

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**NIVELES DE NITRATO EN HORTALIZAS DE HOJA EN
URUGUAY: VALORES TÍPICOS, RANGOS DE VARIACIÓN Y
EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS DE DETERMINACIÓN**

por

Andrés Nicolás BERETTA BLANCO

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magister en Ciencias Agrarias Opción
Ciencias del Suelo

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2011**

Tesis aprobada por:

Jorge Monza

Mónica Barbazán

Roberto Docampo

Fecha: 14/4/2009

Autor:

Andres Beretta

Director:

Carlos Perdomo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Amílcar Rodríguez y Daniel Arana por su gran colaboración en las tareas de campo; a Carlos Perdomo, Jorge Monza y Omar Casanova por todos sus aportes y la guía que me brindaron durante toda la Maestría. A mis compañeros de estudios... y a mi familia.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	V
RESUMEN	VIII
SUMMARY	IX
<u>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1 PROBLEMAS DE SALUD ASOCIADOS AL CONSUMO DE HORTALIZAS.....	1
1.2 FISIOLÓGÍA DE LA ABSORCIÓN DE NITRÓGENO EN LA PLANTA	2
1.3 ACUMULACIÓN DE NITRATO POR LAS PLANTAS.....	4
1.4 DISTRIBUCIÓN DE NITRATO EN LA PLANTA	9
<u>2. NIVELES DE NITRATO EN HOJAS DE LECHUGA, ACELGA Y ESPINACA EN URUGUAY</u>	11
2.1 RESUMEN.....	12
2.2 SUMMARY	13
2.3 INTRODUCCIÓN	14
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	16
<u>2.4.1 Material vegetal</u>	16
<u>2.4.2 Recolección de muestras</u>	16
<u>2.4.3 Cuantificación de nitrato en hoja</u>	17
<u>2.4.4 Cuantificación de nitrato en agua</u>	18
<u>2.4.5 Cuantificación de fracciones de nitrógeno en suelo</u>	18
<u>2.4.6 Análisis estadístico</u>	19
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
<u>2.5.1 Concentración de nitrato en hortalizas procedentes de los predios de productores</u>	20
<u>2.5.2 Concentración de nitrato en hortalizas procedentes del Mercado Modelo</u> ..	23
<u>2.5.3 Nitrato en hojas en relación al nitrógeno del suelo y a su aporte por fertilización</u>	26
2.5.4 Exposición del consumidor a la ingesta de nitrato.....	29
2.6 BIBLIOGRAFÍA	32
<u>3. INTERFERENCIA DEL COLOR DEL EXTRACTO EN MUESTRAS SECAS DE LECHUGA EN LA DETERMINACIÓN DE NITRATO POR EL MÉTODO DE CATALDO</u>	37
3.1 RESUMEN.....	38
3.2 SUMMARY	39
3.3 INTRODUCCIÓN	40
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
<u>3.5.1 Eliminación del color del extracto con carbón activado</u>	47
3.6 BIBLIOGRAFÍA	49

<u>4. DISCUSIÓN GENERAL</u>	52
<u>5. BIBLIOGRAFÍA</u>	56

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Niveles de nitrato en hojas de lechuga, acelga y espinaca en Uruguay

	Página
Cuadro 1. Concentración media de NO ₃ en base fresca en hoja, en muestras obtenidas de predios de productores y del Mercado Modelo, según uso o no de cobertura plástica y estación de muestreo.	23
Cuadro 2. Coeficientes de correlación entre los contenido de NO ₃ en hoja de las diferentes hortalizas, cultivadas a cielo descubierto o bajo cobertura plástica, las fracciones de N del suelo y el aporte de N que recibieron los cultivos.....	27
Cuadro 3. Modelos de regresión ajustados en cada hortaliza para la estimación de mg NO ₃ kg-1 peso fresco (Y), a partir de las fracciones de N analizadas y la cantidad de estiércol utilizado (X).Las muestras se clasificaron con base al momento y tecnología de producción. La concentración promedio de NO ₃ en hoja en base fresca alcanzada por cada tecnología de producción se comparó por test de Tukey.	28
Cuadro 4. Recomendación de consumo máximo de materia fresca de cada hortaliza con base a criterios de ingesta máxima admisible de NO ₃ ⁻ por la Organización Mundial de la Salud.	31
Figura 1. Concentración de NO ₃ en hojas de: espinaca (n _{verano} = 11, n _{invierno} = 43); acelga (n _{verano} = 42, n _{invierno} = 57); lechuga mantecosa bajo cobertura plástica (n _{verano} = 8, n _{invierno} = 37); y lechuga mantecosa producida a cielo descubierto (n _{verano} = 42, n _{invierno} = 47); recolectadas en Predios de Productores, en dos épocas de muestreo. Los extremos de las cajas representan los percentiles 75 y 25, la línea llena interior representa la mediana, la línea punteada la media, las cuotas externas sitúan los valores máximos (percentil 95) y mínimos (percentil 5), los círculos negros rellenos representan los outliers.	21
Figura 2. Concentración de NO ₃ en hojas de: a) acelga (n _{verano} = 12, n _{invierno} = 13); b) lechuga mantecosa (n _{verano} = 25, n _{invierno} = 15); c) espinaca (n _{verano} = 9, n _{invierno} = 10), recolectadas en el Mercado Modelo de Frutas y Verduras. Los extremos de las cajas representan los percentiles 75 y 25, la línea llena interior representa la mediana, la línea punteada la media, las cuotas externas sitúan los valores máximos (percentil 95) y mínimos (percentil 5), los círculos negros rellenos representan los outliers. Se desconoce si la lechuga mantecosa es producida bajo cobertura plástica o a cielo descubierto.....	25

Interferencia del color del extracto en muestras secas de lechuga en la determinación de nitrato por el método de Cataldo

Página

- Cuadro 1. Resultados del análisis de regresión entre las concentraciones de NO_3 determinadas con el método colorimétrico de Cataldo usando dos procedimientos de eliminación del “color del blanco”. Los procedimientos consistieron en usar el Blanco E (X) y en agregar carbón activado con posterior filtración del extracto (Y). El Blanco E consistió del extracto de cada muestra y los reactivos excepto el ácido salicílico. En ambos casos la concentración de NO_3 fue determinada en muestras de tejido seco.....47
- Figura 1. Relación entre la concentración de NO_3 en hojas secas de lechuga determinada por el método colorimétrico de Cataldo y por el potenciométrico. En la determinación colorimétrica se emplearon dos blancos: Blanco A (cruces) y Blanco E (círculos sin relleno). El Blanco A consistió de agua mas los reactivos, el Blanco E consistió del extracto de cada muestra y los reactivos excepto el ácido salicílico. La línea sólida es la línea 1:1.45
- Figura 2. Diferencias absolutas y relativas de concentración de NO_3 en hojas de lechuga obtenidas con los métodos potenciométrico y colorimétrico. El método potenciométrico se comparó con el método colorimétrico de Cataldo con blanco Blanco A (a y b) y con Blanco E (c y d). Las diferencias entre ambos métodos se relacionaron con la concentración de NO_3 determinada con el método potenciométrico. La diferencia absoluta se obtuvo como la resta entre cada valor obtenido por el método colorimétrico y el potenciométrico, y la relativa como la diferencia absoluta dividida por la concentración obtenida por el método potenciométrico. En todos los casos, la concentración de NO_3 fue determinada en muestras de tejido seco.....46
- Figura 3. Relación entre la concentración de NO_3 en hojas secas de lechuga determinada por el método colorimétrico de Cataldo. Los valores en el eje x corresponde a las determinaciones de NO_3 de cada muestra a las cuales se las corrigió por el respectivo valor de análisis del “color del blanco”; en el eje y se eliminó al “color del blanco” de cada muestra previamente a cada medición mediante el agregado de C activado. La línea sólida es la línea 1:1.48

General

Página

Cuadro 1. Contenidos mínimos, máximos y promedios de NO₃ en hojas de espinacas y lechugas, reportados por otros investigadores.....54

RESUMEN

El consumo de hortalizas con alta concentración de nitrato (NO_3) podría perjudicar la salud; pero en Uruguay no existe información las concentraciones esperables. Durante el período 2002-04 se recolectaron de predios de productores (PP) y del Mercado Modelo (MM) muestras de lechuga mantecosa y lechuga crespa (*Lactuca sativa* L. vars. *capitata* y *crispa* L.), espinaca (*Spinacia oleracea* L) y acelga (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*). Las concentraciones de NO_3 en extracto de tejido seco de lechuga medidas con electrodo de actividad específica se compararon con la medición por colorimetría propuesta por Cataldo *et al.* (1975). Sólo el 0,63% de las lechugas y el 9,3% de las espinacas de los PP superaron los límites de concentración de NO_3 en tejido fresco de la directiva 563/2002 de la Unión Europea. En el MM solo las espinacas superaron en un 21,1% de los casos los límites correspondientes. En acelga la máxima concentración se determinó en una muestra de invierno en PP y en verano en el MM. Se podrían ingerir, sin embargo, cantidades de NO_3 mayores a la Ingesta Diaria Admisible recomendada por la OMS. En la determinación de NO_3 por el método colorimétrico existió interferencia del color del extracto. Esta interferencia se eliminó al descontar la absorbancia del color del extracto a cada muestra. Similar resultado se obtuvo al eliminar el color con el agregado de carbono activado. Este último procedimiento resulta más simple, ya que no requiere utilizar un blanco para cada muestra.

Palabras claves: hortalizas de hoja, consumo de nitrato, Cataldo, medición de nitrato

SUMMARY

NITRATE LEVELS IN LEAFY VEGETABLES IN URUGUAY: TYPICAL VALUES, RANGES OF VARIATION AND EVALUATION OF METHODOLOGY FOR ITS DETERMINATION

The consumption of leafy vegetables with high nitrate (NO₃) concentration could jeopardize human health, but in Uruguay there is no information of the expected concentration range. During the period 2002-04 we collected from farms (F) and the Central Market (CM) 178 samples of butter lettuce and 24 of crisp-head (*Lactuca sativa* L. vars. Capitata and crispa L.), 73 of spinach (*Spinacia oleracea* L) and 124 of chard (*Beta vulgaris* L. subsp. vulgaris). Nitrate determination in dry leaf lettuce through nitration of salicylic acid (colorimetric method by Cataldo *et al.* 1995) were evaluated, the potentiometric based on the electrode of specific activity was a reference method. Only 0.63% of lettuce and spinach 9.3% of the PP exceeded NO₃ concentration in fresh tissue limits of Directive 563/2002 of the European Union. In the MM spinach, only 21.1% of cases exceeded the relevant limits. In the chard higher concentration was determined in winter and summer samples in PP in MM respectively. You could eat, however, greater NO₃ amounts than the Acceptable Daily Intake recommended by WHO. Interference by extract color was observed in NO₃ determination by the colorimetric method. This interference was eliminated by deducting the absorbance of the color of each sample extract. Similar result was obtained by removing the color with the addition of activated carbon.

Keywords: leafy vegetables, nitrate intake, Cataldo, nitrate determination

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 PROBLEMAS DE SALUD ASOCIADOS AL CONSUMO DE HORTALIZAS

Todos ingerimos nitrato (NO_3) con nuestros alimentos y bebidas. El dióxido de N existente en el aire, al ser absorbido a través de los pulmones, proporciona NO_3 , pero la cantidad es insignificante comparada con la que existe en los alimentos y en el agua (Böckman *et al.*, 1993). El 80% de la ingesta de NO_3 tiene como origen el consumo de hortalizas frescas, congeladas y enlatadas. Algunas hortalizas pueden contener más de 1g de $\text{NO}_3\text{ kg}^{-1}$. Aportes menores hacen el consumo de aguas provenientes de napas y ríos contaminados. Tanto el NO_3 como el NO_2 también están presentes en sales que se utilizan como conservantes de alimentos (Klingenberg, 1995).

El consumo de hortalizas con alto contenido en NO_3 puede ser nocivo para la salud. Ningún problema de salud es causado directamente por NO_3 , ya que por su solubilidad es rápidamente excretado por el organismo y sólo altísimas concentraciones pueden causar toxicidad. Sin embargo, algunos de sus subproductos metabólicos tales como el NO_2 , las nitrosaminas y nitrosamidas son tóxicos para el humano y animales en general (Klingenberg, 1995). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de $3,7\text{ mg dia}^{-1}\text{ kg}^{-1}$ de peso de la persona (Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA, 2002).

El NO_3 ingerido puede ser reducido a NO_2 por la microflora del tracto digestivo y ser absorbido por las paredes del intestino hacia el torrente sanguíneo. El NO_2 puede transformar el ión ferroso de la hemoglobina en ión férrico y de esta forma se produce metahemoglobina la cual es incapaz de transportar oxígeno. (Muro *et al.* 1998; Urquiaga y Zapata, 2000). En los lactantes el pH del estómago es más básico y permite el desarrollo de una microflora más abundante que es capaz de ocasionar este proceso de reducción del NO_3 a NO_2 , lo que explica la mayor sensibilidad de los niños al NO_3 . Agua con concentraciones superiores a $50\text{ mg de NO}_3\text{ L}^{-1}$ pueden llevar a un riesgo de ataque de metahemoglobinemia aguda en infantes, patología conocida como “bebés

azules". En el período comprendido entre 1950 y 1970 se reportaron aproximadamente 3.000 casos de esta patología en todo el mundo (Böckman *et al.*, 1993). En el adulto normal, el estómago y la primera parte del intestino delgado son prácticamente estériles debido al bajo pH y a que el NO_3 se absorbe antes de ser reducido a NO_2 (Muro *et al.* 1998.)

En el estómago, el NO_3 puede reaccionar con componentes alimenticios y producir compuestos carcinógenos tales como nitrosaminas y nitrosamidas. Tales compuestos pueden causar cáncer de estómago, hígado y esófago. La hipótesis científica de que pueden formarse compuestos nitrosos carcinógenos en el cuerpo humano ha generado una gran cantidad de trabajos, pero con resultados y conclusiones conflictivas. En la actualidad, dista mucho de estar claro si se forman compuestos nitrosos carcinógenos en el estómago en cantidades significativas, en comparación con las cantidades ingeridas de carcinógenos en los alimentos y metabolitos procedentes del intestino grueso. Tampoco resulta evidente que las diferencias en la absorción de NO_3 procedentes del contenido de NO_3 en el agua y los alimentos tengan una influencia apreciable o si los factores más importantes son las infecciones y las poblaciones de bacterias en el estómago que pueden producir tales compuestos (Böckman *et al.*, 1993; Muro *et al.*, 1998, Pobel *et al.*, 1995). Se reconocen también, efectos beneficiosos del consumo de NO_3 y NO_2 en la protección del tracto digestivo, contra el desarrollo de microorganismos patógenos (Callum *et al.*, 1997).

En la bibliografía se sugiere que el NO_2 puede causar una diversidad de otras enfermedades como bocio, puesto que experimentos con animales han mostrado que el NO_2 puede interferir en la absorción de yodo, pero no se dispone de ninguna evidencia epidemiológica verificada; enfermedades cardíacas (Böckman *et al.*, 1993) y puede, también, disminuir la reserva hepática de tocoferol y carotenos (Muro *et al.*, 1998).

