



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Agrarias

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrarias

**Efecto del riego con aguas provenientes del tratamiento de
efluentes urbanos y de la fertilización con selenio sobre la
calidad nutracéutica de brócoli**

Ing. Agr. M. Sc. Fabricio Alejandro Salusso

Director de Tesis: Dr. Ing. Agr. Carlos Bouzo

Facultad de Ciencias Agrarias (UNL)

Co-Director: Dr. Ing. Agr. Raúl Crespi

Facultad de Agronomía y Veterinaria (UNRC)

Esperanza, Santa Fe

Mayo/2021

JURADO DE TESIS

- Dra. IMHOFF, Silvia
- Dr. RODRÍGUEZ, Roberto Adrián
- Dr. GALMARINI, Claudio Rómulo

*“La vida es una obra de teatro que no permite ensayos,
por eso, canta, ríe, baila, llora y vive intensamente cada momento,
antes que el telón baje y la obra termine sin aplausos”*

Charles Chaplin

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

Durante el desarrollo del presente Trabajo de Tesis se difundieron resultados parciales a través de las siguientes publicaciones y comunicaciones:

- CRESPI, R.; PUGLIESE, M.; **SALUSSO, F.**; RAMOS, D. y G. PAUTASSO. (2017). Tratamiento y reutilización de efluentes urbanos. Presentación de resumen en: XXVI Congreso Nacional del Agua. CONAGUA 2017. 20-23/09/2017. Córdoba (Argentina).
- **SALUSSO, F.**; RAMOS, D.; CRESPI, R.; PUEBLA, A. y G. PAUTASSO. (2018). Efecto del riego subterráneo con efluentes urbanos tratados sobre el rendimiento y calidad sanitaria de cultivares de brócoli. Presentación de resumen en: XL Congreso Argentino de Horticultura. 2-5/10/2018. Córdoba (Argentina).
- CRESPI, R.; PUGLIESE, M.; **SALUSSO, F.**; SOLER, C.; PEREYRA, R.; ZUPAN, E.; SOLER, E.; RAMOS, D.; VENIER, F. y G. PAUTASSO. (2018). Desarrollo tecnológico para el tratamiento y reutilización de efluentes urbanos. Presentación de resumen: Congreso Internacional de Recursos Naturales. 25-28/09/2018. Villahermosa, Tabasco (México).
- **SALUSSO, F.**; CRESPI, R.; RAMOS, D.; PAUTASSO, G. y BOUZO, C. (2019). Utilización de efluentes urbanos tratados para la producción de brócoli mediante riego por goteo subterráneo. Revista AgriScientia 36(1): 63-71 p. doi.org/10.31047/1668.298x.v36.n1.20255.

Esta tesis ha sido financiada por el Programa DOCTORAR de la Secretaría de Políticas Universitarias, Ministerio de Educación de la Nación, Argentina.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Litoral, y en especial a la Facultad de Ciencias Agrarias por la oportunidad de realizar el doctorado en su casa de estudios.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, y en especial a la Facultad de Agronomía y Veterinaria por el apoyo y la gestión llevada adelante durante este proceso.

Al Dr. Carlos Bouzo por su dedicación y gran profesionalismo transmitido durante la dirección de este trabajo, enriqueciendo en todo momento mi formación profesional.

A mis compañeros de trabajo, Diego, Gastón y Elena por acompañarme en este trayecto.

Al Jurado Evaluador de este trabajo de Tesis Doctoral por asumir este compromiso.

A los estudiantes David Del Valle, Juan Martín Dalmasso, Ana Luz Puebla, Silvina Criado e Ignacio Escudero que colaboraron con gran énfasis en el desarrollo de este trabajo.

Y especialmente a mi familia, a mi madre y hermano, Marta y Nicolás, por su apoyo incondicional. A mi padre Carlos, por alumbrar mi camino. A mi compañera Victoria por compartir su vida conmigo y apoyarme en todo momento.

