácidos grasos poliinsaturados. Esto puede ser debido a la función que ejercen los tocoferoles evitando la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), de modo que el contenido de tocoferoles disminuye por oxidación, preservando de este modo el contenido de ácidos grasos, especialmente AGPI (Nagaoka, 2007).

En cuanto a otros compuestos con capacidad antioxidante, como son los compuestos fenólicos, se muestra la esperada correlación positiva de los fenoles totales con los flavonoides totales.

Además, el contenido de fenoles totales se correlaciona significativa y positivamente con el contenido de ADHA, ácido glutámico, tocoferoles totales (α , δ y γ -tocoferol), AGPI y con los folatos, estando únicamente correlacionado de forma negativa con los AGS y ácido cítrico. En el caso de los flavonoides, éstos están correlacionados positivamente con otros antioxidantes como son el γ -tocoferol, tocoferoles totales, ADHA, así como con otros

compuestos bioactivos como son los folatos, AGPI, ácido fúmarico y glutámico. Estando negativamente correlacionado con el ácido cítrico, málico, vitamina C total y AGS.

En relación a los ensayos de actividad antioxidante realizados, tal y como se muestra en la segunda matriz de correlaciones (tabla 9.1.2), en el caso de los que evalúan la actividad antioxidante total, se observaron correlaciones negativas entre el EC_{50} obtenido por el método del DPPH con los contenidos de fenoles, flavonoides, AA y α , δ y γ -tocoferol, destacando los fenoles y flavonoides por ser los compuestos con correlaciones más fuertes para este método ($r=-0,6824$ y $-0,5275$, respectivamente). Así, puede decirse que estos compuestos probablemente son los responsables de la capacidad antioxidante de las plantas que mide el método del DPPH.

Sin embargo, en el caso del ensayo del poder reductor, el valor de EC_{50} está igualmente correlacionado negativamente con los fenoles, flavonoides, α , δ y γ -tocoferol, y especialmente con los compuestos fenólicos y flavonoides ($r=-0,513$ y $-0,388$, respectivamente) pero no con el AA.

En cuanto a los métodos de valoración de la inhibición de la peroxidación lipídica, el ensayo de inhibición de la decoloración del β -caroteno fue el método que más correlaciones presentó con los compuestos bioactivos estudiados, existiendo correlaciones negativas entre el valor de EC_{50} con compuestos de carácter lipófilo (α y γ -tocoferol), así como con compuestos con conocido carácter antioxidante como fenoles y flavonoides, lo que nos indica que dichos compuestos serían también activos frente a la peroxidación lipídica.

En el caso del ensayo de TBARS únicamente el α -tocoferol está correlacionados positivamente con el mismo, lo que nos hace indicar que los compuestos antioxidantes presentes en este tipo de muestras no contribuyen significativamente a la actividad antioxidante medida por este método, y sí a la medida por los otros métodos estudiados. Respecto a la posible correlación de los distintos métodos de actividad antioxidante

ensayados entre sí, tal y como se observa en la matriz de correlaciones (tabla 9.8), el ensayo del DPPH está fuertemente y positivamente correlacionado con el ensayo del poder reductor y con el ensayo de la inhibición de la decoloración del β -caroteno ($r=0,658$ y $0,727$, respectivamente). Y dado que los resultados del ensayo del TBARS, están única y débilmente correlacionados con los correspondientes a la evaluación del poder reductor podemos indicar que este método no parece aportar información relevante en este tipo de muestras.

Según los resultados obtenidos podemos afirmar que para valorar la capacidad antioxidante total de muestras de matriz similar a las analizadas en el presente trabajo se puede optar tanto por el ensayo del DPPH como por el ensayo del poder reductor, siendo preferible el primero por establecer un mayor número de correlaciones negativas con los compuestos bioactivos con conocida actividad antioxidante, así como el ensayo de la inhibición de la decoloración del β -caroteno que sería el ensayo de elección para la determinación de la peroxidación lipídica.

	H ₂ O	acidez	pH	AA	ADHA	Vit C	AO	AG	AM	AC	AF	Folato	AGS	ASMI	AGPI	α-toc	β-toc	γ-toc	δ-toc	Toc.tot	fenoles	flav	
H ₂ O	0,000																						
acidez	0,000																						
pH	0,376																						
AA	-0,060	-0,716																					
ADHA	0,322	0,000																					
Vit C	0,122	0,109	-0,072																				
AO	0,044	0,071	0,234																				
AG	-0,179	0,006	0,007	0,115																			
AM	0,044	0,924	0,909	0,056																			
AC	0,086	-0,020	0,095	0,830	0,350																		
AF	0,158	0,745	0,116	0,000	0,000																		
Folato	0,193	-0,126	0,110	-0,183	0,053	-0,260																	
AGS	0,001	0,037	0,070	0,002	0,384	0,000																	
ASMI	-0,006	0,552	-0,268	-0,251	0,080	-0,208	-0,094																
AGPI	0,919	0,000	0,000	0,000	0,187	0,001	0,119																
α-toc	-0,084	0,032	0,191	0,040	0,073	0,087	0,082	0,163															
β-toc	0,165	0,595	0,002	0,506	0,232	0,152	0,175	0,007															
γ-toc	0,015	-0,044	0,100	0,543	0,176	0,574	-0,115	-0,202	-0,030														
δ-toc	0,808	0,465	0,100	0,000	0,004	0,000	0,059	0,000	0,618														
Toc.tot	0,239	-0,148	0,073	-0,265	-0,122	-0,246	0,299	0,043	-0,122	-0,171													
fenoles	0,000	0,014	0,227	0,000	0,045	0,000	0,478	0,044	0,004														
flav	-0,018	0,003	0,057	-0,082	0,207	-0,063	-0,010	0,038	-0,226	-0,154	0,070												
	0,765	0,957	0,346	0,175	0,001	0,297	0,875	0,534	0,000	0,010	0,251												
	-0,021	-0,206	0,100	-0,068	-0,413	-0,106	0,108	-0,312	0,017	-0,110	0,252	-0,206											
	0,729	0,000	0,098	0,260	0,000	0,080	0,075	0,000	0,785	0,068	0,000	0,000											
	0,016	0,447	-0,449	-0,075	-0,239	-0,266	0,102	0,120	-0,238	-0,244	-0,075	0,065	0,299										
	0,798	0,000	0,000	0,219	0,001	0,000	0,093	0,047	0,000	0,216	0,283	0,000											
	0,020	0,107	0,028	0,187	0,203	0,174	0,041	0,057	0,075	0,193	-0,091	0,045	-0,465	-0,183									
	0,742	0,078	0,647	0,001	0,000	0,004	0,498	0,349	0,215	0,001	0,133	0,462	0,000	0,003									
	0,020	0,468	-0,378	-0,276	0,168	-0,263	0,061	0,568	-0,010	-0,164	-0,079	0,067	-0,517	-0,082	0,245								
	0,743	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,313	0,000	0,867	0,006	0,191	0,269	0,000	0,176	0,000								
	-0,147	0,065	-0,031	-0,020	0,217	-0,032	0,075	0,176	-0,019	0,104	-0,058	-0,048	-0,274	-0,176	0,222	0,314							
	0,015	0,284	0,616	0,743	0,000	0,604	0,215	0,003	0,751	0,086	0,342	0,4309	0,000	0,003	0,000	0,000							
	0,045	0,204	-0,177	-0,232	0,136	-0,157	-0,092	0,369	0,006	-0,151	-0,074	0,086	-0,396	-0,198	-0,495	0,572	0,000						
	0,457	0,000	0,003	0,000	0,025	0,009	0,129	0,000	0,922	0,012	0,222	0,1565	0,000	0,001	0,000	0,000	0,989						
	0,175	-0,165	-0,068	-0,310	-0,190	-0,320	0,284	-0,121	-0,119	-0,183	0,643	-0,246	0,393	-0,166	-0,353	-0,033	-0,018	0,097					
	0,004	0,006	0,260	0,000	0,0016	0,000	0,000	0,046	0,050	0,002	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000	0,586	0,7577	0,109					
	0,020	0,405	-0,340	-0,297	0,186	-0,264	0,037	0,552	-0,014	-0,165	-0,056	0,058	-0,523	-0,161	0,011	0,954	0,358	0,764	0,061				
	0,746	0,000	0,000	0,000	0,00	0,000	0,548	0,000	0,814	0,006	0,356	0,336	0,000	0,007	0,857	0,000	0,000	0,000	0,313				
	0,292	0,246	-0,022	-0,032	0,207	0,006	-0,017	0,390	-0,099	-0,127	0,059	0,365	-0,673	0,086	0,281	0,315	-0,11	0,302	-0,303	0,300			
	0,000	0,000	0,723	0,596	0,0006	0,924	0,785	0,000	0,103	0,035	0,332	0,000	0,000	0,332	0,000	0,065	0,000	0,000	0,000	0,000			
	0,254	0,101	0,099	-0,237	0,124	-0,174	0,054	0,422	-0,119	-0,251	0,219	0,511	-0,508	0,071	0,195	0,209	-0,067	0,200	-0,185	0,200	0,883	0,000	0,000
	0,000	0,095	0,104	0,000	0,041	0,004	0,378	0,000	0,049	0,000	0,000	0,000	0,000	0,241	0,001	0,001	0,265	0,001	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000

Tabla 9.1.1.- Matriz de correlaciones canónica entre parámetros fisicoquímicos y compuestos bioactivos (n=273). Para cada par de variables el coeficiente de correlación está indicado en negro y el P-valor en gris, las correlaciones con p < 0,05 están resaltadas en negro. Leyenda: H₂O (humedad); AA (ácido ascórbico); ADHA (ácido dehidroascórbico);AO (ácido oxálico); AG (ácido glutámico); AM (ácido málico); AC (ácido cítrico); AF (ácido fumárico); AGS (ácidos grasos saturados); AGMI (ácidos grasos monoinsaturados); AGPI (ácidos grasos poliinsaturados); α-toc (α-tocoferol); β-toc (β-tocoferol); γ-toc (γ-tocoferol); δ-toc (δ-tocoferol); Toc.tot (tocoferoles totales); fenoles (compuestos fenólicos); flav (flavonoides).

Resultados y discusión

	AA	fenoles	flav	α -toc	β -toc	γ -toc	δ -toc	DPPH	PR	I.D. β -	TBARS
AA	0,000										
	0,000										
fenole	-0,032										
	0,958								n=273		
flav	0,135	0,621							<i>p</i> < 0,05		
	0,024	0,000									
α -toc	-0,275	0,346	-0,0667								
	0,000	0,000	0,2718								
β -toc	-0,019	-0,026	-0,115	0,314							
	0,743	0,668	0,057	0,000							
γ -toc	-0,232	0,635	0,256	0,572	0,001						
	0,001	0,000	0,000	0,000	0,989						
δ -toc	-0,3097	-0,2472	-0,2717	-0,033	-0,019	0,097					
	0,000	0,000	0,000	0,586	0,757	0,109					
DPPH	-0,134	-0,625	-0,471	-0,308	-0,046	-0,261	0,475				
	0,025	0,000	0,000	0,000	0,458	0,000	0,000				
PR	-0,089	-0,513	-0,388	-0,225	-0,060	-0,170	0,827	0,658			
	0,138	0,000	0,000	0,000	0,321	0,005	0,000	0,000			
I.D. β -	0,075	-0,407	-0,3072	-0,387	-0,116	-0,283	-0,054	0,727	0,116		
	0,214	0,000	0,000	0,000	0,054	0,000	0,374	0,000	0,055		
TBARS	0,041	0,094	0,016	0,144	-0,106	-0,000	-0,032	0,111	0,136	0,041	0,000
	0,497	0,118	0,759	0,019	0,078	0,988	0,595	0,065	0,023	0,509	0,000

Tabla 9.1.2.- Matriz de correlaciones canónica entre compuestos antioxidantes y ensayos de actividad antioxidante *in vitro*. (n=273). Para cada par de variables el coeficiente de correlación está indicado en negro y el P-valor en gris, las correlaciones con *p* < 0,05 están resaltadas en negro. Leyenda: AA (ácido ascórbico); α -toc (α -tocoferol); β -toc (β -tocoferol); γ -toc (γ -tocoferol); δ -toc (δ -tocoferol); fenoles (compuestos fenólicos); flav (flavonoides); PR (poder reductor); I.D. β -car (inhibición de la decoloración del β -caroteno).

9.2.- ESTUDIO DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales estudia la correlación entre todos los resultados obtenidos referentes a los contenidos de compuestos bioactivos en las muestras analizadas, considerando como variables a los distintos parámetros evaluados y como “componentes” a unas nuevas variables independientes entre sí, de manera que unas pocas variables (componentes principales) permitirán caracterizar las muestras objeto de este estudio (especies silvestres), ya que cada componente está formado por una combinación de variables correlacionadas entre si.

Se ha realizado el estudio de componentes principales de todas las especies silvestres teniendo en cuenta los compuestos bioactivos caracterizados en las mismas (vitaminas y ácidos grasos) y los ácidos orgánicos mayoritarios.

La aplicación de un análisis de Componentes principales clásico, permitió reducir la estructura multidimensional de los datos a un mapa tridimensional que explicaba el 54,79 % del total de la varianza (22,01 % del primer componente, 18,63 % del segundo componente y 5,75 % del tercero). De forma que para una correcta interpretación de la variabilidad de los datos se requiere la consideración de los tres primeros componentes principales como se muestra en la tabla 9.2.1.

Tabla 9.2.1.- Porcentaje de la variación total explicada por cada “componente principal”

- Análisis global

Número	Autovalor	Varianza	Porcentaje Acumulado
1	3,3015	22,010	22,010
2	2,7947	18,631	40,641
3	2,1233	14,156	54,791
4	1,6138	10,759	65,556
5	1,5124	10,083	75,638
6	1,0712	7,142	82,780

En la tabla 9.2.2 se recoge la participación de cada variable analizada en los tres componentes principales seleccionados, indicándose en negrita aquellos valores más significativos. Por su parte en la tabla 9.2.3 se indica la participación de cada componente principal en las distintas especies de verduras estudiadas.

Tabla 9.2.2.- Participación de cada parámetro estudiado en los componentes principales

Parámetros	Componentes		
	1	2	3
AA	0,16910	-0,35445	-0,35018
ADHA	0,48484	0,03625	-0,00880
Folatos	0,20865	0,19469	-0,01608
AO	-0,14081	0,33531	-0,24952
AM	-0,02476	-0,21870	0,21227
AC	0,20651	-0,32935	-0,31693
AGS	-0,48130	-0,03266	-0,15455
AGMI	-0,25171	0,04533	-0,09023
AGPI	0,26051	-0,19446	-0,16103
α -tocoferol	0,23302	0,13050	0,43325
β -tocoferol	0,22863	0,02058	0,02135
γ -tocoferol	0,14435	0,22550	0,45182
δ -tocoferol	-0,23251	0,33008	-0,05127
Compuestos fenólicos	0,23282	0,36656	-0,35486
Flavonoides	0,17654	0,46245	-0,30077

Leyenda: AA (ácido ascórbico); ADHA (ácido dehidroascórbico); AGS (ácidos grasos saturados); AGMI (ácidos grasos monoinsaturados); AGPI (ácidos grasos poliinsaturados).

Tabla 9.2.3.- Participación de los componentes principales por cada especie estudiada

Etiqueta	Componentes		
	1	2	3
<i>Anchusa azurea</i>	1,4100	2,0260	-0,1637
<i>Beta maritima</i>	1,6932	1,3252	-1,5916
<i>Chondrilla juncea</i>	-0,2501	-0,1130	0,8854
<i>Cichorium intybus</i>	1,0065	2,6332	2,5883
<i>Papaver rhoeas</i>	2,8152	-0,0455	-0,2331
<i>Rumex papillaris</i>	0,4860	-0,2097	1,9576
<i>Rumex pulcher</i>	3,2096	1,9077	-2,1604
<i>Scolymus hispanicus</i>	-2,5991	0,3330	-0,4130
<i>Silybum marianum</i>	-3,8092	3,4938	-1,5929
<i>Sonchus oleraceus</i>	1,0399	0,3508	2,9370
<i>Taraxacum obovatum</i>	-0,0203	-0,9976	1,5010
<i>Apium nodiflorum</i>	-0,9480	0,2270	-0,6184
<i>Foeniculum vulgare</i>	0,7689	-0,5298	-0,2277
<i>Montia fontana</i>	-1,1099	-0,3414	-1,4514
<i>Silene vulgaris</i>	-0,7801	-0,3463	-0,2346
<i>Asparagus acutifolius</i>	-0,8562	-1,3168	-0,6964
<i>Bryonia dioica</i>	-0,6286	-1,7783	0,6958
<i>Humulus lupulus</i>	-0,1261	-1,7981	0,1870
<i>Tamus communis</i>	1,6585	-3,6051	-2,0303
<i>Allium ampeloprasum</i>	-2,9603	-1,2152	0,6613

Como se puede observar el primer componente principal está definido (altamente correlacionado) por las variables: ácido dehidroascórbico (ADHA), ácido grasos poliinsaturados (AGPI), así como con los compuesto fenólicos, en correlación positiva, y negativamente con los ácidos grasos saturados y monoinsaturados (AGS y AGMI).

El segundo componente está caracterizado por las variables: compuestos fenólicos, flavonoides y ácido oxálico con correlación positiva; y con las variables ácido ascórbico (AA) y ácido cítrico (AC), con correlación negativa.

Los dos primeros componentes, que son los que más influyen en la variación de las especies, se encuentran representados en la figura 9.2.1. En el diagrama de dispersión se aprecia que la mayoría de las especies se sitúan en la zona central del gráfico, al estar igualmente caracterizados por los componentes 1 y 2; mientras que pueden separarse cuatro grupos de especies caracterizadas positiva o negativamente por alguno de estos componentes.

En un primer grupo (a) se separan *Allium ampeloprasum*, *Scolymus hispanicus* y especialmente *Silybum marianum*, correlacionado negativamente con el componente con el componente 1 y positivamente con el 2, por sus altos niveles de ácido oxálico, AGS y AGMI, y bajos de AA, AC. Otro grupo (b) estaría formado por *Cichorium intybus*, *Papaver rhoeas* y *Sonchus oleraceus*, que se separan por sus contenidos moderadamente altos de AO, compuestos fenólicos y AGPI, y bajos de AA, AC AGMI y AGS. En un tercer grupo (c) se separan *Rumex pulcher* y especialmente *Anchusa azurea* por sus altos niveles de compuestos fenólicos, ADHA y AGPI, y bajos contenidos de AGS. Por último, *Tamus communis* se diferencia en gran medida de las demás especies por sus altos contenidos de las dos isoformas de la vitamina C, AC y AGPI, y bajos niveles de AO, compuestos fenólicos, AGS y AGMI. La superposiciones en el plano de estas agrupaciones, con las variables anteriormente mencionadas, se pueden observar en la figura 9.2.1.