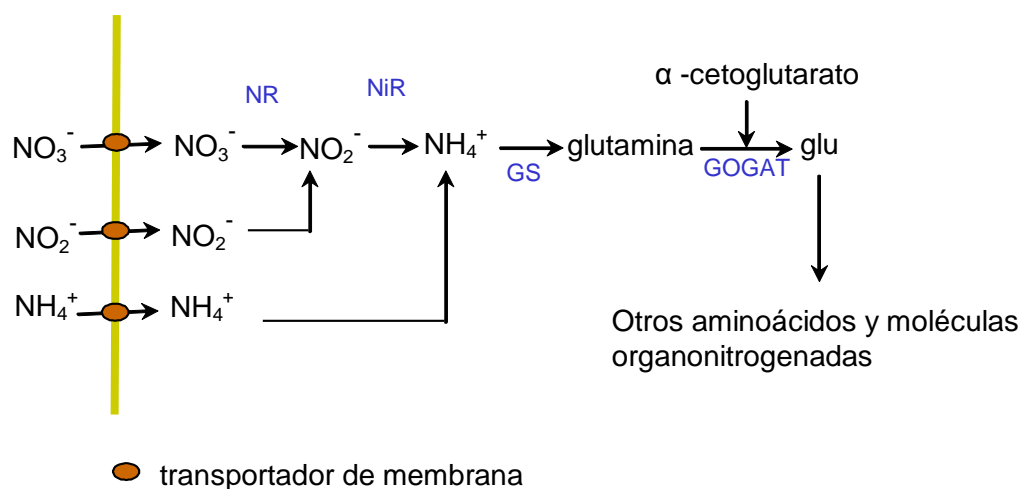
1.2 FISIOLÓGÍA DE LA ABSORCIÓN DE NITRÓGENO EN LA PLANTA

Las plantas absorben el N como NO_3 y en forma limitada como amoníaco (NH_3) o como amonio (NH_4). El nitrato (NO_3) es la principal fuente de N accesible para las

plantas cultivadas e ingresa a la planta a través de las células epidérmicas radiculares. El NO_3 absorbido es reducido a NO_2 y éste a NH_4 en dos reacciones, la primera catalizada por la nitrato reductasa (NR) y la segunda por la nitrito reductasa (NiR) (Figura 1). La NR es una enzima de localización citoplasmática y el poder reductor para la reacción es suministrado por el NAD(P)H, mientras que la NiR, de localización cloroplástica, obtiene el poder reductor del NADPH fotosintético. La cantidad de NO_3 absorbido depende de un mecanismo de *feedback* entre el sistema de transporte de ácidos orgánicos y/o la concentración interna de NO_3 (Bloom-Zandstra y Lampe, 1985). Aunque toda la planta necesita constantemente de N. La magnitud de esta reducción depende de la cantidad de NR y de los equivalentes de reducción aportados por el NADH generados por el catabolismo de los glúcidos y el NADPH.H fotosintético (Fig. 1).

El NH_4 + generado por la reducción del NO_3 – es asimilado mediante el proceso catalizado por las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), que producen glutamina y glutamato respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Esquema de la absorción, reducción y asimilación de amonio. GS glutamina sintetasa y GOGAT Glutamato oxoglutarato glutamin amino transferasa.



El NO_3 es un inductor de la síntesis de la NR y por ello se sugiere que existiría una estrecha relación entre la concentración de ambos. Sin embargo, el contenido relativo de NO_3 también depende de las condiciones ambientales. En condiciones de exceso de este ión en el medio se genera un traslado mayor a los tallos, ya que en estas condiciones las raíces no son capaces de reducirlo en su totalidad. La luz también incrementa la actividad de la NR en las hojas, aunque no está claro su efecto. Esto podría deberse a que la fotosíntesis incrementa el transporte de NO_3 vacuolar al citosol el cual induciría la síntesis de NR. También se sugiere que la luz es capaz de activar el gen que codifica la síntesis de NR. Por otra parte la luz promueve la producción de carbohidratos de cuyo catabolismo se genera poder reductor como NADH^+ . Aunque estos efectos no estén comprobados, sí se conoce que existe un ritmo diurno (día - noche) en la actividad de esta enzima (Klingenberg, 1995).

La reducción de NO_2 a NH_4 depende de los equivalentes de reducción provenientes de la fase luminosa de la fotosíntesis por lo que la reducción que ocurre en las raíces depende del suministro de carbohidratos desde las hojas.

El NH_4 es altamente tóxico para la célula por lo que, para evitar su acumulación en los tejidos, es convertido en grupos amida de la glutamina por la acción de dos enzimas, la GS y la GOGAT (Fig. 1) (Klingenberg, 1995).

1.3 ACUMULACIÓN DE NITRATO POR LAS PLANTAS

Las hortalizas de hoja que presentan mayor cantidad de NO_3 son la acelga (*Beta vulgaris* L. subsp. *Vulgaris*), la espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y la lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L), con valores promedio de 4500, 3000 y 2500 mg kg^{-1} de NO_3 respectivamente. De todas formas existe mucha variación en los contenidos analizados (Klingenberg, 1995; Muro *et al.*, 1998, Muramoto, 1999). Los cultivares de hoja lisa de repollo y endivia por lo general presentan mayores concentraciones de NO_3 que los de hoja corrugada (Kowal, 1978), pero en espinaca sucedería lo contrario (Klingenberg, 1995). Según Maynard y Barker (1979), el alto contenido de materia seca de algunos

cultivares y el correspondiente bajo contenido de NO_3 está asociado a la eficiencia de asimilación de NO_3 de cada variedad (Klingenberg, 1995).

Blom-Zandstra (1989) propuso que la acumulación de NO_3 se debería a una reducción de la actividad de la NR sin una correspondiente disminución de la absorción de este ión. Las plantas pueden acumular NO_3 cuando su absorción excede la reducción, la cual puede ser limitada por varios factores, uno de ellos la intensidad de la luz. Es posible que las plantas acumulen NO_3 para aumentar su potencial osmótico y establecer así una diferencia de potencial hídrico respecto al suelo (Blom-Zandstra y Lampe 1985). Al disminuir la actividad fotosintética por la disminución en la cantidad o intensidad de la luz, disminuyen los ácidos orgánicos (mayormente malato) y azúcares (mayormente glucosa) disponibles para la regulación osmótica, de manera que la función de estas moléculas orgánicas como osmolitos es reemplazada por iones, principalmente NO_3 . La acumulación de NO_3 como osmorregulador implica un costo energético menor para la planta que la síntesis de carbohidratos (Blom-Zandstra y Lampe, 1985). Esta teoría se apoya en la relación inversa observada en distintas especies entre la concentración de NO_3 y compuestos orgánicos solubles (Muro *et al.*, 1998; McCall y Willumsen, 1998). Una vez absorbido y asimilado, aproximadamente el 10% del NO_3 permanece en el citosol y el 90% se almacena en la vacuola. El NO_3 del pool vacuolar es difícilmente metabolizable y su función está relacionada básicamente con el mantenimiento del potencial osmótico celular (Blom-Zandstra y Lampe, 1985). Otra teoría que explicaría la acumulación de NO_3 en las hojas de hortalizas define la existencia en algunas plantas de un consumo de lujo. Las plantas absorben nutrientes en exceso para las necesidades inmediatas de crecimiento, el que será utilizado cuando el aporte del suelo decrezca (Muro *et al.*, 1998).

Roorda van Eysinga y van der Meijs (1985) (citados por McCall y Willumsen, 1999) al trabajar en cultivos de lechuga, reportaron que en condiciones de alta luminosidad el contenido de NO_3 fue bajo y se incrementó considerablemente al aumentar la aplicación de N, en condiciones de baja luminosidad el contenido de NO_3 del cultivo fue alto y se incrementó sólo un poco al aumentar la aplicación de N. Un

resultado similar obtuvieron Ansoreta-Miner *et al.* (1994) en cultivos de lechuga bajo invernadero. El efecto de la luz es relativamente mayor a dosis moderadas de N; a dosis bajas el contenido de NO_3 será también bajo (Klingenberg, 1995; McCall y Willumsen, 1999).

Al cultivar espinacas bajo diferentes concentraciones de NO_3 en solución, Muro *et al.* (1998) observaron que al aumentar la concentración de NO_3 en la solución aumentaba el contenido en la parte aérea de planta. Resultados similares fueron obtenidos por McCall y Willumsen (1998) en lechugas cultivadas en macetas, aunque observaron que al sobrepasar una determinada concentración en la solución el contenido de NO_3 en hoja no aumentó. Estos autores sugieren que hay una cantidad de N a agregar con la cual se logra un buen rendimiento con una concentración de NO_3 aceptable y una limitación en la disponibilidad de N reduce el contenido de NO_3 en la planta por forzarla a usar otros osmorreguladores.

El NH_4 podría disminuir las concentraciones de NO_3 en las hojas de las hortalizas, pero se han obtenido efectos diversos con la aplicación de esta fuente de N. La aplicación de NH_4 en cultivos de lechuga creciendo en solución nutritiva reduce consistentemente el contenido de NO_3 en planta, pero la aplicación de fertilizante amónico al suelo en la siembra no ha logrado el mismo efecto si no se aplica con un inhibidor de la nitrificación (McCall y Willumsen, 1988).

Existe discrepancia sobre el efecto del agregado de fuentes orgánicas de N sobre el contenido de NO_3 de las hortalizas. Vogtman *et al.* (1984) (citados por Böckman *et al.*, 1993) al utilizar abono orgánico fermentado obtuvieron menor contenido de NO_3 en los productos que al utilizar fertilizantes de síntesis química; sin embargo, Gysi *et al.* (1985) (citados por Böckman *et al.*, 1993) reportaron que la lechuga tenía un mayor contenido de NO_3 si se cultivaba en suelos con altos niveles de N orgánico. Lairon *et al.* (1984) obtuvieron los mismos rendimientos y contenidos de proteína al utilizar indistintamente una fuente orgánica o inorgánica de N, pero alcanzaron un menor nivel de NO_3 con el uso de fertilizante inorgánico. Klingenberg (1995) y Ansoreta-Miner *et al.* (1994) no encontraron diferencias en la concentración de NO_3 en lechuga con diferentes

niveles de fertilización mineral y/o orgánica. En el cultivo posterior, sin embargo, las lechugas en parcelas abonadas antes con gallinaza, presentaron mayor concentración de NO_3 debido probablemente a la elevada y gradual liberación de NO_3 desde ese material orgánico. Por el contrario, Vogtman *et al.* (1984), Muramoto (1999) y Worthington (2001) encontraron hasta un 15% menos de concentración de NO_3 en lechuga y espinaca en sistemas de producción orgánica respecto a convencionales. En espinaca y col, según Zhou *et al.* (2000), la fertilización con estiércol y abonos verde en lugar de con N mineral, puede disminuir la concentración de NO_3 entre un 25 y 75%. Este resultado concuerda con los observados por otros autores quienes obtuvieron que la fertilización con abono orgánico se acompañó de la disminución de la concentración NO_3 en las hojas de diversas hortalizas (Böckman *et al.*, 1993; Muramoto, 1999; Worthington, 2001; Chena *et al.*, 2004).

La concentración de NO_3 también parece ser afectada por la presencia de otros iones que estarían incidiendo en su absorción y/o acumulación. El cloruro (Cl) en el suelo es antagonista a la absorción de NO_3 . Währmann y Andel (1984) (citados por Klingenberg, 1995) probaron con espinaca en solución que había menor acumulación de NO_3 en la planta al fertilizar con ambos aniones que exclusivamente con NO_3 y no se perdía rendimiento. En presencia de NH_4 , el Cl puede reemplazar parcialmente al NO_3 como elemento osmótico. Sin embargo, cuando el NH_4 no está presente el NO_3 es preferido frente al Cl como elemento osmótico (Blom-Zandstra y Lampe, 1985; McCall y Willumsen, 1988; Klingenberg, 1995; Muro *et al.*, 1998). Muro *et al.* (1998) al cultivar espinacas en solución nutritiva deficiente en sulfato (SO_4) lograron una mayor acumulación de NO_3 en hoja que en las plantas cultivadas en deficiencia de fosfato (PO_4) y que en las plantas control. Al reestablecer la carencia, las concentraciones entre estas plantas se igualaron. Estos autores lograron disminuir la concentración de NO_3 en hoja al sustituir NO_3 con SO_4 a los nueve y tres días antes de la cosecha, pero la sustitución con nueve días de anterioridad perjudicó la calidad comercial del producto. En plantas con deficiencia de molibdeno (componente estructural de la enzima NR), el NO_3 se acumula en grandes cantidades, algunas veces sobrepasando el 3% sobre la base

de materia seca (Klingenberg, 1995). En abundancia de potasio (K) se estimula la absorción de NO_3 (Regan *et al.*, 1968; Klingenberg, 1995) Los autores van por orden cronológico, no alfabético). Sin embargo, Knauer y Simon, (1968) y Grujic y Kastori (1974) (citados por Klingenberg, 1995) observaron que altas fertilizaciones con K bajaban la acumulación de NO_3

Hata y Ogata (1971) indicaron que el nivel de NO_3 en zanahoria no cambia con el tiempo de almacenamiento; igual resultado obtuvieron Machackova *et al.* (1985) al almacenar lechugas durante 24 h (Klingenberg, 1995). Estos mismos autores, sin embargo, observaron aumentos de 54% y 27% en espinacas almacenadas a 22°C y 8°C respectivamente (Klingenberg, 1995). Klingenberg (1995) observó que el almacenamiento por 24 hs, en presencia o ausencia de luz y a temperatura ambiente, eleva la concentración de NO_3 en base al peso seco. Chung *et al.* (2004) observaron que el almacenamiento de espinaca a temperatura ambiente ($22\pm 1^\circ\text{C}$) por 7 días provocó una disminución del contenido de NO_3 a partir del tercer día, pero no existió ese efecto en las muestras almacenadas en frío ($5\pm 1^\circ\text{C}$). Los autores sugieren que la disminución del NO_3 y aumento del NO_2 se debió a la reducción provocada por microorganismos. Durante el almacenamiento también puede haber reducción de NO_3 a NO_2 a causa de la actividad de la NiR con poder reductor generado por el ciclo de las pentosas.

La temperatura aumenta la evapotranspiración y por lo tanto provoca un flujo ascendente de NO_3 desde la raíz hacia la parte aérea. Al aumentar la temperatura, además, aumenta la demanda de carbohidratos con fines respiratorios y disminuye su disponibilidad para fines osmóticos; asimismo, disminuye la tasa de síntesis de proteínas y aumenta la cantidad de iones NO_3 susceptibles de ser acumulados en las vacuolas (Muro *et al.*, 1998). La temperatura de raíces y parte aérea son distintas durante el día. Una noche de temperaturas bajas afectará menos a las raíces, por lo que la absorción no disminuirá en la misma proporción que lo hará la asimilación en la parte aérea. Esta caída de temperatura favorece la acumulación, lo que estaría de acuerdo con las variaciones de NO_3 que se observan durante el día. A temperaturas superiores a 30°C se inhiben la absorción de NO_3 y la actividad de la enzima NR (Klingenberg, 1995). La

humedad relativa también afecta la acumulación del NO_3 en las hojas, ya que bajos niveles de humedad aumentan el tránsito de NO_3 de la raíz a las hojas fotosintetizantes para mantener la turgencia de las mismas. Las plantas sometidas a estrés hídrico aumentan el contenido de NO_3 al ser absorbido como elemento osmótico para adaptarse a las condiciones de estrés. Además, se produce un cierre de estomas, reduciéndose la actividad fotosintética y por tanto la de la enzima NR (Muro *et al.*, 1998).

1.4 DISTRIBUCIÓN DE NITRATO EN LA PLANTA

Dentro de una planta los contenidos de NO_3 serán mayores en los tejidos más viejos que en los más nuevos (Klingenberg, 1995). En espinaca, la raíz es el órgano donde mayores tasas de NO_3 se acumulan. Dentro de la parte aérea la concentración de los pecíolos es superior a la del limbo y las hojas jóvenes presentan niveles más altos que las plenamente desarrolladas (Muro *et al.*, 1998). Ocurre lo contrario con lechuga donde las hojas exteriores (más viejas) presentan niveles superiores, siendo el contenido en el cogollo mínimo. Sánchez *et al.* (2002) encontraron tres veces más concentración de NO_3 en las hojas viejas de lechuga tipo iceberg que en las hojas nuevas. Quinche (1982) (citado por Klingenberg, 1995) en hojas de lechuga del cv. Ravel, encontró que las concentraciones de NO_3 de hojas externas y medias eran respectivamente 4,5 y 1,9 veces mayores que en las internas, mientras que Asseo-Bickert (1983) (citado por Klingenberg, 1995) analizando hojas de lechuga, encontró en las hojas externas 4000 mg kg^{-1} de NO_3 en peso fresco y en las internas 3300 mg kg^{-1} .