A cada uno de ellos, mis agradecimientos.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	I
INDICE TABLAS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Cultivo de brócoli.....	1
1.1. Importancia económica.....	1
1.2. Origen genético.....	2
1.3. Domesticación y dispersión.....	4
1.4. Morfología de la especie.....	5
1.5. Fisiología del crecimiento y desarrollo.....	6
1.6. Requerimientos climáticos y edáficos.....	7
1.7. Nutrición del cultivo.....	8
1.7.1. Nitrógeno.....	8
1.7.2. Fósforo.....	9
1.7.3. Potasio.....	10
2. Tratamiento y utilización de Efluentes Urbanos.....	11
3. El brócoli: Alimento funcional.....	12
3.1. Biofortificación de brócoli con Selenio.....	13
HIPÓTESIS GENERAL.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
CAPÍTULO I. EFECTOS DE LA UTILIZACIÓN DE EFLUENTES URBANOS TRATADOS SOBRE EL RENDIMIENTO Y CALIDAD SANITARIA DE BRÓCOLI.....	16
I. RESUMEN.....	17
I. INTRODUCCIÓN.....	18
I.1. Utilización y tratamiento de efluentes urbanos.....	18
I.1.1. Utilización de efluentes urbanos tratados en el mundo.....	18
I.1.2. América Latina.....	19
I.1.3. Contexto Nacional.....	20

I.2. Procesos de tratamiento de efluentes urbanos.....	22
I.3. Calidad agronómica de los efluentes urbanos tratados.....	24
I.4. Calidad sanitaria de los efluentes urbanos tratados.....	25
I.4.1. Directrices sobre la calidad de efluentes empleados en agricultura.....	26
I.4.1.2. Selección de cultivos.....	27
I.4.1.3. Directrices en la provincia de Córdoba.....	29
I.5. Calidad e inocuidad de los alimentos.....	32
I.6. Riego por goteo subterráneo.....	33
I.7. Antecedentes.....	36
I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
I. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
I.1. Caracterización del sitio.....	41
I.1.1. Planta Piloto de Tratamiento de Efluentes Urbanos.....	41
I.1.1.2. Proceso de Tratamiento de Efluentes Urbanos.....	41
I.1.1.2.1. Tratamiento preliminar.....	41
I.1.1.2.2. Tratamiento primario y secundario.....	42
I.1.1.3. Riego por goteo subterráneo.....	43
I.1.1.3.1. Instalación del equipo.....	43
I.1.1.3.2. Programación del riego.....	44
I.1.1.4. Análisis del Efluentes Urbanos Tratados y Agua de Acuífero....	45
I.2. Implantación de las parcelas experimentales.....	45
I.2.1. Siembra y trasplante.....	45
I.2.2. Diseño de la experimentación.....	46
I.2.3. Labores culturales.....	47
I.2.4. Cosecha.....	47
I.2.4.1. Partición de asimilados en hoja, tallo y pellas.....	47
I.2.4.2. Determinación de la calidad, rendimiento y precocidad.....	47
I.2.4.3. Determinación de la calidad sanitaria.....	48
I.3. Análisis estadísticos.....	48
I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
I.1. Riego con Efluentes Urbanos Tratados y Agua de Acuífero.....	49
I.1.1. Lámina de riego.....	49
I.1.2. Calidad fisicoquímica del Efluente Urbano Tratado y Agua de Acuífero....	52