El tercer componente está caracterizado por el α y γ -tocoferol, con correlación positiva, y con el AA, AC, ácido oxálico (AO) y compuestos fenólicos con correlación negativa. Las especies más relacionadas con este tercer componente, son *Cichorium intybus* y *Sonchus oleraceus*, positivamente, y *Rumex pulcher* y *Tamus communis*.

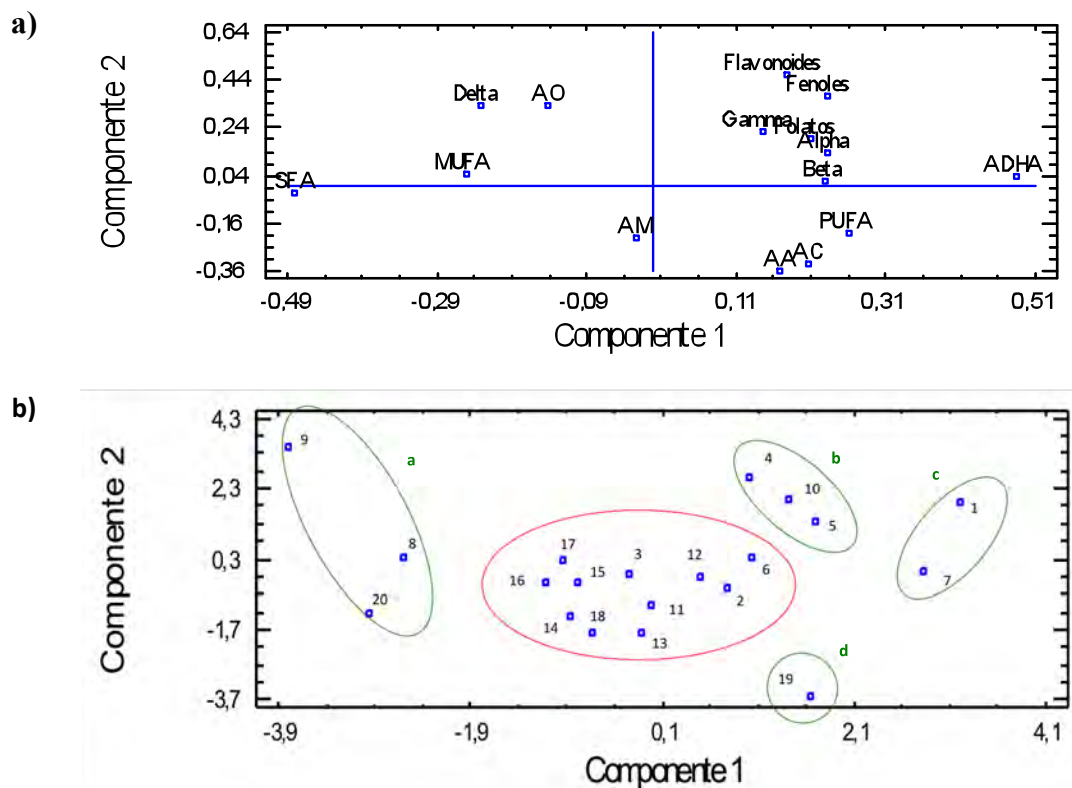


Figura 9.2.1.- Gráficos de pesos de las variables (a) y diagrama de dispersión de las muestras (b). Indicándose en verde aquellas especies correlacionadas significativamente con los componentes principales 1 y/o 2, y en rojo aquellas especies igualmente caracterizados por ambos componentes

Leyenda: AA (ácido ascórbico); ADHA (ácido dehidroascórbico); AO (ácido oxálico); AM (ácido málico); AC (ácido cítrico); SFA (ácidos grasos saturados); MUFA (ácidos grasos monoinsaturados); PUFA (ácidos grasos poliinsaturados); Alfa (α -tocoferol); Beta (β -tocoferol); Delta (δ -tocoferol); Gamma (γ -tocoferol).

(1) *Anchusa azurea*; (2) *Beta maritima*; (3) *Chondrilla juncea*; (4) *Cichorium intybus*; (5) *Papaver rhoeas*; (6) *Rumex papillaris*; (7) *Rumex pulcher*; (8) *Scolymus hispanicus*; (9) *Silybum marianum*; (10) *Sonchus oleraceus*; (11) *Taraxacum obovatum*; (12) *Apium nodiflorum*; (13) *Foeniculum vulgare*; (14) *Montia fontana*; (15) *Silene vulgaris*; (16) *Asparagus acutifolius*; (17) *Bryonia dioica*; (18) *Humulus lupulus*; (19) *Tamus communis* y (20) *Allium ampeloprasum*.

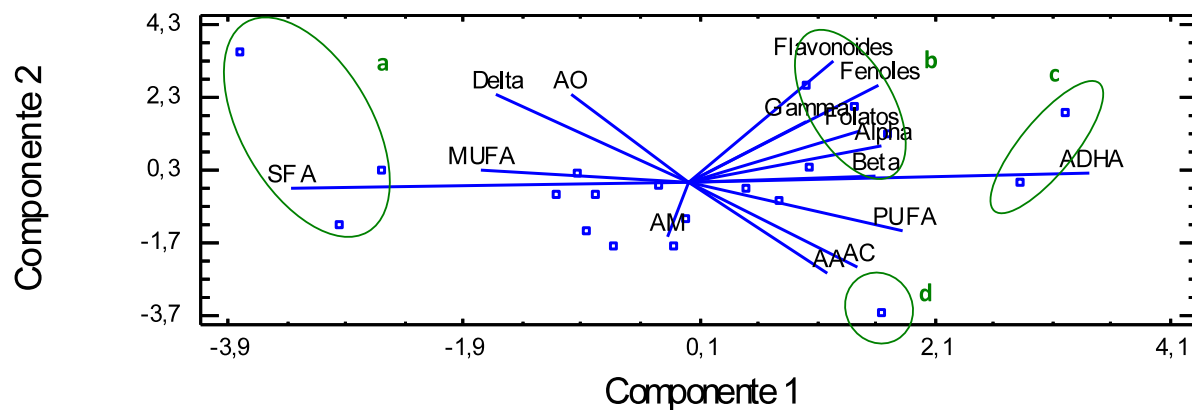


Figura 9.2.2.- Superposición de las distintas variables y muestras en el plano. Análisis global de los compuestos bioactivos

Leyenda: AA (ácido ascórbico); ADHA (ácido dehidroascórbico); AO (ácido oxálico); AM (ácido málico); AC (ácido cítrico); SFA (ácidos grasos saturados); MUFA (ácidos grasos monoinsaturados); PUFA (ácidos grasos poliinsaturados); Alfa (α -tocoferol); Beta (β -tocoferol); Delta (δ -tocoferol); Gamma (γ -tocoferol).

(a) *Allium ampeloprasum*, *Scolymus hispanicus* y *Silybum marianum*, (b) *Cichorium intybus*, *Papaver rhoeas* y *Sonchus oleraceus*, (c) *Rumex pulcher* y *Anchusa azurea*, (d) *Tamus communis*

9.3. ESTUDIO CLUSTER

Por último, para evaluar las posibles relaciones existentes entre las distintas especies silvestres consideradas en el presente estudio se ha realizado el análisis clúster considerando los valores medios obtenidos, para cada parámetro.

Los clusters son grupos de observaciones con características similares. El procedimiento aplicado ha sido una clasificación jerárquica aglomerativa siguiendo el criterio de Ward (Everitt, 1980) que permitió obtener el dendograma reflejado en la figura 9.3.1 Este procedimiento ha creado 1 cluster de las 20 observaciones (especies) proporcionadas mediante el método vecino más cercano (una sola unión).

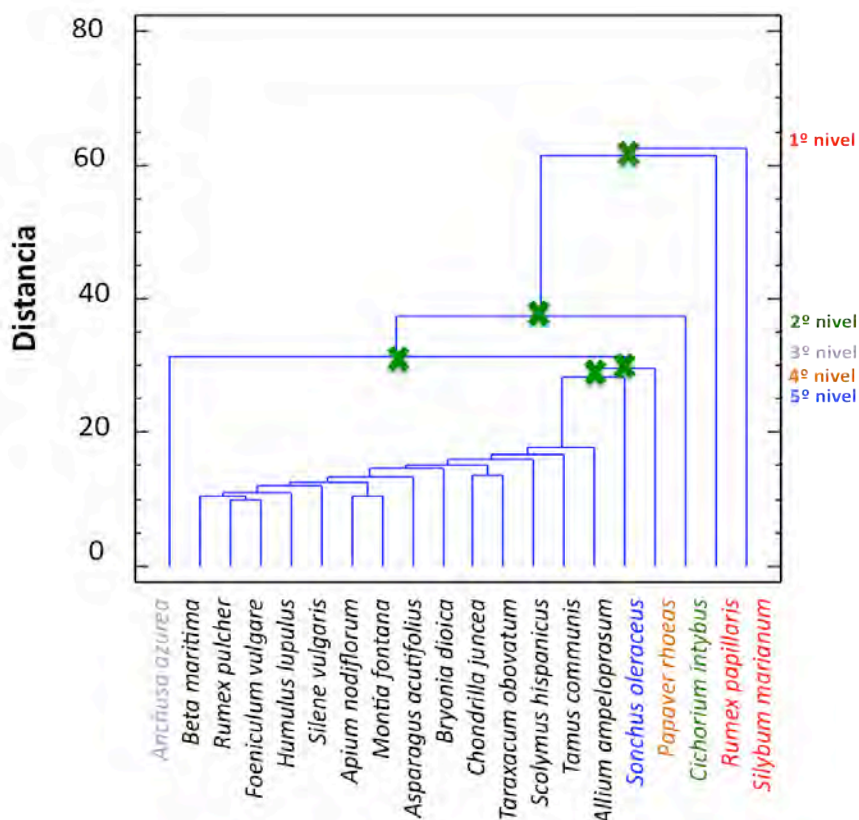


Figura 9.3.1.- Dendrograma de las especies silvestres estudiadas, con respecto a los parámetros analizados

Como se puede observar en el dendrograma (figura 9.3.1), se han establecido 5 niveles diferentes de separación, agrupando las especies que tenían mayor número de características en común. En el primer nivel se diferencia claramente, el cardo (*Silybum marianum*), siendo esta especie la que menos características tiene en común con el resto de especies silvestres estudiadas dada la distancia que la separa del resto. En el diagrama de dispersión, figura 9.2.1 del apartado de componentes principales, dicha especie se situaba en el extremo izquierdo y superior del gráfico, correlacionado positiva y fuertemente con el segundo componente principal. Como puede apreciarse, la mayor parte de estas especies también resultaron diferentes de las demás por su contenido de compuestos bioactivos en el estudio de componentes principales anteriormente comentado.

En un segundo nivel de agrupación, la romaza (*Rumex papillaris*) se separa de las demás por sus atributos (variables pertenecientes al segundo componente). Posteriormente en un tercer nivel, la achicoria (*Cichorium intybus*) se separa claramente del resto de especies, siendo en el cuarto nivel donde se diferencia la lenguaza (*Anchusa azurea*), y en un quinto y sexto nivel la amapola (*Papaver rhoeas*) y la cerraja (*Sonchus oleraceus*), respectivamente, todas ellas especies silvestres de hoja.

El resto de especies presentan un mayor número de características en común, agrupándose en este aspecto todas las especies silvestres de tallos tiernos y brotes tiernos con hojas, a excepción de *Tamus communis*, así como algunas especies de la familia de las compuestas como *Chondrilla juncea*, *Taraxacum obovatum* y *Scolymus hispanicus*. En esta última (el cardillo) cabría esperar mayores similitudes con el cardo, dado que ambas especies se consumen peladas, y además pertenecen a la misma familia (Asteraceae). En efecto, el dendrograma no manifestó una agrupación de las especies con aspectos taxonómicos comunes, como por ejemplo, las 6 especies pertenecientes a esta familia, demostrando así que el hecho de pertenecer a la misma familia o género no va ligado necesariamente a una composición química parecida.

**10. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO
EN EL CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS, VITAMINA C Y
ÁCIDO FÓLICO EN VEGETALES SILVESTRES COMESTIBLES:**

*Rumex pulcher L., Silene vulgaris (Moench) Garcke., Asparagus acutifolius L.,
Bryonia dioica Jacq., Humulus lupulus L. y Tamus communis L.*

El uso gastronómico de las plantas silvestres se ha ido modificando y enriqueciendo con el paso de los años, formando parte de nuestra tradición y cultura gastronómica transmitiéndose de padres a hijos (Cubero et al, 2006). Multitud de compuestos bioactivos son inestables en los alimentos, de modo que tratamientos de procesado, cocinado o simplemente almacenamiento pueden condicionar su estabilidad y concentración en los mismos. La variación en el contenido de dichos compuestos bioactivos tras el cocinado, especialmente en el caso de las vitaminas, dependerá de diversos factores (Cuadro 10.1), como el tipo de proceso culinario empleado, la temperatura máxima alcanzada, tiempo de cocción, pH del medio de cocción, relación superficie/volumen, cantidad de agua empleada, presencia de oxígeno y luz, del tipo de matriz y/o alimento, y de la sensibilidad propia de cada compuesto a cada uno de los factores anteriormente mencionados (Berry Otawa, 1993; Lesková et al., 2006; Ros-Berruero, 2011).

Algunas de las especies silvestres estudiadas en el presente trabajo se consumen tradicionalmente cocinadas en diferentes guisos y platos, realizándose para ello un tratamiento térmico generalmente en medio acuoso, que puede modificar el contenido nutricional y las propiedades funcionales de las mismas. De ahí la importancia de evaluar el contenido de algunos compuestos bioactivos hidrosolubles y/o termolábiles como algunas vitaminas (vitamina C y vitamina B₉) y ácidos orgánicos.

De todas las especies silvestres estudiadas en este trabajo, para la realización de este estudio se seleccionaron 6 especies (recolectadas en el 2009) tradicionalmente consumidas en forma de diferentes guisos como se recoge en el cuadro 10.2, y cuyo contenido de vitamina C destacó de entre el resto de especies silvestres analizadas. En concreto fueron las especies: *Rumex pulcher* L., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke., *Asparagus acutifolius* L., *Bryonia dioica* Jacq., *Humulus lupulus* L. y *Tamus communis* L.

Cuadro 10.1.- Estabilidad de las vitaminas y porcentajes máximos de pérdida según diferentes factores intrínseco y extrínsecos del alimento. Rojo (inestable); Verde (estable). (Adaptado de Ros Berruezo, 2011)

Vitamina	Calor	pH = 7	pH < 7	pH > 7	Oxígeno	Luz	% Máx. de pérdida.
Vitamina B ₁ (Tiamina)	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Verde	80
Vitamina B ₂ (Riboflavina)	Rojo	Verde	Verde	Rojo	Verde	Verde	75
Vitamina B ₃ (Niacina)	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	75
Vitamina B ₅ (Ácido pantoténico)	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Verde	50
Vitamina B ₆ (Piridoxina)	Rojo	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	40
Vitamina B ₉ (Ácido fólico y folatos)	Rojo	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	100
Vitamina B ₁₂ (Cianocobalamina)	Verde	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	10
Vitamina C (AA y ADHA)	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	Rojo	100
Vitamina A (Retinol)	Rojo	Verde	Rojo	Verde	Rojo	Rojo	40
Vitamina D (Ergocalciferol, colecalciferol)	Rojo	Verde	-	Rojo	Rojo	Rojo	40
Vitamina E (Tocoferoles y tocotrienoles)	Rojo	Verde	Verde	Verde	Rojo	Rojo	55
Vitamina K (filoquinonas, menaquinona, menadiona)	Verde	Verde	Rojo	Rojo	Verde	Rojo	5

Cuadro 10.2.- Referencias sobre formas de consumo de vegetales silvestres

Especie	Nombre común	País y Región	Parte comestible	Usos (modo de consumo)	Referencia
<i>Asparagus acutifolius</i>	Espárrago triguero	España: Comunidad de Madrid	Brotes tiernos	Cocinado (guisado); en tortilla o revuelto con huevos; en ensalada como aperitivo	Tardío et al., 2002, 2006, 2010
	Asparraguera silvestre	España: Zamora/ Salamanca	Brotes tiernos	En tortilla	González, 2010
	-	Italia	Parte aérea	Cocido y frito	Pieroni, 2002
<i>Bryonia dioica</i>	Espárrago de nuez	España: Comunidad de Madrid	Brotes tiernos con hojas pequeñas	Cocinado (guisado)	Tardío, 2006, 2010
		España: Sanabria, Caurel, Piloña, Picos de Europa, Campoo; Portugal: Montesinho	Hojas tiernas y tallos	Cocido (guisado)	Pardo de Santayana et al., 2007
	-	Montesinho	Brotes	Cocido (guisado), revuelto con huevos	Carvalho, 2010
<i>Humulus lupulus</i>	Espárrago de zarza; Lúpulo	España: Comunidad de Madrid	Brotes tiernos	Cocinado (guisado)	Tardío et al., 2002, 2006, 2010
		España: Caurel, Piloña, Campoo; Portugal: Montesinho	Inflorescencias femeninas inmaduras	En licores	Pardo de Santayana et al., 2007
<i>Tamus communis</i>	Esparraguilla	España: Comunidad de Madrid	Brotes tiernos con hojas pequeñas	Cocinado (guisado)	Tardío et al., 2002, 2006, 2010
	Espárrago bastardero	España: Zamora/ Salamanca	Brotes tiernos	Guisado, en tortilla o crudo en ensalada	González, 2010
	-	Italia	Brotes	Cocido y frito con huevos	Pieroni, 2002
<i>Rumex pulcher</i>	Romaza	España: Comunidad de Madrid	Hojas basales	Cocinado (guisado) con vegetales, en sopas o como condimento.	Tardío et al., 2002, 2006, 2010
	Adeas de burro	España: Zamora/ Salamanca	Hojas basales	Cocinado (guisado)	González, 2010
<i>Silene vulgaris</i>	Colleja	España: Comunidad de Madrid	Tallos tiernos con hojas	Cocinado (guisado), a veces crudo en ensalada	Tardío et al., 2002, 2006, 2010
	Grisvéli	Italia: Liguria	Hojas	Como ingrediente del "erbete", pastel vegetal.	Cornera, 2009
	Colleja	España: Sanabria, Caurel, Piloña, Picos de Europa, Campoo.	Hojas y tallos jóvenes	Cocido (guisado) en tortilla	Pardo de Santayana et al., 2007
<i>Rumex pulcher</i>	Romaza	España: Comunidad de Madrid	Hojas basales	Cocinado (guisado) con vegetales, en sopas o como condimento.	Tardío et al., 2002, 2006, 2010

Para simular lo máximo posible las condiciones domésticas de cocinado, las plantas troceadas se sometieron a cocción durante 10 minutos a 100 °C en una olla convencional, con una proporción de planta/agua de 0,2 Kg/L.

