



ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

**Máster Universitario de Investigación en
Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos**



**INFLUENCIA DE DIFERENTES ESCENARIOS DE FERTILIZACIÓN SOBRE EL CONTENIDO
NUTRIENTE Y ACTIVIDADES DE VALOR AÑADIDO EN ESPINACA**



ASUNCIÓN ESTER ESCLAPEZ BOIX

2017



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza a la alumna **D^a. Asunción Ester Esclapez Boix**, a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Influencia de diferentes escenarios de fertilización sobre el contenido nutriente y compuestos/actividades de valor añadido en espinaca”, bajo la dirección de D. Raúl Moral Herrero, debiendo cumplir las normas establecidas para la redacción del mismo que están a su disposición en la página Web específica del Master.

Orihuela, 1 de septiembre de 2017

La Directora del Máster Universitario de Investigación en Gestión, Tratamiento y Valoración de Residuos Orgánicos

Fdo.: Concepción Paredes Gil



TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:



**Máster Universitario de Investigación en
Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos**



ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

**INFLUENCIA DE DIFERENTES ESCENARIOS DE FERTILIZACIÓN SOBRE EL CONTENIDO
NUTRIENTE Y ACTIVIDADES DE VALOR AÑADIDO EN ESPINACA**



Vº Bº DIRECTOR

ALUMNO

Raúl Moral Herrero

Asunción Ester Esclapez Boix

2017

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MASTER

IDENTIFICACIONES:

Autor: Asunción Ester Esclapez Boix.

Título: Influencia de diferentes escenarios de fertilización sobre el contenido nutriente y actividades de valor añadido en espinaca.

Title: The effect of different fertilizing scenarios about nutrient and compound extraction/activities of added value in spinach.

Director/es del TFM: Raúl Moral Herrero.

Año: 2017.

Titulación: Máster Universitario en Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos.

Tipo de proyecto: Investigación.

Palabras claves: Vermicompost, compost, fertilizante orgánico, fertilizante inorgánico, digerido, lodo de depuradora, antioxidantes y polifenoles.

Keywords: Vermicompost, compost, organic fertilizer, inorganic fertilizer, digested, sewage sludge, antioxidants and polyphenols.

Nº de citas bibliográficas: 62

Nº de tablas: 13

Nº de figuras: 20

RESUMEN:

El incremento de la degradación de los suelos derivado de cultivos intensivos en el sureste español ha generado un interés creciente en la respuesta de la fertilización orgánica como mecanismo de recuperación. Sin embargo, a pesar de las ventajas de

los fertilizantes orgánicos, existe un desconocimiento sobre como cubrir las necesidades nutricionales en cada cultivo. Además en cultivos como la espinaca es necesario controlar los niveles de nitrato en hoja por lo que es habitual el uso de fertilizantes de liberación lenta (encapsulados y/o con inhibidores de la nitrificación). En el presente trabajo se ha realizado un estudio comparativo de diferentes escenarios de fertilización orgánica e inorgánica (abonos NPK con y sin liberación lenta) en un cultivo de espinaca (*Spinacia oleracia*), dosificados a 150 kg N/ha, se han comprobado aspectos de contenido nutricional donde los fertilizantes de origen orgánico han destacado, se ha comprobado el contenido de nitrato en hoja así como la determinación de propiedades de valor añadido como actividades antioxidantes, donde los fertilizantes orgánicos han estado al nivel de los productos comerciales convencionales, o con índices ligeramente superiores.

ABSTRACT

The increase in soil degradation derived from intensive crops in the Spanish southeast has generated a growing interest in the response of organic fertilization as a recovery mechanism. However, despite the advantages of organic fertilizers, there is a lack of knowledge about how to meet the nutritional needs of each crop. Also in crops such as spinach it is necessary to control nitrate levels in leaf so it is usual to use slow release fertilizers (encapsulated and / or nitrification inhibitors).

In the present work a comparative study of different organic and inorganic fertilization scenarios (NPK fertilizers with and without slow release) in a spinach crop (*Spinacia oleracia*), dosed at 150 kg N / ha, has been verified. Nutritional content where the fertilizers of organic origin have stood out, the content of nitrate in leaf has been verified as well as the determination of properties of added value as antioxidant activities, where the organic fertilizers have been at the level of the commercial products Conventional, or with slightly higher indexes.

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría agradecer a todo el Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, es especial a Raúl Moral por su ayuda y su apoyo.

A mi pareja, que siempre me apoya en los momentos más difíciles, y que lleva muchos años resistiendo mis jornadas de estudio.

Por supuesto a todos mis compañeros de trabajo que me animaron a realizar este máster y me han apoyado cuando lo he necesitado.

Y a todos los compañeros y profesores que he conocido durante este máster. Espero volver a cruzarme con todos, ha sido una suerte encontrarme personas tan profesionales.



INFLUENCIA DE DIFERENTES ESCENARIOS DE FERTILIZACIÓN SOBRE EL CONTENIDO NUTRIENTE Y ACTIVIDADES DE VALOR AÑADIDO EN ESPINACA

1. INTRODUCCION	12
1.1 La espinaca como cultivo hortícola	12
1.1.1 Caracteres botánicos.....	12
1.1.2 Factores nutritivos.....	14
1.1.2.1 Propiedades nutricionales.....	14
1.1.2.2 Agronomía de la espinaca.....	15
1.1.3 Importancia económica.....	16
1.2 Riesgos medioambientales y de seguridad alimentaria asociadas al manejo intensivo de vegetales de hoja	19
1.2.1 Sobreexplotación de acuíferos.....	20
1.2.2 Residuos sólidos agrícolas.....	20
1.2.3 Uso de fertilizantes y fitosanitarios.....	21
1.2.4 Seguridad alimentaria.....	23
1.3 Oportunidades asociadas al manejo fertilizante avanzado (orgánico e inorgánico) en vegetales de hoja	25
1.3.1 Efectos sobre rendimiento y composición vegetal.....	26
1.3.2 Efectos sobre los compuestos/propiedades de interés.....	28
1.4 TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	31
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1 Dispositivo experimental.....	36
3.1.1 Infraestructura utilizada.....	36
3.1.2 Medios utilizados.....	37
3.1.2.1 El cultivo de la espinaca.....	37
3.1.2.2 El suelo.....	38

3.1.2.3 Tratamiento fertilizante utilizado.....	40
3.2 Desarrollo experimental.....	43
3.3 Parámetros analizados.....	45
3.4 Metodología analítica utilizada.....	45
3.4.1 Análisis de agua y suelo.....	45
3.4.2 Rendimiento productivo.....	49
3.4.3 Composición mineral de la espinaca.....	49
3.4.4 Contenido total de polifenoles.....	50
3.4.5 Capacidad antioxidante de TROLOX.....	51
3.4.6 Poder antioxidante reductor del hierro. Método FRAP.....	52
3.5 Metodología estadística utilizada.....	52
4. RESULTADOS Y DISCUSION	53
4.1 Efecto de los tratamientos en rendimiento y producción.....	54
4.2 Efecto de los tratamientos sobre el contenido de nitratos en hoja.....	56
4.3 Efecto de los tratamientos en elementos nutrientes.....	58
4.4 Efecto de los tratamientos en propiedades antioxidantes.....	66
5. CONCLUSIONES.....	71
6. BIBLIOGRAFÍA.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la espinaca. Fuente: www.regmurcia.com

Figura 2. Ciclo de otoño.

Figura 3. Ciclo de primavera.

Figura 4. Producción de espinaca a nivel mundial. En naranja oscuro las regiones más productivas, en amarillo las menos productivas.

Figura 5. Gráfico circular de producción a nivel mundial.

Figura 6. Situación geográfica de la parcela.

Figura 7. Grafica de datos climáticos.

Figura 8. Variedades de espinaca.

Figura 9. Vermicompost peletizado.

Figura 10. Tractor con sembradora automática.

Figura 11. Preparación del suelo.

Figura 12. Formación de la banca.

Figura 9. Ensayo Folín Ciocalteau.

Figura 10. Producción de biomasa con diferentes fertilizantes, medido en materia fresca y seca.

Figura 11. Representación gráfica de nitratos en hoja.

Figura 12. Composición nutricional en macronutrientes.

Figura 13. Micronutrientes.

Figura 14. Correlación macronutrientes y rendimiento materia fresca.

Figura 15. Relación de nitratos en hoja con rendimiento en materia fresca.

Figura 16. Capacidad antioxidante en equivalentes TROLOX.

Figura 17. Fenoles totales.

Figura 18. Determinación de la capacidad reductora férrica.

Figura 19. Correlación nitrógeno y concentración de polifenoles.

Figura 20. Correlación (Zn + Fe) y concentración de polifenoles.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción a nivel mundial en toneladas.

Tabla 2. Contenidos máximos de nitratos en vegetales.

Tabla 3. Flavonoides detectados en espinaca.

Tabla 4. Características fisicoquímicas del suelo previas al establecimiento de los tratamientos fertilizantes.

Tabla 5. Tratamientos y propiedades.

Tabla 6. Cronograma.

Tabla 7. Análisis de agua.

Tabla 8. Análisis de suelo.

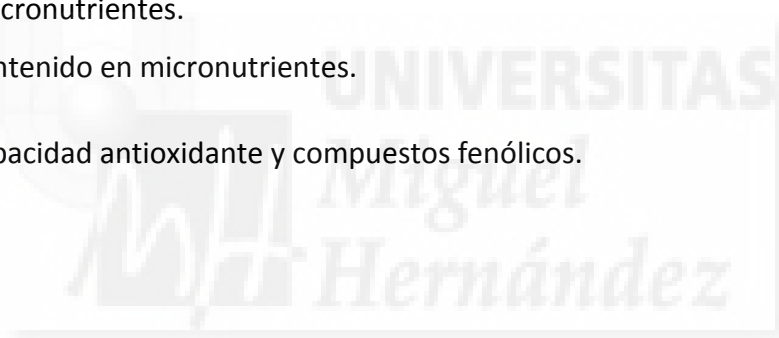
Tabla 9. Producción de biomasa aérea.

Tabla 10. Contenido NO₃ en hoja.

Tabla 11. Macronutrientes.

Tabla 12. Contenido en micronutrientes.

Tabla 13. Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos.



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ESPINACA COMO CULTIVO HORTICOLA

La espinaca cuyo nombre científico es *Spinacia oleracea* L., Sp. pl.: 1.027, denominada así por el botánico Sueco Carlos Linneo (1753) en su libro *Species plantarum*, es una planta herbácea dioica, perteneciente a la familia de las Quenopodiáceas al igual que la acelga cuya forma silvestre no es conocida; sin embargo, existe consenso en que la especie es originaria de la región del Cáucaso, cerca de Irán, Afganistán y Turkestán.

Su cultivo en Europa habría dado comienzo hace aproximadamente mil años y en España habría sido introducida por los árabes en el siglo XI con profusión principalmente en Sevilla.

En los siglos XVI y XVII su cultivo se generalizó a toda Europa. El escritor español José Acosta (1590) nos dice en el libro *Historia Natural y Moral de las Indias* que los conquistadores españoles llevaron el cultivo de la espinaca a América.

1.1.1 Caracteres botánicos

En cuanto a los diferentes órganos florales de la espinaca cabe destacar los siguientes:

Raíz y tallo: la espinaca, es una planta con raíz pivotante, poco ramificada y de desarrollo superficial. Su tallo erecto puede alcanzar los 15 a 25 cm de altura antes de desarrollar un escapo floral.

Hojas: caulíferas, más o menos alternas y pecioladas, de forma y consistencia muy variables, en función de la variedad. Color verde oscuro. Pecíolo cóncavo y a menudo rojo en su base, con longitud variable, que va disminuyendo poco a poco a medida que soporta las hojas de más reciente formación y va desapareciendo en las hojas que se sitúan en la parte más alta del tallo.

Flores: La espinaca es una planta normalmente dioica, es decir que unas plantas presentan solamente flores femeninas y otras solamente flores masculinas; no obstante, pueden aparecer plantas monoicas con flores masculinas y femeninas a la vez, siendo normal en tal caso una mayor abundancia de flores masculinas o femeninas. En ocasiones se comprueba la presencia de flores hermafroditas.

Fruto: los cuales son de color gris verdoso y por la forma de la semilla se distinguen dos tipos de espinaca, una de semilla espinosa y otra de semilla redondeada y lisa. En realidad son aquenios, que mantienen su capacidad germinativa unos 4 años y en un gramo entran unas 100 semillas lisas o 85 espinosas. Las semillas de 2 años poseen una germinación más rápida y regular que las de un solo año.

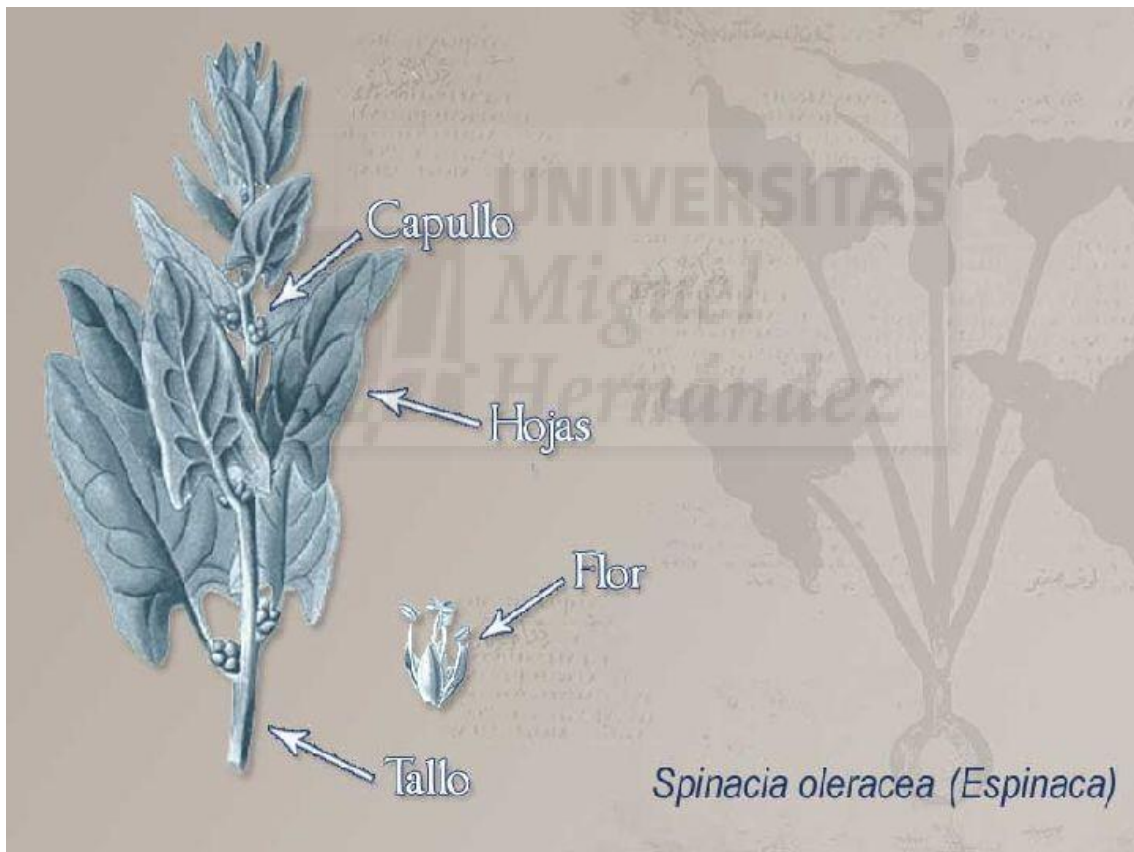


Figura 1. Partes de la espinaca. Fuente: www.regmurcia.com

La espinaca es una planta anual, que puede cultivarse en dos ciclos en función de la época de recolección; primavera y otoño.

Para el ciclo de primavera se siembra desde noviembre hasta a marzo, y se recolecta desde mediados de marzo hasta mediados de junio.

Par el ciclo de otoño se siembra en agosto y se recolecta a mediados de noviembre.

La recolección debe realizarse antes del desarrollo del tallo floral, ya que posteriormente pierde su valor comercial.

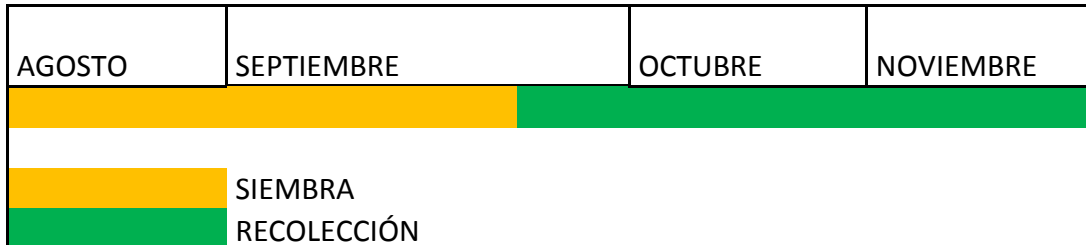


Figura 2. Ciclo de otoño.



Figura 3. Ciclo de primavera.

