



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA

Calidad y Autenticidad de Pimiento (*Capsicum annum* L.) y Lechuga (*Lactuca sativa* L.) Cultivados bajo Sistemas de Producción Sostenibles

D^a. Alicia López Martínez

2014



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Francisco Javier García Alonso, Profesor Contratado Doctor de la Universidad de Murcia del Área de Nutrición y Bromatología, del Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología.

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Calidad y autenticidad de pimiento (*Capsicum annum* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivados bajo sistemas de producción sostenibles**”, realizada por D^a Alicia López Martínez, bajo mi tutela académica y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.



En Murcia a 3 de diciembre de 2013

D^a. M^a Pilar Flores Fernández-Villamil y D. José Fenoll Serrano,
Investigadores del Equipo de Calidad Alimentaria del Instituto Murciano de
Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA),

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Calidad y autenticidad de pimiento (*Capsicum annum* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivados bajo sistemas de producción sostenibles**”, realizada por D^a Alicia López Martínez, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de diciembre de 2013



Dra. M^a Pilar Flores Fernández-Villamil



Dr. José Fenoll Serrano

Las siguientes publicaciones recogen los resultados obtenidos durante la realización de la presente Tesis doctoral:

Flores, P., Hellin, P., Lacasa, A., Lopez, A., Fenoll, J. 2009. Pepper antioxidant composition as affected by organic, low-input and soilless cultivation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 2267-2274.

Flores, P., Hellin, P., Lacasa, A., Lopez, A., Fenoll, J. 2009. Pepper mineral composition and sensory attributes as affected by agricultural management. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 2364-2371.

Fenoll, J., López, A., Hellín, P., Flores, P. 2011. Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* 127, 340-344.

López, A., Fenoll, J., Hellín, P., Flores, P. 2013. Physical characteristics and mineral composition of two pepper cultivars under organic, conventional and soilless cultivation. *Scientia Horticulturae* 150, 259-266.

Flores, P., López, A., Fenoll, J., Hellín, P., Kelly, S. 2013. Classification of organic and conventional sweet peppers and lettuce using a combination of isotopic and bio-markers with multivariate analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* 31, 217-225.

López, A., García-Alonso, J., Fenoll, J., Hellín, P., Flores, P. En prensa. Chemical composition and antioxidant capacity of lettuce: Comparative study of regular-sized (Romaine) and baby-sized (Little Gem and Mini Romaine) types. *Journal of Food Composition and Analysis* 33, 39-48. DOI: 10.1016/j.jfca.2013.10.001.

López, A., Fenoll, J., Hellín, P., Flores, P. En revisión. Cultivation approach for comparing the nutritional quality of two pepper cultivars grown under different agricultural regimes.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL SECTOR AGROALIMENTARIO EN LA REGIÓN DE MURCIA	1
1.1.1. Cultivo de pimiento	2
1.1.1.1. Origen, morfología y taxonomía	2
1.1.1.2. Importancia económica	5
1.1.2. Cultivo de lechuga	5
1.1.2.1. Origen, morfología y taxonomía	5
1.1.2.2. Importancia económica	6
1.2. NUTRIENTES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS	8
1.2.1. Azúcares	8
1.2.2. Ácidos orgánicos	8
1.2.3. Vitamina C	9
1.2.4. Compuestos fenólicos	11
1.2.4.1. Flavonoides	12
1.2.4.2. No Flavonoides	13
1.2.5. Folatos	15
1.2.6. Carotenoides	17
1.2.7. Clorofilas	19
1.3. FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LOS VEGETALES	20
1.3.1. Factores genéticos	21
1.3.2. Factores fisiológicos	21
1.3.3. Factores ambientales	22
1.3.4. Factores agronómicos	23
1.3.4.1. Frecuencia de riego, poda y aclareo	23
1.3.4.2. Fertilización	24
1.3.4.3. Cultivo bajo invernadero	25
1.3.4.4. Sistemas de cultivo	26
1.3.4.4.1. Producción Integrada	26
1.3.4.4.2. Agricultura Ecológica	30
1.3.4.4.3. Cultivo sin suelo	33
1.4. AUTENTICIDAD DE PRODUCTOS VEGETALES ECOLÓGICOS	34

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	39
CAPÍTULO 3. TÉCNICAS ANALÍTICAS	41
3.1. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MINERAL EN MATERIAL VEGETAL	41
3.1.1. Cationes y fósforo total	41
3.1.2. Aniones	41
3.1.3. Nitrógeno total	42
3.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS	42
3.2.1. Peso fresco, peso seco y contenido en agua	42
3.2.2. Calibre ecuatorial y longitudinal	43
3.2.3. Color	43
3.2.4. Espesor de pulpa	44
3.2.5. Firmeza	44
3.3. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LAS FRACCIONES HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA	44
3.3.1. Separación de fracciones hidrofílica y lipofílica	44
3.3.2. Determinación de la actividad antioxidante	45
3.3.2.1. Análisis de la actividad antioxidante mediante ABTS	45
3.3.2.2. Análisis de la actividad antioxidante mediante FRAP	46
3.3.3. Determinación de carotenoides totales y clorofilas	47
3.3.4. Determinación de compuestos fenólicos totales	47
3.3.5. Determinación de azúcares solubles	48
3.3.6. Determinación de ácidos orgánicos	48
3.4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS	49
3.4.1. Extracción	49
3.4.2. Determinación	49
3.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE CAROTENOIDES	50
3.5.1. Extracción	50
3.5.2. Determinación	51
3.6. DETERMINACIÓN DE VITAMINA C	51

3.6.1. Extracción	51
3.6.2. Determinación	52
3.7. DETERMINACIÓN DE FOLATOS	52
3.7.1. Extracción	53
3.7.2. Desconjugación	53
3.7.2.1. Extracción del enzima conjugasa en tejido renal	53
3.7.2.2. Procedimiento de descojugación	54
3.7.3. Purificación	54
3.7.4. Determinación	54
3.8. ANÁLIS DE LA ABUNDANCIA NATURAL DE ISÓTOPOS ESTABLES ($\delta^{15}\text{N}$)	55
3.9. IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRUTOS DE PIMIENTO	56
3.9.1. Extracción	56
3.9.2. Identificación	56
CAPÍTULO 4. CALIDAD DE PIMIENTO BAJO SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA, CONVENCIONAL Y SIN SUELO	57
4.1. APROXIMACIÓN COMERCIAL	58
4.1.1. Material y métodos	58
4.1.1.1. Sitio de estudio y material vegetal	58
4.1.1.2. Manejo del cultivo	60
4.1.1.3. Diseño experimental	61
4.1.1.4. Análisis estadístico	62
4.1.2. Resultados	62
4.1.2.1. Control de la gestión agrícola y producción	62
4.1.2.2. Composición mineral en hoja	64
4.1.2.3. Composición mineral en fruto	65
4.1.2.4. Propiedades físicas del fruto	68
4.1.2.5. Azúcares solubles	70
4.1.2.6. Ácidos orgánicos	73
4.1.2.7. Compuestos fenólicos totales	75

4.1.2.8. Clorofilas y carotenoides totales	76
4.1.2.9. Actividad antioxidante	76
4.1.2.10. Correlaciones	78
4.1.3. Discusión	78
4.2. APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL	84
4.2.1. Material y métodos	84
4.2.1.1. Sitio de estudio, material vegetal y diseño experimental	84
4.2.1.2. Manejo del cultivo	84
4.2.1.2.1. Ensayo 1: ecológico vs convencional	84
4.2.1.2.2. Ensayo 2: suelo vs sin suelo	85
4.2.1.3. Recolección y preparación de las muestras	86
4.2.1.4. Análisis estadístico	86
4.2.2. Resultados	87
4.2.2.1. ecológico vs convencional	89
4.2.2.2. suelo vs sin suelo	97
4.2.3. Discusión	104
4.2.3.1. ecológico vs convencional	105
4.2.3.2. suelo vs sin suelo	109
4.3. CONCLUSIONES	111
CAPÍTULO 5. VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE LECHUGA	113
5.1. MATERIAL Y MÉTODOS	114
5.1.1. Material vegetal	114
5.1.2. Análisis estadístico	116
5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
5.3. CONCLUSIONES	131
CAPÍTULO 6. DISCRIMINACIÓN DE PIMIENTO Y LECHUGA ECOLÓGICOS Y CONVENCIONALES	133
6.1. MATERIAL Y MÉTODOS	134

6.1.1. Diseño experimental	134
6.1.2. Recolección y preparación de muestras	136
6.1.3. Análisis estadístico	136
6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	136
6.2.1. Composición isotópica de las fuentes de N	136
6.2.2. Pimiento	137
6.2.3. Lechuga	142
6.3. CONCLUSIONES	149
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES	151
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA	155

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1.** Distribución de la producción de cultivos herbáceos en la Región de Murcia.
- Figura 1.2.** Distribución de la producción de cultivos hortalizas en la Región de Murcia.
- Figura 1.3.** Pimiento (*Capsicum annuum* L.): (A) planta, (B) flor, (C) semillas, (D) fruto tipo California, (E) fruto tipo Lamuyo y (F) fruto tipo italiano.
- Figura 1.4.** Tipos de lechuga: (A) Romana, (B) Mini Romana, (C) Little Gem, (D) Trocadero, (E) Batavia, (F) Iceberg y (G) Hoja de Roble.
- Figura 1.5.** Oxidación del ácido ascórbico a dehidroascórbico.
- Figura 1.6.** Clasificación de los compuestos fenólicos.
- Figura 1.7.** Estructura básica de los principales grupos de flavonoides.
- Figura 1.8.** Estructura básica de los ácidos fenólicos.
- Figura 1.9.** Estructura básica de los taninos hidrolizables.
- Figura 1.10.** Estructura básica de los estilbenos.
- Figura 1.11.** Estructura básica de los folatos.
- Figura 1.12.** Estructura de los principales carotenoides.
- Figura 1.13.** Estructura de la clorofila.
- Figura 1.14.** Evolución de la superficie de Producción Integrada en la Región de Murcia.
- Figura 1.15.** Distribución por tipo de cultivo de la superficie de Producción Integrada.
- Figura 1.16.** Distribución de cultivos de hortalizas en Producción Integrada.
- Tabla 1.1.** Evolución de la superficie inscrita en Agricultura Ecológica (ha).

Tabla 1.2. Evolución de la superficie de Agricultura Ecológica según tipo de cultivo (ha).

Tabla 1.3. Evolución del número de operadores en Agricultura Ecológica.

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Espacio de color CIELab.

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Localización de los invernaderos comerciales seleccionados para el estudio.

Figura 4.2. Radiación neta (%) y temperatura media (°C) diaria durante los ciclos de cultivo correspondientes a los años 2005 (líneas continuas) y 2006 (líneas punteadas).

Figura 4.3 Efecto de los sistemas de cultivo, ecológico (morado) y convencional (naranja), y de la época de muestreo, al principio (círculos), mediados (triángulos) y final (cuadrados) del ciclo de cultivo, sobre los valores cromahue en Almudén (A) y Quito (B).

Figura 4.4. Efecto de los sistemas de cultivo, suelo (naranja) y sin suelo (verde), y de la época de muestreo, al principio (círculos) y final (triángulos) del ciclo de cultivo, sobre los valores cromahue en Almudén (A) y Quito (B).

Tabla 4.1. Rango de valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) en hoja de invernaderos comerciales seleccionados para el estudio, bajo cultivo ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS).

Tabla 4.2. Valores máximo y mínimo del rendimiento total (kg m^{-2}), de pimientos de invernaderos comerciales seleccionados para el estudio, bajo cultivo ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) durante los años 2005 y 2006.

- Tabla 4.3.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) en hoja.
- Tabla 4.4.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) de pimiento verde.
- Tabla 4.5.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) de pimiento rojo.
- Tabla 4.6.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm), parámetros de color ($L^*\ a^*\ b^*$) y contenido en agua (%) en pimiento verde.
- Tabla 4.7.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm), parámetros de color ($L^*\ a^*\ b^*$) y contenido en agua (%) en pimiento rojo.
- Tabla 4.8.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa ($mg\ g^{-1}$) en pimiento verde.

- Tabla 4.9.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa ($mg\ g^{-1}$) en pimiento rojo.
- Tabla 4.10.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la concentración de ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico y compuestos fenólicos totales, expresado como $mg\ g^{-1}PF$, clorofilas y carotenoides totales (β -caroteno), expresado como $\mu g\ g^{-1}PF$, en pimiento verde.
- Tabla 4.11.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la concentración de ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico y compuestos fenólicos totales, expresado como $mg\ g^{-1}PF$, clorofilas y carotenoides totales (β -caroteno), expresado como $\mu g\ g^{-1}PF$, en pimiento rojo.
- Tabla 4.12.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante hidrofílica (AAH), expresada como equivalentes de ascórbico (AEAC), y la actividad antioxidante lipofílica (AAL), expresada como equivalentes de Trolox (TEAC), en pimiento verde y rojo.
- Tabla 4.13.** Valores de significancia (P) según el test de Pearson para las correlaciones entre la actividad antioxidante (AAH y AAL) y la concentración de compuestos antioxidantes, como compuestos fenólicos totales, ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico, clorofilas y β -caroteno.
- Tabla 4.14.** Características iniciales del suelo (después de la biofumigación y antes del comienzo del cultivo).

- Tabla 4.15.** Parámetros físicos y composición mineral de pimiento Almuden (A) y Quito (Q): Peso del fruto (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor de la carne (Esp; mm), parámetros de color ($L^* a^* b^*$), hue (h°), croma (C) y concentración mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$).
- Tabla 4.16.** Composición nutricional de pimiento Almudén y Quito bajo cultivo ecológico, convencional y sin suelo. Actividad antioxidante en la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox* g^{-1} , concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu g\ g^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como $mg\ g^{-1}$.
- Tabla 4.17.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) de pimiento Almudén.
- Tabla 4.18.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) de pimiento Quito.
- Tabla 4.19.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm) y parámetros de color ($L^* a^* b^*$) en pimiento Almudén.
- Tabla 4.20.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm) y parámetros de color ($L^* a^* b^*$) en pimiento Quito.

- Tabla 4.21.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox g⁻¹*, concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu\text{g g}^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como mg g^{-1} , en pimiento Almuden.
- Tabla 4.22.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox g⁻¹*, concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu\text{g g}^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como mg g^{-1} , en pimiento Quito.
- Tabla 4.23.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($\text{mmol kg}^{-1}\text{PS}$) en Almudén.
- Tabla 4.24.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($\text{mmol kg}^{-1}\text{PS}$) en Quito.
- Tabla 4.25.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; kg cm^{-2}), espesor (Esp; mm) y parámetros de color (L* a* b*) en Almudén.
- Tabla 4.26.** Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo,

sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm) y parámetros de color (L^* a^* b^*) en Quito.

Tabla 4.27. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox* g^{-1} , concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu g\ g^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como $mg\ g^{-1}$, en pimiento Almuden.

Tabla 4.28. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox* g^{-1} , concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu g\ g^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como $mg\ g^{-1}$, en pimiento Quito.

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Representación de valores cromático en hojas externas (A) e internas (B) de lechuga Romana (●), Mini Romana (■) y Little Gem (▲). Los cultivares son Carrascoy (a), España (b), Aitana (c), Collado (d), Alhama (e), Isasa (f), AR-29213 (g), Ricote (h), Petra (i), Etna (j), Urbión (k), Sandra (l), Maite (m), Ferro (n), Marta (o) y AR-29232 (p).

Figura 5.2. Concentración de azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, folatos y carotenoides totales, en lechuga Romana (●), Little Gem (●) y Mini Romana (●).

- Figura 5.3.** Histogramas del análisis discriminante de los parámetros analizados en lechuga Romana (●), Little Gem (▲) y Mini Romana (■) utilizando fructosa, ácido cítrico, vitamina C, FRAP-H, nitrato, hue en hojas internas, ácido α -cetoglutárico, β -caroteno, ABTS-H y luminosidad en hojas externas como variables predictoras.
- Tabla 5.1.** Características de los diferentes cultivares de lechuga.
- Tabla 5.2.** Concentración de azúcares solubles ($mg\ g^{-1}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.
- Tabla 5.3.** Concentración de ácidos málico, cítrico, fumárico, glutámico y tartárico ($mg\ g^{-1}$), quínico, cetoglutárico, succínico, siquímico y malónico ($\mu g\ g^{-1}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.
- Tabla 5.4.** Concentración ácido clorogénico (clorog), rutina y kaempferol ($\mu g\ g^{-1}$), ácido *p*-coumárico (*p*-Cou) ácido cafeico, floridzina, ácido protocatéquico (Protocat), luteolina, apigenina ($\mu g\ kg^{-1}$), derivados del ácido cafeico (Dv. Caf) y derivados del ácido *p*-coumárico (Dv. *p*-Cou) ($\mu g\ g^{-1}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.
- Tabla 5.5.** Concentración de vitamina C, monoglutamato, poliglutamato ($\mu g\ g^{-1}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.
- Tabla 5.6.** Concentración de β -caroteno, luteína, lactucaxantina (Lactuca), violaxantina (Viola), neoxantina (Neo), clorofila *a* (Clorof *a*) y clorofila *b* (Clorof *b*), expresada como $\mu g\ g^{-1}$, en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.
- Tabla 5.7.** Actividad antioxidante determinada por los métodos ABTS y FRAP en la fracción hidrofílica (ABTS-H y FRAP-H) y en la fracción lipofílica (ABTS-L y FRAP-L), expresada como $\mu moles\ equivalentes\ de\ trolox\ 100\ g^{-1}$ y concentración de nitrato ($mmol\ kg^{-1}\ PS$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.

CAPÍTULO 6

- Figura 6.1.** Histogramas del análisis discriminante canónico de las muestras de pimiento cultivado bajo cultivo ecológico (▲), convencional (●) y mixto (■), utilizando como variables predictoras los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de suelo y parte aérea.
- Figura 6.2.** Histogramas de ADC en lechuga cultivada en ecológico (▲), convencional (●) y mixto (■), utilizando $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea, Zn, Mn, ácido tartárico, ácido succínico, ABTS-H y FRAP-H como variables predictoras.
- Tabla 6.1.** Origen de los diferentes fertilizantes utilizados para el cultivo ecológico.
- Tabla 6.2.** Combinaciones de fertilizantes y biosolarización pertenecientes a los diferentes tratamientos principales (ecológico, convencional y mixto).
- Tabla 6.3.** Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de las fuentes de N utilizadas en los diferentes tratamientos ecológicos, convencionales y mixtos.
- Tabla 6.4.** Peso fresco (g) de parte aérea y raíz y contenido en nitrógeno total (N_{total} , %) y abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$; ‰) en parte aérea, raíz, fruto y suelo, en el ensayo de pimiento cultivado bajo sistemas de producción ecológico, convencional y mixto.
- Tabla 6.5.** Peso fresco (g) de parte aérea y raíz y contenido en nitrógeno total (N_{total} , %) y abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$; ‰) en parte aérea, raíz y suelo y contenido en agua (%), en el ensayo de lechuga cultivada bajo sistemas de producción ecológico, convencional y mixto.
- Tabla 6.6.** Actividad antioxidante de la fracción hidrofílica, medida por los métodos ABTS (ABTS-H; *equivalentes de ascórbico por 10*) y FRAP (FRAP-H; $\mu\text{M Fe}$), actividad antioxidante de la fracción lipofílica medida por los métodos ABTS (ABTS-L; *equivalentes de trolox por 10*) y FRAP (FRAP-L; $\mu\text{M Fe por 10}$) y concentraciones de azúcares (mg g^{-1}), compuestos fenólicos totales

(Fenolic; $\mu\text{g g}^{-1}$), clorofilas (Clorof; mg g^{-1}) y vitamina C (Vit C, $\mu\text{g g}^{-1}$) en lechuga.

Tabla 6.7. Concentración de ácidos málico, cítrico (mg g^{-1}), fumárico, glutámico, quínico, tartárico, cetoglutárico (cetoglut), succínico, siquímico y malónico ($\mu\text{g g}^{-1}$) en lechuga cultivada bajo tratamientos ecológico, convencional y mixto.

Tabla 6.8. Concentración de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P y Zn (mmol kg^{-1}) en lechuga cultivada bajo tratamientos ecológico, convencional y mixto.

Tabla 6.9. Concentración de Cl^- , NO_3^- , PO_4^{2-} y SO_4^{2-} (mg g^{-1}) en lechuga cultivada bajo tratamientos ecológico, convencional y mixto.

ABREVIATURAS

$^1\text{O}^2$	Oxígeno singlete
5-MTHF	5-metil tetrahidrofolato
AA	Ácido L-ascórbico
AAH	Actividad antioxidante de la fracción hidrofílica
AAL	Actividad antioxidante de la fracción lipofílica
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABTS-H	Actividad antioxidante de la fracción hidrofílica medida con ABTS
ABTS-L	Actividad antioxidante de la fracción lipofílica medida con ABTS
ACP	Análisis de componentes principales
ADC	Análisis discriminante canónico
ADHA	Ácido L-dehidroascórbico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AEAC	Equivalentes de ácido ascórbico
ANOVA	Análisis de la varianza
BHT	Butil hidroxitolueno
BOE	Boletín Oficial del Estado
C	Convencional
cv	Cultivar
DTT	DL-1,4-ditiotreitol
E	Ecológico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRAP	Poder Antioxidante de Reducción Férrica
FRAP-H	Actividad antioxidante de la fracción hidrofílica medida mediante FRAP
FRAP-L	Actividad antioxidante de la fracción lipofílica medida mediante FRAP
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IF	Índice de forma
MeOH	Metanol
n.s	No significativo
O_2^-	Radical superóxido
OH^-	Radical hidroxilo
p/v	Peso/volumen

Abreviaturas

PF	Peso fresco
ppm	Partes por millón
PS	Peso seco
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Suelo
SS	Sin suelo
TEAC	Equivalentes de Trolox
THF	Tetrahidrofolato
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
v/v	Volumen/volumen
$\delta^{15}\text{N}$	Delta de nitrógeno-15

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL SECTOR AGROALIMENTARIO EN LA REGIÓN DE MURCIA

El sector agroalimentario es uno de los pilares básicos de la economía regional. Las condiciones para el cultivo en un clima árido mediterráneo, caracterizado por escasas lluvias (apenas se alcanzan los 225 L m⁻² al año) y por tanto mínimos recursos hídricos, unido a la mala calidad de las aguas y suelos pobres en nutrientes, han dado lugar a una apuesta constante por la innovación tecnológica, dirigida a encontrar soluciones efectivas para obtener la más alta rentabilidad y productos de primera calidad. Esto ha permitido que actualmente la Región de Murcia sea una de las agriculturas más avanzadas del mundo, a pesar de consumir solo el 3% de los recursos hídricos de España. La superficie agraria útil que posee la Región de Murcia alcanza una extensión de 550.948 ha, de las cuales una tercera parte se dedica a la plantación de cultivos leñosos y una sexta parte a la producción de cultivos herbáceos (Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011). Dentro de los cultivos herbáceos, la producción de hortalizas alcanza el 87,8% del total (Figura 1.1).

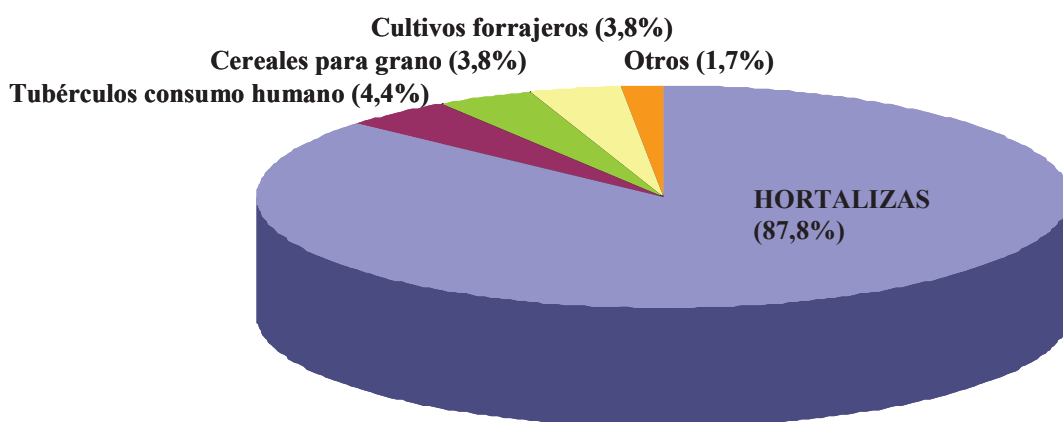


Figura 1.1. Distribución de la producción de cultivos herbáceos en la Región de Murcia. Datos extraídos del Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011.

Aunque en la Región de Murcia se cultivan más de treinta especies de hortalizas, la mayor parte de la producción se concentra en un reducido número. En el año 2011, las diez especies más importantes aportaron en torno al 95% de la producción, cifra que ha permanecido casi invariable desde el año 2000. Las dos especies que más contribuyeron a la producción, casi por igual, fueron lechuga y tomate, aportando más del 40% y que, junto con melón (14,6%), brócoli (10,9%), sandía (7,9%) y pimiento (7,4%), supusieron alrededor del 84% de la producción (Figura 1.2).

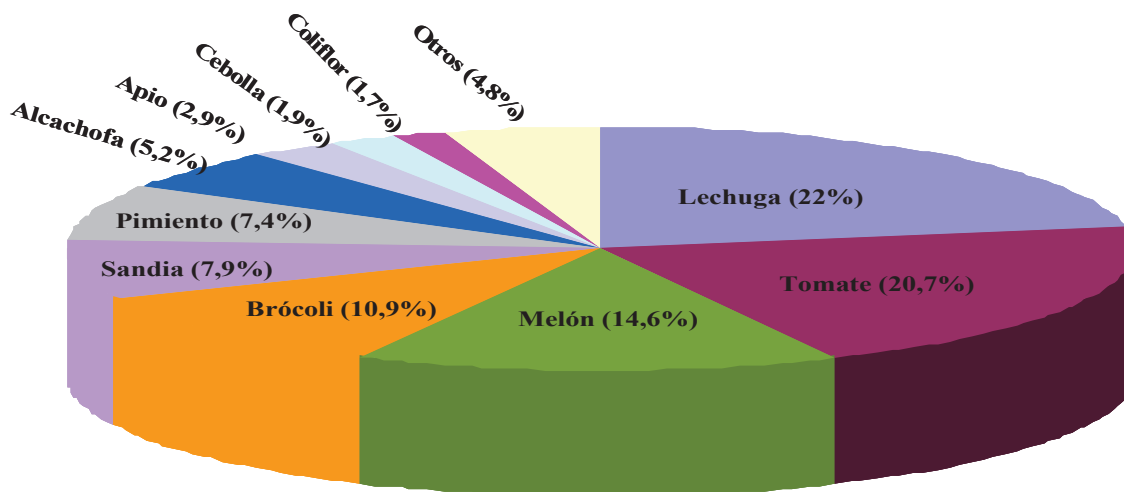


Figura 1.2. Distribución de la producción de cultivos hortícolas en la Región de Murcia. Datos extraídos del Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011.

1.1.1. Cultivo de pimiento

1.1.1.1. Origen, morfología y taxonomía

El pimiento es originario de Bolivia y Perú y fue traído al Viejo Mundo por Colón en su primer viaje. En el siglo XVI se difundió su cultivo en España, desde donde se distribuyó al resto de Europa y del mundo con la colaboración de los portugueses.

El pimiento es una planta herbácea anual del género *Capsicum* que pertenece a la familia *Solanaceae*. El género *Capsicum* está formado por al menos 25 especies silvestres

y 5 especies de cultivo: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. chivense*. Casi todas las variedades de pimiento cultivadas se engloban dentro de la especie *Capsicum annuum* L. (Milla, 1996). La planta de pimiento tiene una altura que oscila entre 1-2 m con un tallo principal que, a partir de cierta altura (30-40 cm), presenta ramificaciones (3-4 ramas), formándose la estructura conocida como “cruz” del pimiento (Figura 1.3A). El sistema radicular es voluminoso, pivotante y profundo, con numerosas raíces laterales. Las flores de *Capsicum annuum* son blancas y de tamaño pequeño, hermafroditas y alógamas (Smith y Heiser, 1951) (Figura 1.3B). Las semillas son de color amarillo, redondeadas y ligeramente reniformes, tienen de 3-5 mm de longitud y se insertan sobre una placenta cónica en disposición central (Figura 1.3C). El fruto es una baya constituida por un grueso pericarpio y un tejido placentario al que se unen las semillas, dando lugar a una superficie hueca en forma de cápsula. Las características del fruto, así como su tamaño, dependen de la variedad (Nuez *et al.*, 1996). Debido a las numerosas variedades de pimiento, es complicado establecer una clasificación general. La mayoría de las clasificaciones están basadas en conceptos relacionados con el grosor de la carne, forma (rectangular, cuadrada o triangular), tamaño, color, sabor (picantes o dulces) y destino (procesado o consumo en fresco).

Entre las variedades de pimientos dulces más cultivadas podemos distinguir, en función de su forma, tres tipos principales:

- *Tipo California*: constituido por frutos cortos y anchos de sección cuadrada, cuya longitud es similar a la anchura, con carne más o menos gruesa, hombros muy marcados y pronunciados. Se recolectan en estado inmaduro (verde) y maduro (rojo, amarillo, naranja, etc.). Poseen requerimientos exigentes de temperatura, por lo que suelen cultivarse en ciclos tempranos (desde mediados de junio a final de julio) dependiendo de la climatología y de la comarca de cultivo. No obstante, también se comercializan variedades para trasplantes de otoño y de ciclo corto en primavera (Figura 1.3D).
- *Tipo Lamuyo*: los frutos son de gran tamaño, largos, de sección rectangular (longitud mayor que la anchura) y de carne gruesa. Se recolectan en estado verde y rojo, aunque también se comercializan variedades de color amarillo, principalmente para encurtidos. En general son plantas de vegetación frondosa y

vigorosa, menos sensibles al frío que los del tipo California y se cultivan para plantaciones medias y tardías y en ciclos largos, desde julio hasta agosto e incluso septiembre (Figura 1.3E).

- *Tipo Italiano*: los frutos tienen forma alargada, son estrechos, puntiagudos, de sección triangular, carne fina y de color verde brillante que vira a rojo al madurar. Se plantan desde junio a octubre, aunque los trasplantes más habituales se realizan en los meses de agosto a septiembre. Son variedades dirigidas al mercado nacional con buen aguante al transporte y a la conservación (Figura 1.3F).

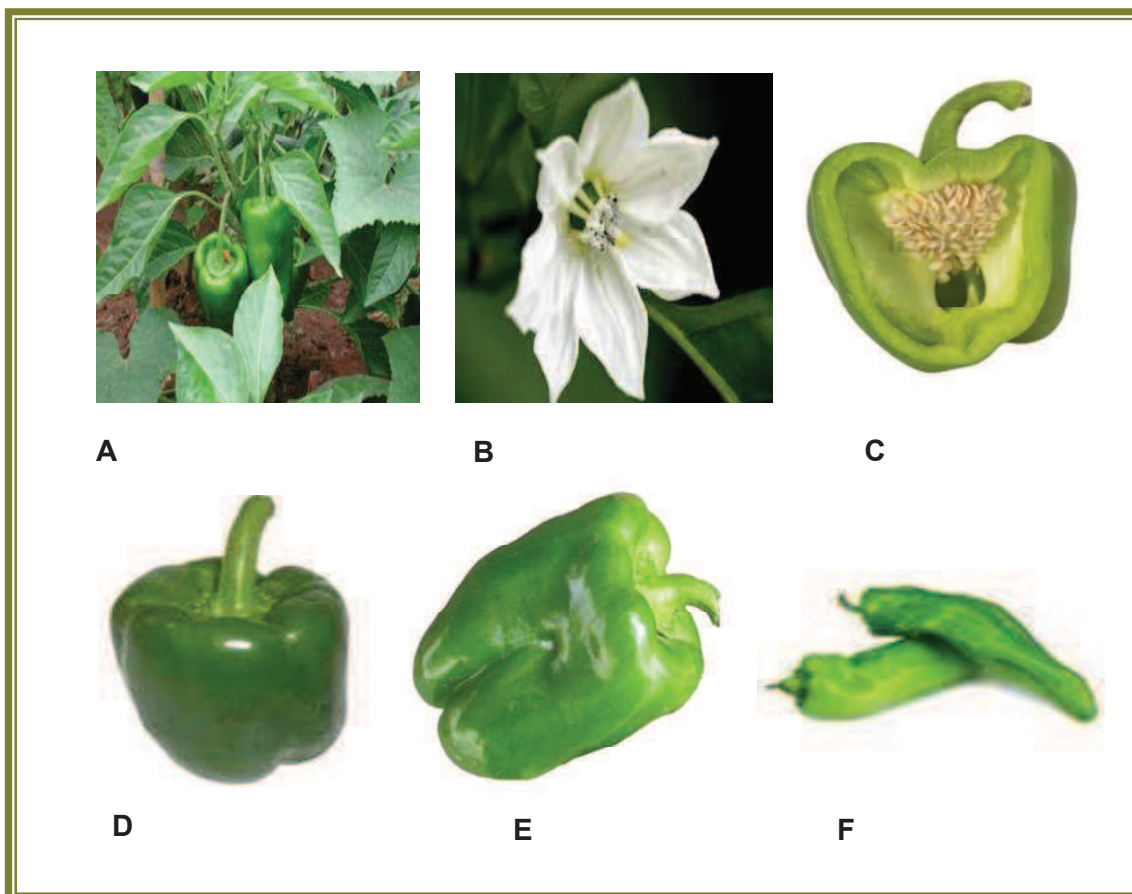


Figura 1.3. Pimiento (*Capsicum annuum* L.): (A) planta, (B) flor, (C) semillas, (D) fruto tipo California, (E) fruto tipo Lamuyo y (F) fruto tipo italiano.

1.1.1.2. Importancia económica

Los frutos de pimiento han formado parte de la dieta humana desde hace más de 7000 años (Macneish, 1964). Además de servir como alimento, el fruto ha sido ampliamente utilizado como especia y como colorante en alimentos y cosméticos (Bosland y Votara, 1999). El éxito del pimiento radica en que es un cultivo con gran variedad de formas de consumo (fresco, en conserva y para pimentón), siendo el consumo en fresco el más extendido. España es el principal productor europeo de pimiento y el quinto en el ámbito mundial, siendo Murcia una de las primeras regiones de cultivo, produciendo variedades de gran valor socio-económico como las que se utilizan para su consumo en fresco y se cultivan en invernaderos. El pimiento para consumo en fresco es, actualmente, el que acapara junto al tomate y la alcachofa, la mayor parte de la mano de obra que se dedica al sector agrícola en la Región. Las variedades de pimiento cultivadas en la Región pueden resumirse fundamentalmente en tres según la forma del fruto (Nuez *et al.*, 1996): Lamuyo (fruto rectangular), California (fruto cuadrado) e Italiano (fruto cónico) (Figura 1.3D, E y C). La producción de pimiento California se destina, casi en su totalidad, a la exportación, prefiriendo mayoritariamente el mercado nacional el Lamuyo.

1.1.2. Cultivo de lechuga

1.1.2.1. Origen, morfología y taxonomía

El origen de la lechuga no parece estar muy claro. Algunos autores afirman que procede de la India, aunque hoy día los botánicos no se ponen de acuerdo por existir un antecesor de la lechuga, *Lactuca scariola* L., que se encuentra en estado silvestre en la mayor parte de las zonas templadas, siendo las variedades cultivadas actualmente una hibridación entre especies distintas. El cultivo de lechuga se remonta a una antigüedad de 2500 años, siendo conocida por griegos y romanos. Las primeras lechugas de las que se tiene referencia son las de hoja suelta, aunque las acogolladas eran conocidas en Europa en el siglo XVI.

La lechuga es una planta anual perteneciente a la familia *Compositae*, género *Lactuca sativa* L. Posee un sistema radicular profundo y ramificado. Su tallo es cilíndrico

corto y muy ramificado. Sus hojas se disponen primeramente en roseta y después forman un cogollo más o menos consistente y apretado, dependiendo de la variedad. Las hojas pueden ser de forma redondeada, lanceolada o casi espatulada con el borde liso, ondulado o aserrado, existiendo una amplia variabilidad varietal. Presenta inflorescencia en capítulos florales amarillos dispuestos en racimos o corimbos. Es una planta autógama cuyas “semillas”, que en realidad son frutos en forma de aquenios típicos, están provistas de un vilano plumoso. Los cultivares modernos de lechuga se clasifican, de acuerdo a la forma del cogollo, en:

- *Romana* (*Lactuca sativa* var. *Longifolia*): tiene hojas erectas, alongadas, con bordes enteros y nervadura central ancha. No forman un verdadero cogollo. Dentro de este grupo se encuentran la lechuga Romana, la Mini Romana y la Little Gem (Figura 1.4A, B y C).
- *Acogollada* (*Lactuca sativa* var. *Capitata*): forma un verdadero cogollo. Dentro de este grupo se encuentran dos variedades principales:
 - Lechuga Batavia o Trocadero: forma un cogollo suelto con hojas de textura suave y aspecto aceitoso (Figura 1.4D y E).
 - Lechuga Iceberg: forma un cogollo compacto y hojas apretadas (Figura 1.4F).
- *De hojas sueltas* (*Lactuca sativa* var. *Inybacea*): Poseen las hojas sueltas y dispersas. Entre ellas destaca la llamada hoja de roble (Figura 1.4G).

1.1.2.2. Importancia económica

La lechuga es uno de los cultivos hortícolas más importantes en España, representando el 17% de la superficie cultivada y cerca del 12% de la producción total. En España, la lechuga se cultiva prácticamente en su totalidad al aire libre. Casi las dos terceras partes de la producción de lechuga se lleva a cabo de forma compartida en dos Comunidades Autónomas: Murcia y Andalucía. En torno al 70% de la producción de lechuga corresponde a variedades acogolladas, fundamentalmente Iceberg, y el 30% restante a la Romana. La producción de lechuga acogollada se realiza mayoritariamente en

Murcia y Andalucía, mientras que la de Romana está más repartida, pero de nuevo destacan Andalucía y Murcia. El cultivo de lechuga en la Región de Murcia, se distribuye principalmente en el Valle del Guadalentín y el Campo de Cartagena. En los últimos años, la importancia del cultivo de la lechuga ha ido incrementándose, debido tanto a la diversificación de tipos varietales como al reciente desarrollo de la industria de la IV gama (Maroto *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2002).

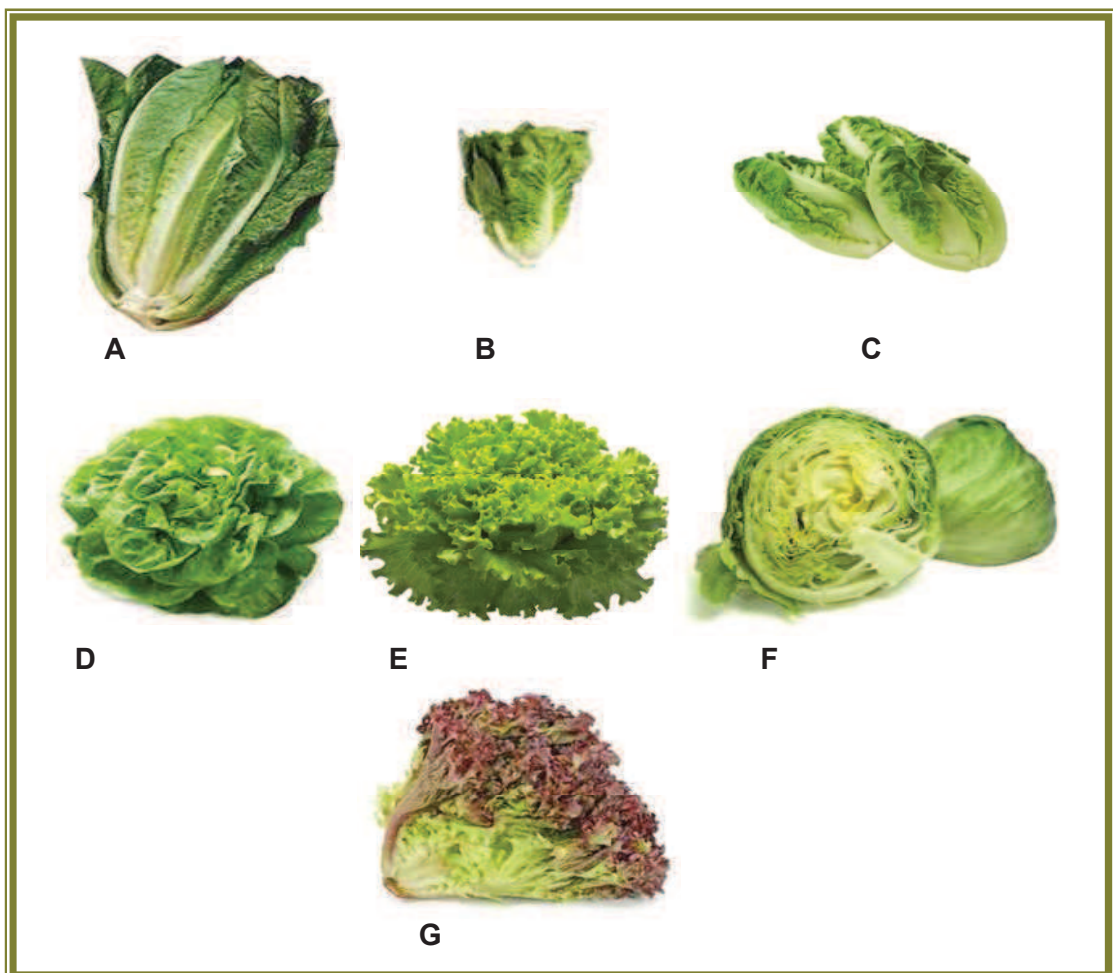


Figura 1.4. Tipos de lechuga: (A) Romana, (B) Mini Romana, (C) Little Gem, (D) Trocadero, (E) Batavia, (F) Iceberg y (G) Hoja de Roble.

1.2. NUTRIENTES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS

Los vegetales en general son una excelente fuente de nutrientes y otras sustancias denominadas compuestos bioactivos o fitoquímicos, que no tienen una función nutricional definida, o no son considerados esenciales para la salud humana, pero que presentan propiedades farmacológicas. Dichos compuestos bioactivos son metabolitos secundarios de las plantas, muchos de ellos con actividad antioxidante, que juegan un papel importante en la protección de la salud humana, reduciendo el riesgo de varias enfermedades crónicas, incluyendo ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Stenmetz y Potter, 1996; Youdim y Joseph, 2001; Kris-Etherton *et al.*, 2002). Entre los nutrientes y compuestos bioactivos presentes en pimiento y lechuga, se encuentran los siguientes:

1.2.1. Azúcares

Los azúcares de la dieta juegan un papel fundamental en la nutrición humana, ya que proporcionan la principal fuente de energía necesaria para mantener las funciones corporales. Además, contribuyen en gran medida a las características de sabor y valor nutritivo de las verduras (Luning *et al.*, 1994). Sacarosa, glucosa y fructosa son los principales azúcares solubles presentes en vegetales y el dulzor de los frutos es altamente dependiente de su concentración; fructosa es de 2,3 y 1,7 veces más dulce que la glucosa y la sacarosa respectivamente (Kulp *et al.*, 1991). Por otra parte, los azúcares promueven la estabilidad del ácido ascórbico, mejorando así el contenido de vitamina C (Birch y Pepper, 1983).

1.2.2. Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son compuestos oxigenados derivados de los hidrocarburos que se forman al sustituir, en un carbono primario, dos hidrógenos por un oxígeno que se une al carbono mediante un doble enlace, y el tercer hidrógeno por un grupo (OH), que se une mediante un enlace simple. El grupo formado por esta sustitución, recibe el nombre de

carboxilo. Según el número de grupos carboxilo, los ácidos orgánicos se clasifican en: monocarboxílicos, dicarboxílicos y tricarboxílicos.

Las plantas contienen pequeñas cantidades de ácidos orgánicos, metabolitos intermediarios de diversos procesos, que se acumulan en vacuolas y confieren un sabor ácido o amargo (Fennema, 2000). El contenido de ácidos orgánicos depende de la especie vegetal, variando desde niveles muy bajos, como en el maíz dulce, a concentraciones muy altas como en espinacas, fresas o grosellas (Fennema, 2000). Los principales ácidos orgánicos presentes en las hortalizas son el ácido málico (mayoritario en cebolla, brócoli, zanahoria o lechuga) y el ácido cítrico (mayoritario en remolacha, tomate, guisantes y coles de Bruselas), si bien el ácido oxálico se presenta en algunos vegetales en cantidades elevadas (Oliveira *et al.*, 2008).

Los ácidos orgánicos influyen en las propiedades organolépticas de las frutas y verduras, ya que juegan un papel importante en la percepción de sabor mediante la modificación del sabor de los azúcares. El ácido cítrico enmascara la percepción de la sacarosa (Schifferstein y Fritjers, 1990; Bonnans y Noble, 1993) y fructosa (Pangborn, 1963), mientras que el ácido málico parece mejorar la percepción de la sacarosa (Fabian y Blum, 1943). Además, los ácidos orgánicos afectan indirectamente al metabolismo fenólico mediante la alteración del pH y actúan como precursores de compuestos fenólicos y compuestos de sabor (Galdon *et al.*, 2008; Kader, 2008).

1.2.3. Vitamina C

La vitamina C es un compuesto hidrosoluble de 6 átomos de carbono que se encuentra principalmente en alimentos de origen vegetal. El hombre carece de la enzima que cataliza la etapa terminal de la síntesis de ácido ascórbico, la gulonolactona oxidasa, por lo que debe adquirirlo a través de la alimentación. El ácido L-ascórbico (AA) es la principal forma activa de la vitamina C. El AA se oxida de forma reversible para formar ácido L-dehidroascórbico (ADHA), que también presenta actividad biológica (Figura 1.5). Esta oxidación puede ser inducida por la exposición a altas temperaturas, pH alto, la luz o la presencia de oxígeno.

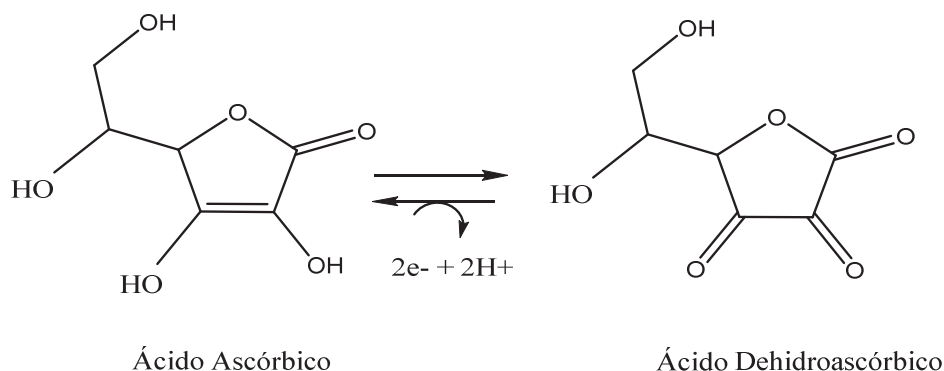


Figura 1.5. Oxidación del ácido ascórbico a dehidroascórbico.

La vitamina C actúa como línea de defensa contra el estrés oxidativo y por lo tanto puede prevenir las enfermedades crónicas, como diabetes, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Joshiyura *et al.*, 1999; Nicolle *et al.*, 2004). Una de las funciones más claramente definida de la vitamina C en el metabolismo de animales y plantas, es la de actuar como modulador de un gran número de reacciones enzimáticas que contienen hierro o cobre en el sitio activo y que requieren AA para su máxima actividad. Este es el caso de la ferro-dioxigenasa, involucrada en la generación y el mantenimiento del colágeno en la piel, el cartílago y el tejido conectivo (Furusawa, 2001). Además, el AA protege a las vitaminas A y E de la oxidación, así como a algunas vitaminas del grupo B, tales como la riboflavina, tiamina, ácido fólico y ácido pantoténico (Tauguinias *et al.*, 2004). También, estimula la absorción de hierro y bloquea la degradación de la ferritina a homosiderina, participa en la cicatrización de heridas, fracturas y hemorragias, es esencial para la oxidación de fenilalanina y tirosina e interviene en el metabolismo del triptófano y en la síntesis de noradrenalina (Belitz y Grosch, 2004).

Otra de las funciones clave de la vitamina C es la de interactuar enzimática y no enzimáticamente con radicales de oxígeno perjudiciales y sus derivados, llamados especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radicales hidroxilo (OH^{\cdot}). La toxicidad de las ROS es debida a su capacidad para iniciar las reacciones de radicales en cascada que conducen a la producción del radical hidroxilo y otras especies perjudiciales que pueden causar daños a proteínas, peroxidación lipídica, daños en el ADN y finalmente la muerte celular (Cadenas, 1995).

1.2.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas ya que intervienen en el crecimiento (los ácidos fenólicos se han relacionado con la absorción de nutrientes, síntesis de proteínas, actividad enzimática, fotosíntesis, etc.), morfología (color y soporte mecánico), reproducción (atracción de aves e insectos que ayudan a la polinización) y contribuyen en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o radiación ultravioleta (Harbone y Williams, 2000). Actualmente, este grupo de compuestos fitoquímicos presentan un gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. De este modo, muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas principalmente a la actividad antioxidante, están relacionadas con la presencia y el contenido de compuestos fenólicos (Martínez-Valverde, 2000). Los compuestos fenólicos previenen el envejecimiento, la arterosclerosis, el cáncer, la inflamación y ciertas enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer y Parkinson, mediante la inhibición de la formación de radicales libres y la peroxidación de lípidos (Poiroux-Gonord *et al.*, 2010). Engloban todas aquellas sustancias que poseen una o varias funciones fenol (hidroxibenceno) unidas a estructuras aromáticas o alifáticas (Croteau *et al.*, 2000). Atendiendo a su estructura básica, los compuestos fenólicos se puede dividir en dos categorías: flavonoides y no flavonoides (Waterhouse, 2002) (Figura 1.6).



Figura 1.6. Clasificación de los compuestos fenólicos.