En ellas se evaluaron las propiedades físico-químicas (humedad, pH y acidez titulable), así como el contenido de vitamina C, ácido fólico y folatos (Vitamina B₉) y ácidos orgánicos tanto en la muestra recién recolectada, como después de un proceso de cocción tradicional, evaluándose el porcentaje de retención de los mismos.

Para la evaluación de la estabilidad de los compuestos estudiados en las plantas seleccionadas, se ha empleado el parámetro “retención aparente”(RA) descrito anteriormente por Murphy et al. (1975) y Bergström (1994):

$$\text{RA (\%)}: (\text{contenido por g alimento cocinado}/\text{contenido por g alimento crudo}) \times 100$$

Actualmente existen muy pocos estudios relativos al tratamiento culinario de los vegetales silvestres. Trichopoulou et al. (2000a) y Vasilopoulou y Trichopoulou (2011) publicaron datos relativos a la composición nutricional y contenido de flavonoides de pasteles típicos de Creta elaborados a partir de una mezcla de vegetales cultivados y silvestres cocinadas con aceite de oliva, para ello emplearon especies cultivadas como la espinaca (*Spinacia oleracea* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), perejil, así como una serie de vegetales silvestres como *Rumex spp.*, *Petromarula pinnata*, *Ranunculus ficaria* L., *Foeniculum vulgare* Mill., entre otros. Si bien, dichos estudios no hacen referencia a la influencia del tratamiento térmico en el contenido de vitaminas, al igual que no existe bibliografía relativa a la composición de vitaminas tras el proceso de cocción (vitamina C ni folatos) de las especies silvestres seleccionadas en el presente estudio.

10.1. Parámetros físico-químicos

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una modificación de los **parámetros físico-químicos** tras el proceso de cocción (tabla 10.1.1), estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre especies, tanto para la humedad como el pH.

Todas las plantas cocinadas, absorbieron agua tras la cocción, destacando *Silene vulgaris* por ser la especie que mayor captación de agua presentó (6%). Dicho incremento es habitual al someter los vegetales a procesos de cocción ya que se produce la ruptura de las células que conforman la pared celular, y su hinchamiento, así como por la captación de agua de compuestos higroscópicos como la fibra, etc.

Tabla 10.1.1.- Parámetros físico-químicos en crudo y tras el proceso de cocción en las especies silvestres estudiadas

Especie		Humedad (%)	pH	Ácidoz titulable (ml NaOH 0,1N/100g)
<i>Rumex pulcher</i>	Crudo	88,15 ^a (0,14)	4,67 ^b (0,06)	25,45 ^a (2,29)
	Cocido	90,88 ^b (0,88)	4,23 ^a (0,02)	21,36 ^a (1,63)
<i>Silene vulgaris</i>	Crudo	86,07 ^a (0,06)	5,90 ^a (0,02)	14,24 ^b (0,53)
	Cocido	92,08 ^b (0,43)	6,62 ^b (0,05)	4,88 ^a (0,12)
<i>Asparagus acutifolius</i>	Crudo	86,91 ^a (0,05)	6,17 ^a (0,01)	19,58 ^b (0,22)
	Cocido	89,57 ^b (0,02)	6,34 ^b (0,01)	7,94 ^a (0,19)
<i>Bryonia dioica</i>	Crudo	90,70 ^a (0,13)	6,14 ^a (0,00)	16,93 ^b (0,29)
	Cocido	93,37 ^b (0,25)	6,51 ^b (0,11)	5,01 ^a (0,18)
<i>Humulus lupulus</i>	Crudo	86,21 ^a (0,06)	6,09 ^a (0,02)	24,16 ^b (1,24)
	Cocido	90,70 ^b (0,25)	6,65 ^b (0,02)	6,70 ^a (0,19)
<i>Tamus communis</i>	Crudo	88,67 ^a (0,35)	5,81 ^a (0,03)	16,93 ^b (0,29)
	Cocido	90,56 ^b (0,05)	5,95 ^b (0,00)	9,81 ^a (0,10)

En cada columna diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre crudo y cocinado para cada especie ($p < 0,05$) n=3.

En relación a la modificación del **pH** tras el proceso de cocción, se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las especies estudiadas, entre la muestra fresca y la cocida, siendo el pH ligeramente superior en la mayoría de las muestras cocidas, con respecto a las frescas, a excepción de *Rumex pulcher*.

Este aumento en el pH, tras el proceso de cocción, se corresponde con una lógica disminución (estadísticamente significativa, $p < 0.05$) de la **acidez titulable** (figura 10.1.1), destacando *Humulus lupulus* por ver reducida su acidez en un factor aproximadamente de 4 tras el proceso de cocción. Dicha disminución se debe a que durante la cocción se produce la ruptura celular, favoreciendo la salida de compuestos de carácter hidrosoluble, como los ácidos orgánicos presentes en las vacuolas celulares, que pasan al líquido de cocción. Esto hace disminuir la acidez en los vegetales cocidos y al mismo tiempo se relaciona con el ligero ascenso detectado en el pH. Las hojas de *Rumex pulcher* (especie más ácida), fueron las que experimentaron un menor descenso en la acidez, lo que concuerda con el hecho de que esta fue la única especie en la que el pH no se incrementó tras el proceso de cocción.

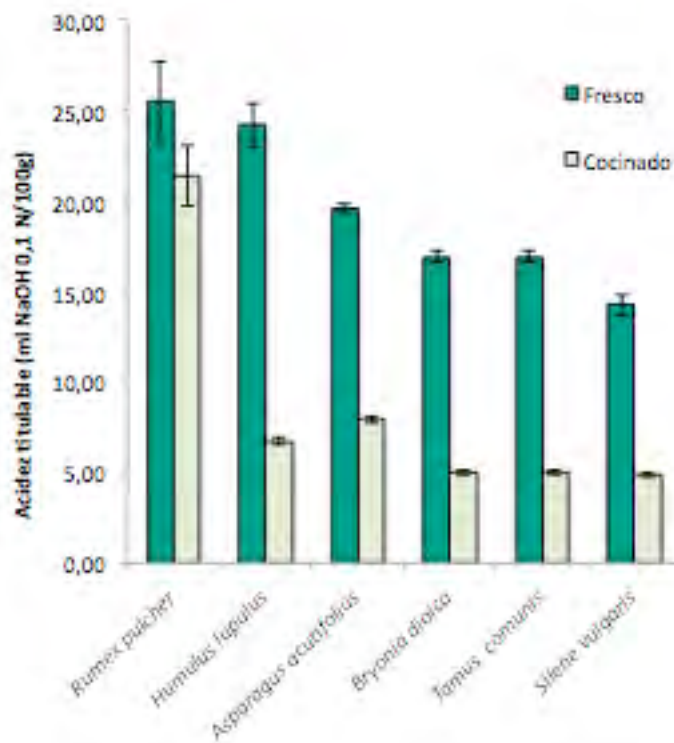


Figura 10.1.1.- Variación de la ácidéz titulable (ml NaOH 0,1 N/100g muestra) tras el proceso de cocción.

10.2.- Ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico: Vitamina C

Como se indicó anteriormente (cuadro 10.1), la estabilidad de la **vitamina C** está condicionada por diversos factores, como la presión parcial de oxígeno, la temperatura, pH, luz solar, así como posibles enzimas y catalizadores metálicos (Cu^{2+} y Fe^{3+}) que puedan contener el alimento (Eitenmiller y Laden, 1999). La degradación de la vitamina C se debe principalmente a un proceso de oxidación (Figura 10.2.1). Inicialmente, el AA en el proceso de oxidación pasa de ascorbato a dehidroascorbato, reacción reversible, por lo que el dehidroascorbato mantiene en principio su valor como vitamina C. Sin embargo, la lactona correspondiente al dehidroascorbato es mucho menos estable que la del ascorbato, por lo que se hidroliza fácilmente para producir ácido 2,3-dicetogulónico, que posteriormente puede degradarse por descarboxilación (Figura 10.2.1).

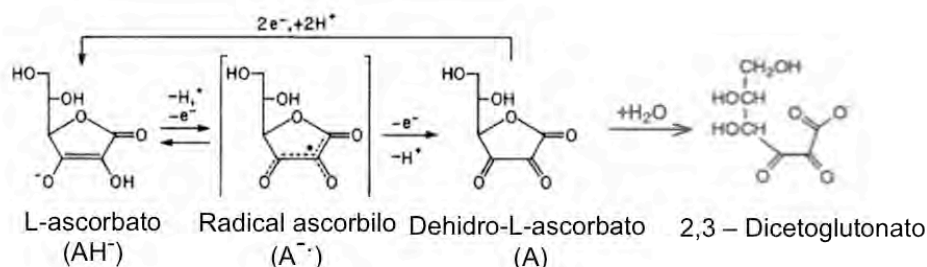


Figura 10.2.1.- Degradación de la vitamina C (Jacob, 1998)

En condiciones de anaerobiosis y baja actividad de agua, la degradación de la vitamina C es muy lenta (Laing et al, 1978; Ordoñez et al., 1998; Sungpuag et al., 1999), mientras que a mayor actividad de agua, se produce una mayor pérdida de esta vitamina. Posteriormente, Vieira et al. (2000) establecieron la cinética de degradación de primer orden del ácido ascórbico (AA) y dehidroascórbico (ADHA), dependiente de la temperatura (es decir, a mayor temperatura, mayor degradación de ambas isoformas).

Ya Laing et al. (1978) comprobaron que la degradación de la vitamina C depende en gran medida de la disponibilidad de oxígeno y la exposición del alimento al mismo, viéndose muy condicionada su estabilidad por la superficie de exposición del alimento a los factores anteriormente mencionados, y por lo tanto al tipo de alimento y al método de cocción empleado. Según Howard et al. (1999) los métodos de cocción que en teoría menor degradación suponen son: la cocción por vapor al microondas, seguido de la cocción con agua al microondas y la cocción por vapor de agua, siendo la cocción en olla tradicional, aquella que presenta las mayores pérdidas de vitamina C tras el tratamiento térmico. Pero a igualdad de condiciones de cocción, la degradación de la vitamina C depende en gran medida de la matriz del alimento y por lo tanto de la planta analizada, tal y como afirmaron Rumm-Kreuter y Demmel en 1999.

El tratamiento de cocción tradicional se caracteriza por emplear agua hirviendo de modo que teóricamente se plantean las mejores condiciones para la degradación de la vitamina C (altas temperaturas, medio acuoso y exposición al oxígeno), lo que hace suponer que se producirá una elevada tasa de degradación de la misma.

Tal y como se observa en la tabla 10.2.1 y figura 10.2.1, las verduras silvestres cocidas presentaron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el contenido de vitamina C respecto del contenido en crudo. Las especie silvestres que destacaron por ser las más ricas en vitamina C en estado fresco fueron *Rumex pulcher*, *Asparagus acutifolius*, *Humulus lupulus* y *Tamus communis*, de las cuales el espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*) y el lupio (*Tamus communis*) presentaron los mayores porcentajes de retención aparente (61,9 y 86,7%, respectivamente) manteniendo más de 40 mg/100g de vitamina C tras la cocción, mientras que las otras retuvieron aproximadamente la mitad (20 mg/100g vitamina C). Por otro lado, *Silene vulgaris* y *Bryonia dioica* retuvieron solo 13,4 y 6,4 mg/100g, respectivamente.

Si tenemos en cuenta la influencia del tratamiento térmico en cada una de las isoformas (AA y ADHA), podemos observar que la estabilidad del AA tras el procesado fue mayor que para el ADHA (isoforma más inestable), excepto para *Asparagus acutifolius* que fue la única especie donde el ADHA mantuvo un mayor porcentaje de retención (90,58%) lo que supuso una retención de 23,57 mg/100g de ADHA, casi la mitad del contenido total de vitamina C. En cambio, las especies que en crudo poseían menores niveles de ADHA, lo perdieron casi totalmente durante el procesado térmico. El único caso donde no hubo variación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) fue para el AA en la colleja (*Silene vulgaris*).

Diversos autores han estudiado la estabilidad de la vitamina C tras la cocción en vegetales cultivados, empleando diferentes métodos y técnicas de cocción. Kmiecik y Lisiewska (1999) indicaron que el proceso de escaldado supone una disminución de la vitamina C en

las hojas del cebollino y del perejil, de 29% y 47-51%, respectivamente. Asimismo Masrizal et al. (1997) evaluó la influencia de la cocción al microondas de varios vegetales, encontrando una retención del 34,1-79,4%. Algo parecido indicó Ilow et al. (1995) que encontró que la cocción al microondas durante 5 minutos supuso una disminución del 40% para el brócoli. Warthessen et al. (1984) comparó la cocción tradicional con la cocción al microondas de judías verdes, demostrando la gran variabilidad entre métodos, indicando una pérdida de 67,8-78,6% para el tratamiento al microondas, mientras que la cocción tradicional presentó un porcentaje de pérdida de 33,9-63,1%, observándose una gran variabilidad en el porcentaje de pérdida en función de la especie estudiada, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, con porcentajes entre 13,3–71,5% de pérdida de vitamina C tras la cocción.

Tabla 10.2.1.- Efecto de la cocción sobre el contenido de vitamina C de las especies estudiadas y porcentaje de retención aparente (RA) tras el proceso de cocción

Especie		AA (mg/100g)	ADHA (mg/100g)	Vitamina C total (mg/100g)	% IDR
<i>Rumex pulcher</i>	Fresco	30,78 ^b (0,72)	16,09 ^b (0,17)	46,47 ^b (0,11)	61,9
	Cocido	20,36 ^a (0,67)	1,25 ^a (0,30)	21,61 ^a (0,86)	28,8
	% RA	66,1	7,35	46,5	
<i>Silene vulgaris</i>	Fresco	14,31 ^a (0,98)	11,09 ^b (0,90)	25,11 ^b (0,46)	33,5
	Cocido	13,90 ^a (0,96)	0,00 ^a	13,41 ^a (0,85)	17,9
	% RA	90,9	0,0	53,4	
<i>Asparagus acutifolius</i>	Fresco	29,29 ^b (0,02)	26,02 ^a (0,59)	56,67 ^b (0,58)	73,7
	Cocido	24,19 ^a (0,51)	23,57 ^a (1,36)	47,93 ^a (1,82)	63,9
	% RA	82,6	90,6	86,6	
<i>Bryonia dioica</i>	Fresco	11,99 ^b (0,31)	13,67 ^b (1,69)	25,67 ^b (2,01)	34,2
	Cocido	6,39 ^a (0,32)	0,22 ^a (0,01)	6,42 ^a (0,25)	8,5
	% RA	53,3	1,6	25,0	
<i>Humulus lupulus</i>	Fresco	37,25 ^b (0,19)	23,22 ^b (0,84)	60,95 ^b (0,12)	78,1
	Cocido	11,26 ^a (0,50)	5,56 ^a (0,19)	17,36 ^a (0,76)	48,3
	% RA	30,2	23,9	28,5	
<i>Tamus communis</i>	Fresco	56,87 ^b (0,21)	1,56 ^b (0,11)	58,57 ^b (0,37)	81,3
	Cocido	36,25 ^a (0,77)	0,00	40,90 ^a (1,60)	23,1
	% RA	63,7	0,0	61,9	

En cada columna diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre crudo y cocido para cada especies ($p < 0,05$), $n=3$.

AA (ácido ascórbico), ADHA (ácido dehidroascórbico) y RA (retención aparente).

Teniendo en cuenta que las ingestas diarias recomendadas (IDR) están en torno a 75-90 mg diarios, dependiendo del rango de edad y sexo (Trumbo, 2002), podemos afirmar que las especies silvestres seleccionadas incluso después de cocinadas, siguen siendo fuentes de vitamina C en la dieta. Por ejemplo, el consumo de 100g de espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*), lupio (*Tamus communis*), y romaza (*Rumex pulcher*) cocinados, tal y como se consume tradicionalmente, supera el 50% de las IDR, destacando el espárrago triguero, que cocinado, aún supone un aporte de hasta un 63,90% de las IDR para esta vitamina.

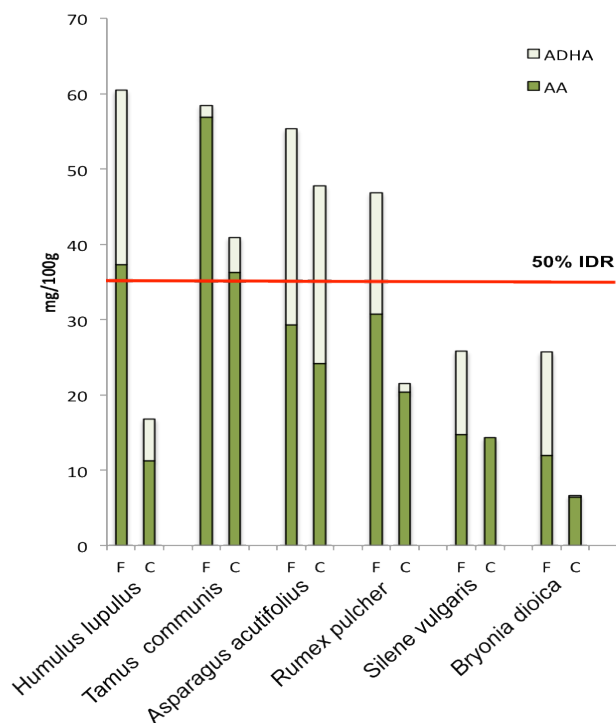


Figura 10.2.2.- Contenido de vitamina C total (g/100g) en las especies objeto de estudio

IDR (Ingestas diarias recomendadas), F (Fresco), C (crudo), AA (ácido ascórbico) y ADHA (ácido dehidroascórbico).