1.1.2 Factores nutritivos

1.1.2.1 Propiedades nutricionales

La espinaca ocupa un lugar muy importante dentro de las hortalizas aprovechadas por sus hojas, su valor nutritivo es elevado dado su alto contenido en proteínas, sales minerales y vitaminas. En concreto según la Fundación Española de la Nutrición (FAN) (2017), este alimento aporta una gran cantidad de folatos, vitamina C y vitamina A y cantidades inferiores de vitamina E, B6 y riboflavina. También aportan muy alto contenido en b-carotenos (3.254µg/100 gramos de espinacas crudas), compuestos que además de transformarse en vitamina A en nuestro organismo (provitamina A), desempeñan acciones antioxidantes y estimuladoras del sistema inmune. En cuanto a los minerales, cabe destacar la elevada proporción de magnesio y de hierro, «hierro no hemo» que se absorbe con mayor dificultad que la forma «hemo» existente en la carne y sus derivados.

Actualmente existe una tendencia de mercado por los alimentos nutricionalmente más sanos y con más propiedades, principalmente de origen orgánico, esta tendencia ha iniciado un incremento de las investigaciones en busca de obtener productos de alto valor añadido y más sostenibles. Para ello debemos tener en cuenta que el valor nutritivo de los cultivos está directamente relacionado con la fertilización que recibe la planta, el agua, el suelo donde se cultive y los factores climáticos.

1.1.2.2 Agronomía de la espinaca

La espinaca, al igual que todos los cultivos, necesita del abastecimiento de nutrientes para su desarrollo y su composición, para lograr las cualidades alimentarias de valor añadido que comentábamos en el punto anterior debemos estudiar las necesidades nutritivas y su procedencia.

Para poder realizar una fertilización correcta de tipo orgánico o convencional, necesariamente tendremos que tener en cuenta las extracciones para la dosificación de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio principalmente.

A continuación, se comentan las extracciones de macronutrientes en espinaca, obtenidos de la guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España (2010).

Extracciones de Nitrógeno para producción de 25 Tn/ha de espinaca:

- Absorción de Nitrógeno por producción comercializada 4,5-5,2 kg/Tn.
- Absorción de Nitrógeno por superficie 110-130 kg/ha.
- Nitrógeno en residuos de cosecha 20-50 kg/ha.

Extracciones de Fósforo:

- Absorción de Fósforo por producción comercializada 1,5-1,8 kg/Tn.
- Absorción de Fósforo por superficie 38-45 kg/ha.
- Absorción de Fósforo en residuos de cosecha 8-15 kg/ha.

Extracciones de Potasa:

- Absorción de Potasio por producción comercializada 7,2-8,8 Kg/Tn.
- Absorción de Potasio por superficie 180-220 kg/ha.

- Absorción de Potasio en residuos de cosecha 50-60 kg/ha.

La dosificación de estos nutrientes ha sido estudiada durante años como resultado de la fertilización con productos inorgánicos que en la mayoría de casos son inoculados a través del riego por goteo o en forma de granulados.

Actualmente estos datos de extracción están siendo adaptados para cálculos de fertilización a través de enmiendas orgánicas habitualmente asociadas a un manejo ecológico, o a la combinación de productos orgánicos e inorgánicos asociados a un manejo biotecnológico mixto entre convencional y ecológico, más conocido administrativamente como producción integrada.

En el presente trabajo, se analizan los resultados de la composición nutricional de la espinaca después de ser fertilizados con abonos orgánicos e inorgánicos, con ello se pretende demostrar que existe una diferencia en la composición final de nutrientes que forman parte de la espinaca.

Diversos autores han estudiado la respuesta de la lechuga a nivel metabólico comparando los resultados de fertilizantes orgánicos con fertilizantes de origen químico (Montemurro et al., 2015; Nicoletto et al., 2014; Cruz et al., 2014), en estos estudios se han encontrado resultados contradictorios, como el aumento de polifenoles y la disminución de vitamina E, (Cruz et al., 2014) o por el contrario un mayor contenidos de Vitamina E, en todos los fertilizantes orgánicos empleados (Nicoletto et al. 2014).

Probablemente la composición diferente de los distintos compost empleados en los estudios hace difícil la comparación entre estos estudios dada su complejidad, pero nos acerca a cómo influyen en aquellos componentes de alto valor añadido como los antioxidantes.

1.1.3 Importancia económica

En cuanto a la producción a nivel mundial, tal como podemos apreciar en las figuras 4 y 5 la producción queda repartida entre Asia, Europa, Oceanía, Norteamérica y Centroamérica, destacando el continente Asiático como principal productor, con más

de 23 millones de toneladas producidas (Tabla 1) y un 92.6% de la producción, seguida por Europa y Norteamérica.

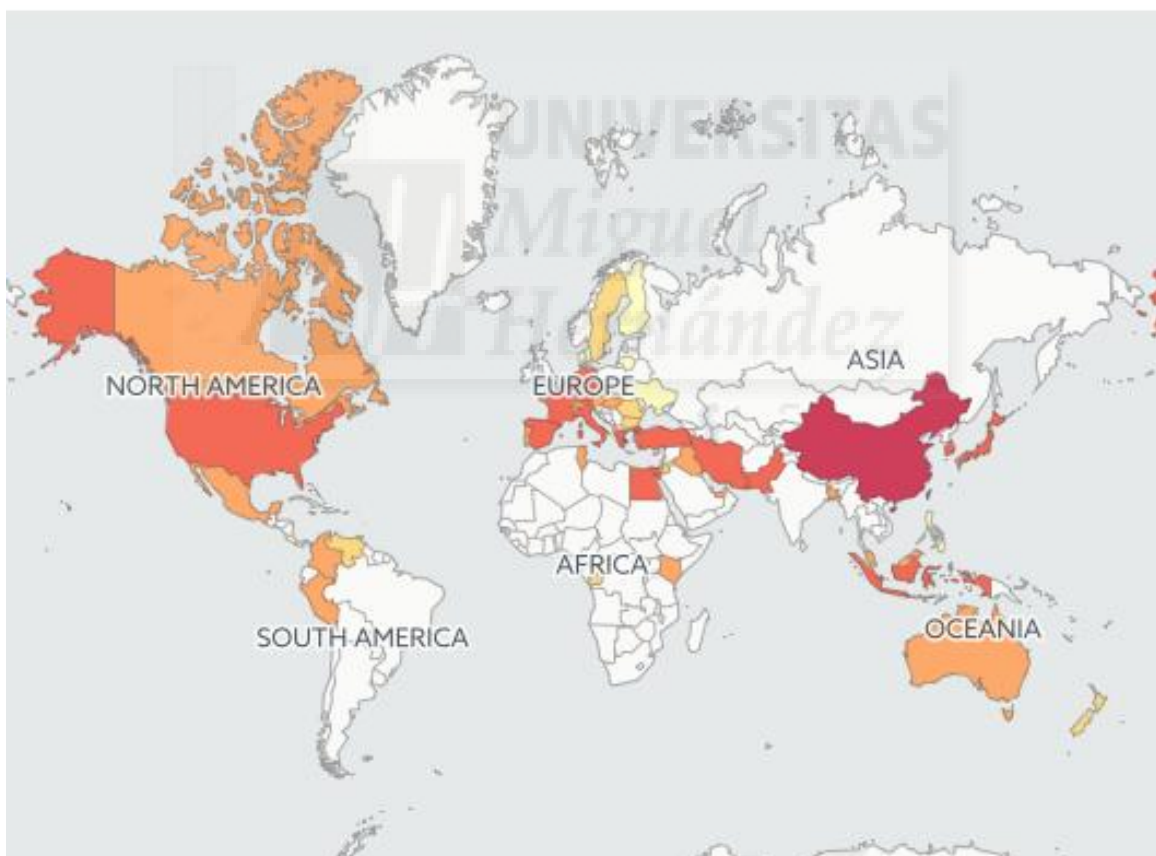
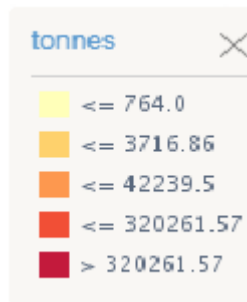


Figura 4. Producción de espinaca a nivel mundial. En naranja oscuro las regiones más productivas, en amarillo las menos productivas. Fuente: FAO.(2014).

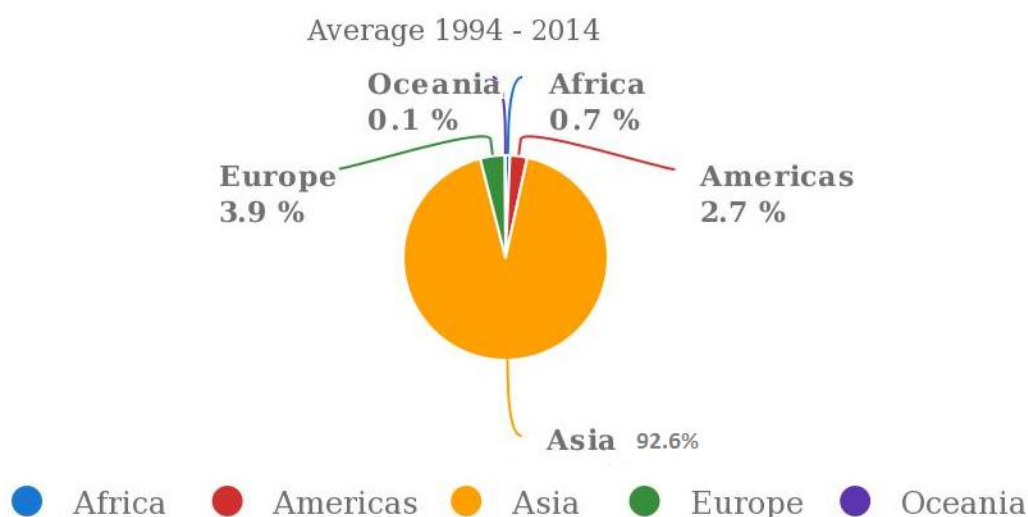


Figura 5. Gráfico circular de producción a nivel mundial.

Fuente: FAO (2014).

Tabla 1. Producción a nivel mundial en toneladas.

CONTINENTE	PRODUCTO	AÑO	PRODUCCIÓN TONELADAS
AFRICA	ESPINACA	2014	133513
AMERICA	ESPINACA	2014	442201
ASIA	ESPINACA	2014	23100484
EUROPA	ESPINACA	2014	489750
OCEANIA	ESPINACA	2014	11863

Fuente: FAO (2014).

Por otro lado la producción a nivel nacional, según datos del avance del anuario de estadística 2016 del mapama, se cultivaron y declararon 1000 Has de espinaca en regadío al aire libre y 74Has en invernadero y como principales comunidades productoras Navarra con 305Has de las cuales 63Has fueron en invernadero y Castilla y León con 712 Has al aire libre.

1.2 RIESGOS MEDIOAMBIENTALES Y DE SEGURIDAD ALIMENTARIA ASOCIADAS AL MANEJO INTENSIVO DE VEGETALES DE HOJA

El sistema de producción intensivo se ha caracterizado por el uso abusivo de fertilizantes y otros agroquímicos, laboreo excesivo de los suelos, uso del monocultivo, etc., está basado en la aplicación de técnicas culturales que agravan los problemas de degradación de los suelos por erosión, salinidad, acidez, contaminación por pesticidas y fertilizantes, empeorando la capacidad productiva del suelo y por tanto su rendimiento agrícola.

Desde la década de los 50 se utilizan cantidades ingentes de fertilizantes nitrogenados en los cultivos con el fin de aumentar sus rendimientos productivos, generando un grave impacto ambiental, como el conocido caso del mar menor, donde los nitratos a través de las aguas de riego han llegado al mar provocando cambios en un ecosistema marino único en el mundo. En la página de la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Región de Murcia (CARM), encontramos una publicación realizada por técnicos de sus oficinas comarcales agrarias, (Fernandez et, al. 2011), donde se describe como el exceso de fertilización nitrogenada, ligado a la escasez de precipitaciones, ha contaminado acuíferos y el litoral del mar menor.

La búsqueda de altos rendimientos en los cultivos, junto con el clima cálido de la zona mediterránea española, fomentó que fuera una región principalmente agraria, sin tener en cuenta quizá los bajos recursos hídricos de la zona, así como la pobreza de algunos suelos, como el caso de la desertificación de Almería donde ha sido necesario la introducción del cultivo sin suelo, generando un gran gasto de recursos. "Esta tierra ha sabido sobreponerse a la falta de agua y suelos pobres con técnicas avanzadas" es el título que el 12 de agosto de 2012 publicaba el periódico Diario de Almería.

Se exponen, a continuación, los principales riesgos medioambientales y de seguridad alimentaria asociados a la agricultura intensiva, abordando el recurso agua, los residuos sólidos, y especialmente la contaminación por el uso de fertilizantes y plaguicidas.

1.2.1 Sobreexplotación de acuíferos

El problema de la escasez del agua en algunas regiones donde se realiza manejo intensivo de hortícolas, o como en este caso de vegetales de hoja, ha provocado un descenso espectacular en el nivel piezométrico en los acuíferos. No hay estudios científicos definitivos sobre la tasa de recarga de estos acuíferos y la extracción de agua para riego intensivo, pero es evidente que la extracción es superior a la recarga de agua. Además, la extracción de agua a profundidades considerables crea un aumento en el consumo energético.

Por otro lado, la falta de agua en los acuíferos cercanos a las zonas costeras está provocando el fenómeno de la intrusión marina, con la consecuente salinización del suelo y empobrecimiento.

1.2.2 Residuos sólidos agrícolas

En los últimos años se está abordando dentro de los planes nacionales de gestión de residuos, los residuos sólidos procedentes de la agricultura intensiva, ya sea de restos vegetales, o de residuos sólidos procedentes del cultivo intensivo, como son los plásticos de invernadero, los envases de productos fitosanitarios y fertilizantes.

En la agricultura procedente de vegetales de hojas, se consideran residuos vegetales a los desechos de la producción agrícola procedentes principalmente del destrío y corte durante la recolección del producto, como aquellos espigados, en mal estado o los tallos y raíces después del corte, además aquellos procedentes del arranque de plantas arvenses, destríos de almacenes comercializadores (frutos no aptos para el consumo humano). Suelen contener un índice de humedad del 60% en el momento de su retirada, con cualidades específicas dependiendo del tipo de cultivo del que se hayan extraído y de la etapa de crecimiento de las plantas. La generación de los residuos vegetales está relacionada directamente con la organización típica de las campañas, por lo que se pueden distinguir los periodos de máxima generación para la correcta planificación de su gestión. En muchos casos la retirada de los restos vegetales es importante para evitar la propagación de enfermedades tales como hongos y enfermedades bacterianas.

Por otro lado, en cuanto al reciclaje de plásticos de uso agrícola, como el plástico de túneles, acolchado e invernaderos, este último en menor medida en vegetales de hoja, es importante que una vez finalizada la vida útil de los plásticos, es necesario recuperarlos, ya que su envío a vertedero significa una pérdida de recursos valiosos. Los residuos plásticos agrícolas procedentes del acolchado y de túneles conservan aún buenas propiedades, sin embargo los procedentes de los invernaderos están deteriorados por la radiación solar, por lo que no se pueden obtener las mismas propiedades. El riesgo medioambiental más importante en los últimos años procede de la mala gestión del residuo a través de la incineración no controlada de estos plásticos que producen dioxinas altamente tóxicas. Por otro lado, los acolchados no biodegradables en muchos casos son labrados e introducidos en el suelo.

Los envases de producto fitosanitarios y fertilizantes generados dependen del tipo de cultivo, del tipo de plaga o enfermedad, y del tipo de presentación comercial, fundamentalmente son de plástico, pero podemos encontrar también de metal, aunque en algunos casos se utiliza vidrio o papel, como los sacos de azufre. En cuanto al destino de estos envases una vez utilizados, aproximadamente el 70% de los productores los devuelven al almacén o los depositan en contenedores apropiados, un 15% son depositados en vertederos, mientras que otro 15% los abandonan o los tiran con otros residuos, quedando sin gestionar de manera conveniente.

1.2.3 Uso de fertilizantes y fitosanitarios

En cuanto al uso de fertilizantes minerales en vegetales de hoja, ha contribuido en gran parte a incrementar el rendimiento de los cultivos, pero en las últimas décadas su consumo ha aumentado considerablemente, según datos del Banco Público de Indicadores Ambientales del ministerio en 2012 el consumo de productos fertilizantes por hectárea (expresados como nutrientes) disminuyó situándose en 103.2kg/Ha de fertilizante, dato inferior a la media de los últimos 18 años (1995-2012) que se situaba en 121.4 kg/ha.

La cantidad de abonos químicos empleados está unido a la práctica de la agricultura intensiva e influye notablemente en la calidad de las aguas y en la posible contaminación del suelo, por lo que el seguimiento de su uso es prioritario.