I.1.2.1. Efluente Urbano Tratado.....	52
I.1.2.2. Agua de Acuífero.....	54
I.1.2.3. Aporte de macronutrientes del Efluente Urbano Tratado y Agua de Acuífero.....	54
I.1.2.3.1. Nitrógeno.....	55
I.1.2.3.2. Fósforo.....	56
I.1.2.3.3. Potasio.....	56
I.2. Producción de brócoli.....	57
I.2.1. Partición de asimilados en hoja, tallo y pellas.....	57
I.2.2. Calidad de pellas, rendimiento y precocidad de los cultivares.....	58
I.2.2.1. Diámetro de pella.....	58
I.2.2.2. Diámetro de pedúnculo y presencia de hollow stem.....	60
I.2.2.3. Peso individual de pella.....	62
I.2.2.4. Rendimiento total en fresco.....	63
I.2.2.5. Rendimiento total en seco.....	64
I.2.2.6. Precocidad.....	65
I.3. Calidad sanitaria del Efluente Urbano Tratado.....	67
I.4. Calidad sanitaria del brócoli.....	68
I. CONCLUSIONES.....	70
CAPÍTULO II. EFECTOS DE LA UTILIZACIÓN DE EFLUENTES URBANOS TRATADOS SOBRE LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS NUTRACÉUTICOS EN BRÓCOLI.....	
II. RESUMEN.....	72
II. INTRODUCCIÓN.....	73
II.1. Alimentos funcionales o nutraceuticos.....	73
II.2. Propiedades nutraceuticas del brócoli.....	74
II.2.1. Compuestos fenólicos.....	75
II.2.2. Clorofila.....	76
II.2.3. Carotenoides.....	77
II.2.4. Proteínas.....	77
II.3. Uso de efluentes en la mejora de las propiedades nutricionales de brócoli.....	78
II.4. Antecedentes.....	79

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	82
II. MATERIALES Y MÉTODOS	83
II.1. Descripción de los experimentos	83
II.1.2. Preparación de las muestras para las determinaciones analíticas	83
II.1.2.1. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales mediante Folin-Ciocalteu	83
II.1.2.2. Determinación del contenido de clorofilas y carotenoides	84
II.1.2.3. Determinación del contenido de proteína soluble y total mediante el método de Bradford	85
II.1.2.4. Determinación del contenido de sólidos solubles	86
II.2. Análisis estadísticos	87
II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
II. 1. Efecto del riego con Efluentes Urbanos Tratados sobre la síntesis de compuestos nutraceuticos en brócoli	88
II.1.1. Contenido de compuestos fenólicos totales	88
II.1.2. Contenido de clorofilas y carotenoides	89
II.1.2.1. Contenido de clorofila a, b y total	89
II.1.2.2. Carotenoides	91
II.1.3. Contenido de proteína soluble y total	92
II.1.4. Contenido de sólidos solubles	93
II. CONCLUSIONES	95
 CAPÍTULO III. EFECTOS DE LA BIOFORTIFICACIÓN CON SELENIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS NUTRACÉUTICOS EN BRÓCOLI	
	96
III. RESUMEN	97
III. INTRODUCCIÓN	98
III.1. Alimentos fortificados	98
III.1.1. Tipos de fortificación de alimentos	99
III.1.1.1. Biofortificación	100
III.2. Selenio	101
III.2.1. Importancia del Selenio en la nutrición	101
III.2.2. Selenio en la dieta poblacional	103

III.2.3. Biofortificación de cultivos con Selenio.....	104
III.2.4. Brócoli biofortificado con Selenio.....	106
III.3. Antecedentes.....	106
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	113
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	114
III.1. Características del ensayo.....	114
III.1.1. Diseño experimental.....	114
III.1.2. Fertilización con Selenio.....	114
III.1.3. Determinaciones analíticas.....	115
III.2. Análisis estadísticos.....	115
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	116
III.1. Partición de asimilados en hoja, tallo y pella.....	116
III.2. Acumulación de Se en el tejido vegetal.....	117
III.3. Efecto de la biofortificación con Se sobre la síntesis de compuestos nutracéuticos en brócoli.....	119
III.3.1. Contenido de compuestos fenólicos totales.....	119
III.3.2. Contenido de clorofilas y carotenoides.....	120
III.3.2.1. Contenido de clorofila a, b y total.....	120
III.3.2.2. Carotenoides.....	122
III.4. Contenido de proteína soluble y total.....	123
III.5. Contenido de sólidos solubles.....	125
III. CONCLUSIONES.....	129
CONCLUSIONES GENERALES.....	130
DISCUSIONES GENERALES.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135
ANEXOS.....	170