10.3. Ácidos orgánicos

El contenido del resto de **ácidos orgánicos** evaluados y el porcentaje de retención de los mismos (tabla 10.3.1) varía dependiendo de la especie y del compuesto estudiado.

El contenido en **ácido oxálico** disminuyó significativamente ($p < 0,05$) tras el proceso de cocción (tabla 10.3.1 y figura 10.3.1). Llama la atención que las especies que menor contenido de dicho ácido orgánico presentaron en crudo, fueron las que mejor lo mantuvieron durante el cocinado, como es el caso de *Asparagus acutifolius*, *Humulus lupulus* y *Tamus communis*, con porcentajes de retención superiores al 82%. Mientras que las especies que mayor contenido tenían en crudo fueron las que mayores pérdidas

presentaron, reteniendo únicamente el 36% *Bryonia dioica*, 39% *Rumex pulcher*. En estos casos, una forma de reducir la ingesta de oxalatos puede ser descartar el líquido de cocción, con lo que se retira más del 40% del ácido oxálico de la planta.

Tabla 10.3.1.- Efecto de la cocción sobre el contenido de ácidos orgánicos (g/100g) y porcentajes de retención aparente (RA) de tras el proceso de cocción

Especies		Ácido oxálico	Ácido glutámico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido fumárico
<i>Rumex pulcher</i>	Fresco	0,73 ^b (0,02)	nd	nd	0,10 ^b (0,00)	tr.
	Cocido	0,29 ^a (0,02)	nd	nd	0,03 ^a (0,00)	tr.
	% RA	39,1	-	-	33,6	-
<i>Silene vulgaris</i>	Fresco	0,63 ^b (0,07)	nd	nd	0,12 ^b (0,01)	tr.
	Cocido	0,45 ^a (0,03)	nd	nd	0,06 ^a (0,02)	tr.
	% RA	70,2	-	-	51,2	11,5
<i>Asparagus acutifolius</i>	Fresco	0,10 ^a (0,01)	0,04 ^b (0,00)	0,22 ^b (0,04)	0,33 ^a (0,05)	0,001 ^b (0,00)
	Cocido	0,08 ^a (0,00)	0,03 ^a (0,00)	0,09 ^a (0,01)	0,20 ^a (0,07)	tr
	% RA	82,3	69,0	41,8	59,1	7,2
<i>Bryonia dioica</i>	Fresco	0,36 ^b (0,02)	0,12 ^b (0,00)	1,71 ^b (0,04)	0,06 ^b (0,01)	0,002 ^b (0,00)
	Cocido	0,13 ^a (0,01)	nd	0,98 ^a (0,07)	0,04 ^a (0,00)	0,001 ^a (0,00)
	% RA	36,7	0	57,2	66,6	32,9
<i>Humulus lupulus</i>	Fresco	0,09 ^a (0,02)	nd	0,77 ^b (0,17)	0,17 ^a (0,01)	0,001 ^b (0,00)
	Cocido	0,08 ^a (0,00)	nd	0,47 ^a (0,02)	0,12 ^a (0,03)	tr
	% RA	85,2	-	78,2	69,1	31,8
<i>Tamus communis</i>	Fresco	0,08 ^a (0,01)	nd	nd	0,34 ^b (0,02)	0,001 ^b (0,00)
	Cocido	0,08 ^a (0,01)	nd	nd	0,24 ^a (0,01)	tr
	% RA	93,7	-	-	69,8	30,5

En cada columna diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre crudo y cocido para cada especie, n=3.

%RA (retención aparente), nd (no detectado), tr (trazas < 0,005 g/100g).

Destaca sin embargo *Silene vulgaris* por presentar el mayor contenido total ($p < 0,05$) de ácido oxálico en crudo (0,635 g/100g) y por ser la especie que mayor porcentaje de retención presentó (70,2%), quedando 0,45 g/100g como contenido final de ácido oxálico.

Bhandari y Kawabata (2006) indicaron que la estabilidad del ácido oxálico está muy influenciada por tratamientos térmicos como horneado, cocción a presión y cocción tradicional. Asimismo, Chai and Liebman (2005) realizaron estudios de cocción (cocción tradicional y escaldado) de diferentes vegetales, como la espinaca, acelga, coles de Bruselas, zanahoria y remolacha, y la influencia de mismo en el contenido de ácido oxálico. Estos autores indicaron para la espinaca una concentración de 1145 mg/100g en crudo, de 797 mg/100g tras el proceso de escaldado y de 460 mg/100g tras la cocción. Demostrando la pérdida de ácido oxálico por solubilización del mismo en el líquido de cocción.

El **ácido glutámico**, fue caracterizado únicamente en fresco en el espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*) y en el espárrago de nuez (*Bryonia dioica*), observándose en este último una pérdida del 100% tras el proceso de cocción (se eliminaron los 0,119 g/100g que presentaba dicha especie en fresco), mientras que en el espárrago triguero se observó una retención del 69,0%.

El **ácido málico** se cuantificó en el espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*), el espárrago de nuez (*Bryonia dioica*) y el lupio (*Tamus communis*), todas ellas brotes tiernos, presentando una retención de 41,8 a 78,2%. El lupio fue la especie que mayor porcentaje de retención presentó lo que supuso una concentración de 0,469 g/100g tras el proceso de cocción, pero fue el espárrago de nuez la especie que mayor contenido ($p < 0,05$) de dicho ácido mantuvo antes y después del tratamiento térmico (1,710 g/100g y 0,976 g/100g, respectivamente).

El **ácido cítrico**, mostró un comportamiento más estable, presentando porcentajes de retención entre 51,2 – 69,8% (Tabla 10.3.1), a excepción de *Rumex pulcher* que mostró la mayor pérdida tras el proceso de cocción para dicho ácido (33,6% de retención). El lupio fue la especie que presentó mayores concentraciones ($p < 0,05$) tanto en fresco como cocida (0,339 g/100g y 0,237 g/100g, respectivamente), puesto que en los brotes tiernos de esta planta, éste fue el ácido mayoritario.

El **ácido fumárico**, al ser un compuesto minoritario en todas las especies estudiadas, se perdió prácticamente en su totalidad tras el proceso de cocción.

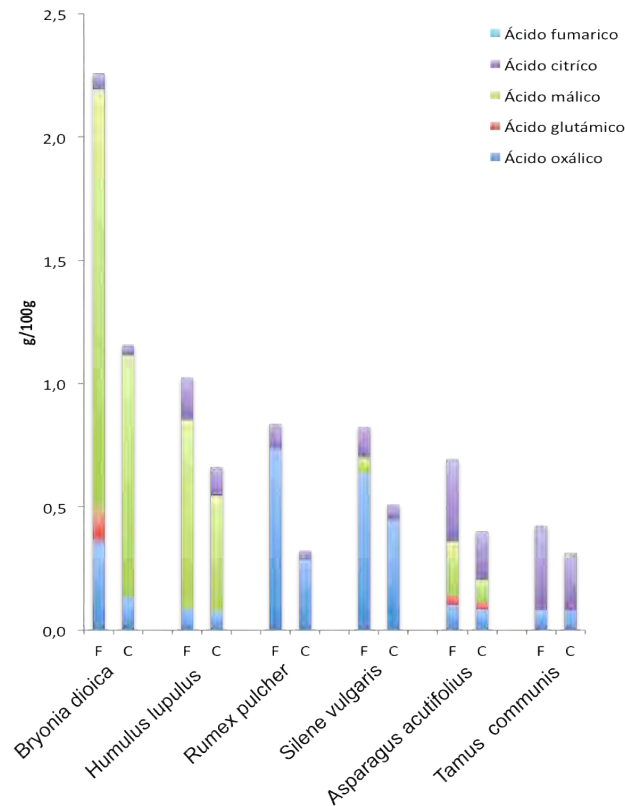


Figura 10.3.1.- Contenido de ácidos orgánicos (g/100g) en las especies objeto de estudio

10.4. Vitamina B₉ (ácido fólico y folatos)

La estabilidad de la **vitamina B₉ (ácido fólico y folatos)** en los alimentos depende de diversos factores (cuadro 10.1), entre los que destaca la exposición lumínica (principalmente UV), tratamiento térmico en medio ácido, cantidad de agua empleada, relación superficie/volumen del alimento, etc., así como la presencia de metales como Fe²⁺ y/o aditivos como el nitrato sódico (se ha observado que disminuye la retención de folatos en los alimentos), mientras que compuestos con actividad antioxidante (ácido ascórbico, tocoferoles, etc.) favorecen su retención (Eintenmiller y Laden, 1999).

Tal y como indica la tabla 10.4.1, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el contenido de ácido fólico y folatos de las muestras frescas y cocinadas, destacando *Silene vulgaris* por presentar el menor porcentaje de retención (19,64%) lo que supone un contenido de 0,102 mg/100g en la muestra cocida.

Aunque podría esperarse que vegetales de hoja, como *Rumex pulcher*, sean más susceptibles a pérdidas de nutrientes al líquido de cocción (debido a sus características morfológicas), en comparación con los tallos y brotes, la romaza fue la especie que mayor porcentaje de retención de ácido fólico presentó (69,78%) con contenidos de 0,277 mg/100g tras el proceso de cocción. Algo similar indicó Lin y Lin (1999) donde la mayor retención de ácido fólico se observó en los vegetales de hoja (47-70% de pérdida), frente al 50-90% de los vegetales sin hoja (tallos y brotes).

Además se puede apreciar que el espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*) fue la especie que mayor contenido total presentó ($p < 0,05$) tanto en fresco (0,587 mg/100g) como cocido (0,280 mg/100g), con un porcentaje de retención de 47,96%. Malin (1977) observó que las coles de Bruselas cuyo contenido de vitamina C era mayor, fueron las que menor proporción de ácido fólico perdían tras el proceso de cocción. Estos resultados concuerdan con los encontrados en el presente trabajo, donde *Asparagus acutifolius* que presentó los

mayores porcentajes de retención de vitamina C, mantuvo a su vez los niveles más elevados de folatos tras la cocción, de modo que podemos afirmar un factor importante para la retención del ácido fólico en las especies de estudio puede ser el elevado contenido de ácido ascórbico que presentan las mismas.

Tabla 10.4.1.- Efecto de la cocción sobre el contenido de ácido fólico y folatos en las especies estudiadas y porcentajes de retención aparente (RA) tras el proceso de cocción

<i>Especie</i>		5MTHF-DG (mg/100g)	5MTHF-MG (mg/100g)	Folatos Totales (mg/100g)	% IDR	Retención aparente (RA) %
<i>Rumex pulcher</i>	Fresco	0,396 (0,022)	0,001 (0,000)	0,397 ^b (0,023)	99,25	69,78
	Cocido	0,272 (0,025)	0,005 (0,001)	0,277 ^a -t(0,026)	69,25	
<i>Silene vulgaris</i>	Fresco	0,516 (0,140)	0,003 (0,000)	0,519 ^b (0,140)	129,75	19,64
	Cocido	0,096 (0,013)	0,005 (0,001)	0,102 ^a (0,012)	25,50	
<i>Asparagus acutifolius</i>	Fresco	0,587 (0,017)	0,002 (0,000)	0,589 ^b (0,017)	147,25	47,96
	Cocido	0,280 (0,006)	0,002 (0,000)	0,283 ^a (0,007)	70,75	
<i>Bryonia dioica</i>	Fresco	0,176 (0,008)	0,001 (0,000)	0,177 ^b (0,008)	44,25	68,61
	Cocido	0,113 (0,008)	0,008 (0,000)	0,122 ^a (0,015)	30,50	
<i>Humulus lupulus</i>	Fresco	0,299 (0,046)	0,004 (0,001)	0,304 ^b (0,045)	76,00	58,15
	Cocido	0,171 (0,036)	0,005 (0,001)	0,177 ^a (0,038)	44,25	
<i>Tamus communis</i>	Fresco	0,157 (0,006)	0,003 (0,002)	0,159 ^b (0,004)	39,75	68,55
	Cocido	0,106 (0,024)	0,004 (0,002)	0,109 ^a (0,022)	27,25	

En cada columna diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre crudo y cocido para cada especie ($p < 0,05$) $n=3$.

IDR (Ingestas diarias recomendadas)

Según Mckillop et al. (2002) el tratamiento térmico de cocción tradicional de la espinaca supone una reducción de 51-56% de folatos, mientras que la cocción a vapor apenas afectaban al contenido de ácido fólico. Algo similar indico Chen et al. (1983) respecto a la diferencia entre la cocción tradicional y al microondas, siendo superior la pérdida de folatos en el primero.

Hay que resaltar que las muestras analizadas de *Asparagus acutifolius*, *Rumex pulcher* y *Humulus lupulus* siguen cubriendo al menos el 40% de las IDR de vitamina B₉ después de cocinadas.

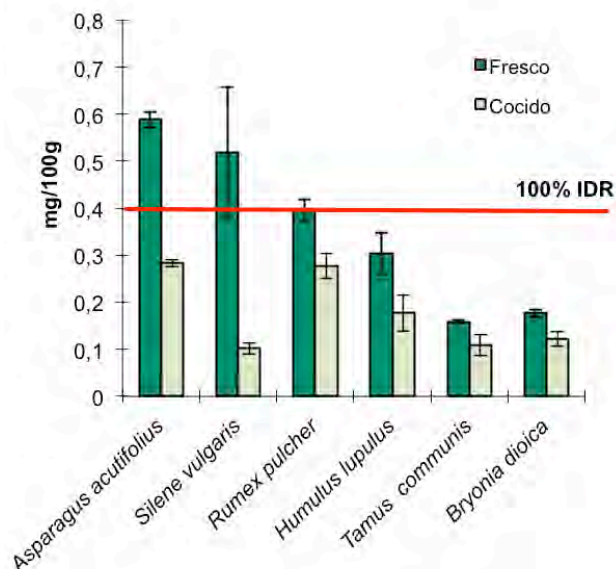


Figura 10.4.1.- Contenido de folatos totales (mg/100g) en las especies objeto de estudio IDR (Ingestas diarias recomendadas).

E. CONCLUSIONES

A. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPECIES

1.- De entre todas las verduras silvestres consideradas en el presente estudio, podemos destacar las siguientes características específicas:

- Las hojas de *Rumex pulcher* y especialmente *R. papillaris* destacan por ser especies muy ácidas y por presentar contenidos elevados de vitamina C (ácido ascórbico), vitamina B₉ (ácido fólico y folatos), compuestos fenólicos, vitamina E (tocoferoles), y ácidos grasos poliinsaturados.
- El lupio (*Tamus communis*), del que se consumen sus brotes tiernos con hojas, destacan por ser la especie vegetal más rica en ácido ascórbico y vitamina C total de todas las estudiadas (59 mg/100 g).
- La lenguaza (hojas de *Anchusa azurea*) ha presentado el mayor contenido de vitamina B₉ (ácido fólico y folatos, 917µg/100g), presentando también niveles elevados de compuestos fenólicos, y la capacidad antioxidante más alta valorada por la mayoría de los métodos aplicados.
- Las hojas de achicoria (*Cichorium intybus*) y de acelga silvestre (*Beta maritima*) destacaron por ser las especies con mayor contenido de compuestos fenólicos, y buena capacidad antioxidante.
- El hinojo (*Foeniculum vulgare*) contiene niveles interesantes de vitamina C (36 mg/100 g) y de folatos (vitamina B₉, 470 µg/100g)
- La colleja (*Silene vulgaris*), de la que se consumen sus tallos tiernos con hojas, presenta elevados niveles de tocoferoles y de vitamina B₉ (ácido fólico y folatos), así como niveles medios de vitamina C (23 mg/100 g).
- La coruja (tallos tiernos con hojas de *Montia fontana*) se caracteriza por su elevado contenido de compuestos fenólicos y vitamina C (33 mg/100 g).
- Las hojas del diente de león (*Taraxacum obovatum*) contiene altos niveles de folatos y los contenidos más bajos del antinutriente ácido oxálico (20 mg/100 g).

- El espárrago de zarza (*Humulus lupulus*) presenta altos niveles de tocoferoles, y ácidos grasos poliinsaturados, así como elevados contenidos de vitamina C (42 mg/100 g) y también bajos contenidos de ácido oxálico (90 mg/100 g).

2.- En la composición de las especies vegetales consideradas se han evidenciado correlaciones significativas entre algunos de los parámetros estudiados:

- El ácido ascórbico contribuye mayoritariamente al contenido total de vitamina C en este tipo de muestras, correlacionándose también con el contenido de ácido cítrico, e inversamente con el ácido oxálico (al utilizarse en su biosíntesis) y con los tocoferoles (al consumirse en su regeneración).
- Los fenoles y flavonoides son los principales responsables de la capacidad antioxidante de las plantas (valorada por el método del DPPH).
- El ensayo de evaluación de la actividad antioxidante del DPPH está correlacionado positivamente con el ensayo del poder reductor y con el ensayo de la inhibición de la decoloración del β -caroteno. Podemos afirmar que para valorar la capacidad antioxidante total de este tipo de matriz, el método del poder reductor, y más especialmente el del DPPH, serían los métodos de elección, por correlacionarse entre sí y con la presencia de compuestos bioactivos con actividad antioxidante en las muestras. El ensayo de la inhibición de la decoloración del β -caroteno sería el ensayo de elección, en concreto, para la determinación de la peroxidación lipídica.

B. EFECTO DE LA TEMPORADA Y LOCALIDAD

3.- La **humedad** presenta variaciones de hasta 12 a 20% en todas las especies estudiadas, a excepción de *Silene vulgaris* y *Silybum marianum*, en las que su contenido hídrico es relativamente constante.

4.- Respecto a la acidez, el **pH** se muestra como un parámetro relativamente estable para una misma especie entre temporadas y localidades en la mayoría de las especies estudiadas, observándose únicamente diferencias claras ($p < 0,05$) en el caso de *Apium nodiflorum* y *Silene vulgaris*. La acidez titulable es un parámetro altamente influido por la temporada de recolección, de forma análoga al contenido de ácidos orgánicos (ácidos oxálico, málico y cítrico), muy dependiente de los procesos metabólicos de la planta.