1.2.4.1. Flavonoides

La estructura común de los flavonoides consiste en dos anillos aromáticos (A y B) conectados mediante un anillo heterocíclico oxigenado (C) (Figura 1.7). Este grupo, a su vez, se divide en varias clases, siendo las más importantes: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianos y flavanoles. Las distintas clases difieren en el nivel de oxidación y en los sustituyentes de dicho heterociclo, mientras que los compuestos dentro de cada clase difieren en los sustituyentes de los anillos aromáticos. Los flavonoides se encuentran en las plantas en forma de aglicona o como glucósidos, siendo esta última su forma más habitual.

Los *flavonoles* son los flavonoides más abundantes en alimentos de origen vegetal. Se acumulan en los tejidos de las plantas casi siempre en forma de conjugados glicosilados y están representados principalmente por quercetina, kaempferol y miricetina.

Las *flavonas* son estructuralmente similares a los flavonoles y difieren solo en la ausencia de hidroxilación en la posición 3 del anillo C. Están principalmente representadas en la dieta por apigenina y luteolina, encontrándose principalmente en apio (*Apium raveolens*), perejil (*Petroselinum crispum*) y alcachofa (*Cynara scolymus*) (Crozier *et al.*, 2006).

Las *flavanonas* están representados principalmente por naringenina y hesperidina y se encuentran principalmente en cítricos (Manach *et al.*, 2004) aunque también se han encontrado en tomate, kiwi y banana (Krause y Galensa, 1992; Kanazawa y Sakakibara, 2000; Dégenève, 2004).

Las *isoflavonas*, a diferencia de la mayoría de los flavonoides, se caracterizan por presentar el anillo B en la posición C3 en lugar de en la posición C2. Las más comunes son genisteína, daidzeína, y gliciteína cuya distribución es muy limitada en el reino vegetal, encontrándose solo en grandes cantidades en leguminosas como la soja (Dixon y Steele, 1999). Las isoflavonas son conocidas por su actividad estrogénica y han recibido mucha atención debido a su posible papel en la prevención del cáncer de mama y la osteoporosis (Barnes, 2003).

Los *antocianos* son los principales responsables de los colores rojo, azul y violeta de las frutas. En la naturaleza se encuentran alrededor de diecisiete antocianos, pero solo seis

de ellos (cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina y malvidina) son de importancia en la dieta.

Los *flavanoles*, también llamados catequinas, se encuentran como agliconas o esterificados con ácido gálico, siendo los más comunes (+) catequina y (-) epicatequina, los cuales se encuentran en grandes cantidades en albaricoque, uva, mora, melocotón y nectarina (Porter, 1988; Hong *et al.*, 2004).

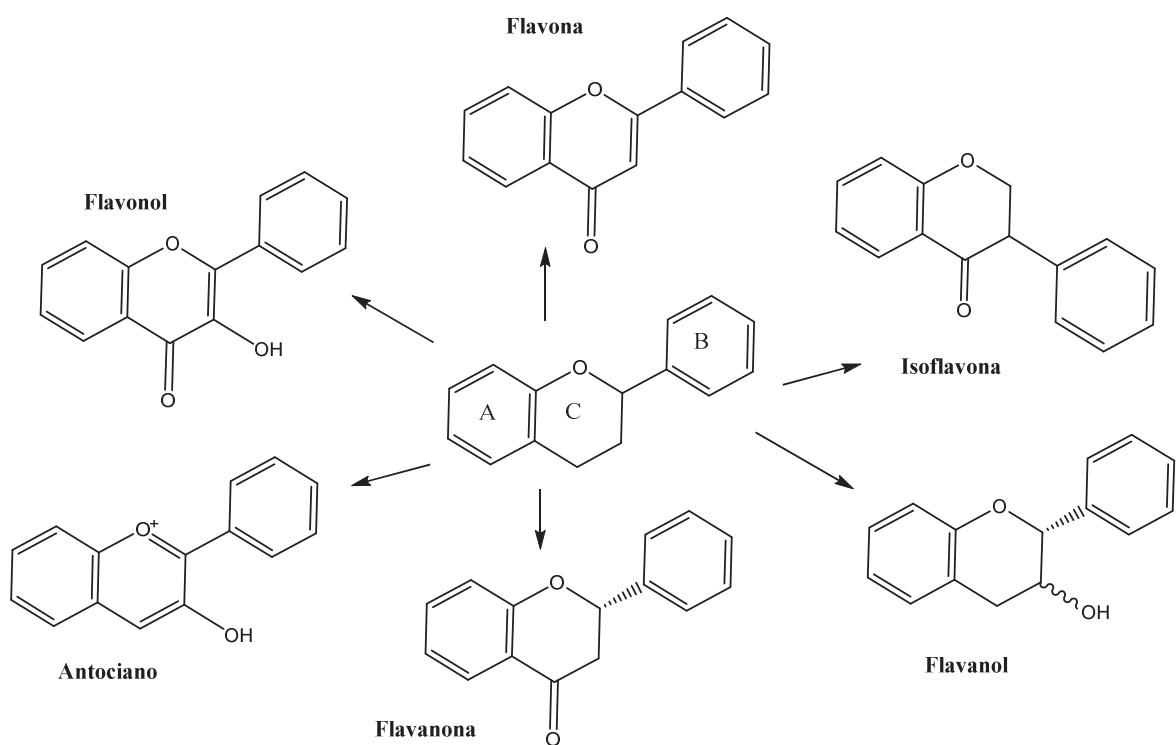


Figura 1.7. Estructura básica de los principales grupos de flavonoides.

1.2.4.2. No Flavonoides

Dentro de los no flavonoides, encontramos tres grupos diferenciados: ácidos fenólicos, taninos hidrolizables y estilbenos.

La estructura básica de los *ácidos fenólicos* es un anillo aromático con un grupo carboxílico sustituido en las dos posiciones meta- (respecto al grupo ácido) y en posición para- (Figura 1.8). Se distinguen dos grupos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Los *ácidos hidroxibenzoicos*, representados por el ácido gálico, ácido vainillínico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico y ácido siríngico, presentan el grupo carboxílico directamente enlazado al anillo aromático. Son muy raros en plantas y aparecen en pequeñas concentraciones en frutos rojos, rábano y cebolla (Herrmann, 1889). Los *ácidos hidroxicinámicos*, como caféico, ferúlico, *p*-cumárico y sináptico, presentan el grupo carboxílico enlazado partir de un sustituyente 2-propanilo y generalmente se encuentran esterificados con el ácido quínico. Se encuentran principalmente en café, manzana, zanahoria y tomate (Clifford, 1999; Paganga *et al.*, 1999; Alasalvar *et al.*, 2001; Clifford *et al.*, 2003).

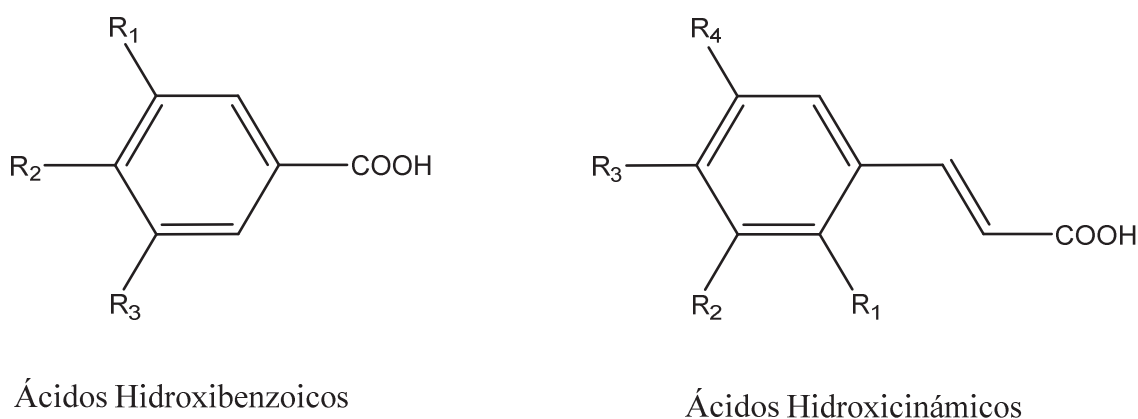


Figura 1.8. Estructura básica de los ácidos fenólicos.

Los *taninos hidrolizables* tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente, bien con el ácido gálico o bien con el ácido elágico, formando galotaninos y elagitaninos, respectivamente (Figura 1.9). Estos compuestos se encuentran principalmente en nuez, frambuesa, fresa y granada (Espín y Tomás-Barberán, 2006).

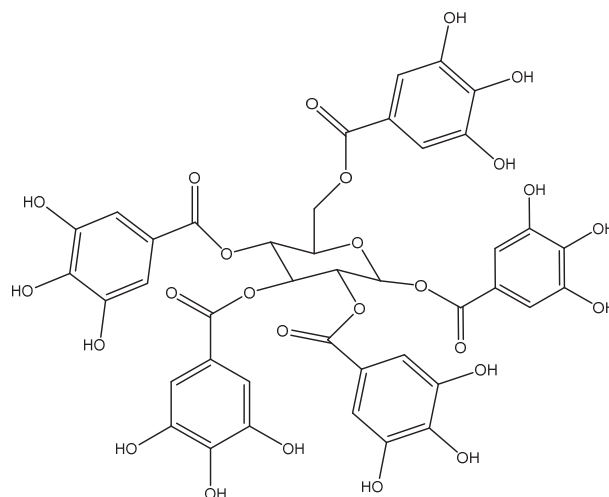


Figura 1.9. Estructura básica de los taninos hidrolizables.

Los *estilbenos* se caracterizan por la presencia de un núcleo 1,2-difeniletileno con grupos hidroxilo en los anillos aromáticos (Figura 1.10). Pueden encontrarse en forma de monómeros y oligómeros, siendo el más conocido el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) típico de la uva, el vino tinto y los cacahuetes (Burns *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2007).

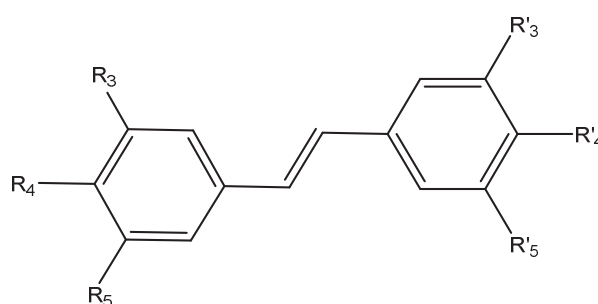


Figura 1.10. Estructura básica de los estilbenos.

1.2.5. Folatos

El término folato se utiliza de forma genérica para denominar las distintas formas químicas reducidas y biológicamente activas derivadas del ácido pteroilglutámico o ácido fólico, una vitamina hidrosoluble del grupo B, concretamente la vitamina B₉. Los folatos

son sintetizados únicamente por bacterias y plantas, los mamíferos carecen de la capacidad de síntesis *de novo* de esta vitamina, por lo que deben ingerirla con la dieta. Los folatos se encuentran mayoritariamente en alimentos como el hígado, las frutas, cereales, legumbres, frutos secos y en especial en verduras de hoja ancha (espinaca, acelga, lechuga, escarola, etc.) de donde proviene su nombre (“folium”, hoja).

Los folatos están formados por un esqueleto de ácido ptericoico, constituido por un anillo de pteridina unido a una molécula de ácido para-aminobenzoico, conjugado con uno (monoglutamatos) o más residuos (poliglutamatos) de ácido glutámico (Figura 1.11). Partiendo de esta estructura básica, las formas naturales de folatos difieren en el estado de reducción y naturaleza de los sustituyentes del anillo de pteridina y en el número de residuos glutamato (generalmente 1-7) que se unen al ácido ptericoico. Los folatos que presentan los anillos de pteridina completamente reducidos se denominan tetrahidrofolatos, mientras aquellos que están parcialmente reducidos son denominados dihidrofolatos. Estos derivados reducidos presentan interconversión entre ellos, especialmente hacia el tetrahidrofolato. El anillo de pteridina puede estar sustituido en la posición N5 dando lugar a 5-metil, si el sustituyente es un grupo metilo (CH₃), 5-formil si se trata de un grupo formilo (CHO-) y derivados formininos cuando el sustituyente es un grupo formimino (NH=CH-) y en la posición N10 dando lugar a derivados 10-formil.

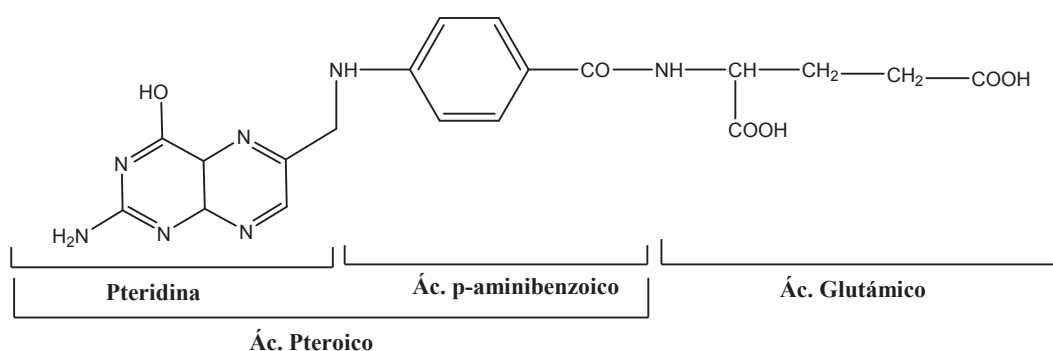


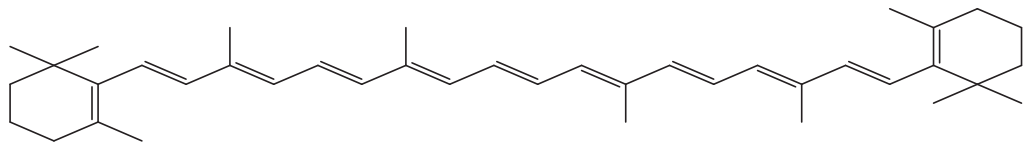
Figura 1.11. Estructura básica de los folatos.

El papel de los folatos en el metabolismo se basa el transporte de unidades monocarbonadas. De esta manera, participan en reacciones involucradas en la

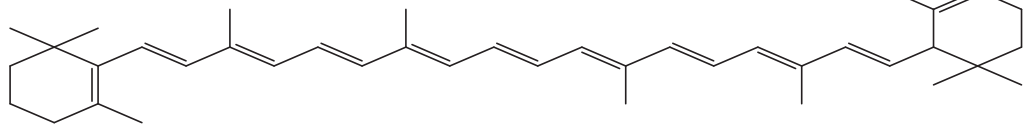
interconversión de aminoácidos y en la síntesis de ácidos nucleicos, además de intervenir como cofactor en numerosas reacciones de metilación. Por su destacada función metabólica, los folatos tienen una importante repercusión sobre la salud. La manifestación clínica clásica de deficiencia de folato es la anemia megaloblástica, siendo el ácido fólico el empleado para el tratamiento de dicha anemia. Diversos ensayos han demostrado que la ingesta de folatos naturales está relacionada con la disminución del riesgo de defectos pre- y posconcepcionales, como el síndrome de Down (James *et al.*, 1999; Fabré *et al.*, 2000) y los defectos del tubo neural (Botto *et al.*, 1999; Bjorklund y Gordon, 2006), diversos tipos de cáncer, sobre todo de colon y recto (Giovannucci *et al.*, 1993) y disfunciones neurocognitivas tales como demencia y Alzheimer (Seshadri, 2002).

1.2.6. Carotenoides

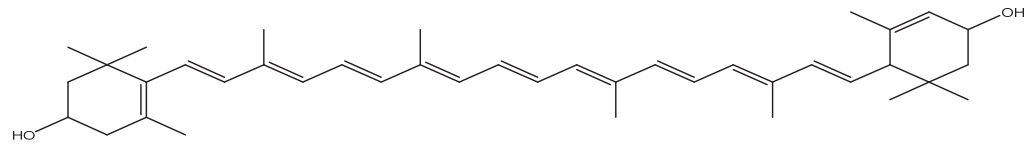
Los carotenoides son un grupo de pigmentos liposolubles de origen vegetal que el hombre no es capaz de sintetizar *de novo* y necesita adquirirlos a través de la dieta, fundamentalmente a partir de frutas y hortalizas. La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos, unidas de manera que el orden se invierte en el centro (Figura 1.12). Este esqueleto básico puede modificarse por hidrogenación, dehidrogenación, ciclación, isomerización, etc., dando como resultado una gran diversidad de estructuras. Se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides, que atendiendo a su composición química se dividen en carotenoides hidrocarbonados o carotenos, y carotenoides oxigenados o xantofilas. Los grupos oxigenados más comunes son los hidroxilo y epoxi. También se encuentran carotenoides con grupos aldehído, ceto, carboxi, carbometoxi y metoxi. Los carotenoides, ya sea carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos, monocíclicos o bicíclicos. La ciclación ocurre en uno o ambos extremos de la molécula, formando anillos β - o anillos ϵ - (Gross, 1987; Britton, 1998; Fraser y Bramley, 2004). El rasgo estructural distintivo de los carotenoides es un sistema extenso de dobles enlaces conjugados, el cual consiste en alternar enlaces carbono-carbono simples y dobles. Esta parte de la molécula, conocida como cromóforo, es responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y en consecuencia de su gran capacidad de coloración.



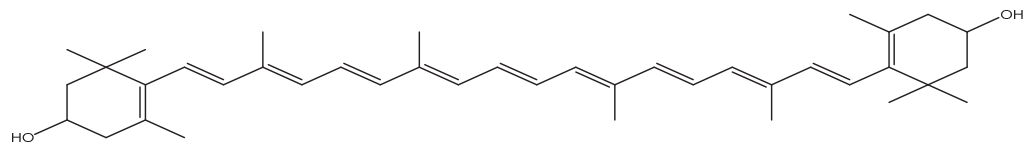
β -caroteno



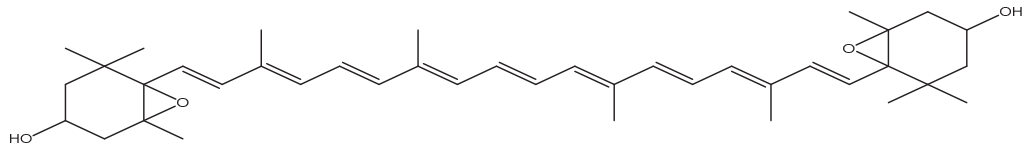
α -caroteno



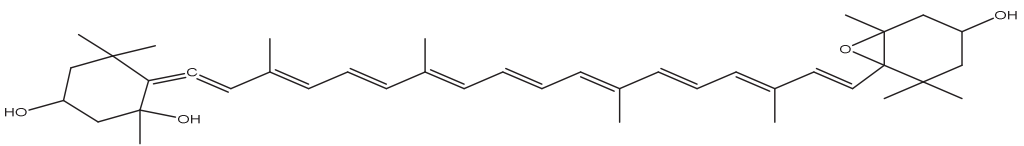
Luteína



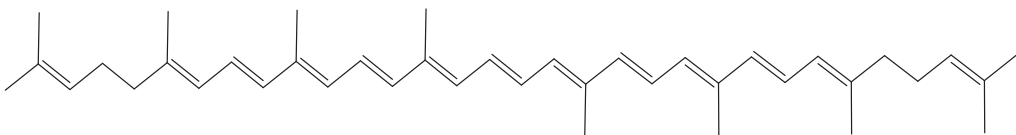
Zeaxantina



Violaxantina



Neoxantina



Licopeno

Figura 1.12. Estructura de los principales carotenoides.

Desde el punto de vista nutricional y fisiológico, el interés de los carotenoides se debe a su actividad provitamina A. Aproximadamente el 10% de los más de 600 carotenoides identificados en la naturaleza son precursores de esta vitamina. Debido a dicha actividad, los carotenoides previenen la degeneración macular y la formación de cataratas (Van den Berg *et al.*, 2000; Fraser y Bramley, 2004). Además, diversas pruebas epidemiológicas han relacionado a los carotenoides con un aumento del sistema inmune y con la disminución del riesgo de enfermedades degenerativas tales como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Gerster, 1991; Ziegler, 1991; Bendich, 1994; Krinsky, 1994; Maoka *et al.*, 2001). Estos efectos biológicos son independientes de la actividad de provitamina A y se han atribuido a una propiedad antioxidante de los carotenoides a través de la desactivación de los radicales libres y la captura del oxígeno singlete (Krinsky, 1989; Palozza y Krinsky, 1992). La capacidad de los carotenoides para capturar el oxígeno singlete se relaciona con el sistema de enlace doble conjugado y los que tienen nueve o más enlaces dobles otorgan la máxima protección (Foote *et al.*, 1970).

1.2.7. Clorofilas

La clorofila, responsable del color verde de los vegetales, es capaz de absorber energía luminosa y transmitirla, con el fin de ser utilizada en las plantas para la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua. La estructura de la molécula de clorofila es un tetrapirrol con un átomo central de magnesio, llamado porfirina y esterificado con un alcohol diterpeno, el fitol (Figura 1.13). Los dos tipos de clorofila más importantes son la clorofila *a* y la clorofila *b* que se encuentran en proporción 3:1 en la mayoría de los vegetales. Sus estructuras se diferencian en que la clorofila *a* presenta un grupo metilo (-CH₃) en la posición 3 del anillo de porfirina, mientras que la clorofila *b* presenta un grupo formilo (-CHO).

Varios estudios han demostrado que los pigmentos de las plantas juegan un papel importante en la salud humana. El beneficio potencial para la salud de una dieta rica en clorofila radica en su efecto protector frente al cáncer atribuido a su actividad antioxidante y antimutagénica (Dashwood *et al.*, 1998; Ferruzzi, 2007).

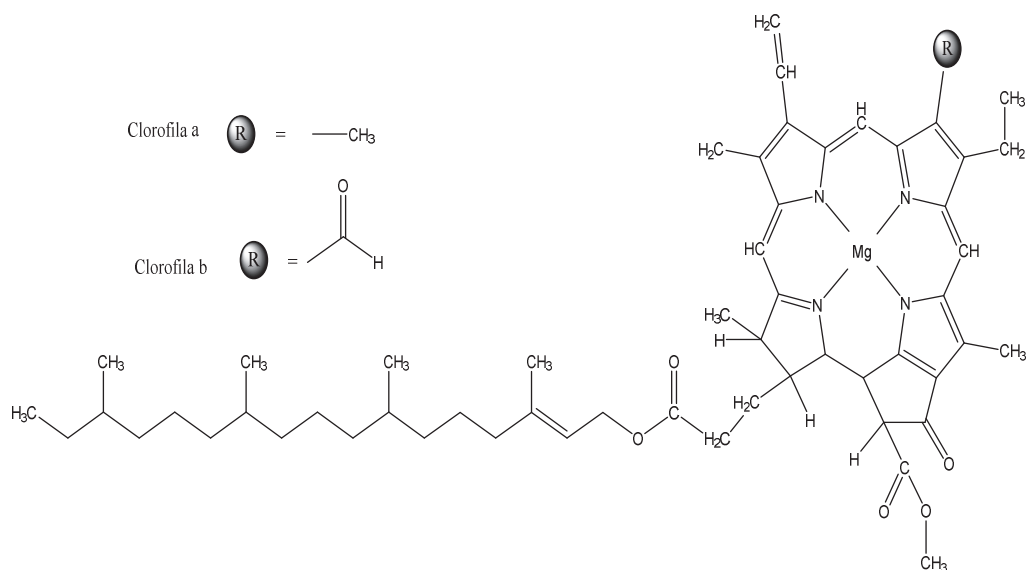


Figura 1.13. Estructura de la clorofila.

1.3. FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LOS VEGETALES

La calidad de las frutas y hortalizas para consumo en fresco es un tema complejo. Mientras que la composición nutricional es un factor principal para definir la calidad de los alimentos, la apariencia externa de las frutas, en particular su color y propiedades tales como la firmeza y el grosor de pericarpio, también juegan un papel decisivo en la evaluación de la calidad, especialmente en cuanto a la aceptación del consumidor se refiere (Abbott, 1999). Muchos son los factores pre- y poscosecha que determinan la composición y calidad de los productos hortícolas. Esta Tesis se centra en los factores precosecha entre los que podemos destacar factores genéticos, fisiológicos, agronómicos y medioambientales. La influencia de cada uno de ellos puede variar en su intensidad y hacerlo de forma individual o por interacción con otros factores. Por lo tanto, la calidad comienza a determinarse mucho antes de la cosecha y es importante conocer la manera en la que estos factores afectan a la calidad poscosecha.

1.3.1. Factores genéticos

Los factores genéticos tienen gran influencia en la calidad sensorial, rendimiento, composición nutricional y vida poscosecha de las frutas y hortalizas (Crisosto y Mitchell, 2007). La variabilidad genética entre variedades dentro de una misma especie es relativamente amplia, por lo que la selección de la más apropiada es de gran importancia para la calidad del producto final. Existen evidencias de cómo especies del mismo género y variedades de la misma especie presentan variabilidad en el contenido de compuestos bioactivos. Lee *et al.* (1995) observaron concentraciones de vitamina C comprendidas en un rango entre 64 y 168 mg 100g⁻¹ en cinco cultivares de pimiento, mientras que Dupont *et al.* (2000) y Mou (2005) encontraron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos y carotenos, respectivamente, en distintas variedades de lechuga. Por último, es importante considerar que el genoma, además de determinar cuantitativa y cualitativamente los parámetros responsables de la calidad organoléptica y nutricional, también determina otros parámetros relativos al comportamiento de las frutas y hortalizas tras la recolección y su capacidad de conservación (Romojaro *et al.*, 2006).

1.3.2. Factores fisiológicos

El estado de maduración en la recolección tiene un papel esencial en la composición química del fruto y la calidad poscosecha de frutas y hortalizas (Kader, 2007). Durante la maduración se producen cambios bioquímicos y estructurales que originan cambios en los constituyentes, alcanzando el fruto las características sensoriales óptimas para su consumo. Para el consumo en fresco, la recolección temprana permite prolongar la textura más tiempo, pero disminuye el contenido en compuestos volátiles que contribuyen al aroma y flavor. La firmeza disminuye conforme aumenta el tamaño y avanza la maduración, a causa del aumento del tamaño celular y de la modificación química de la pared celular. Durante la maduración se producen también cambios de color que se caracterizan por la desaparición de las clorofilas y la síntesis de pigmentos coloreados, fundamentalmente carotenoides y antocianos. Así, Couture *et al.* (1993), trabajando con lechugas mínimamente procesadas cosechadas en los estados inmaduro, maduro y sobremaduro, encontraron que entre los 6 y 10 días de almacenamiento existían diferencias significativas en la calidad visual como consecuencia de diferentes niveles de pardeamiento. Por otro

lado, Howard *et al.* (1994) determinaron que el contenido total de vitamina C en pimiento rojo era un 30% superior al de pimiento verde. Es evidente por tanto, que los atributos sensoriales (color, sabor, textura y aroma) y el contenido en compuestos responsables de los aspectos nutricionales serán diferentes en función del momento de la recolección, determinando la calidad en dicho momento y su evolución en la posrecolección.

1.3.3. Factores ambientales

Los factores ambientales ejercen una gran influencia en la calidad y en el valor nutricional de frutas y hortalizas. En particular, la *luz* juega un papel esencial en la calidad de los productos hortofrutícolas, ya que es requerida para la fotosíntesis y los múltiples procesos que derivan de ella. La intensidad luminosa está relacionada de manera positiva con la síntesis de metabolitos secundarios, tal y como se ha observado en vegetales de hoja, donde al aumentar la intensidad luminosa aumenta la concentración de β -caroteno y vitamina C (Oyama *et al.*, 1999; Weerakkody, 2003). Además de influir en la concentración de compuestos bioactivos, la luz es el factor que más influye en las concentraciones de nitratos en las hortalizas. La acumulación de nitratos en los tejidos de las plantas es más frecuente en condiciones de baja intensidad luminosa, especialmente en las verduras de hoja verde, como lechuga y espinaca (Drews *et al.*, 1997). Una concentración elevada de nitratos en las hortalizas se considera potencialmente perjudicial para la salud humana, ya que se puede combinar con aminas secundarias dando lugar a nitrosaminas que pueden aumentar el riesgo de cáncer gastrointestinal (Hord *et al.*, 2009).

La *temperatura* también afecta al crecimiento y desarrollo de las plantas por su influencia sobre el metabolismo, la estructura celular y los componentes que determinan la textura. Los efectos directos de las altas temperaturas incluyen daños en las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos y los indirectos, inhibición de la síntesis de pigmentos y degradación térmica de los ya existentes (Kays, 1999). Según Romojaro *et al.* (2006), la firmeza de los frutos es mayor y se mantiene durante más tiempo a bajas temperaturas. Además, en lechuga, cuando el cultivo se realiza a temperaturas altas, las hojas pierden firmeza y desarrollan sabor amargo. La magnitud del daño depende de la temperatura, del tiempo de exposición, de la susceptibilidad de la especie, del estado de desarrollo, etc. Por otro lado, la síntesis de ciertos pigmentos como los carotenoides

también ha demostrado ser sensible a la temperatura. Helyes *et al.* (2003) observaron que el contenido de licopeno en tomates cherry cultivados en invernadero era tres veces superior a temperaturas de 16 °C en comparación con los cultivados a 25 °C. En otro estudio, Oyama *et al.* (1999) observaron una mayor concentración de β -caroteno en espinacas y lechugas expuestas a temperaturas bajas (15/10 °C día/noche), en comparación con las cultivadas bajo temperaturas más altas (20/15 °C día/noche). La temperatura también tiene un efecto sobre el contenido de nitratos en hortalizas. Como ejemplo, un estudio de lechuga cultivada bajo diferentes temperaturas demostró que la exposición a temperaturas más altas (14/6 °C día/noche) daba lugar a un mayor contenido de nitratos frente a las cultivadas a temperaturas más bajas (6/6 °C día/noche) (Behr y Wiebe, 1992). Cuando además la alta temperatura va acompañada de una radiación solar intensa, se pueden producir daños fisiológicos, alteración del color por disminución de la síntesis de pigmentos, pardeamiento y modificación de las propiedades organolépticas, debido a cambios en el contenido en sólidos solubles y acidez titulable (Romojaro *et al.*, 2006).

1.3.4. Factores agronómicos

1.3.4.1. Frecuencia de riego, poda y aclareo

Uno de los factores agronómicos que condiciona la calidad en el momento de la recolección y durante la conservación poscosecha es la cantidad y el momento de aplicación del agua de riego. Los gradientes de potencial hídrico entre el tejido vegetal y el aire, condicionan la importancia de la disponibilidad de agua y de la humedad relativa ambiental, debido a que cuando la planta pierde agua se produce un flujo de la misma hacia las hojas, disminuyendo el aporte hídrico y de nutrientes al fruto. Con una pérdida de humedad superior al 5%, el turgor celular puede verse afectado y en consecuencia la textura puede disminuir sensiblemente, sobre todo en los vegetales de hoja como espinaca y lechuga (Shackel *et al.*, 1991). El riego presenta el dilema de tener que escoger entre producción y calidad; un estrés moderado reduce el rendimiento del cultivo pero puede mejorar algunos atributos de calidad de la fruta. Cuando el riego se realiza en fechas próximas a la recolección, se observa un aumento de tamaño y dilución de los

componentes celulares, con la consiguiente pérdida de calidad sensorial y rajado y agrietado de los frutos (Romojaro *et al.*, 2006).

Algunas prácticas agrícolas como la poda y el aclareo también condicionan la calidad precosecha de los frutos. El aclareo incrementa el tamaño de los frutos por un aumento de la relación hoja/fruto. Sin embargo, hay que considerar que aunque el aclareo aumenta el tamaño de los frutos, a la vez reduce el rendimiento total, por lo que debe procurarse un equilibrio entre el rendimiento y el tamaño de la fruta (Crisosto y Mitchell, 2007). Es importante considerar que, generalmente, los máximos beneficios no se obtienen con la máxima producción comerciable, ya que es la fruta de mayor tamaño la que alcanza mayor precio en el mercado.

La posición de los frutos y la eliminación de hojas son factores que también tienen incidencia en la calidad de la fruta. El contenido de sólidos solubles, acidez y tamaño difiere entre frutas ubicadas en la parte exterior y aquellas que se encuentran en la parte interior del árbol.

1.3.4.2. Fertilización

El estado nutricional de la planta es un factor importante para la calidad en el momento de la cosecha, así como en la vida poscosecha de frutas y hortalizas (Crisosto y Mitchell, 2007). Tanto el contenido de un nutriente como el equilibrio entre uno o más nutrientes afecta al crecimiento y al estado fisiológico del fruto pudiendo originar desordenes fisiológicos, tanto por deficiencia como por una dosis excesiva (Soares-Gomes *et al.*, 2005). Nitrógeno, calcio y potasio son los nutrientes que mayor interés tienen, al participar de forma activa en numerosos procesos metabólicos (Romojaro *et al.*, 2006). Dentro de éstos, el *nitrógeno* es el elemento que mayor efecto tiene en la calidad de frutas y hortalizas (Crisosto y Mitchell, 2007). En general, se considera que un contenido excesivo de nitrógeno se traduce en una mayor producción foliar a costa de una menor calidad del fruto; induciendo cambios en su composición tales como la reducción en el contenido de carotenoides, vitamina C, azúcares, acidez y alteraciones en la proporción de aminoácidos esenciales (Crisosto y Mitchell, 2007). El *calcio* está relacionado con numerosas fisiopatías de considerable importancia económica para la producción y calidad

poscosecha de frutas y hortalizas, especialmente con la textura, ya que participa en numerosos procesos de desarrollo y mantenimiento de la estructura de la pared celular, por su capacidad para establecer enlaces iónicos con los grupos carboxilatos de las pectinas (Poovaiah *et al.*, 1988). Estas fisiopatías pueden acentuarse si los niveles de potasio o nitrógeno son altos o cuando los niveles de fósforo son bajos (Beverly *et al.*, 1993; Crisosto y Mitchell, 2007). El *potasio* lleva a cabo funciones vitales en el metabolismo, crecimiento y adaptación al estrés. En cuanto a su participación en el metabolismo celular, juega un papel clave en la fotosíntesis, promueve la síntesis, translocación y almacenamiento de carbohidratos y optimiza la regulación hídrica en los tejidos vegetales. Además, activa el crecimiento radicular, aumenta la resistencia a la sequía y a las heladas y disminuye la incidencia de plagas y enfermedades.

1.3.4.3. Cultivo bajo invernadero

Los cultivos protegidos juegan un papel importante en la producción de verduras frescas. Debido a los métodos de producción intensiva y períodos más largos de cultivo, el rendimiento de hortalizas de invernadero es mucho mayor que el de hortalizas al aire libre. Además, los productos de invernadero tienen generalmente alta calidad visual, de modo que su valor de mercado es alto en comparación con el de las hortalizas producidas al aire libre.

La tecnología de invernadero ofrece muchos recursos para controlar las condiciones de luz, temperatura, humedad, concentración de CO₂, agua y la disponibilidad de nutrientes (Gary, 2003). La gran ventaja es que los ambientes controlados ofrecen una manera de optimizar los parámetros ambientales y que el producto no está expuesto directamente a los cambios repentinos de las condiciones climáticas. El uso de invernaderos hace así posible la producción fuera de la temporada normal. Si bien esto generalmente se traduce en un mejor precio para el productor, la calidad del producto puede verse perjudicada. A pesar de las ventajas obtenidas en comparación con la producción al aire libre, los invernaderos nunca están completamente libres de las influencias de las situaciones de estrés, especialmente con respecto al calor y la energía de la luz (Peet, 1999; Tognoni *et al.*, 1999). Las plantas que crecen en ambientes controlados como los invernaderos presentan una mayor tasa de crecimiento, casi siempre asociada a una mayor incidencia de

alteraciones fisiológicas, tales como la quemadura de puntas (Everaarts y Blom-Zandstra, 2001; Frantz *et al.*, 2004). Shinohara y Suzuki (1991), en un estudio realizado sobre lechuga, encontraron que el peso fresco, el número de hojas y el contenido de azúcares y ácido ascórbico disminuyeron notablemente en plantas cultivadas en invernadero frente a las cultivadas al aire libre, debido probablemente al efecto del sombreado. Sin embargo, una comparación directa entre invernaderos con productos del campo es difícil, porque la calidad es principalmente el resultado de los efectos interactivos de diferentes factores.

1.3.4.4. Sistemas de cultivo

El modelo de producción intensiva, surgido a partir de mediados del siglo XX como consecuencia de los avances científicos y tecnológicos generados por la llamada “Revolución Verde”, contribuyó de forma notoria a incrementar la producción de alimentos para una población humana en creciente aumento (Thévenet, 1995; Smil, 1997). Este modelo, 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 aumentan las producciones pero que, por otro lado, agravan los problemas de degradación de los suelos por erosión, salinidad, acidez, contaminación por plaguicidas y fertilizantes, etc. Debido a los problemas medioambientales y de salud pública que este tipo de agricultura puede provocar, han surgido otros modelos de producción más respetuosos con el medio ambiente y que garantizan una agricultura sostenible, como son la Producción Integrada, el cultivo ecológico o el cultivo sin suelo.

1.3.4.4.1. Producción Integrada

Según el Real Decreto 1201/2002, de 20 de noviembre (BOE nº 287), la Producción Integrada se define como un sistema de producción agraria que, aprovechando al máximo los recursos y los mecanismos de producción naturales, asegura a largo plazo una agricultura sostenible, introduciendo en ella métodos biológicos y químicos de control y otras técnicas que compatibilizan las exigencias en cuanto a calidad, con la protección del medio ambiente y la productividad agraria. La finalidad de la Producción Integrada es, en consecuencia, obtener productos de alta calidad minimizando el uso de productos

agroquímicos, disminuyendo los residuos y optimizando los métodos de producción, mediante una integración total de los recursos disponibles. Sirve para garantizar la salud del consumidor y, al mismo tiempo, respetar el medio ambiente. Para la consecución de estas finalidades, la Producción Integrada da prioridad a la utilización selectiva de técnicas menos agresivas y productos menos perjudiciales, tanto para los humanos como para la flora y la fauna silvestres. A diferencia de lo que ocurre con la producción ecológica, la Producción Integrada permite la utilización de productos agroquímicos de síntesis, como fertilizantes y plaguicidas, aunque su utilización queda restringida a la autorización previa de éstos y a la aplicación correspondiente en cuanto a dosis que establezcan las normas técnicas del cultivo que se trate.

Este sistema de explotación agraria persigue los siguientes objetivos:

- Conservación de recursos (edafológicos, hidráulicos, genéticos, etc.).
- Uso racional de insumos (energéticos, fitosanitarios, fertilizantes, etc.).
- Gestión adecuada de residuos, tanto sólidos como líquidos.
- Conservación y mejora del medio (paisaje, ecosistemas, seguridad e higiene de la población rural, etc.).

Los principios en los que se fundamenta la Producción Integrada son:

- Regulación de todo el agrosistema de manera holística.
- Minimización de impactos no deseados y de costes externos sobre la sociedad.
- Renovación y actualización de los conocimientos sobre Producción Integrada de los agricultores.
- Equilibrio de los aportes y pérdidas de nutrientes.
- Conservación y aumento de la fertilidad natural del suelo.
- Control integrado de plagas, patógenos y malas hierbas como base en la protección de cultivos.
- Refuerzo de la diversidad biológica.

- Evaluación de la calidad de la producción mediante parámetros ecológicos del sistema de producción y parámetros de calidad interna y externa.

Según datos del anuario de estadística de 2011, publicado por el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, la superficie de Producción Integrada en la Región de Murcia ha experimentado un considerable aumento durante el periodo 2007-2011, pasando de 11400 ha a 21549 ha, respectivamente (Figura 1.14). La mayor superficie está destinada a cítricos (27%), frutales (27%) y frutos secos (21%), seguidos de la vid (13%), el olivar (7%), y las hortalizas (6%) (Figura 1.15). Entre las hortalizas, la que más superficie ocupa es el brócoli, abarcando casi el 50% de la superficie cultivada. Le siguen pimiento y lechuga que ocupan igual superficie (20%) y en menor proporción melón y sandía con un 9% y un 6% respectivamente (Figura 1.16).

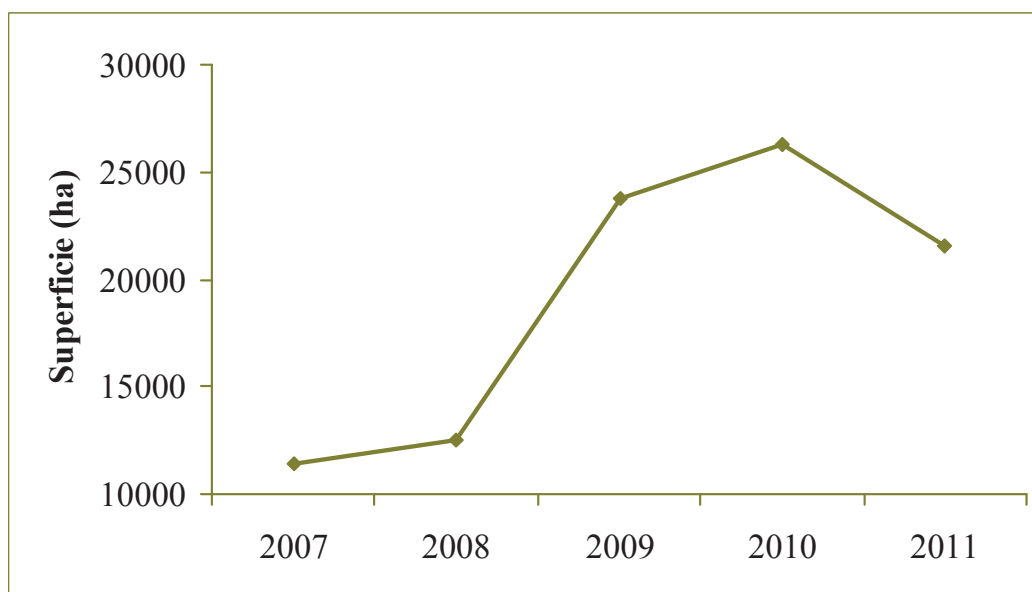


Figura 1.14. Evolución de la superficie de Producción Integrada en la Región de Murcia. Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011.

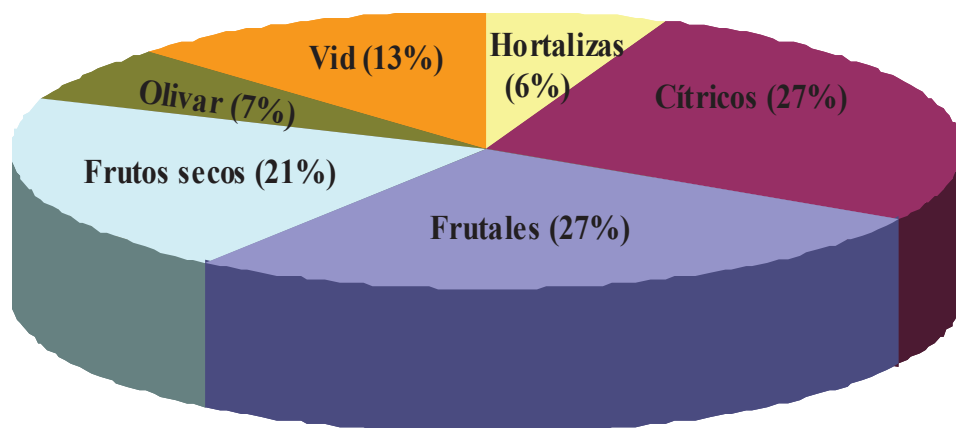


Figura 1.15. Distribución por tipo de cultivo de la superficie de Producción Integrada. Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011.

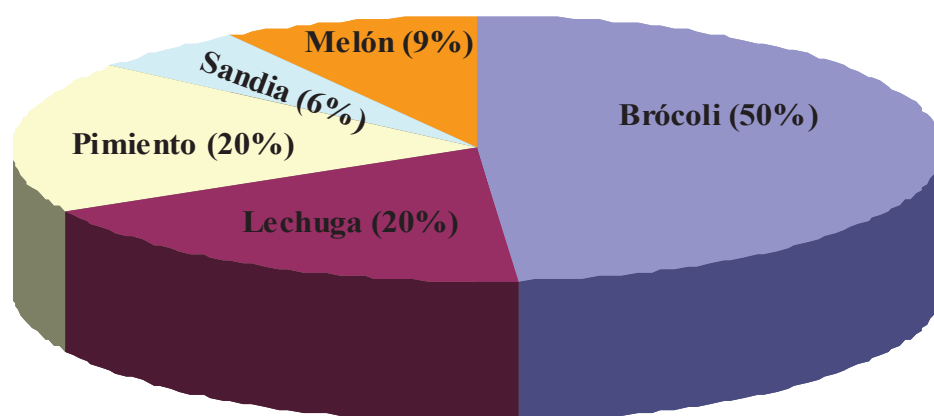


Figura 1.16. Distribución de cultivos de hortalizas en Producción Integrada. Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011.

1.3.4.4.2. Agricultura Ecológica

Según el Reglamento (CE) nº 834/2007, de 28 de junio de 2007 (DO L 189 de 20.7.2007), la producción ecológica se define como un sistema general de gestión agrícola y producción de alimentos que combina las mejores prácticas ambientales, un elevado nivel de biodiversidad, la preservación de recursos naturales, la aplicación de normas exigentes sobre bienestar animal y una producción conforme a las preferencias de determinados consumidores por productos obtenidos a partir de sustancias y procesos naturales. Así pues, los métodos de producción ecológicos desempeñan un papel social doble, aportando, por un lado, productos ecológicos a un mercado específico que responde a la demanda de los consumidores y, por otro, bienes públicos que contribuyen a la protección del medio ambiente, al bienestar animal y al desarrollo rural.

La producción ecológica persigue los siguientes objetivos generales:

- Asegurar un sistema viable de gestión agrario que:
 - Respete los sistemas y los ciclos naturales y preserve y mejore la salud del suelo, el agua, las plantas y los animales y el equilibrio entre ellos.
 - Contribuya a alcanzar un alto grado de biodiversidad.
 - Haga un uso responsable de la energía y de los recursos naturales como el agua, el suelo, las materias orgánicas y el aire.
- Obtener productos de alta calidad.
- Obtener una amplia variedad de alimentos y otros productos agrícolas que respondan a la demanda de los consumidores de productos obtenidos mediante procesos que no dañen el medio ambiente, la salud humana, la salud y el bienestar de los animales ni la salud de las plantas.

La producción ecológica está basada en los siguientes principios:

- Diseño y gestión adecuada de los procesos biológicos basados en sistemas ecológicos que utilicen recursos naturales propios del sistema.
- Restricción del recurso a medios externos.
- Estricta limitación del uso de medios de síntesis.

- Mantenimiento y aumento de la vida, la fertilidad, la estabilidad y la biodiversidad del suelo, la prevención y el combate de la compactación y la erosión de suelo, y la nutrición de los vegetales con nutrientes que procedan principalmente del ecosistema edáfico.
- Reducción al mínimo del uso de recursos no renovables y de medios de producción ajenos a la explotación.
- Reciclaje de los desechos y los subproductos de origen vegetal y animal como recursos para la producción agrícola y ganadera.
- Mantenimiento de la salud de los vegetales mediante medidas preventivas, como la elección de especies y variedades apropiadas que resistan a los parásitos y a las enfermedades, las rotaciones apropiadas de cultivos, los métodos mecánicos y físicos y la protección de los enemigos naturales de las plagas.

En el ámbito regional, la producción ecológica ha experimentado desde el año 2006 un importante crecimiento, tanto en superficie como en número de operadores. Durante el periodo 2006 a 2011 se ha producido un incremento de superficie y operadores del 149% y del 187% respectivamente (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Evolución de la superficie inscrita en Agricultura Ecológica (ha).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Total superficie calificada	23908	24683	37599	60742	61398	59645
Superficie Agricultura Ecológica	18539	20595	21418	22442	4.069	53449
Superficie en Conversión	3970	2778	7238	33895	19160	4978
Superficie 1^{er} año prácticas	1397	1308	8942	4404	2167	1218

Datos extraídos del Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011.

Dentro de la superficie agrícola ecológica cultivada, destacan los frutos secos que representa un 41% de la superficie total inscrita, la vid con un 17% y los cereales y leguminosas con un 16%. Le siguen hortalizas y tubérculos y el olivar y otros cultivos

pequeños en superficie pero fundamentales por su dimensión económica como frutales y cítricos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Evolución de la superficie de Agricultura Ecológica según tipo de cultivo (ha).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
TOTAL	23907	24683	37599	60742	61398	59645
Cereales/Leguminosas	4188	3967	4375	10646	9757	9402
Hortalizas/Tubérculos	999	1485	1367	1356	1628	1595
Cítricos	169	236	458	479	562	719
Frutales	393	411	487	527	529	497
Olivar	1228	1236	1918	2666	2965	3021
Vid	3679	3465	5400	10945	10675	10418
Frutos Secos	7151	7917	17750	24240	24863	24678

Datos extraídos del Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011.

En lo que se refiere a los operadores, su número ascendió a 2525 en 2011, lo que supone un incremento del 50% frente a los 1683 del 2008, un paso más en la consolidación del sector, puesto que los datos de 2008 ya registraron un incremento del 91% respecto a 2006 (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Evolución del número de operadores en Agricultura Ecológica.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
TOTAL OPERADORES	879	919	1683	2393	2460	2525
Productores	752	785	1528	2222	2272	2282
Elaboradores/ comercializadores	124	151	174	170	183	238
Elaboradores		151	164	157	164	210
Otros (comercializadores)			10	13	19	28
Importadores	3	4	4	5	5	5

Datos extraídos del Anuario Estadístico de la Región de Murcia, 2011.