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I

Tabla I.1. Cultivares de la especie <i>Brassica oleracea</i> L. de importancia comestible.....	4
Tabla I.2. Procesos y objetivos del tratamiento preliminar de aguas residuales.....	22
Tabla I.3. Tipos de tratamiento secundario de aguas residuales.....	23
Tabla I.4. Directrices sobre la calidad microbiológica de los efluentes empleados en agricultura.....	29
Tabla I.5. Estándares fisicoquímicos de calidad para la utilización de efluentes urbanos tratados.....	31
Tabla I.6. Estándares biológicos de calidad para la utilización de efluentes urbanos tratados.....	31
Tabla I.7. Normas microbiológicas para frutas y hortalizas frescas.....	33
Tabla I.8. Contenido de Materia Orgánica (MO), Nitrógeno de Nitratos (N-NO ₃ ⁻), Nitratos (NO ₃ ⁻), Fósforo (P), Potasio (K), pH y Conductividad Eléctrica (CE) de 0 a 20 cm de profundidad.....	46
Tabla I.9. Valores medios de las determinaciones fisicoquímicas del EUT utilizado en el riego de brócoli durante los años 2016 y 2017.....	52
Tabla I.10. Determinaciones fisicoquímicas del AC utilizada en el riego de brócoli.....	54
Tabla I.11. Aporte de N, P y K durante el ciclo de los cultivares de brócoli.....	55
Tabla I.12. Efecto del riego con EUT y AC sobre la materia seca acumulada en hojas, tallo y pella (g MS planta ⁻¹) al momento de la cosecha de brócoli.....	58
Tabla I.13. Temperaturas mínimas, media y máximas (°C) durante el ciclo de los cultivares (2016-2017).....	67
Tabla I.14. Determinaciones microbiológicas del EUT utilizado como fuente de agua para riego.....	67
Tabla I.15. Recuento de microorganismos y parásitos en pellas frescas de brócoli a cosecha.....	68

Capítulo II

Tabla II.1. Composición nutricional de una porción comestible de 100 g de brócoli.....	75
---	----

Capítulo III

Tabla III.1. Cantidad diaria de Se recomendada según la etapa de la vida, en microgramos.....	103
Tabla III.2. Límite máximo de ingesta diaria de Se según la etapa de la vida, en microgramos (μg).....	104
Tabla III.3. Efecto del Se sobre la MS acumulada en hojas, tallo y pella (g MS planta^{-1}) de brócoli biofortificado con Se y regado con dos calidades de agua.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura I.1. Triángulo en U que muestra las relaciones entre las especies cultivadas del género <i>Brassica</i>	3
Figura I.2. Esquema de tratamiento del Efluente Urbano Crudo.....	43
Figura I.3. Curva de Capacidad Hídrica del suelo en la parcela experimental. C.C.: Capacidad de Campo. P.M.P.: Punto de Marchitez Permanente.....	45
Figura I.4. Dinámica de la lámina de agua (mm) de 0-0,40 m de profundidad para EUT y AC durante el ciclo de los cultivares en las temporadas 2016 (a-d) y 2017 (e-h)..	49
Figura I.5. Lámina de agua aplicada (mm) mediante riego por goteo subterráneo con EUT y AC, y precipitaciones durante el ciclo de los cultivares (año 2016).....	50
Figura I.6. Lámina de agua aplicada (mm) mediante riego por goteo subterráneo con EUT y AC, y precipitaciones durante el ciclo de los cultivares (año 2017).....	51
Figura I.7. Diámetro de pella (mm) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor).....	59
Figura I.8. Diámetro de pedúnculo (mm) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor).....	61
Figura I.9. Peso individual de pella (g) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor).....	62
Figura I.10. Rendimiento total en fresco ($Mg\ ha^{-1}$) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor).....	64
Figura I.11. Rendimiento total en seco ($Mg\ ha^{-1}$) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor).....	65
Figura I.12. Precocidad en días después del trasplante y días en cosecha en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego.....	66