Es por ello que, el uso poco controlado de los fertilizantes puede provocar la salinización del suelo y la contaminación de las aguas por iones nitrogenados y fosfatados, aunque estos últimos al tener una movilidad muy baja en el suelo y ser fuertemente retenidos por el mismo no suelen ocasionar graves problemas en general. Por el contrario, los nitratos son muy móviles y fácilmente lavados mediante el agua en el suelo y transportados a los acuíferos. Sin embargo, para que exista lixiviación de nitratos, es necesario que se produzcan simultáneamente un exceso de nitratos en el suelo y un exceso de agua en el riego. El nitrógeno es el elemento que más problemas plantea y además de la lixiviación o el lavado de nitratos puede provocar la volatilización de amoníaco hacia la atmósfera y emisiones de óxido nitroso a la atmósfera (Harper *et al.*, 1987).

No sólo el agua y el suelo sufren las consecuencias de una fertilización incontrolada, sino que además los vegetales de hoja, como la espinaca, la acelga, la lechuga o la endivia, tienden a acumular nitratos en las hojas, cuando hay mayor absorción que síntesis de proteínas dentro de la planta. Estos nitratos se acumulan en las vacuolas, pudiendo provocar toxicidad para el consumo humano. Los nitratos son reducidos a nitritos por enzimas producidas a través de bacterias de la saliva humana, estos en cantidades elevadas pueden provocar metahemoglobinemia, a la que los lactantes son particularmente sensibles. Por otra parte, si los nitritos reaccionan con aminos ingeridas exteriormente, se producirán las nitrosaminas altamente cancerígenas.

Los fertilizantes inorgánicos y los fitosanitarios empleados durante el cultivo intensivo también producen contaminación por metales pesados (Andrade 2005). En el caso de fertilizantes fosforados, estos pueden contener Zn, As, Cd y Pb debido a su presencia en la roca fosfórica. El uso de plaguicidas y fungicidas también ha contribuido en el aumento de As, Pb, Hg, Zn y Cu, como son los cobres para prevenir infecciones de hongos como el mildiu. En el caso de algunos estiércoles estos pueden contener Zn y Cu, procedente de los tratamientos veterinarios realizados a los animales.

Por último, cabe destacar los riesgos medioambientales por el uso de productos fitosanitarios. Estos se pueden clasificar según su origen en tres grupos: minerales,

vegetales y compuestos orgánicos de síntesis. Los dos primeros, salvo excepciones, no presentan problemas de contaminación. Los compuestos orgánicos de síntesis son los que plantean mayor riesgo debido tanto a su persistencia como a su toxicidad (arsenicales, carbamatos, derivados de cumarina, derivados de urea, dinitrocompuestos, organoclorados, organofosforados, organometálicos, piretroides, tiocarbamatos, triazinas).

Puede decirse que muchos compuestos organoclorados afectan al sistema nervioso central (depresión, narcosis), así como al hígado y al riñón. Se caracterizan también los organoclorados por acumularse en los tejidos grasos, de donde se eliminan de forma muy gradual.

Los compuestos organofosforados y los carbamatos también afectan principalmente al sistema nervioso central, en este caso mediante un proceso de inhibición de la enzima colinesterasa. Los primeros actúan en forma irreversible, mientras que los segundos son inhibidores reversibles de esta enzima. Respecto a estos tres grupos de pesticidas, los más importantes, puede establecerse que su grado de toxicidad sigue el orden:

Organofosforados > Organoclorados > Carbamatos

El Reglamento (UE) nº 2016/67 DE LA COMISIÓN de 19 de enero de 2016 modifica los límites máximos de residuos (LMR), de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, de esta forma se pretende conseguir una mayor seguridad alimentaria.

1.2.4 Seguridad Alimentaria

Debido a los problemas mencionados como la metahemoglobinemia en bebés que desencadena la ingesta de nitratos y nitritos, la Unión Europea propone una serie de reglamentos y recomendaciones en el consumo de hortalizas con alto contenido en nitratos.

El Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, establece contenidos máximos para los nitratos presentes en

determinadas hortalizas de hoja, en la tabla 2, Podemos ver los niveles establecidos para los distintos cultivos de hoja.

Tabla 2. Contenidos máximos de nitratos en vegetales.

PRODUCTOS ALIMENTICIOS		CONTENIDOS MÁXIMOS (mg NO ₃ /kg)	
1.1	Espinacas frescas (<i>Spinacia oleracea</i>)		3500
1.2	Espinacas en conserva, refrigeradas o congeladas		2000
1.3	Lechugas frescas (Lactuca sativa L.) (lechugas de invernadero y cultivadas al aire libre) excepto las lechugas mencionadas en el punto 1.4	Recolectadas entre el 1 de octubre y el 31 de marzo:	
		lechugas cultivadas en invernadero	5000
		lechugas cultivadas al aire libre	4000
		Recolectadas entre el 1 de abril y el 30 de septiembre:	
		lechugas cultivadas en invernadero	4000
		lechugas cultivadas al aire libre	3000
1.4	Lechugas del tipo "Iceberg"	Lechugas cultivadas en invernadero	2500
		Lechugas cultivadas al aire libre	2000
1.5	Rúcula (<i>Eruca sativa</i> , <i>Diplotaxis</i> sp., <i>Brassica tenuifolia</i> , <i>Sisymbrium tenuifolium</i>)	Recolectadas entre el 1 de octubre y el 31 de marzo:	7000
		Recolectadas entre el 1 de abril y el 30 de	6000

		septiembre:	
1.6	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad		200

Reglamento (CE) nº 1881/2006.

Vista la normativa aplicable sobre el límite de nitratos permitidos, EFSA (European Food Safety Authority) publica en 2010 una serie de conclusiones y recomendaciones, principalmente para el consumo de hortalizas con altos contenidos en nitratos, con el objetivo de disminuir la exposición a nitratos en las poblaciones sensibles (bebés y niños de corta edad), estas recomendaciones posteriormente se adaptan a nuestro país a través de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), incluyendo hortalizas como la acelga. Las recomendaciones más destacadas serían las siguientes:

- Se recomienda, por precaución, no incluir las espinacas ni las acelgas en sus purés antes del primer año de vida. En caso de incluir estas verduras antes del año, procurar que el contenido de espinacas y/o acelgas no sea mayor del 20% del contenido total del puré.
- No dar más de una ración de espinacas y/o acelgas al día a niños entre 1 y 3 años.
- No dar espinacas y/o acelgas a niños que presenten infecciones bacterianas gastrointestinales.
- No mantener a temperatura ambiente las verduras cocinadas (enteras o en puré). Conservar en frigorífico si se van a consumir en el mismo día, si no, congelar.

1.3 OPORTUNIDADES ASOCIADAS AL MANEJO FERTILIZANTE AVANZADO (ORGÁNICO E INORGÁNICO) EN VEGETALES DE HOJA

Los problemas medioambientales derivados del manejo intensivo de cultivos y del uso de fertilizantes minerales unidos al continuo aumento de su precio ocasionado por los costes de la síntesis de amoníaco para la extracción del nitrógeno mineral y de las pocas reservas de fósforo, han provocado un creciente interés por los fertilizantes orgánicos.

Este tipo de fertilizantes, que además de nutrientes, aporta materia orgánica necesaria para el funcionamiento del ecosistema del suelo, se elaboran a partir de residuos orgánicos biodegradables. Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrecen existe un desconocimiento sobre como cubrir las necesidades de un cultivo usando fertilizantes orgánicos. Algo que no ocurre con los fertilizantes inorgánicos donde existen recomendaciones de abonado para distintos cultivos, suelos y climas.

En la actualidad, se promueve el manejo agroecológico de los cultivos, de esta forma se optimizan dos importantes recursos; por un lado, la gestión de residuos orgánicos para así disminuir la materia orgánica que llega a vertederos y por otro se favorece la fijación de carbono al aplicar compost en el suelo evitando así la emisión de gases de efecto invernadero.

En los siguientes puntos profundizaremos en las investigaciones más recientes sobre la respuesta de los cultivos a distintos fertilizantes en cuanto al rendimiento productivo y compuestos de valor añadido.

1.3.1 Efectos sobre rendimiento y composición vegetal

Como comentábamos el manejo de cultivos en agricultura ecológica está en auge ya que ayuda al mantenimiento de la fertilidad del suelo y la producción vegetal a través de la gestión de la materia orgánica evitando el uso de fertilizantes de síntesis y pesticidas, no obstante diversos estudios como el realizado por Warman y Cooper (2000), buscan un equilibrio entre ambos tipos de fertilizantes, donde concluyen que al realizar mezclas de fertilizantes inorgánicos con residuos orgánicos, hay una mejora de las condiciones del suelo gracias al compost y aumenta la disponibilidad de los

nutrientes incrementando el rendimiento de la planta. En este estudio recomiendan investigar cuales son las tasas óptimas económicas y agronómicas de aplicación de estiércol, compost y fertilizantes.

De igual manera, Chand et. al. (2006), llevaron a cabo un experimento de campo durante siete años continuos para evaluar la influencia de la aplicación combinada de fertilizantes inorgánicos en el aumento de la fertilidad del suelo y el consumo de nutriente usando la menta (*Mentha arvensis*) y la mostaza (*Brassica juncea*) en secuencia de cultivo. Ellos concluyen que todos los tratamientos combinados (orgánicos más inorgánicos), mostraban un balance positivo en la disponibilidad de N, P y K en el suelo, al ser comparado con la aplicación sola de fertilización orgánica ó fertilización inorgánica.

Por otro lado, la mineralización del nitrógeno en fertilizantes orgánicos debe pasar por diferentes etapas hasta llegar a la nitrificación realizada por los microorganismos presentes en el suelo, es por ello que, si el compost o el abono orgánico no está maduro, los rendimientos de los cultivos pueden ser menores que los fertilizados con fertilizantes de síntesis. En el experimento llevado a cabo por el Català et al, (2012), probaron distintos tipos de dosis de gallinaza y fertilización mineral y las dosis de gallinaza más elevadas no pudieron igualar en rendimiento al tratamiento Mineral. Esto sugiere que el cultivo únicamente respondió a la parte amoniacal del nitrógeno aportado mediante gallinaza, quedando en el suelo, la correspondiente fracción del nitrógeno orgánico a la espera de mineralización. Es importante remarcar que las enmiendas orgánicas de origen animal pueden ser muy variables en composición.

En otro experimento (Hernández et al, 2016), comparando fertilizantes orgánicos e inorgánicos, se realizaron dos cosechas consecutivas en un suelo empobrecido, y a partir de la segunda cosecha tanto ciertas propiedades físicas del suelo como la capacidad de retención de agua y la estabilidad de los agregados mejoró, aumentando circunstancialmente el rendimiento del cultivo. El rendimiento del cultivo mejora proporcionalmente a mayor disponibilidad de agua y de mineralización del nitrógeno, reforzando la hipótesis de Català et al (2012).

Durante la fertilización, el nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes afectando a todos los niveles de las actividades vegetales, incluyendo el metabolismo, la asignación de recursos, el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Tradicionalmente, se pensaba que las plantas se nutrían exclusivamente de las formas inorgánicas de N, en particular los nitratos como fuente de N (Reeve et al., 2009). Recientemente, varios estudios han demostrado que una amplia gama de especies de plantas son capaces de absorber nitrógeno orgánico (Näsholm et al., 2009; Persson, 2006).

1.3.2 Efectos sobre compuestos/propiedades de interés

El metabolismo vegetal se puede dividir en metabolismo primario, que incluye moléculas esenciales tales como azúcares, aminoácidos o lípidos comunes en todas las plantas; y metabolismo secundario, que comprende moléculas minoritarias, pero con una gran importancia en aspectos de defensa y adaptación a cambios ambientales, en este punto, nos centraremos principalmente en el segundo grupo.

Las frutas y verduras contienen cantidades abundantes de compuestos antioxidantes que tienen beneficios sobre la salud humana principalmente para evitar enfermedades cardiovasculares y cáncer (Middleton et al, 2000; Kris-Etherton et al., 2002). Además, los extractos de antioxidantes tienen gran utilidad en la industria farmacéutica y cosmética (Suhaj 2006). Algunos compuestos polifenólicos tienen funciones como atrayentes de polinizadores o repelentes de plagas, pesticidas naturales o incluso moléculas señalizadoras (Edreva y cols., 2008). Además, encontramos los principios activos de algunos medicamentos como por ejemplo el taxol, el ácido salicílico (componente de la aspirina en su forma acetilada), el resveratrol y otros muchos, que son específicos de algunas especies vegetales y, por tanto, podrían ser empleados como marcadores de carácter taxonómico (Merchant y cols., 2006).

En nuestro caso, la espinaca (*Spinacia oleracea*) es un importante vegetal dietético rico en antioxidantes que se puede consumir fresco en ensaladas o cocinada procedente de hojas frescas, congeladas o enlatadas.

La espinaca contiene sustancias bioactivas como son los compuestos fenólicos, como los flavonoides y los ácidos fenólicos (ácidos p-cumárico, gálico y ferúlico). Las hojas de

espinaca contienen alrededor de 1000-1200mg/kg de flavonoides, además de los carotenoides (principalmente luteína y α -caroteno), y los compuestos derivados de ácidos grasos, tales como como los glicoglicerolipidos y el ácido lipoico. En la tabla 3, se muestran los flavonoides encontrados en espinaca (Cho et al, 2008).

Tabla 3. Flavonoides detectados en espinaca.

1	Patuletin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[β -Dapiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside
2	Patuletin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside
3	Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[β -Dapiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside
4	Compound 6 isomer
5	Compound 7 isomer
6	Patuletin-3-O- β -D-(2- ρ -coumaroylglucopyranosyl-(1 \rightarrow 6))- [β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside
7	Patuletin-3-O- β -D-(2-feruloylglucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-[β -Dapiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside
8	Compound 1 isomer
9	Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside
10	Spinacetin-3-O- β -D-(2- ρ -coumaroylglucopyranosyl-(1 \rightarrow 6))- [β -Dapiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside
11	Spinacetin-3-O- β -D-(2-feruloylglucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside
12	Patuletin-3-O- β -D-(2- ρ -coumaroylglucopyranosyl-(1 \rightarrow 6))- β -D-glucopyranoside
13	Patuletin-3-O- β -D-(2-feruloylglucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside
14	Patuletin derivative
15	Patuletin derivative
16	Spinacetin-3-O- β -D-(2-feruloylglucopyranosyl)-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside
17	Spinatoside

18	Jaceidin-4- β -D-glucuronide
19	5,3,4-Trihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4- β -D-glucuronidea
20	5,4-Dihydroxy-3-methoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4- β -D-glucuronidea
21	5,4-Dihydroxy-3,3-dimethoxy-6:7-methylenedioxyflavone-4- β -D-glucuronidea

Los diferentes manejos de fertilizantes orgánicos e inorgánicos, sobre el cultivo de la espinaca y otros vegetales de hoja están demostrando ser capaces de variar el fenotipo de las plantas en referencia a su contenido fenólico, la capacidad antioxidante total y la presencia de macronutrientes (N, Mg, S, Na, Fe) y micronutrientes (Se, Mn, Mo) en distintas cantidades. De igual manera se ha estudiado como afectan los distintos genotipos de la espinaca a los contenidos en flavonoides y otros antioxidantes, (Howard et al, 2002; Kidmose et al, 2001; Cho et al, 2008) demostrando que el genoma influye en la cantidad de compuestos.

Stagnari et al, en 2007, llevo a cabo un estudio con diferentes fertilizantes nitrogenados inorgánicos en un cultivo de espinaca de distintos genotipos, obteniendo diferente respuesta en compuestos como nitratos, oxalatos y nutrientes como el Ca, K y P, y en rendimiento. Sin embargo, los azúcares y la acumulación de Mg no mostraron diferencia con fertilización nitrogenada o con la elección del genotipo. Siguiendo en esta línea Sofo et al, (2016), experimentó el efecto de distintos tipos de fertilizantes orgánicos e inorgánicos en manejo ecológico y convencional, estudiando los perfiles fenólicos y la capacidad antioxidante, sobre un cultivo de lechuga donde concluye que los tratamientos con manejo convencional presentan mayor cantidad de polifenoles pudiendo estar asociado a la presencia de condiciones más estresantes, y que, por otro lado, la adopción de una gestión orgánica determinó mayores rendimientos y un mejor equilibrio planta/mineral. Un punto más allá fue el grupo investigador de Xiaosong et al, (2016) que evaluó los metabolitos presentes en las hojas de espinaca que habían sido cultivadas a diferentes concentraciones de fertilizantes nitrogenados, orgánicos e

inorgánicos, y encontraron diferencias significativas en los patrones metabólicos afectando a la modificación del azúcar, la glucólisis y el metabolismo del carbono.

Para conocer el efecto de los fertilizantes sobre los componentes de las plantas, se utiliza la metabolómica, permitiendo de esta forma evaluar la contribución de los factores genéticos y/o ambientales a la modificación del metabolismo (Fiehn, 2001).