1.3.4.4.3. Cultivo sin suelo

Los cultivos sin suelo son sistemas de cultivo en los que la planta desarrolla su sistema radicular en un medio (sólido o líquido) al cual se añade una solución de nutrientes que contiene todos los elementos esenciales requeridos por la planta para su crecimiento normal. Los cultivos sin suelo suelen clasificarse en *cultivos hidropónicos* (cultivo en agua más nutrientes o sobre materiales inertes) y *cultivos en sustrato* (cultivo sobre materiales químicamente activos, con capacidad de intercambio catiónico). Además, los cultivos sin suelo pueden funcionar como sistemas abiertos, a solución perdida (no recirculante), o como sistemas cerrados, con recirculación de las soluciones nutritivas. Los sistemas de cultivo sin suelo presentan unas características diferenciales importantes en comparación con el cultivo en suelo, entre ellas cabe citar el control riguroso de los aspectos relacionados con el suministro de agua y nutrientes (especialmente cuando se trabaja en sistemas cerrados) y la capacidad de acogida de residuos y subproductos para ser utilizados como sustratos de cultivo. En general, un control preciso de la nutrición de las plantas que crecen en los cultivos sin suelo, favorece un mayor rendimiento y una mejora cualitativa de los productos.

Los cultivos sin suelo presentan varias ventajas que los hacen más competitivos frente a los cultivos en suelo, entre las que destacan:

- Óptima relación aire/agua en el sistema radicular de la planta, favoreciendo por tanto el desarrollo del cultivo.
- Mayor control de la nutrición.
- Empleo de sustratos totalmente inertes, con ausencia de enfermedades típicas del suelo que convierten al sistema de cultivo sin suelo en una buena alternativa al uso de desinfectantes como el bromuro de metilo.
- Obtención de cultivos uniformes que facilitan las labores culturales, como podas, entutorados, etc. y suprimen los trabajos de incorporación de abonados de fondo, preparaciones de suelo y eliminación de malas hierbas, mejorando en general las condiciones de trabajo.

- Mayor precocidad y mayor potencial productivo, debido a que la planta cuando toma la solución nutritiva, consume menos energía para su desarrollo que en los sistemas de cultivo en suelo.
- Mejor calidad de cultivo y por lo tanto del producto.

1.4. AUTENTICIDAD DE PRODUCTOS VEGETALES ECOLÓGICOS

En los últimos años, la demanda de productos ecológicos ha aumentado de manera notable, debido principalmente a la percepción de los consumidores de que éstos son más sanos y más seguros que los productos convencionales. Respecto a la producción de frutas y hortalizas ecológicas, se prohíbe el uso de plaguicidas y fertilizantes de síntesis, lo que dificulta el manejo del cultivo y aumenta los costes de producción. Ante estas circunstancias y dificultades para el cultivo, existe el riesgo de que productos producidos convencionalmente sean etiquetados como ecológicos. Generalmente los controles analíticos realizados sobre frutas y verduras ecológicas se limitan a la búsqueda de residuos de plaguicidas, siendo la ausencia o la presencia de estas sustancias el único criterio para discriminar entre estos productos y los producidos bajo prácticas convencionales (Woese *et al.*, 1997). Sin embargo, a diferencia de las herramientas disponibles para detectar residuos de plaguicidas, no existe una metodología fiable para confirmar que los productos ecológicos han sido cultivados exclusivamente con fertilizantes orgánicos. Los compuestos nitrogenados que componen estos fertilizantes deben ser mineralizados antes de que el N sea absorbido por las plantas y la tasa de mineralización depende de muchos factores tales como el tipo de suelo, el clima y la actividad microbiana (Bulluck *et al.*, 2002). Una de las mayores limitaciones para el cultivo de plantas bajo producción ecológica, es la baja disponibilidad de N, lo que produce efectos negativos sobre el rendimiento y la calidad del fruto. Por tanto, uno de los fraudes más probables y a su vez más difíciles de detectar en Agricultura Ecológica, es la aplicación de fertilizantes de síntesis, principalmente nitrogenados.

Con el fin de desarrollar una herramienta analítica que garantice la autenticidad de los productos ecológicos, se han investigado diversos marcadores isotópicos (Georgi *et al.*,

2005; Suzuki *et al.*, 2009). Entre ellos, la abundancia natural del isótopo ^{15}N ha mostrado ser un indicador prometedor para la autenticación de frutas y hortalizas ecológicas, tales como tomate (Nakano y Uehara, 2007), pimiento (Flores *et al.*, 2007), patata (Camin *et al.*, 2007), lechuga (Sturm *et al.*, 2011) y naranja (Rapisarda *et al.*, 2005). El patrón de referencia que se utiliza para estudiar la abundancia natural de ^{15}N de una muestra, es el N_2 atmosférico, que presenta una relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de 0,0036765 que corresponden a 0,3663 átomos % de ^{15}N . En concreto, la abundancia natural de ^{15}N de una muestra se expresa en forma de $\delta^{15}\text{N}$, que indica la desviación de la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de la muestra con respecto a la del N_2 atmosférico, expresada en tanto por mil.

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = ((R_m - R_{\text{std}}) / R_{\text{std}}) * 1000$$

donde $R_m = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ de la muestra

y $R_{\text{std}} = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ del patrón

Los fertilizantes nitrogenados de síntesis tienen valores de $\delta^{15}\text{N}$ próximos a 0‰ (normalmente comprendidos entre -3 y 2‰) ya que su N proviene del N_2 atmosférico, (cuyo $\delta^{15}\text{N}$ es 0) y tiende a haber poco fraccionamiento durante el proceso de producción (Wassenaar, 1995). Por otro lado, los fertilizantes de origen orgánico tienen, por lo general, un valor de $\delta^{15}\text{N}$ mayor que el de los fertilizantes de síntesis, con valores medios alrededor del 8‰ (Wassenaar, 1995; Choi *et al.*, 2002). Esto se debe a que la volatilización del amoníaco, durante el proceso de descomposición de la materia orgánica, se produce preferentemente sobre el isótopo más ligero (^{14}N), enriqueciéndose el abono en el más pesado (^{15}N) (Kerley y Jarvis, 1996). Estas diferencias sugieren que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en suelo, planta y fruto pueden ser utilizados como indicador del sistema de producción utilizado (Choi *et al.*, 2003). Sin embargo, dichos valores pueden verse alterados como consecuencia del fraccionamiento isotópico que tiene lugar durante los diferentes procesos físicos, químicos y biológicos que intervienen en la mineralización de los compuestos nitrogenados y, la absorción y distribución del N a lo largo de la planta. Entre los factores que pueden afectar a la composición isotópica de frutas y hortalizas, se encuentran la especie cultivada, el tipo de suelo, la duración del ciclo de cultivo y, especialmente, el tipo, la dosis, frecuencia y modo de aplicación de los fertilizantes nitrogenados (Handley y

Scrimgeour, 1997; Evans, 2001; Choi *et al.*, 2003). Por otro lado, existen variaciones entre los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los frutos en comparación con los de la planta, puesto que las reacciones enzimáticas implicadas en la removilización y redistribución del N generalmente dan como resultado frutos con valores de $\delta^{15}\text{N}$ más bajos (Flores *et al.*, 2007). A pesar del alto potencial del valor de $\delta^{15}\text{N}$ como herramienta para detectar el uso de fertilizantes nitrogenados de síntesis, y debido a las desviaciones de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ respecto a los de la fuente original de N, los resultados no son siempre concluyentes y es difícil definir unos valores umbrales generales para clasificar los productos ecológicos.

Además de la abundancia natural de isótopos estables, otro parámetro que ha sido considerado como una firma analítica del producto y por lo tanto que puede ayudar en la discriminación entre productos cultivados bajo diferentes sistemas agrícolas, es el perfil de metabolitos de frutas y hortalizas (Capuano *et al.*, 2012). Este enfoque parece ser prometedor, ya que los perfiles de metabolitos vegetales son potencialmente una fuente muy rica de biomarcadores. En particular, el contenido en vitamina C y compuestos fenólicos de productos ecológicos en relación con sus homólogos convencionales ha sido ampliamente investigado. Camin *et al.* (2011) observaron que el contenido de ácido ascórbico, unido al contenido de sólidos solubles fueron los parámetros más importantes para diferenciar entre fresas, naranjas y melocotones convencionales y ecológicos. También se ha observado un aumento de la concentración de determinados metabolitos en productos ecológicos respecto a los obtenidos en productos cultivados bajo prácticas convencionales *i.e.* flavonoides en tomate (Chassy *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2007), espinaca, ajo y pimiento verde (Ren *et al.*, 2001), antocianinas en arándanos (Wang *et al.*, 2008) y compuestos fenólicos totales en berenjenas (Raigon *et al.*, 2010), melocotón y pera (Lairon, 2010). El mayor contenido de compuestos fenólicos observado en diferentes vegetales ecológicos ha sido atribuido por algunos autores, a la prohibición del uso de plaguicidas de síntesis, dando lugar a una mayor exposición de la planta a situaciones de estrés, lo que la llevaría a aumentar la síntesis de metabolitos secundarios como un mecanismo de defensa (Woese *et al.*, 1997; Winter y Davies, 2006). Por el contrario, la disponibilidad de N también puede modular las vías biosintéticas de la planta, dando como resultado una limitada síntesis de compuestos fenólicos en los cultivos ecológicos (Daniel *et al.*, 1999). Por otro lado, las plantas producidas bajo cultivo ecológico generalmente tienen períodos de maduración más largo en comparación con las plantas convencionales,

lo que hace que los metabolitos secundarios, que se forman durante este período, se acumulen en concentraciones más altas (Grinder-Petersen *et al.*, 2003). Sin embargo, a pesar de que este enfoque puede mejorar la clasificación de los vegetales en grupos ecológicos y convencionales, también presenta algunas limitaciones. Como ejemplo, en un estudio realizado sobre tres variedades de maíz, cultivadas bajo producción ecológica y convencional en dos localidades diferentes, solo se observaron diferencias atribuibles al sistema de cultivo en la concentración de tres metabolitos (ácido málico, myo-inositol y fosfato) de los trescientos detectados por cromatografía de gases con detector espectrómetro de masas (Rohlig y Engel, 2010). En este estudio, el análisis estadístico de componentes principales (ACP) demostró que la separación de datos fue debida principalmente a las diferencias genéticas (variedades) y a la influencia del medioambiente.

Además de los estudios comparativos sobre el perfil de metabolitos, se han realizado diversos trabajos sobre la composición mineral de cultivos ecológicos y convencionales (Woese *et al.*, 1997; Magkos *et al.*, 2003; Dangour *et al.*, 2009; Lairon, 2010). Aunque los resultados no son consistentes, existen evidencias que sugieren diferencias sistemáticas en las concentraciones de ciertos elementos como Mn, Ca, Cu y Zn entre dichos cultivos. Kelly y Bateman (2010) analizaron muestras de tomate y lechuga ecológicos y convencionales, encontrando concentraciones significativamente mayores de Ca, Cu, Zn y Rb en tomate y de Cu y Rb en lechuga y una concentración significativamente menor de Mn en tomate ecológicos. Según estos autores, cuando los valores de concentración de estos elementos se combinan con los de $\delta^{15}\text{N}$, se optimiza la discriminación entre tomate ecológico y convencional, pero no se observa ninguna mejora adicional en la clasificación de lechuga. A la vista de los antecedentes, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ pueden ser utilizados como una valiosa herramienta para la autenticación de productos ecológicos, sobre todo si se combina con otros marcadores como la composición mineral o el contenido de compuestos bioactivos en un enfoque multivariado.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

Los vegetales en general, y el pimiento y la lechuga en particular, son una excelente fuente de nutrientes como azúcares, ácidos orgánicos y compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud tales como vitamina C, compuestos fenólicos, folatos, carotenoides y clorofilas. Estos compuestos con actividad antioxidante juegan un papel importante en la protección de la salud humana, reduciendo el riesgo de varias enfermedades crónicas, incluyendo ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Sin embargo, el contenido de estos compuestos bioactivos puede verse alterado por una serie de factores precosecha, entre los que podemos destacar factores genéticos y algunas prácticas agronómicas como el sistema de cultivo.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar el efecto de las técnicas de cultivo y la influencia del genotipo sobre la calidad de pimiento y lechuga respectivamente y desarrollar una metodología para detectar posibles aplicaciones fraudulentas de fertilizantes de síntesis en Agricultura Ecológica. Para la consecución del objetivo principal, se han contemplado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar las características físicas y la composición mineral y antioxidante de pimiento cultivado bajo sistemas de producción ecológica, convencional y sin suelo, incluyendo estudios realizados en explotaciones comerciales y bajo condiciones controladas en invernaderos experimentales.
2. Evaluar la calidad de diferentes cultivares de lechuga, perteneciente a los tipos Romana, Mini Romana y Little Gem, en función de sus características físico-químicas y contenido

en compuestos bioactivos, ofreciendo información que permita su selección por sus propiedades beneficiosas para la salud y/o su adecuación para un determinado uso.

3. Estudiar la viabilidad de una aproximación multivariante para discriminar pimiento y lechuga cultivados bajo sistemas de producción ecológico y convencional, considerando como variables la composición mineral, abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) y el perfil de metabolitos.

CAPÍTULO 3

TÉCNICAS ANALÍTICAS

CAPÍTULO 3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MINERAL EN MATERIAL VEGETAL

3.1.1. Cationes y fósforo total

La determinación de la concentración de cationes (K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn) y fósforo total (P) en hoja y fruto se realizó siguiendo el método descrito por Chapman y Pratt (1961). Se pesaron 100 mg de material vegetal seco y molido y se añadieron 3 mL de una mezcla de HNO₃/HClO₄ (2/1 v/v) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 h tapado con un embudo de cristal. Posteriormente se realizó una digestión en un termo bloque Bloc Digest Selecta μ 40 (Barcelona, España) en varias etapas; la primera 2 h a 50 °C, la segunda 2 h a 100 °C, la tercera 2 h a 150 °C y por último a 200 °C hasta que la muestra se decoloró totalmente. Una vez a temperatura ambiente, el residuo que contenía los elementos minerales se aforó hasta 25 mL con agua desionizada. La determinación se realizó mediante un espectrofotómetro de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP) Varian Vista MPX (Victoria, Australia) mediante la selección de las siguientes longitudes de onda (nm): 766.491 (K), 445.478 (Ca), 285.213 (Mg), 238.204 (Fe), 324.754 (Cu), 259.372 (Mn), 213.857 (Zn) y 213.618 (P).

3.1.2. Aniones

Para la determinación de aniones (Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻ y PO₄²⁻), se utilizó el método descrito por Abbas *et al.* (1991). Se pesaron 50 mg de material vegetal seco y se le adicionaron 10 mL de agua desionizada. Posteriormente se agitaron durante 30 min en un agitador orbital Heidolph Reax 2 (Schwabach, Alemania) y se filtraron mediante filtros de

jeringa de 45 μm de diámetro de poro. La concentración de aniones se determinó en un cromatógrafo iónico Dionex ICS-3000 DC (Sunyvale, Ca, EEUU) provisto de una supresora ASRS-ULTRA II 4 mm, utilizando una precolumna AG9-HC 4 x 50 mm y una columna AS9-HC 4 x 250 mm. La fase móvil utilizada fue Na_2CO_3 9 mM y el flujo de 1 mL min^{-1} .

3.1.3. Nitrógeno total

El nitrógeno total (N_{total}) se determinó directamente en el material seco y molido (3 g) utilizando un Analizador Elemental Leco FP528 (St. Joseph, Mo, EEUU).

3.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS

3.2.1. Peso fresco, peso seco y contenido en agua

El peso fresco se determinó con un granatario Mettler Toledo PG 6002-S (Uznach, Suiza), con una precisión de 0,01 g. Para la determinación del contenido en agua, las muestras se secaron en una estufa Selecta (Barcelona, España) manteniéndolas a 65 °C durante 3 días hasta peso constante. El contenido en agua de fruto y hoja se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ agua} = \frac{\text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}}{\text{Peso Fresco}} \times 100$$

3.2.2. Calibre ecuatorial y longitudinal

El calibre ecuatorial y longitudinal de los frutos de pimiento se determinó con un calibre milimétrico con lectura digital Mitutoyo (Andover, Inglaterra). Estos valores se utilizaron para el cálculo del índice de forma (IF), según la siguiente fórmula:

$$IF = \frac{\text{Calibre Ecuatorial}}{\text{Calibre Longitudinal}}$$

3.2.3. Color

El color de las muestras de pimiento y lechuga se midió por reflectancia utilizando un colorímetro Minolta CR-200 (Ramsey, NJ, EEUU) a través de la lectura directa en tres áreas diferentes de la superficie de la muestra seleccionadas al azar, tomando la media de las tres mediciones como la definitiva. Los datos se expresaron como CIEL*a*b*, donde L* indica la luminosidad (0, negro; 100, blanco), y a* (+, rojo; -, verde) y b* (+, amarillo; -, azul) son las coordenadas de cromaticidad (Figura 3.1). Los valores numéricos de a* y b* se convirtieron en *tono* ($\text{hue} = \tan^{-1} b^*/a^*$) y *croma* [$C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$]. El *tono* es un ángulo con valores de 0° a 360° (0°, rojo; 90°, amarillo; 180°, verde; 270°, azul; 360°, violeta), mientras que *croma* es la intensidad o la pureza del *tono* (McGuire, 1992).

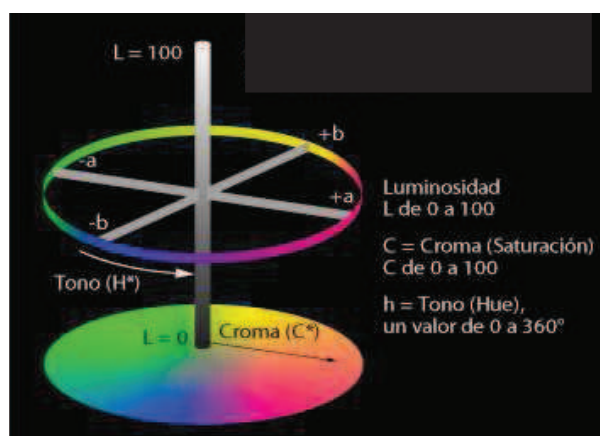


Figura 3.1. Espacio de color CIELab.

3.2.4. Espesor de pulpa

Para determinar el espesor de la carne, los frutos de pimiento se cortaron longitudinalmente por la mitad y se realizaron tres medidas a lo largo de la superficie del corte con un calibre milimétrico con lectura digital Mitutoyo (Andover, Inglaterra).

3.2.5. Firmeza

La firmeza se midió mediante un penetrómetro manual Bertuzzi FT 327 (Bertuzzi, Italia), con un émbolo 8 mm de diámetro, realizándose 3 medidas por fruto.

3.3. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN LAS FRACCIONES HIDROFÍLICA Y LIPOFÍLICA

3.3.1. Separación de fracciones hidrofílica y lipofílica

La separación de las fracciones hidrofílica y lipofílica de pimiento y lechuga se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Cano *et al.* (2002) y Cano *et al.* (2005), respectivamente. Se pesaron 3-5 g de muestra en una balanza de precisión Mettler Toledo PG 6002-S (Uznach, Suiza) y se homogenizó mediante un Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza) con 10 mL de tampón fosfato (50 mM, pH 7,5). Se añadieron 10 mL de acetato de etilo y se homogenizó de nuevo. El extracto se centrifugó a 8000 r.p.m. (10 min, 4 °C) en una centrífuga Eppendorf 5810R (Hamburgo, Alemania). Una vez separadas las fracciones hidrofílica y lipofílica se retiró el sobrenadante (fase lipofílica). El proceso se repitió tres veces utilizando 5 mL de acetato de etilo. La combinación de todas las fases lipofílicas se llevó a un volumen final de 25 mL con acetato de etilo. Esta fracción se utilizó para la determinación de la actividad antioxidante lipofílica (AAL) y para el análisis de carotenoides totales y clorofilas. La fracción hidrofílica se filtró a través de un filtro Millipore de 0,45 µm (Milford, MA, EEUU) y se

utilizó para la determinación de la actividad antioxidante hidrofílica (AAH) y del contenido en azúcares solubles, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos totales.

3.3.2. Determinación de la actividad antioxidante

La medida de la actividad antioxidante proporciona una estimación global del contenido de metabolitos con propiedades antioxidantes presentes en la muestra. Para la determinación de dicha actividad en las fracciones hidrofílica y lipofílica se utilizaron los métodos ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] y FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica).

3.3.2.1. Análisis de la actividad antioxidante mediante ABTS

Este método de decoloración, basado en la capacidad de las moléculas antioxidantes para reducir el radical $ABTS^{*\cdot}$ a ABTS, se determinó en ambas fracciones siguiendo el método descrito por Cano *et al.* (2002). Para la determinación de la capacidad antioxidante en la fracción hidrofílica se preparó una disolución de ABTS 5 mM, H_2O_2 30 μ M y peroxidasa de rábano picante (HRP) 0,25 μ M en tampón fosfato 50 mM (pH 7,5). Una vez preparada la mezcla se midió la absorbancia de la misma (A_0) ($\lambda=730$ nm), se añadió la muestra, se agitó y tras 2 min se midió la absorbancia final (A). La medida de la pérdida de coloración se obtuvo por la diferencia entre las lecturas de absorbancia inicial tras la formación del radical y la lectura final, una vez adicionada la muestra. Para la determinación de la capacidad antioxidante de la fracción lipofílica se preparó una disolución de ABTS 0,0625 mM, H_2O_2 30 μ M y HRP 0,25 μ M en etanol fosfórico (0,7%). Las medidas de absorbancia inicial y final se realizaron según el procedimiento descrito para la fracción hidrofílica. El cálculo de la actividad antioxidante hidrofílica, expresada como equivalentes de ácido ascórbico (AEAC), y de la actividad antioxidante lipofílica, expresada como equivalentes de trolox (TEAC), se realizó por comparación con una recta de calibrado de ácido ascórbico o trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), respectivamente, mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Índice AEAC o TEAC} = \frac{\% \text{ Inhibición} - a}{b}$$

donde:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

siendo:

A_0 = absorbancia inicial de la muestra.

A = absorbancia final de la muestra.

Los parámetros a y b se obtienen de la recta de calibrado: $y = a + b * x$

siendo:

y = % inhibición del estándar.

x = concentración de estándar.

3.3.2.2. *Análisis de la actividad antioxidante mediante FRAP*

El método FRAP consiste en la formación de un complejo férrico con el reactivo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) el cual, en presencia de compuestos antioxidantes se reduce formando el correspondiente complejo ferroso de color azul (Fe^{2+} -TPTZ) con un máximo de absorbancia a 593 nm (Benzie y Strain, 1999). La aparición del color indica la capacidad reductora de la muestra, que es proporcional a la concentración de antioxidantes en la misma. Para el análisis de la actividad antioxidante en la fracción lipofílica el extracto de acetato de etilo se llevó previamente a sequedad y se redisolvió en metanol. Para la determinación de la capacidad antioxidante en ambas fracciones, se preparó una disolución que contenía tampón acetato 300 mM (pH 3,6), TPTZ 10 mM en HCl 40 mM y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Una vez preparada la mezcla se midió la absorbancia inicial, se añadió la muestra, se agitó y tras 1 h de incubación a 37 °C se midió la absorbancia final.

La medida del cambio de coloración se obtuvo por la diferencia entre las lecturas de absorbancia final e inicial. El cálculo de la actividad antioxidante se realizó por comparación con una recta de calibrado utilizando Fe^{2+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) o trolox como patrón.

3.3.3. Determinación de carotenoides totales y clorofilas

La determinación de carotenoides totales y clorofilas se realizó en la fracción lipofílica con un espectrofotómetro VIS/UV Shimadzu UV-2401PC (Kyoto, Japón) a tres longitudes de onda; 450 nm para β -caroteno, y 663 y 645 nm para clorofilas. La cuantificación de β -caroteno se realizó por comparación de la concentración de β -caroteno de la muestra con una curva estándar ($1\text{-}5 \text{ mg L}^{-1}$) de β -caroteno (Fluka, Steinheim, Alemania), expresándose la concentración de las muestras en $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco. Las concentraciones de clorofila *a* y *b* se calcularon mediante las ecuaciones corregidas de Nagata y Yamashita (1992):

Concentración de clorofila *a* (Cl *a*) expresada en mg/100 mL

$$\text{Cl } a = [0,9999 * \text{Abs } (663)] - [0,0989 * \text{Abs } (645)]$$

Concentración de clorofila *b* (Cl *b*) expresada en mg/100 mL

$$\text{Cl } b = [-0,328 * \text{Abs } (663)] + [1,77 * \text{Abs } (645)]$$

Concentración de clorofilas totales expresada en mg/100 mL

$$\text{Cl total} = \text{Cl } a + \text{Cl } b$$

3.3.4. Determinación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales se midieron en la fracción hidrofílica por el método descrito por Singleton y Rossi (1965). A una alícuota de 50 μL de muestra se añadieron

250 μL de reactivo Folin. Se agitó, se dejó reposar durante 8 min, a continuación se adicionó 1 mL de carbonato sódico 2%, se agitó nuevamente y se incubó a 40 °C durante 20 min. La concentración fenólica se calculó mediante el registro de la densidad óptica de cada muestra a 765 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Kyoto, Japón), comparándola con la de una curva estándar de ácido gálico (Fluka, Steinheim, Alemania) con concentraciones comprendidas entre 50 y 300 mg L^{-1} .

3.3.5. Determinación de azúcares solubles

La determinación de los azúcares solubles en la fracción hidrofílica se realizó en un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1100 (Waldbronn, Alemania), provisto de un detector de índice de refracción. La separación se llevó a cabo en una columna CARBOSep CHO-682 LEAD 300 \times 7,8 mm (Transgenomic, San Jose, CA, EEUU) utilizando agua ultrapura como fase móvil y un flujo de 0,4 mL min^{-1} . Para obtener la linealidad de la respuesta del detector y los límites de detección de los azúcares estudiados se inyectaron soluciones estándar de glucosa, fructosa y sacarosa (Sigma, Steinheim, Alemania), en concentraciones 1-10 g L^{-1} .

3.3.6. Determinación de ácidos orgánicos

El análisis de ácidos orgánicos se realizó según el método desarrollado por Flores *et al.* (2012), utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1200 (Waldbronn, Alemania) equipado con detector DAD y columna C_{18} Prontosil 250 \times 3 mm, 3 μm de tamaño de partícula (Bischoff, Alemania), utilizando ácido fórmico 0,1% (v/v) como fase móvil y un flujo de 0,4 mL min^{-1} . El análisis espectral de masas se realizó en un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo G6410A de Agilent equipado con un sistema de ionización por electroespray (ESI) operando en modo negativo. La cuantificación se realizó usando las siguientes transiciones para cada uno de los ácidos analizados: ácido málico (m/z 133 \rightarrow 115), cítrico (m/z 191 \rightarrow 111), fumárico (m/z 115 \rightarrow 71), glutámico (m/z 146 \rightarrow 128), tartárico (m/z 149 \rightarrow 87), quínico (m/z 191 \rightarrow 85), α -cetoglutárico (m/z 145 \rightarrow 101), succínico (m/z 117 \rightarrow 73), siquímico (m/z 173 \rightarrow 93) y

malónico (m/z 103 \rightarrow 59) (Sigma, Steinheim, Alemania). El intervalo de linealidad estuvo comprendido entre 0,05-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada ácido orgánico.

3.4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS

3.4.1. Extracción

Los compuestos fenólicos libres se extrajeron con metanol/ácido fórmico (97/3, v/v) de acuerdo con el método descrito por Cantos *et al.* (2002). Se pesaron 3 g de muestra y se homogenizaron con 5 mL de metanol/ácido fórmico en un Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza). El homogenizado se centrifugó a 10000 r.p.m. (15 min, 4 °C). El sobrenadante se retiró y el proceso se repitió adicionando 5 mL de metanol/ácido fórmico. La combinación de sobrenadantes se llevó a sequedad en un evaporador rotativo Büchi modelo R-205 (Flawil, Suiza) y el residuo se redisolvió en 2 mL de MeOH.

La extracción e hidrólisis simultánea de los compuestos fenólicos ligados se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Luthria *et al.* (2006). Se pesaron 3 g de muestra y se homogenizaron con 5 mL de medio de extracción, que contenía NaOH 2 N, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM y ácido ascórbico 1% (p/v). El extracto se incubó durante 30 min a 40 °C en un baño en agitación y posteriormente se acidificó con 1,4 mL de HCL 7,2 N. Los compuestos fenólicos hidrolizados se extrajeron de la mezcla con acetato de etilo (dos veces), el sobrenadante se llevó a sequedad en un evaporador rotativo Büchi modelo R-205 (Flawil, Suiza) y el residuo se redisolvió en 2 mL de MeOH.

3.4.2. Determinación

Ambos extractos (metanólico e hidrolizado) se inyectaron en un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1200 (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de espectrometría de masas de tipo triple cuádruplo equipado con un sistema de ionización por electroespray (ESI) operando en modo negativo. La separación se realizó en una

columna C₁₈ Licrosphere 250 x 4 mm de 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con ácido fórmico 5% (v/v) (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. El gradiente se inició con un 5% de B, hasta alcanzar el 10% de B en 9 min, un 30% de B en 50 min y se incrementó a 100% de B en 2 min, se mantuvo a 100% de B durante 3 min, volviendo a las condiciones iniciales en 1 min y permaneciendo en isocrático durante 6 min. La identificación y cuantificación se realizó usando las siguientes transiciones: ácido protocatéquico (*m/z* 153 → 108), ácido clorogénico (*m/z* 353 → 191), ácido cafeico (*m/z* 179 → 135), ácido *p*-cumárico (*m/z* 163 → 119), rutina (quercetina 3-O-rutinósido) (*m/z* 609 → 300), luteolina, (*m/z* 285 → 133), apigenina (*m/z* 269 → 117), kaempferol (*m/z* 285 → 117) y floridzina (floretilina 6'-O-glucósido) (*m/z* 475 → 273) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Los compuestos fenólicos ligados se cuantificaron como la diferencia entre los compuestos fenólicos libres determinados en el extracto metanólico y los determinados en el extracto hidrolizado, expresándose como derivados del ácido cafeico y derivados del ácido *p*-cumárico.

3.5. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE CAROTENOIDES

3.5.1. Extracción

Los carotenoides y las clorofilas se extrajeron según el método descrito por Böhm (2001). A 1 g de muestra se le añadieron 200 mg de MgO y 500 µL de β-apo-8'-carotenal (estándar interno) y se homogenizaron en un Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza) con metanol/tetrahidrofurano (1/1, v/v) que contenía 0,1% (p/v) de BHT (Butil hidroxitolueno). El homogenizado se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810R (Hamburgo, Alemania). La solución resultante se llevó a sequedad en un evaporador rotativo Büchi modelo R-205 (Flawil, Suiza). El residuo se redisolvió en 2 mL de metanol/metil tert-butil éter (1/1, v/v) y se utilizó para el análisis cromatográfico.

3.5.2. Determinación

La determinación se realizó en un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1200 (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector diodos array (DAD). La separación se realizó en una columna Prontosil C₃₀ 250 x 4,6 mm, 3 μm (Bischoff, Leonberg, Alemania) con metanol (disolvente A) y metil tert-butil éter (disolvente B) como fase móvil. Las condiciones iniciales fueron 15% de B durante 10 min, seguido de un aumento lineal hasta 90% de B durante 20 min. La elución se realizó a una velocidad de flujo de 1,3 mL min⁻¹ con un volumen de inyección de 20 μL. La detección se realizó a 450 nm para β-caroteno, 444 nm para luteína, 461 nm para β-apo-8'-carotenal y clorofila *a*, y 438 nm para neoxantina, violaxantina lactucaxantina y clorofila *b*. La identificación de los compuestos se logró mediante la comparación de los tiempos de retención, espectros UV utilizando estándares o referencias bibliográficas (Kimura y Rodríguez-Amaya, 2003) y los valores de *m/z* obtenidos mediante el análisis realizado en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Waldbronn, Alemania), provisto de un detector espectrómetro de masas tipo triple cuadrupolo, utilizando una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) operando en modo positivo. La cuantificación se realizó usando estándares disponibles de carotenoides (DHI LAB, Hoersholm, Dinamarca) y clorofilas (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), excepto para lactucaxantina, que se estimó utilizando neoxantina como referencia.

3.6. DETERMINACIÓN DE VITAMINA C

3.6.1. Extracción

La determinación de vitamina C, se realizó de acuerdo con la metodología desarrollada por Fenoll *et al.* (2011). Para la extracción se homogenizaron 3 g de muestra con 10 mL de EDTA 0,05% (p/v) en un Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza). El homogenizado se centrifugó (10000 r.p.m., 10 min, 4 °C) utilizando una centrífuga Eppendorf 5810R (Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se filtró a través de filtros de 0,45 μm (Millipore, Milford, MA, EEUU) y se pasó a través de un cartucho de

extracción en fase sólida Sep-Pak C18 previamente activado (Millipore, Milford, MA, EEUU). Finalmente las muestras se diluyeron con EDTA 0,05% (p/v), se le añadió DL-1,4-ditiotreitol (DTT) 5 mM para inducir la reducción de ácido dehidroascórbico (ADHA) a ácido ascórbico (AA), se dejaron incubar durante 30 min a 30 °C y se analizaron inmediatamente.

3.6.2. Determinación

La determinación de vitamina C se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1200 (Waldbronn, Alemania) equipado con una columna C₁₈ ProntoSil 250 x 3 mm, 3 μm tamaño de partícula (Bischoff, Leonberg, Alemania), utilizando ácido fórmico 0,2% (v/v) como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,4 mL min⁻¹. El análisis espectral de masas se realizó mediante un detector de masas de tipo triple cuadrupolo G6410A de Agilent equipado con un sistema de ionización por electroespray (ESI) operando en modo negativo. La cuantificación se realizó por comparación con un estándar de AA, usando la transición m/z 175 → 115 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

3.7. DETERMINACIÓN DE FOLATOS

La determinación de folatos se realizó por cromatografía líquida de acuerdo a la metodología descrita por Vatheristo *et al.* (1996). El análisis de folatos se lleva a cabo por la hidrólisis de éstos a monoglutamatos y directamente como poliglutamatos, ya que la diferencia entre la concentración de folatos en la muestra, con y sin adición del enzima conjugasa, es una medida de la cantidad de poliglutamatos de la matriz del alimento. El tratamiento de las muestras antes de su análisis puede ser dividido en tres etapas diferentes: extracción, desconjugación y purificación.

3.7.1. Extracción

A 4 g de muestra se le adicionaron 25 mL de tampón de extracción, 50 mM Ches/50 mM Hepes (pH 7,8), conteniendo 2% (p/v) de ascorbato sódico y 2-mercaptoetanol 10 mM. Las muestras se homogenizaron en un Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza) y se sometieron a atmósfera de nitrógeno durante 10 segundos. Posteriormente se mantuvieron en ebullición durante 10 min. Tras este tiempo, las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo y una vez frías se enrasaron a 50 mL con tampón de extracción. El pH se ajustó a 4,9 y se aplicó de nuevo nitrógeno con el fin de evitar la oxidación.

3.7.2. Desconjugación

La hidrólisis enzimática de poliglutamatos a monoglutamatos se llevó a cabo por adición del enzima pteroilglutamato hidrolasa o folato conjugasa (EC3.4.22.12), proveniente de riñón de cerdo (Leichter *et al.*, 1979).

3.7.2.1. Extracción del enzima conjugasa en tejido renal

La solución enzimática fue preparada según el procedimiento descrito por Gregory *et al.* (1984), a partir de riñones de cerdo frescos recién sacrificados, obtenidos en el matadero de Mercamurcia (El Palmar, Murcia). Una porción de 400 g de tejido renal fue homogenizada en un Polytron PT-MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza) con 1200 mL de 2-mercaptoetanol 10 mM. La suspensión obtenida se ajustó a pH 5,0 con ácido acético 1 M y seguidamente, se centrifugó (7500 r.p.m., 2 °C, 33 min) en una centrifuga Beckman modelo J2-21 (Fullerton, Ca, EEUU). El sobrenadante obtenido se introdujo en un baño a 50 °C durante 2 h en agitación continua. Trascorrido este tiempo se volvió a centrifugar (7500 r.p.m., 20 min, 2 °C). La fracción sobrenadante se precipitó entre el 50 y el 75% de saturación con sulfato de amonio. De nuevo se centrifugó en las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y el precipitado se introdujo en una membrana de diálisis de 21,5 mm de diámetro, con tamaño de poro de 12-14000 Daltons de peso (Dialysis Tubing-Visking Code DTV 12000.06.000, Medicell Int. LTD, Inglaterra) y se almacenó durante

toda la noche en un matraz Erlenmeyer con 2 L de tampón acetato potásico 0,05 M (pH 5,0), el cual contenía 2-mercaptoetanol 10 mM. El dializado fue almacenado en pequeños volúmenes a -35 °C hasta su posterior análisis.

3.7.2.2. Procedimiento de descojugación

Para la hidrólisis de los folatos se tomaron 5 mL de extracto y se adicionaron 1 mL de conjugasa de riñón de cerdo y 1 mL de α -amilasa en ascorbato 1% (p/v) (20 mg mL⁻¹). Posteriormente se aplicó nitrógeno y la muestra se introdujo en un baño durante 3 h a 37 °C con agitación constante. Pasado este tiempo, se llevó a ebullición durante 5 min con el fin de inactivar el enzima. A continuación la muestra se enfrió en hielo y se pasó a través de un filtro de 0,45 μ m de tamaño de poro (Millipore, Milford, MA, EEUU).

3.7.3. Purificación

Posteriormente a la filtración, las muestras fueron purificadas, empleando columnas de extracción en fase sólida con intercambio fuerte de aniones (SAX) de 500 mg (LiChrolut®, Merck, Alemania). Para su activación, los cartuchos se lavaron con hexano (2 veces), seguido de metanol, agua Mili-Q y finalmente solución de purificación (tampón fosfato potásico 0,01M, 2-mercaptoetanol 0,1% pH 7,0). Una vez activados se hizo pasar lentamente la muestra y por último 2 mL de solución de elución (NaCl 10%, acetato de sodio 0,1 M y ácido ascórbico 1%) que fue recogida en tubos, previamente pesados, para su posterior cuantificación.

3.7.4. Determinación

La determinación de los folatos se realizó según el método descrito por Vatheristo *et al.* (1996), utilizando un cromatógrafo de líquidos Merck-Hitachi 7000 (Tokio, Japón) equipado con un detector de fluorescencia con unos valores de excitación y emisión de 280 y 350 nm, respectivamente y un detector UV con una longitud de onda de 290 nm. La separación se realizó en una columna LiChrocart® 250 x 4 mm, HPLC Cartridge, con

precolumna: LiChrocart ®4-4, LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) (Darmstadt, Alemania). La fase móvil estuvo constituida por una mezcla de tampón fosfato potásico 30 mM (pH 2,2) (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Las condiciones iniciales del gradiente para la fase móvil fueron 6% de B, mantenido de manera isocrática durante los primeros 6 min y un aumento lineal hasta un 25% durante 20 min. El flujo fue 0,9 mL min⁻¹ y la temperatura de la columna 35 °C. Para la cuantificación se prepararon disoluciones estándar de tetrahidrofolato (THF), 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF), 5-formiltetrahidrofolato (5-FTHF) y ácido fólico (Dr. Schirck's Laboratorio, Jona, Suiza) en tampón borato 0,05 M pH 6,0, conteniendo 1% (p/v) de ácido ascórbico y 0,1% (v/v) de 2-mercaptoetanol. Los folatos totales se calcularon como la suma de las concentraciones de las formas detectadas tras la adición de conjugasa, mientras que las formas poliglutámicas se determinaron mediante la resta de las formas monoglutámicas, presentes de forma natural en el alimento, a los folatos totales.

3.8. ANÁLISIS DE LA ABUNDANCIA NATURAL DE ISÓTOPOS ESTABLES ($\delta^{15}\text{N}$)

Para el análisis de la abundancia natural de ¹⁵N ($\delta^{15}\text{N}$) se pesaron, en una microbalanza Mettler Toledo MX5 (Uznach, Suiza), 3-4 mg de suelo o material vegetal seco previamente encapsulado en cápsulas de estaño. La determinación se llevó a cabo usando un analizador elemental FlashEA 1112 ThermoFinnigan (Milán, Italia), acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas de isótopos estables DELTAplus Finnigan MAT (Bremen, Alemania), mediante una interfase de conexión ConFlo II Finnigan MAT. Los valores de la relación de isótopos se expresaron en δ ‰, utilizando como estándar la relación isotópica de nitrógeno en aire y realizando la calibración del gas con IAEA-N-1 (NH₄)₂SO₄, IAEA-N-2 ((NH₄)₂SO₄) y IAEA-NO-3 (KNO₃), de acuerdo con la fórmula:

$$\delta \text{ ‰} = \frac{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{muestra}} - {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{estándar}}}{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}_{\text{estándar}}} \times 1000$$

3.9. IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRUTOS DE PIMIENTO

3.9.1. Extracción

Para la extracción de residuos de plaguicidas en las muestras de pimiento se pesaron 10 g de fruto previamente triturado y se homogenizaron con 20 mL de acetona, usando un homogenizador (Kinematica AG, Littau, Suiza). A continuación se añadieron 20 mL de una mezcla de acetato de etilo/ciclohexano (1/1, v/v), se agitó y se centrifugó durante 10 min a 4000 r.p.m. con una centrifuga Eppendorf modelo 2810R (Hamburgo, Alemania). El extracto se filtró a través de filtros de papel Albet DP302, de 150 mm de diámetro (Barcelona, España). La fase orgánica se llevó a sequedad en un evaporador rotativo Büchi modelo R-205 (Flawil, Suiza). El residuo se redisolvió en 5 mL de acetato de etilo/ciclohexano (1/1, v/v) y se utilizó para el análisis cromatográfico.

3.9.2. Identificación

Para la identificación de residuos de plaguicidas se empleó un cromatógrafo de gases Agilent modelo HP 6890 (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector espectrómetro de masas modelo 5973N. Se empleó una columna capilar de sílica (30 m, 0,25 mm d.i.) suministrada por Agilent Technologies. Se utilizó como sistema de ionización el impacto electrónico con una energía de ionización de 70 eV. La temperatura de la fuente de iones fue 230 °C y la del cuadrupolo 150 °C. El voltaje del multiplicador de electrones se mantuvo a 1300 v. Se empleó He como gas portador. La temperatura de la columna se mantuvo a 70 °C durante 2 min y posteriormente se incrementó a una velocidad de 25 °C min⁻¹ hasta 150 °C, 3 °C min⁻¹ hasta 200 °C y 8 °C min⁻¹ hasta 280 °C, manteniendo esta temperatura final durante 10 min. La búsqueda de residuos se realizó usando una biblioteca creada con más de 200 estándares de los plaguicidas más comunes.

CAPÍTULO 4

CALIDAD DE PIMIENTO BAJO SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA, CONVENCIONAL Y SIN SUELO

CAPÍTULO 4. CALIDAD DE PIMIENTO BAJO SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA, CONVENCIONAL Y SIN SUELO

La demanda de productos ecológicos aumenta constantemente, principalmente debido a la percepción que tienen los consumidores de que son más sanos y seguros que los productos de alimentación convencionales. Si bien parece evidente su menor contenido de contaminantes, desde el punto de vista científico aún está por demostrar que la producción ecológica aporte alimentos de mejor calidad nutricional. En la bibliografía se encuentra una amplia gama de estudios que han tratado de investigar si existen diferencias en el valor nutricional de los productos hortofrutícolas procedentes de cultivos ecológicos y convencionales, pero los resultados obtenidos son contradictorios. Existen estudios en los que se concluye un efecto beneficioso de la producción ecológica sobre la composición nutritiva de frutas y hortalizas (Carbonaro *et al.*, 2002; Caris-Veyrat *et al.*, 2004; Lombardi-Boccia, 2004). Sin embargo, otros autores afirman que los productos ecológicos no presentan diferencias consistentes en la composición nutricional respecto a los productos convencionales (Woese *et al.*, 1997; Magkos *et al.*, 2003). Incluso, algunos autores han encontrado mayor calidad nutricional en frutas y hortalizas cultivadas bajo producción convencional (Warman, 2005; Lester, 2006). Con el fin de obtener resultados más concluyentes, Magkos *et al.* (2003) propusieron que la realización de este tipo de estudios comparativos abarcara tres categorías diferentes: i) Estudios sobre productos procedentes del mercado, ii) Estudios realizados en explotaciones comerciales y iii) Estudios realizados bajo condiciones controladas, en parcelas experimentales. Este trabajo de Tesis incluye estudios dentro de las dos últimas categorías. Los estudios realizados en invernaderos experimentales bajo condiciones controladas, se consideran el método más reproducible, ya que las plantas se cultivan en suelos similares, bajo las mismas condiciones climáticas y son muestreados al mismo tiempo. Sin embargo, este tipo de estudio no puede ser considerado como un reflejo real del sistema comercial de producción y debe realizarse de manera complementaria con estudios en explotaciones comerciales.

Otro sistema de producción en auge, debido a los altos rendimientos que proporciona incluso en zonas con condiciones de crecimiento adversas, es el sistema de cultivo sin suelo. Esta técnica surge como respuesta al progresivo deterioro del suelo de los invernaderos y de las zonas de producción hortícola en general, debido al agotamiento del suelo, la contaminación por productos químicos de alta persistencia y la salinización del suelo, cada vez más extendida. Se basa en el cultivo de plantas en un medio inerte (perlita, fibra de coco, arena gruesa, turba, vermiculita, etc.), al que se agrega una solución nutritiva que contiene todos los elementos esenciales requeridos por la planta para su crecimiento normal, intentando así subsanar los problemas que plantea la degradación del suelo (Jensen, 2001). Además de mejorar la productividad de los cultivos y dada su elevada tecnificación, la técnica de cultivo sin suelo permite consumir únicamente el agua necesaria, minimizando todo tipo de pérdidas y aportando solamente la cantidad de agua que las plantas estrictamente necesitan. A pesar de estas ventajas, los estudios comparativos sobre la calidad de los productos hortofrutícolas obtenidos por diferentes sistemas de producción, por lo general no incluyen el cultivo sin suelo y, en consecuencia, existe poca información sobre esta materia. Además de cultivo ecológico y convencional, esta investigación incluye el estudio comparativo de la calidad de pimiento cultivado bajo sistemas de producción sin suelo.

4.1. APROXIMACIÓN COMERCIAL

4.1.1. Material y métodos

4.1.1.1. Sitio de estudio y material vegetal

El estudio se llevó a cabo durante dos años consecutivos (2005 y 2006) en el sureste de España (37 ° 51' N, 0° 48' E, 50 m sobre el nivel del mar), en invernaderos ubicados en Murcia y Alicante, con un clima mediterráneo y un suelo clasificado como xerosol cálcico. Para este trabajo se empleó pimiento (*Capsicum annuum* L.) tipo California variedad Quito. Esta variedad corresponde a un pimiento corto y de carne gruesa, destinada al mercado en fresco. Los pimientos fueron suministrados por productores de pimiento,

adscritos a los diferentes sistemas de producción contemplados en el estudio (ecológico, convencional y sin suelo). Todos los invernaderos seleccionados se encontraban dentro de los márgenes delimitados en el mapa representado en la Figura 4.1. La selección de invernaderos vecinos respondió a la necesidad de minimizar la influencia de las condiciones ambientales (clima y las características del suelo). Además, en todos los invernaderos se siguieron similares procedimientos presiembra.



Figura 4.1. Localización de los invernaderos comerciales seleccionados para el estudio. Fuente: Cartomur.com

Los datos climáticos (radiación neta y temperatura media diaria) de la zona de ensayo, durante el periodo de estudio, fueron suministrados por el Sistema de Información Agraria de Murcia (SIAM) (Figura 4.2).

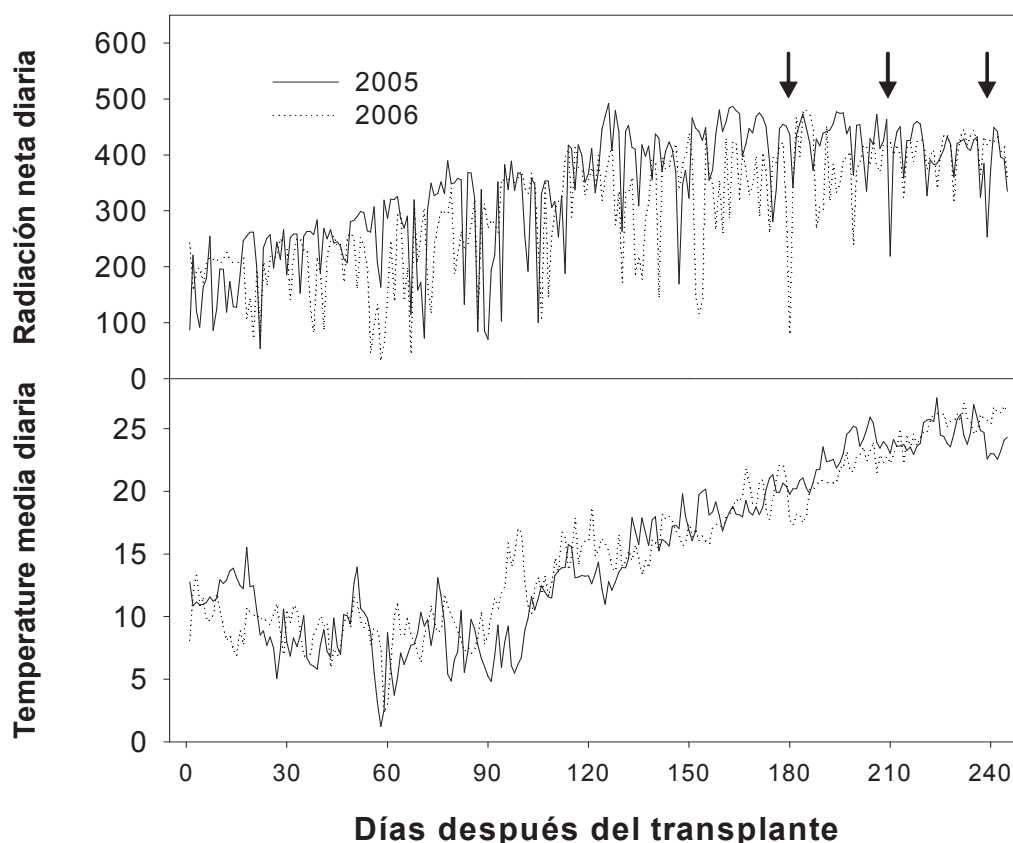


Figura 4.2. Radiación neta (%) y temperatura media (°C) diaria durante los ciclos de cultivo correspondientes a los años 2005 (líneas continuas) y 2006 (líneas punteadas).