5.-La **vitamina C** es un parámetro altamente influido por las variaciones ambientales (coeficientes de variación de hasta 59,5%). El perfil de AA y ADHA suele ser constante en la mayor parte de las especies: en *Tamus communis*, *Silene vulgaris*, *Montia fontana*, *Asparagus acutifolius* y *Allium ampeloprasum* la isoforma mayoritaria es el AA, mientras que en el caso de las especies pertenecientes a la familia de las compuestas y *Foeniculum vulgare* es el ADHA. *Beta maritima*, *Bryonia dioica* y *Silene vulgaris*, en la mayor parte de los casos, mantienen niveles totales de vitamina C relativamente constantes, a pesar de que el reparto de las dos formas (AA y ADHA) a menudo es irregular.

C. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN *Rumex pulcher* L., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke., *Asparagus acutifolius* L., *Bryonia dioica* Jacq., *Humulus lupulus* L. y *Tamus communis* L.

6.- El contenido del antinutriente **ácido oxálico (AO)** disminuyó significativamente ($p < 0,05$) tras el proceso de cocción. Las especies que menor contenido de AO presentaron en crudo, fueron las que más lo retuvieron durante el cocinado, mientras que las especies más ricas en el mismo fueron las que mayores pérdidas presentaron, lo cual hace recomendar el tratamiento térmico previo al consumo de estas especies para disminuir la presencia de ácido oxálico en la dieta.

7.- El contenido de **vitamina C** de los vegetales silvestres cocidos se redujo significativamente ($p < 0,05$) respecto a su contenido inicial. El espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*) y el lupio (*Tamus communis*) presentaron los mayores porcentajes de retención aparente (61,9 y 86,7%, respectivamente) manteniendo en torno a 40mg/100g de vitamina C tras el proceso de cocción. La estabilidad del **AA** tras el procesado fue, en general, mayor que para el **ADHA**.

8.- La **vitamina B₉** (ácido fólico y folatos) experimentó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en su contenido en las muestras cocinadas. Las hojas de *Rumex pulcher* y los espárragos trigueros (*Asparagus acutifolius*) fueron las que mayores porcentajes de retención de ácido fólico presentaron (69,78% y 47,68 %, respectivamente), manteniendo este último, elevados niveles de ácido fólico en los brotes cocidos (más de 280 µg/100 g).

CONCLUSIÓN FINAL

De entre las especies que se pueden consumir crudas, una ración de 100 g de hinojo (*Foeniculum vulgare*) puede cubrir el 50 % de las IDR de vitamina C para adultos, y más del 100 % de las IDR de ácido fólico; la colleja (*Silene vulgaris*) aporta gran cantidad de ácido fólico, duplicando, con una ración de 100 g, las IDR para adultos. Respecto al contenido en compuestos liposolubles, la acedera (*Rumex papillaris*) es una buena fuente de ácidos grasos poliinsaturados y tocoferoles totales, mientras que en el caso del α -tocoferol, se puede seleccionar a la colleja (*Silene vulgaris*). Respecto a aquellas que requieren un tratamiento térmico previo a su consumo, el lupio (*Tamus communis*) y el espárrago triguero (*Asparagus acutifolius*), siguen siendo una buena fuente de vitamina C tras el mismo (100 g cubren más del 50 % de las IDR para adultos); y en el caso del espárrago triguero cocido, también se cubre este porcentaje de las IDR de ácido fólico.

Las plantas silvestres comestibles estudiadas son en muchos casos, muy buenas fuentes de vitamina C y vitamina B₉ (ácido fólico). Por ello es importante la conservación de estos recursos genéticos, bien en su forma silvestre, para el cultivo *in situ*, o *ex situ* en bancos de germoplasma, con el fin de preservar y revalorizar su uso alimentario, como parte de nuestras tradiciones gastronómicas y fuente de nutrientes y compuestos bioactivos de interés en nuestra dieta.

**F. EDIBLE WILD VEGETABLES. DETERMINATION OF
BIOACTIVE COMPOUNDS AND EVALUATION OF
ANTIOXIDANT ACTIVITY**

11.- IMPORTANCE OF WILD PLANTS IN NUTRITION

Since the beginning of human existence, man has obtained nutritional resources either by hunting, fishing or simply collecting wild plants and mushrooms. During the Paleolithic period man was a hunter and collector, gathering herbs, roots, fruits, seeds, etc. His diet was simple but varied and balanced. The first methods of cooking used were very simple and rudimentary, introducing the food to fire direct action, or heating it over hot stones placed over the fire. In the mid part of this era, the society had a tribal organization; they were able to hunt together big animals such as mamouts and rhinoceoreus as well as fishing. In the higher Paleolithic's period, they were able to mill grains, living in the open air, in open caves or other shelters. (Ladizinsky, 1998; Casañas, 2010; Harlan, 1992)

Wild plants have been vital for the survival of civilizations from prehistoric times till the beginning of agriculture, and it continues being so for some tribes that still exist, as well as for agricultural societies during periods of poor harvests and food shortage, as these are easily available, plentiful of easy recollection and in some cases they can be easily conserved for future use. (Peña-Chocarro, 2000; Martínez, 2001; Cubero et al., 2006; Tardío et al., 2006).

Studies carried out on pre-agricultural societies show us how man aware of the different localizations and stationalities and manipulate his environment to make it more productive, which slowly evolved to what we know as agriculture.

The origins of agriculture took place coinciding with a very important climate change, the last Ice age, which supposed the "domestication" of vegetable species, in response to the need to feed a growing population through the manipulation of harvest (approximately 10,000 years ago). We understand "domestication" as the process where by man makes an intervention in adapting wild vegetable species, which he already consumed to obtain

these in greater quantities. In the Neolithic period the domestication of crops coincided with the origins of sedentary lifestyle, initially to complement hunting and recollection, due to the increase in the number of groups or tribes that populated great part of the useful land (rich in plants), thus reducing available land which in turn motivated a sedentary lifestyle. From this moment, man has tried to continue this process of domestication with the objective of obtaining better and more productive crops; this manipulative process is what we today know as genetic improvement. (Cubero et al., 2006; Nuez, 2010).

The exposition of ancestral wild vegetables to farming processes provoke a number of morphological, physiological and genetically changes so radical that in many cases it is extremely difficult to recognize the original species (Tardío et al., 2002). The central areas of domestication were located in the fertile area in the Middle East, in China, and America, the so named Vavilov centres. (Figure 11.1.). From these original domestication areas, crops were expanded worldwide following the flows of human migration. In this process mankind took with him domesticated seeds (Casañas, 2010).



Figure 11.1.- Geographical representation of Vavilov centres. (1) China, (2) Indo-malasia, (3) Indo Afghanistan (Central Asia), (4) Middle East , (5) Mediterranean, (6) Abisinia, (7) México (Central América), (8) Sudamerica (8a: Peru-Ecuador-Bolivia, 8b: Chile, 8c: Brazil-Paraguay). Vavilov, 1949/1950

The domestication of a crop generally implies a competitive loss of biodiversity in the non cultivated areas, changing according to the species concerned (Casañas, 2010). During this evolution the agricultural variability appears and disappears in response to the changes in the environment being cultivated, this continuous process of gain and loss in diversity is inherent to Nature as a response to natural evolution. The problem arises when the gain and loss process is incremented drastically, some species even disappearing all together (mainly wild species) as time goes by. Similarly, since domestication of crops in the Neolithic period, some new species have appeared and new varieties have been cultivated. The number of species for nutritional purposes used by the hunting/gathering societies (according to ethnographic data) was more than 1400, although only a few were suitable for mass production and have an important dietary impact.

Even though during thousands of years of agriculture, man has been able to produce a high number of different varieties of crops, up to the last century different species and varieties appeared and disappeared in apparently logical or normal processes, in a process that accelerates with time and what we call genetically erosion. Each variety that disappears causes the loss of their genes. (Casañas, 2010; Esquinas, 2010). We can see a clear example in the arrival of Europeans to the American continent. As a consequence of the interchange of crops (maybe the most important in history), which allowed the introduction of potatoes, corn, peppers, tomatoes, beans etc. to the European diet, the disappearance of parsnip, celery or salsifi was provoked (Nuez y Hernández Bermejo, 1992; Nuez, 2010).

At present, the problem of the margination or disappearance of species and their different varieties does not affect only their availability, but also excludes the possibility of their use for genetical improvement processes in the future along with the loss of an important agricultural patrimony. One of the most serious consequences derived for the actual genetical improvement process, which are a part of a very restricted diversity, along with the actual distribution of seeds in “single crop farming”, fruit of the industrialization of

agriculture. Therefore the genetical diversity in the fields is decreasing and this contributes to the increase in genetical vulnerability (NAS, 1972) and consequently the possibility of an important loss in the production of food. For this reason FAO recommends the conservation of traditional farming systems, the recovery of minor or marginated species and the return of diversity that existed in the traditional varieties to the fields. (FAO, 2001).

As “wild varieties” we understand, those material that are made up of certain genetical integrity, morphologically recognizable (traditionally and ethnobotanical known by various different names depending on the geographical area) and different to the cultivated version in their adaptation to the type of ground, time shown and matured, high, nutritional value, usage and other benefits (FAO, 1996; Nuez, 2010) Thanks to these adaptation characteristics, these varieties have formed homeostatic systems and in some types these have maintained acceptable levels of production even if face any environmental aggression such as plagues, disease or climate change. (FAO, 1996).

“Technological improvement” has brought along the disappearance, (since the beginning of the century to date), of 75% of the diversity in most important genetical crops (FAO, 1998; Esquinas, 2010). Therefore the importance of conserving the “psychopathological resources” via two widely known strategies: conservation “*in situ*” and “*ex situ*”. Has been recognized Conservation “*in situ*” promotes the conservation of the ecological systems and habitats, maintaining and recuperating the wild species of the region; whilst conservation “*ex situ*”, consists in the inclusion of seeds in the so called banks of germoplasm or seeds, which normally are official centres where genetic material (normally on danger of extinction) is collected and stored, these normally coming from phyto-genetical centres or from farmers. The inconvenience of these centres lies in that they are normally located within universities or investigation centres, centralized, and to far away from farmers access. Due to all the above said, it is of interest to combine both

conservation systems complementing each other, with the support and cooperation of governments, institutions and private companies. (Cubero et al., 2006; Esquinas, 2010).

Nowadays in most countries there are some wild vegetables that still make up an important part of nutrition, specially in rural areas. In some countries this recollection plays an important part, as even though having access to cultivated vegetables, the wild variety is considered as better and are frequently sold in local markets. (Ertug, 2004).

In the rural areas in Spain and Portugal, as well as in other European countries, is normal to take advantage of the local natural resources such as plants and fungi which complement basic agricultural food. Edible plants are valuable elements in each culture and are therefore a predominant element in the landscape created by mankind during the last centuries. (Heinrich, 2006).

In Spain, the use of wild plants is more or less local, with the exception of the present hobby of mushroom recollection and some other vegetables traditionally extended geographically as in the case of green asparagus (*Asparagus acutifolius*), campion (*Silene vulgaris*) or thistle (*Scolymus hispanicus*). Some of these species have even been cultivated; however their consumption dropped due the competency faced with other more productive varieties, and their usage is limited to recollection in the wild.

Indeed in our country as well as in other European countries, along with the uniformed globalization of customs and values, we can see that there is a strong hold and value in the identities and local traditions, including local traditional cooking (Pardo de Santayana & Gómez Pellón, 2003). In fact there is an upsurge against the so-called “fast food”, a new wave has arisen called “slow food” which means rediscovering of the traditional European products and gastronomy (Pieroni et al., 2005). In this sense, during the last few years there is an increase in home cooking and the commercialization, on a small scale, of certain local products elaborated with wild plants, such as jams or liqueurs or even

preserves made with wild fruits and plants (Pardo de Santayana et al., 2006). As an example in the Valencia Community the use of certain species has formed part of the gastronomic patrimony such as the case of the typical dish *Polinyà de Xúquer (la Fenollà)*, that includes fennel (*Foeniculum vulgare*) among its principal ingredients (Morales, 2002; Pretel y Obón, 2009). This species is also used all over Spain. The traditional use of wild plants, such as the Swiss chard (*Beta vulgaris*) is widely extended throughout the peninsula and specially present in the Community of Madrid, this vegetable being previously cooked and after stir fried accompanied with eggs or ham (Tardío et al., 2002); similarly this is also the method used for preparing asparagus and fennel.

At the same time fruit and vegetable companies, that commonly use the major distribution channels, continuously launch exotic fruits and “new” vegetables, as in the case of *Valerianella locusta*, rocket (*Eruca vesicaria*), wild rocket (*Diplotaxis tenuifolia*) or cress (*Barbarea verna*), the majority of which have very little tradition in our gastronomy, but are achieving a considerable growth and acceptance by consumers.

Nearly 7.000 different plant species are cultivated worldwide for nutritional or popular medical use, these originating from wild forms (FAO, 1998; Esquinas, 2010). These neglected and infratilitated species generally grow in particular regions with determined climate conditions (as is the case of the Mediterranean region), which could imply an important means of sustenance for small farmers. Although the use of wild vegetables has continued falling in line with agricultural development, specially due to new social economical matters, some wild species are still consumed at present (Tardío, 2010).

Due to this lack of notoriety, their potential value is underestimated and cannot be commercialized adequately, approaching the verge of genetical erosion and disappearance. Wild species are very versatile in their handling and consumption, and have great potential as new sources of unusual colouring and flavours, along with their

chemical and nutritional values, especially in the bioactive compounds they have, that justify the need to preserve their traditional use, as an alternative to the variety of vegetables currently available and also as a source of dietary supplements or as functional foods. So that these reasoning can be recognized worldwide their investigation has to be supported, both under the nutritional and phytotherapeutical point of view (Zeghichi et al 2003;. Ansari et al 2005), along with their agroindustrial potential.

The different ethnobotanical studies carried out related to edible wild plants in Spain, Europe and other countries allows us to have better knowledge and understanding of the importance, both social and nutritional, of wild vegetables traditionally consumed in Spain. These studies could suppose a projection on the rural productive system on mid-term basis, opening new areas of development of the natural resources in the area (Tardío et al, 2002).

At present, there is more and more interest in wild plants in Europe for their potential benefits for human health, as can be shown by different studies carried out with the European Commission support (Tumino et al., 2002; Heinrich et al., 2006).

In recent years various authors have carried out different chemical and biochemical studies with the aim of evaluating the nutritional potential of these wild species that traditionally formed part of the daily diets of our ancestors and that are still present in our diets today.

In this sense, different authors have evaluated the nutritional composition of wild edible vegetables such as *Allium schoenoprasum*, *Apium graveolens*, *Asparagus acutifolius*, *Beta maritima*, *Borrago officinalis*, *Bryonia dioica*, *Bryonia cretica*, *Carduus pycnocephalus*, *Cichorium intybus*, *Diploaxis eruroides*, *Echium vulgare*, *Foeniculum vulgare*, *Glechoma hederacea*, *Lepidium sativum*, *Origanum vulgare*, *Papaver rhoeas*, *Petromarula pinnata*, *Ranunculus ficaria*, *Rumex sp.*, *Rumex obtusifolius*, *Scolymus hispanicus*, *Silene vulgaris*,

Sinapis incana, *Sinapis nigra*, *Sonchus oleraceus*, *Tamus communis*, *Taraxacum* spp., *Thymus mastichina* y *Urtica dioica* (Alarcon, 2006; Barros et al., 2009; Barros et al., 2010a; Conforti et al., 2008; Conforti et al., 2009; Guil et al., 1996a,b; Guil et al., 2003; Hinneburg et al., 2006; Martins et al., 2011; Mata et al., 2007; Pieroni et al., 2002; Salvatore, 2005; The local Food-nutraceuticals consortium, 2005; Trichopoulou, 2000; Vasilopouliu, 2011; Vardavas et al, 2006a, b; Zeghichi et al., 2003).

Some of the species have demonstrated being a the potential source of essential fatty acids such as linolenic acid of wild species from Spain, Portugal and Greece. Others have concentrated on wild greens as sources of bioactive compounds with or without vitamin activity, such as ascorbic acid, organic acid, tocopherols, carotenoids, vitamin K, sterols, phenolics y flavonoids, along with their antioxidant capacity via different methods *in vitro*. On the other hand, Trichopoulou (2000) y Zeghichi et al. (2003) described the mineral contents of different edible wild plants from Crete.

There are some studies relating the nutritional composition of local dishes elaborated with wild plants, as is the case of different vegetable pies made in Crete (Greece) using *Allium schoenoprasum*, *Ammi majus*, *Daucus carota*, *Foeniculum vulgare*, *Papaver rhoeas*, *Petromarula pinnata*, *Rumex sp.*, *Sonchus oleraceus*, *Tordylium apulum*, along with other cultivated vegetables (Trichopoulou, 2000; Vasilopouliu, 2011). These type of studies provide a more complete vision of the contribution that these wild vegetables can make as part of our diet.

Nonetheless, different authors have recognized an important lack of scientific knowledge on the nutritional potential of many edible wild species (Barros et al., 2009; Conforti, 2005; Tripoulou, 2000; Casilopouliu, 2011; Vardavas et al., 2006a,b, among others). The scientific data on the chemical composition of many edible wild vegetables are relatively scarce as they only show partial results and in many cases the number of samples used is limited. We also lack information on the nutritional characteristics of many of the species

traditionally consumed in Spain, due to the great variety in their habitat, being in many cases local varieties and specific to determined regions, which can differ to those gathered and consumed in other countries.

This is the case for species such as: *Anchusa azurea*, *Apium nodiflorum*, *Chondrilla juncea*, *Humulus lupulus*, *Montia fontana*, *Rumex papillaris*, *Rumex pulcher* y *Silybum marianum*, of which at present there are no studies carried out on their nutritional composition or chemical characteristics, even though there is an important consumption of these plants in our countries, as can be seen in the citations reported in several ethnobotanical studies (Tardío et al., 2002; Tardío et al., 2006; Pardo de Santayana et al., 2007).

For all the above said reasons we believe that is necessary to study in depth the potential of these products in our diet contributing to a sustainable development of our rural regions in Spain and the conservation of the traditional gastronomy.