El presente trabajo se ha realizado apoyando las actuales investigaciones del Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, perteneciente a la Universidad Miguel Hernández, y que estudian los efectos de distintos escenarios de fertilización orgánica en la producción comercial de espinaca (*Spinacia oleracia*) frente a la fertilización inorgánica, mediante el estudio de los rendimientos productivos y fijación de carbono por el cultivo, flujos de CO₂, CH₄ y N₂O, extracción de nutrientes primarios y Na (Vico et al, 2016), en este estudio se ha comprobado que los fertilizantes orgánicos estabilizados como el compost y el vermicompost obtienen resultados similares a los fertilizantes inorgánicos, en cuanto a la emisión de CO₂ se ve afectada por los tratamientos siendo máxima para los tratados con lodos frescos de depuradora y mínima para los tratados con digeridos y seguidamente se está realizando una ampliación del estudio, a través de la determinación de la metabolómica de la espinaca, donde se han determinado la capacidad antioxidante, demostrando que los fertilizantes de origen orgánico han obtenido mejores resultados. (Vico et al, 2017).

1.4 TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Existen diferentes técnicas que permiten determinar actividades asociadas a propiedades de valor añadido a nivel funcional, prebiótico, o de salubilidad.

Estos métodos están basados en la generación de radicales libres que reaccionan con la muestra de modo que los antioxidantes presentes en esta generan una respuesta inhibiendo dichos radicales.

A continuación se describen brevemente algunos de los métodos más comunes para la determinación de la capacidad antioxidante total en los alimentos;

- El método FRAP, consiste en una reacción de reducción del complejo de la tipiridiltriazina férrica (TPTZ) al complejo ferroso con un antioxidante y en un medio ácido. Es una reacción que se mide a una longitud de onda de 593 nm.
- El método Folin- Cicoalteau, consiste en medir el cambio de color de amarillo a azul que acompaña la reacción de los compuestos fenólicos con la mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. Este cambio de color azul se mide espectrofotométricamente a 760 nm de longitud de onda, de manera que la coloración azul aumenta con la mayor concentración de fenoles.
- El método TEAC, Este método se basa en la captación de los radicales ABTS+• por los antioxidantes. El ABTS+• tiene un color verde-azul, y a medida que disminuye la concentración de éste la solución pierde su color. La inhibición del color es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra. Se mide el porcentaje de inhibición del color y, a partir de la recta de calibrado se calcula la capacidad antioxidante en equivalentes de Trólox, un polifenol.
- La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna y según estas interacciones químicas y el tiempo de retención en la columna, se determina la separación de los contenidos de la muestra para así poder identificarlos y cuantificarlos.

OBETIVOS



2. OBJETIVOS

Como hemos visto, el consumo de vegetales de hoja es creciente y recomendable desde el punto de vista nutricional y dietario, aunque en sus procesos productivos actuales, orientados a una hiperintensificación existen riesgos claros de impacto no solo del medio ambiente sino de impacto en la salud humana vía acumulación de nitrato en hoja. Por ello se están utilizando fertilizantes de liberación lenta, encapsulados, con aditivos que bloquean la nitrificación etc. que evitan la presencia-liberación de especies nitrogenadas de forma desacompañada a las necesidades del cultivo.

En este trabajo fin de master nos planteamos como objetivo principal estudiar como diferentes estrategias de fertilización pueden afectar al rendimiento, composición nutriente en parte comestible y a diferentes propiedades de interés a nivel antioxidante en espinaca.

Como objetivos específicos nos planteamos:

- a. Estudiar el efecto diferencial entre estrategias fertilizantes basadas en: i) fertilizantes inorgánicos; ii) fertilizantes orgánicos frescos; iii) fertilizantes orgánicos estabilizados-compostados.
- b. Analizar en contenido de nitrato en hoja de espinaca para i) verificar que cumple con los niveles máximos asociados con la normativa alimentaria, ii) establecer que estrategias de fertilización minimizan este contenido sin perjudicar el rendimiento.
- c. Analizar el contenido en macro y micronutrientes esenciales en hoja de espinaca y específicamente C, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn, así como el Na.
- d. Analizar comparativamente las capacidades antioxidantes en materia vegetal de espinaca, como indicador indirecto de las potenciales capacidades salutíferas de este vegetal y discernir si el manejo fertilizante afecta a dichos contenidos, favoreciendo o no el valor añadido del producto de consumo en fresco.

MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo fin de master nos planteamos como objetivo principal estudiar como diferentes estrategias de fertilización pueden afectar al rendimiento, composición nutriente en parte comestible y a diferentes propiedades de interés a nivel antioxidante en espinaca.

De forma específica nuestro experimento debe estar diseñado de forma que permita estudiar el efecto diferencial entre estrategias fertilizantes basadas en: i) fertilizantes inorgánicos; ii) fertilizantes orgánicos frescos; iii) fertilizantes orgánicos estabilizados-compostados dosificados de forma que suponga una entrada fertilizante nitrogenada normalizada en todos los casos.

3.1 DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

3.1.1 Infraestructura utilizada

El experimento de campo fue llevado a cabo durante la primavera de 2016 en una finca agrícola situada dentro del término municipal Librilla (Murcia-S N 37° 53' 16" p. n.; 37°55'01.9"N 1°17'16.8"W; 180 m.s.n) El clima en esta zona es un clima cálido de estepa al estar situado entre las formaciones montañosas de la Sierra de Carrasco y Sierra Espuña, su temperatura media anual es de 17,2 ° C y sus precipitaciones medias anuales son muy escasas (303 mm) por lo que se ha clasificado como un clima semiárido cálido. Durante los 61 días que duró el experimento, las condiciones climáticas fueron: temperatura media de 17,2 ° C y máxima de 24 ° C humedad relativa media 46,75%, precipitaciones totales de 62,47 l/m² (8 eventos) en los 61 días de experimento. La evapotranspiración de referencia diaria 2,38 L/m²/día después del día 40. Los datos climáticos fueron obtenidos de una estación meteorológica perteneciente al SIAM-IMIDA (Murcia) situada en Librilla. En la figura 6, podemos ver la disposición de la parcela a través de foto aérea de Sigpac, y en la figura 7, los datos climáticos.



Figura 6. Situación geográfica de la parcela.

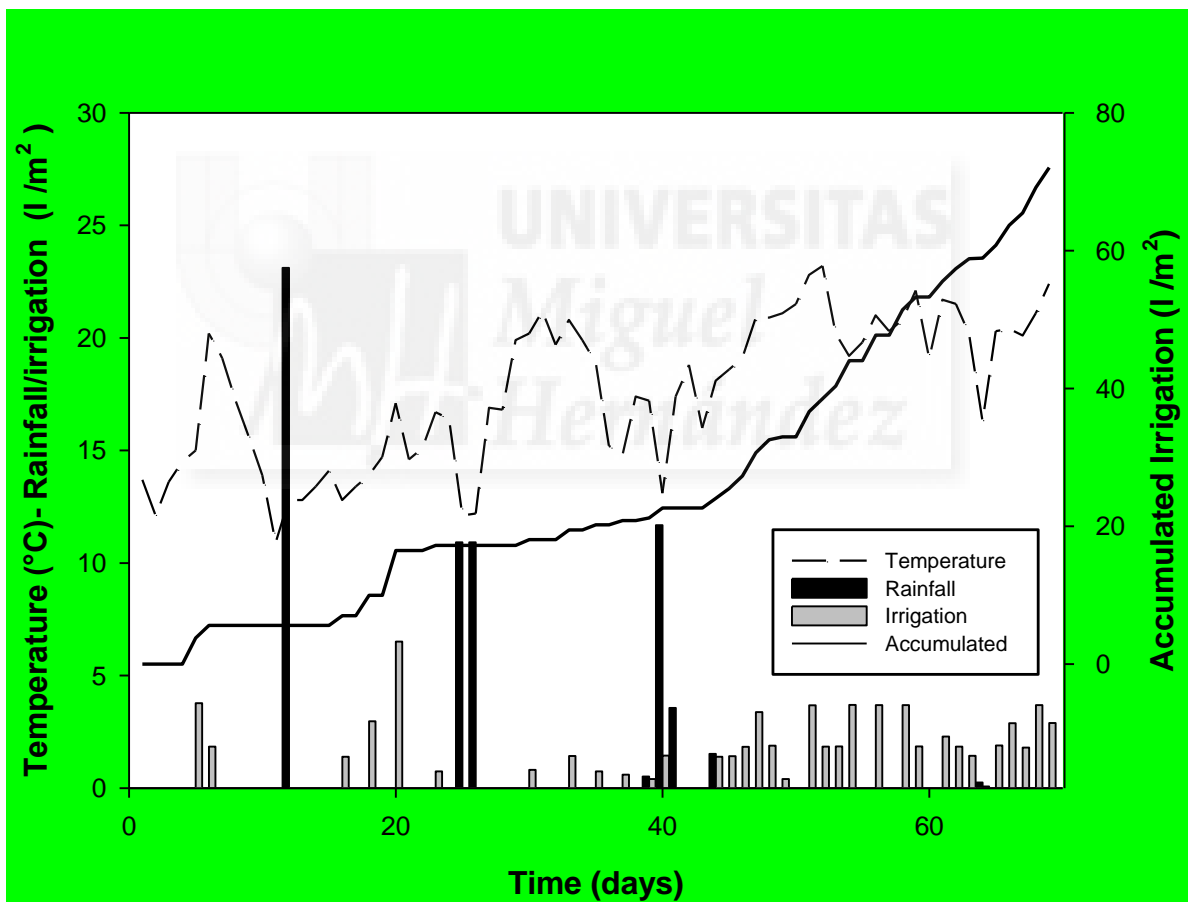


Figura 7. Gráfica de datos climáticos.

3.1.2 Medios utilizados

3.1.2.1 El cultivo de espinaca

Nuestro experimento se desarrolló empleando plantas de espinaca (*Spinacea Oleracea*) perteneciente al tipo oriental, tal como aparece en la figura 8,

concretamente la variedad cultivada fue Shrike RZ F₁, recomendada para cultivo en manojo, aunque también puede emplearse para baby leaf e industria, además esta variedad presenta resistencias a mildiu vellosa, *Peronospora farinosa f.sp. Spinaciae*, concretamente a las razas comprendidas entre 1 y 13, la raza 15 y la 16. Además, es una variedad que puede emplearse para recolecciones de primavera y otoño.



Figura 8. Variedades de espinaca.

3.1.2.2 El suelo

Las características del suelo donde se estableció el cultivo se describen en la tabla 4. Se trata de un suelo agrícola clasificado como calcaric fluvisol, (FAO, 2014). La textura es arcillosa, como aspectos favorables, este tipo de suelos presentan un nivel óptimo de retención de agua útil y retienen nutrientes por su alta superficie específica. Sin embargo, son suelos plásticos, difíciles de trabajar, altamente adherentes, baja capacidad de enraizamiento, de permeabilidad muy baja que en casos extremos puede provocar asfixia radicular y con alto potencial de escorrentía. El pH del suelo es básico (8,36) y es no salino, ya que su conductividad eléctrica es reducida (0,34 dS/m). Los niveles de carbono orgánico total (0,63 %) y de nitrógeno (810 mg/kg), son bajos, y el fósforo asimilable (47,2 mg/kg) es normal. Además, el suelo presenta niveles muy bajos de materia orgánica (1,09 %).

Tabla 4. Características fisicoquímicas del suelo previas al establecimiento de los tratamientos fertilizantes.

Parámetro	Método –Técnica analítica	Valor
Color	Tabla Munsell	10YR 7/3 light brown
pH (extracto acuoso 1:5)	Potenciometría	8.37±0.05
Densidad aparente (kg/m ³)	Gravimetría	1.44±0.05
CE (dS/m) (extracto acuoso 1:5)	Conductimetría	0,34
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100g)	Método de Mehlig y Lax	13.9±0.2
Capacidad de campo (g H ₂ O/100 g)	Gravimetría	30,1
COT (%)	Volumetría	0.47±0.02
Carbonato total (%)	Volumetría	46.8±0.8 %
Caliza activa (%)	Volumetría	17.3±0.8 %
NTK (mg/kg)	Volumetría	0.077±0.002
N-NO ₃ ⁻ (mg/kg)	E. V-UV	74.40
P asimilable (ppm)	E. V-UV	471.35
Arena (%)	Densimetría	35,75
Limo (%)	Densimetría	30
Arcilla (%)	Densimetría	34,25
Textura	-	Franco-Arcillosa

E. V-U: espectrofotometría visible-ultravioleta.

3.1.2.3 Tratamientos fertilizantes utilizados

La variable principal fue el establecimiento de 12 tratamientos de fertilización a lo largo de un ciclo de cultivo de 61 días en espinaca (*Spinacea Oleracea*), estos tratamientos se ajustaron para lograr un aporte de 150 kg/ha de nitrógeno total, 9 de los tratamientos fueron enmiendas de procedencia orgánica y los tres restantes, fueron tratamientos inorgánicos utilizados en fertilización convencional, además se estableció un tratamiento testigo sin fertilizar.

Cada tratamiento se realizó por triplicado en subparcelas de 12 m² seleccionadas al azar y por lo tanto no consecutivas. Para facilitar la comprensión de los tratamientos en la siguiente tabla se describe el tratamiento y la denominación utilizada:

Tabla 5. Tratamientos y propiedades.

Tratamiento	Enmienda	Código	MS %	N % ms	C % ms
1	Compost Lodo+Tronco Palmera (CIG 19)	TP	56,1	2,15	20,9
2	Compost Lodo+Hoja Palmera, (CIG 8)	HP	48,6	3,19	27,8
3	Compost vegetal JUSTGREEN, 100% vegetal	JU	73,0	2,43	25,5
4	Compost Lodo+Arundo Donax (CIG 10)	AD	69,6	2,12	22,5
5	Vermicompost comercial Tercia	VT	68,2	1,61	19,2
6	Pellet Vermicompost comercial Tercia	PV	75,1	1,38	17,6
7	Fertilizante órgano-mineral comercial Venus Bitop	COM	100	4,00	-
8	Digerido biometanización proy. Agrowaste	DI	4.1	2.9	-
9	Lodo Depuradora EDAR Orihuela	LO	19,9	5,50	-
10	Fertilización convencional (sin liberación lenta), 15-15-15	NOLI	100	15,00	--
11	Fertilización convencional liberación lenta, <i>Nutricote</i>	LI-1	100	15,00	--
12	Sin fertilización, blanco	B	100	0,00	--
13	Fertilización convencional liberación lenta por inhibición de la nitrificación con DMMP, <i>Nitrofoska</i>	LI-2	100	21	--

De los tratamientos de origen orgánico tres fueron marcas comerciales, dos fueron de residuos orgánicos frescos y los cuatro restantes fueron compost de distinta composición (Tabla 5):

- ❖ **Fertilizante órgano-mineral:** fertilizante órgano-mineral Venus Bitop® (COM).
- ❖ **Fertilizantes orgánicos frescos:** un digerido de un digestor anaeróbico agroalimentario (DI) con 30% de purines de cerdo y 70% de aguas residuales de una planta de procesado de tomate y un lodo EDAR fresco (LO) de la planta depuradora de Orihuela (Alicante).
- ❖ **Fertilizantes orgánicos estabilizados:** compost de lodo más hoja de palmera (HP), compost vegetal procedente de jardinería urbana (cespáceas, arbustivas y leñosas), compost de lodo más tronco de palmera (TP), Compost de lodo más caña (AD) (*arundo nodax*), y dos fertilizantes orgánicos comerciales; un vermicompost de origen ganadero (VT) y el mismo vermicompost peletizado (PV) que se muestrea en la imagen 9.
- ❖ **Fertilizantes inorgánicos:** Fertilización Inorgánica NPK 15-15-15 (NOLI), Fertilización Inorgánica Liberación lenta Nutricote (LI-1), fertilización Inorgánica Liberación lenta Nitrofoska (LI-2) con inhibidor de la nitrificación (DMPP). utilizando un abono complejo con inhibidor de la nitrificación (DMPP). El producto utilizado se denomina comercialmente ENTEC Nitrofoska 21. Es un abono complejo NPK, con el potasio procedente exclusivamente de sulfato. Según su ficha técnica en la página web <http://es.eurochemagro.com> su composición es:
 - 21 % Nitrógeno (N) total
 - 9,9 % Nitrógeno (N) nítrico
 - 11,1 % Nitrógeno (N) amoniacal
 - 8 % Pentóxido de fósforo (P₂O₅) soluble en citrato amónico neutro y en agua
 - 5,6 % Pentóxido de fósforo (P₂O₅) soluble en agua
 - 11 % Óxido de potasio (K₂O) soluble en agua
 - 10 % Trióxido de azufre (SO₃) total
 - 8 % Trióxido de azufre (SO₃) soluble en agua
 - 0,8% DMPP (3,4-dimetilpirazol fosfato) en relación con el nitrógeno amoniacal

- pH = 5,5 (disolución en agua 1:10 a 20° C)

Con dosis recomendada para hortalizas entre 600-1000 Kg/ha, en este caso la dosis de aplicación fue de 800 Kg/ha, lo que corresponde a una dosis de 168 UF de N, 64 UF de P₂O₅ y 88 UF de K₂O.



Figura 9. Vermicompost peletizado.