Capítulo II

Figura II.1. Contenido de compuestos fenólicos totales en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego.	88
Figura II.2. Contenido de clorofila a, b y total en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego.....	90

Figura II.3. Contenido de carotenoides en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego.....	92
Figura II.4. Contenido de proteína soluble y total en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego	93
Figura II.5. Contenido de sólidos solubles en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego.....	94

Capítulo III

Figura III.1. Acumulación de Se según la dosis aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego.....	118
Figura III.2. Contenido de compuestos fenólicos totales según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego.....	119
Figura III.3. Contenido de clorofila a, b y total según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego.....	121
Figura III.4. Contenido de carotenoides según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego.....	123
Figura III.5. Contenido de proteína soluble y total según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego.....	124
Figura III.6. Contenido de sólidos solubles según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego.....	126

RESUMEN

El tratamiento de aguas residuales urbanas y su reutilización en sistemas agrícolas significan no sólo un aporte de agua para riego, sino también una importante fuente de nutrientes para los cultivos. El brócoli posee un alto valor nutricional, ya que contiene múltiples compuestos nutraceuticos beneficiosos para la salud humana. Además, tiene la capacidad de acumular altas concentraciones de selenio (Se), un micronutriente esencial para humanos. El Se constituye un elemento deficitario en la dieta, por lo cual, la biofortificación de brócoli con este elemento podría mejorar su calidad como alimento nutraceutico. El objetivo del estudio fue evaluar durante dos temporadas (2016 y 2017), el efecto de la utilización de efluentes urbanos tratados y la biofortificación con Se sobre la producción y propiedades nutraceuticas de brócoli. Para ello se trasplantaron tres cultivares F1: 'Matsuri', 'Green Pia' y 'Almanor', regados con dos calidades de agua: efluentes urbanos tratados y agua de acuífero, mediante riego localizado por goteo subterráneo, y se aplicaron tres dosis de fertilización foliar con Se: 0 g ha⁻¹; 50 g ha⁻¹ y 100 g ha⁻¹, en un diseño experimental en parcelas divididas. A cosecha se evaluó la partición de asimilados en hojas, tallo y pella; diámetro y peso de pella y rendimiento, se determinó el contenido de compuestos nutraceuticos (compuestos fenólicos, clorofilas y carotenoides, proteínas solubles y totales, sólidos solubles) y acumulación de Se en las pellas. Además, se determinó la calidad sanitaria de las pellas mediante análisis microbiológicos y parasitológicos. Los resultados determinaron diferencias significativas en favor del uso de efluentes urbanos tratados en la partición de asimilados, diámetro de pella, peso de pella y rendimiento, sin embargo, no tuvo efectos sobre el contenido de compuestos nutraceuticos, a excepción del contenido de fenólicos. La biofortificación con Se incrementó la producción de biomasa en algunos cultivares, no así los niveles de compuestos nutraceuticos, sin embargo, se logró una acumulación significativa de Se en las pellas de brócoli. La calidad sanitaria del producto determinó que las pellas fueron aptas para su consumo directo en fresco. En conclusión, el uso de efluentes urbanos tratados debería considerarse como una alternativa válida para mejorar la producción de brócoli, a pesar de no lograrse mejoras significativas en su calidad nutricional, si se lograron obtener pellas con calidad sanitaria para su consumo. El brócoli posee una elevada capacidad para acumular Se, por lo cual, debería considerarse como una hortaliza con gran potencial para su biofortificación con este nutriente esencial.

Palabras claves: brócoli, efluentes, compuestos nutraceuticos, selenio, biofortificación.