4.1.1.2. Manejo del cultivo

Las parcelas elegidas para este estudio estaban inscritas, en el caso de la producción ecológica, dentro del Consejo de Agricultura Ecológica de la Región de Murcia, que controla y certifica este tipo de producción. Las parcelas seleccionadas bajo producción convencional, estaban inscritas en el Registro de Producción Integrada y/o sometidas a normas o protocolos privados (EUREP-GAP, UNE 155.000). En el caso de cultivo sin suelo, las parcelas elegidas cumplieron las normas de Control Integrado, referentes al control de plagas, incluidas en las Normas Técnicas de Producción Integrada para pimiento bajo invernadero.

Para el manejo de la nutrición mineral en invernaderos bajo cultivo convencional o sin suelo, se emplearon los fertilizantes sintéticos KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y microelementos (Fe, Zn y Mn). Además, en los cultivos convencionales se emplearon HNO_3 y H_3PO_4 y se aplicó antes de la siembra enmienda orgánica (estiércol de oveja). En ambos sistemas de cultivo, las plagas fueron controladas de acuerdo con el Protocolo de Producción Integrada para cultivo de pimiento mediante la aplicación de plaguicidas sintéticos, azufre y enemigos naturales. La preparación de los suelos en invernaderos ecológicos incluyó la biofumigación y solarización (biosolarización) del mismo, durante los meses de verano antes del trasplante. Además se realizó una fertilización adicional con fertilizantes solubles de origen orgánico, incluyendo extractos de abonos orgánicos, aminoácidos procedentes de algas marinas y microelementos. El manejo de plagas incluyó el uso de trampas para insectos, azufre y enemigos naturales.

4.1.1.3. Diseño experimental

El diseño experimental incluyó un total de 24 invernaderos (ocho por tratamiento), cada uno de ellos dividido en dos subparcelas. Los frutos de pimiento fueron cosechados en dos estadios de maduración: frutos verdes totalmente desarrollados sin zonas de color marrón o partes rojas y frutos rojos, sin partes verdes o marrones. Las muestras de hoja y fruto fueron recolectadas de diez plantas por subparcela seleccionadas al azar (resultando 16 repeticiones por tratamiento, con diez frutos por repetición) en tres épocas de muestreo, marzo (M1), mayo (M2) y julio (M3). Cada uno de los pimientos de una repetición se pesó en fresco y se determinó el color, el calibre ecuatorial y longitudinal, la dureza y espesor de la pulpa. Posteriormente los pimientos se lavaron con agua desionizada, se retiraron las semillas y se trocearon. Los pimientos de una misma repetición se dividieron en dos partes. Una parte se homogeneizó con N_2 líquido y se congeló a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para la determinación de plaguicidas, compuestos fenólicos, clorofilas y carotenos, azúcares solubles, ácidos orgánicos, así como la capacidad antioxidante del fruto. La otra parte, al igual que las hojas, se secó en una estufa a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y se molió para el análisis de la composición mineral.

4.1.1.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 18.0. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para estudiar el efecto de los factores principales (sistema de cultivo y muestreo) y la interacción entre ambos. Los valores medios se compararon con el test de rango múltiple de Tukey y para detectar correlaciones bivariadas significativas se realizó la prueba de Pearson.

4.1.2. Resultados

4.1.2.1. Control de la gestión agrícola y producción

Durante el ensayo se realizaron controles para detectar la posible presencia de residuos de plaguicidas en los frutos procedentes de los diferentes sistemas de cultivo. Se recogieron muestras de forma aleatoria sin tener en cuenta el plazo de seguridad establecido para cada plaguicida, ya que el propósito de estos análisis era determinar si los protocolos específicos para cada sistema agrícola con respecto a la gestión de plagas se estaban siguiendo. Por lo tanto, los análisis fueron cualitativos y los residuos de plaguicidas no fueron cuantificados. En frutos cultivados bajo el sistema de cultivo ecológico (E), no se encontraron residuos de plaguicidas en ningún momento del ciclo de cultivo. En pimientos cultivados en sistemas convencional (C) y sin suelo (SS), se detectaron residuos de pirimicarb, piriproxifeno, buprofezin y/o ciprodinil dependiendo del muestreo. Todos estos plaguicidas estaban incluidos entre los permitidos para el control de plagas, de acuerdo con el Protocolo de Producción Integrada para los cultivos de pimiento (BORM, 2007).

Aunque aún no existe una metodología establecida para discriminar los sistemas de cultivo en función del tipo de fertilización aplicada, existen evidencias de que el valor de abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) es un indicador del origen (orgánico o de síntesis) de la fuente de nitrógeno y por tanto puede ser una herramienta para la autenticación de frutas y hortalizas ecológicas. En este estudio, el valor de $\delta^{15}\text{N}$ se utilizó como garantía del origen de los fertilizantes utilizados en los invernaderos cultivados bajo sistemas de cultivo

ecológico. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en hoja aumentaron en los diferente sistemas de cultivo según el orden $\text{SS} < \text{C} < \text{E}$ (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Rango de valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) en hoja de invernaderos comerciales seleccionados para el estudio, bajo cultivo ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS).

Sistema de cultivo		
E	C	SS
10,7-13,7	3,9-8,9	1,2-4,8

El rendimiento total de la cosecha fue determinado por los agricultores mediante maquinarias a escala comercial (Tabla 4.2). El mayor rendimiento se alcanzó en el sistema sin suelo y el más bajo en el sistema ecológico aunque, en este último, no se observaron grandes diferencias respecto a los valores alcanzados en el sistema convencional.

Tabla 4.2. Valores máximo y mínimo del rendimiento total (kg m^{-2}), de pimientos de invernaderos comerciales seleccionados para el estudio, bajo cultivo ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) durante los años 2005 y 2006.

Sistema de cultivo		
E	C	SS
6,2-9,1	7,3-10,0	9,5-17,3

4.1.2.2. Composición mineral en hoja

Las concentraciones de N, NO₃⁻, K, Ca y Mg, en hoja, se vieron afectadas significativamente por el sistema de cultivo (Tabla 4.3). El cultivo SS dio como resultado una concentración mayor de N, NO₃⁻ y K, pero menor concentración de Mg que los sistemas E y C, mientras que los valores de Ca fueron similares a los obtenidos en los sistemas C y E. Cuando se compararon los resultados obtenidos en los cultivos E y C, se observó una menor concentración de NO₃⁻, Ca y Mg y una mayor concentración de K en hojas procedentes de plantas bajo cultivo E. Sin embargo, la concentración de N fue similar en ambos sistemas. Por último, no se observaron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo en cuanto a la concentración de P. Las concentraciones de N, P y K aumentaron a lo largo del ciclo de cultivo, mientras que la concentración NO₃⁻ fue menor al final del ciclo de cultivo (M3) que al principio (M1) y a mitad (M2) (Tabla 4.3). La concentración de Ca más baja se encontró en M2, mientras que la concentración de Mg no se vio afectada por el muestreo. ANOVA detectó una interacción significativa entre el sistema de cultivo y la época de muestreo (SC x M) para N, NO₃⁻, P y K (Tabla 4.3). Mientras que en los cultivos E y C no se observaron diferencias en el contenido de N entre muestreos, en el cultivo SS se observó un aumento significativo en la concentración de este nutriente del M1 y M2 al M3. Respecto a NO₃⁻, las concentraciones en hoja fueron similares a lo largo del ciclo de cultivo para los sistemas E y C, pero disminuyó en el M3 para el sistema SS. En el cultivo E, la concentración de P aumentó del M1 al M2 y se mantuvo constante en el M3. Sin embargo, en los cultivos C y SS se observó un aumento del M2 al M3. Finalmente, en el cultivo E no se observaron diferencias significativas en la concentración de K entre los muestreos, mientras que se observó un aumento del M2 a M3 en los cultivos C y SS.

Tabla 4.3. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) en hoja.

		N	NO ₃ ⁻	P	K	Ca	Mg
SC							
	E	3006,9 ^a	73,0 ^a	86,6	1118,6 ^b	441,0 ^a	281,4 ^b
	C	2973,7 ^a	115,8 ^b	83,9	1024,1 ^a	504,7 ^b	322,1 ^c
	SS	3246,9 ^b	176,5 ^c	87,3	1266,9 ^c	474,2 ^{ab}	198,2 ^a
		***	***	n.s.	***	**	***
M							
	M1	2974,8 ^a	139,0 ^b	71,2 ^a	1018,9 ^a	520,8 ^b	275,4
	M2	3002,8 ^a	133,2 ^b	79,7 ^b	1078,3 ^a	444,9 ^a	265,0
	M3	3299,7 ^b	111,9 ^a	109,3 ^c	1338,6 ^b	471,9 ^b	257,3
		***	*	***	***	***	n.s.
SC x M							
E	M1	2784,3 ^a	70,7 ^{ab}	63,7 ^a	994,6 ^{abc}	444,5	275,1
	M2	3125,0 ^a	80,7 ^{abc}	98,5 ^{bc}	1167,3 ^c	476,7	310,3
	M3	3107,6 ^a	63,0 ^a	97,5 ^{bc}	1201,5 ^c	451,5	260,0
C	M1	2891,8 ^a	130,5 ^{cd}	65,4 ^a	930,2 ^{ab}	532,2	321,3
	M2	2904,5 ^a	89,7 ^{abc}	75,9 ^{ab}	895,3 ^a	471,1	326,9
	M3	3124,9 ^a	127,6 ^{bc}	109,9 ^c	1246,8 ^d	510,7	318,2
SS	M1	3165,0 ^{ab}	185,8 ^{de}	81,1 ^{ab}	1121,2 ^b	554,8	228,1
	M2	3017,1 ^a	212,8 ^e	70,5 ^a	1200,1 ^c	425,4	180,5
	M3	3558,5 ^b	118,0 ^{abc}	114,6 ^c	1518,6 ^e	441,7	184,3
		*	***	***	*	n.s.	n.s.

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias (n=16).

4.1.2.3. Composición mineral en fruto

En pimiento verde, el sistema de cultivo tuvo un efecto significativo sobre la concentración de Ca y Mg del fruto (Tabla 4.4). La concentración de Ca fue mayor en E y C que en SS, mientras que la concentración de Mg fue mayor en C que en E y SS. El muestreo afectó significativamente a las concentraciones de NO₃⁻, P, K y Mg. La concentración NO₃⁻ disminuyó al final del ciclo de cultivo, mientras que la concentración de K aumentó. Las concentraciones de P y Mg mostraron sus niveles más bajos a mitad del ciclo (M2). El efecto del sistema de cultivo dependió del muestreo (interacción SC x M) para todos los minerales analizados, excepto para Ca (Tabla 4.4). En el cultivo E, la mayor

concentración de N se observó en el M2, momento en el cual los frutos cultivados bajo sistemas C y SS mostraron la concentración más baja. La concentración NO_3^- disminuyó drásticamente del M1 al M2 en el cultivo E, pero no en los otros dos sistemas de cultivo. A diferencia de los cultivos E y C, donde no se observaron diferencias en la concentración de P entre muestreos, en el cultivo SS la concentración aumentó del M2 al M3. En cuanto a la concentración de K, en los sistemas C y SS no se observaron diferencias entre muestreos, mientras que en frutos ecológicos se observó un aumento del M1 al M2. La concentración de Mg aumentó significativamente del M1 al M2 en frutos ecológicos, mientras que no se observaron diferencias en los cultivados en C y SS.

Tabla 4.4. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($\text{mmol kg}^{-1}\text{PS}$) de pimiento verde.

		N	NO_3^-	P	K	Ca	Mg
SC							
	E	1453,4	6,4	107,6	833,1	46,7 ^b	81,6 ^a
	C	1477,9	5,9	111,5	884,7	50,0 ^b	93,0 ^b
	SS	1468,6	4,9	109,9	815,6	37,1 ^a	76,4 ^a
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	***
M							
	M1	1480,7	7,6 ^b	111,8 ^a	822,6 ^a	48,6	84,3 ^{ab}
	M2	1457,7	6,2 ^b	101,3 ^a	825,8 ^a	40,9	79,9 ^a
	M3	1469,0	3,0 ^a	117,8 ^b	894,1 ^b	43,4	88,4 ^b
		n.s.	***	**	**	n.s.	***
SC x M							
E	M1	1352,1 ^a	11,8 ^b	101,2 ^a	639,9 ^a	53,9	71,4 ^{ab}
	M2	1579,6 ^c	4,4 ^a	115,0 ^a	987,5 ^c	45,5	91,4 ^{cd}
	M3	1385,4 ^a	2,8 ^a	103,2 ^a	811,2 ^{abc}	49,6	78,0 ^{a^{bc}}
C	M1	1490,3 ^b	6,9 ^{ab}	113,3 ^a	885,4 ^{bc}	55,9	96,9 ^d
	M2	1439,0 ^a	6,7 ^{ab}	104,2 ^a	849,1 ^{a^{bc}}	43,6	85,7 ^{bcd}
	M3	1504,6 ^b	4,2 ^a	117,1 ^b	920,9 ^{bc}	49,9	96,6 ^d
SS	M1	1543,4 ^b	5,9 ^a	115,7 ^a	851,3 ^{abc}	39,7	78,1 ^{abc}
	M2	1392,6 ^a	7,1 ^{ab}	88,5 ^a	687,1 ^{ab}	37,7	65,7 ^a
	M3	1470,0 ^a	1,8 ^a	124,8 ^b	904,4 ^{bc}	33,7	85,1 ^{bcd}
		**	*	*	***	n.s.	***

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias (n=16).

En pimiento rojo, las concentraciones de Ca y Mg de frutos E y C fueron más altas que las observadas en frutos SS (Tabla 4.5). La época de muestreo y su interacción con el sistema de cultivo afectó significativamente a la concentración de todos los elementos minerales, excepto a la concentración de Ca (Tabla 4.5). La concentración N en frutos C se redujo del M1 al M2, mientras que no se detectaron diferencias significativas en frutos E y SS durante el ciclo de cultivo. En los sistemas C y SS se observó un aumento de la concentración de NO_3^- en el M2, no observada en el sistema C. Además, el cultivo SS dio lugar a un aumento de la concentración de P del M2 al M3. Las concentraciones de K y Mg de los frutos E aumentaron del M1 al M2, mientras que en los sistemas C y SS el aumento se observó del M2 al M3 (significativo sólo en el caso de K en frutos SS).

Tabla 4.5. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($\text{mmol kg}^{-1}\text{PS}$) de pimiento rojo.

		N	NO_3^-	P	K	Ca	Mg
SC							
	E	1283,8	1,9	87,7	733,6	27,6 ^b	65,2 ^{ab}
	C	1273,1	1,8	89,4	703,9	26,1 ^b	67,2 ^b
	SS	1232,9	1,7	83,4	669,2	19,5 ^a	57,6 ^a
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	**
M							
	M1	1313,7 ^b	0,9 ^a	79,4 ^a	613,1 ^a	22,2 ^{ab}	58,2 ^a
	M2	1192,3 ^a	3,6 ^b	79,4 ^a	687,9 ^b	27,6 ^b	62,5 ^a
	M3	1278,2 ^a	0,8 ^a	102,9 ^b	797,3 ^c	21,6 ^a	69,0 ^b
		*	***	***	***	*	**
SC x M							
E	M1	1202,6 ^a	1,6 ^{ab}	77,8 ^{abc}	570,9 ^a	18,0	49,1 ^a
	M2	1473,5 ^b	2,3 ^b	103,9 ^{abc}	867,7 ^c	37,9	78,9 ^b
	M3	1090,2 ^a	1,7 ^{ab}	74,3 ^{ab}	720,5 ^{abc}	25,9	63,1 ^{ab}
C	M1	1425,9 ^b	0,7 ^a	89,4 ^{abc}	646,7 ^{ab}	28,1	68,0 ^{ab}
	M2	1100,7 ^a	4,2 ^c	72,1 ^{ab}	646,1 ^{ab}	27,5	61,1 ^{ab}
	M3	1293,2 ^a	0,5 ^a	107,3 ^{bc}	822,7 ^{bc}	23,2	72,8 ^b
SS	M1	1264,0 ^a	0,6 ^a	70,0 ^a	601,7 ^a	18,2	53,0 ^a
	M2	1087,3 ^a	3,9 ^c	69,4 ^a	603,4 ^a	21,7	52,3 ^a
	M3	1350,4 ^a	0,7 ^a	111,7 ^c	807,0 ^c	18,8	67,8 ^{ab}
		***	***	***	***	n.s.	***

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias ($n=16$).

4.1.2.4. Propiedades físicas del fruto

El efecto del sistema de cultivo en las propiedades físicas de los frutos de pimiento dependió del estado de maduración estudiado. En pimiento verde, el sistema de cultivo tuvo un efecto significativo sobre los parámetros de color (L^* , a^* y b^*), la firmeza y el espesor de la carne (Tabla 4.6). El cultivo SS presentó menor valor de L^* (luminosidad) y b^* (amarillo frente azul) y mayor de a^* (rojo frente a verde) que los cultivos E y C. Los frutos cultivados bajo sistema SS presentaron los valores más altos de firmeza y espesor. La época de muestreo tuvo un efecto significativo sobre todas las propiedades físicas del fruto (Tabla 4.6). En general, los frutos del M1 mostraron mayor peso medio, firmeza y espesor. Por otro lado, los frutos del M3 presentaron los mayores valores de L^* , b^* , índice de forma y contenido en agua. Se observó una interacción significativa SC x M para todos los parámetros analizados, excepto para el índice de forma (Tabla 4.6) ya que la evolución de las propiedades físicas de los frutos a lo largo del ciclo dependió del sistema de cultivo estudiado. En general, el cultivo C mostró las menores diferencias en peso, firmeza, L^* y a^* entre los muestreos M1 y M2, pero presentó las mayores diferencias al comparar el M2 con el M3.

En pimiento rojo, a diferencia de los resultados encontrados en pimiento verde, el peso del fruto y el índice de forma se vieron influenciados significativamente por el sistema de cultivo (Tabla 4.7). Los frutos cultivados bajo el sistema SS presentaron los valores de peso y firmeza más bajos, pero mayor espesor. Además, estos frutos presentaron los menores valores de a^* y b^* . ANOVA detectó un efecto significativo del muestreo (Tabla 4.7) y una interacción SC x M sobre todos los parámetros analizados, a excepción de la interacción SC x M para a^* (Tabla 4.7). Mientras que en los sistemas E y SS no se observaron diferencias en el peso del fruto entre los diferentes muestreos, en el M2 del sistema C se alcanzaron valores significativamente mayores respecto al M1 y M3. Respecto al índice de forma, en los sistemas E y C existió una tendencia a aumentar a lo largo del ciclo de cultivo mientras que en el SS se observó una disminución en el M2. La tendencia del valor de firmeza a lo largo del ciclo también dependió del sistema estudiado; mientras que en E y C el valor de firmeza disminuyó, en SS no se observaron diferencias entre muestreos. Por último, la disminución del espesor con el tiempo fue más acusada en SS que en E o C.

Tabla 4.6. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm), parámetros de color (L^* a^* b^*) y contenido en agua (%) en pimiento verde.

		Peso	IF	Firm	Esp	L^*	a^*	b^*	Agua
SC									
	E	186,9	0,99	5,1 ^a	6,3 ^a	37,3 ^b	-12,4 ^a	15,3 ^b	94,4
	C	193,7	0,98	5,1 ^a	6,7 ^b	37,5 ^b	-12,3 ^a	15,3 ^b	94,7
	SS	191,4	1,00	5,6 ^b	7,0 ^c	36,9 ^a	-11,7 ^b	14,1 ^a	95,0
		n.s.	n.s.	***	***	***	***	***	n.s.
M									
	M1	197,7 ^b	0,95 ^a	6,1 ^c	7,2 ^b	36,8 ^a	-11,7 ^c	13,9 ^a	94,4 ^a
	M2	187,4 ^a	1,00 ^a	5,3 ^b	6,4 ^a	37,0 ^a	-12,0 ^b	14,8 ^b	94,6 ^a
	M3	187,1 ^a	1,01 ^b	4,3 ^a	6,4 ^a	37,9 ^b	-12,7 ^a	16,1 ^c	95,1 ^b
		***	**	***	***	***	***	***	**
SC x M									
E	M1	194,1 ^{cd}	1,01	5,8 ^c	6,6 ^{bc}	37,2 ^{bc}	-12,6 ^b	15,2 ^c	93,9 ^a
	M2	178,8 ^a	1,03	4,8 ^b	6,0 ^a	37,0 ^{ab}	-12,2 ^{bc}	15,1 ^{bc}	95,2 ^{ab}
	M3	188,2 ^{abcd}	0,98	4,3 ^{ab}	6,3 ^{ab}	37,9 ^{cd}	-12,4 ^{bc}	15,6 ^c	94,2 ^a
C	M1	200,9 ^d	0,95	5,7 ^c	7,5 ^d	37,0 ^{ab}	-11,9 ^{bc}	14,1 ^b	94,5 ^{ab}
	M2	200,8 ^d	1,00	5,5 ^c	6,3 ^{ab}	37,1 ^b	-11,8 ^c	14,7 ^{bc}	94,4 ^{ab}
	M3	179,6 ^{ab}	0,99	4,1 ^a	6,3 ^{ab}	38,4 ^d	-13,3 ^a	17,1 ^d	95,2 ^{ab}
SS	M1	198,2 ^d	0,95	6,6 ^d	7,5 ^d	36,3 ^a	-10,7 ^d	12,4 ^a	94,9 ^{ab}
	M2	182,3 ^{abc}	1,00	5,6 ^c	6,8 ^c	36,9 ^{ab}	-11,9 ^{bc}	14,6 ^{bc}	94,4 ^a
	M3	193,7 ^{bcd}	1,03	4,5 ^{ab}	6,6 ^{bc}	37,5 ^{bc}	-12,3 ^{bc}	15,4 ^c	95,7 ^b
		***	n.s.	***	***	*	***	***	**

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias ($n=16$).

Tabla 4.7. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm), parámetros de color (L^* a^* b^*) y contenido en agua (%) en pimiento rojo.

		Peso	IF	Firm	Esp	L^*	a^*	b^*	Agua
SC									
	E	201,0 ^b	1,00 ^{ab}	4,5 ^b	6,5 ^a	35,8 ^b	25,3 ^b	15,7 ^b	92,7
	C	195,5 ^b	0,99 ^a	4,4 ^b	6,4 ^a	35,3 ^a	26,6 ^c	16,1 ^b	92,2
	SS	187,7 ^a	1,03 ^b	4,2 ^a	7,2 ^b	35,0 ^a	24,0 ^a	15,1 ^a	92,4
		***	**	***	***	***	***	***	n.s.
M									
	M1	189,3 ^a	0,98 ^a	4,6 ^c	7,3 ^b	35,9 ^b	26,6 ^c	15,9 ^b	91,8 ^a
	M2	202,7 ^b	0,99 ^a	4,4 ^b	6,5 ^a	35,0 ^a	25,6 ^b	15,6 ^a	92,1 ^a
	M3	191,6 ^a	1,05 ^b	4,0 ^a	6,4 ^a	35,1 ^a	23,6 ^a	15,4 ^a	93,1 ^b
		***	***	***	***	***	***	**	***
SC x M									
E	M1	202,2 ^{cd}	4,9 ^e	7,1 ^c	0,96 ^{ab}	36,7 ^d	29,4	15,8 ^{ab}	92,3 ^{abc}
	M2	201,2 ^{cd}	4,3 ^{bcd}	6,1 ^a	1,01 ^{bc}	34,8 ^{ab}	25,8	15,3 ^a	92,6 ^{ab}
	M3	199,0 ^{bcd}	4,1 ^{ab}	6,4 ^{ab}	1,04 ^c	36,0 ^{cd}	23,3	16,0 ^{ab}	93,0 ^{ab}
C	M1	183,0 ^{ab}	4,6 ^{cde}	6,7 ^{bc}	0,92 ^a	35,4 ^{bc}	28,5	16,6 ^b	92,6 ^{ab}
	M2	215,5 ^d	4,7 ^{de}	6,3 ^{ab}	0,99 ^{bc}	35,8 ^c	26,5	16,5 ^b	91,5 ^{ab}
	M3	187,7 ^{abc}	3,8 ^a	6,2 ^a	1,04 ^c	34,6 ^{ab}	24,7	15,3 ^a	92,4 ^{abc}
SS	M1	181,9 ^a	4,2 ^{abc}	8,1 ^d	1,05 ^c	35,8 ^c	25,1	15,2 ^a	90,7 ^a
	M2	191,3 ^{abc}	4,2 ^{ab}	7,1 ^c	0,98 ^{ab}	34,3 ^a	24,7	14,9 ^a	92,2 ^{abc}
	M3	189,8 ^{abc}	4,1 ^{ab}	6,5 ^{ab}	1,05 ^c	34,8 ^{ab}	23,6	15,0 ^a	94,1 ^b
		***	***	***	***	***	n.s.	*	***

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias ($n=16$).

4.1.2.5. Azúcares solubles

En pimiento verde, la concentración de azúcares solubles no se vio afectada por el sistema de cultivo pero si por la época de muestreo (Tabla 4.8). La concentración de glucosa y fructosa disminuyó al final de la cosecha, mientras que la concentración de sacarosa aumentó conforme avanzaba la temporada. Finalmente, ANOVA detectó una interacción significativa entre el sistema de cultivo y el muestreo (SC x M) para la concentración de sacarosa. Mientras que en el cultivo C no se observaron diferencias en el

contenido de sacarosa entre los muestreos, en los cultivos E y SS se observó un aumento significativo en la concentración de este metabolito a lo largo de la temporada de cultivo.

Tabla 4.8. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa ($mg\ g^{-1}$) en pimiento verde.

		Glucosa	Fructosa	Sacarosa
SC				
	E	15,0	16,2	5,0
	C	13,6	14,2	4,8
	SS	14,8	15,6	4,7
		n.s.	n.s.	n.s.
M				
	M1	15,2 ^b	16,5 ^b	3,7 ^a
	M2	16,1 ^b	17,0 ^b	5,1 ^{ab}
	M3	12,0 ^a	12,5 ^a	5,8 ^b
		***	***	***
SC x M				
E	M1	15,4	16,6	2,7 ^a
	M2	17,6	19,2	6,1 ^{ab}
	M3	11,9	12,7	6,3 ^b
C	M1	13,7	15,0	4,3 ^{ab}
	M2	15,4	16,0	5,3 ^{ab}
	M3	11,6	11,7	4,8 ^{ab}
SS	M1	16,6	17,8	4,0 ^{ab}
	M2	15,3	15,9	3,8 ^{ab}
	M3	12,4	13,0	6,3 ^b
		n.s.	n.s.	*

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias ($n=16$).

En pimiento rojo, las concentraciones de glucosa y fructosa fueron aproximadamente 1,8 veces mayores que en los pimientos verdes, mientras que la concentración de sacarosa

fue menor (Tabla 4.9). El sistema de cultivo C mostró concentraciones significativamente más bajas de sacarosa en comparación con el cultivo E y el SS. A diferencia de los resultados encontrados en pimiento verde, la concentración de azúcares solubles no se vio afectada por la época de muestreo.

Tabla 4.9. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa ($mg\ g^{-1}$) en pimiento rojo.

		Glucosa	Fructosa	Sacarosa
SC				
	E	24,2	26,6	2,0 ^{ab}
	C	27,5	31,6	1,7 ^a
	SS	28,7	32,7	2,4 ^b
		n.s.	n.s.	**
M				
	M1	27,2	31,2	2,2
	M2	27,5	31,1	2,1
	M3	25,6	28,6	1,9
		n.s.	n.s.	n.s.
SC x M				
E	M1	24,9	28,2	2,3
	M2	23,9	26,1	1,7
	M3	23,9	25,4	2,0
C	M1	29,5	34,2	1,7
	M2	26,8	30,8	1,7
	M3	26,0	30,0	1,6
SS	M1	27,1	31,3	2,5
	M2	31,9	36,5	2,7
	M3	27,0	30,5	2,1
		n.s.	n.s.	n.s.

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias (n=16).

4.1.2.6. Ácidos orgánicos

En pimiento verde, el sistema de cultivo tuvo un efecto significativo en la concentración de ácidos málico y cítrico en fruto, pero no se observaron diferencias en la concentración de ácido ascórbico (Tabla 4.10). En general, la concentración de ácidos orgánicos disminuyó significativamente a lo largo del ciclo de cultivo. El efecto del sistema de cultivo sobre la concentración de ácido málico dependió de la época de muestreo (interacción SC x M); mientras que en el cultivo ecológico la concentración de ácido málico disminuyó del M1 al M2, en los cultivos convencionales y sin suelo no se observaron diferencias significativas entre muestreos.

En pimiento rojo no se detectó ácido málico, mientras que la concentración de ácido cítrico fue aproximadamente 4 veces superior a la encontrada en frutos verdes. El sistema de cultivo tuvo un efecto significativo sobre las concentraciones de ácido ascórbico y ácido cítrico (Tabla 4.11). Los pimientos cultivados bajo sistema de cultivo SS mostraron la mayor concentración de ácido ascórbico y, de forma similar a los resultados observados en pimiento verde, los pimientos convencionales mostraron el valor más alto de ácido cítrico. Al igual que los pimientos verdes, los frutos rojos mostraron una disminución de las concentraciones de ácido ascórbico y ácido cítrico a medida que avanzaba el ciclo de cultivo (Tabla 4.11). El efecto del sistema de cultivo sobre la concentración de dichos compuestos dependió de la época de muestreo (Tabla 4.11). A diferencia del cultivo ecológico, donde no se observaron diferencias significativas en la concentración de ácido ascórbico entre muestreos, en los sistemas de cultivo C y SS la concentración disminuyó con el avance de la temporada. La concentración de ácido cítrico disminuyó del M1 al M2 en el cultivo C, mientras que permaneció constante en los otros dos sistemas de cultivo.

Tabla 4.10. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la concentración de ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico y compuestos fenólicos totales, expresado como $mg\ g^{-1}PF$, clorofilas y carotenoides totales (β -caroteno), expresado como $\mu g\ g^{-1}PF$, en pimiento verde.

		Málico	Ascórbico	Cítrico	Fenólicos	Clorofilas	β -caroteno
SC							
	E	1,38 ^b	1,48	0,83 ^a	0,45	64,5	28,6
	C	1,27 ^{ab}	1,58	1,14 ^b	0,46	67,2	28,0
	SS	1,13 ^a	1,60	0,96 ^a	0,47	67,2	27,8
		**	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
M							
	M1	1,42 ^b	1,75 ^b	1,08 ^b	0,46 ^b	80,1 ^b	31,7 ^b
	M2	1,13 ^a	1,47 ^a	0,97 ^a	0,52 ^b	56,7 ^a	26,4 ^a
	M3	1,22 ^{ab}	1,43 ^a	0,89 ^a	0,40 ^a	62,2 ^a	26,3 ^a
		***	***	**	***	***	***
SC x M							
E	M1	1,90 ^c	1,55	0,80	0,40 ^{ab}	78,2	31,4 ^{bcd}
	M2	1,02 ^a	1,52	0,91	0,59 ^c	54,3	29,1 ^{bcd}
	M3	1,22 ^{ab}	1,39	0,79	0,37 ^a	60,9	25,2 ^{ab}
C	M1	1,48 ^{bc}	1,88	1,33	0,50 ^{bc}	78,6	31,2 ^{cd}
	M2	1,11 ^{ab}	1,49	1,16	0,50 ^{bc}	58,8	26,1 ^{abc}
	M3	1,21 ^{ab}	1,37	0,94	0,38 ^a	64,4	26,8 ^{abcd}
SS	M1	0,89 ^a	1,83	1,10	0,49 ^{bc}	83,4	32,5 ^b
	M2	1,27 ^{ab}	1,41	0,85	0,48 ^{abc}	57,0	24,1 ^a
	M3	1,23 ^{ab}	1,55	0,94	0,44 ^{ab}	61,3	26,8 ^{abc}
		***	n.s.	n.s.	**	n.s.	*

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias ($n=16$).

Tabla 4.11. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la concentración de ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico y compuestos fenólicos totales, expresado como $mg\ g^{-1}PF$, clorofilas y carotenoides totales (β -caroteno), expresado como $\mu g\ g^{-1}PF$, en pimiento rojo.

		Málico	Ascórbico	Cítrico	Fenólicos	Clorofilas	β -caroteno
SC							
	E	n.d.	1,93 ^a	4,31 ^a	0,60 ^a	4,2	102,4
	C	n.d.	1,95 ^a	4,57 ^b	0,64 ^a	4,4	113,5
	SS	n.d.	2,13 ^b	4,16 ^a	0,71 ^b	4,7	112,4
			***	***	***	n.s.	n.s.
M							
	M1	n.d.	2,15 ^c	4,61 ^b	0,78 ^c	1,2 ^a	124,1 ^c
	M2	n.d.	1,99 ^b	4,09 ^a	0,67 ^b	4,1 ^a	112,0 ^b
	M3	n.d.	1,87 ^a	4,33 ^a	0,50 ^a	8,0 ^b	92,2 ^a
			***	***	***	***	***
SC x M							
E	M1	n.d.	2,00 ^{abcd}	4,50 ^a	0,73	1,2 ^a	114,4 ^{bc}
	M2	n.d.	1,89 ^{ab}	4,10 ^a	0,60	7,8 ^{abc}	116,3 ^{bc}
	M3	n.d.	1,91 ^{abc}	4,32 ^a	0,47	3,7 ^{abc}	76,6 ^a
C	M1	n.d.	2,16 ^{de}	5,19 ^b	0,80	1,2 ^a	141,6 ^c
	M2	n.d.	1,96 ^{abc}	4,11 ^a	0,66	1,9 ^a	101,1 ^{ab}
	M3	n.d.	1,74 ^a	4,41 ^a	0,46	9,9 ^{bc}	97,7 ^{ab}
SS	M1	n.d.	2,30 ^c	4,12 ^a	0,82	1,3 ^a	116,3 ^{bc}
	M2	n.d.	2,11 ^{cde}	4,07 ^a	0,73	2,4 ^{ab}	118,6 ^{bc}
	M3	n.d.	1,98 ^{bcd}	4,28 ^a	0,58	10,3 ^c	102,4 ^{ab}
			**	***	n.s.	*	***

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. n.d. no detectado. Los valores son medias ($n=16$).

4.1.2.7. Compuestos fenólicos totales

El efecto del sistema de cultivo sobre el contenido de compuestos fenólicos totales sólo fue significativo en pimiento rojo (Tablas 4.10 y 4.11), observándose una mayor concentración en frutos cultivados bajo sistema de cultivo SS. En ambos estados de maduración, verde y rojo, la concentración de compuestos fenólicos disminuyó al final del ciclo de cultivo (Tablas 4.10 y 4.11). En pimiento verde, ANOVA detectó una interacción

significativa SC x M (Tabla 4.10); en pimientos ecológicos se observó un ligero aumento en el contenido compuestos fenólicos totales del M1 al M2, seguido de una disminución en el M3, mientras que, en pimientos convencionales, el contenido disminuyó del M1 y M2 al M3, y en pimientos cultivados en el sistema SS no se detectaron diferencias significativas durante el ciclo de cultivo.

4.1.2.8. Clorofilas y carotenoides totales

El sistema de cultivo adoptado no afectó al contenido de clorofilas y carotenoides totales en pimiento verde y rojo. Sin embargo, la concentración total de estos compuestos se vio significativamente afectada por la época de muestreo (Tablas 4.10 y 4.11). En general, las concentraciones de clorofila y β -caroteno disminuyeron a medida que avanzaba el ciclo de cultivo, excepto en pimiento rojo, donde la concentración de clorofila aumentó de M1 a M3 (Tabla 4.11). En pimiento rojo, ANOVA detectó una interacción significativa entre el sistema de cultivo y el muestreo (SC x M), para ambos compuestos, mientras que en pimiento verde esta interacción sólo fue significativa para la concentración de β -caroteno. Respecto a pimiento rojo, mientras que en cultivo ecológico no se observaron diferencias en el contenido de clorofilas entre muestreos, en convencional y sin suelo se observó un aumento significativo en la concentración de este compuesto de M2 a M3. En pimiento verde cultivado en sistema sin suelo se observó una disminución de la concentración de β -caroteno de M1 a M2, no observada en los otros dos sistemas de cultivo.

4.1.2.9. Actividad antioxidante

Tanto en pimiento rojo como en verde, la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) fue entre 100 y 250 veces mayor que la actividad antioxidante de la fracción lipofílica (AAL) (Tabla 4.12). La mayor AAH de pimiento se obtuvo en el cultivo SS en estado de maduración rojo. La AAH, en general, aumentó según el orden E < C < SS, tanto en fruto verde como en rojo, aunque en verde se observaron algunas excepciones debido a una interacción con el muestreo. Respecto a la AAL, en pimiento verde no se observaron diferencias entre sistemas de cultivo o muestreos. Sin embargo, en pimiento

rojo se observó una tendencia a aumentar durante el ciclo de cultivo, dependiente del sistema de cultivo (interacción SC x M).

Tabla 4.12. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E), convencional (C) y sin suelo (SS) y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante hidrofílica (AAH), expresada como equivalentes de ascórbico (AEAC), y la actividad antioxidante lipofílica (AAL), expresada como equivalentes de trolox (TEAC), en pimiento verde y rojo.

		Pimiento verde		Pimiento rojo	
		AAH	AAL	AAH	AAL
SC					
	E	2,21 ^a	0,009	4,68 ^a	0,059
	C	2,55 ^{ab}	0,009	5,25 ^a	0,061
	SS	2,62 ^b	0,008	6,17 ^b	0,061
		*	n.s.	***	n.s.
M					
	M1	2,86 ^b	0,009	5,27	0,055 ^a
	M2	2,24 ^a	0,008	5,43	0,058 ^a
	M3	2,28 ^a	0,009	5,40	0,068 ^b
		***	n.s.	n.s.	***
SC x M					
E	M1	2,40 ^{abc}	0,009	4,17	0,049 ^a
	M2	2,27 ^{ab}	0,007	4,43	0,057 ^{abc}
	M3	1,96 ^a	0,010	5,43	0,070 ^c
C	M1	3,09 ^c	0,009	5,54	0,064 ^{abc}
	M2	2,42 ^{abc}	0,009	5,36	0,051 ^a
	M3	2,15 ^{ab}	0,010	4,84	0,068 ^c
SS	M1	3,09 ^c	0,010	6,10	0,053 ^{ab}
	M2	2,03 ^{ab}	0,007	6,49	0,066 ^{bc}
	M3	2,74 ^{bc}	0,008	5,94	0,064 ^{abc}
		*	n.s.	n.s.	***

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son medias (n=16).

4.1.2.10. Correlaciones

El valor de actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) se correlacionó significativamente (Pearson, $P < 0,01$) con el contenido de ácidos orgánicos y compuestos fenólicos del fruto (Tabla 4.13). En pimiento verde, el mayor valor de coeficiente de correlación con la AAH fue el obtenido con ácido ascórbico, seguido de los compuestos fenólicos. Sin embargo, la correlación entre AAH y los compuestos fenólicos en frutos rojos fue mayor que la observada para el ácido ascórbico. A pesar de que la concentración de ácido cítrico fue menor en pimiento verde que en rojo (Tablas 4.10 y 4.11), la única correlación entre el ácido cítrico y la AAH se observó en el primer estado de maduración. Los valores de AAL se correlacionaron significativamente con la concentración de clorofilas (en pimiento verde y rojo) y carotenoides totales (en pimiento rojo).

Tabla 4.13. Valores de significancia (P) según el test de Pearson para las correlaciones entre la actividad antioxidante (AAH y AAL) y la concentración de compuestos antioxidantes, como compuestos fenólicos totales, ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico, clorofilas y β -caroteno.

Correlación	Pimiento verde	Pimiento rojo
AAH – Fenólicos totales	0,467++	0,571++
AAH – Málico	-0,322++	-
AAH – Ascórbico	0,660++	0,367++
AAH – Cítrico	0,436++	-0,148
AAL – Clorofilas	0,480++	0,235++
AAL – β -caroteno	0,036	0,500++
Clorofilas – β -caroteno	0,414++	0,044

+,++ correlaciones significativas a 0,05 y 0,01 respectivamente.

4.1.3. Discusión

Los análisis de plaguicidas en pimientos cultivados bajo sistemas C y SS mostraron residuos de compuestos permitidos para el control de plagas de acuerdo con el Protocolo de Producción Integrada de pimiento. Por el contrario, no se observaron residuos de plaguicidas en los pimientos bajo cultivo E. En cuanto a la fertilización con N, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en hoja fueron significativamente diferentes entre sistemas de cultivo. Aunque estos resultados no son concluyentes, reflejan las diferentes prácticas de fertilización realizadas en cada sistema de cultivo. Los valores más altos de $\delta^{15}\text{N}$ de los fertilizantes orgánicos comparados con los de los fertilizantes de síntesis es debido a que la volatilización del amoníaco, durante el proceso de descomposición de la materia orgánica, se produce preferentemente sobre el isótopo más ligero (^{14}N), enriqueciéndose el abono en el más pesado (^{15}N) (Flores *et al.*, 2007). Los resultados encontrados en nuestro estudio, son indicativos de que la fertilización nitrogenada en el cultivo E se basó exclusivamente en productos de origen orgánico (mayores valores de $\delta^{15}\text{N}$), mientras que en el cultivo SS el N provenía de fertilizantes sintéticos (menores valores de $\delta^{15}\text{N}$). Los valores registrados para el cultivo C estuvieron entre los valores del cultivo E y el SS, ya que en este caso el N provenía tanto de los fertilizantes sintéticos como de la materia orgánica del suelo.

La limitación del aporte de N en agricultura ecológica es, según diversos autores, uno de los principales problemas de este sistema de cultivo ya que, aunque los abonos orgánicos por lo general contienen la cantidad necesaria de N para el crecimiento de la planta, sólo una parte de este nutriente está en formas inmediatamente disponibles (Haraldsen *et al.*, 2000; Bañuelos y Pasakdee, 2002; Haneklaus *et al.*, 2002). Sin embargo, en el presente estudio, no se observaron diferencias en la concentración de N en hoja entre los cultivos E y C. Por el contrario, la concentración de NO_3^- fue mayor en el sistema de cultivo C que en el E. El NO_3^- se acumula en el tejido de la planta a través de un “consumo de lujo” (Grindlay, 1997) y por lo tanto, en condiciones no limitantes de N, las diferencias en la concentración de N en la planta son más evidentes en la fracción nítrica (Flores *et al.*, 2007). Debido a la menor disponibilidad de N en el cultivo ecológico, las frutas y verduras cultivadas bajo este sistema contienen, por lo general, menores concentraciones de NO_3^- que las cultivadas en sistema convencional (Worthington, 2001; Rembialkowska, 2003). Esto contribuye a la percepción de que los productos cultivados bajo producción ecológica

son más saludables, ya que el nitrato presente en los alimentos puede ser metabolizado a compuestos potencialmente cancerígenos (Santamaria, 2006). Sin embargo, a pesar de las diferencias observadas en la concentración de NO_3^- en hoja, en general, no se detectaron diferencias significativas entre sistemas de cultivo en los frutos de pimiento. Además, al comienzo de la cosecha (M1), el cultivo E mostró los valores de concentración de NO_3^- más altos, probablemente por la mayor disponibilidad de N procedente del suelo debido a la descomposición de la materia orgánica durante la biosolarización.

El sistema de cultivo SS presentó los valores más altos de concentración de K en hoja. Sin embargo, en el fruto, no se observaron diferencias entre los sistemas de cultivo, probablemente debido a que, bajo condiciones no limitantes de K, y debido a la alta movilidad de este elemento en la planta, los órganos preferentemente suministrados vía floema (frutos) están repletos en este nutriente independientemente del K suministrado y por lo tanto, el aumento de la dosis de K no conduce a aumentar el contenido de K en los frutos (Flores *et al.*, 2004). Los valores de concentración de Ca en el fruto fueron mayores en los sistemas de cultivo en suelo (E y C) que en el cultivo sin suelo (SS), tanto en pimiento verde como en rojo. El transporte de Ca en el xilema se produce principalmente por flujo de masa, y la competencia entre la transpiración de las hojas y la débil transpiración de las zonas meristemáticas es altamente dependiente de las relaciones hídricas en la planta (Clarkson, 1984). Por lo tanto, las diferencias observadas en la concentración de Ca de los frutos entre los sistemas de cultivo se pueden atribuir a diferencias en la disponibilidad de agua para la planta en cultivos de suelo y sin suelo; y por consiguiente a diferencias en el transporte de Ca al fruto. En frutos, la concentración de Mg aumentó según el orden $\text{SS} \leq \text{E} < \text{C}$. En los cultivos SS, el Mg se aplica generalmente en forma de sales inorgánicas, mientras que en los cultivos E proviene del suelo y de compuestos orgánicos. Sin embargo, en los cultivos C, el Mg proviene del suelo y de sales inorgánicas, altamente disponibles para la planta. Esto podría explicar los valores más altos de Mg en pimientos C en comparación con pimientos E y SS.

El sistema de producción utilizado afectó al color, firmeza y espesor de la carne de los frutos. Los pimientos bajo cultivo SS presentaron los valores más bajos de L^* , lo que significa una disminución de la luminosidad con respecto a los pimientos E y C. Además, los pimientos SS presentaron los mayores valores de a^* (menos verde) en pimiento verde y los menores valores de a^* (menos rojo) en pimiento rojo, aunque estas diferencias no

fueron significativas en todas las etapas de maduración. Estos resultados reflejan una menor calidad respecto al color de los frutos de los pimientos SS con respecto a pimientos E y C. Por otro lado, los frutos en estado de maduración verde cultivados bajo sistema SS presentaron los valores más altos de firmeza y espesor. Sin embargo, en el mismo sistema de cultivo, los frutos rojos presentaron los valores más bajos de firmeza (excepto en M3), a pesar de tener el mayor espesor. En un estudio previo realizado con frutos de tomate cherry, se encontraron diferencias en la morfología de las células del pericarpio entre frutos cultivados bajo sistemas ecológico, convencional e hidropónico, que podrían explicar las diferencias en el espesor y la firmeza encontradas (Stertz, 2005). Por último, las diferencias encontradas en el tamaño de frutos rojos entre sistemas de cultivo pudieron deberse a los criterios seguidos por los agricultores durante la recolección; los pimientos verdes se recogieron cuando aproximadamente el 90% de los frutos estaban desarrollados completamente, mientras que, siguiendo criterios económicos, un número variable de frutos se mantuvieron en la planta hasta el estado de maduración rojo. Por lo tanto en pimientos rojos los parámetros del fruto relacionados con el tamaño podrían verse afectados por esta práctica. Las propiedades físicas del fruto que se vieron afectadas por el sistema de cultivo también se vieron afectadas, en un grado similar o incluso mayor, por la época de muestreo. Además, se observaron múltiples interacciones entre estos dos factores.

Las diferencias encontradas entre sistemas de cultivo en la concentración de azúcares solubles alcanzaron valores del 38% (para sacarosa, comparando pimientos verdes ecológicos y sin suelo del segundo muestreo), mientras que, las diferencias entre recolecciones llegaron a alcanzar valores del 55% (para sacarosa, comparando pimientos verdes ecológicos del primer y segundo muestreo). El factor más importante que determinó la concentración de azúcar en pimiento fue el estado de maduración, siendo el pimiento rojo el que presentó una mayor concentración de glucosa y fructosa. Estos resultados se atribuyen tanto a la acumulación de hexosas durante la maduración, a través de la enzima invertasa ácida, como a la descomposición de sacarosa durante la última fase de maduración a través de la sacarosa sintasa (Nielsen *et al.*, 2006).

Entre los compuestos analizados, el ácido ascórbico es de particular importancia, ya que está implicado en procesos fisiológicos importantes tales como la biosíntesis de colágeno y de hormonas y por su papel protector en procesos inflamatorios a través de sus propiedades antioxidantes (Li y Schellhorn, 2007; Aguirre y May, 2008). Varios autores

describen un mayor contenido de vitamina C en vegetales cultivados en sistemas ecológicos, en comparación con los cultivados sistemas convencionales (Worthington, 2001). En pimiento, las diferencias en vitamina C entre los sistemas de cultivo fueron significativas sólo en estado de maduración rojo; los frutos bajo sistema SS mostraron valores más altos de vitamina C que los cultivados en suelo (E y C), mientras que no se observaron diferencias entre pimientos E y C. De la misma manera, la concentración de compuestos fenólicos sólo se vio afectada por el sistema de cultivo en frutos rojos, observándose de nuevo los valores más altos en pimientos SS. Por el contrario, la concentración de clorofilas y β -caroteno no se vio afectada por el sistema de cultivo. Según algunos autores, el mayor contenido de compuestos bioactivos en frutas y hortalizas ecológicas respecto a las convencionales se debe principalmente a un efecto de concentración como consecuencia de un menor contenido de agua (Hajslova *et al.*, 2005). Según otros autores, el mayor contenido de nutrientes en los vegetales ecológicos se debe principalmente a la baja disponibilidad de N (Magkos *et al.*, 2003). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias en el contenido de agua de los frutos entre los sistemas de cultivo y además, no se observaron diferencias en el contenido de N entre cultivos E y C. Las diferencias encontradas con respecto a los resultados mostrados en otros estudios pueden deberse, por un lado, a que en muchos de esos trabajos se comparaban cultivos convencionales, en los que se utilizaban altas dosis de fertilización, con cultivos ecológicos en los que la nutrición nitrogenada limitaba el desarrollo de la planta (Haneklaus *et al.*, 2002). Por el contrario, en el manejo de la nutrición mineral de los invernaderos ecológicos incluidos en nuestro estudio, se utilizaron diversas fuentes de N de origen orgánico (extractos solubles de estiércol, aminoácidos, extractos de algas marinas, etc.), por lo que las plantas disponían de una fuente de N constante y no limitante. De acuerdo con otros estudios en pimiento en los que un aumento de la concentración de N en el medio de crecimiento no condujo a modificaciones en las concentraciones de ácido ascórbico y compuestos fenólicos o en el contenido de agua de las frutas (Flores *et al.*, 2004), en nuestro estudio no son de esperar grandes diferencias en el contenido de metabolitos en pimiento ecológico, atribuibles a una limitación en la nutrición mineral. Existe poca información sobre la calidad de los frutos obtenidos en sistemas de producción sin suelo respecto a los cultivados en suelo. Rouphael *et al.* (2004) encontraron concentraciones de minerales y carbohidratos mayores en los frutos de calabacín cultivados sin suelo respecto a los cultivados en suelo. Estos autores atribuyen la mayor

calidad y rendimiento obtenido en los sistemas de cultivo sin suelo a un mejor control de la nutrición y una mayor eficiencia del uso del agua en comparación con el cultivo realizado en suelo. En tomate, sólo se observaron pequeñas diferencias en la composición mineral y el contenido de azúcares y ácido ascórbico entre los dos métodos de producción (Kunsch *et al.*, 1994). En tomate cherry y lechuga, se observaron diferencias en la evolución de las concentraciones de ácido ascórbico y minerales durante el almacenamiento entre productos cultivados en suelo y sin suelo (Chiesa *et al.*, 2005). Según Chassy *et al.* (2006) la composición nutricional de pimiento está poco influenciada por los sistemas de cultivo y muestra una respuesta diferente de otros cultivos en cuanto a la biodisponibilidad de nutrientes. En el presente estudio se observó una tendencia a disminuir la concentración de metabolitos de los frutos a lo largo del ciclo de cultivo atribuible al aumento paralelo de la producción que podría conducir a una dilución de metabolitos en frutas y a la disminución de la energía y reserva de nutrientes de la planta en las últimas etapas fenológicas.