Si bien en Uruguay se han realizado estudios sobre el contenido de NO_3 en aguas (Perdomo *et al.*, 1998) no existe información sobre los contenidos de NO_3 en hortalizas de hoja como acelga (*Beta vulgaris* L. subsp. *Vulgaris*), espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L), que son alimentos con altos contenidos de este ión (Dejonckheere *et al.*, 1994). Por esta razón nos planteamos generar información acerca de los contenidos de NO_3 que alcanzan estos cultivos según la producción sea bajo cobertura plástica o a campo, la estación de producción y el manejo de fertilización nitrogenada que haya recibido. Para disponer de una herramienta de determinación del

contenido de NO₃ en hoja que fuera rápida y de bajo costo, analizamos la posibilidad de utilizar una modificación del método de determinación por nitración del ácido salicílico desarrollado por Cataldo *et al.* (1975).

2. NIVELES DE NITRATO EN HOJAS DE LECHUGA, ACELGA Y ESPINACA EN
URUGUAY

Artículo a publicar en Agrociencia

2.1 RESUMEN

El consumo de hortalizas de hoja con alta concentración de nitrato (NO_3) podría perjudicar la salud; pero en Uruguay no existe información de los rangos esperables de concentración. Durante el período 2002-04 se recolectaron de predios de productores (PP) y del Mercado Modelo (MM) 178 muestras de lechuga mantecosa y 24 de crespita (*Lactuca sativa* L. vars. capitata y crispa L.), 73 de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y 124 de acelga (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*). En los PP, solamente el 2,7% de las muestras de lechuga de invernadero y el 11,6% de las de espinaca superaron los límites de invierno de NO_3 en hoja en base fresca de la Unión Europea (UE), pero ninguna muestra de lechuga o espinaca superó los de verano. En el MM, el 11,1% de la espinaca de invierno y el 33,3% de la de verano superaron sus correspondientes límites, pero ninguna de lechuga mantecosa lo superó. No existen límites para acelga, pero la máxima concentración ocurrió en PP en invierno ($4219 \text{ mg NO}_3 \text{ kg}^{-1}$) y en MM en verano ($3255 \text{ mg NO}_3 \text{ kg}^{-1}$). Las concentraciones de NO_3 fueron mayores en las hortalizas producidas en invernadero ($P < 0,05$) que a cielo descubierto, mientras que las hortalizas del MM tuvieron niveles superiores a los de PP, posiblemente debido al almacenamiento. Pese a los bajos niveles de NO_3 encontrados con respecto a los límites de la UE, igualmente se podrían ingerir con estas hortalizas cantidades de NO_3 mayores a la Ingesta Diaria Admisible recomendada por la OMS.

Palabras clave: hortalizas de hoja, consumo de nitrato, normativa UE 563/2002, IDA OMS.

Abreviaciones: AmoSu: contenido de amonio intercambiable en suelo; cob: cobertura plástica; inv: invierno; MM: Mercado Modelo; %MO: contenido materia orgánica en suelo; Nmin: contenido de nitrógeno potencialmente mineralizable del suelo; $\text{NO}_3\text{-Hj}$ contenido de nitrato en hoja expresado en base fresca; NitSu: contenido de N-NO_3 en suelo; PP: predios productores; ver: verano.

2.2 SUMMARY

NITRATE LEVELS IN LETTUCE, CHARD AND SPINACH IN URUGUAY

The consumption of leafy vegetables with high nitrate (NO_3) concentration could jeopardize human health, but in Uruguay there is no information of the expected concentration range. During the period 2002-04 we collected from farms (F) and the Central Market (CM) 178 samples of butter lettuce and 24 of crisp-head (*Lactuca sativa* L. vars. *Capitata* and *Crispa* L.), 73 of spinach (*Spinacia oleracea* L) and 124 of chard (*Beta vulgaris* L. subsp. *Vulgaris*). In the F samples, only 2.7% of lettuce and 11.6% of spinach exceeded the European Union (EU) NO_3 limits for winter, but neither spinach nor lettuce surpassed the corresponding summer limits. In CM, 11.1 and 33.3% of the winter and summer spinach samples were above their corresponding limits, but none of the lettuce samples exceeded them. Currently, there are no EU limits for chard, but in this vegetable the maximum concentration was observed both in winter (4219 mg NO_3 kg^{-1}) and in summer (3255 mg NO_3 kg^{-1}) for the F and CM samples, respectively. Leafy vegetables produced in greenhouse tended to have higher NO_3 concentrations than those cultivated in the open field ($P < 0.05$), while vegetables from CM showed higher concentrations than those from F, possibly due to a storage effect. In spite of the low NO_3 levels found in Uruguay with respect to the EU limits, the ingestion of NO_3 associated to a normal ingestion of leafy vegetables could still exceed the Admissible Daily Intake recommended by W.H.O.

Keywords: leafy vegetable, nitrate intake, UE 563/2002, ADI WHO.

2.3 INTRODUCCIÓN

Las hortalizas de hoja, como lechuga (*Lactuca sativa.*), acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla* L.) y espinaca (*Spinacea oleracea* L) son una de las principales fuentes de nitrato (NO_3) en la dieta humana (Dejonckheere *et al.*, 1994; European Community, 1995; Muramoto, 1999; Zhou *et al.*, 2000). La Unión Europea (UE) estableció para la comercialización de hortalizas de hoja, límites legales de concentración porque la ingesta de NO_3 puede producir daños en la salud humana (Böckman *et al.*, 1993; Klingenberg, 1995; Muro *et al.*, 1998; Urquiaga y Zapata, 2000).

La normativa 563/2002 de la UE establece que la concentración de NO_3 para lechuga de invierno no debe superar los 4500 mg kg^{-1} cuando se produce bajo cobertura plástica, y 4000 mg kg^{-1} cuando se produce a cielo descubierto. Para lechugas producidas en verano el límite máximo de concentración de NO_3 es de 3500 mg.kg^{-1} en sistemas bajo cobertura plástica y 2500 mg kg^{-1} en producciones a cielo descubierto. De acuerdo a la misma normativa, la concentración de NO_3 para espinacas de invierno no debe superar los 3000 mg kg^{-1} , y para las de verano los 2500 mg kg^{-1} . La normativa no indica máximos para las acelga. De todas formas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la ingesta diaria admisible (IDA) de NO_3 debe ser inferior a $3,7 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corporal (Joint Expert Committee on Food Additives, JECFA, 2002).

La concentración de NO_3 en hortalizas de hoja depende de factores ambientales (Bloom-Zandstra y Lampe, 1985; Ansoreta-Miner *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1994; Klingenberg 1995; McCall y Willumsen, 1998; Muro *et al.*, 1998), nutricionales (Böckman, *et al.*, 1993; Ansoreta-Miner *et al.*, 1994; McCall y Willumsen, 1998; Muro *et al.*, 1998) y genéticos (Klingenberg, 1995; Muro *et al.*, 1998).

Los factores que parecen tener mayor influencia en la dinámica y metabolismo del N en la planta son su disponibilidad y la luz. Así, el aporte excesivo de N mineral sería una de las principales causas de acumulación de NO_3 en hoja, aunque el efecto final dependerá de la fuente, forma y momento de aplicación del N, así como de la disponibilidad de K y P (Zhou *et al.*, 2000; Chena *et al.*, 2004; Zhaohui y Li , 2004). El

consumo de lujo de NO_3 en etapas tempranas del cultivo, para ser utilizado cuando eventualmente decrezca el aporte de nitrógeno (N) del suelo, puede explicar su acumulación (Muro *et al.*, 1998).

A su vez, Gillian *et al.* (1999) encontraron que en general, hay mayor concentración de NO_3 en hortalizas en sistemas protegidos cultivados en invierno, que en los cultivados en verano. La temperatura y luminosidad en condiciones de almacenamiento (post-cosecha), también pueden provocar incrementos o descensos de la concentración de NO_3 en hojas de hortalizas (Klingenberg 1995; Chung *et al.*, 2004).

En estudios realizados en Asia, Europa y Estados Unidos, los niveles promedio de NO_3 no superaron los límites establecidos por la normativa de la UE (Gillian *et al.*, 1999; Muramoto 1999; Petersen y Stoltze, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003) por lo que el consumo de espinaca o lechuga no conllevaría a una ingesta elevada de NO_3 . Sin embargo en Dinamarca, Petersen y Stoltze (1999) encontraron en lechuga una concentración de NO_3 de 7820 mg kg^{-1} , y en Corea, Chung *et al.* (2003) encontraron en espinaca 7793 mg kg^{-1} . En Uruguay no hay información acerca de la concentración de NO_3 en hortalizas de hoja. El objetivo de este trabajo fue conocer la concentración de NO_3 en hojas de lechuga, acelga y espinaca provenientes de predios agrícolas y de puestos de venta, e identificar las condiciones de suelo y manejo del cultivo que favorecen su acumulación.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Material vegetal

Las hortalizas estudiadas fueron lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Capitata) mantecosa y lechuga crespa, acelga (*Beta vulgaris* L. subsp. *Vulgaris*) y espinaca (*Spinacia oleracea* L).

2.4.2 Recolección de muestras

Se relevaron 80 predios productores (PP) de la zona hortícola sur del país elegidos al azar. Los muestreos se realizaron en: mayo y agosto-setiembre de 2003 (38 y 34 predios, respectivamente), marzo y agosto de 2004 (33 predios), y diciembre de 2005 (40 predios). En los años 2003 y 2004 se relevó el mismo grupo de productores, mientras que en el 2005 se relevaron otros 40 predios. En todos los muestreos se extrajeron simultáneamente muestras de plantas, suelo y del agua que se utilizaba para lavar las hortalizas al momento de enviarlas a los puestos de venta.

En los PP se recabó información del sistema de producción: a cielo descubierto o bajo cobertura (invernadero o microtúnel) y del tipo de fertilizante nitrogenado (químico y/o orgánico) y dosis de fertilización con N. Para estimar el aporte de N de los abonos orgánicos se asumió que el estiércol de gallina ponedora contenía 460 g de materia seca (MS) por kilogramo de materia fresca (MF) y 14 g N kg⁻¹ MS, mientras que la cama de criadero de pollo contenía 500 g MS kg⁻¹MF y 20 g N kg⁻¹ MS (Barbazán *et al.* 2010). Las muestras que recibieron el aporte de otras fuentes orgánicas no fueron consideradas en los modelos de regresión, debido a que fueron pocos los productores que las utilizaron.

En el Mercado Modelo de Frutas y Verduras (MM) se recolectaron muestra de las hortalizas en puestos de ocho acopiadores elegidos al azar, en seis fechas de muestreo: febrero, marzo y julio de 2003, y febrero, mayo y diciembre de 2004. No se obtuvo información acerca del sistema de producción de las hortalizas en las muestras de esta procedencia.

En analogía con la normativa 563/2002, se clasificó la época de producción en verano e invierno. Para lechuga, se consideró verano el período entre el 1 de octubre y el 31 de marzo, y para espinaca entre el 1 de octubre y el 30 de abril. El resto del año se consideró como invierno. Las muestras de lechuga se consideraron según se produjeran bajo cobertura o a cielo descubierto, única de estas hortalizas incluidas en la normativa de la UE bajo estas condiciones de cultivo.

En total, entre los PP y el MM se muestrearon: 124 muestras de acelga; 178 muestras de lechuga mantecosa; y 73 muestras de espinaca. Además, en los PP se recolectaron 24 muestras de lechuga crespita.

2.4.3 Cuantificación de nitrato en hoja

Cada muestra se compuso de la hoja más joven, completamente desarrollada (Geraldson y Tyler, 1990), de 36 plantas. Las muestras fueron secadas a 60° C en una estufa de aire forzado hasta peso constante y molidas hasta pasar malla de tamaño menor a 0.5 mm. Se determinó el contenido de materia seca de cada muestra como la relación entre (peso seco / peso fresco) x 100.

La extracción de NO₃ se realizó con agua a temperatura ambiente (dilución agua/muestra seca de 100:1), la solución se agitó durante 1 h y se filtró con papel Whatman N° 1 (Delgado y Follet, 1998).

La concentración de NO₃ en hoja (Nit-Hj) se determinó con electrodo de actividad específica (modelo 48680-00, Hach Co., Loveland, CO), calibrado con soluciones de KNO₃ de concentración conocida. Para realizar la determinación se mezclaron 15 mL del extracto y 10 mL de una solución de AgSO₄, Al(SO₄)₃·18H₂O, NH₂HSO₃ y H₃BO₃ a efectos de homogeneizar la fuerza iónica y eliminar interferencias (Gelderman y Beegle, 1998). Los valores de concentración de NO₃ se expresaron en base fresca, dividiendo el valor obtenido en base seca entre la fracción de materia seca de cada muestra.

2.4.4 Cuantificación de nitrato en agua

Las muestras de agua se recolectaron luego de 5 minutos de bombeo en botellas de 1 L de capacidad. Estos recipientes se mantuvieron refrigerados hasta el momento del análisis. La concentración de NO_3 en agua se realizó con electrodo de actividad específica (modelo 48680-00, Hach Co., Loveland, CO), calibrado con soluciones de KNO_3 de concentración conocida. Para realizar la determinación se mezclaron 15 mL de agua y 10 mL de una solución de AgSO_4 , $\text{Al}(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, NH_2HSO_3 y H_3BO_3 a efectos de homogeneizar la fuerza iónica y eliminar interferencias (Gelderman y Beegle, 1998). En aquellas muestras de agua que superaron los $100 \text{ mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$ se realizó una dilución previa de la muestra en agua deionizada en una relación muestra:agua 1:10.

2.4.5 Cuantificación de fracciones de nitrógeno en suelo

Cada muestra de suelo se compuso de 15 a 20 tomas, sacadas con calador de una profundidad de 0 a 20 cm. Las muestras fueron secadas a 40°C durante 48 h y molidas hasta pasar por tamiz de 2 mm. Posteriormente se determinó, amonio intercambiable (NH_4), N mineralizado en anaerobiosis (N min), NO_3 y materia orgánica del suelo (MOS).

El NH_4 se extrajo con KCl 2 M, con una relación extractante:suelo 5:1, y la concentración en el extracto se determinó según Rhine *et al.* (1998).

El N min se estimó como el incremento del contenido de NH_4 luego de 7 días de incubación anaeróbica a 40°C , según Keeney (1980).

El NO_3 se extrajo con una solución saturada de CaSO_4 , con una relación extractante:suelo 2,5:1. La concentración se determinó con la misma metodología que la usada para determinar NO_3 en planta.

La MOS se determinó mediante digestión con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y H_2SO_4 a temperatura ambiente (Walkley y Black, 1934), y el Cr^{+3} producido se determinó según Sims y Haby (1970).

2.4.6 Análisis estadístico

Los efectos de distintas variables en la concentración de Nit-Hj se analizaron por Anova y comparación de medias (prueba t). Se correlacionaron además los valores de concentración de Nit-Hj con las fracciones de N del suelo. Para ambos análisis se utilizaron los procedimientos GLM y TTEST del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1990). Los resultados del análisis de correlación sirvieron como puntos de partida para ajustar modelos de regresión lineales y no lineales, considerando como variable dependiente a la concentración de Nit-Hje y como independientes a las fracciones de N del suelo y los aportes de N de fuentes orgánicas e inorgánicas. Para ajustar estos modelos los datos se agruparon por tecnología de producción, la cual fue definida como la combinación de sistemas de producción con tipo de fertilizante. Estos modelos fueron ajustados por el procedimiento de mínimos cuadrados, con la herramienta Solver (Wraith y Or, 1998) del software Microsoft Excel (Microsoft Inc., Redmond, WA). Las concentraciones medias ajustadas de Nit-Hj de cada tecnología seleccionada se compararon mediante la prueba t del procedimiento Mixed del paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1990).

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Concentración de nitrato en hortalizas procedentes de los predios de productores

Los valores medios de concentración de Nit-Hj y los desvíos estándar para acelga, lechuga mantecosa, lechuga cresa y espinaca fueron respectivamente 1103 ± 772 , 1221 ± 883 , 988 ± 612 y 1171 ± 1104 mg kg⁻¹. Estos valores se encuentran por debajo de los límites indicados en la normativa 563/2002 y concuerdan con los rangos publicados por otros autores (Gillian, *et al.*, 1999; Muramoto 1999; Petersen y Stoltze 1999; Zhou, 2000; Chung *et al.*, 2003).