ABSTRACT

The treatment of urban waste water and their reuse in agricultural systems mean not only contribution of water for irrigation but also an important source of nutrients for crops. Broccoli has an impressive nutritional profile, since it has multiple nutraceutical compounds which are beneficial to human health. Furthermore, it also has the ability to accumulate high concentrations of selenium (Se), an essential micronutrient for humans. However, there is inadequate dietary intake of selenium. That's why the bio fortification with Se could further improve its quality as a nutraceutical food. The objective of the study was to evaluate for two years (2016 and 2017), the effect of the use of treated urban effluents and bio fortification with Se on the production and nutraceutical properties of broccoli. To do this, three F1 cultivars were transplanted: 'Masturi', 'Green Pia' and 'Almanor', and irrigated with two qualities of water: Treated urban effluents and groundwater from aquifers, by means of localized subsurface drip irrigation. Moreover, three doses of foliar fertilization were applied with Se: 0 g ha⁻¹; 50 g ha⁻¹ and 100 g ha⁻¹, in an experimental design split in plots. At harvest the assimilated partition in leaves, stem and head, head diameter, weight and yield were evaluated; the content of nutraceutical compounds (phenolic compounds, chlorophylls and carotenoids, soluble and total proteins, soluble solids) and Se accumulation in the head were determined. In addition, sanitary quality of head was determined through microbiological and parasitological tests. The results determined significant differences in favour of the use of treated urban effluents in the assimilate partitioning, head diameter, head weight and yield. However, it had no effect on the content of nutraceutical compounds, except for the phenolic content. Bio fortification with Se increased biomass production in some cultivars, but it did not affect the levels of nutraceutical compounds. Nevertheless, a significant Se accumulation was achieved in broccoli head. The sanitary quality of the product determined that head were suitable for direct consumption in fresh. In conclusion, the use of treated urban effluents should be considered a valid alternative to improve the production of broccoli. Although significant improvement in its nutritional quality was not achieved, head with sanitary quality for consumption was obtained. Broccoli has a high capacity to accumulate Se; therefore, it should be considered a vegetable with great potential for bio fortification with this essential nutrient.

Key words: broccoli, effluents, nutraceutical compounds, selenium, biofortification.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Cultivo de brócoli

1.1. Importancia económica

La familia de las *Brassicáceas* presenta un gran número de cultivos de interés agrícola ya sea por el área sembrada como por el valor de su producción (Jaramillo y Díaz, 2006). Las especies producidas son consumidas en estado fresco, como así también congeladas, o formando parte de productos de cuarta gama o industrializadas en encurtidos, sopas, entre otros (Aprea, 2008). A esta familia pertenece el brócoli o bróculi de gran importancia económica a nivel mundial (Nuez *et al.*, 1999).

Debido al incremento en la demanda, en el año 2012 la producción mundial de brócoli fue de 21.266.789 Mg. El 77% de ésta se concentró en dos países de Asia: China con 9.500.000 Mg e India con 7.000.000 Mg., que destinaron la mayor parte de su producción para el consumo interno. Países como Italia, México y Francia produjeron en conjunto, alrededor de 1.150.000 Mg (MAGAP, 2013).

En el año 2012 las exportaciones mundiales de brócoli fueron de 1.121.184 Mg, siendo España uno de los principales países exportadores de este producto con aproximadamente 275.000 Mg (el 61,0% lo exportó a Reino Unido, Francia y los Países Bajos), seguido de Francia con alrededor de 157.000 Mg (que vendió el 67,1% a Alemania, Países Bajos y Reino Unido), Estados Unidos con 150.000 Mg (el 89,6% del producto lo exportó a Canadá y Japón) (MAGAP, 2013; Espinosa, 2015).

Según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, desde el año 1970 al año 1994 el consumo de brócoli se incrementó de 0,7 a 2,5 kg hab⁻¹ año⁻¹; y el área de producción de 16.649 a 43.384 has. El brócoli ocupa uno de los 10 lugares más sobresalientes en ventas de ese país y su consumo sigue creciendo (Stoppani y Francescangeli, 2010).