3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

La siembra, se realizó el 8 de marzo de 2016, utilizando una máquina de siembra a chorrillo, con una densidad de 150 plantas por m², sin necesidad de posterior aclareo. (Figura 10).



Figura 10. Tractor con sembradora automática.

La plantación se realiza en bancas de 1.80m de ancho, donde se instalan 4 tuberías de riego por goteo de 16mm de diámetro, con gotero autocompensante a 33cm, y caudal de 1.6l/h. La sembradora introduce una línea a derecha e izquierda de cada tubería, con una separación de la misma entre 8/10cm y una profundidad de plantación entre 1 y 1.5cm. El caudal de descarga por hectárea es de 111,11 m³. La siembra se realizó en seco, con posterior riego para la inducción de la germinación.

En cuanto al riego y la fertilización, para evitar los aumentos de nitratos en las espinacas con altas temperaturas y riego deficitario, se usaron un total de 2.470,03 m³/ha de agua durante el riego, y la fertilización se aplicó a través de en mesas con irrigación de agua sin fertirrigación, los tratamientos se aplicaron como abonado de fondo en los primeros 10 cm de suelo previo a la siembra, la cual se realizó de manera mecánica y además se mantuvo un tratamiento control sin fertilizar.

El cuadro siguiente muestra el cronograma del manejo realizado para el cultivo:

Tabla 6. Cronograma.

FECHA	MANEJO
22/2/2016	Aplicación de fertilización de fondo en toda la finca
25/2/2016	Formación de banca
26/2/2016	Aplicación de los tratamientos
29/2/2016	Plantación de semillas
2/3/2016	Implantación de riego localizado
7/3/2016	Germinación de las semillas



Figura 11. Preparación del suelo.



Figura 12. Formación de la banca.

Por último, en cuanto a tratamientos fitosanitarios, se realizaron 4 aplicaciones para tratar las siguientes plagas:

- ❖ Larvas de lepidópteros → *Bacillus thuringiensis* (tratamiento ecológico).
- ❖ Larvas de lepidópteros → Lambda cihalotrin
- ❖ Pulgones (*Aphis* sp.) → Acetamiprid
- ❖ Mildiu (*Peronospora farinosa*) → Propamocarb + Fosetil

3.3 PARÁMETROS ANALIZADOS

Para el estudio de las repercusiones en la calidad de la cosecha por el uso de distintos tipos de fertilizantes, los parámetros analizados fueron:

Análisis de los medios de cultivo:

- Análisis de agua y análisis de suelo, para el posterior cálculo de la fertilización.

Análisis nutricionales y funcionales sobre el cultivo de la espinaca:

- Rendimiento productivo.
- Composición mineral de la espinaca.
- Contenido total de polifenoles.
- Capacidad antioxidante de trolox.
- Poder antioxidante reductor del hierro. Método FRAP.

3.4 METODOLOGIA ANALÍTICA UTILIZADA

3.4.1 Análisis de agua y suelo

Para una correcta fertilización del cultivo de la espinaca, y para garantizar el aporte de nitrógeno de 150Kg/ha se realizó un análisis del agua de riego en el laboratorio Fitosoil de Murcia y un análisis de la composición del suelo en el laboratorio Kudam, de Pilar de la Horadada. En la tabla 7 y la tabla 8 se muestran los datos más relevantes extraídos del análisis de agua y de suelo respectivamente:

TABLA 7. Análisis de agua.

DETERMINACIONES			
	RESULTADO	UNIDAD	CLASIFICACIÓN
Ph	8,64	Ud. pH	MUY ALTO
Conductividad eléctrica	2,96	mS/cm	ALTO
Sales totales disueltas	2,05	g/l	ALTO
ANIONES			
	g/L	CLASIFICACIÓN	
Cloruro	0,408	ALTO	
Sulfato	0,825	ALTO	
Carbonato	0,0167	ALTO	
Bicarbonato	0,192	NORMAL	
Nitrato	0,0031	NORMAL	
Fosforo disuelto H ₂ PO ₄	<0,00157	NORMAL	
CATIONES			
	g/L	CLASIFICACIÓN	
Calcio	0,263	NORMAL	
Magnesio	0,0791	NORMAL	
Sodio	0,243	NORMAL	
Potasio	0,0249	NORMAL	
Amonio	<0,000050	NORMAL	
MICRONUTRIENTES			
	mg/L	CLASIFICACIÓN	
Boro	0,714	NORMAL	
Hierro	<0,050	NORMAL	
Manganeso	0,0576	NORMAL	
Cobre	0,328	ALTO	
Zinc	<0,01	NORMAL	
INDICES SECUNDARIOS			
	RESULTADO	UNIDADES	CLASIFICACIÓN
Dureza	98	Fº	MUY DURA
Indice de saturación de Langelier	1,78		MUY INCRUSTANTE
Relación Ca/Mg	2,02		CALCIFICANTE
Presión osmótica	1,07	atm	ALTA

Como resultado del análisis de agua, se determinó que se trataba de un agua muy dura y calcificante, con altas probabilidades de obstruir goteros. Por otro lado, la relación Ca/Mg, es elevada y por lo tanto necesitará compensarse con aporte de magnesio. Los niveles de sulfato y carbonato son elevados, por lo que no es necesaria la adición de los mismos durante la fertilización. La conductividad, elevada, podría afectar a plantas más sensibles provocando marchitamiento. En el caso de la espinaca se considera moderadamente sensible, según Mujeriego (1990), que sitúa su tolerabilidad en 2 dS/m.



TABLA 8. Análisis de suelo general de la finca comercial.**TEXTURA**

		RESULTADO
ARCILLA	34,25%	FRANCO- ARCILLOSO
ARENA	35,75%	
LIMO	30%	

EXTRACTO 1:2 (SUELO-AGUA)

		CLASIFICACIÓN
Ph	8,51	BASICO ALTO
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	0,62mS/cm	BAJO
RELACIÓN ADSORCIÓN DE SOCIO (S.A.R)	2,16	NORMAL

CAPACIDAD DE CAMBIO CATIONICO (C.I.C)

		CLASIFICACIÓN
(C.I.C)	13,92 meq/100 g suelo	NORMAL
CALCIO	9,71 meq/100 g suelo	NORMAL
MAGNESIO	2,66 meq/100 g suelo	NORMAL
POTASIO	1,12 meq/100 g suelo	NORMAL
SODIO	0,43 meq/100 g suelo	NORMAL
CA/MG	3,65 meq/100 g suelo	NORMAL
P/MG	0,42 meq/100 g suelo	NORMAL
SATURACIÓN DE SODIO	3,09 meq/100 g suelo	NORMAL

OTRAS DETERMINACIONES

		CLASIFICACIÓN
CALIZA TOTAL	41,60%	MUY ALTO
CALIZA ACTIVA	15,59%	MUY ALTO
MATERIA ORGANICA	1,12%	MUY BAJO
NITRÓGENO (ORGÁNICO+AMONICAL)	0,08%	BAJO

En el análisis de suelo, determina un suelo agrícola clasificado como calcaric fluvisol-Franco Arcilloso (FAO, 2014), considerándose pesado debido a su alto contenido de arcilla, por otro lado, destacó la baja relación carbono-nitrógeno, por lo tanto, gran parte del nitrógeno nítrico es liberado y no asimilado por las plantas, perdiendo su carácter fertilizante. Por otro lado, la textura indicó que se trataba de un suelo pesado y capaz de retener agua y abonos. El alto contenido en caliza activa puede bloquear la absorción de ciertos compuestos, y el bajo contenido en materia orgánica debía ser compensado con fertilizantes o enmiendas orgánicas.

Una vez analizadas las características del agua de riego y del suelo, se procedió a los análisis nutricionales y funcionales en el cultivo.

3.4.2 Rendimiento productivo

El primer paso para determinar las características del cultivo fue determinar el rendimiento productivo de la espinaca una vez recolectado el total de cada subparcela, para ello se cortó y pesó toda la parte aérea de la espinaca y se ponderó por cada submuestra en toneladas por hectárea. Se guardaron 3 bolsas de cada subparcela para las posteriores pruebas.

Para la primera prueba se extrajeron dos muestras de cada bolsa, obteniendo 6 muestras de cada subparcela, y se calculó la humedad y la materia seca, para ello se realizó un pesado y un secado al horno a 45°C, hasta conseguir un peso constante.

Los aparatos utilizados fueron una balanza graduada en 0,01 g, y una estufa de circulación forzada regulable a $(103 \pm 2^\circ\text{C})$.

3.4.3 Composición mineral de la espinaca

Para la determinación de la composición mineral se realizó una digestión nítrico-perclórica ($\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$). El sodio y el potasio fueron determinados por fotometría de llama. El calcio, el magnesio, el hierro, el manganeso y el zinc se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica. El fósforo se determinó por espectrofotometría de absorción molecular según el método de Kitson y Mellon

(1944). Se determinaron muestras de carbono y nitrógeno en tejidos vegetales en un microanalizador elemental automático (EuroVector Elemental Analyser, Milano, Italy).

3.4.4 Contenido total de polifenoles

El contenido total de polifenoles fue determinado usando el método de Folin-Ciocalteu (Huang et al., 2005) y ácido gálico (Sigma-Aldrich, Europa) para la preparación de disoluciones patrón a partir de una disolución concentrada de 100 mg/L.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles. (Figura 9).

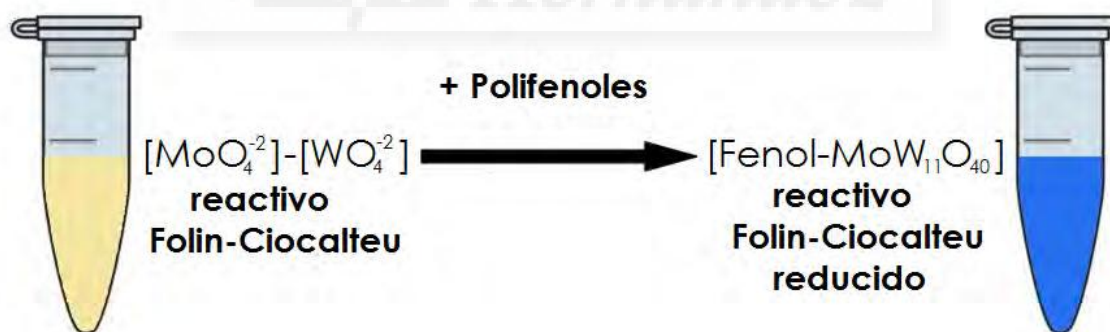


Figura 9. Ensayo Folin Ciocalteau.

Para la preparación de las muestras se coloca en un tubo de ensayo una muestra de 0.3ml, se le adiciona reactivo de folin diluido (1:10), y se agita durante un minuto. A continuación, se añaden 2ml de Na_2CO_3 al 7.5% y se agita durante un minuto, transcurrido ese tiempo, se tapan todos los tubos con parafilm y se dejan incubar a 50° durante 5 minutos. Finalmente se deja enfriar durante 5. La oxidación de los

polifenoles presentes en la muestra causó la aparición de una coloración azulada que se cuantificó por espectrofotometría en base a la recta patrón de ácido gálico a 750nm.

Por otro lado, el contenido en taninos se determinó con el uso de dos técnicas alternativas. La primera consistía en la precipitación de taninos creando un complejo proteína-tanino con 0,6 mg/ml de BSA (albúmina sérica bovina) (Sigma-Aldrich, Europa) a pH ácido y luego con una adición de solución detergente en SDS al 1%, (sodium dodecyl sulfate) más un tampón de trietanolamina al 5% en agua destilada (Makkar, 1989). La trietanolamina, mantiene una alta alcalinidad y ayuda a la disolución del complejo, el total de la proteína puede tardar en precipitar de 15 minutos a 24 horas según anteriores estudios de autores como Hagerman en 1987 y posteriormente por Makkar en 1988.

Posteriormente, se añadió FeCl₃ a la reacción y el cromógeno formado se cuantificó midiendo la absorbancia a 510 nm. El segundo método se realizó a través de la precipitación de polifenoles con 1,6 mg/ml de BSA a pH 7,4, y el precipitado de taninos más tarde se descartó. A continuación, el contenido de polifenoles se determinó de nuevo en el sobrenadante mediante el método de Folin-Ciocalteu y el contenido de taninos se calculó por diferencia de peso.

3.4.4 Capacidad antioxidante de TROLOX

En el siguiente paso, se midió la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC), mide la capacidad antioxidante de una sustancia dada, en comparación con el estándar de referencia Trolox, que es una sustancia análoga de la vitamina E, este método se describe por Laporta en 2007.

La actividad antioxidante se evaluó en el espectrofotómetro, evaluando el radical catiónico que se obtiene, siendo este un compuesto de color verde azulado, estable y con espectro de absorción en el UV-visible.

Para obtener el radical catiónico el primer paso fue disolver el precursor ABTS "2,20-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)" en agua hasta una concentración de 7 Mm, produciéndose el catión radical ABTS (ABTS • +) haciendo reaccionar la solución

madre de ABTS con persulfato potásico 2,45 mM (concentración final) y dejando la mezcla reposar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-24h antes de su uso. Para realizar el ensayo antioxidante se utilizaron extractos de Cistaceae, la solución de ABTS • + se diluyó con agua hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0,70 ($\pm 0,02$) a 734 nm.

3.4.5 Poder antioxidante reductor del hierro. Método FRAP

El siguiente ensayo realizado fue el método FRAP (Poder antioxidante reductor del hierro), este ensayo mide la capacidad de una sustancia de reducir Fe_3^+ a Fe_2^+ . Para realizar este ensayo se hace uso del reactivo FRAP, consistente en una mezcla del reactivo TPTZ (Sigma-FluKa, Europa), ácido acético y cloruro férrico, en mezcla (10:1:1).

La mezcla del Fe_3^+ junto con el reactivo TPTZ, es incolora hasta que se reduce al ión ferroso (Fe_2^+) a bajo pH, momento en el que cambia su coloración a un tono azul.

Para medir esta coloración azul se añadieron 40 μ L de los extractos a ensayo y se mezclaron en una placa de 96 pocillos con 250 μ L de reactivo FRAP recién preparado. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 37°C y después se registró la absorbancia a 593 nm durante 4 minutos en un lector de microplacas (SPECTROstar Omega, BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania). Los valores de FRAP se calcularon usando $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ como estándar. Este método fue descrito anteriormente por (Benzie y Strain, 1996).

El valor de la muestra de FRAP, se expresa en mmoles de $FeSO_4$ por cada 100gr de extracto, se determinó extrapolando en la ecuación de la recta de calibrado el incremento de absorbancia mostrado.

3.5 METODOLOGIA ESTADISTICA UTILIZADA

Los análisis se realizaron por triplicado. Se realizaron análisis de varianza a $P < 0,05$ para todas las variables del experimento. Las diferencias entre los tratamientos se analizaron utilizando contraste Tukey B ($P < 0,05$). El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete de software estadístico SPSS v. 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN RENDIMIENTO Y PRODUCCION

Durante la recolección de la espinaca en las diferentes subparcelas, se estimó la biomasa aérea, y se midieron las toneladas por hectárea en materia fresca y seca.

De los resultados reflejados en la tabla 9 y en la figura 10 podemos observar el vermicompost comercial (VT) y el digerido de residuos agroalimentarios (DI), son los que mejores resultados han obtenido en materia fresca y seca, seguidos por el fertilizante órgano mineral (COM), con mayor rendimiento en materia seca.

Dentro de los fertilizantes inorgánicos, el fertilizante de liberación lenta (LI-2) supera al fertilizante convencional (NOLI), quedando este último similar a la zona sin fertilizar en cuanto a rendimiento en materia seca, probablemente debido a un fertilizante residual en el suelo. El fertilizante inorgánico (LI-1), obtiene un rendimiento un poco inferior al (LI-2).

En cuanto a residuos orgánicos frescos, hay una gran diferencia entre el digerido (DI) y el lodo de depuradora fresco (LO), debido a una diferencia en la estabilidad de la materia orgánica.

En los compost se aprecian diferencias en función de la mezcla realizada en su composición, siendo más eficientes los compost derivados de la palmera (TP) y (HP) que el compost (JU) que fue obtenido con otros materiales vegetales.

Los mejores resultados se han obtenido en compost y vermicompost, debido al aporte de materia orgánica estabilizada, a la riqueza en nutrientes y a un aporte secuencial. El incremento de materia orgánica en el suelo genera una mejora en la capacidad de retención de agua y nutrientes, la conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico (CIC), mientras que los fertilizantes inorgánicos no inciden en la mejora del suelo. Comparando los resultados más recientes de Sofo et al, (2016) sobre un cultivo de lechuga, obtenía los mejores valores de rendimiento del cultivo en dos fertilizantes orgánicos, un estiércol y un estiércol más polvo de roca, ambos compostados, haciendo coincidir sus resultados con los nuestros sobre espinaca.

Tabla 9. Producción de biomasa aérea.