En invierno, sólo una muestra de un total de 84 de lechuga mantecosa, superó la concentración de 4500 mg NO₃ kg⁻¹ de materia fresca permitida por la UE para producción bajo cobertura plástica (Fig. 1 a). En espinaca, 5 muestras de 54 superaron los 3500 mg NO₃ kg⁻¹ de materia fresca, que corresponde al valor máximo considerado aceptable para ese período del año (Fig. 1 c). En los meses de verano, ninguna de las muestras de lechuga mantecosa o espinaca superaron la concentración máxima permitida de para ese período (Fig. 1 a, b y c).

Independientemente de la estación y del sistema de producción (con y sin cobertura), no se encontraron concentraciones de Nit-Hj de lechuga cresa superiores a las permitidas, la mayor concentración (2592 mg kg⁻¹) se encontró en una muestra de invierno. En acelga, las mayores concentraciones de Nit-Hj también se encontraron en invierno (Fig 1 d). De todas formas en la normativa de la UE no se establece una recomendación sobre la concentración admisible de Nit-Hj para esta especie.

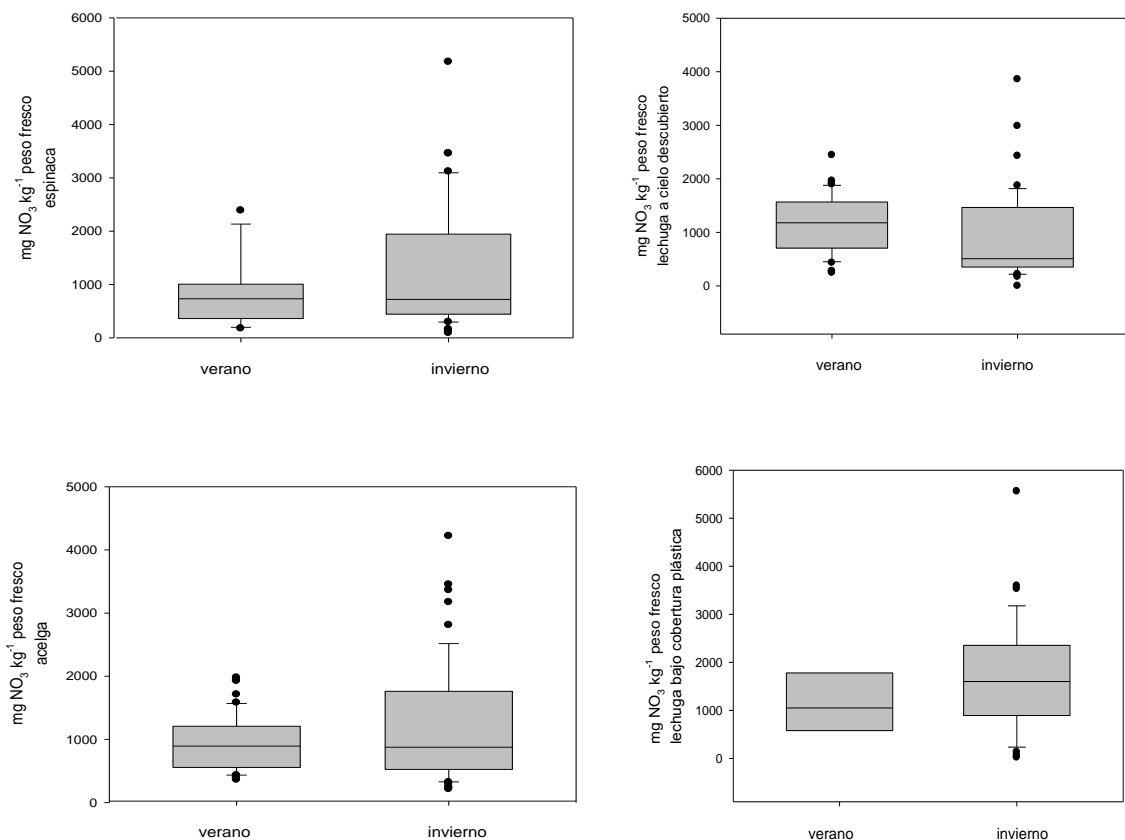


Figura 1. Concentración de NO₃ en hojas de: espinaca ($n_{\text{verano}}= 11$, $n_{\text{invierno}}= 43$); acelga ($n_{\text{verano}}= 42$, $n_{\text{invierno}}= 57$); lechuga mantecosa bajo cobertura plástica ($n_{\text{verano}}= 8$, $n_{\text{invierno}}= 37$); y lechuga mantecosa producida a cielo descubierto ($n_{\text{verano}}= 42$, $n_{\text{invierno}}= 47$); recolectadas en Predios de Productores, en dos épocas de muestreo. Los extremos de las cajas representan los percentiles 75 y 25, la línea llena interior representa la mediana, la línea punteada la media, las cuotas externas sitúan los valores máximos (percentil 95) y mínimos (percentil 5), los círculos negros rellenos representan los outliers.

La espinaca, independientemente del período del año y producción bajo cobertura o cielo descubierto, fue la hortaliza que presentó mayor porcentaje de muestras (9,3%) con concentraciones de Nit-Hj superiores a la permitida en la normativa de la UE. Sin embargo, desde el punto de vista de la salud humana hay que considerar que la cocción, con alta relación de agua:material vegetal, produce descenso en la concentración de Nit-Hj (Dejonckheere *et al.*, 1994; Ministry of Agriculture, Fisheries

and Food, MAFF, 1998; Petersen y Stoltze, 1999). La cocción con agua caliente puede disminuir la concentración de Nit-Hj entre un 40% (Dejonckheere et al 1994) y un 75% (MAFF, 1998). Petersen y Stoltze (1999) encontraron menores concentraciones de NO₃ en espinacas congeladas que en espinacas frescas y atribuyen esto al escaldado que se realiza antes del proceso de congelado.

No se encontraron diferencias en la concentración de Nit-Hj entre los momentos de muestreo, si se considera el efecto de la producción bajo cobertura (Cuadro 1). Estos resultados difieren de los encontrados por Petersen y Stoltze (1999); Muramoto (1999), Gillian *et al.* (1999) y MAFF (1998) que en diversas hortalizas, excluyendo espinaca, encontraron en invierno mayor concentración de Nit-Hj que en verano. La baja luminosidad podría explicar la mayor concentración de Nit-Hj de lechugas producidas en invierno, respecto a las producidas en verano (MAFF, 1998; Gillian *et al.*, 1999; Muramoto, 1999; Petersen y Stoltze, 1999). Sin embargo, en Corea, Chung *et al.* (2003) encontraron mayor concentración de NO₃ en lechugas producidas en verano, que lo atribuyeron a la fertilización nitrogenada que se realiza principalmente en esa estación. Ansoreta-Miner *et al.* (1994) observaron que en condiciones de elevada iluminación, la concentración promedio de NO₃ fue de 1000 mg kg⁻¹, y aumentó hasta 2,5 veces al agregar abono de gallina.

La concentración de Nit-Hj de espinaca, lechuga mantecosa y acelga, bajo cobertura plástica, fue mayor que la encontrada en producción a cielo descubierto (Cuadro 1). Klingenberg (1995) encontraron que la concentración de Nit-Hj de lechuga bajo invernadero es mayor que a cielo descubierto, probablemente debido a la menor luminosidad y mayor temperatura. En el Reino Unido, Gillian *et al.* (1999), en producción bajo cobertura plástica encontraron que la concentración de Nit-Hj es mayor que a cielo descubierto.

Cuadro 1. Concentración media de NO₃ en base fresca en hoja, en muestras obtenidas de predios de productores y del Mercado Modelo, según uso o no de cobertura plástica y estación de muestreo.

Variable	Predios de Productores			Mercado Modelo		
	Acelga	Lechuga mantecosa	Espinaca	Acelga	Lechuga	Espinaca
	mg kg ⁻¹					
Cobertura plástica						
Con	1661 a† (10)‡	1632 a (45)	1903 a (7)	sd §	sd	sd
Sin	1023 b (91)	1027 b (89)	931 b (47)	sd	sd	sd
Estación de muestreo						
Invierno	1220 a (59)	1360 a (50)	1609 a (43)	2035 a ¶ (12)	1563 a (12)	2010 a (10)
Verano	937 a (42)	1299 a (84)	1226 a (11)	1473 b (13)	1055 b (25)	1867 a (9)

† Comparación de medias mediante test de Tukey, las letras diferentes en la misma columna significan diferencia significativa al 0,05. ‡ El número entre paréntesis corresponde a la cantidad de muestras utilizadas en la comparación. § sd: sin dato. ¶ Comparación de medias mediante test de Tukey, las letras diferentes en la misma columna significan diferencia significativa al 0,10.

La lechuga mantecosa presentó mayor concentración de Nit-Hj que la lechuga crespas (P<0,005) cuando ambas crecieron en las mismas condiciones, lo que concuerda con lo encontrado por Klingenberg (1995) y Muro *et al.* (1998). Sin embargo, Amrl y Hadidi (2001) al comparar la concentración de Nit-Hj en diferentes hortalizas, entre ellas lechuga, no observaron diferencias entre distintas variedades.

2.5.2 Concentración de nitrato en hortalizas procedentes del Mercado Modelo

Los valores medios y desvíos estándar de la concentración de Nit-Hj de acelga, espinaca y lechuga mantecosa, fueron 1744 ±761, 1245±664 y 1942±789 mg.kg⁻¹, respectivamente (Fig. 2). Al igual que las muestras tomadas de PP, la concentración promedio de Nit-Hj no superó la concentración máxima sugerida en la normativa 563/2002 para espinaca y lechuga. Sin embargo, en espinaca, la concentración de Nit-Hj

en 3 de 10 muestras de verano y 1 de las 9 muestras de invierno igualaron o superaron los valores aconsejados por la normativa (2500 mg kg⁻¹ y 3000 mg kg⁻¹, respectivamente).

En lechuga mantecosa, sólo en una muestra de verano la concentración de Nit-Hj se situó en el límite aceptable para la producción a cielo descubierto, pero de las muestras procedentes del MM no se tiene información acerca del sistema de producción del que proceden.

Las concentraciones medias de Nit-Hj de acelga y lechuga mantecosa fueron superiores en invierno respecto a las encontradas en verano (Cuadro 1), lo que también pudo deberse a que en invierno hay mayor número de producciones bajo cobertura plástica y a causa de la menor luminosidad los cultivos hayan concentrado más NO₃.

Al considerar el efecto post-cosecha, observamos que la media de la concentración Nit-Hj de acelga y espinaca de muestras del MM fue mayor a la encontrada en muestras de PP, tanto en verano como en invierno (Figuras 1 y 2), mientras que en muestras de lechuga mantecosa fue la misma. Esto evidencia que durante la poscosecha, en nuestras condiciones, aumenta la concentración de NO₃-Hj. Al comparar las concentraciones de NO₃ en base seca, observamos que en invierno las acelgas y la espinacas procedentes del MM concentraron, respectivamente, 2,14 y 2,22 veces más NO₃ en hoja que las muestras procedentes de PP; mientras que en verano las muestra del MM de de acelga y espinaca concentraron, respectivamente, 2,00 y 2,72 más que las muestra procedentes de PP. El aumento podría deberse a la pérdida de agua por deshidratación o a la pérdida de peso por la respiración del tejido, lo cual aumentaría la concentración de NO₃. La mayor concentración de NO₃ en las muestras del MM también podría deberse al NO₃ aportado por el agua con la que se lavan las hortalizas en los PP inmediatamente luego de cosechadas, que presentó concentraciones entre 1 y 488 mg NO₃ L⁻¹, aunque el aporte por esta vía parece cuantitativamente poco importante. Klingenberg (1995) también encontró un aumento en la concentración de NO₃ en lechuga almacenada a temperatura ambiente. Sin embargo, Chung *et al.* (2004) observaron un descenso de la concentración de Nit-Hj de espinaca almacenada a

temperatura ambiente (22°C) durante 7 días, acompañado de un incremento en la concentración de NO₂ a partir del tercer día, probablemente debido a la actividad microbiana.

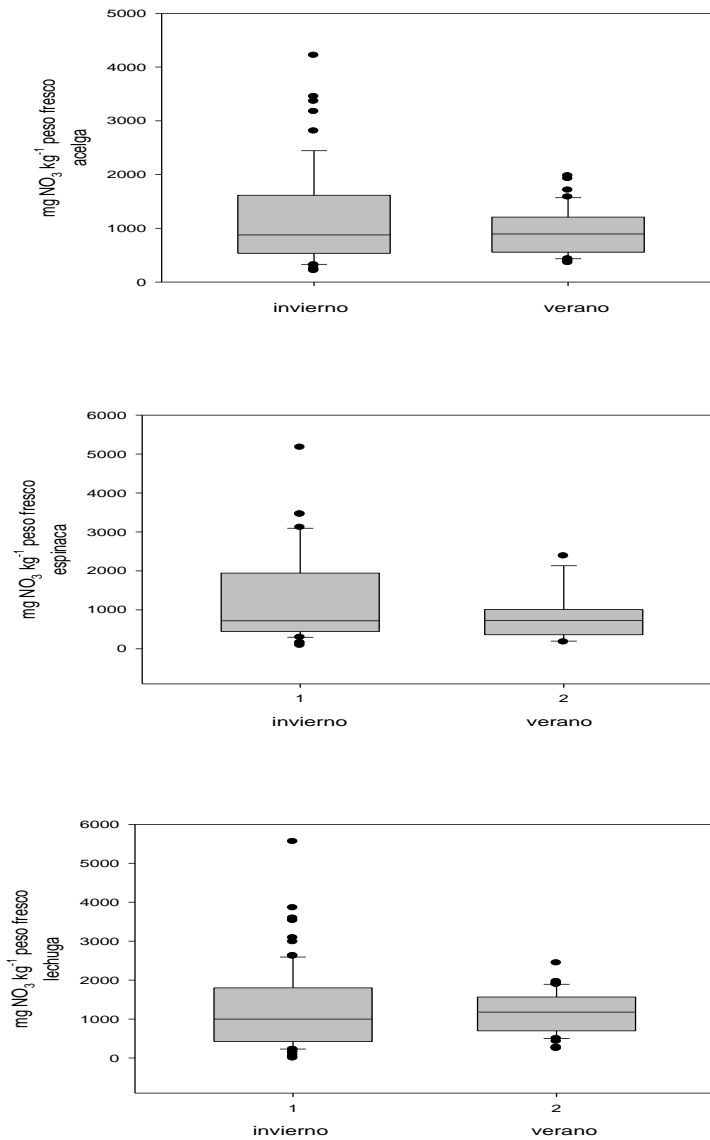


Figura 2. Concentración de NO₃ en hojas de: a) acelga ($n_{\text{verano}}=12$, $n_{\text{invierno}}=13$); b) lechuga mantecosa ($n_{\text{verano}}=25$, $n_{\text{invierno}}=15$); c) espinaca ($n_{\text{verano}}=9$, $n_{\text{invierno}}=10$), recolectadas en el Mercado Modelo de Frutas y Verduras. Los extremos de las cajas representan los percentiles 75 y 25, la línea llena interior representa la mediana, la línea punteada la media, las cuotas externas sitúan los valores máximos (percentil 95) y mínimos (percentil 5), los círculos negros rellenos representan los

outliers. Se desconoce si la lechuga mantecosa es producida bajo cobertura plástica o a cielo descubierto.

2.5.3 Nitrato en hojas en relación al nitrógeno del suelo y a su aporte por fertilización

Si bien se hallaron coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre las fracciones de N del suelo y Nit-Hj, por los bajos valores de los mismo no podemos explicar gran parte de la variación observada (Cuadro 2). Sin embargo, cuando dentro de cada especie se agrupó la información por estación, sistema de producción y tipo de fertilización, la Nit-Hj tuvo mayor relación con las fracciones de N del suelo (Cuadro 3). Este criterio también permitió identificar las situaciones que producen mayor acumulación de Nit-Hj cuando se comparó la concentración de NO₃ en ese órgano entre las diferentes tecnologías de producción.