12. OBJECTIVES

Previous studies carried out on the nutrient composition of wild edible vegetables are scarce. However, these wild vegetables can have great nutritional value and provide bioactive compounds to our diet, also being a way of diversifying food intake and maintaining the cultural gastronomical identity in each region.

The present study has been funded by the Ministry of Education & Science (Plan Nacional I + D + I. CGL2006- 09546/BOS), under the title of “Productive and nutritional assessment of wild edible plants and their traditional use in Spain”, coordinated by Dr. Javier Tardío Pato, Researcher of Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA).

In the framework of the project objectives, the **main objective** of this investigation is the characterization of the contents of bioactive compounds and their potential biological activity, (antioxidant capacity). of wild vegetables traditionally consumed in Spain, with the aim of recuperating their traditional use or assessing the possibility of being sources of functional ingredients for food uses.

Bearing this in mind, the following specific objectives were assessed:

1. Optimization of the analytical methods for chemical characterization of vegetables, specially for folic acid and folates (pteroil-polyglutamates) analysis in plants.
2. Characterization of the contents of hydrophilic bioactive compounds in wild plants subject to this study: vitamin C, vitamin B₉ (folic acid and folates), organic acids, phenolics and total flavonoids.

3. Characterization of the contents of lipophilic bioactive compounds in wild plants subject to this study: fatty acids (essential and non-essential) and vitamin E (tocopherols).
4. Assessment of the antioxidant capacity of the wild plants under study, via different *in vitro* assays.
5. Assessment of the influence of boiling on in the contents of some bioactive compounds such as vitamin C (AA y ADHA), organic acids and vitamin B₉ (folic acid and folates) in the studied wild edible plants.

13. WORK PLAN

1) Selection of samples:

To fulfill the proposed objectives, firstly the wild edible species subject to study were selected, considering their food uses, availability and adaptation to the proposed objectives according to the criteria previously studied by the experts ethnobotanists (from Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Real Jardín Botánico de Madrid, Universidad Autónoma de Madrid).

As shown in figure 11.1, a total of 20 wild edible vegetable species have been selected.

Table 11.1.- Wild edible plants selected for the study (Tardío et al., 2002).

Species	Family	Spanish common name	Edible part	Way of consumption
<i>Apium nodiflorum</i> (L.) Lag.	Umbelliferae	Berraza	Tender shoots With leaves	Raw
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Umbelliferae	Hinojo	Tender shoots with leaves	Raw and cooked
<i>Montia fontana</i> L.	Portulacaceae	Corujas	Tender shoots with leaves	Raw
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke.	Caryophyllaceae	Collejas	Tender shoots with leaves	Raw and cooked
<i>Anchusa azurea</i> Mill.	Boraginaceae	Lenguaza	Basal leaves	Raw
<i>Beta maritima</i> L.	Chenopodiaceae	Acelga silvete	Basal Leaves	Cooked
<i>Chondrilla juncea</i> L.	Asteraceae	Ajonjera	Basal leaves	Raw
<i>Cichorium intybus</i> L.	Asteraceae	Achicoria	Basal leaves	Raw and cooked
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Papaveraceae	Amapola	Basal leaves	Raw
<i>Rumex papillaris</i> Boiss. & Reut.	Polygonaceae	Acedera	Basal leaves	Raw
<i>Rumex pulcher</i> L.	Polygonaceae	Romaza	Basal leaves	Cooked
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Asteraceae	Lecheras	Basal leaves	Raw and cooked
<i>Taraxacum obovatum</i> (Willd) D.C.	Asteraceae	Diente de león	Basal leaves	Raw
<i>Scolymus hispanicus</i> L	Asteraceae	Cardillo	Peeled basal leaves	Raw and cooked
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.	Asteraceae	Cardo o cardinha	Peeled basal leaves and tender shoots	Raw and cooked
<i>Asparagus acutifolius</i> L.	Lilaeaceae	Espárrago triguero	Tender shoots	Cooked
<i>Humulus lupulus</i> L.	Cannabaceae	Espárrago de zarza	Tender shoots with small leaves	Cooked
<i>Tamus communis</i> L.	Dioscoreaceae	Lupios	Tender shoots with small leaves	Cooked
<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	Cucurbitaceae	Espárrago de nuez	Tender shoots with small leaves	Cooked
<i>Allium ampeloprasum</i> L.	Lilaeaceae	Ajo porro	Bulb & apical part of leaves	Cooked

2) Selection of parametres and analytical determinations to be carried out:

- Physico-chemical parametres: moisture, pH and titratable acidity.
- Hidrophilic bioactive compounds: ascorbic and dehydroascrbic acids (vitamin C), organic acids, folic acid and folates (vitamin B₉), phenolics and total flavonoids.
- Lipophilic bioactive compounds: fatty acids, tocopherols (vitamin E).
- *In vitro* antioxidant activity

3) Application of methods to the selected plant samples

4) Assessment of the influence of thermal treatment in the contents of some bioactive compounds

Vitamin C, organic acids and vitamin B₉ (folic acid) contents, in six of the species studied, selected for their high contents of some of these compounds and for being normally consumed after cooking treatment.

- *Asparagus acutifolius* L.
- *Bryonia dioica* Jacq.
- *Humulus lupulus* L.
- *Silene vulgaris* (Moench) Garcke
- *Rumex pulcher* L.
- *Tamus communis* L.

Some of these determinations were carried out during a predoctoral stay at Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, Dpt. Biologia y Biotecnologia (DBB), Centro de Investigaçao de Montanha (CIMO), Escola Superior Agraria de Bragança, from June 22nd to September 30th, under the direction of Dra. Ana M Carvalho, teacher and coordinator of DBB.

14. CONCLUSIONS

A. CHARACTERIZATION OF SPECIES

1.- From the edible parts of the plants that have been considered in this study, we can highlight the following specific characteristics:

- The leaves of *Rumex pulcher* and especially *R. papillaris* stand out for their acidity and high contents of Vitamin C (ascorbic acid), vitamin B₉ (folic acid and folates), phenolics, vitamin E (tocopherols), and polyunsaturated fatty acids.
- The tender shoots with leaves of *Tamus communis* stand out for being the richest in ascorbic acid and total vitamin C (59 mg/100 g).
- *Anchusa azurea* leaves) is the vegetable species with major vitamin B₉ content (folic acid and folates, 917µg/100g), also showing high levels of phenolics and a higher antioxidant capacity, by the different methods applied.
- The chicory leaves (*Cichorium intybus*) and the wild chard (*Beta maritima*) stood out for being the species with the highest content of phenolics, and also high antioxidant activity.
 - The tender fennel shoots and leaves (*Foeniculum vulgare*) contain interesting levels of vitamin C (36 mg/100 g) and folates (vitamin B₉, 470ug/100g).
 - The campion (*Silene vulgaris*), of which the tender shoots and leaves are eaten, shows high levels of tocopherols and vitamin B₉ (folic acid and folates), along with average levels of vitamin C (23 mg/100 g).
 - The tender shoots and leaves of *Montia fontana* is characterized for its high content of phenolics and vitamin C.
 - The dandelion leaves (*Taraxacum obovatum*) contain high levels of folates and the lowest values of oxalic acid (20 mg/100 g).

- *Humulus lupulus* shoots showed high levels of tocopherols, and polyunsaturated fatty acids, as well as high levels of vitamin C (42 mg/100 g) and also low levels of oxalic acid (90 mg/100 g).

2.- In the composition of the studied species, we have observed significant correlations between some of the parameters studied:

- Ascorbic acid contributes primarily to the total vitamin C content in this type of biological tissues, also correlating with the citric acid content, and negatively with oxalic acid (being used in its bio-synthesis) and with tocopherols (being consumed is its regeneration).
- Phenolics and flavonoids contribute significantly to the antioxidant capacity of the plants (measured by the DPPH methodology).
- DPPH assay for the evaluation of the antioxidant capacity is strongly and positively correlated with reducing power assay and bleaching inhibition of β -carotene assay. We can therefore state that in order to measure the total antioxidant capacity of this type of matrix, the reducing power, and specifically DPPH, should be selected, by correlating between themselves and with the presence of the bioactive compounds with antioxidant activity in the samples. The bleaching inhibition of β -carotene would be selected to determine the lipid peroxidation.

B. EFFECT OF SEASON AND LOCATION

3.- Moisture presented variation of up to 12 to 20% in all of the studied species, with the exception of *Silene vulgaris* and *Silybum marianum*, whose water contents were relatively constant.

4.- **pH** is shown as a relatively stable parameter for a given specie between seasons and locations, the only clear differences observed ($p < 0,05$) were for the case of tender shoots of *Apium nodiflorum* and *Silene vulgaris*. Titratable acidity was a parameter highly

influenced by the season of gathering, similarly to the contents of organic acids (oxalic, malic and citric), very much dependant on the metabolic processes of the plants.

5.- **Vitamin C** is highly influenced by environmental variations (coefficient of variation up to 59,5 %). The AA and ADHA profiles are normally constant in most of the species: in *Tamus communis*, *Silene vulgaris*, *Montia fontana*, *Asparagus acutifolius* and *Allium ampeloprasum* the major isoform is AA, whilst in the case of the species belonging to the Asteraceae family and *Foeniculum vulgare*, it is ADHA. *Beta maritima*, *Bryonia dioica* and *Silene vulgaris*, in most cases, maintain relatively constant total Vitamin C levels, even though the contents of the individual forms (AA y ADHA) are often irregular.

C. – THERMAL TREATMENT INFLUENCE IN *Rumex pulcher* L., *Silene vulgaris* (Moench) Garcke., *Asparagus acutifolius* L., *Bryonia dioica* Jacq., *Humulus lupulus* L. and *Tamus communis* L.

6.- The content in the antinutrient oxalic acid (**AO**) was significantly reduced ($p < 0,05$) after cooking. The species that showed less AO in the raw material, were those that retained most after cooking. However the species with the highest contents were those that showed bigger losses. For that reason, prior thermal treatment in high oxalic acid species is advisable to reduce the presence of oxalic acid in the diet.

7.- **Vitamin C contents in cooked wild vegetables were considerably reduced** ($p < 0,05$) with respect to the original content. *Asparagus acutifolius* and *Tamus communis* showed the highest retention percents (61,9 y 86,7%, respectively) maintaining 40mg/100g of vitamin C after being cooked. The **AA** stability after the process was in general higher than that of **ADHA**.

8.- **Vitamin B₉** (folic acid and folates) underwent a significant reduction ($p < 0,05$) in the contents of the cooked samples. The leaves of *Rumex pulcher* and *Asparagus acutifolius* were those that showed higher retention percents of folic acid (69,78% and 47,68 %, respectively), the latter maintaining high levels of folic acid in the cooked shoots (more than 280 µg/100 g).

FINAL CONCLUSION

From the species that can be eaten raw, 100 g of *Foeniculum vulgare* can provide 50 % of vitamin C daily requirements for adults, and more than 100 % of folates daily requirements; *Silene vulgaris* also provides a high amount of folic acid (100 g can fulfill double of the daily amount required). Regarding lipophilic compound, *Rumex papillaris* is a good source of polyunsaturated fatty acids and tocopherols, while for α -tocopherol, *Silene vulgaris* is considered as a good source.

In the case of the species that should be cooked before consumption, *Tamus communis* and *Asparagus acutifolius* are still good sources of vitamin C after cooking (retaining in 100 g an amount equivalent to 50 % of recommended dietary intake), and in the case of cooked *Asparagus acutifolius*, also 50 % of folates recommended dietary intake is covered). In the light of the results obtained, edible wild plants, although subjected to natural variability, are very interesting resources to be preserved, either as wild plants, in situ cultivation, or ex situ in germoplasm banks, with the aim of preserving and revalorize their food use as part of our gastronomic traditions and sources of nutrients and bioactive compounds to improve the nutritional quality of the diet.

G. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, R., Ortiz, L.T., y García, P. 2006. Nutrient and Fatty Acid Composition of Wild Edible Bladder Campion Populations (*Silene vulgaris* [Moench.] Garcke). *International Journal of Food Sciences and Technology*, 41, 1239–1242.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. 1993. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 7915–7922.
- Ames, B.N. 2001. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research*, 475, 7–20.
- Ansari, N.M., Houlihan, L., Hussain, B., Pieroni, A. 2005. Antioxidant activity of five vegetables traditionally consumed by South-Asian Migrants in Bradford, Yorkshire, UK. *Phytother Res*, 19, 907–911.
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. Association Analytical Chemistry, Arlington
- Arcot, J., Shrestha, A. 2005. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 253–266.
- Arella, F., Deborde, J.LI, Bourguignon, J.B y Hasselmann, C. 1997. Application de la chromatographie en phase liquide haute performance à la détermination de l'acide l-ascorbique et de la vitamine C totale dans les aliments. Étude interlaboratoire. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 90, 217–233.
- Azzi, A. 2004. The role of α -tocopherol in preventing disease. *Eur J Nutr*, 43 (1), 18–25.
- Barceló-Coblijn, G., Murphy, E.J. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in Lipid Research*, 48, 355–374.
- Barceló Coll, J., Nicolas Rodrigo, G., Sabater García, B., Sánchez Tamés, R. 1995. *Fisiología vegetal*. Ed. Pirámide. Madrid.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Casal, S., Oliveira, B., Ferreira, I. C.F.R. 2007. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry* 105, 140–145

- Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. 2008. Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chem.*, 110, 1046–1050
- Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. 2009. Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2458–2464.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. 2010a. The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): shoots, leaves, stems and inflorescences. *LWT - Food Science and Technology*, 43(5), 814-818.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. 2010b. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics *LWT - Food Science and Technology*, 43, 544–550.
- Bhandari, M.R., Kawabata, J. 2006. Cooking effects on oxalate, phytate, trypsin and α -amylase inhibitors of wild yam tubers of Nepal. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 524–530.
- Baziramakenga, R., Simard, R., Leroux, D. 1994. Determination of organic acids in soil extracts by ion chromatography. *Soil Bid. Biochem.*, 27 (3), 349-356.
- Bendich, A., Machlin, L.J., Scandurra, O. 1986. The Antioxidant Role of Vitamin C. *Adv. in Free Radical Biology & Medicine*, 2, 419-444.
- Benítez, G., Gonzalez-Tejero, M.R., Molero-Mesa, J. 2010. Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology*, 129 (1), 87-105.
- Berman, K., Brodaty, H. 2004. Tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *CNS Drugs*, 18, 807–25.
- Bergström, L. 1994. Nutrient losses and gains in the preparation of food. NLG Report, 32 National Food Administration, Sweden.

- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Demirata, B., Apak, R. 2010. Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method Food Anal. Methods. 3,154-168
- Berry Ottaway, P. 1993. Stability of vitamins in food. The technology of vitamins in food, 90-113. Blackie Academic & Professional. Ed. P. Berry Ottaway and Associates Ltd. Hereford.
- Biglino, G., Nano, G.M. 1965. Partial synthesis of bryogenine. XII. Constituents of Bryonia dioica root. Farmaco 20(8), 566-9.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. 1992. Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. Nutr. Cancer, 18, 1–29.
- Brand-Williams W, Cuvelier M E, Berset C. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 28 (1995) 25-30
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. 56, 317–333.
- Brigelius-Flohe, R., Traber, M.G. 1999. Vitamin E: Function and metabolism. FASEB J, 13, 1145–1155.
- Bruckert, S. 1970. Influence de composés organique solubles su le pédogénèse en milieu acide: I. Etudes des terrain. Annales Agronomiques, 21, 421-452.
- Burton, G.W, Traber, M.G. 1990. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. Annual Review of Nutrition, 357-382.
- Caliskan, M. 2000. The Metabolism of Oxalic Acid. Turk J Zool, 24, 103–106.
- Cámara, M., Sánchez-Mata, M.C., Isasa, M.E. 2003. Frutas y verduras, fuente de salud. Servicio de promoción de la salud, Instituto de Salud Pública. Consejería de Sanidad y Consumo.
- Caretto S., Nisi, R., Paradiso, A., De Gara, L. 2010. Tocopherol production in plant cell cultures. Mol. Nutr. Food Res., 54, 726-730.

- Carvalho, A. M., Morales, R. 2010. Persistence of Wild Food and Wild Medicinal Plant Knowledge in a North-Eastern Region of Portugal. In M. Pardo de Santayana, A. Pieroni, & R. Puri (eds.), *Ethnobotany in the New Europe: People, Health and Wild Plant Resources*. Oxford, UK: Berghahn Books.
- Casañas Artigas, F. 2010. Origen y evolución de las plantas cultivadas hasta la “Revolución Verde”. *La agrobiodiversidad. Historia Natural y Económica*. Fundació Miguel Agustí. Barcelona
- Chai, W., Liebman, M. 2005. Effect of different cooking methods on vegetable oxalate content. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3027–30.
- Chen, T.S., Song, Y.O., Kirsch, A.J., 1983. Effects of blanching, freezing and storage on folacin contents of spinach. *Nutrition Reports International*, **28**, 317–321.
- Chew, B. P. 1995. Antioxidant Vitamins Affect Food Animal Immunity and Health. *J. of Nutrit.* **125** (6S)1804-1808.
- Chou, C.C.,Patrick, Z. A. 1976. Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. *Journal of Chemical Ecology*, **2**, 369-387.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F., Della Loggia, R. 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**, 144–151.
- Conforti, F., Sosa, S., Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Uzunov, D., Tubaro, A., Menichini, F. 2009. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chemistry*, **112**, 587–594.
- Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis. *Cancer Res.*, **52**, 6735-40.
- Cornara, L. , La Rocca, A., Marsili, S., Mariotti, M.G. 2009. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, **125**, 16–30.
- Couplan, F. 1990. Les belles veneneuses. *Encyclopedie des plantes comestibles de l'Europe*, **3**. Equilibres Aujourd'hui, Flers.