Tratamiento	Biomasa aérea (t/Ha)	
	sobre materia fresca	sobre materia seca
Blanco (B)	<u>32,2 a</u>	<u>2,24 a</u>
Fert. Inorgánica NPK 15-15-15 (NOLI)	41,7 abc	<u>2,56 a</u>
Fert. Inorgánica Lib. lenta Nutricote (LI-1)	42,7 abc	2,85 ab
Fert. Inorgánica Lib. lenta Nitrofoska (LI-2)	48,0 bc	3,15 abcd
Digerido Agrowaste (DI)	49,7 c	3,90 d
Lodo depuradora (LO)	38,0 ab	2,91 abc
Fert. organo-mineral Venus Bitop (COM)	47,8 bc	3,87 d
Vermicompost comercial (VT)	50,5 c	3,89 d
Vermicompost comercial pelletizado (PV)	46,7 bc	3,81 cd
Compost Lodo+TP 30/70 ms (TP)	44,5 bc	3,03 abcd
Compost Lodo+HP 36/64 ms (HP)	44,8 bc	3,54 bcd
Compost vegetal (JU)	39,4 abc	3,17 abcd
Compost Lodo+AD 30/70 ms (AD)	39,5 abc	2,96 abcd
F-anova y significación	5,3***	8,0***

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$.

ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$) ; **: significativo ($p \leq 0.1$).

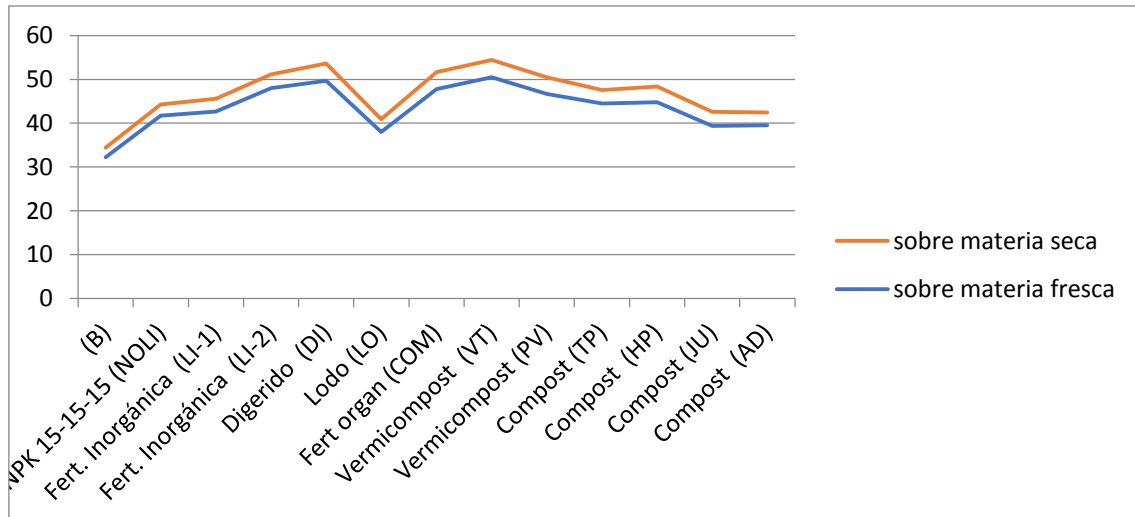


Figura 10. Producción de biomasa con diferentes fertilizantes, medido en materia fresca y seca.

4.2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL CONTENIDO DE NITRATOS EN HOJA

Como puede observarse en la tabla y en el gráfico, los niveles de NO_3 en hoja, han sido muy variables en los distintos tratamientos. Los compost (JU) y (TP) (tabla 10, figura 11), han obtenido los mejores resultados, siendo equiparables a los fertilizantes de liberación lenta usados en espinaca, para no sobrepasar el límite de $1500\text{mg NO}_3/\text{kg}$ en hoja.

Tabla 10. Contenido NO₃ en hoja.

Tratamiento		NO₃ en hoja
		mg/kg
Blanco (B)	<u>1</u>	617abcd
Fert, Inorgánica NPK 15-15-15 (NOLI)	2	323ab
Fert, Inorgánica Lib, lenta Nitrofoska (LI-2)	4	471abc
Digerido Agrowaste (DI)	5	1710f
Lodo depuradora (LO)	6	1906f
Vermicompost comercial (VT)	8	619abcd
Compost Lodo+TP 30/70 ms (TP)	10	337ab
Compost Lodo+HP 36/64 ms (HP)	11	716bcde
Compost vegetal (JU)	12	<u>280a</u>
<i>F-anova y significación</i>		31***

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$.

ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$); **: significativo ($p \leq 0.1$).

Sin embargo, los compuestos frescos, tanto el digerido como el lodo, han obtenido resultados mucho mayores, aunque no superan el límite de 3500 mg/Kg para consumo en fresco, por lo que podrían utilizarse con la dosificación de 150kg de nitrógeno por hectárea. Por otro lado, el aumento de nitratos en hojas según ciertos estudios se debe a la disponibilidad del nitrógeno en el fertilizante y a la temperatura del suelo (Lampkin 2002), por lo que, en cultivos de otoño, los niveles de nitratos en hojas serían menores.

Los niveles más elevados de nitratos en hojas para el lodo y el digerido puede deberse a una liberación más rápida de nitrógeno a causa de una mineralización menos

controlada en el suelo, ya que los fertilizantes orgánicos mejor estabilizados, aportan los nutrientes más lentamente.



Figura 11. Representación gráfica de nitratos en hoja.

Sedat Citak en 2010, encontró diferencias en niveles de nitratos y vitamina C en fertilizaciones orgánicas a base de estiércol realizadas en otoño e invierno, donde los valores de nitratos eran mayores en invierno y menores en otoño para 150kg/N por hectárea, sin embargo, los niveles de vitamina C eran mayores en invierno.

4.3 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN ELEMENTOS NUTRIENTES

Como apreciamos en la tabla 11 y figura 12, los resultados obtenidos en macronutrientes no fueron concluyentes para todos los fertilizantes, por lo que sólo se estudiaron aquellos cuyos resultados fueran correctos.

De los tratamientos orgánicos empleados los que obtuvieron mejores resultados en contenido de nutrientes a nivel de nitrógeno fue el digerido (DI) en primer lugar seguido del vermicompost comercial (VT), coincidiendo directamente con las mejores tasas de rendimiento. El lodo de depuradora fresco fue el que peor resultado obtuvo. En cuanto a los fertilizantes inorgánicos el fertilizante (NOLI), es el que obtiene el mayor resultado, seguido del fertilizante de liberación lenta (LI-2).

En cuanto al fósforo, despuntan los dos vermicompost comerciales, en primer lugar (VT) y seguido por los compost (HP) y (TP). Sin embargo, el compost (JU), junto con el lodo y el digerido, se encuentran por debajo de la media y del blanco. En esta ocasión todos los fertilizantes inorgánicos quedan igualados al blanco.

En contenido de potasio el fertilizante orgánico más destacado es el vermicompost (VT) seguido del lodo y como peor resultado el compost de hoja de palmera (HP). (Tabla 11, figura 12).

Los fertilizantes de liberación lenta frente a los compost presentan valores similares, exceptuando las cantidades de extracción de K, inferiores en los compost. El vermicompost (VT) es el más compensado en extracción de nutrientes.

Por otro lado los niveles de Ca/Mg, son similares a excepción del vermicompost que presenta unos niveles altos de calcio, y unos niveles de magnesio menores y la relación Ca/Mg está en torno a 2, considerándose una medida ideal. Por otro lado, el complejo Ca/Mg, en el caso del fertilizante inorgánico (NOLI) es el más descompensado de todos.

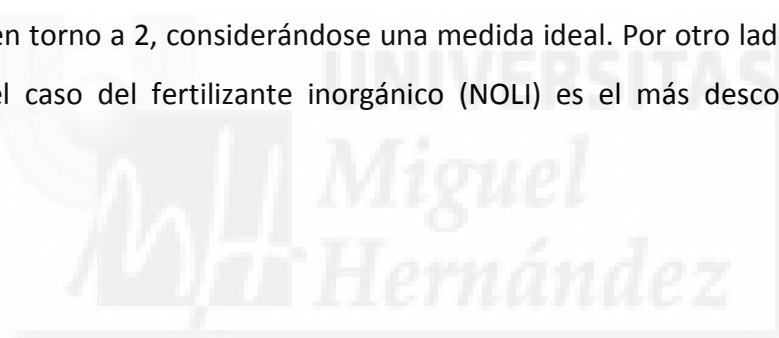


Tabla 11. Macronutrientes.

Tratamiento		N	P	K	Ca	Mg
		(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)	(g/kg)
Blanco (B)	<u>1</u>	42,4abc d	4,2ab	66ab	10,0b	<u>5,4a</u>
Fert, Inorgánica NPK 15-15-15 (NOLI)	2	45,5d	4,1ab	91d	9,9b	6,2b
Fert, Inorgánica Lib, lenta Nitrofoska (LI-2)	4	44,7cd	4,1ab	94d	9,8ab	<u>5,3a</u>
Digerido Agrowaste (DI)	5	<u>43,7bcd</u>	<u>3,4a</u>	71bc	<u>8,0a</u>	<u>4,6a</u>
Lodo depuradora (LO)	6	<u>38,3a</u>	3,7ab	81cd	9,2ab	<u>4,9a</u>
Vermicompost comercial (VT)	8	<u>41,6abc</u> d	4,5b	82cd	10,2b	<u>4,7a</u>
Compost Lodo+TP 30/70 ms (TP)	10	40,5abc	4,3b	57ab	9,9ab	<u>5,1a</u>
Compost Lodo+HP 36/64 ms (HP)	11	40,5abc	4,3b	<u>55a</u>	<u>9,4ab</u>	<u>4,8a</u>
Compost vegetal (JU)	12	39,1ab	3,8ab	62ab	9,7ab	<u>5,0a</u>
<i>F-anova y significación</i>		4,9***	3,3**	17,0* **	2,4* **	6,5** *

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$.

ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$); **: significativo ($p \leq 0.1$).

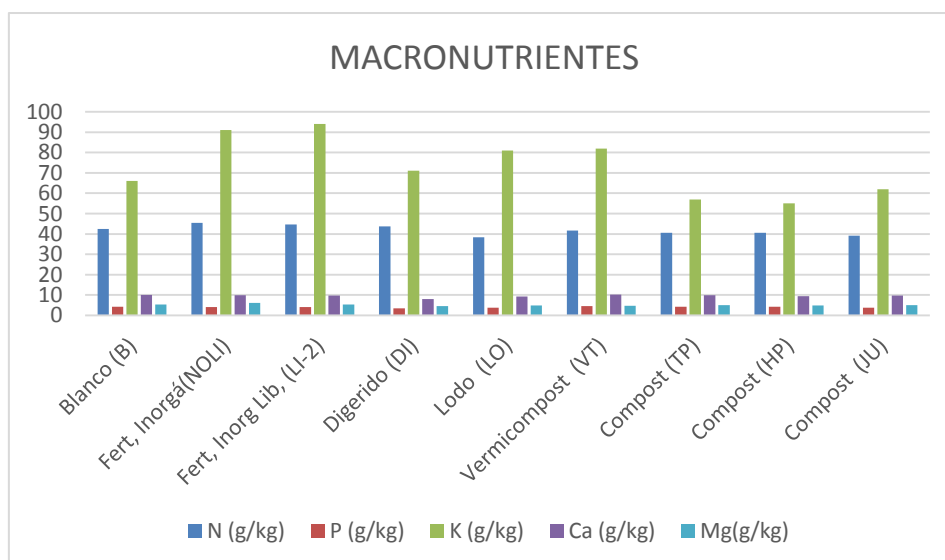


Figura 12. Composición nutricional en macronutrientes.

Tabla 12. Contenido en micronutrientes.

Tratamiento		Fe (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Na (g/kg)
Blanco (B)	<u>1</u>	<u>94a</u>	108b	57c	21,6ab	34,8c
Fert, Inorgánica NPK 15-15-15 (NOLI)	2	100ab	<u>82a</u>	53bc	<u>18,8a</u>	32,3abc
Fert, Inorgánica Lib, lenta Nitrofoska (LI-2)	4	97ab	119bc	50abc	20,2ab	35,1c
Digerido Agrowaste (DI)	5	<u>95a</u>	116bc	<u>43a</u>	22,9b	34,4bc
Lodo depuradora (LO)	6	<u>90a</u>	137cd	58c	20,6ab	30,1abc
Vermicompost comercial (VT)	8	116b	150d	45ab	21,5ab	<u>26,4a</u>
Compost Lodo+TP 30/70 ms (TP)	10	<u>93a</u>	119bc	50abc	20,7ab	28,4abc
Compost Lodo+HP 36/64 ms (HP)	11	<u>90a</u>	106b	52bc	22,2ab	27,0ab
Compost vegetal (JU)	12	101ab	146d	57c	20,5ab	29,1abc
<i>F-anova y significación</i>		2,9**	11,7***	7,6***	2,1ns	4,0***

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$. ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$); **: significativo ($p \leq 0.1$).

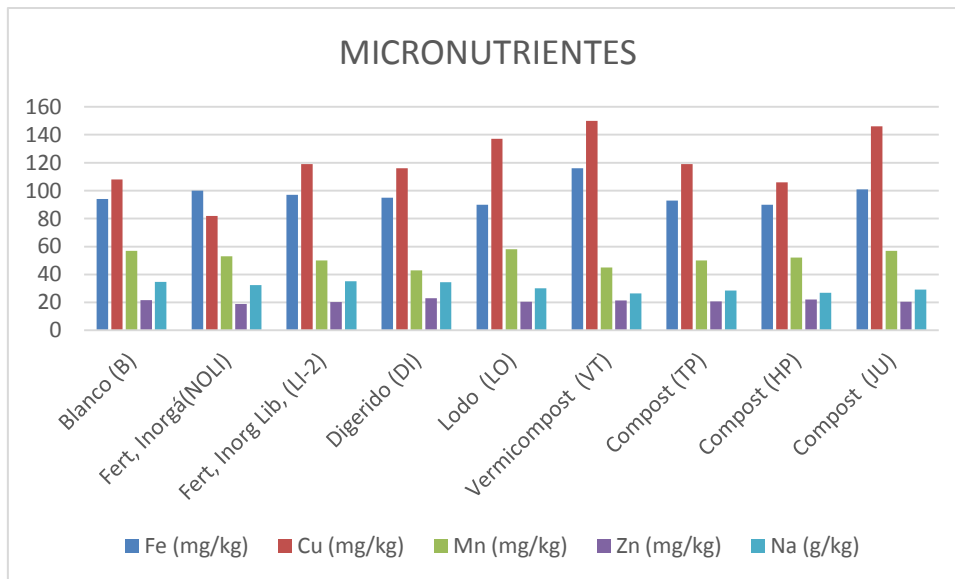


Figura 13. Micronutrientes.

A nivel de micronutrientes, el vermicompost (VT) y el compost vegetal (JU), obtienen resultados similares, sobre todo en cuanto a hierro y cobre, (Figura 13).

Al comparar abonos orgánicos e inorgánicos, comprobamos que no existen grandes diferencias en los aportes de micronutrientes. El cobre es quizá el micronutriente donde existe mayor diferencia, seguido del zinc. El cobre es un micronutriente que puede favorecer la mitigación de problemas de hongos.

Por último, en cuanto a la salinidad, los fertilizantes inorgánicos especialmente el de liberación lenta (LI-2) seguido de (NOLI), son los fertilizantes que más sodio presentan. En cuanto a fertilizantes orgánicos, el digerido (DI), presenta unos niveles similares a los convencionales. El compost de hoja de palmera (HP), presenta los niveles más bajos en sodio.

Nuestro estudio de nutrientes en comparación con el de Sofo et al, (2016), encuentran una diferenciación en los propios fertilizantes orgánicos o minerales, respecto al tipo de manejo, ecológico y convencional. Sin embargo hay una diferencia en el potasio, donde obtienen mejor valor en los fertilizantes orgánicos frente a los inorgánicos, mientras que en nuestro caso es menor el resultados para los orgánicos, es probable que la acumulación de K en el suelo durante los tres años de experimento realizado, haya conseguido una acumulación de K explicando esa diferencia. De igual forma que los resultados son similares para N y P, obteniendo mayor contenido en los fertilizados

de forma orgánica. En cuanto a los micronutrientes, no se encuentran diferencias significativas entre ambos experimentos, pero sí una diferencia en Cu y Se, para los tratamientos realizados con manejo ecológico en lechuga y contenido final de N total fue significativamente mayor.

La química de la espinaca en el nivel elemental, que incluye el contenido de todos los nutrientes minerales y oligoelementos, es de importancia clave (Kelly et al, 2010). De hecho, se sabe que algunos cationes inorgánicos, naturalmente presentes en concentraciones no tóxicas en los vegetales de hoja, tales como Fe, Cu y Zn, participan en las reacciones de eliminación de radicales para su papel de cofactores en algunas enzimas antioxidantes. En el caso de K, Na, Ca, Mg, S y P, son esenciales para el organismo humano junto con algunos micronutrientes (por ejemplo, Mn, Se y Co) que actúan como cofactores en las vitaminas y enzimas humanas.