De todas formas, no fue posible encontrar para un momento del año y una tecnología de producción, fracciones de N en el suelo que posean similar incidencia en las tres especies evaluadas. Por esto, los modelos ajustados son apropiados sólo para establecer relaciones en cada condición evaluada, pero no para realizar predicciones. Las relaciones positivas entre las fracciones de N del suelo y/o las fuentes de N agregado con la concentración de Nit-Hj evidenciada por algunos modelos, concuerdan con relaciones obtenidas por otros autores (Klingenberg, 1995; McCall y Willumsen 1998; Wang y Shengxiu, 2004).

En espinaca de invierno fertilizada con abono orgánico la concentración de Nit-Hj fue mayor a la no fertilizada con ese abono. Este resultado concuerda con lo encontrado en otros cultivos de hortalizas (Klingenberg, 1995; Böckman *et al.*, 1993; Fjelkner-Modig *et al.*, 2000; Malmaurety *et al.*, 2002). Ansoreta - Miner *et al.* (1994) no encontraron diferencias en la concentración de NO₃ en lechuga con diferentes niveles de fertilización mineral y/o orgánica. En el cultivo posterior, sin embargo, las lechugas en parcelas abonadas antes con gallinaza, presentaron mayor concentración de NO₃, debido probablemente a la elevada y gradual liberación de NO₃ desde ese material orgánico. Por el contrario, Vogtman *et al.* (1984), Muramoto (1999) y Worthington (2001),

encontraron hasta un 15% menos de concentración de NO₃ en lechuga y espinaca en los sistemas de producción orgánica respecto a los convencionales. En espinaca y col, según Zhou *et al.* (2000), la fertilización con estiércol y abonos verde, en lugar de con mineral, puede disminuir la concentración de NO₃ entre un 25 y 75%. La menor concentración de NO₃ en hoja en cultivos fertilizados con abonos orgánicos puede deberse a que estas fuentes agregan, también, otros nutrientes además de N, los cuales pueden estar disminuyendo la acumulación de NO₃ o favoreciendo la asimilación del N absorbido.

Cuadro 2. Coeficientes de correlación entre los contenido de NO₃ en hoja de las diferentes hortalizas, cultivadas a cielo descubierto o bajo cobertura plástica, las fracciones de N del suelo y el aporte de N que recibieron los cultivos.

	Muestreo †	Cultivo bajo	Fracción de N del suelo §					Aporte de N ¶		
		Cobertura ‡	Nitsu	AmoSu	Nmin	MOS	Abha	Norg	Nquim	Ntotal
acelga	Ver.	0,350*	0,474*	-0,050	0,096	-0,123	0,297*	0,317*	-0,154	0,097
	Inv.	0,269*	0,171	0,084	0,136	0,220*	0,149	0,159	0,124	0,187
espinaca	Ver.	-0,057	0,127	0,447	0,275	0,061	0,245	0,008	0,308	0,167
	Inv.	0,343*	-0,024	0,124	-0,355*	-0,022	0,100	0,082	-0,082	0,033
lechuga mantecosa	Ver.	-0,020	0,229	0,255*	0,127	0,052	0,043	0,084	0,075	0,135
	Inv.	0,391*	0,304*	0,107	0,304*	0,202*	-0,102	-0,063	0,129	0,014
lechuga crespa	Ver.	SD	0,430	0,284	0,235	0,413	-0,280	-0,280	-0,211	-0,366
	Inv.	0,177	0,380	0,620*	0,078	-0,180	0,627*	0,639*	0,058	0,593*

*, ** y SD: valor significativo con P<0,05, P<0,10 y sin dato respectivamente. † Ver: muestreo en verano; Inv: muestreo en invierno. ‡ La producción a cielo descubierto o bajo cobertura plástica se introdujeron como “dummy variable” para determinar una posible correlación. A la producción a cielo descubierto se le adjudicó el valor 0 y a la cobertura plástica el valor 1. § Nitsu: mg N-NO₃ kg⁻¹ suelo; AmoSu: mg N-NH₄ kg⁻¹ suelo; Nmin: mg N-NH₄ potencialmente mineralizable kg⁻¹ suelo; MOS: contenido de materia orgánica del suelo. ¶ Abha: kg de abono orgánico agregado por ha; Norg: kg N agregado con los abonos orgánicos; Nquim: kg de N agregados con los fertilizantes nitrogenados de síntesis química; Ntotal: kg de N agregados con los fertilizantes nitrogenado de síntesis química más los agregados con los abonos orgánicos.

Cuadro 3. Modelos de regresión ajustados en cada hortaliza para la estimación de mg NO₃ kg⁻¹ peso fresco (Y), a partir de las fracciones de N analizadas y la cantidad de estiércol utilizado (X). Las muestras se clasificaron con base al momento y tecnología de producción. La concentración promedio de NO₃ en hoja en base fresca alcanzada por cada tecnología de producción se comparó por test de Tukey.

Tecnología de Producción †	Modelo ajustado ‡	n §	R ²	NO ₃ ¶ mg kg ⁻¹
<u>Espinaca</u>				
inv s/ab	$3460 (1 - e^{(-0,016 (130,5 + N_{\text{itsu}})})} + 0,29 N_{\text{min}}^2 - 26,6 N_{\text{min}} - 2337$	12	0,86	493 b
inv c/ab	si $N_{\text{min}} < 40$ $4636 - 53,5 N_{\text{itsu}}$ si $N_{\text{min}} > 40$ $581,1 + 4,95 N_{\text{itsu}}$	20 (2)	0,85	1297 a
ver	si $N_{\text{itsu}} < 35,1$ $-22,2 + 27,9 N_{\text{itsu}}$ si $N_{\text{itsu}} < 35,1$ $\text{plateau} = 958,7$	9	0,78	666 nc
<u>Acelga</u>				
inv s/ab.	$5,5 \text{ AmoSu} + 0,9 N_{\text{min}} + 0,3 \text{ AmoSu} N_{\text{min}} + 420,0$	17 (5)	0,80	1164 a
inv c/ab. G	$-3,7 N_{\text{itsu}} - 4,5 \text{ AmoSu} + 0,2 N_{\text{itsu}} \text{ AmoSu} + 835$	12 (4)	0,64	1200 a
inv c/ab. P	$15,1 \text{ MOS} - 0,03 \text{ Abha} + 0,02 \text{ MOS} \text{ Abha} + 437,3$	12 (1)	0,67	1357 a
ver s/ab.	si $\text{NitSu} < 24$ $27,0 N_{\text{itsu}} + 402,6 \text{ MOS} - 663,4$ si $\text{NitSu} > 24$ $402,6 \text{ MOS} - 692,3$	13 (2)	0,62	857 a
ver c/ab.	$=1193 (1 - e^{(-0,02 (N_{\text{itsu}} + 14,8))}) - 0,02 \text{ Norg}^2 + 7,0 \text{ Norg}$	19 (1)	0,55	1083 a
<u>Lechuga mantecosa</u>				
inv CD s/ab. s/Q	$393,5 (1 - e^{(-0,3 (N_{\text{itsu}} - 2,2)})}$	5	0,95	558 c
inv CD s/ab. c/Q	$9,0 N_{\text{min}} - 414,9$	9	0,68	1152 bc
inv CD c/ab. s/Q	$192,2 N_{\text{itsu}}^{0,5} - 10,2 N_{\text{itsu}} + 22,7 N_{\text{min}} - 10,2$	17	0,75	838 c
inv CD c/ab. c/Q	Si $\text{AmoSu} < 8$ $217,7 \text{ AmoSu} - 356,6$ Si $\text{AmoSu} > 8$ $319,0 + e^{(0,014 N_{\text{total}})}$	13 (1)	0,95	946 bc
inv CP s/ab.	Si $\text{MOS} < 3,5$ $2112,40 (1 - e^{(-0,01 (N_{\text{itsu}} - 9,1)})}$	14 (2)	0,86	2155 a

	Si MOS > 3,5	-46,0 Nmin + 5585,3			
inv CP c/ab.	2526	$(1 - e^{(-0,1(1,7 + \text{AmoSu}))}) (1 - e^{(-0,2(\text{Nitsu} - 8,1))})$	17(5)	0,70	1417 b
ver s/ab. s/Q	273,3	$(\text{Nitsu}/\text{AmoSu}) + 46,3$	10 (1)	0,78	951 a
ver s/ab. c/Q	-7,6	$\text{Nquim} - 196,2 \text{Nitsu}^{0,5} + 23,1 \text{Nitsu} + 2194,6$	8	0,91	1339 a
ver c/ab. s/Q	1337	$(1 - e^{(-1,2(\text{Nitsu} - 7,3))}) - 658,9 \text{Ln AmoSu} - 1380$	11 (2)	0,68	1285 a
ver c/ab. c/Q	7528,4	$(1 - e^{(-0,5(\text{Nitsu} - 6,5))}) + 659,7 \text{MOS} - 8396$	9 (1)	0,68	1092 a

Lechuga crespa

inv	y= 420,0 + 28,8 AmoSu		10 (1)	0,75	964 nc
	Si AmoSu <14,5	-447,0 + 72,4 AmoSu - 6,8 Nitsu + 135,9			
ver	NitSu ^{0,5}		10	0,77	1023 nc
	Si AmoSu >14,5	953,0 - 6,8 Nitsu + 135,9 NitSu ^{0,5}			

† ver: verano; inv: invierno; c/ab.: con abono orgánico (cama de pollo o estiércol de gallina); s/ab.: sin abono orgánico; s/Q: sin fertilizante nitrogenado de síntesis química; c/Q: con fertilizante nitrogenado de síntesis química; CD: producción a cielo descubierto; CP: producción bajo cobertura plástica. ‡ Nitsu: mg N-NO₃ kg⁻¹ suelo; MOS: contenido de materia orgánica del suelo; AmoSu: mg N-NH₄ kg⁻¹ suelo; Nmin: mg N-NH₄ potencialmente mineralizable kg⁻¹ suelo; Nquim: kg de N agregados con los fertilizantes de síntesis química; Norg: kg ha⁻¹ N agregado con los abonos orgánicos; Ntotal: total de kg ha⁻¹ N agregado; Abha: kg ha⁻¹ de abono orgánico. § El número entre paréntesis corresponde a la cantidad de muestras que no son representadas por el modelo. ¶ letras diferentes significan diferencia significativa P < 0,10; nc: la comparación no corresponde.

Otros autores encontraron que la fertilización con abono orgánico se acompañó de la disminución de la Nit-Hj en diversas hortalizas (Böckman *et al.*, 1993; Muramoto, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Worthington, 2001; Chena *et al.*, 2004), como observamos en lechuga mantecosa de invierno bajo cobertura, cuando se aplicó abono orgánico (Cuadro 3). Este hecho puede deberse a la interacción negativa entre la absorción de N y otros iones como K y P agregados con el estiércol (Zhou *et al.*, 2000). En acelga no se encontraron diferencias entre las tecnologías de producción utilizadas y la concentración de Nit-Hj (Cuadro 3).

2.5.4 Exposición del consumidor a la ingesta de nitrato

Según la IDA sugerida por la OMS (JECFA, 2002) el consumidor promedio, un individuo de 70 kg de peso corporal, puede ingerir una cantidad diaria máxima de 259 mg NO₃. Con base a este criterio, se realizó una estimación de las cantidades diarias de materia fresca y el equivalente en N^o hojas, que un consumidor podría ingerir de cada

hortaliza (Cuadro 4). Para esta estimación se asumió que todo el NO_3^- de la dieta proviene de esa fuente. Como se muestra en el Cuadro 4, no parece factible que una persona ingiera cantidades excesivas de NO_3 por el consumo de lechuga, acelga o espinaca que posean, respectivamente, concentraciones de Nit-Hj equivalentes a las promedio o al percentil 75.

Durante el período evaluado (mayo de 2003 a diciembre de 2005) sólo el 0,63% de las lechugas y el 9,3% de las espinacas de los PP superaron los límites de $\text{NO}_3\text{-Hj}$ de la directiva 563/2002 de la Unión Europea. En el MM el 21,1% de las espinacas superaron los límites correspondientes, mientras que las demás hortalizas no superaron estos límites. Sin embargo, el consumo de hortalizas con valores de $\text{NO}_3\text{-Hj}$ similares a los del cuartil superior de este trabajo podría conducir a una ingesta excesiva de NO_3 , de acuerdo a los criterios de la OMS. Esto implica que sería recomendable reducir aún más la concentración de $\text{NO}_3\text{-Hj}$ de estas hortalizas, pero para lograr este objetivo habría que establecer en Uruguay normas aún más estrictas que las de la UE en cuanto a los máximos límites de concentración tolerados.

Las condiciones de baja luminosidad y alta disponibilidad de N favorecieron el incremento de la concentración de NO_3 en las hojas de lechuga, acelga y espinaca. Los cultivos producidos bajo cobertura plástica tuvieron en promedio concentraciones superiores de $\text{NO}_3\text{-Hj}$, lo cual podría deberse a la menor luminosidad que recibieron. En términos generales, además, las hortalizas provenientes de predios con mayor aporte de N del suelo y/o fertilizantes tendieron a presentar mayores concentraciones de $\text{NO}_3\text{-Hj}$, pero las relaciones cuantitativas encontradas entre estas fuentes de aporte de N con $\text{NO}_3\text{-Hj}$ fueron válidas solamente dentro de cada tecnología productiva y posiblemente tengan limitado poder de predicción.

Cuadro 4. Recomendación de consumo máximo de materia fresca de cada hortaliza con base a criterios de ingesta máxima admisible de NO_3^- por la Organización Mundial de la Salud.

Hortaliza	Época de muestreo	Consumo máximo admisible de hojas según diferentes escenarios de concentración †					
		Percentil 50		Percentil 75		Concentración máxima	
		Peso (g día ⁻¹)	Nº hoja ‡	Peso (g día ⁻¹)	Nº hojas	Peso (g día ⁻¹)	Nº hojas
Lechuga	Invierno	195	15	136	10	46	4
	Verano	230	18	171	13	100	8
Espinaca	Invierno	183	37	112	23	49	10
	Verano	197	40	121	24	91	18
Acelga	Invierno	186	11	133	8	61	4
	Verano	240	14	190	11	78	5

† Esta determinación se realizó considerando una ingesta máxima diaria de 259 mg de NO_3^- lo que correspondería para una persona de 70 kg de peso corporal y asumiendo que cada hortaliza constituía la única fuente de aporte de NO_3^- a la dieta. Los percentiles 50, 75 y la concentración máxima se estimaron a partir de los datos relevados. ‡ El Nº de hojas se estimó como el consumo recomendado (g día⁻¹) dividido el peso promedio de una hoja. El peso promedio de hoja de cada hortaliza se estimó como el promedio del Peso Fresco de cada muestra dividido por las 36 hojas de las cual se compusieron las muestras. El peso promedio de hoja fue de: 13,0 g para lechuga; de 5,0 g para espinaca; y de 17,0 g para acelga.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Aldabe L.** 2000. Producción de hortalizas en Uruguay. Epsilon. Montevideo, Uruguay. 269 p.
- Amrl A, Hadidi N.** 2001. Effect of cultivar and harvest date on nitrate (NO₃) and nitrite (NO₂) content of selected vegetables grown under open field and greenhouse conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14: 59-67.
- Ansoreta-Miner D, Merino D, Merino E, Fernández-Darlás N, Ruiz Larrañaga N, Muro Erreguerena J.** 1994. Nitratos en lechugas. Influencia del abonado nitrogenado en el contenido de verano. *Horticultura*. 99: 13-18.
- Bloom-Zandstra M, Lampe J.** 1985. The role of nitrate in the osmoregulation of lettuce (*Lactuca sativa L.*), grow at different light intensities. *Journal of Experimental Botany*. 36: 1043-1052.
- Böckman O, Kaarstad O, Lie O, Richards I.** 1993. Agricultura y fertilizante. Fertilizantes en perspectiva. 2^a. Noruega, Ostlands- Posten. 265 p.
- Barbazán M, del Pino A, Moltini C, Hernández J, Rodríguez, J, Beretta, A.** 2010. Aplicación de enmiendas orgánicas y efectos en el suelo. *En Manejo de suelos para producción hortícola sustentable*. INIA. Montevideo. 624, p.: 21 – 31.
- Chena B-M, Wang Z-H, Li S-X, Wang G-X, Songc H-X, Wang X-N.** 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*. 167: 635–643.
- Chung J C, Chou S S, Hwang D F.** 2004. Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives and Contaminants*. 21 (4): 317–322.