La medida de actividad antioxidante constituye una cuantificación global del contenido de metabolitos con propiedades antioxidantes, a los que se le atribuye la capacidad de mitigar los efectos del estrés oxidativo en el desarrollo de diversas enfermedades y en el proceso de envejecimiento (Kalt, 2005). En frutos, los antioxidantes más abundantes son la vitamina C, los carotenoides y los compuestos fenólicos. En particular, en pimiento, la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) se correlacionó significativamente con el contenido de ácido ascórbico y compuestos fenólicos de fruto, y aumentó, paralelamente a la concentración de dichos metabolitos, del estado de maduración verde al rojo. La actividad antioxidante de la vitamina C y de los compuestos fenólicos se basa en la donación de electrones y, en el caso de algunos compuestos fenólicos, en la quelación de iones metálicos. En particular, se ha demostrado en diversos frutos que la actividad antioxidante se correlaciona con los compuestos fenólicos en mayor grado que con la vitamina C (Bahorun *et al.*, 2004). El pimiento cultivado sin suelo mostró los valores más altos de AAH en ambos estados de maduración. La actividad antioxidante de la fracción lipofílica (AAL) representó una proporción muy baja de la actividad antioxidante total. En pimiento verde, la AAL se correlacionó significativamente con el contenido en clorofilas. La clorofila y sus derivados son conocidos por poseer actividad antioxidante a través de su capacidad para reducir los radicales libres (Ferruzzi *et al.*, 2002). Por último, en pimiento rojo, se observó una

disminución de la concentración de clorofilas y un aumento de la de carotenoides, que se correlacionó significativamente con un aumento de los valores de AAL.

4.2. APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL

4.2.1. Material y métodos

4.2.1.1. Sitio de estudio, material vegetal y diseño experimental

El estudio se realizó en la finca experimental "Torreblanca" del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), ubicada en Torre-Pacheco (Murcia), en el sureste de España (37° 47', 0° 53' O, 45 m sobre el nivel del mar). Se cultivaron plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) de dos variedades comerciales: Almudén (tipo Lamuyo) y Quito (tipo California). El cultivo se realizó de acuerdo con el manejo de la nutrición propia de los sistemas de producción ecológica (E), convencional (C) y sin suelo (SS). Por cuestiones de disponibilidad, el estudio comparativo se realizó en dos fases. En una primera fase (campaña 2007), se realizó el ensayo comparativo entre el sistema ecológico y convencional. Dentro del invernadero, las plantas se dividieron en cuatro subparcelas (dos por tratamiento). Dentro de cada subparcela, las plantas se distribuyeron en filas, con un marco de plantación de 0,4 x 1 m (once filas por tratamiento). Los frutos se recolectaron de plantas situadas en las filas centrales para evitar el "efecto borde". Siguiendo el mismo diseño experimental, en una segunda fase (campaña 2008) se realizó el ensayo comparativo entre los sistemas de cultivo en suelo y sin suelo, utilizando dos invernaderos adyacentes, uno para cada sistema de cultivo.

4.2.1.2. Manejo del cultivo

4.2.1.2.1. Ensayo 1: ecológico vs convencional

El suelo donde se desarrollaron los sistemas de producción ecológico y convencional presentaba una textura franco arcillosa y se desinfectó mediante biosolarización, aplicando

enmienda ovina y gallinácea a razón de 5 kg m⁻². El estiércol utilizado presentaba las siguientes características: pH (1:10 p/v) = 7,4, conductividad eléctrica (1:10) 8,7 dS m⁻¹, 41% de materia orgánica, 1,8% N, 0,2% P, 1,4% K, 7,1% Ca, 1,0% Mg, 0,2 ppm Fe, 76,8 ppm Mn, 49,3 ppm Zn, 12,5 ppm Cu y relación C/N = 13,2. Después de la aplicación de estiércol el suelo se cubrió con una película de plástico y el invernadero se cerró durante 3 meses (agosto-octubre). Las características del suelo de las parcelas ecológicas y convencionales en el momento de la siembra se presentan en la Tabla 4.14. En el cultivo ecológico, la fertilización se realizó con abonos orgánicos certificados según el Reglamento Europeo (CE) 834/2007 para su uso en cultivos ecológicos: Ecoamin[®] (aminoácidos con un 3,0% de N total y un 1,9% de N orgánico) y Basuras Pedrín[®] (1,0% N, 0,02% P, 1,0% K, 350 ppm Ca, 250 ppm Mg, 350 ppm Fe, 275 ppm Mn, 600 ppm Zn y 0,5 ppm Cu). Las plantas del cultivo convencional se fertilizaron con Ca(NO₃)₂, KH₂PO₄, NH₄NO₃, KNO₃ y MgSO₄, siguiendo las pautas de bajos insumos, a razón de 373 N, 56 P, 485 K, 65 Ca y 26 Mg kg ha⁻¹, respectivamente. El control de plagas se realizó de acuerdo al Protocolo de Producción Integrada para los cultivos de pimiento (BORM, 2007).

Tabla 4.14. Características iniciales del suelo (después de la biofumigación y antes del comienzo del cultivo).

	Ensayo 1		Ensayo 2
	Convencional	Ecológico	Suelo
pH	7,6	7,9	7,7
CE (dS m⁻¹)	15,4	11,7	17,1
Na soluble	55,2	56,0	75,2
Cl⁻ (meq L⁻¹)	82,1	60,6	100,5
SO₄²⁻ (meq L⁻¹)	51,0	55,1	63,0
NO₃⁻ (meq L⁻¹)	30,0	14,2	26,9
P asimilable (mg L⁻¹)	131,0	114,9	125,7
K⁺ soluble (meq L⁻¹)	19,5	19,8	16,9
Ca²⁺ soluble (meq L⁻¹)	38,6	43,6	46,6
Mg²⁺ soluble (meq L⁻¹)	53,1	44,9	57,7
N orgánico (%)	0,18	0,20	0,20
Materia orgánica (%)	2,98	2,96	3,0

4.2.1.2.2. Ensayo 2: suelo vs sin suelo

El manejo del cultivo en suelo se realizó siguiendo las mismas pautas especificadas para el cultivo convencional (ensayo 1). En el sistema sin suelo, las plantas se cultivaron en sustrato de perlita (30%) y fibra de coco (70%). La solución de nutrientes utilizada para el riego, tenía la siguiente composición (mM) de macronutrientes: 18,0 NO₃⁻, 1,0 H₂PO₄⁻, 1,0 SO₄²⁻, 5,5 Ca, 6,5 K y 1,7 Mg. La concentración de micronutrientes (ppm) fue la siguiente: 2,0 Fe, 1,0 Mn, 0,1 Zn, 0,3 B, 0,1 Cu y 0,06 Mo. El control de plagas se llevó a cabo según el Protocolo de Producción Integrada para los cultivos de pimiento (BORM, 2007).

4.2.1.3. Recolección y preparación de las muestras

Los frutos de pimiento se recolectaron en estado de maduración verde. En cada muestreo se recogieron seis repeticiones por tratamiento, cada uno compuesto de diez frutos de diferentes plantas. En el primer ensayo (ecológico vs convencional) se realizaron tres muestreos a 164 (M1), 186 (M2) y 223 (M3) días después del trasplante. En el segundo ensayo (suelo vs sin suelo) se realizaron dos muestreos a 159 (M1) y 181 (M2) días después del trasplante. Los pimientos se pesaron en fresco y se determinó el color, el calibre ecuatorial y longitudinal, la dureza y el espesor de la pulpa. Posteriormente los pimientos se lavaron con agua desionizada, se retiraron las semillas y se trocearon. Los pimientos de una misma repetición se dividieron en dos partes. Una parte se homogeneizó con N₂ líquido y se congeló a -80 °C para la determinación de compuestos fenólicos, clorofilas, carotenos, azúcares solubles, ácidos orgánicos, así como la capacidad antioxidante del fruto. La otra parte, se secó en estufa a 60 °C y se molió para determinar la composición mineral.

4.2.1.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 18.0. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para los factores principales (sistema de cultivo y muestreo) y la interacción entre ambos. Los valores medios se compararon con el

test de rango múltiple de Tukey y para detectar correlaciones bivariadas significativas se realizó la prueba de Pearson

4.2.2. Resultados

Independientemente del sistema de cultivo estudiado, los frutos de los cultivares Almudén y Quito, pertenecientes respectivamente a los tipos de pimiento Lamuyo y California, mostraron diferencias en sus características físicas y su composición mineral (Tabla 4.15). Los frutos de Almudén fueron más grandes (mayor peso medio) y más largos (mayor índice de forma), mientras que los frutos de Quito eran más duros (mayor firmeza) y más gruesos (mayor espesor de la carne). En cuanto a los parámetros de color, Almudén mostró mayor valor de b^* (amarillo frente azul) y croma (saturación del color), pero menor a^* (rojo frente a verde) y hue (tono) que Quito. No se observaron diferencias significativas en L^* (luminosidad) entre cultivares. Respecto a la composición mineral de fruto, Quito acumuló más P y Mg mientras que Almudén mostró una mayor concentración de NO_3^- , aunque no se observaron diferencias significativas en la concentración de N entre ellos.

Tabla 4.15. Parámetros físicos y composición mineral de pimiento Almudén (A) y Quito (Q): Peso del fruto (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; kg cm^{-2}), espesor de la carne (Esp; mm), parámetros de color (L^* a^* b^*), hue (h°), croma (C) y concentración mineral ($\text{mmol kg}^{-1}\text{PS}$).

	Peso	IF	Firm	Esp	L^*	a^*	b^*	h°	C	Ca	K	Mg	P	N	NO_3^-
A	205,2	1,4	3,6	5,5	38,6	-13,4	17,2	128,4	21,8	30,2	668,7	64,3	104,7	1425,9	4,4
Q	185,0	1,0	4,1	6,0	38,1	-12,6	15,5	129,4	20,0	31,2	676,5	72,4	115,6	1494,3	2,4
	***	***	***	***	n.s.	**	***	***	***	n.s.	n.s.	***	*	n.s.	*

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Los valores son media (n=6).

Las diferencias entre Almudén y Quito respecto a su calidad nutricional, dependieron del sistema de cultivo estudiado (Tabla 4.16). En cultivos ecológicos y convencionales, Quito mostró una mayor concentración de compuestos antioxidantes lipofílicos como, clorofilas y carotenoides totales ($P<0,01$). No se observaron diferencias significativas entre

cultivares en la concentración de los compuestos hidrófilicos, excepto en glucosa y fructosa, que fueron mayores en Almudén. En el cultivo sin suelo, Almudén mostró una mayor concentración de compuestos hidrófilicos tales como compuestos fenólicos totales, ácido ascórbico, ácido cítrico, y fructosa ($P<0,05$), pero no se observaron diferencias significativas en la concentración de compuestos lipofílicos entre los dos cultivares.

Tabla 4.16. Composición nutricional de pimiento Almudén y Quito bajo cultivo ecológico, convencional y sin suelo. Actividad antioxidante en la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox g⁻¹*, concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu\text{g g}^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como mg g^{-1} .

	AAL	AAH	Clorof	β -carot	Fenolic	AA	Cítric	Glu	Fruc	Sac
Ecológico										
Almudén	0,14	4,05	50,1	25,5	0,33	1,27	1,46	17,8	17,5	2,8
Quito	0,15	4,70	55,5	29,3	0,37	1,45	1,46	16,1	15,4	4,6
	n.s.	n.s.	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	n.s.
Convencional										
Almudén	0,11	3,79	45,2	23,5	0,34	1,31	1,60	18,2	18,0	4,6
Quito	0,12	4,83	55,4	27,5	0,40	1,53	1,73	15,7	14,8	6,7
	n.s.	n.s.	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	n.s.
Sin Suelo										
Almudén	0,22	4,88	59,5	28,4	0,43	1,21	0,57	10,6	12,7	2,1
Quito	0,20	4,24	53,3	26,0	0,31	0,81	0,36	9,8	11,0	1,2
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.	*	n.s.

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Los valores son media ($n=6$).

Independientemente de la variedad y del sistema de cultivo estudiado, la fracción hidrofílica representó el 96% de la actividad antioxidante total de los frutos de pimiento. Mientras que la actividad antioxidante de la fracción lipofílica de los frutos (AAL) estuvo principalmente correlacionada con la concentración de compuestos lipofílicos como clorofilas y carotenoides totales ($P<0,01$), la actividad antioxidante de la fracción

hidrofílica (AAH) se correlacionó significativamente con la concentración de compuestos fenólicos, ácido ascórbico y sacarosa ($P < 0,01$).

4.2.2.1. Ecológico vs convencional

Respecto a la composición mineral del fruto, los pimientos cultivados bajo sistema C mostraron una mayor concentración de N y P que los frutos ecológicos, independientemente de la variedad estudiada (Tablas 4.17 y 4.18). En Almudén se observó la mayor concentración de NO_3^- en frutos convencionales. Además, en este cultivar se detectó un efecto del muestreo (M) sobre la concentración de N, NO_3^- , P y Ca (Tabla 4.17). En el segundo muestreo (M2), las concentraciones de N y Ca alcanzaron los valores más alto y más bajo del ciclo de cultivo, respectivamente. La concentración de P aumentó al final de la cosecha (M3), mientras que la concentración de NO_3^- disminuyó. En Quito, el efecto del muestreo sólo fue significativo para P y Ca, mostrando un patrón a lo largo del ciclo de cultivo similar al observado en Almudén (Tabla 4.18). Además, se observó una interacción significativa entre el efecto del sistema de cultivo y el muestreo (SC x M) sobre la concentración de Mg en Almudén, debida a que, mientras en el cultivo C dicha concentración se mantuvo constante durante la temporada de cosecha, en el cultivo ecológico fue mayor al final del ciclo de cultivo (Tabla 4.17).

Tabla 4.17. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmo\ kg^{-1}PS$) de pimiento Almodén.

		N	NO ₃ ⁻	P	K	Ca	Mg
SC							
	E	1337,4	2,3	95,1	666,7	30,4	66,5
	C	1443,0	3,6	104,7	649,0	34,7	63,1
		**	*	**	n.s.	n.s.	n.s.
M							
	M1	1333,9 ^a	3,4 ^b	92,7 ^a	623,6	23,4 ^b	65,2
	M2	1475,6 ^b	3,5 ^b	92,7 ^a	646,5	11,9 ^a	63,2
	M3	1361,0 ^a	1,5 ^a	114,4 ^b	703,4	62,4 ^c	66,0
		**	**	***	n.s.	***	n.s.
SC X M							
E	M1	1277,3	3,2	84,2	614,7	23,1	64,7 ^a
	M2	1435,3	2,7	89,1	652,5	9,5	63,9 ^a
	M3	1299,6	0,9	112,1	732,7	58,7	70,9 ^b
C	M1	1390,6	3,6	101,1	632,4	23,8	65,8 ^{ab}
	M2	1515,9	4,5	96,2	640,4	14,3	62,5 ^a
	M3	1422,4	2,4	116,7	674,1	66,1	61,1 ^a
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media (n=6).

Tabla 4.18. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) de pimiento Quito.

		N	NO ₃ ⁻	P	K	Ca	Mg
SC							
	E	1350,1	1,0	101,5	626,1	30,4	72,9
	C	1536,4	0,9	116,5	653,7	35,9	73,3
		**	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
M							
	M1	1397,5	0,9	102,4 ^a	604,2	21,9 ^b	70,7
	M2	1425,6	1,1	101,4 ^a	633,7	13,2 ^a	68,4
	M3	1524,0	0,8	125,5 ^b	688,0	68,0 ^c	81,1
		n.s.	n.s.	**	n.s.	***	n.s.
SC X M							
E	M1	1294,4	1,1	95,9	576,2	22,6	68,5
	M2	1383,6	0,8	98,3	661,7	10,1	70,8
	M3	1377,9	1,1	112,4	664,0	65,5	81,1
C	M1	1500,6	0,6	108,9	632,3	21,3	72,9
	M2	1467,6	1,3	104,6	605,6	16,4	65,9
	M3	1641,0	0,5	136,0	723,1	70,0	81,2
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media (n=6).

El sistema de cultivo afectó a las propiedades físicas del fruto de forma similar en ambos cultivares; los pimientos convencionales mostraron mayores valores de peso medio, firmeza y espesor que los pimientos ecológicos, aunque el efecto sobre el espesor sólo fue significativo en Quito (Tablas 4.19 y 4.20). No se observaron diferencias significativas en el índice de forma entre pimientos ecológicos y convencionales en ninguno de los cultivares estudiados. La época de recolección (muestreo) tuvo una influencia significativa sobre todos los atributos físicos del fruto, excepto sobre el índice de forma. Almudén y Quito mostraron una disminución del peso medio del fruto con el avance del ciclo de cultivo. Los valores más altos de firmeza se observaron a mitad (M2) y los más bajos al final (M3) del ciclo de cultivo. ANOVA detectó una interacción significativa entre SC x M sobre el peso medio del fruto en ambos cultivares; mientras que en el cultivo C el peso del fruto disminuyó a medida que avanzaba el ciclo de cultivo, en el cultivo E este parámetro

se mantuvo constante. Además se observó una interacción entre SC x M sobre el espesor en Quito, debido a que este parámetro aumentó de M1 a M2 en frutos ecológicos, pero no en convencionales.

Tabla 4.19. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm) y parámetros de color (L^* a^* b^*) en pimiento Almudén.

		Peso	IF	Firm	Esp	L^*	a^*	b^*
SC								
	E	184,3	1,38	3,1	5,3	39,8	-14,2	18,6
	C	210,1	1,32	3,5	5,4	39,0	-13,5	17,2
		***	n.s.	***	n.s.	n.s.	*	*
M								
	M1	218,1 ^b	1,32	3,4 ^b	5,9 ^c	37,6 ^a	-12,0 ^c	14,9 ^a
	M2	207,4 ^b	1,37	3,5 ^b	5,4 ^b	38,9 ^a	-13,3 ^b	17,1 ^b
	M3	166,0 ^a	1,36	3,0 ^a	4,7 ^a	41,6 ^b	-16,3 ^a	21,7 ^c
		***	n.s.	***	***	***	***	***
SC X M								
E	M1	186,5 ^b	1,32	3,2	5,8	38,6	-12,9 ^b	16,6
	M2	186,5 ^b	1,39	3,2	5,3	39,2	-13,6 ^b	17,5
	M3	179,8 ^b	1,42	3,0	4,7	41,6	-16,2 ^a	21,7
C	M1	249,8 ^c	1,32	3,6	6,0	36,6	-11,0 ^c	13,1
	M2	228,3 ^c	1,35	3,8	5,6	38,6	-13,0 ^b	16,8
	M3	152,2 ^a	1,30	3,1	4,7	41,6	-16,5 ^a	21,8
		***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media ($n=6$).

Tabla 4.20. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm) y parámetros de color (L^* a^* b^*) en pimiento Quito.

		Peso	IF	Firm	Esp	L^*	a^*	b^*
SC								
	E	168,0	1,04	3,7	5,8	38,4	-13,1	16,1
	C	190,4	1,02	4,0	6,0	39,1	-13,1	16,3
		***	n.s.	**	*	*	n.s.	n.s.
M								
	M1	199,1 ^c	1,04	3,8 ^b	6,0 ^b	37,1 ^a	-10,8 ^c	12,7 ^a
	M2	179,2 ^b	1,01	4,4 ^c	6,3 ^b	39,1 ^b	-13,1 ^b	16,4 ^b
	M3	159,3 ^a	1,04	3,4 ^a	5,3 ^a	40,1 ^c	-15,4 ^a	19,5 ^c
		***	n.s.	***	***	***	***	***
SC X M								
E	M1	177,9 ^{ab}	1,03	3,6	5,6 ^a	37,2 ^a	-11,0 ^e	13,1 ^a
	M2	166,6 ^a	1,05	4,3	6,3 ^b	39,1 ^b	-13,6 ^c	17,1 ^{bc}
	M3	159,5 ^a	1,04	3,3	5,4 ^a	38,9 ^b	-14,8 ^b	18,0 ^c
C	M1	220,3 ^c	1,05	4,1	6,4 ^b	37,0 ^a	-10,7 ^e	12,3 ^a
	M2	191,7 ^b	0,98	4,4	6,4 ^b	39,1 ^b	-12,7 ^d	15,6 ^b
	M3	159,1 ^a	1,04	3,4	5,2 ^a	41,3 ^c	-16,0 ^a	20,9 ^d
		**	n.s.	n.s.	**	***	**	***

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media ($n=6$).

En Almodén, los pimientos ecológicos mostraron valores menores de a^* y mayores valores de b^* que los pimientos convencionales (Tabla 4.19). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la luminosidad (L^*) entre sistemas de cultivo. Por el contrario, en Quito, el sistema de cultivo sólo tuvo un efecto significativo sobre la luminosidad, siendo los pimientos ecológicos los que mostraron el valor más bajo (Tabla 4.20). En ambos cultivares, los valores de L^* y b^* aumentaron y los de a^* disminuyeron con el avance del ciclo de cultivo. Se observó una interacción significativa entre el sistema de cultivo y el muestreo (SC x M) sobre los parámetros del color en Almodén (a^*) y Quito (L^* , a^* , b^*), debido al hecho de que el incremento de L^* y b^* y la disminución de a^* observada durante la temporada de crecimiento fue más pronunciada en el sistema C que en el E. El efecto del sistema de cultivo y el muestreo sobre el color de los pimientos se describió en términos de hue y croma (Figura 4.3). En Almodén, todos los datos aparecen

alineados a lo largo del mismo hue, lo que indica que el color verde de los pimientos no se vio afectado por el sistema de cultivo o el muestreo (Figura 4.3A). Sin embargo, los pimientos ecológicos mostraron mayor croma (mayor intensidad de color) que los frutos convencionales en los muestreos M1 y M2. Además, el valor de croma aumentó con el avance del ciclo de cultivo en ambos sistemas de producción. En Quito, el valor de hue disminuyó ligeramente y el de croma aumentó con el muestreo. Las diferencias en croma entre frutos ecológicos y convencionales dependió del muestreo; los pimientos ecológicos mostraron valores más altos que los pimientos convencionales en el primer y segundo muestreo, mientras que al final de la temporada ocurrió lo contrario (Figura 4.3B).

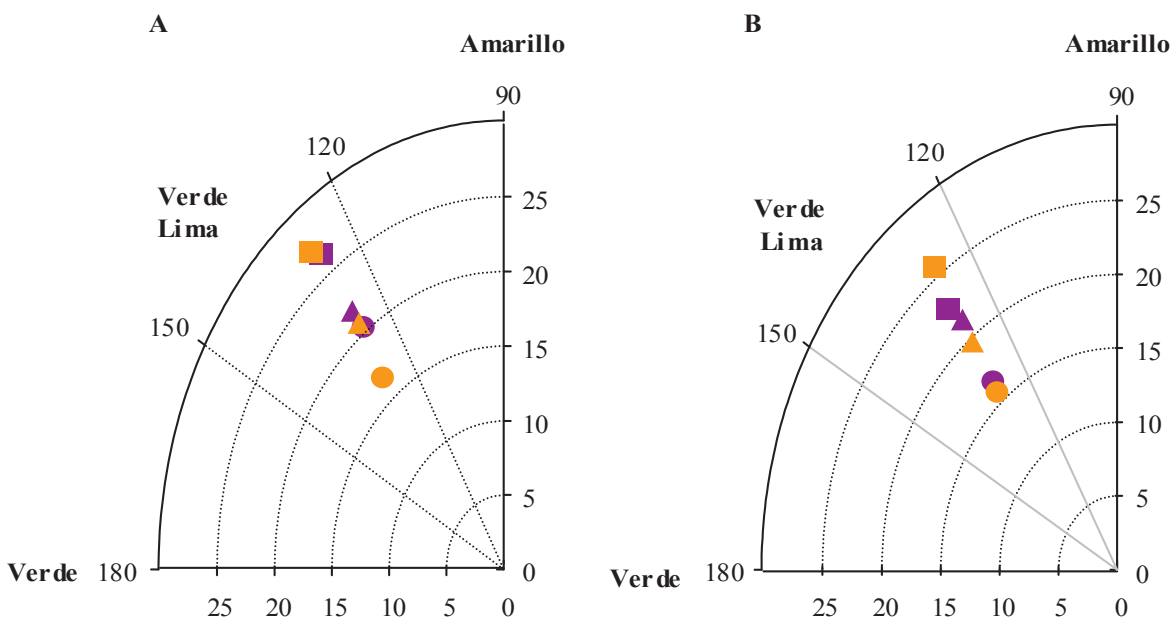


Figura 4.3. Efecto de los sistemas de cultivo, ecológico (morado) y convencional (naranja), y de la época de muestreo, al principio (círculos), mediados (triángulos) y final (cuadrados) del ciclo de cultivo, sobre los valores croma-hue en Almudén (A) y Quito (B).

El sistema de cultivo afectó significativamente a la actividad antioxidante de la fracción lipófila (AAL) en ambos cultivares (Tablas 4.21 y 4.22). La AAL y los compuestos lipofílicos mostraron una mayor concentración en pimiento ecológico que en convencional. Sin embargo, la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) no se vio afectada por el sistema de cultivo. En Almudén, de acuerdo con los resultados observados en la AAH, no se observaron diferencias significativas en la concentración de compuestos hidrofílicos (compuestos fenólicos totales, ácido ascórbico, ácido cítrico, sacarosa, glucosa y fructosa) entre cultivos E y C. En Quito, el efecto del sistema de cultivo en la fracción hidrofílica sólo fue significativo para la concentración de ácido cítrico y sacarosa, observándose los valores más altos en frutos cultivados bajo el sistema convencional. La influencia del muestreo sobre la composición antioxidante de pimiento dependió de cultivar estudiado (Tablas 4.21 y 4.22). Mientras que en Almudén la AAL y la concentración de compuestos lipofílicos no se vieron afectados por la época de muestreo, en Quito, estos compuestos disminuyeron significativamente al final del ciclo de cultivo (M3). En lo que respecta al efecto de la época de muestreo sobre la fracción hidrofílica, la AAH disminuyó en ambos cultivares con el avance del ciclo de cultivo. En Almudén, sólo los compuestos fenólicos, el ácido ascórbico y la sacarosa se vieron afectados por la época de muestreo, mientras que en Quito todos los compuestos hidrofílicos (excepto fructosa) disminuyeron paralelamente a la AAH. Por último, ANOVA no detectó interacciones significativas entre los factores principales, sistema de cultivo y muestreo (SC x M), salvo para el ácido cítrico en Quito, debido a que en el cultivo ecológico la concentración de ácido cítrico se mantuvo constante a lo largo del ciclo de cultivo, mientras que en el cultivo convencional la concentración aumentó a mitad del ciclo (M2) y volvió a disminuir al final del ciclo (Tablas 4.21 y 4.22).

Tabla 4.21. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox g⁻¹*, concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu\text{g g}^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como *mg g⁻¹*, en pimiento Almudén.

		AAL	AAH	Clorof	β -carot	Fenolic	AA	Cítric	Glu	Fru	Sac
SC											
	E	0,14	4,05	50,1	25,5	0,33	1,27	1,46	17,9	17,5	2,9
	C	0,11	3,79	45,2	23,5	0,34	1,31	1,60	18,2	18,2	3,9
		**	n.s.	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M											
	M1	0,12	5,23 ^c	46,9	25,7	0,40 ^c	1,57 ^b	1,44	17,8	18,3	5,8 ^b
	M2	0,13	3,85 ^b	47,4	24,3	0,33 ^b	1,25 ^a	1,50	18,2	17,5	3,3 ^a
	M3	0,13	2,69 ^a	48,7	23,6	0,28 ^a	1,05 ^a	1,66	18,0	17,5	1,6 ^a
		n.s.	***	n.s.	n.s.	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	***
SC X M											
	E										
	M1	0,13	5,23	49,8	25,8	0,38	1,51	1,33	17,9	18,4	4,3
	M2	0,15	3,80	52,2	26,3	0,33	1,18	1,45	18,3	17,5	2,7
	M3	0,13	3,13	48,3	24,4	0,29	1,13	1,60	17,5	16,7	1,8
	C										
	M1	0,11	5,23	47,6	25,6	0,42	1,63	1,54	17,9	18,1	6,7
	M2	0,11	3,90	42,6	22,3	0,34	1,32	1,54	18,0	17,5	3,7
	M3	0,11	2,24	45,5	22,7	0,26	0,97	1,72	18,8	18,9	1,1
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media (n=6)

Tabla 4.22. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), ecológico (E) y convencional (C), y de la época de muestreo (M), al principio (M1), mediados (M2) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox g⁻¹*, concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu\text{g g}^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como mg g^{-1} , en pimiento Quito.

		AAL	AAH	Clorof	β -carot	Fenolic	AA	Cítric	Glu	Fru	Sac
SC											
	E	0,15	4,65	55,1	29,1	0,37	1,42	1,47	16,0	15,4	4,6
	C	0,12	4,83	51,4	27,5	0,40	1,55	1,73	15,7	14,8	6,9
		**	n.s.	*	*	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	*
M											
	M1	0,14 ^b	5,92 ^b	57,1 ^b	30,7 ^b	0,45 ^b	1,71 ^b	1,60 ^{ab}	16,3 ^b	15,6	7,4 ^b
	M2	0,16 ^b	5,36 ^b	55,8 ^b	29,8 ^b	0,41 ^b	1,59 ^b	1,72 ^b	16,5 ^b	15,5	5,8 ^{ab}
	M3	0,11 ^a	2,95 ^a	46,9 ^a	24,4 ^a	0,29 ^a	1,15 ^a	1,47 ^a	14,7 ^a	14,3	3,5 ^a
		**	***	***	***	***	***	**	*	n.s.	**
SC X M											
	E										
	M1	0,16	5,61	56,9	30,7	0,44	1,66	1,47 ^a	16,5	16,1	6,2
	M2	0,17	5,29	58,9	31,0	0,38	1,44	1,47 ^a	16,6	15,6	5,0
	M3	0,12	3,05	49,4	25,5	0,29	1,14	1,43 ^a	14,8	14,4	2,6
	C										
	M1	0,12	6,22	57,2	30,6	0,46	1,76	1,73 ^b	16,1	15,1	9,1
	M2	0,14	5,43	52,7	28,7	0,44	1,74	1,97 ^c	16,5	15,3	7,1
	M3	0,10	2,85	44,3	23,2	0,30	1,16	1,50 ^a	14,7	14,1	4,5
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media ($n=6$).

4.2.2.2. Suelo vs sin suelo

Respecto al efecto del sistema de cultivo en suelo (S) o sin suelo (SS) sobre la composición mineral del fruto, independientemente de la variedad estudiada los pimientos cultivados en S mostraron una mayor concentración de Ca y un menor contenido de NO_3^- que los pimientos cultivados en SS. La composición mineral de los frutos no se vio afectada por el muestreo ni por la interacción SC x M (Tablas 4.23 y 4.24).

Tabla 4.23. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) en Almadén.

		N	NO ₃ ⁻	P	K	Ca	Mg
SC							
	S	1749,8	3,7	130,8	816,5	39,7	78,9
	SS	1559,7	9,1	123,0	709,4	21,5	63,8
		n.s.	*	n.s.	n.s.	***	n.s.
M							
	M1	1689,3	6,8	129,4	784,1	31,7	72,5
	M2	1658,2	6,0	125,9	763,3	33,0	70,2
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SC X M							
S	M1	1767,1	3,1	132,3	823,1	39,7	84,0
	M2	1732,4	4,2	129,3	810,0	39,7	73,9
SS	M1	1572,5	10,4	125,1	725,6	19,9	61,0
	M2	1547,0	7,7	120,9	693,1	23,2	66,5
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media (n=6).

Tabla 4.24. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre la composición mineral ($mmol\ kg^{-1}PS$) en Quito.

		N	NO ₃ ⁻	P	K	Ca	Mg
SC							
	S	1533,7	2,2	118,7	782,0	38,5	75,6
	SS	1667,8	7,7	138,8	807,4	23,8	69,7
		n.s.	*	n.s.	n.s.	**	n.s.
M							
	M1	1551,7	5,1	126,7	828,3	32,2	72,7
	M2	1665,1	4,8	132,5	768,3	30,8	72,2
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SC X M							
S	M1	1518,8	1,2	120,3	853,2	36,7	77,9
	M2	1553,6	3,3	116,6	710,9	40,2	72,6
SS	M1	1586,8	9,0	133,1	803,5	23,9	67,5
	M2	1748,8	6,3	144,4	811,3	23,7	72,0
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media (n=6).

En Almudén, la influencia del sistema del cultivo sobre las propiedades físicas de los frutos sólo se observó en la firmeza del fruto, que fue menor en S que en SS (Tabla 4.25). En el caso de Quito, los frutos cultivados en S también fueron menos firmes aunque el espesor de la carne fue mayor (Tabla 4.26). El efecto del muestreo sobre los parámetros físicos dependió del cultivar estudiado. Mientras que en Quito se observó una pérdida de peso y un aumento del espesor al final del ciclo de cultivo (M2), en Almudén, la pérdida de espesor se observó al final de la temporada. ANOVA detectó una interacción significativa (SC x M) sobre la firmeza en Almudén; mientras que en el sistema S la firmeza aumentó del M1 al M2, en SS se observó lo contrario. Además se observó una interacción significativa SC x M en Quito respecto al peso y al espesor del fruto ya que mientras en S el peso se mantuvo constante y el espesor aumentó entre muestreos, en SS se observó una pérdida de peso sin pérdida de espesor.

Tabla 4.25. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm) y parámetros de color (L^* a^* b^*) en Almudén.

		Peso	IF	Firm	Esp	L^*	a^*	b^*
SC								
	S	232,1	1,40	3,8	6,4	36,3	-11,4	14,2
	SS	235,1	1,44	4,4	6,2	35,6	-11,4	14,6
		n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M								
	M1	234,6	1,46	3,9	6,7	36,1	-10,7	12,0
	M2	232,0	1,37	4,2	6,1	36,0	-12,0	16,6
		n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	***	***
SC X M								
S	M1	227,0	1,44	3,3a	6,7	37,0 ^c	-11,2 ^{bc}	12,4 ^a
	M2	236,7	1,35	4,3bc	6,2	35,7 ^{ab}	-11,6 ^{ab}	15,8 ^b
SS	M1	245,1	1,49	4,8c	6,6	34,8 ^a	-10,4 ^c	11,5 ^a
	M2	225,1	1,39	4,1b	5,9	36,5 ^{bc}	-12,5 ^a	17,8 ^c
		n.s.	n.s.	***	n.s.	***	*	*

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media ($n=6$).

Tabla 4.26. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre el peso (g), índice de forma (IF), firmeza (Firm; $kg\ cm^{-2}$), espesor (Esp; mm) y parámetros de color (L^* a^* b^*) en Quito.

		Peso	IF	Firm	Esp	L^*	a^*	b^*
SC								
	S	208,2	1,08	4,4	7,4	35,2	-9,7	11,3
	SS	206,6	1,08	5,2	6,6	35,6	-10,6	13,2
		n.s.	n.s.	***	***	n.s.	***	***
M								
	M1	215,7	1,10	4,8	6,8	35,8	-10,2	11,7
	M2	199,1	1,05	4,7	7,2	35,0	-10,1	13,0
		*	n.s.	n.s.	*	**	n.s.	**
SC X M								
S	M1	206,4 ^{ab}	1,12	4,4	6,7 ^a	35,7	-9,8	10,7
	M2	209,9 ^{ab}	1,04	4,3	8,1 ^b	34,6	-9,6	11,9
SS	M1	224,9 ^b	1,09	5,2	6,9 ^a	35,9	-10,7	12,5
	M2	188,3 ^a	1,07	5,2	6,3 ^a	35,3	-10,6	13,8
		*	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media ($n=6$).

En Almudén, los parámetros de color no se vieron afectados por el sistema de cultivo. Sin embargo, se observó una disminución de a^* y un aumento de b^* conforme avanzaba la temporada (Tabla 4.25). ANOVA detectó una interacción significativa SC x M para todos los parámetros de color (L^* a^* b^*). Los pimientos cultivados en ambos sistemas de cultivo (S y SS) mostraron un color verde similar (igual hue) que disminuyó del M1 al M2 (Figura 4.4A). Por el contrario, la intensidad de color (croma) aumentó de M1 a M2 siendo este incremento más pronunciado en SS que en S. Al contrario de lo observado en Almudén, los frutos de Quito cultivados en S mostraron mayor a^* y menor b^* que los cultivados en SS (Tabla 4.26). Además, los pimientos cultivados en suelo mostraron mayor hue que los cultivados sin suelo observándose una disminución general en el último muestreo (Figura 4.4B). Para este cultivar, los valores de croma fueron más altos en pimientos cultivados en el sistema sin suelo que en los cultivados en suelo y esta diferencia permaneció durante todo el ciclo de cultivo.

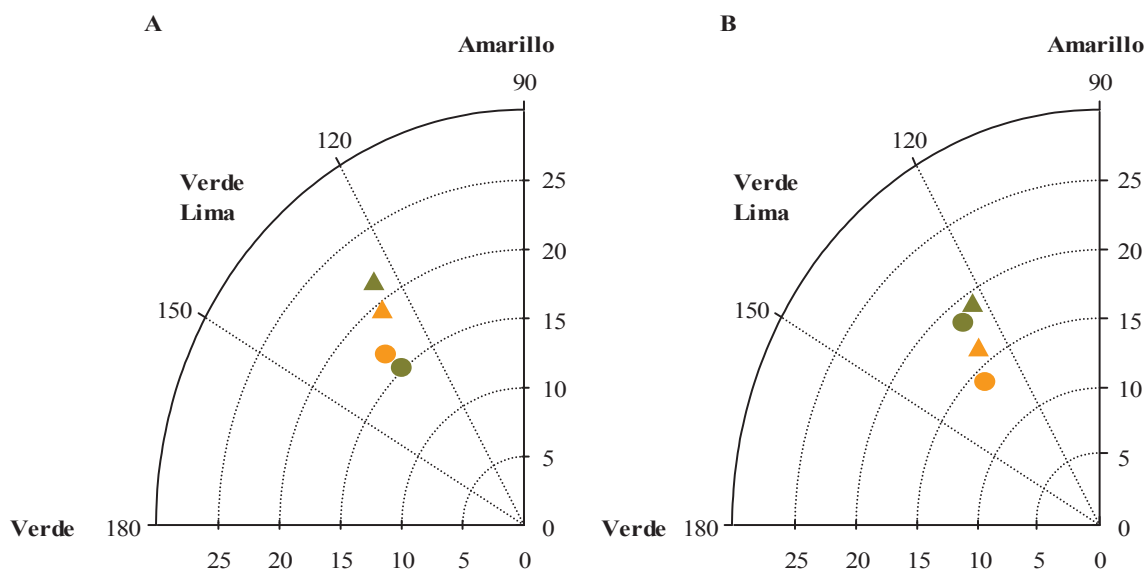


Figura 4.4. Efecto de los sistemas de cultivo, suelo (naranja) y sin suelo (verde), y de la época de muestreo, al principio (círculos) y final (triángulos) del ciclo de cultivo, sobre los valores cromático-hue en Almudén (A) y Quito (B).

El efecto del sistema de cultivo sobre la actividad antioxidante de pimiento dependió del cultivar estudiado (Tablas 4.27 y 4.28). En Almudén, las concentraciones de compuestos hidrofílicos y lipofílicos no se vieron afectados por el sistema de cultivo utilizado, excepto fructosa, cuya concentración fue menor en pimientos cultivados en suelo. Por el contrario, en Quito, tanto la AAH y la AAL como la concentración de todos los compuestos analizados, estuvieron influenciados por el sistema de cultivo adoptado. La concentración de glucosa y fructosa fue significativamente menor en cultivos en suelo, sin embargo este sistema presentó una mayor concentración del resto de compuestos analizados, así como un mayor valor de AAH y AAL. En ambos cultivares, la concentración de compuestos lipofílicos disminuyó del primer al segundo muestreo, aunque la AAL no lo hizo significativamente. Con respecto a la fracción hidrofílica, en Almudén, tanto la AAH como la concentración de los compuestos hidrofílicos disminuyeron del M1 al M2, aunque no se observaron diferencias significativas para los azúcares solubles. En Quito, al igual que en Almudén, la AAH disminuyó del M1 al M2 aunque no se observaron diferencias significativas entre muestreos en la concentración de

los compuestos hidrofílicos estudiados. En Quito, ANOVA detectó una interacción significativa entre el sistema de cultivo y el muestreo (SC x M) para AAH, AAL y todos compuestos analizados, excepto para el ácido cítrico y los azúcares solubles. Dicha interacción fue debida a la disminución observada del M1 al M2 en S, que no ocurrió en SS. En Almudén, la interacción SC x M sólo se observó en la concentración de compuestos fenólicos, glucosa y sacarosa y, al contrario que en Quito, se debió a una disminución de M1 a M2 en SS, que no se observó en S.

Tabla 4.27. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M2) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox g⁻¹*, concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu\text{g g}^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como mg g^{-1} , en pimiento Almudén.

		AAL	AAH	Clorof	β -carot	Fenolic	AA	Cítric	Glu	Fru	Sac
SC											
	S	0,22	4,58	53,7	26,5	0,41	1,09	0,77	9,2	11,1	2,3
	SS	0,22	4,88	59,5	28,4	0,45	1,21	0,57	10,6	12,7	2,1
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
M											
	M1	0,24	5,42	60,9	29,4	0,48	1,45	0,80	11,2	12,5	2,5
	M2	0,21	4,04	52,3	25,5	0,37	0,85	0,54	8,6	11,3	1,9
		n.s.	*	*	*	**	***	*	n.s.	n.s.	n.s.
SC X M											
S	M1	0,23	4,74	57,3	28,3	0,42 ^a	1,28	0,83	8,9 ^{ab}	11,2	2,0 ^{ab}
	M2	0,22	4,42	50,1	24,6	0,39 ^a	0,89	0,71	9,5 ^{ab}	10,9	2,6 ^{ab}
SS	M1	0,25	6,11	64,5	30,4	0,54 ^b	1,62	0,77	13,6 ^b	13,8	3,0 ^b
	M2	0,20	3,66	54,4	26,4	0,35 ^a	0,80	0,36	7,7 ^a	11,6	1,0 ^a
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	*

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media (n=6).

Tabla 4.28. Efecto de los sistemas de cultivo (SC), en suelo (S) y sin suelo (SS), y de la época de muestreo (M), al principio (M1) y final (M3) del ciclo de cultivo, sobre la actividad antioxidante de la fracción hidrofílica (AAH) y lipofílica (AAL), expresada como *moles equivalentes de trolox g⁻¹*, concentración de clorofilas (Clorof) y carotenoides totales (β -carot), expresadas como $\mu\text{g g}^{-1}$, y concentración de compuestos fenólicos totales (Fenolic), ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (Cítric), glucosa (Glu), fructosa (Fru) y sacarosa (Sac), expresadas como mg g^{-1} , en pimiento Quito.

		AAL	AAH	Clorof	β -carot	Fenolic	AA	Cítric	Glu	Fru	Sac
SC											
	S	0,26	5,52	61,4	30,0	0,39	1,00	0,63	8,8	9,7	2,8
	SS	0,20	4,24	53,3	26,0	0,33	0,82	0,36	9,8	11,0	1,2
		*	**	***	***	*	*	**	*	**	**
M											
	M1	0,24	5,70	60,3	28,9	0,34	0,96	0,50	9,5	10,6	1,6
	M2	0,23	4,06	54,5	27,0	0,38	0,85	0,49	9,1	10,1	2,4
		n.s.	***	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
SC X M											
S	M1	0,29 ^b	6,95 ^b	66,2 ^c	31,9 ^c	0,40 ^b	1,15 ^b	0,62	9,2	10,1	2,4
	M2	0,23 ^{ab}	4,10 ^a	56,6 ^b	28,0 ^b	0,34 ^{ab}	0,85 ^a	0,65	8,4	9,3	3,2
SS	M1	0,19 ^a	4,46 ^a	54,3 ^{ab}	26,0 ^a	0,28 ^a	0,78 ^a	0,38	9,8	11,2	0,8
	M2	0,22 ^a	4,02 ^a	52,4 ^a	26,0 ^a	0,35 ^{ab}	0,86 ^a	0,34	9,7	10,8	1,6
		**	*	*	*	**	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Tukey. Los valores son media (n=6).

4.2.3. Discusión

Independientemente del sistema de cultivo adoptado, se observaron diferencias en las características físicas de los dos cultivares estudiados, propias de cada uno de los tipos de pimientos a los que pertenecen. Almudén (tipo Lamuyo) presentó frutos más grandes y más largos que Quito (tipo California) y este a su vez presentó frutos más duros y gruesos y con un color más verde (mayor hue) pero menos intenso (menor cromas) que Almudén. Además, también se observaron diferencias en la composición química; Quito mostró una mayor concentración de P y Mg que Almudén y un menor contenido de NO_3^- . El contenido de nitratos de en la parte comestible de las plantas se ha correlacionado con el aumento del riesgo de enfermedades como el cáncer gastrointestinal (Hord *et al.*, 2009). El cultivar

Quito acumuló menos nitratos en fruto que Almudén, pero ello no puede considerarse como un parámetro beneficioso relevante, ya que la concentración de nitrato en ambos cultivares fue muy inferior a la observada en tubérculos y hortalizas de hoja (Correia *et al.*, 2010), por lo que su contribución a la dieta no es significativa.

La actividad antioxidante, parámetro que proporciona una estimación global del contenido en metabolitos con dicha propiedad, identificó a la fracción hidrofílica como la principal responsable de las propiedades antioxidantes de los frutos de pimiento. De acuerdo con estudios previos realizados en pimiento verde, los principales compuestos responsables de la actividad antioxidante hidrofílica (AAH) fueron compuestos fenólicos y ácido ascórbico, mientras que la clorofila fue el principal compuesto antioxidante de la fracción lipofílica (AAL) (Bahorun *et al.*, 2004; Greco *et al.*, 2007; Perucka y Materska, 2007). Según Buratti *et al.* (2001) la clorofila es electroquímicamente menos antioxidante que los carotenoides pero, cuando está presente en altas concentraciones, como es el caso de pimiento verde, su contribución a la actividad antioxidante total es determinante. En general, en sistemas de cultivo realizados en suelo (E y C), Quito mostró una mayor calidad nutricional que Almudén, presentando altas concentraciones de compuestos antioxidantes lipofílicos. Sin embargo, en el cultivo SS, Almudén mostró una mayor calidad nutricional que Quito, como se refleja en su mayor contenido en compuestos antioxidantes hidrofílicos.

4.2.3.1. Ecológico vs convencional

De acuerdo con estudios anteriores realizados en pimiento y tomate, la concentración de N en frutos convencionales fue significativamente mayor que en frutos ecológicos (Clark *et al.*, 1999; Colla *et al.*, 2002; Herencia *et al.*, 2007). Los fertilizantes sintéticos utilizados en la agricultura convencional proporcionan N de una forma más disponible para las plantas que los fertilizantes orgánicos. Esto explica por qué numerosos investigadores han descrito que los niveles de nitrato en frutas y verduras cultivadas con fertilizantes nitrogenados inorgánicos son superiores a la de los cultivos en los que el N es suministrado en forma de compost u otras materias orgánicas (Bourn and Prescott, 2002; Vogtmann *et al.*, 1993; Williams, 2002). Sin embargo, a pesar del mayor contenido de N en frutos convencionales de ambos cultivares, sólo Almudén mostró un mayor contenido de nitrato

en dichos frutos, probablemente debido a una menor tasa de asimilación de nitrato en Quito, y por tanto, una mayor acumulación en NO_3^- en la vacuola. Respecto al efecto del sistema de cultivo sobre la concentración de P, los resultados encontrados en la bibliografía no muestran una tendencia clara. Por ejemplo, Phillips *et al.* (2002) no encontraron diferencias en la concentración de P en habas ecológicas y convencionales, mientras que Colla *et al.* (2002) y Wszelaki *et al.* (2005) encontraron niveles más altos de P en cultivos ecológicos en tomate y patata, respectivamente. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados en pimiento, Warman (2005) observó un mayor contenido de P en tomate y cebolla cultivados bajo producción convencional. Por último, independientemente del cultivar estudiado, el sistema de cultivo no afectó a la concentración de K, Ca y Mg del fruto. Independientemente del cultivar o del sistema de cultivo, en nuestro estudio se observaron diferencias en la composición mineral a lo largo del ciclo de cultivo, siendo este efecto, en la mayoría de los casos, más pronunciado que el producido por el sistema de cultivo.