- Cubero, J.I., Nadal, S., Moreno, M.T. 2006. Recursos fitogenéticos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Cuskelly, G., McNulty, H., Scott, J. 1996. Effect of increasing dietary folate on redcell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet*, 347, 657–659.
- Davis, R.E., Nicol, D.J. 1988. Folic acid. *Int. J. Biochem.*, 20, 133-139.
- Di Matteo, V., Esposito, E. 2003. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2, 95–107.
- Díaz, M.N, Frei, B., Vita, J.A, Keaney, J.F. 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.*, 337, 408-16.
- De Leenheer, A. 2000. Modern Chromatographic Analysis of Vitamin (Revised and Expanded). 3ª Edición, 290-294. EUA: Marcel Dekker Incorporated
- Ducros, V., Demuth, K., Sauvant, M.P., Quillard, M., Caussé, E., Candito, M., Read, M.H., Draï, J., Garcia, I., Gerhardt, M.F. 2002. Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. *Journal of Chromatography B*, 781, 207-26.
- Duthie, G.G. 1993. Lipid peroxidation. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 47: 759-764.
- El Beyrouthy, M., Arnold, N., Delelis-Dusollier, A., Dupont, F., 2008. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 315–334.
- Doherty, R. F. & Beecher, G. R. 2003. A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 354-361.
- Eitenmiller, R.R., Laden, W.O., 1999. Vitamin A and b-carotene. Ascorbic acid. Thiamin. Vitamin B-6. Folate. In: Eitenmiller, R.R., Laden, W.O. (Eds.), *Vitamin Analysis for the Health and Food Science*. CRC Press, Boca Raton, FL (pp. 15–19, 226–228, 275, 375, 411–465).
- Ertug, F. 2004. Wild edible plants of the Bodrum Area (Mugla, Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 28, 161–174.
- Escudero, N.L., De Arellano, M.L., Fernández, S., Albarracín, G., Mucciarelli, S. 2003. *Taraxacum officinale* as a food source. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 1–10.

- Esquinas-Alcázar, J.T. 2010. Los recursos fitogenéticos como piezas de la mejora genética: situación actual y retos. La agrobiodiversidad. Historia Natural y Económica. Fundació Miguel Agustí. Barcelona
- Esteve, M.J., Farré, R., Frigola, A. y García-Cantabella, J.M. 1997. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. *J. Chromat. B*, 688, 345-349.
- Everitt, B. 1980. *Cluster Analysis*. Halsted Press: New York, 136.
- FAO, 1996. Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. FAO, Roma.
- FAO, 1998. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. FAO, Roma.
- FAO/WHO Expert Consultation. Human vitamin and mineral requirements. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: FAO, 2001.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R. M.V. 2009. Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Florez, J. (2003). *Farmacología Humana*. Ed. Masson. Barcelona (España).
- Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Real Jardín Botánico. Consejo superior de investigaciones científicas. <http://www.floraiberica.org/>
- Fontana E, Hoeberechts J, Nicola S, Cros V, Palmegiano GB, Peiretti PG (2006) Nitrogen concentration and nitrate/ammonium ratio affect yield and change the oxalic acid concentration and fatty acid profile of purslane (*Portulaca oleracea* L.) grown in a soilless culture system. *J Sci Food Agric* 86(14):2417-2424
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. 2000. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington D.C.: National Academy Press.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. 2002. Dietary reference intakes for vitamin a, vitamin k, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese,

- molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press.
- Fox, T. R., Comerford, N. B. 1990. Low-molecularweight organic acids in selected forest soils of Southeastern USA. *Soil Science Society of America Journal*, 54, 1139-1144.
- Franceschi, V.R., Horner, Jr. H.T. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Bot. Rev.* 46, 361-427.
- French, M.A., Sundram, K., Clandinin, M.T., 2002. Cholesterolaeamic effect of palmitic acid in relation to other dietary fatty acids. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 11, 401-407.
- Frick, B., Schröcksnadel, K., Nerauter, G., Wirleitner, B., Artner-Dworzak, E., Fuchs, D. 2003. Rapid measurement of total plasma homocysteine by HPLC. *Clinica Chimica Acta*, 331, 19-23.
- Fridovich, I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Anu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23, 239-257.
- Garad, I.D. 1970. *Introductory food chemistry*. Avi Publishing Company, inc. Connecticut.
- Gerber, M. 2001. Protective vegetal micronutrients and microcomponents for breast cancer. *Bull cancer*, 88(10), 943-53.
- Gerber, M., Boutron-Ruault, M.C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., Siess, M.H. 2002. Food and Cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bull Cancer*, 89, 293–312.
- Gregory, I. J. F. 1997. Bioavailability of folate. *European Journal of Clinical Nutrition* 51, 554-559.
- González, J.A., García-Barriuso, M., Amich, F. 2010. Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *J. Ethnopharmacol.* 131, 343-355.
- González-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sánchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutiérrez, J.M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M.E., Censorii, E., de Pasquale, C., Della, A., Paraskeva-Hadjichambi, D., Hadjichambis, A., Houmanie, Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchig, M., ElJohrig, S. 2008. Medicinal plants in the

- Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 341–357.
- Guarrera, P.M., Forti, G., Marignoli, S. 2005. Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 429–444.
- Guil, J.L., Torija, M.E., Giménez, J.J., Rodríguez, I. 1996. Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography. *Journal of Chromatography, A* 719, 229–235.
- Guil, J.L., Torija, M.E., Giménez, J.J., Rodríguez-García, I., Giménez, A. 1996. Oxalic acid and calcium determination in wild edible plants. *J Agric Food Chem*, 44, 1821–1823.
- Guil, J.L., Rodríguez, I., Torija, M.E. 1997. Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51, 99–107.
- Guil-Guerrero, J.L., Rodríguez-García, I. 1999. Lipids Classes, Fatty Acids and Carotenes of the Leaves of Six Edible Wild Plants. *European Food Research and Technology*, 209(5), 313–316.
- Guil, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M., Torija, M.E. 2003. Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 111–119.
- Hadad, C.G.R., Moradi, Z., 2005. The amounts and distribution of diosgenin and saponin and their carbohydrate moiety of *Tamus communis* L. *J. Agric. Sci. Nat. Resour.* 12(2), 55-66.
- Hallberg, D., Brune, M. & Rossander-Hulthen, L. 1987. Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption. *Ann. NY Acad. Sci.*, 498: 324-332
- Halliwell, B., 1996a. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 16, 33–50.
- Halliwell, B. 1996b. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Rad. Res.*, 25, 439–454.
- Halliwell, B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.* 31: 261–272.
- Halliwell, B. 2001. Vitamin C and genomic stability. *Mutation Research*, 475, 29–35.

- Halsted, C.H. 1980. Intestinal absorption and malabsorption of folates. *Annu. Rev. Med.*, 31,79-87.
- Harlan, J.R. 1992. *Crops and men* (Second edition). American Society of Agronomy. The Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- Heinrich, M., Muller, W.E., Galli, C. 2006a. *Local Mediterranean Food Plants and Nutraceuticals*. Karger, Basel (Switzerland).
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M. 2006b. Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 157–160.
- Heinrich, M., Nebel, S., Leonti, M., Rivera, D., Obón, C. 2006c. Local Food-Nutraceuticals: bridging the gap between local knowledge and global needs. *Forum Nutr.*, 59, 1-17.
- Herbert, V., Larrabee, A., Buchanan, J. 1962. Studies on the identification of a folate compound of human serum. *J. Clin. Invest.*, 41, 1134–8.
- Hinneburg, I., Dorman, H.J.D., Hiltunen, R. 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97, 122–129.
- Holte Stea, T., Johansson, M., Jagerstad, M., Frølich, W. 2006. Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems *Food Chemistry* 101,1095–1107
- Horsley, S. B. 1977. Allelopathic interference among plants. II. Physiological modes of action. In *Proceeding of Fourth North America Forest Biology Workshop* (H. E. Wilcox and A. F. Hamer, Eds), 93-136. College of Environmental Science and Forestry, SUNY. Syracuse. NY.
- Horvath, G., Wessjohann, L., Bigirimana, J., Jansen, M., Guisez, Y., Caubergs, R., Horemans, N. 2006. Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry*, 67, 1185–1195.
- Howard, L.A., Wong, A.D., Perry, A.K., Klein, B.P. 1999. b-Carotene and ascorbic acid retention in fresh and processed vegetables. *Journal of Food Science*, 64 (5), 929–936.

- Hu, C., Kitts, D.D., 2001. Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. *Mol. Cell Biochem.*, 218, 147–155.
- Hylands, P., Kosugi, J. 1982. Bryonoside and bryoside—new triterpene glycosides from *Bryonia dioica*. *Phytochem.*, 21(6), 1379-1384.
- Iwatani, K., Arcot, J., Shrestha, A.K. 2003. Determination of folate contents in some Australian vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 37–48
- Jacob, R. 1988. *Modern nutrition in health and disease*. 7^a edición, 432-448. EUA: Lea & Febiger.
- Jastrebova, J., Witthoft, C., Grahn, A., Svensson, U., Jagerstad, M. 2003 . HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chemistry*, 80, 579–588.
- Johansson, M., Furuhaugen, C., Frølich, W., Jagerstad, M. 2008. Folate content in frozen vegetarian ready meals and folate retention after different reheating methods. *LWT*, 41, 528–536
- Joubert, F., Hammoud, C., Chevallier, B. 2002. Carences vitaminiques (hormis la carence en vitamine D). *Encycl. Méd. Chir. Pédiatrie*. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31, 671–701.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. 1993. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.*, April, 85-88.
- Kmiecik, W., Lisiewska, Z. 1999. Effect of pretreatment and conditions and period of storage on some quality indices of frozen chive (*Allium schoenoprasum* L.). *Food Chemistry*, 67, 61–66.
- Koudela, M., Petříková, K. 2008. Nutritional compositions and yield of sweet fennel cultivars *Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell. *Hortscience (Prague)*, 35(1),1–6.

- Kris-Etherton P.M. (1999). Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 100: 1253-1258.
- Kuiters, A. T., Sarink, H. M. 1986. Leaching of phenolic compounds from leaf and needle litter of several deciduous and coniferous trees. *Soil Biology & Biochemistry*, 18, 475-480.
- Ladizinsky, G., 1998. Plant evolution under domestication. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244–282.
- Lai, L. S., Chou, S. T., Chao, W. W. 2001. Studies on the antioxidative activities of hsiantso (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 963–968.
- Laing, B.M., Schlueter, D.L., Labuzza, T.P. 1978. Degradation kinetics of ascorbic acid at high temperature and water activity. *Journal of Food Science*, 43, 1440–1443.
- Lampe, J., 1999. Health effects of vegetables and fruit: accessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 475–490.
- Lea, P.J., Leegood, R.C. 1997. Plant biochemistry and molecular biology. Wiley & Sons Ltd. Chichester, England.
- Leboy, P.S., Vaías, L., Ushman, B., Golub, E., Adams, S.I., Pacifici, M. 1989. Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, 264, 17281-6.
- Lehninger Principles of Biochemistry. 2011. Fifth Edition David L. Nelson (U. of Wisconsin–Madison) Michael M. Cox (U. of Wisconsin–Madison).
- Lesková, E., Kubíková, J., Kováčikova, E., Kosická, M., Porubská, J., Holcikova, K. 2006. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 252–276.
- Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch R.W., Washko, P.W., Dhariwal K.R., Park, J.B., Lazarev, A., Graumlich, J.K. 1996. Vitamin C pharmacokinetics in healthy

- volunteers: evidence for a Recommended Dietary Allowance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 3704-3709.
- Lin, J.T., Liu, S.C., Chen, S.L., Chen, H.Y., Yang, D.J. 2006. Effects of domestic processing on steroidal saponins in taiwanese yam cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *J. Agr. Food Chem.* 54 (26), 9948–995.
- Lin, B.F., Lin, R.F. 1999. Effect of Chinese stir-fry cooking on folate contents of vegetables. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 37 (4), 443–454.
- Loewus, F.A. 1999. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*, 52, 193-210.
- López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramírez-Rodríguez, V., Herrera-Estrella, L. 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160, 1–13.
- Luckock, M. 2000. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab.*, 71, 121-138.
- Lunn, J., Theobald, H. E. 2006. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *British Nutrition Foundation. Nutrition Bulletin*, 31, 178–224.
- Maccarone, M., D'andrea, G., Salucci, M. L., Avigliano, L., & Finazzi-Agro, A. 1993. Temperature, pH and UV irradiation effects on ascorbate oxidase. *Phytochemistry*, 32(4), 795–798.
- Massey LK (2007) Food oxalate: factors affecting measurement, biological variation, and bioavailability. *J Am Diet Assoc* 107(7):1191-1194
- McGee, D.L., Ree, D.M., Yano, K. 1984. Ten-year incidence of coronary heart disease in the Honolulu Heart Program. Relationship to nutrient intake. *Am. J. Epidemiol.*, 119, 667– 76.
- McKillop, D.J., Pentieva, K., Daly, D., McPartlin, J.M., Hughes, J., Strain, J.J., Scott, J.M., McNulty, H. 2002. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *British Journal of Nutrition* 88, 681–688.

- Malin, J.D., 1977. Total folate activity in Brussels sprouts: the effects of storage, processing, cooking and ascorbic acid content. *Journal of Food Technology*, 12, 623.
- Marchioli, R. 1999. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: laboratory, epidemiological and clinical trial data. *Pharmacological research*, 40(3), 1999.
- Martinez, M. 2001. Restoring the DHA levels in the brain of Zellweger patients. *J. Mol. Neurosci.*, 16 (2-3), 309-321.
- Martins, D., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. 2011. Nutritional and in vitro antioxidant properties of edible wild greens in Iberian Peninsula traditional diet. *Food Chemistry*, 125 (2), 488-494
- Masrizal, M.A., Giraud, D.W., Driskell, J.A., 1997. Retention of vitamin C, iron and b-carotene in vegetables prepared using different cooking methods. *Journal of Food Quality* 20, 403–418
- Mata, A.T., Proença, C., Ferreira, A.R., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103, 778–786.
- Mataix, J., Gil, A. 2002. Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Edita Puleva food. Granada.
- Mataix, J., García Diz, L., Mañas Almendros, M., Martínez de Victoria, E., Llopis González, J. Tablas de composición de alimentos españoles. 2003. 4a ed. Granada: Universidad de Granada.
- Mebart, J. 2006. Manuel pratique de nutrition /l'alimentation preventive et curative. ISBN 2804148041.278p.
- Mitchell, H.K., Snell, E.E., Williams, R.J. 1941. The concentration of "folic acid" . *Journal of American chemical society*, 63, 2284.

- Morales, A.J. 2002 Biogeografía y aprovechamiento de la flora auctóctona valenciana. El caso de las plantas aromáticas, medicinales y condimentarías. Tesis Doctoral. Facultad de Geografía y Historia. Universidad de Valencia.
- Moncada, S., Higgs, E.A. 1993. Mechanisms of disease: the L-arginine- nitric oxide pathway. *N.Engl. J. Med.*, 329, 2002-2012.
- Montgomery, G.W., Zhao, Z.Z., Morley, K.I., Marsh, A.J., Boomsma, D.I., Martin, N.G., Duffy, D.L. 2003. Dizygotic twinning is not associated with methylenetetrahydrofolate reductase haplotypes. *Human reproduction*, 18 (11), 2460-2464.
- Morales, A.J. 2002 Biogeografía y aprovechamiento de la flora auctóctona valenciana. El caso de las plantas aromáticas, medicinales y condimentarías. Tesis Doctoral. Facultad de Geografía y Historia. Universidad de Valencia.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C. (2010) *Tablas de composición de Alimentos*. ed. Piramide (España).
- Motamed, S.M., Naghibi, F. 2010. Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chemistry*, 119, 1637–1642.
- Murphy, E.W., Criner, P.E., Gray, B.C. 1975. Comparison of methods for determining retentions of nutrients in cooked foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 23, 1153.
- Miyamoto, T., Murata, K., Kawamura, M. (1973). Folic acid contents of some fermented soybean products and vegetables. *Vitamins (Japan)*, 47, 233–237.
- Nagaoka, S., Kakiuchi, T., Ohara, K., Mukai, K. 2007. Kinetics of the reaction by which natural vitamin E is regenerated by vitamin C. *Chemistry and Physics of Lipids*, 146, 26–32.
- Nakata, P.A. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*, 164(6), 901-909.
- Napier, J.A., Sayanova, A. 2005. The production of very-long-chain PUFA biosynthesis in transgenic plants: towards a sustainable source of fish oils. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64, 387–93.

- NAS. National Academy of Sciences. 1972. Genetic vulnerability of major crops, 307. Washington, DC, EE.UU.
- Ndaw, S., Bergaentzlé, M., Aoudé-Werner, D., Lahély, S., Hasselmann, C. 2001. Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates. *Journal of Chromatography A*, 928(1), 77–90.
- Nijveldt, R., van Nood, E., van Hoorn, D. E.C, Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418–25.
- Nuez, F., Hernández Bermejo, E., 1992. Hortícolas marginadas. En: Hernández Bermejo, E. y J. León (1992) *Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492*. Colección FAO: Producción y protección vegetal, 26. Roma.
- Nuez, F. 2010. La agrobiodiversidad y el proceso sociocultural antes de la “Revolución Verde”. La agrobiodiversidad. Historia Natural y Económica. Fundació Miguel Agustí. Barcelona
- Nyyssonen, K., Salonen, J.T., Parviainen, M.T., 2000. Ascorbic acid. In: Leenheer, A.P.D., Lambert, E., Bocxlaer, J.F. (Eds.), *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*. Marcel Dekker, New York, USA, 271–300.
- Oddy, W.H., De Klerk, N.H., Kendall, G.E., Miharshahi, S., Peat, J.K. 2004. Ratio of omega-6 to omega-3 fatty acids and childhood asthma. *J. Asthma*, 41, 319–326.
- Oliveira, A. P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Silva, B. M. 2008. Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chemistry*, 111, 393–399.
- Olmedilla, B., Granado, F., Herrero, C. 2001. Dieta Mediterránea versus suplementación con micronutrientes: Pros y contras. *Revista Chilena de Nutrición*, 28 (2), 368-380.
- Olmedilla, B., Granado F. 2007. Componentes bioactivos. Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación. Instituto de Nutrición y Trastornos alimentarios. Dirección general de Salud Pública y alimentación.

- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease *Physiol. Rev.*, 87, 315-424.
- Padh, H. 1990. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol.*, 68, 1166-1173.
- Pardo de Santayana, M., Gómez Pellón, E. 2003. Etnobotánica: aprovechamiento tradicional de plantas y patrimonio cultural. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 60(1), 171-182.
- Palaniswamy UR, Bible BB, McAvoy RJ (2002) Effect of nitrate:ammonium nitrogen ratio on oxalate levels of purslane. In: Janick J, Whipkey A (ed.) Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria. pp 453-455
- Pardo de Santayana, M., San Miguel, E. 2006. The gender of plants according to popular nomenclature in the North of Spain. En Ertug, F. (ed.): Proceedings of the Fourth International Congress of Ethnobotany: 461-466. Yayinlari, Istambul.
- Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J., Blanco, E., Carvalho, A.M., Lastra, J.J., San Miguel, E. Morales, R. 2007. Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3, 27.
- Pauling, L. 1971. The significance of the evidence about ascorbic acid and the common cold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 2678-2681.
- Peña-Chocarro, L., Zapata, L., González Urquijo, J.E., Ibáñez Estévez, J.J. 2000. Agricultura, alimentación y uso del combustible: aplicación de modelos etnográficos en arqueobotánica. *Saguntum-Extra*, 3, 403-420.
- Petersen M.A., Berends, H. 1993 Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of blanched sweet green peppers during chilled storage in modified atmospheres. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 197, 546-549.
- Pfeiffer, C.M., Rogers, L.M., Gregory, J.F. 1997. Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 45, 407-413.

- Phillips, K. M., Wunderlich, K. M., Holden, J. M., Exler, J., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B. 2005. Stability of 5-methyltetrahydrofolate in frozen fresh fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 92, 587–595.
- Pieroni, A., Janiak, V., Dürr, C.M., Lüdeke, S., Trachsel, E., Heinrich, M. 2002a. In vitro Antioxidant Activity of Non-cultivated Vegetables of Ethnic Albanians in Southern Italy. *Phytotherapy Research*, 16, 467–473.
- Pieroni, A., Nebel, S., Quave, C., Münz, H., Heinrich, M. 2002b. Ethnopharmacology of Liakra: Traditional Weedy Vegetables of the Arbëreshë of the Vulture Area in Southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 165–185.
- Pieroni, A., Nebel, S., Santoro, R.F., Heinrich, M. 2005. Food for Two Seasons: Culinary Uses of Non-cultivated Local Vegetables and Mushrooms in a South Italian Village. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(4), 245–272.
- Pretel, M.T., Obón, C. 2009. Propiedades Beneficiosas de Plantas comestibles silvestres de la provincia de Alicante. *Salut, alimentació i cultura popular al País Valencià*, 239-252. Ed. CEIC Alfons el Vell. Gandía.
- Prior RL, Wu X, Schaich K “Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10 (2005) 4290-302
- Prohens, J., Sánchez, M.C., Rodríguez-Burruezo, A., Cámara, M., Torija, E., Nuez, F. 2005. Morphological and Physico-Chemical Characteristics of Fruits of Pepino (*Solanum muricatum*), Wild Relatives (*S. caripense* and *S. tabanoense*) and Interspecific Hybrids. Implications in Pepino Breeding. *Eur. J. Hortic. Sci.*, 7, 224-230.
- Quinlivan, E.P., Hanson, A.D., Gregory, J.F. 2006. The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Analytical Biochemistry*, 348, 163–184.
- Qiu, X. 2003. Biosynthesis of docosahexenoic acid (DHA, 22:6-3,7,10,13,16,19) two distinct pathway. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty acids*, 68 (2), 181-186.
- Refsum, H., Ueland, P.M., Bygard, M.D., Vollset, S.E. 1998. Homo-cysteine and Cardiovascular Disease. *Annu. Rev. Med.*, 49, 31-62.

- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Castro de Ron, C., López-Hernández, J., Lage-Yusty, M.A. 2004. Determination of folates in seaweeds by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1032, 135–139.
- Ros-Berruezo, G. 2011. Influence of food processing on vitamin content and availability, 25-34. “Hot topics” en vitaminas y salud. Instituto Tomas Pascual Sanz. Madrid
- Rumm-Kreuter, D., Demmel, I. 1990. Comparison of vitamin losses in vegetables due to various cooking methods. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 36 (4), 7–15.
- Russo, G.L. 2009. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical pharmacology*, 77, 937–946.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Jones, D., 2001. Function and mechanism of organic anion exudation in maize. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 527–560.
- Salvatore, S., Pellegrini, N., Brenna, O.V., Del Rio, D., Frasca, G., Brighenti, F., Tumino, R. 2005. Antioxidant Characterization of Some Sicilian Edible Wild Greens. *Journal Agriculture of Food Chemistry*, 53, 9465-9471.
- Sánchez-Mata, M.C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., Torija-Isasa, M.E. 2000. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur. Food Res. Technol.*, 210(3), 220-225.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. “A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (1998) 270-76
- Sanders, T., Emery P. 2003. *Molecular Basis of Human Nutrition*. Taylor & Francis: London.
- Seabra, R. M., Andrade, P. B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M. L. 2006. Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. In *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. New Hampshire: Science Publishers – Enfield (NH) Jersey Plymouth.

- Schaffer, S., Schmitt-Schillig, S., Müller, W.E., Eckert, G.P. 2005. Antioxidant Properties of Mediterranean Food Plants Extracts: Geographical Differences. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(1), 115– 124.
- Scherrer, A.M., Motti, R., Weckerle, C.S. 2005. Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 129–143.
- Schwenke, D. C. 2002. Does the lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer?. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 2–20.
- Scott, J.M., Weir, D.G. 1994. Folate/vitamin B12 interrelationships. *Essays in Biochemistry*, 28, 63–72.
- Scott, J.M., Weir, D.G., Molloy, A., MacPartlin, J., Daly, L., Kirke, P. 1994. Folic acid metabolism and mechanisms of neural tube defects. *CIBA Foundation Symposium*, 181, 180– 191.
- Scott, J.M. 1999. Folate and Vitamine B12. *Proceedings of the nutrition society*, 58, 441-448.
- Selhub, J., Jacques, P.F., Wilson, P.W.F., Rush, D., Rosenberg, I.H. 1993. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA*, 270 2693-2727.
- Sen, C.K., Khanna, S., Roy, S. 2006. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 78, 2088–2098.
- Shah, A.M., Channon, K.M. 2004. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart*, 90, 486-487.
- Shai, I., Stampfer, M.J., Mab, J., Manson, J.E., Hankinson, S.E., Cannuscio, C., Selhub, J., Curhan, G., Rimm, E.B. 2004. Homocysteine as a risk factor for coronary heart diseases and its association with inflammatory biomarkers, lipids and dietary factors. *Atherosclerosis*, 177, 375-81.
- Shojania, A.M., 1984. Folic acid and vitamin B12 deficiency in pregnancy and the neonatal period. *Clin. Perinatal*, 11, 433-459.

- Siegall, C.B., Gawlak, S.L., Chace, D., Wolff, E.A., Mixan, B., Marquardt, H. 1994. Characterization of Ribosome- Inactivating Proteins isolated from *Bryonia dioica* and their utility as carcinoma-reactive immunoconjugates. *Bioconjugate Chem.* 5 (5), 423–429.
- Simopoulos, A.P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, 56, 365–379.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. 2008. *Food Composition and Nutrition Tables*. Medpharm, Stuttgart. Germany.
- Squeira, J. O., Nair, N. G., Hammerschmidt, G. R., Satir G. R. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial interaction systems. *Critical Reviews in Plant Science*, 10, 63-121.
- Strain, J.J., Benzie, I.F.F. 1999. Diet and antioxidant defence. In: Sadler, M.J., Strain, J.J., Caballero, B. (Eds.), *Encyclopedia of Human Nutrition*. Academic Press, London, 95–106.
- Stegers-Theunissen, R. P. 1995. Folate metabolism and neural tube defects: a review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 61, 39-48.
- Sungpuag, P., Tangchitpianvit, S., Chittchang, U., Wasantwisut, U. 1999. Retinol and beta-carotene content of indigenous raw and home—prepared foods in Northeast Thailand. *Food Chemistry* 64, 163–167.
- Sydow, K., Boger, R.H. 2001. Homocysteine, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: pathomechanisms and therapeutic options. *Z. Kardiol.*, 90(1), 1-11.
- Tardío, J., Pascual, H., Morales, R. 2002. *Alimentos Silvestres de Madrid: Guía de Plantas y Setas de Uso Alimentario Tradicional en la Comunidad de Madrid*. Madrid: Ediciones La Librería.
- Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., Morales, R. 2006. Ethnobotanical Review of Wild Edible Plants in Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(1), 27–72.
- Tardío, J. 2010. Spring is coming: the gathering and consumption of wild vegetables in Spain. In: Pardo de Santayana M, Pieroni A, Puri R (ed.) *Ethnobotany in the New*

- Europe: people, health and wild plant resources. Berghahn Books, Oxford-New York. 211-238.
- Tebbe, B. 2001. Relevance of oral supplementation with antioxidants for prevention and treatment of skin disorders. *Skin. Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 14(85), 296-302.
- The local Food-nutraceuticals consortium, 2005. Understanding Local Mediterranean Diets: a Multidisciplinary Pharmacological and Ethnobotanical Approach. *Pharmacological Research*, 52, 353–366.
- Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Hollman, P., Chamalides, Ch., Foufa, E., Kaloudis, Tr., Kromhout, D., Miskaki, Ph., Petrochilou, I., Poulima, E., Stalakis, K., Theophilou, D. 2000a. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 70, 319-323.
- Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H. 2000b. Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 9, 869–73.
- Traber, M.G. 2007. Vitamin E Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Nutr.*, 27, 347-362.
- Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A.A., Poos, M. 2002. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *Journal of The American Dietetic Association*. November, 102 (11).
- Tucker, J.M., Townsend, D.M. 2005. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59, 380–387.
- Tumino, R., Frasca, G., Giurdanelli, M.C., Lauria, C., Krogh, V. 2002. Consumption of wild vegetables in the EPIC cohort of Ragusa (Sicily). In: Riboli E, Lambert R (ed.) *Nutrition and lifestyle: Opportunities for cancer prevention*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 115-116.
- Vahteristo, L., Ollilainen, V., Koivistoinen, P., Varo, P. 1996a. Improvements in the determination of reduced folate monoglutamates and folic acid in food using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 477-482.

- Vahteristo, L., Finglas, P. M., WitthBft, C., Wigertz, K., Scale, R., de Froidmont-Giirtz, I. 1996b. Third EUMAT intercomparison study on food folate analysis using HPLC procedures. *Food Chemistry*, 57, 109-111.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.
- Vanizor Kural, B. 2003. Plasma homocysteine and its relationships with atherotrombotic markers in psoriatic patients" *Clinica Chimica Acta*, 332,23-30.
- Vardavas, C.I., Majchrzak, D., Wagner, K.H., Elmadfa, I., Kafatos, A. 2006a. Lipid concentrations of wild edible greens in Crete. *Food Chemistry*, 99, 822–834.
- Vardavas, C.I., Majchrzak, D., Wagner, K.H., Elmadfa, I., Kafatos, A. 2006b. The antioxidant and phyloquinone content of wildy grown greens in Crete. *Food Chemistry*, 99, 813–821.
- Varela Moreiras, G., Alonso-Apperte, E. 1999. *Ácido Fólico y Salud*. Madrid: Fundación Española de la Nutrición.
- Varela Moreira, G. 2008. *Ácido fólico: vitamina versus marcador de riesgo en enfermedad*. 159-169. *Genética, Nutrición y Enfermedad*. Instituto Tomas Pascual Sanz y CSIC. Editado por EDIMSA Editores médicos S.A. Madrid
- Vasilopoulou, E., Trichopoulou, A. 2011. Green pies: The flavonoid rich Greek snack. *Food Chemistry* 126, 855–858.
- Vavilov, N.I. 1949/1950. *The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants*. The Chronica Botanica Co., Waltham, Mass, EEUU.
- Vázquez Odériz, M.L., Vázquez Blanco, M.E., López Hernández, J., Simal Lozano, J., Romero Rodríguez, M.A. 1994. Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by Liquid Chromatography. *J. AOAC Int.* 77, 1056-1059.
- Viegi, L., Pieroni, A., Guarrera, P.M., Vangelisti, R. 2003. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 221–244.
- Voet, D., Voet, J. G. 2004. *Biochemistry* (3rd ed.). Haboken, N.J: Wiley & Sons.

- Wallis, J.G., Watts, J.L., Browse, J. 2002. Polyunsaturated fatty acids synthesis: what will they think of next? *Trend Biochem. Sci.* 27(9), 467-473
- Wang, Ch., Riedl, K.M., Schwartz, S.J. 2010. A liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for quantitative determination of native 5-methyltetrahydrofolate and its polyglutamyl derivatives in raw vegetables. *Journal of Chromatography B*, 878, 2949–2958
- Ward, O.P., Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40, 3627–3652.
- Warthesen, J.J., Vickers, Z.M., Whitney-West, S., Wolf, D. 1984. Cookery methods for vegetables: influence of sensory quality, nutrient retentions, and energy consumption. *Home Economics Research Journal* 13, 61–79.
- Waterhouse, A. L. 2002. Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 21-36.
- Wills, R. B. H., McGlasson, W. B., Graham, D., Joyce, D. 1998. *Post Harvest, an Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals*, CAB INTERNATIONAL, New York.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H., 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 609–614.
- Wojdyło, A., Oszmiński, J., Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940–949.
- Woods, J.R., Plessinger, M.A., Miller, R.K. 2001. Vitamin C and E: Missing links in preventing premature rupture of membranes?. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 185, 5-10.
- Xia, S., Wang, J., Kang, J.X. 2005. Decreased n-6/n-3 Fatty Acid Ratio Reduces the Invasive Potential of Human Lung Cancer Cells by Down-Regulation of Cell Adhesion/Invasion-Related Genes . *Carcinogenesis Advance Access* published January 20.
- Yang, J.H.; Lin, H.C.; Mau, J.L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.*, 77, 229-235

- Yang, J., Guo, J., Yuan, J. 2008. In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT*, 41, 1060–1066.
- Zeghichi, S., Kallithraka, S., Simopoulos, A.P., Kipriotakis, Z. 2003. Nutritional Composition of Selected Wild Plants in the Diet of Crete, in A.P. Simopoulos and C. Gopalan (eds). *Plants in Human Health and Nutrition Policy*. Basel: Karger, 22–40.
- Zittoun, J. 1998. Homocystéine et pathologie vasculaire. *Rvue Hématologie*, 4, 7-16.

**ANEXO 1. TRABAJOS DERIVADOS DEL
PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

- **V CONGRESO DE MEJORA GENÉTICA DE PLANTAS.** Madrid 7-9 julio 2010
Poster: “Recuperación de recursos genéticos tradicionales: Verduras y Frutos Silvestres comestibles”
Autores: Sánchez-Mata, M.C.; Fernández Ruiz, V.; Cámara Hurtado, M., Díez-Marqués, C.; García Herrera, P.; Ruiz Rodríguez, B.; Morales Gómez, P.; Morales, R.; Pardo de Santayana M.; Molina Simón, M.; Tardío, J.
Publicación: ISBN: 978-84-491-1004-97
- **28TH INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS.** Lisboa (Portugal), 22-27 Agosto 2010
Poster: “Wild edible fruits Traditional used in Spain: nutritional aspects and bioactive compounds”.
Autores: Ruiz Rodríguez, B.; Morales, P.; Fernández-Ruiz, V.; Sánchez-Mata, M.C.; Cámara, M.; Díez Marqués, C.; Molina, M., Tardío, J.
- **28TH INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS.** Lisboa (Portugal), 22-27 Agosto 2010
Comunicación oral: “Scientific Based Approach to Promote Fruit and Vegetable Consumption in Spain”.
Autores: Cámara, M.; Morales, P.; Mollá, A.
- **1ER ENCUENTRO HISPANO-PORTUGUÉS DE ETNOBIOLOGÍA: LOS DESAFÍOS DE LA ETNOBIOLOGÍA EN ESPAÑA Y PORTUGAL.** Albacete, 20-25 Septiembre 2010
Poster: “Antioxidant components in strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.)”
Autores: B.M. Ruiz, P. Morales, V. Fernández, M.C. Sánchez, M. Cámara, M. Molina, J. Tardío.
- **1ER ENCUENTRO HISPANO-PORTUGUÉS DE ETNOBIOLOGÍA: LOS DESAFÍOS DE LA ETNOBIOLOGÍA EN ESPAÑA Y PORTUGAL.** Albacete, 20-25 Septiembre 2010
Oral: “*Montia fontana* L., un interesante recurso silvestre del Oeste de la Península”
Autores: Tardío, J.; Molina, M.; Morales, R., Pardo de Santayana, M.; Morales, P., García, P., Fernández, V.
- **1ST UK INTERNATIONAL FUNCTIONAL FOOD CONFERENCE.** Oxford (England), 25-26 Noviembre 2010.
Poster: “Tocopherols and Antioxidant Properties of some Spanish Wild Vegetables”.
Autores: P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, AM. Carvalho, M.C. Sánchez-Mata, M. Cámara, M. Molina and J. Tardío.

PUBLICACIONES

- Autores: Ruiz_Rodríguez, B., Morales, P., Fernández_Ruiz, V., Sánchez_Mata, M. C., Cámara, M., Díez_Marqués, C., Pardo_de_Santayana, M., Molina, M.; Tardío, J.
Título: "Valorization of wild strawberry_tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data".
Revista: Food Research Internacional. 2011. (DOI:10.1016/j.foodres.2010.11.015)
- Autores: Sánchez-Mata, M.C, Cabrera-Loera, R.D., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Díez- Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J.
Título: Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds.
Revista: Genetic Resources and Crop Evolution . 2011 (DOI: 10.1007/s10722-011-9693-6).
- Autores (p.o. de firma): Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., Carvalho, A.M., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Tardío, J.
Título: "Fatty acids characterization of twenty Spanish wild vegetables".
Revista: Journal of the Science of Food and Agriculture
Estado: En proceso de revisión; Mayo 2011
- Autores (p.o. de firma): Patricia Morales, Ana Maria Carvalho, M^a Cortes Sánchez-Mata, Montaña Cámara, María Molina, Isabel C.F.Rrreira
Título: "Tocopherols composition and Antioxidant Activity of Spanish Wild vegetables" .
Revista: Journal of Food and Chemical Toxicology.
Estado: Enviado (Enero 2011) en proceso de evaluación.
- Autores: Tardío, J., Molina, M., Aceituno-Mata, L., Pardo-de- Santayana, M., Morales, R., Fernández-Ruiz, V., Morales, P., García, P., Cámara, C., Sánchez-Mata, M.C.
Titulo: *Montia fontana* L. (Portulacaceae), an interesting wild vegetable traditionally consumed in the Iberian Peninsula
Revista: Genetic Resources and Crop Evolution
Estado: Enviado (abril 2011) en proceso de evaluación.