- Chung S Y, Kim J S, Kim M, Hong M K, Lee J O, Kim C M, Song I S.** 2003. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. *Food Additives and Contaminants.* 7 (20): 621–628.
- Delgado J, Follett R.** 1998. Sap Test to Determine Nitrate-Nitrogen Concentration in Aboveground biomass of Winter cover Crops. *Community of Soil Science and Plant Analysis.* 29 (5&6): 545 – 559.
- Dejonckheere W, Steurbaut W, Drieghe S, Verstraeten R, Braeckman H.** 1994. Nitrate in food commodities of vegetable origin and the total diet in Belgium (1992-1993). *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* 12: 359-370.
- European Community. European Commission: Scientific Committee for Food.** 1995. Opinion on nitrate and nitrite. Annex 4 to Document III/. 5611/95, pp. 1–25.
- Fjelkner-Modig S, Bengtsson H, Stegmark R, Nyström S.** 2000. The influence of organic and integrated production on nutritional, sensory and agricultural aspects of vegetable raw materials for food production. *Acta Agric. Scand., Sect. B, Soil and Plant Sci.* 50:102–113.
- Geraldson C M, Tyler K B.** 1990. Plant Analysis as an Aid in Fertilizing Vegetable Crops. In D. E. Kissel. ed. Westerman R. L. (ed.) *Soil Testing and Plant Analysis.* SSSA, Madison, WI. 546-562 p
- Gelderman R H, Beegle D.** 1998. Nitrate – Nitrogen. In Brown, J. R. (ed) *Recommended chemical soil testing procedures for North Central Region.* Missouri Agric. Exp. Stn. Pub. No. 221.17 – 20.
- Gillian Y, Clifford R, Harrison N.** 1999. Monitoring for nitrate in UK-grown lettuce and spinach. *Food Additives and Contaminants.* 16 (7): 301 – 306.
- Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), Expert Committee on Food Additives. European Community.** 2002. Evaluation of certain food additives.

Fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO. World Health Organization, Geneva. 26-32 pp

Keeney D R. 1980. Nitrogen availability indices. *En Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, 2nd. Eds. A L Page, R H Miller and D R Keeney, Am. Soc. Agron. Inc., Soil Sci. Soc. Am. Inc. Madison, Wisconsin. 711–733 pp.

Klingenberg C. 1995. Comportamiento de las concentraciones de nitrato y nitrito en lechuga (*Lactuca sativa* var. *Crispa* (L)) bajo condiciones de fertilización nitrogenada y otros ensayos de cosecha y poscosecha. Tesis Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 52p

Malmaurety L, Parent-Massin D, Ardí J L, Vergery P. 2002 Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*. 19 (6): 524 – 532.

McCall D, Willumsen J. 1998. Effects of nitrate, ammonium and chloride application on the yield and nitrate content of soil-grown lettuce. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*.73: 698-703.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). 1998. Nitrate in vegetables. Food Surveillance Information Sheet Number 158. En línea en <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1998/no158/158nitra.htm>. Verificado el 21 de marzo de 2012.

Mulvaney R L. 1996. Nitrogen-inorganic forms. *En* D.L. Sparks (ed.) *Methods of soil analysis*. Part 3. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI. p. 1123–1184.

Muro J, Irigoyen I, Lamsfus C. 1998. Acumulación de nitratos en hortalizas de hoja. *En* Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: de la Fisiología a la Biología

Molecular. Vega J. M., Aparicio P. J., Castillo F. y Maldonado J. M.

eds. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Pp. 453-464.

Perdomo C, Casanova O, Ciganda, V. 2001. Contaminación de aguas subterráneas con nitratos y coliformes en el litoral sudeste del Uruguay. *Agrociencia*.1: 10-22.

Petersen A, Stoltze S. 1999. Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. *Food Additives and Contaminants*. 16 (7): 291- 299.

Rhine E, Sims G, Mulvaney R, Pratt E. 1998. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Science Society of American Journal*. 62:473-480.

Santos R H S, Casali V W D, Condé A R, Miranda L. C. G. 1994. Qualidade de alface cultivada com composto orgânico. *Hort Bras*.12: 29-32.

SAS Institute, 1990. SAS/STAT user's guide. Version 6. 4th ed. Vol. 1. SAS Inst., Cary, NC.

Scottish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1998. Nitrate in vegetables. Food Surveillance Information Sheet Number 158. En línea en <http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1998/no158/158nitra.htm>. Verificado el 17 de agosto del 2007.

Sims J R, Haby V A. 1970. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Sci*. 112: 137-141.

Urquiaga S, Zapata F. 2000. Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. 1ª. Brasil. *Génesis*. 110p.

Walkley A, Black I A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determination soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci*. 37: 29-38.

- Wang Z, Shengxiu L.** 2004. Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on plant growth and nitrate accumulation in vegetables. *Journal of Plant Nutrition*. 27 (3): 539–556.
- Worthington V.** 2001. Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 7: 161–173.
- Wraith JM, Or D.** 1998. Nonlinear parameter estimation using spreadsheet software. *Journal of Natural Resources and Life Sciences Education* 27, 13-19.
- Zhaohui W, Li S.** 2004. Effects of Nitrogen and Phosphorus fertilization on plant growth and nitrate accumulation in vegetables. *Journal of Plant Nutrient*. 27 (3): 539 -556.
- Zhou Z-Y, Wang M-J, Wang J-S.** 2000. Nitrate and nitrite contamination in vegetables in China. *Food Rev. Int.* 16 (1): 61- 76.

3. INTERFERENCIA DEL COLOR DEL EXTRACTO EN MUESTRAS SECAS DE
LECHUGA EN LA DETERMINACIÓN DE NITRATO POR EL MÉTODO DE
CATALDO

Artículo a publicar en Agrociencia

3.1 RESUMEN

La implementación de sistemas de control a nivel internacional en la concentración de NO_3 en alimentos en humanos, supone contar con métodos de determinación que además de precisos, sean prácticos y económicos. En este trabajo se compararon dos métodos de determinación de la concentración de NO_3 , el potenciométrico basado en el uso del electrodo de actividad específica, y el colorimétrico propuesto por Cataldo *et al.* (1975). Ambas determinaciones fueron hechas en extractos de muestras de hojas secas de lechuga (*lactuca sativa* L. var Capitata). Los resultados obtenidos por colorimetría fueron 30% superiores a los determinados por potenciometría y esta diferencia fue causada por la interferencia generada por los extractos en la determinación por el método colorimétrico. Cataldo *et al.* (1975) propusieron descontar la absorbancia del color del extracto a cada muestra para eliminar esta interferencia, cuando los extractos son obtenidos a partir de tejido fresco. Cuando utilizamos este procedimiento, la diferencia en la concentración de NO_3 determinada por el método potenciométrico y el colorimétrico se redujo y no fue estadísticamente significativa. El otro procedimiento evaluado para eliminar el color del extracto fue el agregado de carbón activado. Aunque los valores de concentración de NO_3 estimados con ambos procedimientos fueron similares, el uso de carbón activado resulta más simple, ya que no requiere utilizar un blanco para cada muestra.

Palabras clave: Cataldo, electrodo actividad específica, carbón activado

3.2 SUMMARY

COLOR INTERFERENCE IN DRIED LETTUCE SAMPLES EXTRACT IN THE NITRATE DETERMINATION BY THE METHOD OF CATALDO

At an international level, there is an increasing trend towards the implementation of control measures to ensure low nitrate levels of human food, and the methods used to measure nitrate concentration should be therefore practical and inexpensive. In this work two methods were evaluated, the potentiometric based on the electrode of specific activity and the colorimetric of Cataldo *et al.* (1975). All determinations were done on water extracts of dried leaf lettuce (*lactuca sativa* L. var Capitata) samples. Nitrate concentrations measured by colorimetry were 30% higher than those obtained by potentiometry, and this difference was due to the interference caused by some of the reactivities used for color development. Cataldo *et al.* (1975), suggested a procedure to avoid this interference which consisted in discounting the absorption of the extract before color development, using hence one blank per sample, but these authors considered that this procedure would only be needed for water extracts obtained from fresh samples. When this procedure was applied, the difference between the colorimetric and the potentiometric methods was statistically non-significant. The other procedure evaluated was the addition of activated carbon to the extract, which also eliminated the difference between methods. Although both procedures were equally effective in eliminating this background color, the use of activated carbon is recommended because it does not require the use of one blank per sample.

Keywords: Cataldo, specific electrode activity, activated carbon

3.3 INTRODUCCIÓN

Altos contenidos de NO_3 en las hortalizas de hoja pueden presentar un riesgo para la salud, ya que su consumo en exceso se asocia a metahemoglobinemia infantil, formación de sustancias cancerígenas como nitrosaminas y nitrosamidas, disminución de la reserva de tocoferoles en el hígado y bocio (Böckman *et al.* 1993; Muro *et al.*, 1998; Urquiaga y Zapata, 2000). A causa de esta problemática, actualmente se analiza en Europa, y también en Uruguay, la introducción de límites de concentración de NO_3 en hojas de hortalizas, por encima de los cuales su consumo no sería recomendable. En Uruguay se ha incrementado la demanda para determinar la concentración de NO_3 en hojas de hortalizas en general, y específicamente en lechuga, debido a la creciente demanda de los consumidores por alimentos de calidad. Por esta razón es importante la determinación precisa y rápida del contenido de NO_3 en hojas de hortalizas.

Entre los métodos usados comúnmente para determinar la concentración de NO_3 en hojas se encuentran el potenciométrico, en el que se utiliza un electrodo de actividad específica. Otro método es el colorimétrico, basado en la nitratación del ácido salicílico propuesto por Cataldo *et al.* (1975), de ahora en adelante método de Cataldo. El método potenciométrico es simple y conveniente, y requiere solamente de un electrodo y un medidor de pH. Sin embargo, los electrodos son caros, poco sensibles, requieren de una continua reestandarización, y la membrana y el módulo sensor tienen una vida corta, de pocos días a varios meses (Mulvaney, 1996). Además, las muestras vegetales presentan rangos diversos de concentración de NO_3 por lo cual ocasionalmente es necesario repetir extracciones cuando las concentraciones se encuentren fuera de los rangos de calibración.

La cuantificación de la concentración de NO_3 por el método de Cataldo es similar en rapidez y confiabilidad a la cuantificación por el método potenciométrico, pero el primero permite cuantificar el NO_3 en un más amplio rango de concentraciones que el método potenciométrico, sin necesidad de ser recalibrado.

Nuestro laboratorio ha usado comúnmente el método potenciométrico, pero debido a los problemas mencionados nos propusimos como alternativa usar el método de Cataldo para determinar la concentración de este anión en hojas secas de lechuga. Sin embargo, el protocolo sugerido (Cataldo *et al.*, 1975) no resultó adecuado, debido a la pigmentación amarilla-verdosa del extracto que interfería con la determinación. Por consiguiente, el objetivo fue ajustar el procedimiento de Cataldo *et al.* (1975) para dosificar NO₃ en muestras secas de esta especie de hortaliza.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de lechuga *Lactuca sativa* L. (var. Capitata) obtenidas en el mercado local. Cada muestra se compuso de la hoja más joven completamente desarrollada (Geraldson y Tyler, 1990) de 36 plantas. Las hojas se secaron a 60°C en estufa de aire forzado y se molieron hasta pasar malla de 2 mm.

La extracción de NO₃ se realizó con agua a temperatura ambiente, con una relación agua/muestra de 100:1, que se mantuvo en agitación durante 1 h y se filtró con papel Whatman N° 2. Cuando la concentración de NO₃ de la muestra fue mayor a 10000 mg N-NO₃ kg⁻¹ de tejido seco, se usó una relación agua/muestra 200:1 para que la concentración estuviera dentro de la escala utilizada para calibrar el electrodo de actividad específica.

La determinación potenciométrica se realizó con un electrodo de actividad específica de NO₃ (Hach modelo 48680), que se calibró con soluciones de KNO₃ de 1, 10, 20, 40, 100 mg N L⁻¹. Previo a la determinación, se mezclaron 15 mL del extracto de la muestra y 10 mL de una solución de AgSO₄, Al(SO₄)₃·18H₂O, NH₂HSO₃ y H₃BO₃ a efectos de homogeneizar la fuerza iónica y eliminar interferencias (Gelderman y Beegle, 1998).

Para la determinación colorimétrica se usó el método de Cataldo *et al.*, (1975) con modificación de los volúmenes que consistieron en: 0,1 mL de extracto, 0,4 mL de ácido salicílico al 5% (p/v) en H₂SO₄ y luego de 20 min se agregaron 5 mL de NaOH 3,8 M. La absorbancia se midió a 410 nm. Se utilizaron los dos blancos propuestos por Cataldo *et al.* (1975): i) el blanco para extractos de muestras secas (denominado blanco A en adelante) que consiste en 0,1 mL de agua destilada y los reactivos de la técnica, y ii) el blanco para extractos de muestras frescas (denominado blanco E en adelante) que consiste en 0,1 mL de extracto de cada muestra, H₂SO₄ (sin ácido salicílico) y NaOH. El blanco E había sido sugerido por Cataldo *et al.* (1975) como el procedimiento indicado para eliminar el color del extracto en muestras frescas.

El otro procedimiento usado para eliminar el color del extracto consistió en agregar una “cucharadita de té” de carbón activado a 30 mL del extracto, se agitó la mezcla y se filtró con papel Whatman N° 2. La curva de calibración se hizo con soluciones de NO_3 de concentración conocida, que fueron tratadas igual que las muestras.

Los resultados fueron analizados mediante técnicas de comparación de medias y análisis de regresión, utilizando rutinas del Programa Excel (Microsoft Corp., 1997). En todos estos análisis el valor de probabilidad de 1% fue considerado como el límite de significación estadística.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores promedio de concentración de NO_3 obtenidos con el método de Cataldo cuando se usó el blanco A (común a todas las muestras), fueron mayores que los obtenidos con el método potenciométrico (24132 versus 16533 $\text{mg NO}_3 \text{ kg}^{-1}\text{PS}$). Esta diferencia fue estadísticamente significativa, de acuerdo a la prueba t para medias de dos muestras apareadas (test a dos colas). Parte de esta diferencia es atribuible a la coloración amarillo-verdosa del extracto que no pudo cuantificarse correctamente con el procedimiento de determinación del "color del blanco" propuesto por Cataldo *et al.* (1975). El color de extracto varió entre las distintas muestras, lo que introdujo errores de hasta 198 % respecto a la determinación potenciométrica, por lo cual no fue posible usar un valor constante de absorbancia del extracto para todas las muestras para eliminar esta interferencia.

Cuando la concentración de NO_3 fue determinada por el método de Cataldo y se usó el blanco E de cada muestra, la diferencia entre los valores promedio de los métodos colorimétrico y potenciométrico se redujo de 7599 a 1655 $\text{mg NO}_3 \text{ kg}^{-1}\text{PS}$, y no fue estadísticamente significativa.

Prácticamente en todo el rango de análisis, las concentraciones de NO_3 determinadas por el método de Cataldo con el blanco A fueron mayores que las obtenidas por el método potenciométrico (Fig. 1). En cambio, cuando se usó el método de Cataldo con blanco E las concentraciones de NO_3 fueron similares a las determinadas con el método potenciométrico, y las diferencias entre ambos métodos tendieron a distribuirse entorno a la línea 1:1 (Fig. 1). En ambos casos, el coeficiente de correlación (r) entre el método potenciométrico y el de Cataldo fue alto ($r=0,9526$ y $0,9527$ cuando se usó blanco A y E en el método de Cataldo respectivamente) y estadísticamente significativo.