Por otro lado, comprobamos que el desarrollo de la planta se encuentra ligado al aporte de nitrógeno orgánico. A través de la figura 14, podemos observar como aumenta el rendimiento en materia fresca de las muestras de espinaca, según aumenta el nitrógeno disponible de tipo orgánico.

El lodo al no estar totalmente estabilizado provocará en el suelo una desestabilización C/N hasta que finalmente se mineralice, y en el caso del fertilizante inorgánico sin liberación lenta (NOLI) comprobamos que su rendimiento productivo en materia fresca es inferior, aunque encontramos mayor cantidad de nitrógeno en hoja. Se comprueba que, con base a nuestros resultados, el nitrógeno orgánico, afecta directamente al estado C/N y juega un papel importante en el metabolismo de las plantas (Xiaosong 2016).

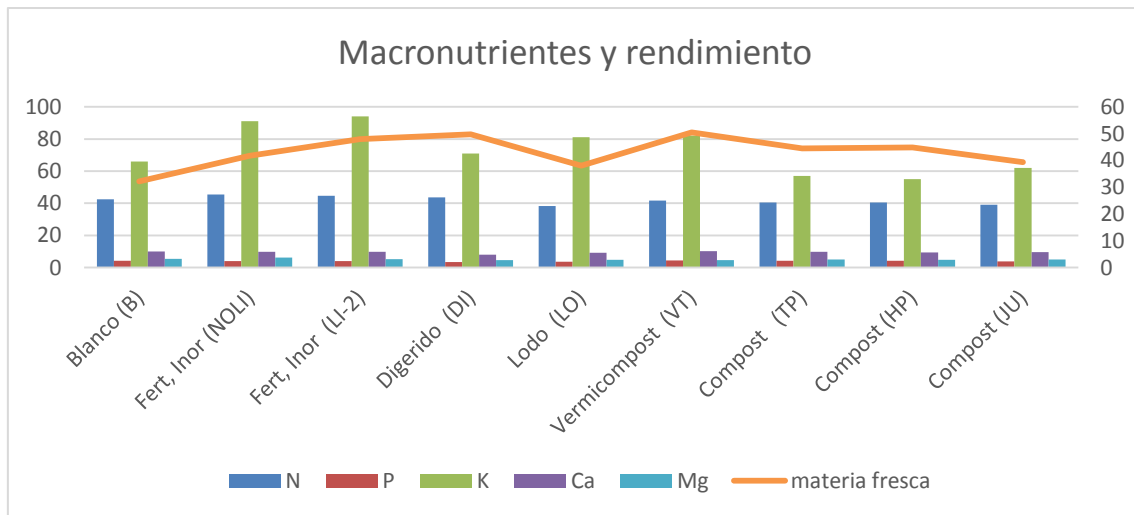


Figura 14. Correlación macronutrientes y rendimiento materia fresca.

Además, comprobamos la relación de los nitratos en hoja y el rendimiento en materia fresca. En la figura 15, se comprueba que existe una relación inversa entre el aumento de los nitratos en hoja y la disminución de rendimiento en hojas. El aumento de nitratos en hoja puede estar ocasionada por diversas causas, como ciertos microelementos que afectan al proceso de reducción de nitratos como son el molibdeno (Mondy et al, 1993), el hierro (Sikora et al, 1999) y el sodio (Tarakcioglu et al, 2002). Cada uno de ellos interviene de un modo distinto y su importancia es diferente. Pero en este caso, los niveles más elevados de nitratos corresponden a los fertilizantes orgánicos menos estabilizados, y que por lo tanto liberan el nitrógeno de forma incontrolada. El contenido de nitratos en plantas es comúnmente visto como resultado del desequilibrio entre absorción neta y tasa de asimilación (Cárdenas-Navarro *et al.*, 1999).

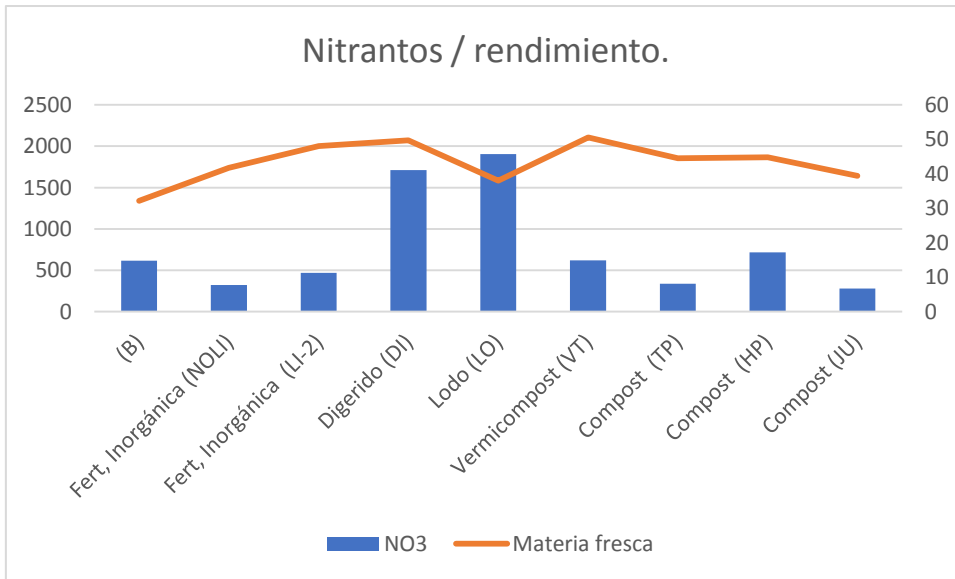


Figura 15. Relación de nitratos en hoja con rendimiento en materia fresca.



4.4 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Tabla 13. Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos.

Tratamiento	GAE	TEAC	FRAP
	g	mmoles de eq de trolox /100g MS	mmoles de FeSO4/100g MS
	GAE/100g MS	trolox /100g MS	MS
Blanco (B)	0,83ab	4,3b	1,47ab
Fert, Inorgánica (NOLI)	0,72a	<u>3,3a</u>	1,69bc
Fert, Inorgánica Nitrofoska (LI-2)	0,71a	4,3b	1,38a
Digerido Agrowaste (DI)	0,69a	3,5a	1,46ab
Lodo depuradora (LO)	0,85bc	4,6b	1,83c
Vermicompost comercial (VT)	0,83bc	5,7c	1,63bc
Compost Lodo+TP 30/70 ms (TP)	0,80b	4,8b	1,56ab
Compost Lodo+HP 36/64 ms (HP)	0,85bc	5,9c	<u>1,37a</u>
Compost vegetal (JU)	0,89c	6,3c	1,51ab
<i>F-anova y significación</i>	<i>11.4***</i>	<i>45***</i>	<i>7,2***</i>

Letras diferentes en una columna indican diferencias e.s. con una $p \leq 0.05$.

ns: no significativo; *: significativo ($p \leq 0.05$); **: significativo ($p \leq 0.1$).

GAE: equivalentes de ácido gálico.

TEAC: capacidad antioxidante en equivalentes TROLOX.

FRAP: determinante de la capacidad reductora férrica.

Para determinar los fenoles totales se utilizó el reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteu, la mayor concentración de fenoles se obtuvo en el sombrero del compost vegetal (JU), y después en el sombrero del lodo de depuradora fresco (LO) y en el compost (HP), con valores de 0.89 y 0.85 gramos equivalentes de ácido gálico en 100 gramos de espinaca, respectivamente. Este reactivo no solo mide los fenoles totales, sino que reaccionará con cualquier sustancia reductora y, en consecuencia, el reactivo mide la capacidad reductora total de una muestra, no solo el nivel de compuestos fenólicos, pudiendo actuar como un reactivo no específico oxidando otro tipo de compuestos como azúcares o aminas (Apak et al, 2007).

La alta tasa de fenoles para el lodo fresco (LO), podría estar relacionada con una respuesta fisiológica de la planta a la presencia de condiciones más estresantes, en términos de déficit de absorción de minerales (Sofo et al, 2016). Otra posibilidad no estudiada en este caso podría deberse a la fitotoxicidad causada por metales pesados, generando una respuesta fisiológica por parte de la planta.

La capacidad antioxidante obtenida mediante el ensayo TEAC varían entre 3 y 6 mmoles equivalentes de Trólox por cada 100 gramos de espinaca. Se han eliminado los resultados poco fiables que mediante análisis estadístico riguroso se demuestra que estos valores no deben considerarse. El compost vegetal (JU) es el que mayor capacidad antioxidante muestra, seguida del vermicompost (VT). La fertilización mineral (NOLI) sin embargo consigue valores por debajo del blanco, al igual que el digerido (DI).

En las figuras 16 y 17, podemos ver que los fenoles totales medidos con el método de FOLIN y la capacidad antioxidante TEAC, están correlacionadas, ya que las gráficas siguen la misma trayectoria, demostrando así que los compost y los vermicompost obtienen mejor capacidad antioxidante.

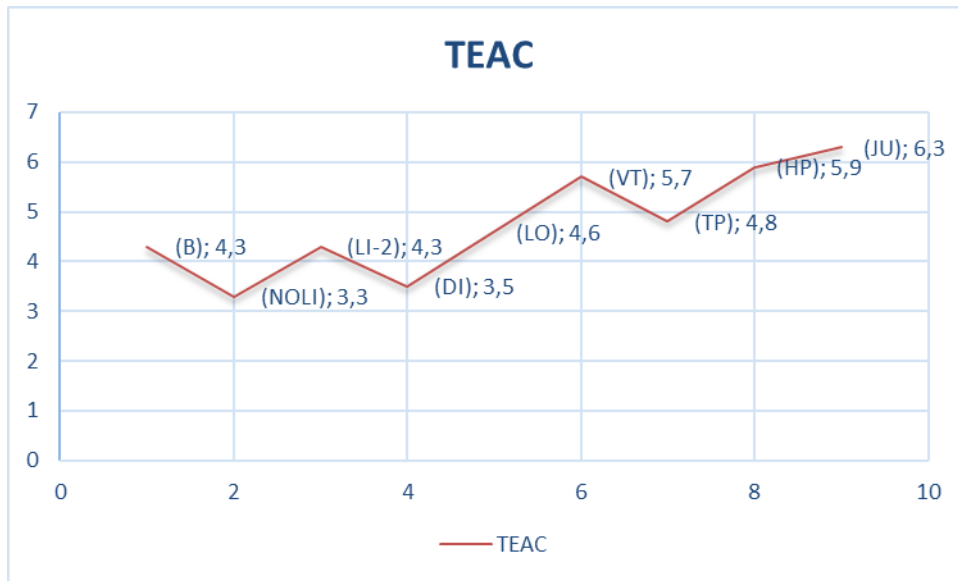


Figura 16. Capacidad antioxidante en equivalentes TROLOX.

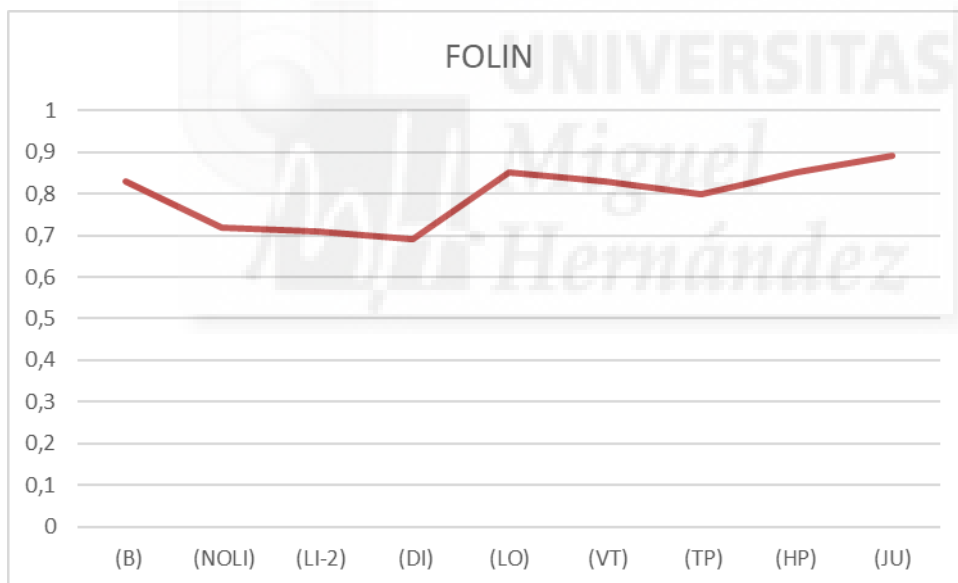


Figura 17. Fenoles totales.

La capacidad reductora férrica, que se midió en mmoles de FeSO_4 en 100g de materia seca, estimó que la mayor capacidad antioxidante ha conseguido fue la fertilización con lodo de depuradora al igual que en el método de Folin-Ciocalteu que lo situaba en un segundo puesto. Por otro lado, en el punto más bajo encontramos el compost (HP). En la figura 18, comprobamos que la correlación con los métodos FOLIN y TEAC, se encuentra un poco desplazada, probablemente es debido a que está técnica no

puede determinar aquellos compuestos que actúan por transferencia de átomos de hidrógeno.

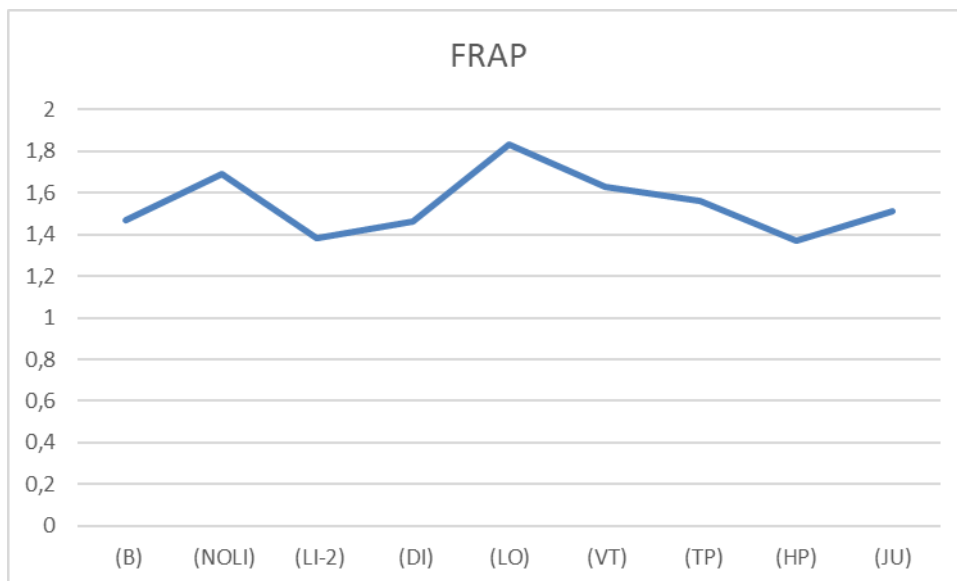


Figura 18. Determinación de la capacidad reductora férrica.

Las muestras estudiadas en el presente trabajo contienen gran cantidad de fenoles, y alta actividad antioxidante, tal como se ha comprobado en los métodos de FOLIN, TEAC y FRAP.

Existe una correlación negativa, entre el nitrógeno en hoja y la concentración de fenoles $R^2 = 0.75$ (Figura 19), cuanto más nitrógeno en hoja, menor concentración de polifenoles. Sin embargo, en la figura 20, la correlación entre el Zn y el Fe no es representativa en la concentración de fenoles, probablemente debido a que las diferencias de los fertilizantes orgánicos y los inorgánicos en cuanto a microelementos es baja.

No es sorprendente la correlación entre el contenido mineral de plantas y la biosíntesis y acumulación de fenoles, se incrementan generalmente por condiciones medioambientales adversas, tales como bajos niveles de nutrientes, particularmente N y microelementos metálicos (Ruiz et al., 2003; Velicković et al., 2014; Wada et al., 2014).

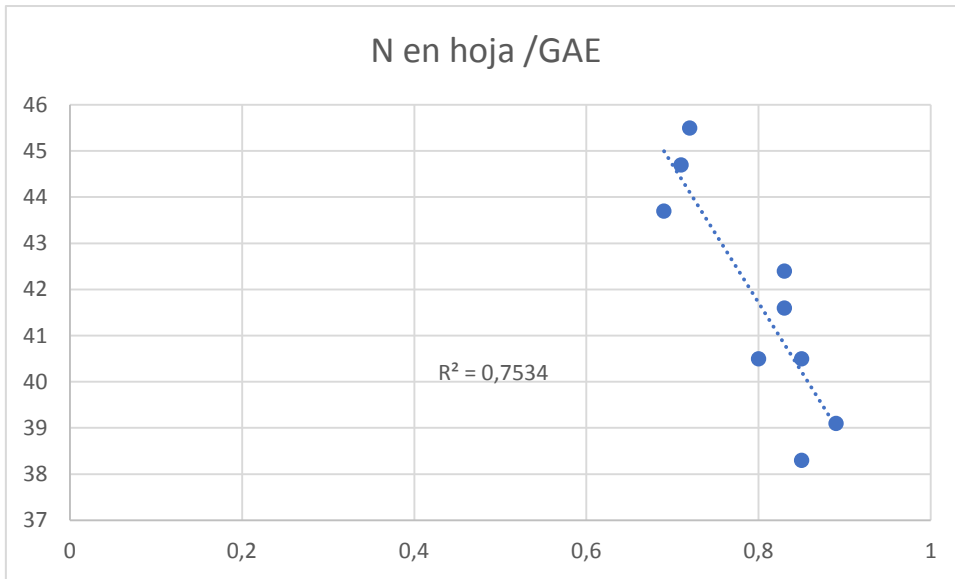


Figura 19. Correlación nitrógeno y concentración de polifenoles.