En general, los pimientos convencionales mostraron mayor peso, firmeza y espesor que los ecológicos. Estos resultados difieren de los encontrados en nuestro estudio anterior llevado a cabo en explotaciones comerciales, en el que las diferencias en las características físicas de los frutos cultivados bajo producción ecológica y convencional son más difíciles de detectar. En el estudio anterior, se realizó una cuidadosa selección de invernaderos vecinos para controlar el clima y las características del suelo. Sin embargo, las diferencias en el manejo nutricional, el control de plagas y el microclima dentro de los invernaderos son inevitables y esto puede hacer que las diferencias entre los sistemas de cultivo sean más difíciles de detectar que en un estudio llevado a cabo en un centro de investigación en el que las plantas se cultivan en el mismo suelo, bajo idénticas condiciones climáticas y con un manejo de la fertilización homogéneo para cada sistema de cultivo. Por otro lado, en el presente estudio, el manejo de las prácticas agrícolas llevadas a cabo en el cultivo ecológico hizo que el peso medio de los frutos se mantuviera constante durante todo el ciclo de cultivo, mientras que este parámetro disminuyó en los frutos cultivados bajo sistema convencional. Como se ha mencionado anteriormente, los fertilizantes ecológicos proporcionan nutrientes de una forma menos asimilable para las plantas que los fertilizantes sintéticos (Gutser *et al.*, 2005), y por lo tanto, tienden a actuar como fertilizantes de liberación lenta, proporcionando un suministro más regular y homogéneo

de nutrientes durante todo el período de crecimiento. El hecho de que este suministro más regular pueda dar lugar a que el peso del fruto se mantenga constante a lo largo del ciclo de cultivo, puede considerarse una ventaja del cultivo ecológico frente al convencional.

En cuanto a los parámetros de color, los pimientos cultivados en E y C mostraron un color verde similar (igual hue) pero, en general, los pimientos ecológicos mostraron una mayor intensidad de color que los frutos convencionales. Sin embargo, las diferencias en la intensidad de color encontradas entre diferentes muestreos, fueron incluso mayores que las encontradas entre los distintos sistemas de cultivo. Almudén mantuvo el color verde inalterado, sin embargo este parámetro disminuyó en Quito con el avance de la temporada, especialmente en el cultivo C.

En ambos cultivares, el sistema de cultivo no tuvo un efecto significativo sobre la concentración de la mayoría de los compuestos hidrofílicos ni sobre la AAH. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en nuestro estudio anterior llevado a cabo en explotaciones comerciales, en el que no se observaron diferencias en la concentración de vitamina C y compuestos fenólicos entre frutos cultivados bajo producción ecológica y convencional, observándose sólo pequeñas diferencias en los valores de AAH. Según Winter y Davis (2006), existen dos hipótesis principales que explicarían el posible aumento en los compuestos bioactivos en vegetales ecológicos. La primera hipótesis sugiere que las diferencias se basan en el impacto de las diferentes prácticas de fertilización en el metabolismo de la planta ya que los abonos sintéticos aceleran el crecimiento y desarrollo de plantas, produciéndose una disminución de la producción de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos y clorofilas. La segunda hipótesis considera que en el cultivo ecológico, en el que se limita el uso de plaguicidas para el control de plagas, las plantas responden a ambientes estresantes, como el ataque de insectos, malezas y patógenos, aumentando la síntesis de metabolitos secundarios que actúan como un mecanismo propio de defensa química (Asami *et al.*, 2003).

En contraste con los resultados encontrados sobre la fracción hidrofílica, el sistema de cultivo tuvo un efecto significativo sobre la actividad antioxidante de la fracción lipofílica; los pimientos ecológicos mostraron valores significativamente más altos de AAL, carotenoides y clorofilas que los convencionales. Aunque la mayor concentración de N disponible en los sistemas convencionales puede afectar la calidad del fruto, el

conocimiento de la influencia de la fertilización con N en la concentración de metabolitos lipofílicos es limitada y a menudo contradictoria (Goldman *et al.*, 1999). En frutas como tomate, no se observaron diferencias significativas en la concentración de carotenoides al comparar cultivos convencionales y ecológicos (Caris-Veyrat *et al.*, 2004; Ordoñez-Santos *et al.*, 2011). Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto del sistema de cultivo en la fracción lipofílica de pimiento verde. En general, la mayor asimilación de N, derivada del uso de fertilizantes sintéticos, puede conducir a una disminución en la acumulación de clorofilas (Winter y Davis, 2006). De acuerdo con esto y acompañado de un menor contenido en N, encontramos concentraciones más altas de compuestos lipofílicos en pimiento ecológico. Los resultados observados en este estudio contrastan con los resultados obtenidos en nuestro estudio comparativo previo llevado a cabo en explotaciones comerciales, en el que no se observó un efecto significativo del sistema de cultivo en la fracción lipofílica. Estas diferencias pueden atribuirse al hecho de que, a diferencia de los resultados observados en este estudio, en el estudio previo no se observaron diferencias en la concentración de N planta o fruto entre el cultivo ecológico y el convencional. Por lo tanto, se debe tener en cuenta que, aunque en el cultivo ecológico el suministro de N es más limitado, en el mercado existe una gran variedad de fertilizantes de origen orgánico, aplicables en cultivos ecológicos, que pueden satisfacer de manera eficiente los requisitos de la planta respecto a la nutrición mineral.

Por último, la concentración de los compuestos antioxidantes disminuyó de forma general con el avance de la cosecha, especialmente la de los compuestos hidrofílicos. Esta disminución global puede atribuirse, por un lado, a la dilución de los metabolitos en los frutos como consecuencia del incremento estacional de la producción y, por otra lado, a la disminución natural de la energía y reserva de nutrientes de la planta en las últimas etapas fenológicas.

4.2.3.2. Suelo vs sin suelo

De acuerdo con estudios anteriores realizados en fresa (Recamales *et al.*, 2007), no se observaron diferencias en la concentración de N en pimiento entre los cultivos S y SS. Sin embargo, la concentración de NO_3^- fue mayor en pimientos SS que en pimientos cultivados en S, tal vez porque en condiciones no limitantes de N, tal y como se ha visto en

el estudio comparativo entre el sistema ecológico y convencional, las diferencias en la concentración de N es más evidente en la fracción nítrica (Flores *et al.*, 2007). La concentración de Ca fue mayor en los cultivos S que en los cultivos SS, para ambos cultivares. Las plantas adquieren Ca de la solución del suelo, a través del sistema de raíces, y llega a la parte aérea a través del xilema. Por lo tanto, la acumulación de Ca en la parte aérea está linealmente relacionada con las relaciones hídricas de la planta (White, 2001). Esto sugiere que las diferencias observadas en la concentración de Ca pueden ser atribuidas a diferencias en la disponibilidad de agua para la planta entre los cultivos en suelo y los cultivos sin suelo. Los resultados obtenidos para el Ca coinciden con los encontrados en nuestro estudio anterior en explotaciones comerciales. Sin embargo, en las explotaciones comerciales no se encontraron diferencias significativas entre los sistemas de cultivo en cuanto a la concentración de NO_3^- .

La información sobre el efecto del cultivo sin suelo sobre las propiedades físicas de los vegetales en general y del pimiento en particular, es limitada. Entre las propiedades físicas del fruto, la firmeza es un parámetro de calidad importante que puede decidir qué frutos son cosechados, almacenados o comercializados. De acuerdo con los resultados encontrados en pimiento verde en nuestro estudio en explotaciones comerciales y con los descritos en tomate, las frutas procedentes del cultivo sin suelo son más firmes que las cultivadas en suelo (Benoit y Ceustermans, 1987; Flores *et al.*, 2009b y Thybo, 2005). Por el contrario, los pimientos cultivados en S mostraron un mayor espesor, aunque las diferencias con respecto a los cultivados en SS sólo fueron significativas en Quito. La respuesta del color del fruto al sistema de cultivo en suelo o sin suelo dependió del cultivar estudiado. En Almodén, el color verde del pimiento y su intensidad no se vieron afectados por el sistema de cultivo adoptado. Sin embargo, en Quito, los pimientos cultivados en suelo mostraron un color más verde pero menos intenso que los cultivados en SS.

Existe poca información sobre de la composición nutricional de pimiento procedente de cultivo sin suelo en comparación con los cultivados en suelo. En tomate, Abak y Celikel (1994) no observaron diferencias entre los cultivos S y los SS en lo que respecta a los sólidos solubles, acidez y contenido de vitamina C. Por el contrario, Ozcelik y Akilli (1999) encontraron que los tomates producidos en un sistema de cultivo sin suelo tenían valores más altos de esos parámetros. En calabacín, Roupheal *et al.* (2006) no encontraron diferencias en la materia seca o el contenido total de proteína, mientras que la

concentración de hidratos de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) fue mayor en el cultivo sin suelo. Otros autores, no encontraron diferencias significativas en la calidad de lechuga (Siomos *et al.*, 2001), melón (Guler *et al.*, 1995) y fresa (Paraskevopoulou-Paroussi y Paroussis, 1995; Fernández *et al.*, 2006) cultivados en sistemas sin suelo y en suelo. Nuestros resultados muestran que el efecto del cultivo en suelo frente al cultivo sin suelo, sobre la concentración de compuestos antioxidantes en pimiento verde, dependió en gran medida del cultivar estudiado. En Almudén, el sistema de cultivo sólo afectó a la concentración de fructosa, que fue mayor en pimientos cultivados SS, mientras que en Quito, tanto la concentración de los compuestos hidrofílicos como la de los lipofílicos se vieron afectados significativamente, siendo los resultados, en la mayoría de los casos, más favorables para el cultivo en suelo (excepto glucosa y fructosa). Los resultados observados en Almudén concuerdan con los obtenidos en estudios previos en tomate, donde la mayor variación en los parámetros de calidad se debieron a diferencias en el tiempo de cosecha, mientras que el tipo de cultivo (suelo o sin suelo) tuvo poco o ningún efecto (Thybo *et al.*, 2005). Además, nuestros resultados mostraron que algunos cultivares como Quito pueden verse más afectados por el sistema de cultivo, lo que sugiere que la elección de cultivar tiene una gran influencia en el resultado de los estudios comparativos.

Independientemente del sistema de cultivo y de la variedad estudiada, el momento del muestreo no afectó ni a la composición mineral ni a la mayoría de los parámetros físicos del fruto. Por el contrario se observó un efecto significativo del muestreo sobre la mayoría de los compuestos antioxidantes analizados observándose, al igual que en el estudio comparativo entre cultivo ecológico y convencional, una disminución general con el avance de la temporada.

4.3. CONCLUSIONES

En el estudio comparativo entre los sistemas de producción ecológico y convencional, sólo se observaron diferencias en la calidad organoléptica y nutricional de pimiento, en el ensayo realizado bajo invernadero experimental. El manejo de la nutrición mineral específico de cada sistema de cultivo en dicha aproximación experimental, dio

lugar a un menor contenido de N y P en los pimientos ecológicos respecto a los cultivados en sistema convencional. En este ensayo, también se observaron diferencias en la composición de la fracción lipofílica del fruto, incluyendo clorofilas, carotenoides y actividad antioxidante, estos valores fueron superiores en pimiento ecológico, lo que puede atribuirse a las diferencias observadas en el estado nutricional de las plantas. Por el contrario, en la aproximación comercial, no se observaron diferencias en la composición mineral ni en la de la concentración de compuestos lipofílicos, debido a que, aunque en el cultivo ecológico el suministro de N puede ser limitado, en el mercado existe una gran variedad de fertilizantes de origen orgánico, aplicables en cultivos ecológicos, que pueden satisfacer de manera eficiente los requisitos de la planta respecto a la nutrición mineral.

Respecto a la fracción hidrofílica, no se observaron diferencias en la concentración de compuestos fenólicos, vitamina C y actividad antioxidante entre frutos ecológicos y convencionales en ninguna de las aproximaciones. Las discrepancias con respecto a otros estudios en los que si se encuentran diferencias entre los dos sistemas de producción, pueden deberse a otros factores diferentes al manejo de la nutrición mineral, en particular a una mayor exposición a diferentes estreses bióticos, que no tuvieron repercusión en los ensayos llevados a cabo en nuestro estudio.

El efecto del cultivo en suelo frente al cultivo sin suelo sobre los parámetros de calidad de pimiento sólo se observó, a excepción del ácido cítrico, en el estudio realizado bajo condiciones experimentales. Además, el efecto del sistema de cultivo dependió en gran medida del cultivar estudiado. En Almudén, el sistema de cultivo sólo afectó a la concentración de fructosa, que fue mayor en pimientos cultivados sin suelo, mientras que en Quito los parámetros afectados fueron sacarosa, ácido cítrico, clorofilas y carotenoides, cuyas concentraciones fueron superiores en pimiento cultivado en suelo, y firmeza, glucosa y fructosa, cuyos valores fueron superiores en pimiento cultivado sin suelo.

Por último, se observó una gran influencia del período en el que se realizó el muestreo a lo largo del ciclo de cultivo sobre la calidad organoléptica y nutricional del fruto, siendo el efecto del muestreo, en muchos de los casos, más determinante que el efecto del sistema de cultivo. Además, se observó, en muchos de los parámetros estudiados, una interacción entre el efecto del sistema de cultivo y el muestreo.

CAPÍTULO 5

VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE LECHUGA

CAPÍTULO 5. VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE LECHUGA

La lechuga (*Lactuca sativa* L.), una de las hortalizas de hoja más consumida en todo el mundo, es una excelente fuente de vitaminas y compuestos bioactivos, entre ellos folatos, carotenoides, clorofilas, vitamina C y compuestos fenólicos (Nicolle, 2004). En general, el contenido de compuestos bioactivos en los vegetales depende ampliamente de factores genéticos, además de factores medioambientales y agrícolas (DuPont *et al.*, 2000; Kimura, y Rodríguez-Amaya, 2003; Romani *et al.*, 2002). En el caso concreto de lechuga, existe una amplia variabilidad en la composición y cuantificación de compuestos bioactivos entre diferentes genotipos. Estas diferencias indican la importancia de la selección de ciertos tipos o cultivares, con el fin de conseguir un producto con mayor valor nutricional y contenido en antioxidantes, o por su adecuación para un determinado uso. Por ejemplo, un mayor contenido en compuestos fenólicos está correlacionado con un aumento de la vida útil de lechuga y de su tolerancia al estrés (Meir *et al.*, 1995; Hodges y Forney, 2003). Sin embargo, la acumulación de compuestos fenólicos en el tejido puede favorecer la pérdida de calidad de lechuga procesada para cuarta gama, actuando como sustrato para enzimas responsables de su oxidación (pardeamiento enzimático). En este capítulo se presenta un estudio para conocer el contenido en vitaminas, nutrientes y antioxidantes de diferentes cultivares de lechuga pertenecientes a los tipos Romana, Mini Romana y Little Gem, ampliamente utilizados para su comercialización en fresco y cuarta gama. En particular, se ha estudiado el contenido en azúcares solubles, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos totales, vitamina C, folatos, clorofilas y carotenos. Además de su contenido en estos compuestos potencialmente beneficiosos para la salud, los vegetales de hoja verde constituyen la principal fuente de ingesta dietética de nitrato, cuyo consumo se asocia a diversos efectos negativos sobre el

organismo. Una vez ingerido, el nitrato puede reducirse a nitrito y combinarse con aminas secundarias, aumentando el riesgo de cáncer gastrointestinal (Hord *et al.*, 2009). El contenido en nitrato en hoja también puede depender, entre otros factores, del genotipo y ha sido objeto de estudio en este trabajo.

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.1. Material vegetal

El ensayo se realizó en un invernadero experimental del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) situado en La Alberca (Murcia). Se seleccionaron dieciséis cultivares de lechuga (*Lactuca sativa* L.) pertenecientes a los tipos Romana (Carrascoy, Espuña, Aitana, Collado, Alhama, Isasa, AR-29213), Mini Romana (Marta y AR-29232) y Little Gem (Ricote, Petra, Etna, Urbión, Sandra, Maite, Ferro). Los tres tipos de lechuga estudiados, Romana, Mini Romana y Little Gem, difieren en la estructura de la cabeza y en el tamaño. La lechuga Romana presenta hojas largas de 20 a 26 cm de largo, márgenes enteros, nervio central muy amplio y una cabeza abierta. Mini Romana es similar al tipo Romana, pero de calibre más pequeño y aproximadamente de 18 a 20 cm de largo, mientras que Little Gem forma una cabeza compacta y cerrada, de 10 a 15 cm de largo y de 8 a 10 cm de diámetro. Las características de los cultivares estudiados dentro de cada tipo se presentan en la Tabla 5.1. Las semillas se germinaron sobre un papel de filtro húmedo en una cámara oscura a 25 °C durante tres días y después se transfirieron a macetas de 5 L con turba. Las plantas se regaron con una solución nutritiva con la siguiente concentración: 6 N, 7 K, 4 Ca, 1 Mg, 1 P, 1 S (mM) y 2,24 Fe, 0,11 Mn, 0,27 B, 0,13 Zn, 0,032 Cu y 0,05 Mo (μM). Sesenta días después del trasplante, las plantas se recolectaron, se pesaron en fresco y se midió el color en hojas externas e internas. Posteriormente las cabezas de lechuga se lavaron con agua desionizada y se dividieron en dos partes iguales. Una parte se homogeneizó con N₂ líquido y se congeló a -80 °C para la determinación de los metabolitos de interés y la actividad

antioxidante. La otra parte, se secó en un horno a 60 °C y se molió para determinar el contenido en nitrato.

Tabla 5.1. Características de los diferentes cultivares de lechuga.

	TIPO ROMANA
Carrascoy	De gran tamaño con follaje de color verde medio oscuro y abullonado grande.
España	Hojas lisas, de textura blanda y color verde medio-claro.
Aitana	Forma cogollo de hojas lisas, totalmente solapadas, de color verde medio-claro.
Collado	Cogollo bien cerrado y compacto, de gran tamaño. Hojas de abullonado medio, de color verde oscuro.
Alhama	Planta más alta que Carrascoy pero más estrecha de base. Las hojas exteriores son muy erectas y abrazan muy bien al cogollo, formando una roseta alrededor.
Isasa	Forma un cogollo bien solapado y compacto, de color verde amarillento muy apropiado para comercializar como cogollo pelado en bolsa.
AR-29213	Hojas poco abullonadas, de color verde medio-oscuro y muy tiernas. Forma un buen cogollo.
	TIPO LITTLE GEM
Ricote	Follaje de color verde amarillento y abullonado. Forma una roseta abundante. Buen aguante al espigado. Especial para corazones.
Petra	Cogollos compactos, de hojas abullonadas, de color verde medio intenso y cierre uniforme.
Etna	Cogollos anchos y compactos bien solapados y hojas exteriores que forman una roseta. Color verde medio a oscuro y hojas abullonadas.
Urbión	Cogollos compactos, con hojas que solapan y cubren bien el cogollo. Color verde medio-claro, intenso y brillante.
Sandra	Cogollo pequeño y de color amarillo y hojas exteriores de color verde intenso brillante.
Maite	Color verde oscuro
Ferro	Color verde oscuro y hojas abullonadas
	TIPO MINI ROMANA
Marta	Cogollo compacto con cierre en forma de pez. Hojas de color verde oscuro.
AR-29232	Hojas de color verde oscuro con abullonado intenso.

5.1.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 18.0. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para estudiar el efecto del tipo de lechuga sobre los metabolitos de interés. Los valores medios se compararon con el test de rango múltiple de Duncan, para detectar correlaciones bivariadas significativas se realizó la prueba de Pearson y para clasificar los diferentes tipos de lechuga con respecto a los parámetros medidos se utilizó el análisis discriminante canónico (ADC).

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El color es uno de los atributos que más afectan a la percepción del consumidor de la calidad. Como tal, juega un papel clave en la preferencia y aceptación de los alimentos e incluso puede influir en los umbrales del gusto y en la percepción del dulzor (Clydesdale, 1993). Al comparar el color de las hojas externas, se observó que la lechuga Mini Romana tenía un color más verde (mayor hue) pero menos intenso (menor croma) que los tipos Romana y Little Gem (Figura 5.1A). Sin embargo, se observaron algunas excepciones; los cultivares Aitana y Alhama (tipo Romana) mostraron igual hue, pero mayor croma que el tipo Mini Romana. En cuanto al color de las hojas internas, la lechuga Romana presentó un color más verde (mayor hue) que Mini Romana y Little Gem, pero no se observaron diferencias en la intensidad de color (croma) entre los tres tipos de lechuga (Figura 5.1B).

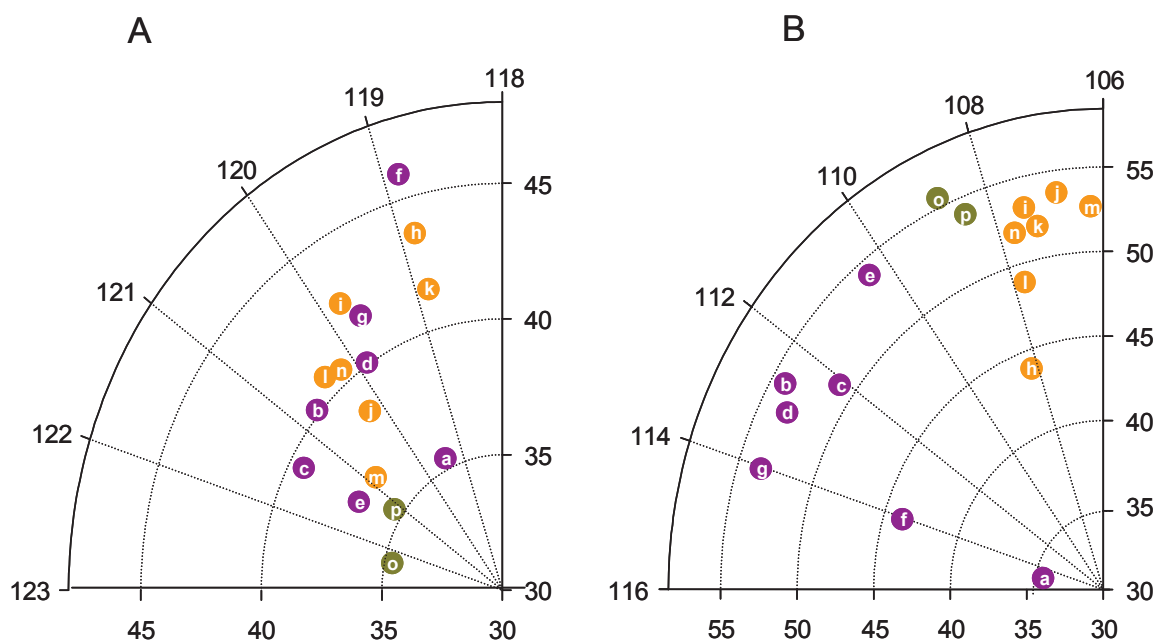


Figura 5.1. Representación de valores cromas-hue en hojas externas (A) e internas (B) de lechuga Romana (●), Little Gem (●) y Mini Romana (●). Los cultivares son Carrascoy (a), España (b), Aitana (c), Collado (d), Alhama (e), Isasa (f), AR-29213 (g), Ricote (h), Petra (i), Etna (j), Urbión (k), Sandra (l), Maite (m), Ferro (n), Marta (o) y AR-29232 (p).

Los azúcares solubles y los ácidos orgánicos contribuyen en gran medida a las características de sabor y al valor nutricional de los vegetales (Luning *et al.*, 1994). Además, los azúcares promueven la estabilidad del ácido ascórbico, mejorando así el contenido de vitamina C (Birch y Pepper, 1983). Los azúcares solubles detectados en lechuga fueron glucosa y fructosa, en concentraciones similares, y sacarosa en una concentración de 2 a 5 veces menor que la de glucosa (Tabla 5.2). El contenido en azúcares totales se calculó como suma de las concentraciones de los azúcares individuales (Figura 5.2). En general, la lechuga Romana mostró la mayor concentración de azúcares solubles mientras que Little Gem mostró la concentración más baja, excepto para sacarosa, cuyos valores fueron similares a los de Mini Romana. Además, se observaron algunas excepciones en algunos cultivares de Romana y Little Gem cuyo contenido de glucosa y fructosa fueron similares a los de Mini Romana.

Tabla 5.2. Concentración de azúcares solubles ($mg\ g^{-1}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.

TIPO	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
Romana			
Carrascoy	1,9±0,2	3,6±0,2	4,5±0,2
España	2,0±0,2	4,7±0,1	6,1±0,2
Aitana	2,4±0,2	4,7±0,3	6,2±0,6
Collado	1,9±0,1	4,0±0,4	5,1±0,5
Alhama	2,6±0,2	5,3±0,4	6,5±0,3
Isasa	1,9±0,3	4,6±0,5	5,3±0,4
AR-29213	2,3±0,1	5,1±0,4	6,1±0,4
Media	2,2b	4,6c	5,7c
Little Gem			
Ricote	1,7±0,3	2,7±0,6	3,8±0,6
Petra	1,7±0,2	3,5±0,2	4,6±0,3
Etna	1,1±0,2	2,9±0,3	3,4±0,4
Urbión	1,2±0,1	2,8±0,2	3,4±0,2
Sandra	1,2±0,1	3,2±0,2	3,9±0,1
Maite	1,3±0,1	3,4±0,4	4,1±0,4
Ferro	1,1±0,1	3,1±0,3	3,9±0,3
Media	1,3a	3,1a	3,9a
Mini Romana			
Marta	1,9±0,1	3,7±0,2	4,7±0,2
AR-29232	1,3±0,3	4,2±0,7	5,0±0,8
Media	1,6a	3,9b	4,8b
	***	***	***

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0.1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media \pm error estándar ($n=4$).

El análisis de ácidos orgánicos en muestras de lechuga reveló la presencia de ácidos málico, cítrico, fumárico, glutámico, tartárico, quínico, α -cetoglutárico, succínico, siquímico y malónico (Tabla 5.3). Los ácidos orgánicos también desempeñan un papel importante en la percepción del sabor mediante la modificación del sabor de los azúcares. El ácido cítrico enmascara la percepción de la sacarosa (Schifferstein y Fritjers, 1990; Bonnans y Noble,

1993) y fructosa (Pangborn, 1963), mientras que el ácido málico parece mejorar la percepción de la sacarosa (Fabian y Blum, 1943). En todos los cultivares de lechuga, la concentración de ácido málico fue sustancialmente mayor que la concentración del resto de ácidos orgánicos. La mayor concentración de ácido málico y en consecuencia de ácidos orgánicos totales (Figura 5.2) se observó en Mini Romana, mientras que no se observaron diferencias significativas entre Romana y Little Gem. Sin embargo, se observó una amplia variabilidad en la concentración de ácido málico, especialmente en lechuga Romana donde los cultivares, Alhama y AR-29213, mostraron valores similares a los de lechuga Mini Romana. En cuanto a los otros ácidos orgánicos, Mini Romana presentó las mayores concentraciones de ácido fumárico, glutámico y α -cetoglutámico, mientras que la concentración de ácido tartárico, succínico y siquímico fue similar a la observada en Romana y la de cítrico a la observada en Little Gem. Por último, la concentración de ácido malónico fue similar para los tres tipos de lechuga.

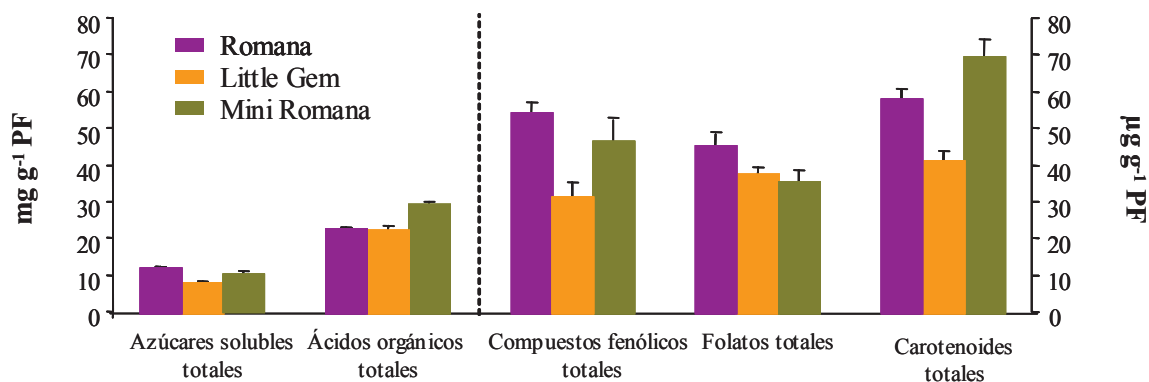


Figura 5.2. Concentración de azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, folatos y carotenoides totales, en lechuga Romana (●), Little Gem (●) y Mini Romana (●).

El papel de los compuestos fenólicos en la dieta está asociado a la disminución de riesgo de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Wei *et al.*, 1990; Hertog *et al.*, 1993). Además de los efectos beneficiosos de estos compuestos en la salud humana, se cree que

aumentan la tolerancia al estrés de las plantas y prolongan la vida útil postcosecha de frutas y hortalizas (Meir *et al.*, 1995; Hodges y Forney, 2003). Dichas propiedades se basan en su capacidad para eliminar las especies reactivas de oxígeno que se sabe que están implicadas en la senescencia de las hojas y en el sistema de defensa antioxidante de la planta. Los compuestos fenólicos se pueden encontrar libres y conjugados con azúcares, ácidos y otros compuestos fenólicos (Robbins, 2003). En este estudio se determinó, mediante extracción y digestión básica, el perfil de compuestos fenólicos libres y totales, respectivamente. Los compuestos fenólicos libres detectados en el extracto metanólico fueron el ácido clorogénico, rutina, kaempferol, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, floridzina, ácido protocatéquico, luteolina y apigenina, siendo el ácido clorogénico el principal compuesto fenólico detectado en forma libre (Tabla 5.4). En general, la lechuga Romana mostró la mayor concentración de ácidos clorogénico y cafeico, aunque se observó una gran variabilidad entre cultivares y algunos como Collado y Carrascoy mostraron concentraciones más bajas que Little Gem. Romana y Mini Romana mostraron un mayor contenido de ácido *p*-cumárico, floridzina y luteolina que Little Gem. Por el contrario no se observaron diferencias significativas en la concentración de rutina, kaempferol, ácido protocatéquico y apigenina entre los tres tipos de lechuga. Los compuestos fenólicos ligados se cuantificaron como la diferencia entre compuestos fenólicos totales, determinados en la fracción hidrolizada y los libres, determinados en el extracto metanólico. Los principales fueron los derivados del ácido cafeico y del ácido *p*-cumárico (Tabla 5.4), que representaron entre el 43 y el 92% del contenido fenólico total, dependiendo del cultivar estudiado. La concentración de los compuestos derivados del ácido cafeico fue entre 15 y 34 veces superior a la de los derivados del ácido *p*-cumárico. La mayor concentración de compuestos fenólicos ligados y totales (calculados como suma de los compuestos fenólicos libres y ligados) se observó en Romana y Mini Romana (Figura 5.2). De acuerdo con estos resultados, Romana y Mini Romana podrían presentar ventajas para su comercialización en fresco (cabeza entera) debido a que en lechuga, un mayor contenido en compuestos fenólicos ha sido correlacionado con un aumento de la vida útil del producto (Martínez-Sánchez *et al.*, 2012). Por el contrario, estos tipos de lechuga podrían presentar desventajas con respecto a Little Gem cuando se comercializan en cuarta gama, ya que los compuestos fenólicos actúan como sustrato del enzima polifenoloxidasas, responsable del pardeamiento enzimático que se produce en las zonas de corte.

Tabla 5.3. Concentración de ácidos málico, cítrico, fumárico, glutámico y tartárico ($mg\ g^{-1}$), quínico, cetoglutárico, succínico, siquímico y malónico ($\mu g\ g^{-1}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.

TIPO	Málico	Cítrico	Fumárico	Glutámico	Tartárico	Quínico	Cetoglutárico	Succínico	Siquímico	Malónico
Romana										
Carrascoy	15,9±1,4	0,8±0,5	0,95±0,08	0,32±0,02	0,15±0,03	59,0±11,6	46,0±5,9	36,0±4,4	13,8±0,4	10,2±1,0
España	14,4±0,7	0,6±0,1	0,89±0,04	0,34±0,01	0,09±0,01	77,4±7,4	36,9±5,1	20,9±2,2	14,8±0,7	10,8±0,3
Aitana	17,0±0,3	0,9±0,1	0,92±0,03	0,38±0,03	0,12±0,01	89,0±1,8	38,1±2,5	24,9±1,6	16,9±0,6	11,4±0,5
Collado	21,4±2,0	2,1±0,3	1,13±0,12	0,57±0,06	0,21±0,02	53,2±4,3	56,4±7,0	28,6±3,8	16,2±1,1	12,3±0,9
Alhama	23,1±0,8	1,6±0,1	1,25±0,04	0,52±0,05	0,19±0,01	70,4±4,1	68,6±3,4	49,7±2,0	18,1±1,5	10,6±0,3
Isasa	21,9±1,8	1,1±0,4	1,11±0,10	0,51±0,04	0,18±0,02	79,3±19,6	43,2±7,8	24,7±5,3	19,5±1,0	12,2±0,4
AR-29213	25,3±0,8	1,7±0,2	1,24±0,08	0,70±0,04	0,21±0,02	77,8±5,5	61,9±6,0	36,5±3,4	16,7±1,0	13,0±0,4
Media	19,8a	1,3a	1,07b	0,48a	0,16b	73,0b	49,9b	31,7b	16,6b	11,5
Little Gem										
Ricote	17,0±0,9	1,9±0,3	0,77±0,12	0,52±0,10	0,09±0,01	48,7±5,4	31,5±3,7	28,0±2,3	12,5±0,6	11,9±0,9
Petra	18,8±1,2	1,5±0,2	0,89±0,05	0,56±0,05	0,12±0,01	50,0±6,8	34,0±2,0	21,1±0,9	14,5±0,7	11,2±0,4
Etna	17,5±1,5	1,2±0,2	0,90±0,08	0,58±0,02	0,10±0,01	51,2±4,5	38,0±3,8	19,0±2,6	12,5±0,7	11,3±0,9
Urbión	20,4±0,8	1,9±0,2	0,88±0,03	0,62±0,04	0,11±0,01	51,6±7,0	35,5±2,0	21,2±2,6	13,9±0,4	11,5±0,1
Sandra	18,9±0,6	1,6±0,1	0,93±0,02	0,66±0,05	0,12±0,01	57,0±2,9	41,2±2,9	21,8±0,5	14,3±0,5	10,9±0,4
Maite	20,4±1,2	2,4±0,3	0,97±0,05	0,65±0,10	0,11±0,01	61,4±5,6	40,1±1,6	22,1±1,3	13,7±0,5	11,6±0,8
Ferro	21,3±0,9	1,8±0,3	0,97±0,07	0,60±0,04	0,10±0,01	57,8±8,6	35,2±2,6	20,7±1,6	14,7±0,4	10,9±0,5
Media	19,2a	1,7b	0,90a	0,60b	0,12a	53,9a	36,5a	22,0a	13,7a	11,3
Mini Romana										
Marta	24,5±0,9	1,6±0,1	1,23±0,04	0,71±0,03	0,15±0,01	72,5±4,1	62,5±2,1	34,7±2,9	14,5±0,6	11,7±0,3
AR-29232	26,0±1,8	2,1±0,3	1,34±0,10	0,68±0,05	0,18±0,02	61,2±7,5	74,6±6,4	39,5±1,7	16,6±1,4	13,0±0,8
Media	25,3b	1,9	1,29c	0,70c	0,17b	66,9b	68,6c	37,1b	15,6b	12,3
	***	**	***	***	***	***	***	***	***	n.s.

*** y **, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0.1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4).

Tabla 5.4. Concentración ácido clorogénico (clorog), rutina y kaempferol ($\mu\text{g g}^{-1}$), ácido *p*-coumárico (*p*-Cou) ácido cafeico, floridzina, ácido protocatéuico (Protocat), luteolina, apigenina ($\mu\text{g kg}^{-1}$), derivados del ácido cafeico (Dv. Caf) y derivados del ácido *p*-coumárico (Dv. *p*-Cou) ($\mu\text{g g}^{-1}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.

TIPO	Clorog	Rutina	Kaempferol	<i>p</i> -Cou	Cafeico	Floridzina	Protocat	Luteolina	Apigenina	Dv. Caf	Dv. <i>p</i> -Cou
Romana											
Carrascoy	4,0±1,2	0,1±0,1	0,20±0,02	80,9±1,3	36,8±4,6	47,0±0,5	18,5±1,2	13,6±2,1	0,8±0,1	39,3±4,4	2,4±0,6
España	72,9±7,3	0,3±0,2	0,25±0,01	82,2±0,6	76,5±18,5	48,8±0,4	25,5±2,6	16,9±1,9	0,8±0,1	48,9±1,1	2,9±0,2
Aitana	50,2±3,1	0,3±0,1	0,23±0,02	81,0±1,3	60,8±15,5	48,0±0,6	25,8±1,5	16,5±1,2	1,0±0,2	76,3±6,1	2,2±0,5
Collado	7,9±1,9	0,3±0,2	0,20±0,03	80,4±0,4	45,4±6,5	47,4±0,2	22,3±2,6	10,8±1,1	0,6±0,1	46,5±2,8	1,6±0,6
Alhama	25,3±4,2	0,3±0,1	0,25±0,01	82,5±0,7	58,0±8,5	48,7±0,4	26,1±2,3	19,1±3,8	0,8±0,1	46,7±5,1	2,1±0,5
Isasa	17,4±4,8	0,1±0,1	0,23±0,02	81,3±0,6	91,4±20,1	47,4±0,4	26,8±1,9	11,9±0,9	0,8±0,1	60,1±10,4	4,1±2,8
AR-29213	56,8±9,0	0,1±0,1	0,24±0,01	81,0±0,9	55,6±11,5	47,9±0,8	24,7±1,2	13,6±1,1	0,6±0,1	44,4±6,8	2,8±0,7
Media	34,1b	0,2	0,23	81,3b	60,7b	47,9b	22,4	14,6b	0,8	51,8b	2,5b
Little Gem											
Ricote	14,0±5,1	0,1±0,1	0,24±0,02	78,6±0,3	32,2±2,8	46,6±0,2	19,9±1,2	11,7±0,7	0,6±0,2	31,3±5,8	1,1±0,2
Petra	5,6±0,9	0,4±0,3	0,24±0,01	79,1±0,9	34,3±3,9	46,4±0,2	23,0±1,7	11,1±0,6	0,7±0,1	19,8±3,8	1,1±0,2
Etna	14,3±3,9	0,5±0,2	0,26±0,03	78,2±1,5	46,3±6,8	46,2±0,6	21,9±1,8	11,6±0,9	0,7±0,1	23,8±7,1	0,9±0,1
Urbión	3,6±0,9	0,1±0,1	0,25±0,02	79,4±0,5	34,9±4,8	47,1±0,3	21,5±1,0	12,3±1,1	0,6±0,1	24,5±4,3	1,2±0,2
Sandra	8,0±0,8	0,8±0,1	0,30±0,04	78,1±0,6	36,9±1,1	46,9±0,2	24,2±2,6	13,3±1,1	0,6±0,1	44,0±12,1	1,5±0,5
Maite	13,5±2,6	0,1±0,1	0,25±0,01	79,1±1,1	44,1±5,5	46,6±0,4	23,1±1,8	11,5±0,5	0,7±0,1	30,6±5,9	1,6±0,3
Ferro	14,6±7,2	0,2±0,1	0,26±0,02	77,7±1,1	44,1±8,4	46,0±0,4	19,4±1,5	12,3±0,8	0,5±0,1	33,6±4,3	1,3±0,1
Media	11,0a	0,3	0,26	78,6a	39,0a	46,5a	21,9	12,0a	0,6	29,9a	1,2a
Mini Romana											
Marta	19,6±5,3	0,1±0,1	0,22±0,02	80,8±0,7	50,8±5,5	47,4±0,2	22,5±2,2	13,5±1,8	0,5±0,1	53,5±7,2	2,0±0,5
AR-29232	8,5±1,8	0,3±0,3	0,25±0,01	81,4±1,0	38,9±4,1	48,1±0,5	26,1±0,8	12,8±0,5	0,8±0,1	35,4±4,8	1,9±0,2
Media	14,0a	0,2	0,24	81,1b	44,9a	47,8b	24,3	13,2ab	0,6	44,4b	2,0b
	***	n.s.	n.s.	***	***	***	n.s.	**	n.s.	***	***

*, **, y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0.1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4).

La concentración de vitamina C, medida como la suma de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico, se utiliza como un parámetro de calidad de los vegetales. La principal forma activa de la vitamina C es ácido ascórbico (AA), aunque su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (ADHA), también presenta actividad biológica, ya que se convierte fácilmente en ácido ascórbico en el cuerpo humano, de ahí el interés en el análisis simultáneo de AA y ADHA (Lee y Kader, 2000). La lechuga es una fuente relativamente pobre de vitamina C (90-120 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) en comparación con otros vegetales como brócoli ($\sim 750 \mu\text{g g}^{-1}$ PF), coliflor ($\sim 500 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) o pimiento ($\sim 350 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) (Bahorun *et al.*, 2004). En este estudio, la vitamina C (AA más ADHA) mostró una concentración media de $\sim 78 \mu\text{g g}^{-1}$ PF dentro del rango observado anteriormente para la lechuga (Nicolle *et al.*, 2004). En general, la lechuga Romana presentó una mayor concentración de vitamina C seguida de Little Gem y Mini Romana, aunque se observó una amplia variabilidad entre cultivares (Tabla 5.5).

La ingesta de folatos está relacionada con la disminución de riesgo de anemia megaloblástica, defectos del tubo neural, ciertas formas de cáncer y disfunciones neurocognitivas (Giovannucci *et al.*, 1993; Fabre *et al.*, 2000; Seshadri, 2002; Bjorklund y Gordon, 2006). Los folatos naturales en los alimentos se encuentran principalmente en forma de poliglutamatos (80%) y el resto como monoglutamatos (Vahteristo, 1996). Las formas poliglutámicas no son asimilables por el organismo humano y necesitan ser hidrolizadas hasta monoglutamatos para ser absorbidos a nivel intestinal (Chandler *et al.*, 1986). La necesidad de este paso previo ha sido considerado generalmente como una limitación de la biodisponibilidad de las formas poliglutámicas (Gregory, 1995; Melse-Boonstra, *et al.*, 2002). Por ello, conocer el contenido de las formas poliglutámicas presentes en los alimentos podría proporcionar información relevante sobre la idoneidad de un alimento como fuente de folatos biodisponibles. Entre los vegetales ricos en folatos destacan: espinaca ($\sim 1,7 \mu\text{g g}^{-1}$ PF), acelga ($\sim 1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) y escarola ($\sim 1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ PF), mientras que lechuga ($\sim 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) puede considerarse una fuente moderada de folatos (Konings *et al.*, 2001). Respecto a las formas monoglutámicas, en los cultivares de lechuga estudiados sólo se detectó 5-metil tetrahydrofolato (5-MTHF) (Tabla 5.5). En general, Little Gem mostró la mayor concentración de 5-MTHF, mientras que Romana y Mini Romana mostraron valores similares de este compuesto. La adición de conjugasa, para determinar formas poliglutámicas, reveló la

presencia de 5-MTHF y tetrahidrofolato (THF), de acuerdo con los resultados descritos previamente en lechuga (Scott *et al.*, 2000). Estas formas poliglutámicas representaron del 25% al 65% del contenido total de folatos. Esta proporción está de acuerdo con los resultados previamente observados por Wang *et al.* (2010) para lechuga que, a diferencia de la mayoría de los vegetales en los que los folatos están presentes en forma de poliglutamatos, muestra una cantidad similar de formas mono- y poliglutámicas. En nuestro estudio comparativo, la lechuga Romana presentó la mayor concentración de 5-MTHF con algunas excepciones (cv. Isasa), mientras que el contenido de THF no se vio influenciado por el tipo de lechuga. El contenido total de folatos, calculado como la suma de las formas mono- y poliglutámicas, fue también mayor para lechuga tipo Romana que para los tipos de lechuga “baby-leaf” (Figura 5.2).

Los vegetales de hoja verde presentan un patrón de carotenoides relativamente constante: luteína (~45%), β -caroteno (25-30%), violaxantina (~15%) y neoxantina (~15%) (Britton, 1991). A diferencia de otros vegetales de hoja verde, la lechuga también contiene lactucaxantina y presenta una concentración de neoxantina menor que la de violaxantina y una concentración de β -caroteno mayor que la de luteína (Kimura y Rodríguez-Amaya, 2003). De acuerdo con este patrón de carotenoides, el principal compuesto encontrado en todos los cultivares de lechuga fue β -caroteno, que representó aproximadamente el 50% de los carotenoides totales, seguido de luteína (20%), lactucaxantina (13%), violaxantina (11%) y neoxantina (6%) (Tabla 5.6). Entre los carotenoides, β -caroteno es la provitamina A más potente, mientras que la luteína está implicada en la reducción del riesgo de cataratas, degeneración macular (Snodderly, 1995; Moeller *et al.*, 2000) y cáncer de colon (Slattery *et al.*, 2000). Aunque los posibles beneficios para la salud de neoxantina, violaxantina, lactucaxantina y otros carotenoides no se ha demostrado, se consideran de interés para la salud humana por presentar estructuras similares a las de los carotenoides anteriormente mencionados. Estudios previos han demostrado la influencia del cultivar en el contenido de carotenoides de lechuga (Mou, 2005). En el presente estudio, Mini Romana mostró la mayor concentración de carotenoides totales (Figura 5.2), mientras que Little Gem presentó la concentración más baja. De manera similar a lo observado en carotenoides, Mini Romana mostró la mayor concentración de clorofila (*a* y *b*) (Tabla 5.6). Al igual que en otros estudios

realizados sobre lechuga (Mou, 2005) y otros vegetales de hoja como col rizada (Kopsell *et al.*, 2004) y acelga (Ihl *et al.*, 2006), se observó una correlación significativa entre la clorofila y los carotenoides ($p < 0,001$).

Tabla 5.5. Concentración de vitamina C, monoglutamato, poliglutamato ($\mu\text{g g}^{-1}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.

TIPO	Vitamina C	Monoglutamato	Poliglutamato	
		5-MTHF	5-MTHF	THF
Romana				
Carrascoy	75,4±5,0	0,22±0,01	0,24±0,03	0,07±0,02
España	104,5±9,2	0,21±0,02	0,20±0,02	0,08±0,01
Aitana	100,5±5,6	0,21±0,02	0,33±0,06	0,07±0,02
Collado	90,5±14,0	0,15±0,01	0,11±0,02	0,07±0,02
Alhama	93,6±5,5	0,18±0,04	0,17±0,08	0,04±0,01
Isasa	69,8±11,9	0,19±0,02	0,05±0,01	0,03±0,03
AR-29213	109,2±4,2	0,20±0,02	0,21±0,05	0,08±0,03
Media	92,0b	0,20a	0,19b	0,06
Little Gem				
Ricote	59,9±0,4	0,26±0,03	0,10±0,06	0,04±0,02
Petra	63,9±1,8	0,27±0,02	0,10±0,02	0,03±0,01
Etna	131,9±13,0	0,16±0,03	0,04±0,01	0,01±0,00
Urbión	78,8±4,6	0,24±0,03	0,02±0,01	0,09±0,08
Sandra	81,2±5,1	0,28±0,05	0,05±0,02	0,08±0,03
Maite	60,8±4,4	0,24±0,03	0,22±0,07	0,05±0,02
Ferro	35,8±10,2	0,20±0,02	0,03±0,01	0,06±0,01
Media	73,2a	0,24b	0,08a	0,05
Mini Romana				
Marta	73,4±12,0	0,19±0,02	0,07±0,06	0,09±0,05
AR-29232	61,0±7,2	0,25±0,03	0,08±0,05	0,07±0,02
Media	67,2a	0,22a	0,07a	0,07
	**	*	**	n.s.

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0.1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media \pm error estándar ($n=4$).

Tabla 5.6. Concentración de β -caroteno, luteína, lactucaxantina (Lactuca), violaxantina (Viola), neoxantina (Neo), clorofila *a* (Clorof *a*) y clorofila *b* (Clorof *b*), expresada como $\mu\text{g g}^{-1}$, en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.

TIPO	β -caroteno	Luteína	Lactuca	Viola	Neo	Clorof <i>a</i>	Clorof <i>b</i>
Romana							
Carrascoy	26,4±3,0	11,7±0,9	6,8±0,3	5,9±0,3	3,4±0,3	100,9±9,0	39,6±3,4
España	24,6±5,0	10,0±2,1	5,9±1,1	5,5±1,0	3,2±0,6	82,1±16,2	32,5±6,8
Aitana	34,9±2,3	13,9±1,2	8,2±0,7	7,5±0,5	4,6±0,4	121,4±10,9	49,8±4,8
Collado	32,0±0,9	11,6±0,2	8,1±0,7	5,3±0,3	3,5±0,1	96,1±7,8	23,7±7,2
Alhama	33,9±2,8	13,4±1,0	8,6±0,8	6,2±0,4	4,1±0,3	105,5±12,4	37,9±4,6
Isasa	20,1±1,3	7,7±0,5	4,0±0,6	5,0±1,2	2,3±0,3	59,8±5,3	19,5±2,8
AR-29213	33,0±2,2	14,1±1,1	9,3±0,8	6,9±0,7	4,5±0,6	114,8±9,6	35,4±6,8
Media	29,3b	11,8b	7,3b	6,0b	3,7b	97,2b	34,0a
Little Gem							
Ricote	20,5±1,0	7,8±0,3	5,0±0,7	4,5±0,3	2,6±0,2	71,8±9,1	26,8±3,9
Petra	19,5±1,0	7,8±0,7	4,7±0,2	4,6±0,1	2,5±0,2	60,2±4,6	23,4±3,2
Etna	18,8±2,2	8,4±0,7	5,8±0,6	4,3±0,3	2,6±0,2	67,8±11,9	29,8±3,3
Urbión	20,6±0,5	8,4±0,4	5,3±0,5	4,8±0,3	2,7±0,1	76,5±5,5	25,5±1,9
Sandra	20,7±4,1	8,7±1,3	4,8±0,7	4,9±0,6	2,7±0,4	72,9±17,2	28,6±5,9
Maite	22,7±2,9	9,7±1,3	6,5±0,5	5,3±0,7	3,1±0,3	90,5±11,4	31,8±3,3
Ferro	20,3±3,4	7,8±1,1	4,6±0,6	4,2±0,5	2,5±0,4	69,0±9,7	23,4±3,2
Media	20,5a	8,4a	5,2a	4,7a	2,7a	72,7a	27,0a
Mini Romana							
Marta	41,8±5,9	14,9±2,0	11,1±0,7	7,5±0,6	5,0±0,7	122,3±13,9	47,3±6,5
AR-29232	33,3±1,4	12,7±0,4	8,4±0,3	6,2±0,3	3,9±0,1	112,0±9,5	51,9±4,3
Media	37,6c	13,8c	9,7c	6,8b	4,5c	117,2c	49,6b
	***	***	***	***	***	***	***

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0.1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a $p=5\%$. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media \pm error estándar ($n=4$).