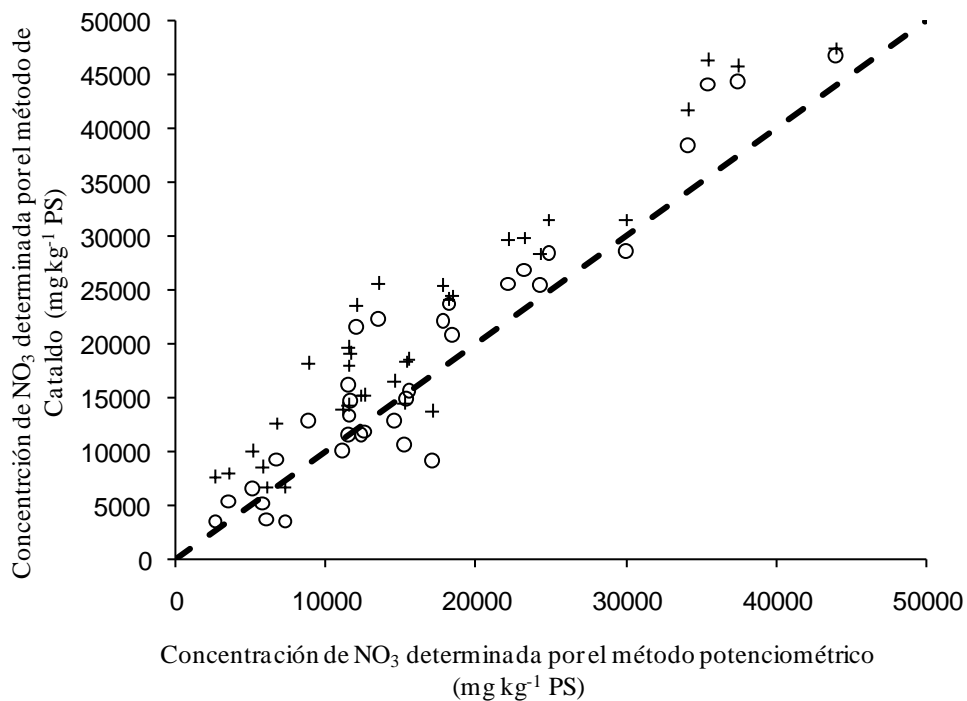


Figura 1. Relación entre la concentración de NO_3 en hojas secas de lechuga determinada por el método colorimétrico de Cataldo y por el potenciométrico. En la determinación colorimétrica se emplearon dos blancos: Blanco A (cruces) y Blanco E (círculos sin relleno). El Blanco A consistió de agua mas los reactivos, el Blanco E consistió del extracto de cada muestra y los reactivos excepto el ácido salicílico. La línea sólida es la línea 1:1.

Además, cuando se usó blanco A, la diferencia entre los valores absolutos de las concentraciones de NO_3 encontradas por ambos métodos tendieron a ser independientes de la concentración de NO_3 (Fig. 2a), mientras que la diferencia relativa tendió a decrecer exponencialmente con el incremento de la concentración de este anión (Fig. 2b). Por otra parte, cuando se usó blanco E, el error absoluto promedio fue cercano a cero (Fig. 2c) y la relación entre el error relativo y la concentración de NO_3 fue relativamente constante (Fig. 2d). Estos resultados sugieren la existencia de una fuente de error relativamente constante cuando se usó blanco A, y que adjudicamos al “color del blanco”. Nosotros hemos observado esta coloración no sólo en el extracto de hojas secas de lechuga, sino también en el de muestras de acelga, espinacas, ryegrass y avena (datos no publicados). Teutsch y Tilson (2004) usaron también una corrección del “color

del blanco” en el análisis de tejido seco de *Digitaria sanguinalis*. Sin embargo, en algunos trabajos en los que se ha utilizado el método de Cataldo para determinar la concentración de NO_3 en muestras secas de distintos vegetales, no se hace referencia a la necesidad de hacer corrección por el “color del blanco” (Inal *et al.*, 1999; Druart *et al.*, 2000; Fontes *et al.*, 2000; Caputo *et al.*, 2001; Unides *et al.*, 2001; Beninni *et al.*, 2002). En otros trabajos en que se utilizaron extractos de tejido fresco, sin embargo, se realizó corrección por el “color del blanco” (Foyer *et al.*, 1998).

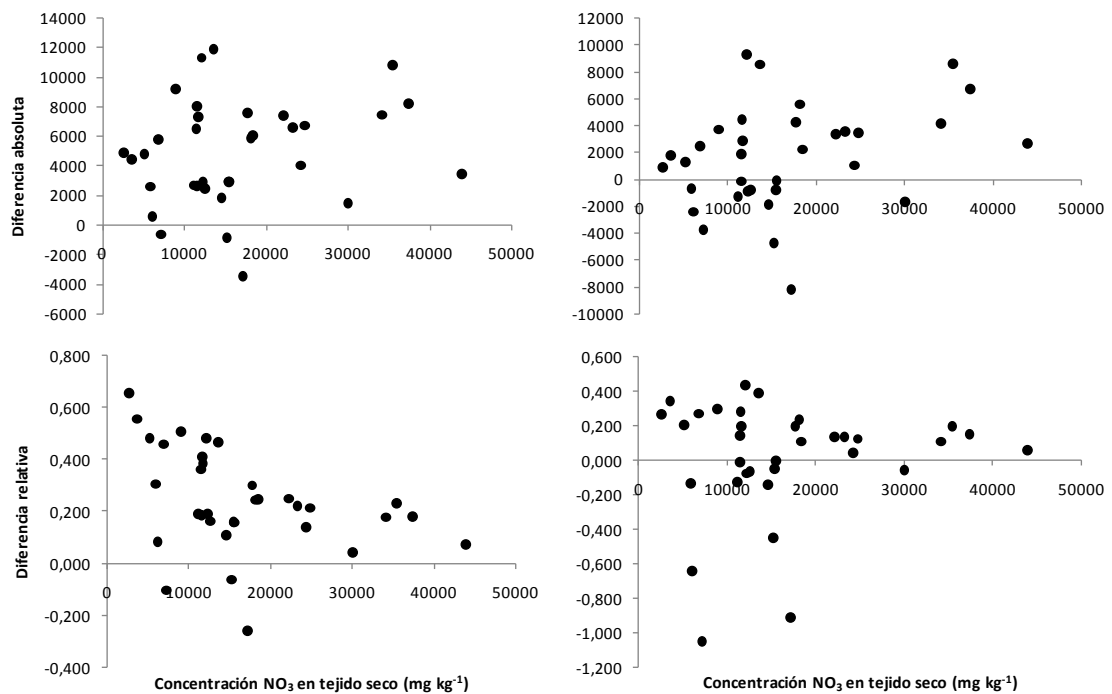


Figura 2. Diferencias absolutas y relativas de concentración de NO_3 en hojas de lechuga obtenidas con los métodos potenciométrico y colorimétrico. El método potenciométrico se comparó con el método colorimétrico de Cataldo con blanco Blanco A (a y b) y con Blanco E (c y d). Las diferencias entre ambos métodos se relacionaron con la concentración de NO_3 determinada con el método potenciométrico. La diferencia absoluta se obtuvo como la resta entre cada valor obtenido por el método colorimétrico y el potenciométrico, y la relativa como la diferencia absoluta dividida por la concentración obtenida por el método potenciométrico. En todos los casos, la concentración de NO_3 fue determinada en muestras de tejido seco.

La principal diferencia observada entre ambos procedimientos se debió al color del extracto, una fuente de error del método de Cataldo. Las diferencias remanentes entre los métodos potenciométrico y de Cataldo con blanco E fueron menores desde el punto de vista práctico.

3.5.1 Eliminación del color del extracto con carbón activado

La relación entre las concentraciones de NO_3 de muestras de tejido seco de lechuga medidas con el método de Cataldo, utilizando carbón activado y el blanco E, fue similar a la línea 1:1 (Fig. 3). El intercepto de la regresión lineal no fue estadísticamente distinto de cero. En cambio, la pendiente de la regresión lineal fue estadísticamente distinta de cero pero no fue distinta de uno (cuadro 1). Da Silva *et al.*, (2001) también utilizaron carbón activado para eliminar el color del extracto de muestras secas de lechugas, pero no compararon este procedimiento con otras técnicas capaces de eliminar esta interferencia.

Cuadro 1. Resultados del análisis de regresión entre las concentraciones de NO_3 determinadas con el método colorimétrico de Cataldo usando dos procedimientos de eliminación del “color del blanco”. Los procedimientos consistieron en usar el Blanco E (X) y en agregar carbón activado con posterior filtración del extracto (Y). El Blanco E consistió del extracto de cada muestra y los reactivos excepto el ácido salicílico. En ambos casos la concentración de NO_3 fue determinada en muestras de tejido seco.

Parámetro	Valor del parámetro	Valor de probabilidad H0: parámetro =0	Valor de probabilidad H0: parámetro =1
a	-617,333	0,211	NC [†]
b	1,081	1,784E-16	0,163 (0,529 [‡])
r	0,968	NC	NC

[†]NC, no corresponde; [‡] el valor entre paréntesis corresponde al valor de probabilidad H0: parámetro =1, para $y=bx$.

En relación al método potenciométrico, el método de Cataldo *et al.* (1975) sobrestimó significativamente en 30% la concentración de NO_3 en extractos de hojas

secas de lechuga, debido a la interferencia producida por el color del extracto. Cuando se eliminó la interferencia usando un blanco E para cada muestra, la diferencia en la concentración de NO_3 determinada por ambos métodos no fue estadísticamente significativa.

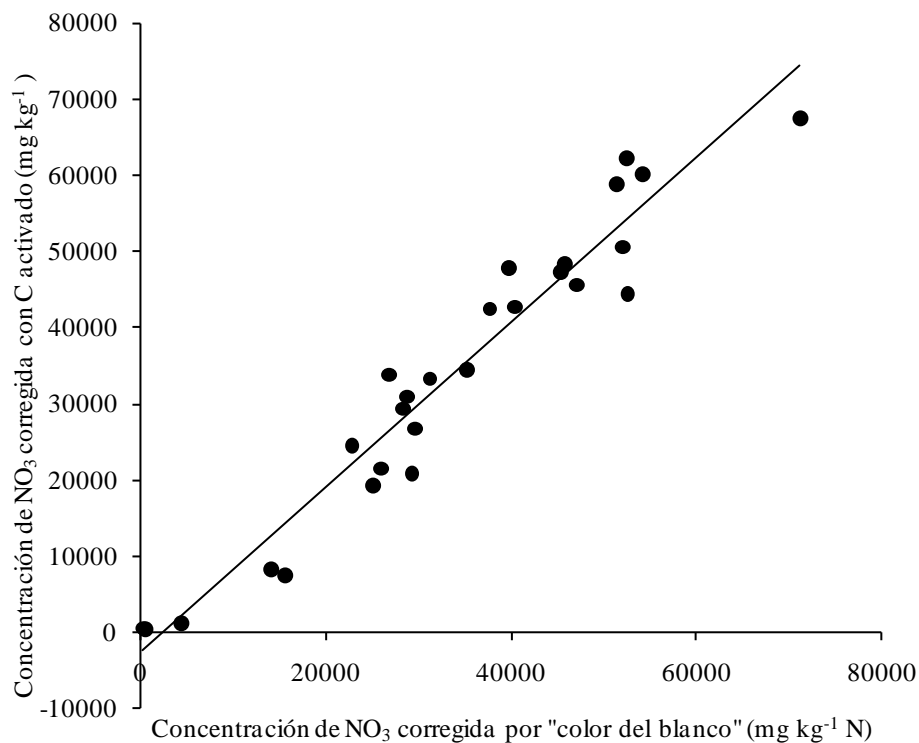


Figura 3. Relación entre la concentración de NO_3 en hojas secas de lechuga determinada por el método colorimétrico de Cataldo. Los valores en el eje x corresponde a las determinaciones de NO_3 de cada muestra a las cuales se las corrigió por el respectivo valor de análisis del "color del blanco"; en el eje y se eliminó al "color del blanco" de cada muestra previamente a cada medición mediante el agregado de C activado. La línea sólida es la línea 1:1.

El uso del carbón activado fue tan eficiente como el blanco E para eliminar la interferencia debida al color del extracto. Sin embargo, nosotros recomendamos usar el carbón activado, ya que no requiere utilizar un blanco diferente para cada muestra.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Beninni E, Takahashi H, Neves C, Fonseca I.** 2002. Level of nitrate in lettuce cultivated in hydroponic and conventional systems. *Horticultura Brasileira*,20(2): 183-186.
- Böckman O, Kaarstad O, Lie O, Richards I.** 1993. Agricultura y Fertilizante: Fertilizantes en perspectiva. 2ª ed. Ostlands- Posten. 265 p.
- Caputo C, Fatta N, Barneix AJ.** 2001. The export of amino acid phloem is altered in wheat plants lacking the short arm of chromosome 7B. *Journal of Experimental Botany*, 52(362): 1761–1768.
- Cataldo D, Haroon M, Schrader L, Youngs V.** 1975. Rapid Colorimetric colorimetric Determination determination of Nitrate nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Soil Science and Plant analysis*, 6: 71-80.
- Da Silva FJ, Dias Casali VW, Cruz C, Da Silva CA.** 2001. Combination capacity in lettuce cultivars based on agronomical characteristics. *Ciência e Agrotecnologia*.25(4): 831-839.
- Delgado J, Follett R.** 1998. Sap Test to Determine Nitrate-Nitrogen Concentration in Aboveground biomass of Winter cover Crops. *Community of Soil Science and Plant Analysis*. 29 (5&6): 545 – 559.
- Druart N, Goupil P, Dewaele E, Boutin JP, Rambour S.** 2000. Nitrate assimilation in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) which acquire radial growth. *Journal of Experimental Botany*, 51(344): 539–546.

- Fontes P, Sampaio R, Finger F.** 2000. Fruit size, mineral composition and quality of trickle-irrigated tomatoes as affected by potassium rates. *Pesquisa Agropecuaria*. 35(1): 21–25.
- Foyer C, Valadier MH, Migge A, Becker T.** 1998 .Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. *Plant Physiologists*, 117(1): 283–292.
- Gelderman R H, Beegle D.** 1998. Nitrate – Nitrogen. P. 17 – 20. In Brown, J. R. (ed) Recommended chemical soil testing procedures for North Central Region. Missouri Agric. Exp. Stn. Pub. No. 221.
- Geraldson C M, Tyler K B.** 1990. Plant Analysis as an Aid in Fertilizing Vegetable Crops.546-562 p. In D. E. Kissel. Ed. Westerman R. L. (ed.) Soil Testing and Plant Analysis. SSSA, Madison, WI.
- Inal A, Günes A, Alpaslan M, Demir K.** 1999. Nitrate versus chloride nutrition effects in a soil-plant system on the growth, nitrate accumulation and N, K, Na, Ca and Cl content of carrot *Daucus carota L.* *Turkish Journal of Biology*, 23: 207–214.
- Mulvaney RL.** 1996. Nitrogen-inorganic forms. In: Sparks DL *et al.*(Eds.) Methods of soil analysis : Chemical methods. Madison : Soil Science Society of America. (Book Serie ; 5) . pp. 1123-1184.
- Muramoto J.** 1999. Comparison of nitrate content in leafy vegetables from organic and conventional farms in California. Center for Agroecology and Sustainable Food Systems, University of California, Santa Cruz. 64 p.

- Muro J, Irigoyen I, Lamsfus C.** 1998. Acumulación de nitratos en hortalizas de hoja. *En Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: de la Fisiología a la Biología Molecular.* Vega J. M., Aparicio P. J., Castillo F. y Maldonado J. M. eds. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Pp. 453-464.
- Teutsch CD, Tilson WM.** 2004. Nitrate accumulation in crabgrass as impacted by nitrogen fertilization rate and application timing [En línea]. Consultado 6 octubre 2004. Disponible en:
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/fg/research/2004/crabgrass/>.
- Unides S, Zhou D, Siddigi Y, Kinghorn J, Glass A.** 2001. Apparent genetic redundancy facilitates ecological plasticity for nitrate transport. *The EMBO Journal*, 20(22): 6246–6255.
- Urquiaga, S., Zapata, F.** 2000. Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. *Génesis*. 110p

4. DISCUSIÓN GENERAL

No existe acuerdo en la bibliografía acerca del riesgo que pueda provocar el consumo de NO_3 con los alimentos. Existe acuerdo, en cambio, de que el NO_2 , nitrosaminas y nitrosamidas producidas en el tracto digestivo a causa de la metabolización del NO_3 tienen un impacto negativo en la salud humana.