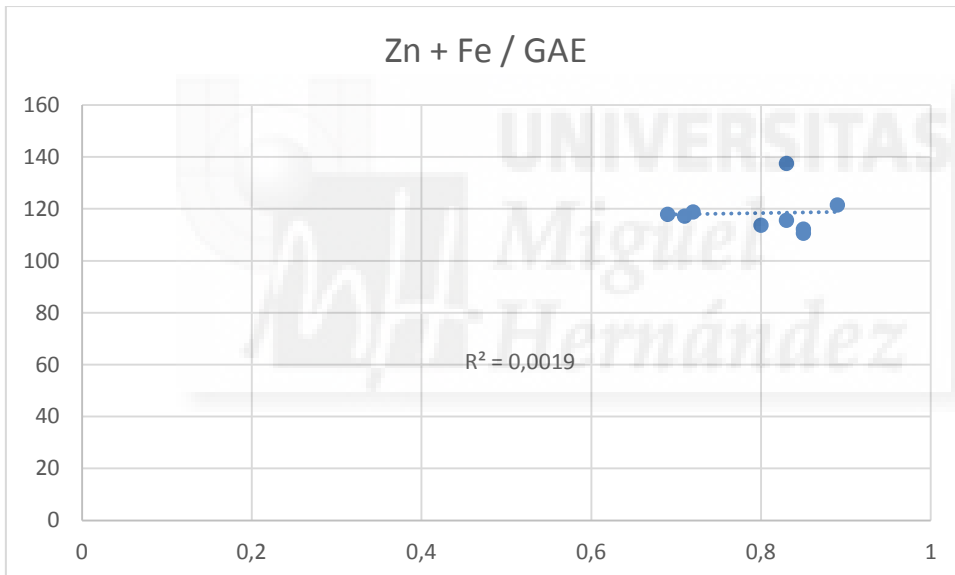


Figura 20. Correlación (Zn + Fe) y concentración de polifenoles.

CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

- Los rendimientos en espinaca fueron más altos en los suelos tratados orgánicamente que en los suelos que sólo recibieron fertilización inorgánica, exceptuando el lodo fresco por no estar suficientemente estabilizado.
- Los fertilizantes orgánicos fueron capaces de suministrar nutrientes suficientes para obtener rendimientos similares a los obtenidos en los fertilizantes inorgánicos.
- Se observa que las enmiendas orgánicas avanzadas (compost y vermicompost) tienen un comportamiento muy similar a los fertilizantes complejos NPK de liberación lenta.
- La cantidad de nitratos en hoja para los fertilizantes orgánicos está dentro de los parámetros autorizados para la comercialización de la espinaca en fresco o para su procesado. Para evitar aumentos de nitratos, se debe utilizar una estrategia de fertilización que evite los fertilizantes orgánicos frescos y los fertilizantes inorgánicos sin liberación lenta.
- La química de la espinaca se ve favorecida por los fertilizantes orgánicos, siendo mayor el número de cationes inorgánicos; Fe, Cu y Zn. Son cationes responsables de las reacciones de eliminación de radicales para su papel de cofactores en algunas enzimas antioxidantes.
- En el caso de K, Na, Ca, Mg, y P, que son esenciales para el organismo humano se encuentran en proporciones similares entre orgánicos e inorgánicos, no obstante el vermicompost (VT) es el que más concentración presenta.
- De las muestras estudiadas, el compost vegetal (JU) obtiene más cantidad de fenoles totales, por lo tanto tiene mayor capacidad antioxidante, además todos los fertilizantes orgánicos muestran tasas más altas de polifenoles que la fertilización inorgánica. No obstante, cabe destacar que la composición en un compost es muy variable debido a su naturaleza, y una buena estabilización del compost puede equilibrar los rendimientos y la obtención de polifenoles, aumentando así su valor añadido al disponer de mayor tasa de antioxidantes.
- El estrés en las plantas aumenta el contenido en polifenoles, y disminuye su rendimiento, por lo que una selección de variedades genéticas más adaptadas a

situaciones de estrés y un compost equilibrado, conseguiría un valor añadido a un cultivo más sostenible.

- El nitrógeno de naturaleza orgánica provoca un mayor rendimiento productivo en espinacas.



BIBLIOGRAFÍA



6. BIBLIOGRAFIA

- Andrade, M.L, Fernández, E., Alonso, M.F., (2005). Influencia del manejo agrícola intensivo en la contaminación del suelo. Departamento de biología vegetal y ciencia del suelo, Vigo (España) Revista Pilquen, sección agronomía, año VII, nº 7.
- Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I., Ozyurt, D., (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12: 1496-1547.
- Avance del anuario de estadística 2016 del mapama. <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/#para1>
- Benzie, I.F.F., J.J, Strain., (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239(1): 70-76.
- Cardenas-Navarro R., Adamowicz S., Robin P., (1999). Nitrate accumulation in plants: a role for water, *J. Exp. Bot.* 50, 613–624.
- Català, E., Pla M., Martínez, V., Forés, N. Tomàs., (2012). Fertilización del arroz con gallinaza, una alternativa en alza. IRTA -Estación Experimental del Ebro Ctra. Balada, km 1. E-43870. Amposta (Tarragona).
- Chand S., Anwar M., Patra D., (2006). Influence of Long-Term Application of Organic and Inorganic Fertilizer to Build Up Soil Fertility and Nutrient Uptake in Mint-Mustard Cropping Sequence. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37:63-76.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J., (2002). Estimation of totalflavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, *J. Food Drug Anal.* 10 178–182.
- Cho M.J., Howard, L.R., Prior, R.L., Morelock, T., (2008). Flavonoid content and antioxidant capacity of spinach genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Department of Food Science,

- University of Arkansas, 2650 N Young Avenue, Fayetteville, AR 72704, USA. *Journal of the Science of Food and Agriculture, J Sci Food Agric* 88:1099–1106.
- Citak, S., Sonmez, S., (2010). Effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. Akdeniz University, Faculty of Agriculture, Soil Science Department, Antalya, Turkey. *Scientia Horticulturae* nº 126 415–420.
 - Cruz, R., Gomes, T., Ferreira, A., Mendes, E., Baptista, P., Cunha, S., Baptista, P., et al. (2014). Antioxidant activity and bioactive compounds of lettuce improved by espresso coffee residues. *Food Chemistry*, 145, 95–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.038>.
 - De Acosta, J. (1590) *Historia natural y moral de las Indias*. En que se tratan de las cosas notables del cielo, elementos, metales, plantas y animales dellas y de los ritos y ceremonias y leyes y gobierno de los indios, Sevilla, Juan de León.
 - Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Oagnon, S., Gesheva, E., (2008). Stress-protection role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiol.*, 34, 67-78.
 - European Food Safety Authority (EFSA), (2010). Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *EFSA Journal* 2010;8(12):1935. Parma, Italy.
 - F.A.O. (2014). Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/>.
 - Fernández, M.A., Soria, A., (2011). La contaminación de las aguas por nitratos procedentes de fuentes de origen agrario. Servicio de Formación y Transferencia Tecnológica, Oficina Comarcal Huerta de Murcia. <https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=8996&IDTIPO=246&RASTRO=c2155m1259,20559>.
 - Fiehn, O., (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genom.* 2, 155- 68.
 - Fundación Española de la nutrición, pág.: 173-174, visto el 8 de mayo de 2017 www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/espinacas.pdf.

- Georgios C. Pavlou A., Constantinos D. Ehaliotis B, Victor A., Kavvadias., (2007). Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. National Agricultural Research Foundation (N.A.G.R.E.F.), Olive and Horticultural Crops Institute, Lakonikis 87, Kalamata 24100, Greece, Agricultural University of Athens, Soil Science and Agricultural Chemistry Lab., Iera Odos 75, Athens 11855, Greece. *Scientia Horticulturae* 111 319–325.
- Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España (2010) pág 184. [http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/02_FERTILIZACI%C3%93N\(BAJA\)_tcm7-207770.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/02_FERTILIZACI%C3%93N(BAJA)_tcm7-207770.pdf)
- Hagerman, A.E., Robbins, C.T., (1987). Implications of soluble Tanin-protein complexes for tannins analysis and plants defense mechanisms. *J. Chem. Ecol* Nº 13 pags 1243-1259.
- Harinder, P., Makkar, S. (1989). Protein precipitation methods for quantitation of tannins: a review. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37 (4), pp 1197–1202
- Harper, L., Shape,R., Langdale,G., Giddens, J., (1987). Nitrogen cycling in a wheat crop: soil, plant, and herbagenitrogen transport. *Agronomy Journal* 79: 965-973.
- Hernández, T., Chocano, C., Moreno, J.L., García, C., (2016). Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (*Lactuca sativa* L.) crops—Effects on soil and plant. Department of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, CEBAS-CSIC, P.O. Box 164, 30100 Espinardo, Murcia, Spain.
- Howard, L.R., Pandjaitan, N., Morelock, T., Gil, M.I., Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and growing season. *J Agric Food Chem* 50:5891–5896 (2002).
- <http://es.eurochemagro.com/productos/entec/entec-nitrofoska-21/>
- <http://www.aecosan.msssi.gob.es>
- http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,543,m,2714&r=ReP-20448-DETALLE_REPORTAJESPADRE

- Imagen Guadalentín:
<http://www.atlasdemurcia.com/index.php/secciones/6/bajo-guadalentin-mazarron/>
- Imagen hojas: <http://www.rijkzwaan.fr>
- Kelly, S.D., Bateman, A.S., (2010). Comparison of mineral concentrations in commercially grown organic and conventional crops—tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and lettuces (*Lactuca sativa*). *Food Chem.* 119, 738–745.
- Kidmose, U., Knuthsen, P., Edelenbos, M., Justesen, U., Hegelund, E., Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L) genotypes after deep frozen storage. *J Sci Food Agric* 81:918–923 (2001).
- Kitson, R.E., Mellon, M.G., (1944). Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphonic acid. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 16: 379-383
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9, Supplement 2), 71–88.
- Lampkin, N., (2002). *Organic Farming*. Old Pond Publishing, Ipswich, United Kingdom.
- Laporta, O., Pérez-Fons, L., Mallavia, R., Caturla, N., Micol, V., (2007). Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato). *Food Chemistry* 101 (2007) 1425–1437.
- Linnaeus, C., (1753). *Species plantarum*.
- Makkar, H., (1989). Protein precipitation methods for quantitation of tannins: A review. *J. agric. Food Chems.* Nº37 pags 1197-1202.
- Merchant, A., Richter, A., Popp, M., Adams, M., (2006). Targeted metabolite profiling provides a functional link among eucalypt taxonomy, physiology and evolution. *Phytochemistry*, 67, 402-8.

- Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 52:673–751.
- Mondy, N.I., Munshi, C.B., (1993). Effect of soil and foliar application of molybdenum on the glycoalkaloid and nitrate concentration of potatoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 41: 256-258.
- Montemurro, F., Ciaccia, C., Fraissa, D., Lamaison, J. L., Rock, E., Michel, H., Amouroux, P., et al. (2015). Suitability of different organic amendments from agro-industrial wastes in organic lettuce crops. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 102, 243–252. <http://dx.doi.org/10.1007/s10705-015-9694-5>.
- Mujeriego, R., (1990). *Manual Práctico de Riego con Agua Residual Municipal Regenerada*. Ediciones de la Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona
- Näsholm, T., Kielland, K., Ganeteg, U., (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *N. Phytol.* 182, 31–48.
- Nicoletto, C., Santagata, S., Zanin, G., & Sambo, P. (2014). Effect of the anaerobic digestion residues use on lettuce yield and quality. *Scientia Horticulturae*, 180, 207–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.028>.
- Origen de la espinaca: <http://www.mapama.gob.es/app/materialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?lng=es&IdFicha=2530>.
- Persson, J., (2006). Uptake, metabolism and distribution of organic and inorganic nitrogen sources by *Pinus sylvestris*. *J. Exp. Bot.* 57, 2651–2659.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N., (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences,
- Reeve, J.R., Smith, J.L., Carpenter-Boggs, L., Reganold, J.P., (2009). Glycine, nitrate, and ammonium uptake by classic and modern wheat varieties in a short-term microcosm study. *Biol. Fert. Soils* 45, 723–732.

- Ruiz, J.M., Rivero, R.M., Lopez-Cantarero, I., Romero, L., (2003). Role of Ca²⁺ metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Growth Regul.* 41, 173–177.
- Sancho, E., (2012). Esta tierra ha sabido sobreponerse a la falta de agua y suelos pobres con técnicas avanzadas. Artículo de prensa del Diario de Almería. http://www.elalmeria.es/almeria/sobreponerse-suelos-pobres-tecnicas-avanzadas_0_614938942.html.
- Sikora, E., Cieslik, E., (1999). Correlation between the levels of nitrates and nitrites and the contents of iron, copper and manganese in potato tubers. *Food chemistry*, 67: 301- 304.
- Sofo, A., Lundegårdh, B., Mårtensson, A., Manfra, M., Pepe, G., Sommella, E., De Nisco, M., Tenore, G.C., Campiglia, P., Scopa, A.,(2016). Different agronomic and fertilization systems affect polyphenolic profile, antioxidant capacity and mineral composition of lettuce. School of Agricultural, Forestry, Food and Environmental Sciences, University of Basilicata, Viale dell'Ateneo Lucano, 10, I-85100 Potenza, Italy. *Scientia Horticulturae* nº 204 106–115.
- Stagnari, F., Di Bitetto V., Pisante, M. (2007). Effects of N fertilizers and rates on yield, safety and nutrients in processing spinach genotypes. Department of Food Science, Faculty of Agriculture, University of Teramo, Via Carlo Lerici 1, I 64023 Mosciano S. Angelo, Teramo, Italy. *Scientia Horticulturae* 114 225–233.
- Suhaj, M., (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity, *J. Food Composition and Analysis* 19 531–537.
- Tarakcioglu, C., Inal, A., (2002). Changes induced by salinity, demarcating specific ion ratio (Na/Cl) and osmolality in ion and proline accumulation, nitrate reductase activity, and growth performance of lettuce. *Journal plant nutr.*, 25: 27-41.
- Velicković, J.M., Dimitrijević, D.S., Mitić, S.S., Mitić, M.N., Kostić, D.A., 2014. The determination of the phenolic composition, antioxidative activity and heavy metals in the extracts of *Calendula officinalis* L. *Adv. Technol.* 3, 46–51.
- Vico, A., Sáez J.A., Pérez M.D., Martínez, J., Pérez, A., Andreu, J., Agulló E., Bustamante, M.A., Paredes, C., Sanz, A., Mora, R. (2016). Producción de

espinaca en agricultura intensivista en el sureste español: implicaciones medioambientales y agronómicas de las prácticas de fertilización orgánica. Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, 2-Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, 3-Departamento de Ingeniería, Universidad Miguel Hernández. Pendiente de publicación.

- Vico, A., Barrajon, A., Marhuenda, F.C., Martinez, J., Jose Antonio Sáez, J.A., Pérez, M.D., Pérez, A., Andreu, J., Agulló, E., Bustamante, M.A., Paredes, C. Micol, V. Moral, R. (2017). Nutritional and functional effects of different fertilization systems on spinach under mediterranean intensive production. Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, 2-Departamento de Producción Vegetal y Microbiología, 3-Departamento de Ingeniería, Universidad Miguel Hernández. Pendiente de publicación.
- Wada, K.C., Mizuuchi, K., Koshio, A., Kaneko, K., Mitsui, T., Kaneko, T., (2014). Stressenhances the gene expression and enzyme activity of phenylalanineammonia-lyase and the endogenous content of salicylic acid to induceflowering in pharbitis. J. Plant Physiol. 171, 895–902.
- Warman, P.R., Cooper, J.M., (2000). Fertilization of a mixed forage crop with fresh and composted chicken manure and NPK fertilizer: Effects on dry matter yield and soil and tissue N, P and K. Cánada Journal Soil Science. 80: 337-344.
- Xiaosong Liu, Xiao Yanga, Limin Wanga, Qingqing Duana, Danfeng Huang., (2016). Comparative analysis of metabolites profile in spinach (*Spinacia oleracea* L.) affected by different concentrations of gly and nitrate. A Department of Plant Science, School of Agriculture & Biology, Shanghai Jiao Tong University, Dongchuan Road 800, Shanghai 200240, China. Scientia Horticulturae nº 204 8–15.