Las diferencias observadas en la composición nutricional y el contenido de compuestos bioactivos entre los tipos de lechuga estudiados, podrían explicarse en parte por las diferencias en la estructura de la cabeza y el tamaño. Las lechugas con una estructura de cabeza abierta como Romana y Mini Romana tienen una mayor área fotosintética lo que contribuiría a aumentar la concentración de clorofilas y azúcares, así como la de otros metabolitos relacionados con la fotosíntesis (Mou, 2009; Ozgen y Sekerci, 2011). Por el contrario, en los

cultivares tipo Little Gem, con una cabeza más cerrada que Romana o Mini Romana, la penetración de la luz solar está más limitada, lo que conlleva a un menor contenido de metabolitos relacionados con la fotosíntesis. Según Mou (2005), la influencia de estructura de la cabeza sobre el contenido de carotenoides es especialmente relevante. El β -caroteno desempeña un papel en la fotosíntesis como pigmento accesorio que absorbe a longitudes de onda diferentes a la de las clorofilas, y transfiere la energía luminosa absorbida a las clorofilas (Mou, 2009). Además de su función como pigmentos captadores de luz, los carotenoides también protegen a las células contra las acciones de los radicales libres de oxígeno cuando la energía incidente de luz excede a la necesaria para la fotosíntesis; los carotenoides que componen el ciclo de las xantofilas disipan el exceso de energía, evitando así daños en el sistema fotosintético (Krause, 1988; Demmig-Adams y Adams, 1996). Además de las diferencias en la estructura de la cabeza entre Little Gem y los otros dos tipos de lechuga, los cultivares de lechuga Mini Romana presenta un menor tamaño que los de Romana y por lo tanto, mayor proporción de hojas verdes externas, lo que explicaría el mayor contenido de carotenoides observado en Mini Romana.

Para evaluar la potencial actividad antioxidante de los diferentes tipos y cultivares de lechuga se utilizaron como métodos complementarios ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] y FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica). Los resultados obtenidos por ambos métodos mostraron que la mayor actividad antioxidante correspondía a la fracción hidrofílica. Sin embargo, dichos métodos no detectaron las mismas diferencias entre los tipos de lechuga (Tabla 5.7), debido a que la fracción hidrofílica contiene compuestos antioxidantes que presentan diferente respuesta a cada método. La actividad antioxidante medida en la fracción hidrofílica mediante el ensayo ABTS (ABTS-H) fue mayor en Mini Romana, mientras que no se encontraron diferencias entre Romana y Little Gem. La mayor actividad antioxidante hidrofílica medida en el ensayo FRAP (FRAP-H) se observó en Mini Romana y Romana. Los compuestos hidrosolubles que contribuyen a la actividad antioxidante hidrofílica son compuestos fenólicos, vitamina C y ácidos orgánicos. Según Gil *et al.* (2000), los principales ácidos orgánicos presentes en lechuga, ácidos málico y cítrico, no muestran actividad antioxidante cuando se evalúan con el ensayo FRAP. Esto puede explicar que Mini Romana presente una mayor actividad antioxidante cuando se mide con el método

ABTS, debido a su alto contenido de ácidos orgánicos, mientras que Romana presente mayor actividad antioxidante con el método FRAP, debido a su mayor contenido de compuestos fenólicos. En lo que respecta a la fracción lipofílica, la actividad antioxidante medida por el ensayo ABTS (ABTS-L) fue mayor en Mini Romana y no se encontraron diferencias entre Romana y Gem Little. Cuando la actividad antioxidante de la fracción lipofílica se midió con el método FRAP (FRAP-L), Romana presentó los valores más altos seguida por Mini Romana y finalmente por Little Gem. Los valores de actividad antioxidante lipofílica medida por el ensayo FRAP fueron más bajos que los obtenidos en el ensayo con ABTS. Aunque tanto en el ensayo FRAP como en el ABTS los carotenoides cíclicos y sus derivados con el grupo carbonilo sustituido, muestran baja reactividad química debido a un impedimento estérico, el ensayo ABTS es capaz de reconocer, al menos en parte las propiedades antioxidantes de los carotenoides (Muller *et al.*, 2011; Pellegrini *et al.*, 2009).

Los nitratos en la dieta son potencialmente adversos para la salud, debido a su potencial transformación en nitritos, que pueden interactuar con la hemoglobina, afectando el transporte de oxígeno en sangre (Santamaría, 2006). Además, el nitrato puede reducirse a nitrito y combinarse con aminas secundarias dando lugar a nitrosaminas que aumentan el riesgo de cáncer gastrointestinal (Hord *et al.*, 2009). Los vegetales, especialmente los vegetales de hoja, representan las principales fuentes de ingesta dietética de nitrato. A pesar de la gran variabilidad observada entre cultivares del mismo tipo, especialmente entre las del tipo Romana, en Little Gem se encontró un contenido de nitrato 3 y 6 veces mayor al observado en lechuga Mini Romana y Romana, respectivamente (Tabla 5.5). Según Burns *et al.* (2004), la acumulación de nitrato en vegetales de hoja aumenta al disminuir la radiación solar, o cuando partes de la cabeza de lechuga quedan a la sombra debido a que la densidad foliar aumenta. Por lo tanto, una limitación en la disponibilidad de luz en lechugas de cabeza cerrada como Little Gem disminuiría la asimilación de nitrato, dando lugar a un mayor contenido de nitrato.

Tabla 5.7. Actividad antioxidante determinada por los métodos por ABTS y FRAP en la fracción hidrofílica (ABTS-H y FRAP-H) y en la fracción lipofílica (ABTS-L y FRAP-L), expresada como $\mu\text{moles equivalentes de trolox } 100 \text{ g}^{-1}$ y concentración de nitrato ($\text{mmol kg}^{-1} \text{ PS}$) en variedades de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem.

TIPO	ABTS-H	ABTS-L	FRAP-H	FRAP-L	Nitrato
Romana					
Carrascoy	31,8±2,1	19,5±2,9	46,1±5,9	5,2±0,5	185,6±69,0
España	53,4±4,5	21,0±3,9	63,9±5,1	6,8±0,5	19,7±4,3
Aitana	60,9±7,4	34,0±5,0	71,2±8,5	6,7±1,1	19,0±4,3
Collado	37,7±4,4	20,5±5,1	49,7±6,4	6,0±0,9	115,8±35,1
Alhama	42,7±2,9	29,3±1,2	56,4±4,0	7,6±0,6	30,1±5,2
Isasa	38,8±4,3	20,6±2,4	52,2±5,0	2,6±0,4	221,4±49,9
AR-29213	49,5±6,4	28,5±3,7	55,0±5,9	5,0±0,5	161,2±39,3
Media	44,9a	24,8a	56,3b	5,7c	100,5a
Little Gem					
Ricote	31,8±2,1	19,5±2,4	40,5±1,9	2,5±0,6	733,3±71,8
Petra	53,4±4,5	18,8±2,3	32,2±2,2	2,2±0,5	783,3±58,9
Etna	60,9±7,4	16,7±4,7	34,3±3,4	2,8±0,7	714,1±264,8
Urbión	37,7±4,4	19,0±1,7	34,3±2,8	2,4±0,6	395,9±62,2
Sandra	42,7±2,9	21,5±3,7	30,6±2,1	2,7±0,8	755,8±189,3
Maite	38,8±4,3	26,6±0,9	34,9±3,0	4,4±0,2	571,6±185,2
Ferro	49,5±6,4	20,5±1,3	36,2±4,4	2,1±0,3	402,3±77,4
Media	46,9a	20,4a	34,7a	2,7a	626,6b
Mini Romana					
Marta	58,1±2,1	33,5±3,0	52,3±2,3	5,6±0,7	152,2±24,6
AR-29232	57,0±5,5	31,7±2,5	48,5±4,9	3,4±0,7	297,8±72,0
Media	57,8b	32,6b	50,4b	4,5b	214,6a
	*	***	***	***	***

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0.1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4).

Con el fin de identificar diferencias (si existieran) entre los tres tipos de lechuga estudiados, respecto a su composición nutritiva y antioxidante, se realizó un análisis discriminante de los parámetros estudiados. Dicho análisis se realizó por etapas, para reducir un efecto de sobreajuste y se aplicó un procedimiento de validación cruzada, para determinar

la fiabilidad del modelo estadístico. El conjunto de datos constaba de 64 muestras (28 Romana, 28 Little Gem y 8 Mini Romana). Al introducir todos los parámetros estudiados, resultaron dos funciones canónicas discriminantes, siendo las variables predictoras seleccionadas para la primera función, fructosa (con un coeficiente de función canónica de 0,265), ácido cítrico (-0,110), vitamina C (0,105), FRAP-H (0,293), nitrato (-0,348) y hue en hojas internas (0,380) y para la segunda función, α -cetoglutámico (-0,488), β -caroteno (-0,464), ABTS-H (-0,210) y luminosidad en hojas externas (0,382). La primera función explicó el 82,3% de la clasificación y el modelo permitió que el 100% de los casos agrupados por validación cruzada pudieran ser clasificados correctamente de acuerdo con la distribución discriminante representada en la Figura 5.3.

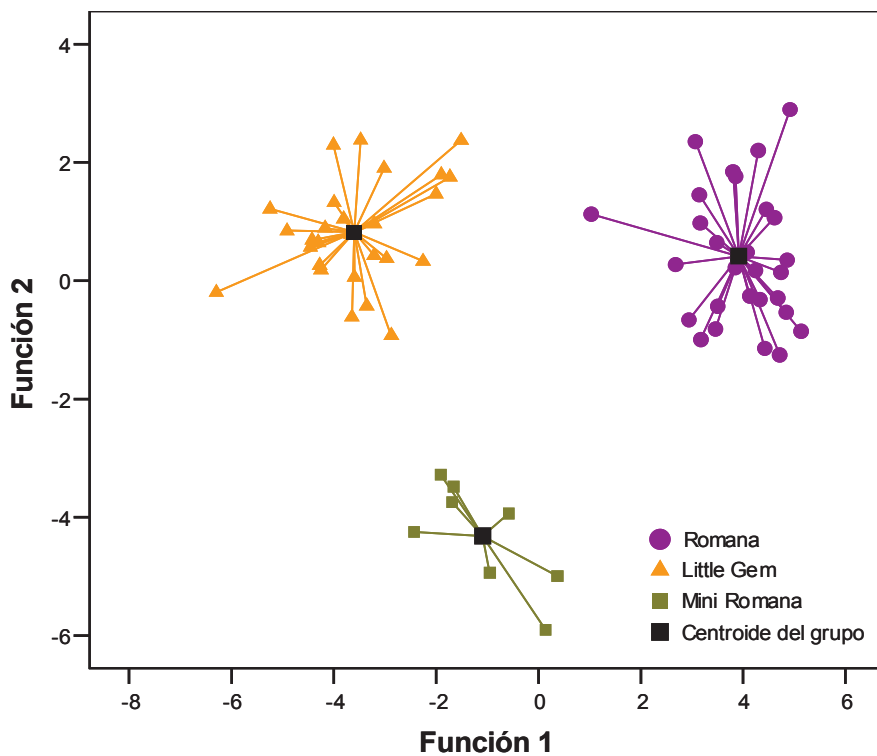


Figura 5.3. Histogramas del análisis discriminante de los parámetros analizados en lechuga Romana (●), Little Gem (▲) y Mini Romana (■) utilizando fructosa, ácido cítrico, vitamina C, FRAP-H, nitrato, hue en hojas internas, ácido α -cetoglutámico, β -caroteno, ABTS-H y luminosidad en hojas externas como variables predictoras.

5.3. CONCLUSIONES

En este estudio se han evaluado las diferencias entre los tipos de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem, respecto a su composición nutritiva y antioxidante y a su contenido en nitrato. En general, la lechuga tipo Romana mostró el mayor contenido en compuestos fenólicos, vitamina C y folatos, todos ellos con un reconocido efecto beneficioso sobre la salud humana. En el caso de los compuestos fenólicos, además sus propiedades saludables, tienen la capacidad de prolongar la vida útil poscosecha de lechuga, lo que presenta una clara ventaja cuando esta se comercializa entera para su consumo en fresco. Por el contrario, un mayor contenido en compuestos fenólicos presenta desventajas en el caso de lechuga procesada para cuarta gama, ya que cuando dichos compuestos son sustrato de los enzimas responsables del pardeamiento enzimático. La lechuga tipo Mini Romana mostró el mayor contenido de ácidos orgánicos y compuestos lipofílicos, incluyendo carotenoides y clorofilas, ambos con propiedades antioxidantes reconocidas. Finalmente, la lechuga Little Gem presentó el mayor contenido de nitrato, lo que se puede considerar como una característica negativa de este tipo de lechuga. Las diferencias encontradas en las concentraciones de metabolitos y nitrato podrían atribuirse a la estructura de cabeza de lechuga y al tamaño de los diferentes tipos que determinan la penetración de la luz solar y por lo tanto la síntesis de metabolitos dependientes de la luz y la asimilación de nitrógeno. Los parámetros que permitieron diferenciar los tres tipos de lechuga entre sí fueron los contenidos en fructosa, ácido cítrico, vitamina C y nitrato, la capacidad antioxidante de la fracción hidrofílica y el color de hojas internas y en menor medida, el contenido en α -cetoglutárico, β -caroteno, y la luminosidad de hojas externas. A pesar de las diferencias generales encontradas entre los diferentes tipos de lechuga, en algunos casos se observaron diferencias entre cultivares pertenecientes a un mismo tipo, lo que debería ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar variedades de lechuga en función de su composición.

CAPÍTULO 6

DISCRIMINACIÓN DE PIMIENTO Y LECHUGA ECOLÓGICOS Y CONVENCIONALES

CAPÍTULO 6. DISCRIMINACIÓN DE PIMIENTO Y LECHUGA ECOLÓGICOS Y CONVENCIONALES

A pesar del crecimiento que en la actualidad experimenta la agricultura ecológica, aún no existe una metodología fiable para confirmar que los insumos utilizados durante el cultivo de frutas y hortalizas ecológicas son realmente de origen orgánico y por lo tanto, que están autorizados para su uso en este sistema de producción. Con el fin de garantizar la autenticidad de dichos productos, se han investigado varios marcadores isotópicos potenciales, incluyendo $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{34}\text{S}$, etc, como indicadores del origen de la fuente de los fertilizantes utilizados en el cultivo (Georgi, *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2009). El uso de estos isótopos con este fin se basa en las diferencias en la composición isotópica entre los fertilizantes ecológicos y sintéticos que pueden dar lugar a diferencias en las huellas isotópicas de planta y fruto. Entre los marcadores isotópicos estudiados, el $\delta^{15}\text{N}$ se ha mostrado como un indicador prometedor para la caracterización de frutas y verduras ecológicas (Rapisarda *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2007; Sturm *et al.*, 2011). Sin embargo, los resultados no son siempre concluyentes y es difícil definir unos valores umbrales para clasificar productos ecológicos y convencionales. Además de las relaciones de los isótopos estables, la composición química de frutas y hortalizas también se ha estudiado como herramienta potencial para distinguir entre productos cultivados bajo diferentes sistemas agrícolas (Carbonaro *et al.*, 2002; Hajslova *et al.*, 2005; Rapisarda *et al.*, 2005; Camin *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que este enfoque es capaz de mejorar la clasificación de los vegetales en grupos ecológicos o convencionales, también presenta algunas limitaciones para ser utilizado como único indicador de la gestión agrícola, debido a las discrepancias encontradas en la bibliografía respecto al contenido de minerales y metabolitos de frutas y hortalizas cultivadas bajo diferentes sistemas de producción. El objetivo de este trabajo fue estudiar la viabilidad de una aproximación multivariante, combinando resultados de valores de $\delta^{15}\text{N}$, concentración de metabolitos y composición

mineral, para clasificar pimiento y lechuga cultivados bajo sistemas de producción ecológico y convencional.

6.1. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.1. Diseño experimental

Se cultivaron plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L. cv. Quito) y lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. Little Gem Ferro) bajo invernadero, en macetas de 15 L con suelo con textura franco arcillosa (25% arena, 35% limo, y 40% de arcilla; pH 7,7). Los tratamientos consistieron en siete tipos de fertilización ecológica (E), tres tratamientos con fertilizantes convencionales (C) y tres tratamientos mixtos (M). Los tratamientos ecológicos y mixtos implicaron la preparación del suelo, previamente al transplante, mediante biosolarización (Flores *et al.*, 2008) que se realizó aplicando una enmienda ovina y gallinácea (proporción 4:1) a razón de 7 kg m⁻². Después de la aplicación de estiércol, el suelo se cubrió con una película de plástico transparente y el invernadero se cerró durante 3 meses (agosto-octubre). En los tratamientos ecológicos, las plantas se cultivaron con fertilizantes sólidos (Agrimartín[®] sólido, Negrot[®] o Lombrimur[®]) o líquidos (Agrimartín[®] líquido, Terrabal[®], Tecsoil[®] o Naturamin[®]) de diferentes orígenes (Tabla 6.1), certificados de acuerdo con el Reglamento Europeo (CE) 834/2007 para su uso en cultivos ecológicos. La fertilización convencional consistió en la aplicación de fertilizantes sintéticos solubles (KNO₃, NH₄H₂PO₄ o urea). Por último, en los tratamientos mixtos se aplicaron los mismos fertilizantes sintéticos utilizados en los tratamientos convencionales, sobre la base de un suelo biosolarizado. En la Tabla 6.2 se presentan las combinaciones de fertilización y biosolarización utilizadas en cada tratamiento. Los fertilizantes líquidos ecológicos y los fertilizantes sintéticos utilizados en tratamientos ecológicos, convencionales y mixtos se suministraron por riego por goteo a la misma concentración de N (10 mM). Los fertilizantes ecológicos sólidos utilizados en los tratamientos ecológicos fueron suministrados directamente al suelo con una dosis de 4,4 g N planta⁻¹ y las plantas se regaron por goteo con agua.

Tabla 6.1. Origen de los diferentes fertilizantes utilizados para el cultivo ecológico.

Tipo	Fertilizante	Origen
Ecológico Sólido	Agrimartín Sólido	Estiércol de oveja
	Lombrimur	Humus de lombriz
	Negrot	Mezcla animal y vegetal
Ecológico Líquido	Naturamín	Aminoácidos
	Tecsoil	Extracto Vegetal
	Terrabal	Extracto cereal
	Agrimartín Líquido	Extracto de estiércol de oveja

Tabla 6.2. Combinaciones de fertilizantes y biosolarización pertenecientes a los diferentes tratamientos principales (ecológico, convencional y mixto).

Tratamiento	Tipo	Biosolarización	Fertilizante	Referencia
Ecológico	Sólido	Si	Agrimartín Sólido	BS+ES(AgrSol)
			Lombrimur	BS+ES(Lomb)
			Negrot	BS+ES(Negrot)
	Líquido	Si	Agrimartín Líquido	BS+EL(AgrLiq)
			Naturamín	BS+EL(Natur)
			Tecsoil	BS+EL(Tecsoil)
Terrabal			BS+EL(Terrab)	
Convencional	Sólido soluble	No	KNO ₃	NO ₃
			NH ₄ H ₂ PO ₄	NH ₄
			Urea	Urea
Mixto	Sólido soluble	Si	KNO ₃	BS+NO ₃
			NH ₄ H ₂ PO ₄	BS+NH ₄
			Urea	BS+Urea

6.1.2. Recolección y preparación de muestras

Las muestras de material vegetal (planta y fruto) y suelo se recogieron 188 días después del trasplante, en el caso de pimiento y 70 días después del trasplante, en el caso de lechuga. Las muestras de planta se separaron en parte aérea, raíz y fruto (en pimiento), se lavaron con agua desionizada y se secaron con papel. En el caso de lechuga, cada muestra se cortó en dos porciones, conservando una de ellas a -80 °C para el análisis de metabolitos. Las muestras de material vegetal y suelo destinadas al análisis de los valores de abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), nitrógeno total (N_{total}) y composición mineral, junto a muestras de los fertilizantes ecológicos y de síntesis destinadas al análisis de $\delta^{15}\text{N}$, se secaron a 65 °C y se molieron para su posterior análisis.

6.1.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS 18.0. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para los factores principales del cultivo que afectan a las variables medidas, los valores medios se compararon con el test de rango múltiple de Duncan y para predecir el modo de cultivo se utilizó el análisis discriminante canónico (ADC).

6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1. Composición isotópica de las fuentes de N

Las fuentes de N utilizadas en los diferentes tratamientos incluyeron fertilizantes ecológicos sólidos o líquidos, fertilizantes sintéticos y estiércol para la biofumigación del suelo. La Tabla 6.3 muestra los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de dichas fuentes. Estos valores oscilaron, en el caso de los fertilizantes ecológicos, entre 9,0 y 14,1 ‰ en los fertilizantes sólidos y entre 3,0 y 8,2 ‰ en los líquidos. Estos valores están de acuerdo con la caracterización isotópica de fertilizantes ecológicos, previamente descrita por Bateman y Kelly (2007),

donde los valores de $\delta^{15}\text{N}$ oscilaron entre 0,6 y 16,2 ‰, dependiendo de su origen, siendo los fertilizantes a base de algas marinas los que presentaron valores medios más bajos ($\delta^{15}\text{N}=2,5$ ‰). Los fertilizantes inorgánicos de origen sintético mostraron valores de $\delta^{15}\text{N}$ cercanos a 0 ‰ (entre 0,1 y 0,9 ‰) de acuerdo con la composición de N atmosférico utilizado por la industria de los fertilizantes como fuente de N (Vitoria *et al.*, 2004).

Tabla 6.3. Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de las fuentes de N utilizadas en los diferentes tratamientos ecológicos, convencionales y mixtos.

Fuente N	$\delta^{15}\text{N}$
Estiércol para biosolarización	11,9
Fertilizantes Ecológicos Sólidos	
Agrimartín Sólido	14,1
Lombrimur	10,7
Negrot	9,0
Fertilizantes Ecológicos Líquidos	
Agrimartín Líquido	3,7
Naturamín	3,0
Tecsoil	8,2
Terrabal	4,2
Fertilizantes Sintéticos	
KNO_3	0,9
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,1
Urea	0,7

6.2.2. Pimiento

Para el estudio de discriminación entre pimientos cultivados bajo los diferentes sistemas de producción, se analizaron los valores de $\delta^{15}\text{N}$ y la concentración de N_{total} de parte aérea, raíz, fruto y suelo, así como el peso fresco de parte aérea y raíz. Al comparar los tratamientos ecológicos (E) y convencionales (C), se detectaron diferencias

significativas entre los diferentes tipos de fertilización en la concentración de N_{total} en raíz, fruto y suelo y en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea, raíz, fruto y suelo (Tabla 6.4). Las plantas que se cultivaron bajo un régimen mixto no mostraron diferencias significativas en la concentración de N_{total} y valores de $\delta^{15}\text{N}$ de raíz, fruto y suelo con respecto a las plantas E, ni en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea con respecto a las plantas C. Además, no se observaron diferencias significativas en el peso fresco de parte aérea y raíz ni en la concentración de N_{total} de parte aérea entre tratamientos. Aunque los tratamientos E presentaron un valor medio de $\delta^{15}\text{N}$ de la planta mayor al observado en los tratamientos C, en el caso particular del tratamiento con NO_3^- , se observaron valores mayores a los esperados a partir del análisis isotópico de la fuente de N, mostrando valores de $\delta^{15}\text{N}$ en parte aérea incluso más altos a los observados en algunos tratamientos E. Los resultados obtenidos en el tratamiento con NO_3^- pueden ser atribuidos a procesos de pérdida de nitrógeno (i.e. nitrificación y desnitrificación) que discriminan a favor del isótopo más ligero (^{14}N), dando lugar a un enriquecimiento en ^{15}N del nitrógeno remanente del suelo y en consecuencia de la planta (Delwiche y Steyn, 1970). Los procesos de nitrificación y desnitrificación dependen de diferentes factores, como el pH, la temperatura y el contenido de agua del suelo. Bajo temperaturas cálidas y condiciones anaeróbicas, la desnitrificación conlleva pérdidas de N por volatilización de nitrógeno atmosférico (N_2) u óxido nitroso (N_2O) y un posterior enriquecimiento en ^{15}N del nitrato remanente. Por el contrario, el proceso de nitrificación requiere condiciones aerobias y está limitado por las altas temperaturas en mayor medida que el proceso de desnitrificación (Maag y Vinther, 1996). Nuestras condiciones experimentales incluyeron altas temperaturas y suelos de textura fina con alto contenido de humedad. Bajo tales condiciones ambientales, el proceso de desnitrificación se ve favorecido mientras que el proceso de nitrificación es menos probable. Todo ello justifica los valores de $\delta^{15}\text{N}$ mayores a lo esperado en plantas tratadas con NO_3^- y también el hecho de que el contenido de N en estas plantas sea inferior a lo observado en plantas tratadas con NH_4 o urea, a pesar de que se cultivan con el mismo nivel de N.

Tabla 6.4. Peso fresco (g) de parte aérea y raíz y contenido en nitrógeno total (N_{total} ; %) y abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$; ‰) en parte aérea, raíz, fruto y suelo, en el ensayo de pimiento cultivado bajo sistemas de producción ecológico, convencional y mixto.

Tratamiento	Peso Fresco				N_{total}				$\delta^{15}\text{N}$			
	P. aérea	Raíz	P. aérea	Raíz	P. aérea	Raíz	Fruto	Suelo	P. aérea	Raíz	Fruto	Suelo
Ecológico												
BS+ES(AgrSol)	171,0±10,9	33,5±5,2	1,8±0,3	2,2±0,2	2,2±0,2	2,2±0,2	2,2±0,2	0,29±0,02	12,7±0,6	8,4±0,4	13,0±0,3	8,3±0,3
BS+ES(Lomb)	150,2±8,5	30,7±4,2	1,6±0,1	2,2±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1	0,31±0,01	13,6±0,3	9,1±0,4	14,5±0,1	8,4±0,3
BS+ES(Negrot)	197,5±9,0	31,0±4,0	1,7±0,1	2,1±0,1	2,2±0,2	2,2±0,2	2,2±0,2	0,30±0,03	11,7±0,1	7,0±0,9	11,2±0,6	7,3±0,4
BS+EL(AgrLiq)	206,9±20,0	45,0±1,8	3,2±0,1	2,8±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	0,24±0,02	6,4±0,4	3,4±0,6	6,0±0,7	7,2±0,7
BS+EL(Natur)	177,4±6,8	34,5±2,8	2,6±0,1	2,5±0,1	2,3±0,1	2,3±0,1	2,3±0,1	0,22±0,01	8,5±0,4	4,4±0,1	7,3±0,5	6,7±0,3
BS+EL(Tecsoil)	160,7±23,9	27,2±4,3	1,9±0,1	2,4±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1	0,22±0,01	11,3±0,3	6,1±0,3	10,9±0,7	7,4±0,1
BS+EL(Terrab)	244,7±2,7	38,4±1,9	3,2±0,1	2,5±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1	0,23±0,01	9,3±0,2	4,7±0,1	8,3±0,2	7,5±0,1
Media	186,9	34,3	2,3	2,4a	2,2a	2,2a	2,2a	0,26b	10,5b	6,1b	10,2b	7,5b
Convencional												
NO ₃	189,5±9,5	30,4±1,8	2,4±0,2	2,7±0,1	2,5±0,1	2,5±0,1	2,5±0,1	0,18±0,01	8,7±0,3	2,1±0,5	5,5±0,3	4,7±0,1
NH ₄	225,9±16,4	30,8±4,9	3,1±0,1	3,1±0,1	2,7±0,2	2,7±0,2	2,7±0,2	0,27±0,04	3,9±0,2	-0,6±0,7	2,4±0,2	4,3±0,2
Urea	191,2±12,0	27,6±3,2	2,8±0,1	3,0±0,2	2,5±0,2	2,5±0,2	2,5±0,2	0,16±0,02	4,5±0,4	-0,3±0,1	2,9±0,3	4,4±0,3
Media	202,2	29,6	2,8	2,9b	2,5b	2,5b	2,5b	0,20a	5,7a	0,4a	3,6a	4,4a
Mixto												
BS+NO ₃	175,9±11,5	30,6±1,3	1,7±0,2	2,2±0,1	2,2±0,1	2,2±0,1	2,2±0,1	0,24±0,01	12,7±0,5	7,0±0,4	11,5±0,7	7,5±0,5
BS+NH ₄	209,6±10,5	44,0±6,4	2,9±0,2	2,7±0,2	2,3±0,1	2,3±0,1	2,3±0,1	0,25±0,02	3,9±0,5	2,2±0,3	5,9±0,5	7,4±0,2
BS+Urea	194,7±9,3	40,8±3,1	2,9±0,2	2,6±0,1	2,3±0,1	2,3±0,1	2,3±0,1	0,25±0,02	6,5±0,7	3,8±0,6	6,0±0,6	7,9±0,6
Media	193,4	38,5	2,5	2,5a	2,3a	2,3a	2,3a	0,25ab	7,7a	4,3b	7,8b	7,6b
	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	***	***	*	***	***	***	***

* ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4).

Con el fin de examinar las diferencias entre los tres grupos (E, C y M) con respecto a los múltiples parámetros analizados (variables predictoras) se llevó a cabo un análisis discriminante canónico (ADC). El ADC ha sido utilizado anteriormente para determinar el origen y la autenticidad de los alimentos (Kelly y Bateman, 2010) y permite la identificación de las variables más útiles para predecir por ejemplo, pertenencia a un grupo ecológico o convencional. Con este fin, se llevó a cabo un análisis por etapas para reducir un efecto de sobreajuste y se aplicó un procedimiento de validación cruzada para determinar la fiabilidad del modelo estadístico. El conjunto de datos constaba de 52 muestras individuales (28 ecológicas, 12 convencionales y 12 mixtas). Las variables usadas para el ADC fueron N_{total} , $\delta^{15}\text{N}$ y peso fresco de parte aérea, raíz, fruto y N_{total} , $\delta^{15}\text{N}$ de suelo. El análisis discriminante dio como resultado dos funciones que utilizaron los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea y suelo como variables predictoras. El modelo permitió que el 78,8% de los casos agrupados (por validación cruzada) pudieran ser clasificados correctamente de acuerdo con la distribución discriminante representada en la Figura 6.1. La primera función dependía de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ del suelo, con un coeficiente de función canónica de 0,999 y explicaba el 94,3% de la varianza. La segunda función se relacionó con el $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea con un coeficiente de función canónica de 0,952. Los casos pertenecientes a los tratamientos E y C se separaron bien, con un sólo caso E mal clasificado como C y viceversa. A pesar de que una gran parte de la varianza fue explicada por las dos funciones, no se obtuvo la separación deseada entre los tratamientos E y M, con el 50% de los casos M mal clasificados como E y el 10,7% de E como M. Estos resultados destacan la gran contribución del estiércol orgánico utilizado para la biosolarización del suelo sobre la composición isotópica de la planta y la complicación de la detección de la aplicación de fertilizantes inorgánicos cuando se combinan con fuentes de N orgánico. Por último, los casos E mal clasificados como C (3,6%) corresponden al tratamiento que utiliza como fertilizante Agrimartín líquido [BS+EL(AgrLiq)] con $\delta^{15}\text{N}= 3,7 \text{ ‰}$.

Las variables predictoras utilizadas por el ADC (valores de $\delta^{15}\text{N}$ de suelo y parte aérea) podrían ser de utilidad cuando se realiza un análisis precosecha, como por ejemplo durante una inspección de la plantación durante el desarrollo del cultivo. Sin embargo, no son útiles cuando la diferenciación entre cultivos ecológicos y convencionales se lleva a cabo en condiciones postcosecha (por ejemplo para una inspección en el mercado de destino). Con el fin de obtener una clasificación más realista bajo condiciones postcosecha,

el análisis se realizó incluyendo sólo los parámetros disponibles en esa situación como N_{total} y $\delta^{15}\text{N}$ de fruto. El análisis discriminante excluyó la variable N_{total} de fruto, debido a la escasa contribución de este parámetro a la discriminación entre grupos y sólo utilizó el valor de $\delta^{15}\text{N}$ de fruto. El modelo permitió que el 69,2% de los casos agrupados pudieran ser clasificados correctamente por validación cruzada. Varios casos M fueron erróneamente clasificados como E (66,7%) o C (25,0%) y también, el 3,6% de E y el 16,7% de C se clasificaron como M. Sólo dos casos de E (7,1%) fueron mal clasificados como C, mientras que ningún C fue clasificado erróneamente como E.

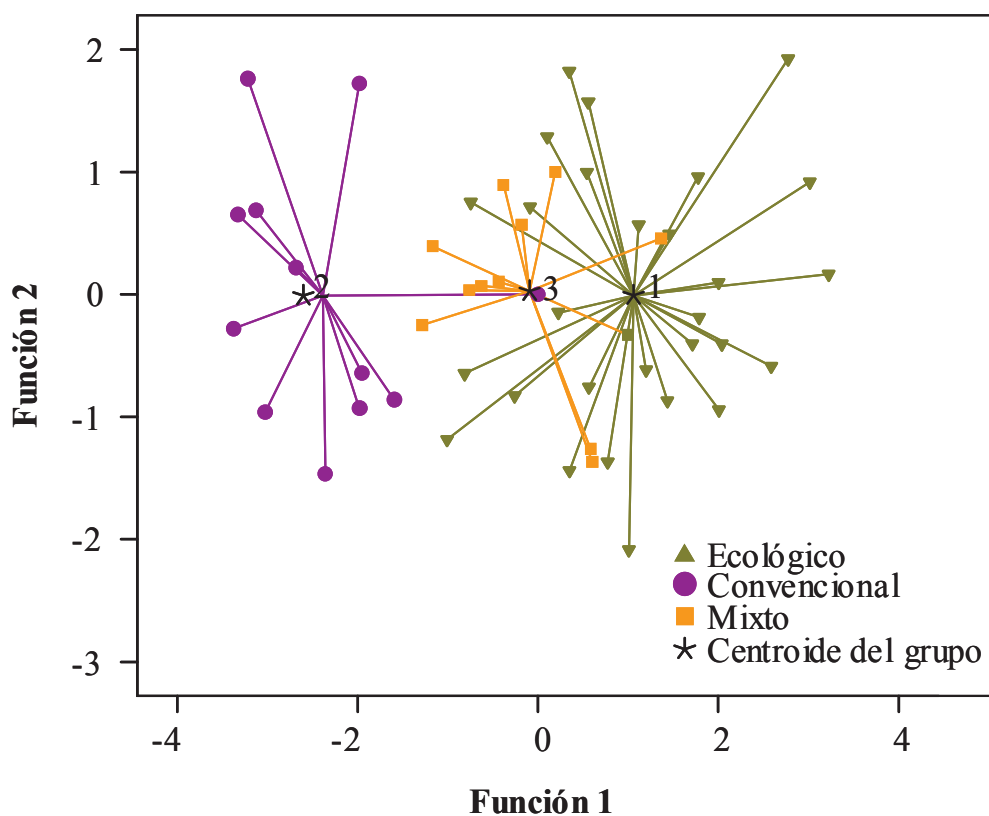


Figura 6.1. Histogramas del análisis discriminante canónico de las muestras de pimiento cultivado bajo cultivo ecológico (\blacktriangle), convencional (\bullet) y mixto (\blacksquare), utilizando como variables predictoras los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de suelo y parte aérea.

6.2.3. Lechuga

En lechuga no se observaron diferencias significativas en el peso fresco ni en la concentración de N_{total} de parte aérea y raíz entre tratamientos (Tabla 6.5). Los valores $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea y suelo disminuyeron con los tratamientos siguiendo el orden $E > M > C$. Además, no se observaron diferencias significativas en los valores de ^{15}N de raíz entre plantas bajo tratamientos E y M que a su vez presentaron valores superiores a los observados en plantas bajo tratamiento C. De manera similar a los resultados observados en el pimiento, el tratamiento con NO_3^- mostró valores de $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea y raíz mayores a los esperados a partir del análisis isotópico de la fuente de N, probablemente debido al fraccionamiento isotópico durante la desnitrificación que pudo provocar un aumento del valor de $\delta^{15}\text{N}$ del nitrato remanente.

Al igual que en el estudio de pimiento, para diferenciar entre tratamientos E, C y M mediante ADC, se utilizó la composición de N en lechuga y suelo (N_{total} y $\delta^{15}\text{N}$), así como el peso fresco de parte aérea y raíz. La clasificación se logró con éxito en el 65,4% de los casos agrupados mediante validación cruzada por una función discriminante canónica que sólo dependía del valor de $\delta^{15}\text{N}$ de raíz, con un coeficiente de función canónica de 0,802. La mayor parte de los casos mal clasificados fueron los pertenecientes al grupo M (91,7%). Sólo un caso E fue erróneamente clasificado como C y no hubieron casos C mal clasificados como E.

Con el fin de evaluar el uso de variables disponibles durante la postcosecha en los mercados de destino, se realizó un nuevo ADC incluyendo sólo los valores de N_{total} y $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea. Además de estos parámetros relacionados con el crecimiento de la planta y la composición de N, se utilizaron variables relacionadas con la calidad y la composición mineral de lechuga, en particular, el contenido en agua de parte aérea, la capacidad antioxidante utilizando como métodos complementarios ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)] y FRAP (Poder Antioxidante de Reducción Férrica) tanto en la fracción hidrofílica (ABTS-H, FRAP-H) como en la fracción lipofílica (ABTS-L, FRAP-L), la concentración de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), fenoles totales, clorofilas, vitamina C, ácidos orgánicos (glutámico, tartárico, quínico, málico, malónico, siquímico, cetoglutámico, cítrico, fumárico y succínico), minerales (Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P y Zn) y aniones (Cl^- , NO_3^- , PO_4^{2-} y SO_4^{2-}). ANOVA sólo detectó diferencias

significativas entre tratamientos E, C y M en el $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea, vitamina C, ácido cítrico, glutámico y tartárico, K, Mg, Mn, Zn, Cu y Cl^- (Tablas 6.5-6.9). Las variables de predicción seleccionadas por el ADC fueron el valor de $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea (con un coeficiente de función canónica de 0,537), Zn (0,262) y ABTS-H (-0,129) para la primera función y Mn (0,415), ácido tartárico (0,318), ácido succínico (0,231) y FRAP-L (0,095) para la segunda función. Este análisis de datos multivariado logró la correcta clasificación del 94,2% de los casos agrupados originalmente, y el 90,4% de los agrupados por validación cruzada (Figura 6.2). En particular, el 100% de los casos E fueron clasificados correctamente. El 83,3% de los casos C fueron clasificados correctamente mientras que un 8,3% fueron mal clasificados como E y un 8,3% como M. El 75,0% de los casos M fueron clasificados correctamente mientras que el 16,7% y el 8,3% fueron clasificados como E y C, respectivamente.

Tabla 6.5. Peso fresco (g) de parte aérea y raíz y contenido en nitrógeno total (N_{total} ; %) y abundancia natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$; ‰) en parte aérea, raíz y suelo y contenido en agua (%), en el ensayo de lechuga cultivada bajo sistemas de producción ecológico, convencional y mixto.

Tratamiento	Peso Fresco			N_{total}			$\delta^{15}\text{N}$			
	P. aérea	Raíz		P. aérea	Raíz	Suelo	P. aérea	Raíz	Suelo	Agua
Ecológico										
BS+ES(AgrSol)	197,9±60,4	15,2±4,5	4,4±0,2	2,5±0,4	0,28±0,02	13,6±0,4	11,2±0,6	10,9±0,2	95,4±0,1	
BS+ES(Lomb)	302,8±6,2	22,9±3,0	4,1±0,1	1,7±0,1	0,32±0,01	14,2±0,6	11,9±0,3	10,2±0,2	96,0±0,3	
BS+ES(Negrot)	294,3±7,3	21,2±1,9	4,3±0,1	2,5±0,1	0,33±0,03	12,0±0,6	12,3±0,6	10,1±0,4	96,0±0,3	
BS+EL(AgrLiq)	181,8±9,9	12,5±0,2	4,3±0,2	2,4±0,1	0,17±0,01	8,0±0,5	7,6±0,2	9,4±0,5	95,4±0,2	
BS+EL(Natur)	211,5±13,2	14,2±1,3	4,3±0,2	2,2±0,1	0,16±0,01	9,3±0,9	8,6±0,6	8,9±0,2	96,0±0,3	
BS+EL(Tecsoil)	127,2±36,4	12,4±2,8	4,0±0,1	2,2±0,3	0,28±0,01	14,0±0,8	10,3±1,7	10,6±0,3	94,2±0,2	
BS+EL(Terrab)	289,1±36,7	16,3±1,5	4,2±0,2	2,2±0,1	0,16±0,01	10,4±1,0	8,9±0,7	9,0±0,2	96,5±0,3	
Media	229,2	16,4	4,2	2,3	0,24c	11,7c	10,1b	9,9b	95,7	
Convencional										
NO ₃	225,5±12,6	19,6±1,4	4,0±0,1	1,7±0,1	0,07±0,01	6,8±0,2	5,9±0,3	8,4±1,4	95,7±0,2	
NH ₄	296,3±33,4	16,6±1,0	4,3±0,2	2,1±0,1	0,08±0,01	3,8±0,5	2,2±0,4	8,5±0,6	96,4±0,1	
Urea	188,8±16,1	16,3±1,5	4,4±0,1	2,3±0,1	0,08±0,01	1,8±0,5	1,1±0,2	8,6±0,3	95,3±0,2	
Media	236,9	17,5	4,2	2,0	0,08a	4,1a	3,1a	8,5a	95,8	
Mixto										
BS+NO ₃	283,0±14,1	21,5±2,0	4,1±0,1	1,8±0,1	0,19±0,02	12,2±0,2	10,0±0,6	10,0±0,4	95,7±0,2	
BS+NH ₄	286,4±11,9	18,0±0,3	4,3±0,1	2,3±0,1	0,16±0,01	7,8±0,4	7,6±0,5	9,1±0,1	96,6±0,1	
BS+Urea	226,9±14,0	17,2±2,0	4,4±0,1	2,4±0,1	0,17±0,01	7,8±0,3	7,8±0,4	9,1±0,1	95,8±0,1	
Media	265,4	18,9	4,2	2,2	0,17b	9,2b	8,5b	9,4ab	96,0	
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	***	**	**	n.s.

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4).

Tabla 6.6. Actividad antioxidante de la fracción hidrofílica, medida por los métodos ABTS (ABTS-H; equivalentes de ascórbico por 10) y FRAP (FRAP-H; $\mu M Fe$), actividad antioxidante de la fracción lipofílica medida por los métodos ABTS (ABTS-L; equivalentes de trolox por 10) y FRAP (FRAP-L; $\mu M Fe$ por 10) y concentraciones de azúcares ($mg g^{-1}$), compuestos fenólicos totales (Fenolic; $\mu g g^{-1}$), clorofilas (Clorof; $mg g^{-1}$) y vitamina C (Vit C, $\mu g g^{-1}$) en lechuga.

Tratamiento	ABTS-H	ABTS-L	FRAP-H	FRAP-L	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Fenolic	Clorof	Vit C
Ecológico										
BS+ES(AgrSol)	0,84±0,01	0,56±0,01	480,8±28,2	112,2±36,6	1,8±0,4	4,0±0,7	7,5±0,9	72,4±6,7	1,3±0,2	189,1±9,3
BS+ES(Lomb)	0,80±0,09	0,45±0,05	405,2±23,8	106,6±26,2	2,4±0,5	4,6±1,0	7,3±1,1	64,0±4,5	0,9±0,1	147,1±1,4
BS+ES(Negrot)	0,65±0,04	0,48±0,03	338,9±27,5	134,5±34,4	1,6±0,3	3,5±0,2	6,3±0,3	60,7±5,0	1,1±0,2	147,0±7,2
BS+EL(AgrLiq)	1,18±0,03	0,79±0,03	314,7±24,9	156,7±14,6	1,9±0,1	4,1±0,3	6,1±0,3	63,9±4,9	1,7±0,1	157,7±12,4
BS+EL(Natur)	1,16±0,05	0,71±0,06	301,3±17,6	188,6±35,2	1,5±0,1	3,5±0,7	5,7±0,7	68,0±4,4	1,4±0,2	146,5±17,8
BS+EL(Teasoil)	1,15±0,17	0,77±0,02	606,9±40,2	129,0±18,4	2,8±0,3	6,4±0,6	6,6±0,9	94,8±9,7	1,7±0,2	195,4±15,2
BS+EL(Terrab)	1,01±0,10	0,54±0,08	367,3±19,2	135,2±18,2	0,9±0,2	3,9±0,3	7,2±0,3	68,9±5,1	0,9±0,1	156,6±11,4
Media	0,97	0,61	402,2	137,6	1,9	4,3	6,7	70,4	1,3	162,8a
Convencional										
NO ₃	0,99±0,01	0,60±0,10	456,9±21,7	137,4±19,1	1,4±0,3	3,3±0,3	7,2±0,6	71,6±4,3	1,2±0,2	177,3±7,3
NH ₄	1,04±0,07	0,75±0,04	274,5±10,5	145,4±14,1	1,3±0,1	2,8±0,1	5,0±0,2	68,1±3,1	1,2±0,1	151,2±3,5
Urea	1,41±0,09	0,76±0,04	404,4±27,6	175,3±29,6	1,1±0,1	4,2±0,5	7,1±0,6	90,4±10,1	1,7±0,2	213,0±16,9
Media	1,14	0,71	378,6	152,7	1,3	3,4	6,4	76,7	1,3	180,5ab
Mixto										
BS+NO ₃	1,02±0,07	0,50±0,05	472,4±48,5	162,9±12,1	1,8±0,3	4,0±0,4	6,3±0,3	72,0±3,2	1,1±0,1	179,9±10,8
BS+NH ₄	1,02±0,07	0,64±0,07	302,2±12,9	191,6±26,8	1,2±0,2	3,9±0,6	6,4±0,7	67,9±2,3	1,1±0,1	165,7±4,6
BS+Urea	1,19±0,09	0,68±0,04	336,3±17,9	168,4±15,7	1,7±0,3	5,1±0,6	7,3±0,6	74,9±3,1	1,3±0,1	215,1±8,4
Media	1,08	0,61	370,3	174,3	1,6	4,3	6,7	71,6	1,2	186,9b
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4).

Tabla 6.7. Concentración de ácidos málico, cítrico ($mg\ g^{-1}$), fumárico, glutámico, quínico, tartárico, cetoglutárico (cetoglut), succínico, siquímico y malónico ($\mu g\ g^{-1}$) en lechuga cultivada bajo tratamientos ecológico, convencional y mixto.

Tratamiento	Cítrico	Málico	Fumárico	Glutámico	Quínico	Tartárico	Cetoglut	Succínico	Siquím	Malónico
Ecológico										
BS+ES(AgrSol)	18,6±1,6	8,2±0,4	450,4±29,1	483,4±32,5	317,7±16,8	163,4±9,7	62,0±7,4	47,7±9,9	25,4±2,3	13,4±1,9
BS+ES(Lomb)	21,1±3,1	6,7±0,3	367,7±28,0	420,7±44,8	294,2±21,0	152,1±13,8	37,7±3,8	28,3±3,3	16,7±2,0	7,7±0,7
BS+ES(Negrot)	22,2±2,7	7,0±0,6	353,1±24,4	368,7±57,5	237,4±22,0	118,1±6,2	33,6±4,2	33,2±5,9	15,2±1,6	8,4±1,1
BS+EL(AgrLiq)	16,8±3,0	6,8±0,7	423,4±46,8	314,7±22,7	246,4±40,0	129,9±22,2	44,7±7,4	49,7±11,7	14,5±2,8	11,3±1,3
BS+EL(Natur)	15,2±0,9	6,9±0,2	356,5±32,1	314,2±14,1	222,7±13,9	122,4±9,5	39,0±1,4	32,3±3,4	14,4±1,3	9,0±1,1
BS+EL(Tecsoil)	32,1±0,8	8,7±0,7	461,8±31,7	852,2±44,3	468,5±71,4	237,0±15,0	74,2±44,5	59,9±13,3	30,9±2,7	15,0±2,9
BS+EL(Terrab)	13,3±0,3	6,4±0,1	345,9±7,7	280,2±19,8	201,0±8,0	153,5±38,5	27,4±3,6	26,2±2,8	10,2±0,9	7,0±0,2
Media	19,9 ^b	7,24	394,1	433,4 ^b	284,0	158,4 ^{ab}	45,5	39,6	18,2	10,3
Convencional										
NO ₃	21,9±2,8	7,3±0,4	402,6±43,7	324,7±35,4	278,8±28,9	194,4±29,2	35,7±3,8	39,3±4,8	17,2±2,1	8,9±0,9
NH ₄	15,0±0,7	6,7±0,3	338,2±18,0	272,4±21,8	229,3±25,1	117,7±8,1	28,1±2,0	35,8±0,7	9,9±1,9	6,2±0,8
Urea	20,8±1,8	6,4±0,2	338,0±14,2	299,1±15,3	298,2±27,2	192,6±22,0	45,4±2,2	55,3±3,3	18,8±0,9	10,0±0,5
Media	19,2 ^b	6,8	359,6	298,8 ^a	268,7	168,2 ^b	36,4	43,4	15,3	8,4
Mixto										
BS+NO ₃	18,7±2,3	7,3±0,1	421,6±29,5	383,0±21,6	285,8±15,1	154,4±17,5	49,2±2,4	37,2±2,6	19,8±0,7	10,2±0,6
BS+NH ₄	12,2±1,8	5,2±0,7	278,9±32,8	200,0±31,4	220,8±39,0	91,8±11,1	27,0±7,7	23,5±5,6	10,1±3,2	5,9±0,6
BS+Urea	13,5±0,8	6,0±0,2	366,0±10,1	313,2±26,5	262,1±4,8	119,3±4,3	49,9±6,4	37,3±6,0	16,8±2,0	10,5±1,1
Media	14,8 ^a	6,2	355,5	298,7 ^a	256,3	121,8 ^a	42,0	32,7	15,6	8,9
	*	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4).