En diversas investigaciones podemos observar que difícilmente las lechugas y espinacas (mencionadas en la bibliografía como hortalizas con altas concentraciones de NO_3) superaron los límites recomendados por la UE (cuadro 1). En nuestra investigación obtuvimos un resultado similar, ya que durante el período evaluado (mayo de 2003 a diciembre de 2005) sólo el 0,63% de las lechugas y el 9,3% de las espinacas de los predios de productores superaron los límites de $\text{NO}_3\text{-Hj}$ de la directiva 563/2002 de la Unión Europea. En las muestras del Mercado Modelo el 21,1% de las espinacas superaron los límites correspondientes, mientras que las demás hortalizas no superaron estos límites. Sin embargo, el consumo de hortalizas con valores de $\text{NO}_3\text{-Hj}$ similares a los del cuartil superior de nuestro estudio podría conducir a una ingesta excesiva de NO_3 , de acuerdo a los criterios de la OMS. Esta aparente contradicción se debe a que los criterios de la UE y de la OMS son diferentes, ya que el último se basa en la cantidad de hortaliza consumida y no en la concentración de NO_3 de este vegetal.

En nuestro estudio las condiciones de baja luminosidad y alta disponibilidad de N favorecieron el incremento de la concentración de NO_3 en las hojas de lechuga, acelga y espinaca. Los cultivos producidos bajo cobertura plástica tuvieron en promedio concentraciones superiores de $\text{NO}_3\text{-Hj}$, lo cual pudo deberse a la menor luminosidad que recibieron. En términos generales, además, las hortalizas provenientes de predios con mayor aporte de N del suelo y/o fertilizantes tendieron a presentar mayores concentraciones de $\text{NO}_3\text{-Hj}$, pero las relaciones cuantitativas encontradas entre estas fuentes de aporte de N con $\text{NO}_3\text{-Hj}$ fueron válidas solamente dentro de cada tecnología productiva y posiblemente tengan limitado poder de predicción.

Aunque este estudio no pretendió estudiar este aspecto, en base a la información disponible estimamos que sería posible diseñar medidas de manejo para disminuir la concentración de NO_3 en los cultivos de estas hortalizas. Algunas de estas medidas serían la dosificación de la fertilización con N de acuerdo a la capacidad de aporte de este nutriente por el suelo y a la utilización de coberturas plásticas que permitan la mayor luminosidad posible en los cultivos. Esta disminución de la concentración de NO_3 en hoja se lograría sin perjudicar la conveniencia económica del cultivo, ya que no se afectaría el rendimiento e incluso se reducirían los costos de producción. Además, existiría una ventaja adicional de un menor impacto ambiental del cultivo al reducirse el uso de fertilizante nitrogenado y/o estiércol. De hecho, nuestras observaciones indican que muchos de los predios que tuvieron concentraciones relativamente bajas de NO_3 eran económicamente sostenibles. Otro aspecto importante a considerar es el período desde la cosecha hasta la venta, el cual debería minimizarse para reducir los procesos de deshidratación y respiración de los tejidos, que también incrementan la concentración de NO_3 .

En el caso de que se decidiera realizar un control a nivel comercial acerca de la concentración de NO_3 con la que se comercializan estas hortalizas de hoja, sería necesario disponer de un método analítico rápido, práctico y económico. Con respecto a la practicidad y bajo costo, el método colorimétrico propuesto por Cataldo *et al.* (1975) parece ser una buena alternativa. Al momento de realizar el análisis, sin embargo, se debería eliminar la interferencia generada por el color del extracto de la muestra mediante el agregado de C activado. La metodología propuesta en este trabajo permite realizar análisis a muestras secas, lo cual implica un período de secado de la muestra que puede ser una limitante para implementar un método de control *in situ* al momento de la comercialización. Para superar esta limitante sería necesario estudiar la aplicabilidad de la metodología propuesta por Cataldo *et al.* (1975) en el análisis de muestras de tejido fresco.

lechuga	1		750	Amhert, EEUU	1972	Maynard y Barker, citados por Muramoto, (1999)
lechuga de invierno	15	247	3283	1933	Corea	1988 Chung <i>et al.</i> (2003)
lechuga de verano	25	884	4488	2728	Corea	1988 Chung <i>et al.</i> (2003)
lechuga de invernadero	18	188	3476	2841	Reino Unido	1996-1998 Gillian, <i>et al.</i> (1999)
lechuga	30	108	7820	2582	Dinamarca	1993-1996 Petersen y Stoltze, (1999)
	4					

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aldabe L.** 2000. Producción de hortalizas en Uruguay. Epsilon. Montevideo, Uruguay. 269 p.
- Amrl A, Hadidi N.** 2001. Effect of cultivar and harvest date on nitrate (NO₃) and nitrite (NO₂) content of selected vegetables grown under open field and greenhouse conditions in Jordan. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14: 59-67.
- Ansoreta-Miner D, Merino D, Merino E, Fernández-Darlás N, Ruiz Larrañaga N, Muro Erreguerena J.** 1994. Nitratos en lechugas. Influencia del abonado nitrogenado en el contenido de verano. *Horticultura*. 99: 13-18.
- Barbazán M, del Pino A, Moltini C, Hernández J, Rodríguez, J, Beretta, A.** 2010. Aplicación de enmiendas orgánicas y efectos en el suelo. *En Manejo de suelos para producción hortícola sustentable*. INIA. Montevideo. 624, p.: 21 – 31.
- Beninni E, Takahashi H, Neves C, Fonseca I.** 2002. Level of nitrate in lettuce cultivated in hydroponic and conventional systems. *Horticultura Brasileira*, 20(2): 183-186.
- Bloom-Zandstra M.** 1989. Nitrate accumulation in vegetables and its relationship to quality. *Annals of Applied Biology* 115: 553-561.
- Bloom-Zandstra M, Lampe J.** 1985. The role of nitrate in the osmoregulation of lettuce (*Lactuca sativa L.*), grow at different light intensities. *Journal of Experimental Botany*. 36: 1043-1052.
- Böckman O, Kaarstad O, Lie O, Richards I.** 1993. Agricultura y fertilizante. Fertilizantes en perspectiva. 2^a. Noruega, Ostlands- Posten. 265 p.
- Callum D, Hong L, Dykhuizen R, Frazer R, Johnston P, Macknight G, Smith L, Lamza K, Mckenzie H, Batt L, Kelly D, Golden M, Benjamin N, Leifert C.** 1997. Protection against oral and gastrointestinal diseases: importance of dietary

nitrate intake, oral nitrate reduction and enterosalivary nitrate circulation. *Comp. Biochem. Physiology* 118A(4): 939-948.

Caputo C, Fatta N, Barneix AJ. 2001. The export of amino acid phloem is altered in wheat plants lacking the short arm of chromosome 7B. *Journal of Experimental Botany*, 52(362): 1761–1768.

Cataldo D, Haroon M, Schrader L, Youngs V. 1975. Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Soil Science and Plant analysis*. 6: 71-80

Chena B-M, Wang Z-H, Li S-X, Wang G-X, Songc H-X, Wang X-N. 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*. 167: 635–643.

Chung J C, Chou S S, Hwang D F. 2004. Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives and Contaminants*. 21 (4): 317–322.

Chung S Y, Kim J S, Kim M, Hong M K, Lee J O, Kim C M, Song I S. 2003. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. *Food Additives and Contaminants*. 7 (20): 621–628.

Da Silva FJ, Dias Casali VW, Cruz C, Da Silva CA. 2001. Combination capacity in lettuce cultivars based on agronomical characteristics. *Ciência e Agrotecnologia*. 25(4): 831-839.

Delgado J, Follett R. 1998. Sap Test to Determine Nitrate-Nitrogen Concentration in Aboveground biomass of Winter cover Crops. *Community of Soil Science and Plant Analysis*. 29 (5&6): 545 – 559.

- Dejonckheere W, Steurbaut W, Drieghe S, Verstraeten R, Braeckman H.** 1994. Nitrate in food commodities of vegetable origin and the total diet in Belgium (1992-1993). *Microbiologie-Aliments-Nutritiom.* 12: 359-370.
- Druart N, Goupil P, Dewaele E, Boutin JP, Rambour S.** 2000. Nitrate assimilation in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) which acquire radial growth. *Journal of Experimental Botany*, 51(344): 539–546.
- European Community. European Commission: Scientific Committee for Food.** 1995. Opinion on nitrate and nitrite. Annex 4 to Document III/. 5611/95, pp. 1–25.
- Fjelkner-Modig S, Bengtsson H, Stegmark R, Nyström S.** 2000. The influence of organic and integrated production on nutritional, sensory and agricultural aspects of vegetable raw materials for food production. *Acta Agric. Scand., Sect. B, Soil and Plant Sci.* 50:102–113.
- Fontes P, Sampaio R, Finger F.** 2000. Fruit size, mineral composition and quality of trickle-irrigated tomatoes as affected by potassium rates. *Pesquisa Agropecuaria.* 35(1): 21–25.
- Foyer C, Valadier MH, Migge A, Becker T.** 1998. Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. *Plant Physiologists*, 117(1): 283–292.
- Geraldson C M, Tyler K B.** 1990. Plant Analysis as an Aid in Fertilizing Vegetable Crops. In D. E. Kissel. ed. Westerman R. L. (ed.) *Soil Testing and Plant Analysis.* SSSA, Madison, WI. 546-562 p.
- Gelderman R H, Beegle D.** 1998. Nitrate – Nitrogen. In Brown, J. R. (ed) *Recommended chemical soil testing procedures for North Central Region.* Missouri Agric. Exp. Stn. Pub. No. 221.17 – 20.
- Gillian Y, Clifford R, Harrison N.** 1999. Monitoring for nitrate in UK-grown lettuce and spinach. *Food Additives and Contaminants.* 16 (7): 301 – 306.

- Inal A, Günes A, Alpaslan M, Demir K.** 1999. Nitrate versus chloride nutrition effects in a soil-plant system on the growth, nitrate accumulation and N, K, Na, Ca and Cl content of carrot *Daucus carota* L. *Turkish Journal of Biology*, 23: 207–214.
- Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), Expert Committee on Food Additives. European Community.** 2002. Evaluation of certain food additives. Fifty-ninth report of the Joint FAO/WHO. World Health Organization, Geneva. 26-32 pp.
- Keeney D R.** 1980. Nitrogen availability indices. *En Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, 2nd. Eds. A L Page, R H Miller and D R Keeney, Am. Soc. Agron. Inc., Soil Sci. Soc. Am. Inc. Madison, Wisconsin. 711–733 pp.
- Klingenberg C.** 1995. Comportamiento de las concentraciones de nitrato y nitrito en lechuga (*Lactuca sativa* var. *Crispa* (L)) bajo condiciones de fertilización nitrogenada y otros ensayos de cosecha y poscosecha. Tesis Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 52p.
- Lairon D, Spitz N, Termine E, Ribaud P, Lafont H, Hauton J.** 1984. Effect of organic and mineral nitrogen fertilization on yield and nutritive value of butterhead lettuce. *Plant Foods Human Nutrition*. 34, 97-108
- Malmaurety L, Parent-Massin D, Ardí J L, Vergery P.** 2002 Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*. 19 (6): 524 – 532.
- Maynard D, Backer A, Minotti P, Peck N.** 1976. Nitrate accumulation in vegetables. *Adv. In Agron*. 28:71-118.
- McCall D, Willumsen J.** 1998. Effects of nitrate, amonium and chloride application on the yield and nitrate content of soil-grown lettuce. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 73: 698-703.

- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.** 1998. Nitrate in vegetables. Food Surveillance Information Sheet Number 158. [En línea]. Verificado el 21 de marzo de 2012.
<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infosheet/1998/no158/158nitra.htm>.
- Mulvaney R L.** 1996. Nitrogen-inorganic forms. *En* D.L. Sparks (ed.) Methods of soil analysis. Part 3. SSSA Book Ser. 5. SSSA, Madison, WI. p. 1123–1184.
- Muramoto J.** 1999. Comparison of nitrate content in leafy vegetables from organic and conventional farms in California. Center for Agroecology and Sustainable Food Systems, University of California, Santa Cruz. 64 p.
- Muro J, Irigoyen I, Lamsfus C.** 1998. Acumulación de nitratos en hortalizas de hoja. *En* Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: de la Fisiología a la Biología Molecular. Vega J. M., Aparicio P. J., Castillo F. y Maldonado J. M. eds. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Pp. 453-464.
- Perdomo C, Casanova O, Ciganda V.** 2001. Contaminación de aguas subterráneas con nitratos y coliformes en el litoral sudeste del Uruguay. *Agrociencia*. 1: 10-22.
- Petersen A, Stoltze S.** 1999. Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. *Food Additives and Contaminants*. 16 (7): 291- 299.
- Pobel D, Riboli E, Cornee J, Hemon B, Guyader M.** 1995. Nitrosamine, nitrate and nitrite in relation to gastric cancer: a case-control study in Marseille, France. *European journal of epidemiology*. 11(1): 67-73.
- Regan W, Lamberth J, Brown J, Blevins.** 1986. Fertilization interrelationships in yield, nitrate and oxalic acid content of spinach. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 93:485-492
- Rhine E, Sims G, Mulvaney R, Pratt E.** 1998. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Science Society of American Journal*. 62:473-480.

- Sánchez, L R, Pérez A, Pellicer C, Sáez J, Abadía A.** 2002. Influencia de la fertilización nitrogenada en la absorción de nitrógeno y acumulación de nitratos en la lechuga iceberg. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 17 (2): 303-318.
- Santos R H S, Casali V W D, Condé A R, Miranda L. C. G.** 1994. Qualidade de alface cultivada com composto orgânico. *Hort Bras.* 12: 29-32.
- SAS Institute,** 1990. SAS/STAT user's guide. Version 6. 4th ed. Vol. 1. SAS Inst., Cary, NC.
- Scottish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.** 1998. Nitrate in vegetables. Food Surveillance Information Sheet Number 158. [En línea] Verificado el 17 de agosto de 2007.
<http://archive.food.gov.uk/maff/archive/food/infsheet/1998/no158/158nitra.htm>.
- Sims J R, Haby V A.** 1970. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. *Soil Sci.* 112: 137-141.
- Teutsch CD, Tilson WM.** 2004. Nitrate accumulation in crabgrass as impacted by nitrogen fertilization rate and application timing [En línea]. Verificado el 6 octubre de 2004.
<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/fg/research/2004/crabgrass/>.
- Unides S, Zhou D, Siddigi Y, Kinghorn J, Glass A.** 2001. Apparent genetic redundancy facilitates ecological plasticity for nitrate transport. *The EMBO Journal*, 20(22): 6246-6255.
- Urquiaga S, Zapata F.** 2000. Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. 1ª. Brasil. Génesis. 110p.
- Walkley A, Black I A.** 1934. An examination of the Degtjareff method for determination soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38.

- Wang Z, Shengxiu L.** 2004. Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on plant growth and nitrate accumulation in vegetables. *Journal of Plant Nutrition*. 27 (3): 539–556.
- Worthington V.** 2001. Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 7: 161–173.
- Wraith JM, Or D.** 1998. Nonlinear parameter estimation using spreadsheet software. *Journal of Natural Resources and Life Sciences Education* 27, 13-19.
- Zhaohui W, Li S.** 2004. Effects of Nitrogen and Phosphorus fertilization on plant growth and nitrate accumulation in vegetables. *Journal of Plant Nutrient*. 27 (3): 539 -556.
- Zhou Z-Y, Wang M-J, Wang J-S.** 2000. Nitrate and nitrite contamination in vegetables in China. *Food Rev. Int.* 16 (1): 61- 76.