Tabla 6.8. Concentración de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P y Zn ($mmol\ kg^{-1}$) en lechuga cultivada bajo tratamientos ecológico, convencional y mixto.

Tratamiento	K	Ca	Mg	P	Fe	Mn	Zn	Cu
Ecológico								
BS+ES(AgrSol)	1748,6±96,7	280,2±16,7	227,4±9,4	168,4±4,7	6,5±3,1	0,79±0,04	0,86±0,10	0,18±0,01
BS+ES(Lomb)	1790,8±114,1	269,5±21,2	213,3±10,2	195,9±15,4	2,2±0,5	0,78±0,05	0,97±0,04	0,24±0,02
BS+ES(Negrot)	1775,0±145,4	279,4±27,4	204,5±11,2	189,3±8,0	2,2±0,3	0,85±0,08	0,89±0,07	0,24±0,02
BS+EL(AgrLiq)	1840,1±165,5	301,9±23,0	200,5±12,7	157,0±13,1	6,8±1,5	1,12±0,07	0,68±0,05	0,15±0,02
BS+EL(Natur)	1559,6±103,7	290,8±23,4	190,9±12,4	173,6±19,7	5,2±0,8	0,99±0,08	0,80±0,11	0,19±0,02
BS+EL(Teccoil)	2120,8±179,8	204,1±21,2	165,7±20,0	155,0±14,9	9,3±3,0	1,21±0,08	0,87±0,11	0,23±0,03
BS+EL(Terrab)	1375,1±113,4	370,9±27,1	215,1±15,6	212,6±8,9	6,7±1,5	1,69±0,12	0,56±0,04	0,20±0,02
Media	1744,3c	285,2	202,5b	178,8	5,6	1,06a	0,80b	0,20b
Convencional								
NO ₃	1242,4±104,6	382,3±53,7	179,0±8,5	134,0±13,2	6,5±0,8	2,03±0,29	0,62±0,03	0,16±0,01
NH ₄	1175,7±123,4	304,2±25,2	172,1±17,7	244,2±6,4	4,8±1,0	1,30±0,10	0,49±0,05	0,17±0,01
Urea	1275,9±67,4	277,1±14,5	145,2±6,1	94,0±9,3	5,3±0,4	1,58±0,11	0,63±0,03	0,11±0,01
Media	1231,3a	321,2	165,4a	157,4	5,5	1,64b	0,58a	0,15a
Mixto								
BS+NO ₃	1696,3±53,9	277,1±27,6	197,4±13,0	144,6±9,3	3,1±0,5	0,74±0,13	0,62±0,03	0,16±0,01
BS+NH ₄	1359,3±171,1	324,7±25,2	193,7±13,3	265,6±21,8	3,7±0,3	1,10±0,05	0,62±0,03	0,20±0,01
BS+Urea	1442,0±38,1	273,7±6,6	182,9±2,9	144,9±8,4	5,0±1,4	0,88±0,03	0,57±0,05	0,16±0,01
Media	1499,2b	291,8	191,3b	185,1	3,9	0,90a	0,60a	0,18ab
	***	n.s.	**	n.s.	n.s.	***	***	**

*, ** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4)

Tabla 6.9. Concentración de Cl⁻, NO₃⁻, PO₄²⁻ y SO₄²⁻ (mg g⁻¹) en lechuga cultivada bajo tratamientos ecológico, convencional y mixto.

Tratamiento	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Ecológico				
BS+ES(AgrSol)	0,67±0,02	0,80±0,12	0,25±0,02	0,10±0,02
BS+ES(Lomb)	0,56±0,03	0,36±0,04	0,20±0,01	0,08±0,01
BS+ES(Negrot)	0,55±0,03	0,49±0,06	0,21±0,03	0,09±0,01
BS+EL(AgrLiq)	0,39±0,02	0,42±0,05	0,09±0,01	0,05±0,01
BS+EL(Natur)	0,45±0,06	0,47±0,08	0,13±0,02	0,07±0,01
BS+EL(Tecsoil)	0,92±0,12	0,29±0,05	0,16±0,01	0,07±0,01
BS+EL(Terrab)	0,47±0,05	0,49±0,05	0,21±0,02	0,06±0,01
Media	0,57b	0,47	0,18	0,07
Convencional				
NO ₃	0,42±0,02	0,36±0,05	0,12±0,01	0,07±0,01
NH ₄	0,44±0,02	0,33±0,02	0,24±0,02	0,05±0,01
Urea	0,31±0,02	0,68±0,07	0,08±0,01	0,06±0,01
Media	0,39a	0,49	0,15	0,06
Mixto				
BS+NO ₃	0,59±0,04	0,56±0,09	0,16±0,03	0,08±0,01
BS+NH ₄	0,43±0,01	0,41±0,05	0,25±0,02	0,07±0,01
BS+Urea	0,44±0,01	0,58±0,06	0,11±0,02	0,06±0,01
Media	0,49ab	0,52	0,17	0,07
	**	n.s.	n.s.	n.s.

*,** y ***, diferencias significativas entre medias a 5, 1 y 0,1% niveles de probabilidad, n.s., no significativo a p=5%. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre medias según el test de Duncan. Los valores son media ± error estándar (n=4).

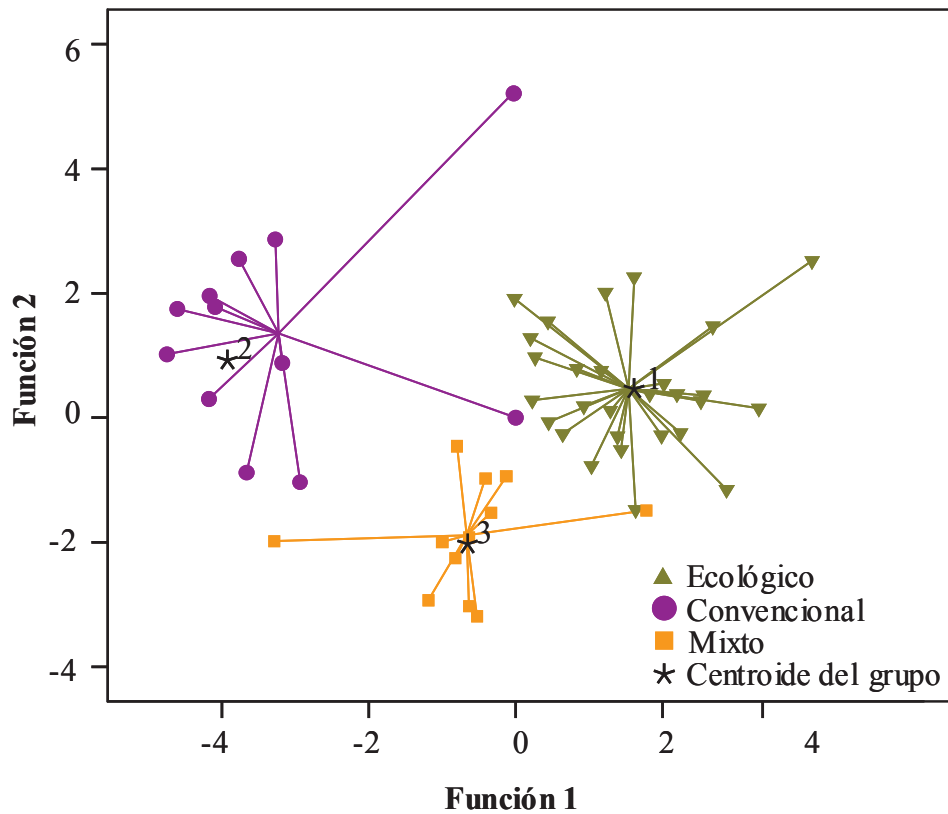


Figura 6.2. Histogramas de ADC en lechuga cultivada en ecológico (\blacktriangle), convencional (\bullet) y mixto (\blacksquare), utilizando $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea, Zn, Mn, ácido tartárico, ácido succínico, ABTS-H y FRAP-H como variables predictoras.

6.3. CONCLUSIONES

En el estudio de pimiento, la introducción de parámetros precosecha relacionados con el crecimiento de la planta y la composición isotópica de N permitió que un alto porcentaje (78,8%) de las muestras pudieran ser clasificadas correctamente por el ADC. Este porcentaje se redujo (69,2%), cuando sólo se utilizaron para construir el modelo parámetros postcosecha. En lechuga, el uso de parámetros precosecha en el ADC dio lugar a un menor porcentaje de casos clasificados con éxito (65,4%) en comparación con los datos de pimiento. La selección de los parámetros postcosecha, incluyendo los relacionados con el crecimiento vegetal, la composición de N y variables relacionadas con

la calidad y la composición mineral de lechuga, mejoró significativamente el modelo permitiendo que el 90,4% de las muestras de lechuga cultivadas bajo tratamientos E, C y M pudieran ser correctamente clasificados mediante validación cruzada. Independientemente de la especie (pimiento o lechuga) y de los parámetros estudiados (pre- o postcosecha), la mayoría de los casos mal clasificados fueron los de las plantas cultivadas bajo tratamientos mixtos (M). La metodología descrita tiene un alto potencial para ser utilizada como una herramienta para el control de la autenticidad del cultivo ecológico. En los resultados obtenidos, el tipo de suelo y las condiciones ambientales juegan un papel importante y por lo tanto, las investigaciones futuras deberían incluir el estudio del efecto de estos factores con el fin de confirmar la idoneidad de la metodología, teniendo en cuenta que los procesos bioquímicos que implican la pérdida de N y el posterior fraccionamiento isotópico a menudo conducen a un incremento de los valores de $\delta^{15}\text{N}$ del nitrógeno disponible del suelo y por lo tanto de la planta.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES GENERALES

A continuación se recogen las principales conclusiones obtenidas en los distintos capítulos de esta Tesis Doctoral, cuyo objetivo ha sido estudiar por un lado, el efecto de los sistemas de producción (ecológico, convencional y sin suelo) y del genotipo sobre la calidad de pimiento y lechuga respectivamente, y por otro lado, desarrollar una metodología fiable para detectar posibles aplicaciones fraudulentas de fertilizantes de síntesis en Agricultura Ecológica.

CALIDAD DE PIMIENTO BAJO SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA, CONVENCIONAL Y SIN SUELO

1. Los resultados del estudio comparativo de los diferentes sistemas de producción mostraron evidencias de que el manejo de la fertilización en la producción ecológica y convencional, puede influir en la calidad organoléptica y nutricional de pimiento. Sin embargo, estas diferencias sólo se observaron cuando dicho manejo implicó una limitación en la nutrición mineral del cultivo ecológico respecto al convencional.
2. Los parámetros de calidad de fruto afectados por el manejo de la fertilización (ecológica o convencional) fueron por un lado, peso, firmeza y concentración de ácido cítrico, cuyos valores fueron superiores en pimiento convencional, y por otro lado, clorofila, carotenoides y actividad antioxidante de la fracción lipofílica, cuyos valores fueron superiores en pimiento ecológico. Sin embargo, estas diferencias sólo se observaron bajo determinadas condiciones experimentales.

3. No se observaron diferencias en la concentración de compuestos fenólicos, vitamina C y actividad antioxidante de la fracción hidrofílica entre pimiento ecológico y convencional. Estos resultados fueron atribuidos a que, en los estudios realizados, las plantas cultivadas bajo producción ecológica no estuvieron sometidas, en mayor medida que las cultivadas bajo producción convencional, a ambientes estresantes (ataque de insectos, patógenos, etc.) responsables del aumento de la concentración de dichos metabolitos como respuesta de la planta al estrés biótico.
4. En pimiento Quito (tipo California), las diferencias en la composición de los frutos cultivados en suelo respecto a los producidos en cultivo sin suelo, sólo se apreciaron bajo condiciones de cultivo experimentales, a excepción de la concentración de ácido cítrico, que fue superior en pimiento cultivado en suelo, tanto en la aproximación experimental como en la comercial.
5. La respuesta de pimiento al cultivo sin suelo en la aproximación experimental, dependió de la variedad estudiada. En pimiento Almudén (tipo Lamuyo) sólo se observaron diferencias en la concentración de fructosa, que fue mayor en pimientos cultivados sin suelo, mientras, en pimiento Quito, este sistema de cultivo produjo una pérdida de calidad del fruto respecto al cultivado en suelo, al disminuir la concentración de gran parte de compuestos antioxidantes.
6. El efecto de la época de muestreo sobre las propiedades físicas y la composición nutricional y antioxidante del fruto fue, en la mayoría de los casos, más pronunciado que el efecto del sistema de cultivo. Además se observó, en muchos de los parámetros estudiados, una interacción entre el efecto del sistema de cultivo y el efecto del factor muestreo.

VARIABILIDAD GENOTÍPICA DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE LECHUGA

7. El estudio comparativo de la composición de lechuga Romana, Mini Romana y Little Gem mostró a Romana como el tipo de lechuga con mayor concentración en

compuestos fenólicos, vitamina C y folatos. Este mayor contenido en compuestos fenólicos puede considerarse una ventaja de la lechuga Romana frente a los otros tipos cuando ésta se comercializa entera para su consumo en fresco y por otro lado, una desventaja en el caso de ser procesada para cuarta gama.

8. La lechuga tipo Mini Romana mostró el mayor contenido de ácidos orgánicos y compuestos lipofílicos, incluyendo carotenoides y clorofilas, ambos con propiedades antioxidantes reconocidas.
9. La lechuga Little Gem presentó el mayor contenido en nitrato y la menor concentración en compuestos fenólicos, carotenoides y clorofilas.

DISCRIMINACIÓN DE PIMIENTO Y LECHUGA ECOLÓGICOS Y CONVENCIONALES

10. El análisis discriminante canónico (ADC) aplicado a muestras de pimiento y lechuga cultivados bajo producción ecológica, convencional y mixta, permitió una correcta clasificación en el 78,8 % y el 65,4 % de los casos, respectivamente, utilizando como variables predictoras valores de abundancia natural de ^{15}N en la parte aérea (pimiento) o la raíz (lechuga). La mayoría de los casos mal clasificados correspondieron a plantas cultivadas bajo fertilización mixta.
11. En lechuga, la introducción en el ADC de valores de $\delta^{15}\text{N}$, concentración de metabolitos, actividad antioxidante y contenido mineral de la parte comestible, permitió una correcta clasificación, en el 90,4 % de los casos por validación cruzada.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abak, K., Celikel, G. 1994. Comparison of some Turkish originated organic and inorganic substrates for tomato soilless culture. *Acta Horticulturae* 366, 423-427.
- Abbas, M.A., Younis, M.E., Shukry, W.M. 1991. Plant-growth, metabolism and adaptation in relation to stress conditions. *Journal of Plant Physiology* 138, 722-727.
- Abbott, J.A. 1999. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 15, 207-225.
- Aguirre, R., May, J.M. 2008. Inflammation in the vascular bed: Importance of vitamin C. *Pharmacology and Therapeutics* 119, 96-103.
- Alasalvar, C., Grigorr, J.M., Zhang, D. 2001. Comparison of volatiles, phenolic compounds, sugars, antioxidant vitamins and sensory quality of different coloured carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1410-1416.
- Anuario estadístico de la Región de Murcia, 2011.
http://www.carm.es/econet/anuario/actual/anuario_tomoI_5.html
- Asami, D.K., Hong, Y.J., Barrett, D.M., Mitchell, A.E. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1237-1241.
- B.O.R.M. 2007. Orden 26 de noviembre de 2007 por la que se regulan las normas técnicas de producción integrada en el cultivo de pimiento de invernadero. *Boletín Oficial de la Región de Murcia* 287, 34657-34674.

- Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A., Aruoma, O.I. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1553-1561.
- Bañuelos, G.S., Pasakdee, S. 2002. Effect of organic fertilizers on vegetable production. *Biocycle* 43, 63.
- Barnes, S., Kirk, M., Coward, L. 1994. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 2466-2474.
- Bateman, A.S., Kelly, S.D. 2007. Fertilizer nitrogen isotope signatures. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 43, 237-247.
- Behr, U., Wiebe, H.J. 1992. Relation between photosynthesis and nitrate content of lettuce cultivars. *Scientia Horticulturae* 49, 175-179.
- Belitz, H.D., Grosch, W. 2004. *Química de los alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- Bendich, A., Olson, J.A. 1989. Biological actions of carotenoids. *FASEB Journal* 1927-1932.
- Benoit, F., Ceustermans, N. 1987. Some qualitative aspects of tomatoes grown on NFT. *Soilless Culture* 3, 3-7.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239, 70-76.
- Beverly, R.B., Latimer, J.G., Smittile, D.A. 1993. *Postharvest Handling: A System Approach*. Academic Press, New York 73-98.
- Birch, G.G., Pepper, T. 1983. Protection of vitamin C by sugars and their hydrogenated derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31, 980-985.
- Bjorklund, N.K., Gordon, R. 2006. A hipótesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. *International Journal of Developmental Biology* 50, 135-141.
- Böhm, V. 2001. Use of column temperature to optimize carotenoid isomer separation by C30 high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 24, 955-959.

- Bonnans, S., Noble, A.C. 1993. Effect of sweetener type and of sweetener and acid levels on temporal perception of sweetness, sourness and fruitiness. *Chemical Senses* 18, 273-283.
- Bosland, P.W., Votava, E.J. 2000. Peppers: Vegetable and spice Capsicums. *Crop Production Science in Horticulture* 12. CAB. International Publishing, Wallingford, England, UK. 204.
- Botto, L.D., Moore, C.A., Khoury, M.J., Erickson, J.D. 1999. Neural tube defects. *New England Journal of Medicine* 341, 1509-1519.
- Bourn, D., Prescott, J. 2002. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42, 1-34.
- Britton, G. 1991. Carotenoids. Ed. Dey, P.M., Harborne, J.B. *Methods in plant Biochemistry*, London: Academic Press 473-518.
- Britton, G. 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. Ed. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. *Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland* 3, 13-147.
- Bulluck, L.R., Brosius, M., Evanylo, G.K., Ristaino, J.B. 2002. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Applied Soil Ecology* 19, 147-160.
- Buratti, S., Pellegrini, N., Brenna, O.V., Mannino, S. 2001. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5136-5141.
- Burns, I.G., Lee, A., Escobar-Gutiérrez, A.J. 2004. Nitrate accumulation in protected lettuce. *Acta Horticulturae* 633, 271-278.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J., Crozier, A. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3337-3340.
- Cadenas, E. 1995. Mechanism of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. Ed. Ahmed, S. *Oxidative Stress and Antioxidant Defences in Biology*. Chapman and Hall, New York 1-61.

- Camin, F., Moschella, A., Miselli, F., Parisi, B., Versini, G., Ranalli, P., Bagnaresi, P. 2007. Evaluation of markers for the traceability of potato tubers grown in an organic versus conventional regime. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 1330-1336.
- Camin, F., Perini, M., Bontempo, L., Fabroni, S., Faedi, W., Magnani, S., Baruzzi, G., Bonoli, M., Tabilio, M.R., Musmeci, S., Rossmann, A., Kelly, S.D., Rapisarda, P. 2011. Potential isotopic and chemical markers for characterising organic fruits. *Food Chemistry* 125, 1072-1082.
- Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M., Arnao, M.B. 2002. On-line antioxidant activity determination: Comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS⁺ assay. *Redox Report* 7, 103-109.
- Cano, A., Arnao, M.B. 2005. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity in different leaves of three lettuce varieties. *International Journal of Food Properties* 8, 521-528.
- Cantos, E., Espin, J.C., Tomás-Barberán, F.A. 2002. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5691-5696.
- Capuano, E., Boerrigter-Eenling, R., van der Veer, G., van Ruth, S.M. 2013. Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 12-28.
- Carbonaro, M., Mattera, M., Nicoli, S., Bergamo, P., Cappelloni, M. 2002. Modulation of antioxidant compounds in organic vs. conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5458-5462.
- Caris-Veyrat, C., Amiot, M.J., Tyssandier, V., Grasselly, D., Buret, M., Mikolajczak, M., Guillard, J.C., Bouteloup-Demange, C., Borel, P. 2004. Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees; Consequences on antioxidant plasma status in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6503-6509.

- Chandler, C.J., Wang, T.T.Y., Halsted, C.H. 1986. Pteroylpolyglutamate hydrolase from human yeyunal brush borders. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry* 261, 928-933.
- Chapman, H.D., Pratt, P.F. 1961. *Methods of analysis for soils, plant and waters*. University of California, Agriculture Publications, Barkely, California 309.
- Chassy, A.W., Bui, L., Renaud, E.N.C., Van Horn, M., Mitchell, A.E. 2006. Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8244-8252,
- Chiesa, A., Frezza, D., Moccia, S., Oberti, A., Fraschina, A., Diaz, L. 2005. Vegetable production technology and postharvest quality. *Acta Horticulturae* 682, 565-572.
- Choi, W.J., Lee, S.M., Ro, H.M., Kim, K.C., Yoo, S.H. 2002. Natural ¹⁵N abundances of maize and soil amended with urea and composted pig manure. *Plant and Soil* 245, 223-232.
- Choi, W.J., Ro, H.M., Hobbie, E.A. 2003. Patterns of natural ¹⁵N in soils and plants from chemically and organically fertilized uplands *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1493-1500.
- Clark, M.S., Horwath, W.R., Shennan, C., Scow, K.M., Lantni, W.T., Ferris, H. 1999. Nitrogen, weeds and water as yield-limiting factors in conventional, low-input, and organic tomato systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 73, 257-270.
- Clarkson, D.T. 1984. Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant Cell Enviroment* 7, 449-456.
- Clifford, M.N. 1999. Review: Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and other dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 362-372.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N. 2003. A hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2900-2911.

- Clydesdale, F.M. 1993. Color as a factor in food choice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33, 83-101.
- Colla, G., Mitchell, J.P., Poudel, D.D., Temple, S.R. 2002. Changes of tomato yield and fruit elemental composition in conventional, low input, and organic systems. *Journal of Sustainable Agriculture* 20, 53-67.
- Correia, M., Barroso, A., Barroso, M.F., Soares, D., Oliveira, M., Delerue-Matos, C. 2010. Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. *Food Chemistry* 120, 960-966.
- Couture, R., Cantwell, M.I., Ke, D., Saltveit, M.E. 1993. Physiological attributes related to quality attributes and storage life of minimally processed lettuce. *HortScience* 28, 723-725.
- Crisosto, C.H., Mitchell, F.G. 2007. Factores precosecha que afectan la calidad de frutas y hortalizas. *Tecnología Poscosecha de Productos Hortofrutícolas*. 3ª edición. Ed. Kader, A. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, California, USA 55-62.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolism). *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*. Ed. Gruissem, B.W., Jones, R., Rockville, M.D. American Society of Plant Physiologist 1250-1318.
- Crozier, A., Yokota, T., Jaganath, I.B., Marks, S.C., Saltmarsh, M., Clifford, M.N. 2006. Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant based dietary components. *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford: Blackwell Publishing 208-302.
- Dangour, A.D., Lock, K., Hayter, A., Aikenhead, A., Allen, E., Uauy, R. 2010. Nutrition-related health effects of organic foods: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition* 92, 203-21.
- Daniel, O., Meier, M.S., Schlatter, J., Frischknecht, P. 1999. Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulation by pesticides. *Environmental and Health Perspectives* 107, 109-114.

- Dashwood, R., Negishi, T., Hayatsu, H., Breinholt, V., Hendricks, J., Bailey, G. 1998. Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B1: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399, 245-253.
- Davis, R.M., Subbarao, K.V., Raid, R.N., Kurtz, E.A. 2002. Plagas y enfermedades de la lechuga. *The American Phytopathological Society* 1-2.
- Dégenève, A. 2004. Antioxidants in Fruits and Vegetables. MSc Thesis, University of Glasgow 250-252.
- Delwiche, C.C., Steyn, P.L. 1970. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Environmental Science and Technology* 4, 929-935.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1, 21-27.
- Dixon, R.A., Steele, C.L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids—a goldmine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* 4, 394-400.
- Drews, M., Schonhof, I., Krumbein, A. 1997. Gehalt an Inhaltsstoffen in Eissalat (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L.) in Abhängigkeit von Sorte und Stadium der Kopfentwicklung beim Anbau im Gewächshaus. *Gartenbauwiss* 62, 65-72.
- DuPont, M.S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K.R. 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3957-3964.
- Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. 2006. Polifenoles y Salud: Propiedades biológicas de uva y de la granada. *Investigación y ciencia* 34-36.
- Evans, R.D. 2001. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *Trends in Plant Science* 6, 121-126.
- Everaarts, A.P., Blom-Zandstra, M. 2001. Internal tipburn of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) Review Article. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76, 515-521.

- Fabian, F., Blum, H. 1943. Relative taste potency of some basic food constituents and their competitive and compensatory action. *Food Research International* 8, 179-193.
- Fabré, E., González de Agüero, R., Sobreviela, M., Loú, C., Sánchez-Dehesa, M. 2000. Uso de los folatos en la gestación. *Revista Española de Ginecología y Obstetricia* 1, 254-60.
- Fennema, O.R. 2000. *Química de los alimentos*. 2. Ed. Saracoza: Acribia.
- Fenoll, J., Martínez, A., Hellin, P., Flores, P. 2011. Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* 127, 340-344.
- Ferruzzi, M.G., Blakeslee, J. 2007. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research* 27, 1-12.
- Ferruzzi, M.G., Bohm, V., Courtney, P.D., Schwartz, S.J. 2002. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *Journal of Food Science* 67, 2589-2595.
- Flores, P., Castellar, I., Hellin, P., Fenoll, J., Navarro, J. 2007. Response of pepper plants to different rates of mineral fertilizers after soil biofumigation and solarization. *Journal of Plant Nutrition* 30, 367-379.
- Flores, P., Fenoll, J., Hellin, P. 2007. The feasibility of using delta ^{15}N and delta ^{13}C values for discriminating between conventionally and organically fertilized pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5740-5745.
- Flores, P., Hellin, P., Fenoll, J. 2012. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry* 132, 1049-1054.
- Flores, P., Hellin, P., Lacasa, A., Lopez, A., Fenoll, J. 2009. Pepper mineral composition and sensory attributes as affected by agricultural management. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 2364-2371.
- Flores, P., Navarro, J.M., Garrido, C., Rubio, J.S., Martínez, V. 2004. Influence of Ca^{2+} , K^{+} and NO_3^{-} fertilisation on nutritional quality of pepper. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 569-574.

- Foote, C.S., Chang, Y.C., Denny, R.W. 1970. Chemistry of singlet oxygen X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Chemical Society* 92, 5216-5218.
- Frantz, J.M., Ritchie, G., Cometti, N.N., Robinson, J., Bugbee, B. 2004. Exploring the limits of crop productivity. Beyond the limits of tipburn in lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129, 331-338.
- Fraser, P.D., Bramley, P.M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of Carotenoids. *Journal of Lipid Research* 43, 228-265.
- Furusawa, N. 2001. Rapid high performance liquid chromatographic identification-quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control* 12, 27-29.
- Galdon, R., Rodriguez, B., Rodriguez, E.M., Diaz, R.C. 2008. Flavonoids in onion cultivars (*Allium cepa* L). *Food Science* 73, 599-605.
- Gary, C. 2003. Crop stresses and their management in greenhouse production. *Acta Horticulturae* 614, 489-496.
- Georgi, M., Voerkelius, S., Rossmann, A., Grassmann, J., Schnitzler, W.H. 2005. Multielement isotope ratios of vegetables from integrated and organic production. *Plant and Soil* 275, 93-100.
- Gerster, H. 1991. Potential role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 61, 277-91.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4581-4589.
- Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rimm, E.B., Trichopoulos, D., Rosner, B.A., Speizer, F.E., Willett, W.C. 1993. Folate, methionine and alcohol intake and risk of colorectum adenoma. *Journal of the National Cancer Institute* 85, 875-84.
- Goldman, I.L., Kader, A.A., Heintz, C. 1999. Influence of production, handling, and storage on phytonutrient content of foods. *Nutrition Reviews* 57, S46-S52.

- Greco, L., Riccio, R., Bergero, S., Del Re, A.A.M., Trevisan, M. 2007. Total reducing capacity of fresh sweet peppers and five different Italian pepper recipes. *Food Chemistry* 103, 1127-1133.
- Gregory, J.F., Sartain, D.B., Day, B.P.F. 1984. Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. *Journal of Nutrition* 114, 341-353.
- Gregory, J.F. 1995. The bioavailability of folate. Ed. L.B. Bailey. *Folate in Health and Disease*. New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc. 195-235.
- Grinder-Pedersen, L., Rasmussen, S.E., Bügel, S., Jørgensen, L.V., Dragsted, L.O., Gundersen, V., Sandström, B. 2003. Effect of diets based on foods from conventional versus organic production on intake and excretion of flavonoids and markers of antioxidative defense in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5671-5676.
- Grindlay, D.J.C. 1997. Towards an explanation of crop nitrogen demand based on the optimization of leaf nitrogen per unit leaf area. *Journal of Agricultural Science* 128, 377-396.
- Gross, J. 1987. Pigments in fruits. Ed. Schweigert B.S. *Food science and technology: a series of monographs*. London: Academic Press.
- Güler, H.G., Olympios, C., Gerasopoulos, D. 1995. The effect of the substrate on the fruit quality of hydroponically grown melons (*Cucumis melo* L.). *Acta Horticulturae* 379, 261-266.
- Gutser, R., Ebertseder, T., Weber, A., Schraml, M., Schmidhalter, U. 2005. Short-term and residual availability of nitrogen after long-term application of organic fertilizers on arable land. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168, 439-446.
- Hajslova, J., Schulzova, V., Slanina, P., Janne, K., Hellenas, K.E., Andersson, C. 2005. Quality of organically and conventionally grown potatoes: Four-year study of micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymic browning and organoleptic properties. *Food Additives and Contaminants* 22, 514-534.

- Han, X., Shen, T., Lou, H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8, 950-988.
- Handley, L.L., Scrimgeour, C.M. 1997. Terrestrial plant ecology and ^{15}N natural abundance: The present limits to interpretation for uncultivated systems with original data from a Scottish old field. *Advances in Ecological Research* 27, 133-212.
- Haneklaus, S., Hagel, I., Paulsen, H.M., Schnug, E. 2002. Objectives of plant nutrition research in organic farming. *Landbauforsch Volk* 52, 61-68.
- Haraldsen, T.K., Asdal, A., Grasdalen, C., Nesheim, L., Ugland, T.N. 2000. Nutrient balances and yields during conversion from conventional to organic cropping systems on silt loam and clay soils in Norway. *Biological Agriculture and Horticulture* 17, 229-246.
- Harbone, J.B., Williams, A.C. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Helyes, L., Brandt, S., Reti, K., Barna, E., Lugasi, A. 2003. Appreciation and analysis of lycopene content of tomato. *Acta Horticulturae* 604, 513-537.
- Herencia, J.F., Ruiz-Porras, J.C., Melero, S., Garcia-Galavis, P.A., Morillo, E., Maqueda, C. 2007. Comparison between organic and mineral fertilization for soil fertility levels, crop macronutrient concentrations, and yield. *Agronomy Journal* 99, 973-983.
- Herrmann, K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28, 315-347.
- Hertog, M.G.L., Fesens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342, 1007-1011.
- Hodges, D.M., Forney, C.F. 2003. Postharvest ascorbate metabolism in two cultivars of spinach differing in their senescence rates. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128, 930-935.
- Hong, Y.J., Barrett, D.M., Mitchell, A.E. 2004. Liquid chromatography/mass spectrometry investigation of the impact of thermal processing and storage on peach procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2366-2371.

- Hord, N.G., Tang, Y.P., Bryan, N.S. 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *American Journal of Clinical Nutrition* 90, 1-10.
- Howard, L.R., Smith, R.T., Wagner, A.B., Villalon, B., Burns, E.E. 1994. Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed jalapenos. *Journal of Food Science* 59, 362-365.
- Ihl, M., Shene, C., Scheuermann, E., Bifani, V. 1994. Correlation of pigment content through colour determination using tristimulus values in a green leafy vegetable, Swiss chard. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 66, 527-531.
- James, S.J., Pogribna, M., Pogribny, I.P., Melnyk, S., Hine, R.J., Gibson, J.B., Yi, P., Tafoya, D.L., Swenson, D.H., Wilson, V.L., Gaylor, D.W. 1999. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for down syndrome. *American Journal of Clinical Nutrition* 70, 495-501.
- Jensen, M.H. 2001. Controlled environment agriculture in deserts, tropics and temperate regions-A world review. *International Symposium on Design and Environmental Control of Tropical and Subtropical Greenhouses* 578, 19-25.
- Joshiyura, K.J., Ascherio, A., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Rimm, E.B., Speizer, F.E., Hennekens, C.H., Spiegelman, D., Willett, W.C. 1999. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *Jama* 282, 1233-1239.
- Kader, A.A. 2007. *Biología y tecnología poscosecha: Un panorama*. Ed. Kader, A. *Tecnología Poscosecha de Productos Hortofrutícolas*. 3ª edición. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, California, USA 43-54.
- Kader, A.A. 2008. Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1863-1868.
- Kalt, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science* 70, R11-R19.

- Kalt, W., Forney, C.F., Martin, A., Prior, R.L. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4638-4644.
- Kanazawa, K., Sakakibara, H. 2000. High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 844-848.
- Kays, S.J. 1999. Preharvest factors affecting appearance. *Postharvest biology and technology* 15, 233-247.
- 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 Chemistry* 119, 738-745.
- Kerley, S.J., Jarvis, S.C. 1996. Preliminary studies of the impact of excreted N on cycling and uptake of N in pasture systems using natural abundance stable isotopic discrimination *Plant and Soil* 178, 287-294.
- Kimura, M., Rodriguez-Amaya, D.B. 2003. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2603-2607.
- Konings, E.J.M. 1999. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. *Journal of AOAC International* 82, 119-127.
- Kopsell, D.A., Kopsell, D.E., Lefsrud, M.G. 2004. Variation in lutein, b-carotene, and chlorophyll concentrations among Brassica oleraceae cultivars and seasons. *HortScience* 39, 361-364.
- Krause, G.H. 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damage and protective mechanisms. *Physiologia Plantarum* 74, 566-574.
- Krause, M., Galensa, G. 1992. Determination of naringenin and naringenin-chalcone in tomato skins by reversed phase HPLC after solid phase extraction. *Z Lebensmittel Forschung A* 194, 29-32.
- Krinsky, N.I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine* 7, 617-635.

- Krinsky, N.I. 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 66, 1003-1010.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine* 113, 71-88.
- Kulp, K., Lorenz, K., Stone, M. 1991. Functionality of carbohydrates ingredients in bakery products. *Food Technology* 45, 136-142
- Kunsch, U., Scharer, H., Durr, P., Hurter, J., Martinoni, A., Jelmini, G., Sulser, H., Seeger, B. 1994. Quality assessment of tomatoes from soilless and conventional glasshouse production. *Gartenbauwissenschaft* 59, 21-26.
- Lairon, D. 2010. Nutritional quality and safety of organic food. *A review. Agronomy for Sustainable Development* 30, 33-41.
- Lee, S.K., Kader, A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 20, 207-220.
- Lee, Y., Howard, L.R., Villalon, B., 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *Journal of Food Science* 60, 473-476.
- Leichter, J., Landymore, A.F., Krumdieck, C.L. 1979. Folate conjugase activity in fresh vegetables and its effects on the determination of free folate content. *American Journal of Clinical Nutrition* 32, 92-95.
- Lester, G. 2006. Organic versus conventionally grown produce: Quality differences, and guidelines for comparison studies. *HortScience* 41, 296-300.
- Li, Y., Schellhorn, H.E. 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *Journal of Nutrition* 137, 2171-2184.
- Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Lanzi, S., Aguzzi, A., Cappelloni, M. 2004. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 90-94.

- Luning, P.A., van der Vurst de Vries, R., Yuksel, D., Ebbenhorst-Seller, T., Wichers, H.J., Roozen, J.P. 1994. Combined instrumental and sensory evaluation of flavor of fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) harvested at three stages of maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 2855-2861.
- Luthria, D.L., Mukhopadhyay, S., Krizek, D. 2006. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 771-777.
- Maag, M., Vinther, F.P. 1996. Nitrous oxide emission by nitrification and denitrification in different soil types and at different soil moisture contents and temperatures. *Applied Soil Ecology* 4, 5-14.
- Macneish, R.S. 1964. Ancient mesoamerican civilization-long archeological sequence from Tehuacan Mexico may give new data about of this civilization. *Science* 143, 531-538.
- Magkos, F., Arvaniti, F., Zampelas, A. 2003. Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 54, 357-371.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727-747.
- Maoka, T., Mochida, K., Kozuka, M., Ito, Y., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Enjok, F., Ogata, M., Nobukuni, Y., Tokuda, H., Nishino, H. 2001. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. *Cancer Letters* 172, 103-109.
- Maroto, J.V., Gómez, A.M., Baixauli, C. 2000. La lechuga y la escarola. Ed. Mundi Prensa. Cuadernos de Agricultura N° 6 242.
- Martínez-Valverde, J., Periago, M.J., Ros, G. 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50, 5-18.
- Mcguire, R.G. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27, 1254-1255.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Philosoph-Hadas, S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of agricultural and food chemistry* 43, 1813-1819.

- Melse-Boonstra, A. 2003. Dietary folate: Bioavailability studies in humans. PhD Thesis. Wageningen Centre for Food Science. Wageningen University, The Netherlands.
- Milla, A. 1996. Capsicum de capsia, cápsula el pimiento. Compendios de Horticultura 9, 21-31.
- Mitchell, A.E., Hong, Y.J., Koh, E., Barrett, D.M., Bryant, D.E., Denison, R.F., Kaffka, S. 2007. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 6154-6159.
- Moeller, S.M., Jacques, P.F., Blumberg, J.B. 2000. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. Journal of the American College of Nutrition 19, 522-527.
- Mou, B. 2009. Nutrient content of lettuce and its improvement. Current Nutrition and Food Science 5, 242-248.
- Mou, B. 2005. Genetic variation of beta-carotene and lutein contents in lettuce. Journal of the American Society for Horticultural Science 130, 870-876.
- Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferricreducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. Food Chemistry 129, 139-148.
- Nagata, M., Yamashita, I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology 39, 925-928.
- Nakano, A., Uehara, Y. 2007. Effects of different kinds of fertilizer and application methods on delta ^{15}N values of tomato. Japan Agricultural Research Quarterly 41, 219-226.
- Nicolle, C., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L., Rock, E., Michel, H., Amouroux, P., Remesy, C. 2004. Characterization and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa folium*). Journal of the Science of Food and Agriculture 84, 2061-2069.

- Nielsen, T.H., Skjærbæ, H.C., Karlsen, P. 2006. Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Physiologia Plantarum* 82, 311-319.
- Nuez, F., Gil, R., Costa, J. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundiprensa.
- Oliveira, A.P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentao, P., Seabra, R.M., Silva, B.M. 2008. Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chemistry* 111, 393-399.
- Ordóñez-Santos, L.E., Vázquez-Odériz, M.L., Romero-Rodríguez, M. 2011. Micronutrient contents in organic and conventional tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 46, 1561-1568.
- Oyama, H., Shinohara, Y., Ito, T. 1999. Effects of air temperature and light intensity on β -carotene concentration in spinach and lettuce. *Japanese Society for Horticultural Science* 68, 414-420.
- Özçelik, N., Akilli, M. 1999. Effects of CO₂ enrichment on vegetative growth, yield and quality of greenhouse-grown tomatoes in soil and soilless cultures. *Acta Horticulturae* 491, 155-160.
- Ozgen, S., Sekerci, S. 2011. Effect of leaf position on the distribution of phytochemicals and antioxidant capacity among green and red lettuce cultivars. *Spanish Journal of Agricultural Research* 9, 801-809.
- Paganga, G., Miller, N.G., Rice-Evans, C.A. 1999. The phenolic content of fruits and vegetables and their antioxidant activities, What does a serving constitute?. *FEBS Letter* 401, 78-82.
- Palozza, P., Krinsky, N.I. 1992. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. *Methods in Enzymology* 213, 403-420.
- Pangborn, R.M. 1963. Relative taste intensities of selected sugars and organic acids. *Journal of Food Science* 28, 726-733.
- Paraskevopoulou-Paroussi, G., Paroussi, E. 1995. Precocity, plant productivity and fruit quality of strawberry plants grown in soil and soilless culture. *Acta Horticulturae* 408, 109-117.

- Peet, M.M. 1999. Greenhouse crop stress management. *Acta Horticulturae* 481, 643-654.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition* 133, 2812-2819.
- Perucka, I., Materska, M. 2007. Antioxidant vitamin contents of *Capsicum annuum* fruit extracts as affected by processing and varietal factors. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* 6, 67-73.
- Phillips, S.B., Mullins, G.L., Donohue, S.J. 2002. Changes in snap bean yield, nutrient composition, and soil chemical characteristics when using broiler litter as fertilizer source. *Journal of Plant Nutrition* 25, 1607-1620.
- Poiroux-Gonord, F., Bidel, L.P., Fanciullino, A.L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F., Urban, L. 2010. Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and Prospects To Increase Their Concentrations by Agronomic Approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12065-12082.
- Poovaiah, B.W., Glenn, G.M., Reddy, A.S.N. 1988. Calcium and fruit softening: Physiology and biochemistry *Horticultural Reviews* 10, 107-152.
- Porter, L.J. 1988. Flavans and proanthocyanidins. Ed. Harborne J.B. *The Flavonoids: advances in research since 1980*. Chapman and Hall 21-62.
- Raigon, M.D., Rodriguez-Burruezo, A., Prohens, J. 2010. Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 6833-6840.
- Rapisarda, P., Calabretta, M.L., Romano, G., Intrigliolo, F. 2005. Nitrogen metabolism components as a tool to discriminate between organic and conventional citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2664-2669.
- Real Decreto 1201/2002, de 20 de noviembre, por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. B.O.E. 287, 42028-42040.

- Recamales, A.F., Medina, J.L., Hernanz, D. 2007. Physicochemical characteristics and mineral content of strawberries grown in soil and soilless system. *Journal of Food Quality* 30, 837-853.
- Reglamento (CE) nº 834/2007, de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos. DO L 189 de 20.7.2007.
- Rembialkowska, E. 2003. Organic Farming as a System to Provide Better Vegetable Quality. *Acta Horticulturae* 604, 473-480.
- Ren, H., Endo, H., Hayashi, T. 2001. Antioxidative and antimutagenic activities and polyphenol content of pesticide-free and organically cultivated green vegetables using water-soluble chitosan as a soil modifier and leaf surface spray. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 1426-1432.
- Robbins, R.J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51 2866-2887.
- Rohlig, R., Engel, K.H. 2010. Influence of the input system (conventional *versus* organic farming) on metabolite profiles of maize (*Zeamays*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 3022-3030.
- Romani, A., Pinelli, P., Galardi, C. Sani, G. Cimato, A., Heimler, D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry* 79, 337-342.
- Romajaro, F., Martínez-Madrid, M.C., Pretel, M.T. 2006. Factores precosecha determinantes de la calidad y conservación en poscosecha de productos agrarios. V Simposio Ibérico VIII Nacional de Maduración y Post-Recolección 91-96.
- Rouphael, Y., Colla, G., Battistelli, A., Moscatello, S., Proietti, S. 2004. Yield, water requirement, nutrient uptake and fruit quality of zucchini squash grown in soil and closed soilless culture. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79, 423-430.
- Santamaría, P. 2006 Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 10-17.
- Schifferstein, H.N.J., Fritjers, J.E.R. 1990. Sensory integration in citric acid/sucrose mixtures. *Chemical Senses* 15, 87-109.

- Scott, J., Rébeillé, F., Fletcher, J. 2000. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 795-824.
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J. 2002. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 346, 476-483.
- Shackel, K.A., Grece, C., Labavitch, J.M., Ahmadi, H. 1991. Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiology* 97, 814-816.
- Shinohara, Y., Suzuki, Y. 1991. Effects of light and nutritional conditions on the ascorbic acid content of lettuce. *Journal Japanese Society for Horticultural Science* 50, 239-246.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic-phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Siomos, A.S., Beis, G., Papadopoulou, P.P., Nasi, P., Kaberidou, I., Barbayiannis, N. 2001. Quality and composition of lettuce (cv. 'Plenty') grown in soil and soilless culture. *Acta Horticulturae* 548, 445-449.
- Slattery, M.L., Benson, J., Curtin, K., Ma, K.N., Schaeffer, D., Potter, J.D. 2000. Carotenoids and colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 575-582.
- Smil, V. 1997. Global population and the nitrogen cycle. *Scientific American* 277, 58-63.
- Smith, P.S., Heiser, C.B. 1957. Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 84, 413-420.
- Snodderly, D.M. 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *American Journal of Nutrition* 62, 1448-1462.
- Soares-Gomes, A., Trugo, L.C., Botrel, N., Da Silva-Souza, L.F. 2005. Reduction of internal browning of pineapple fruit (*Ananas comusus* L.) by preharvest soil application of potassium. *Postharvest Biology and Technology* 35, 201-207.
- Steinmetz, K.A., Potter, J.D. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association* 96, 1027-1039.

- Stertz, S.C., Santo, A.P.D., Bona, C., de Freitas, R.J.S. 2005. Comparative morphological analysis of cherry tomato fruits from three cropping systems. *Scientia Agricola* 62, 296-298.
- Sturm, M., Kacjan-Marsic, N., Lojen, S. 2011. Can delta $\delta(15)N$ in lettuce tissues reveal the use of synthetic nitrogen fertiliser in organic production?. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 262-267.
- Suzuki, Y., Nakashita, R., Akamatsu, F., Korenaga, T. 2009. Multiple stable isotope analyses for verifying geographical origin and agricultural practice of japanese rice samples. *Bunseki Kagaku* 58, 1053-1058.
- Tauguinas, A.L., Hoyos, S., Cravzov, A.L., Avallone, C.M. 2004. Análisis de niveles de concentración de vitamina C en mieles de la provincia del Chaco. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas T044*, 1-4.
- Thévenet, G. 1995. Du principe de vegetation à la fertilisation raisonnée. *Phytoma – La Defense des Vegetaux* 504, 56-60.
- Thybo, A.K., Bechmann, I.E., Brandt, K. 2005. Integration of sensory and objective measurements of tomato quality: quantitative assessment of the effect of harvest date as compared with growth medium (soil *versus* rockwool), electrical conductivity, variety and maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 2289-2296.
- Tognoni, F., Pardossi, A., and Serra, G. 1999. Strategies to match greenhouses to crop production. *Acta Horticulturae* 481, 451-461.
- Vahteristo, L.T., Ollilainen, V., Koivistoinen, P.E., Varo, P. 1996. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 477-482.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H.F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., Stahl, W. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 880-912.

- Vitoria, L., Otero, N., Soler, A., Canals, A. 2004. Fertilizer characterization: Isotopic data (N, S, O, C, and Sr). *Environmental Science and Technology* 38, 3254-3262.
- Vogtmann, H., Matthies, K., Kehres, B., Meier-Ploeger, A. 1993. Enhanced food quality: Effects of compost on the quality of plant foods. *Compost Science and Utilization* 1, 82-100.
- Wang, C., Riedl, K.M., Schwartz, S.J. 2010. A liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for quantitative determination of native 5-methyltetrahydrofolate and its polyglutamyl derivatives in raw vegetables. *Journal of Chromatography B* 878, 2949-2958.
- Wang, S.Y., Chen, C.T., Sciarappa, W., Wang, C.Y., Camp, M.J. 2008. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 5788-5794.
- Warman, P.R. 2005. Soil fertility, yield and nutrient contents of vegetable crops after 12 years of compost or fertilizer amendments. *Biological Agriculture and Horticulture* 23, 85-96.
- Wassenaar, L.I. 1995. Evaluation of the origin and fate of nitrate in the Abbotsford aquifer using the isotopes of ^{15}N and ^{18}O in NO_3^- . *Applied Geochemistry* 10, 391-405.
- Waterhouse, A.L. 2002. Wine phenolic. *Annals of the New York Academic of Sciences*. 957, 21.36.
- Weerakkody, W.A.P. 2003. Nutritional value of fresh leafy vegetables as affected by pre-harvest factors. *Acta Horticulturae* 604, 511-515.
- Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., Birt, D.F. 1990. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Research* 50, 499-502.
- White, P.J. 2001. The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany* 52, 891-899.
- Williams, C.M. 2002. Nutritional quality of organic food: shades of grey or shades of green? *Proceedings of the Nutrition Society* 61, 19-24.

- Winter, C.K., Davis, S.F. 2006. Organic foods. *Journal of Food Science* 71, 117-124.
- Woese, K., Lange, D., Boess, C., Bogl, K.W. 1997. A comparison of organically and conventionally grown foods - Results of a review of the relevant literature. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74, 281-293.
- Worthington, V. 2001. Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 7, 161-173.
- Wszelaki, A.L., Delwiche, J.F., Walker, S.D., Liggett, R.E., Scheerens, J.C., Kleinhenz, M.D. 2005. Sensory quality and mineral and glycoalkaloid concentrations in organically and conventionally grown redskin potatoes (*Solanum tuberosum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 720-726.
- Youdim, K.A., J.A. Joseph. 2001. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 583-594.
- Ziegler, R.G. 1993. Carotenoids, cancer and clinical trials. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691, 120-127.