En México, el cultivo de brócoli ha tomado un gran auge debido a su rentabilidad y nuevos hábitos de consumo (SFA, 2011). En el año 2016, el volumen de producción fue de 507.482 Mg, de las cuales Guanajuato ocupó el primer lugar con 320.268 Mg, seguido de Michoacán 48.456 Mg, Puebla 41.258 Mg, Jalisco 25.436 Mg. En México, se siembran 31.900 hectáreas de brócoli, lo que representa un 3,3% de la producción de hortalizas, siendo el rendimiento promedio de 16 Mg ha⁻¹ (Zamora, 2016; Cessa, 2018).

En Ecuador, entre los años 2000 al 2012 se produjo lo que algunos autores denominaron “*la fiebre del oro verde*”, impulsado por grandes, medianos y pequeños productores, la producción nacional de brócoli aumentó en un 44%, debido principalmente a la creciente demanda de este producto y al incremento en los precios a nivel internacional (Le Gall, 2010; MAGAP, 2013). Actualmente la producción ecuatoriana es de 100 Mg de brócoli fresco, en un total de 6.500 ha cultivadas con esta hortaliza, el 95% de la producción se destina a las procesadoras-exportadoras y el restante 5% se destina al mercado local (El Comercio, 2017).

En Argentina, la producción de brócoli se realiza principalmente en los cinturones hortícolas de las principales ciudades, con excepción del destinado a industria (Krizaj, 2014). En los últimos años el cultivo ha tenido un desarrollo económico relativamente importante por su comercialización en el mercado fresco y por su uso en congelados (Del Pino, 2016).

En la década de 1980 se consumían 0,5 kg hab⁻¹ año⁻¹ y para el periodo comprendido entre los años 1990-1995 los volúmenes de comercialización habían crecido un 265%, lo cual representa alrededor de 2.285 Mg, llegando para el periodo entre los años 2004-2005 con 15.155 Mg distribuidas en 1.084 ha considerando la provincia de Buenos Aires (Aprea, 2008).

En el año 2013 el ingreso de brócoli al Mercado Central de Buenos Aires (MCBA) fue de 1.978 Mg provenientes principalmente de las provincias de Buenos Aires (La Plata y Mar del Plata), Santa Fe y Mendoza. En 2018 se registró en el mes de octubre un ingreso de 371 Mg, provenientes del cinturón hortícola de Buenos Aires, y de zonas productoras de San Juan y Mendoza (MCBA, 2018). El mayor ingreso de brócoli al MCBA se produce entre los meses de abril a noviembre (Krizaj, 2014). Sin embargo, los registros de producción y comercialización son puntuales y escasos lo cual dificulta contar con datos más precisos sobre este cultivo (Stoppani y Francescangeli, 2010).

1.2. Origen genético

La familia de las *Brassicáceas* comprende aproximadamente unos 340 géneros y más de 3.000 especies de plantas concentradas en las áreas templadas y frías, particularmente del hemisferio norte, existen unos pocos géneros nativos de las áreas tropicales y con pocas excepciones éstos se encuentran en zonas montañosas elevadas (Rollins, 2009).

Dentro de esta familia se destaca el género *Brassica* con unas 35 especies de distribución sobre todo mediterránea, con un máximo de diversidad en la parte sudoeste de esta región. Sus límites taxonómicos no están aún perfectamente definidos. Algunas especies son de gran importancia económica para el consumo humano -hortalizas, condimentos, aceites- o para el ganado, como forraje. También se incluyen algunas especies de malezas de los cultivos (Gómez Campo, 1999).

La taxonomía del género *Brassica* es muy complicada. En 1935 el botánico coreano Nagaharu U publicó un estudio sobre la citología del género y estableció las relaciones entre los genomas de las seis especies con mayor importancia agrícola en todo el mundo. Su teoría conocida como “El triángulo de U” explica cómo fue posible que tres especies separadas se cruzaran debido a que están estrechamente relacionadas. Esta reproducción interespecífica permitió la creación de tres nuevas especies de *Brassicac*s tetraploides (Prohens y Nuez, 2007) (Figura I.1).

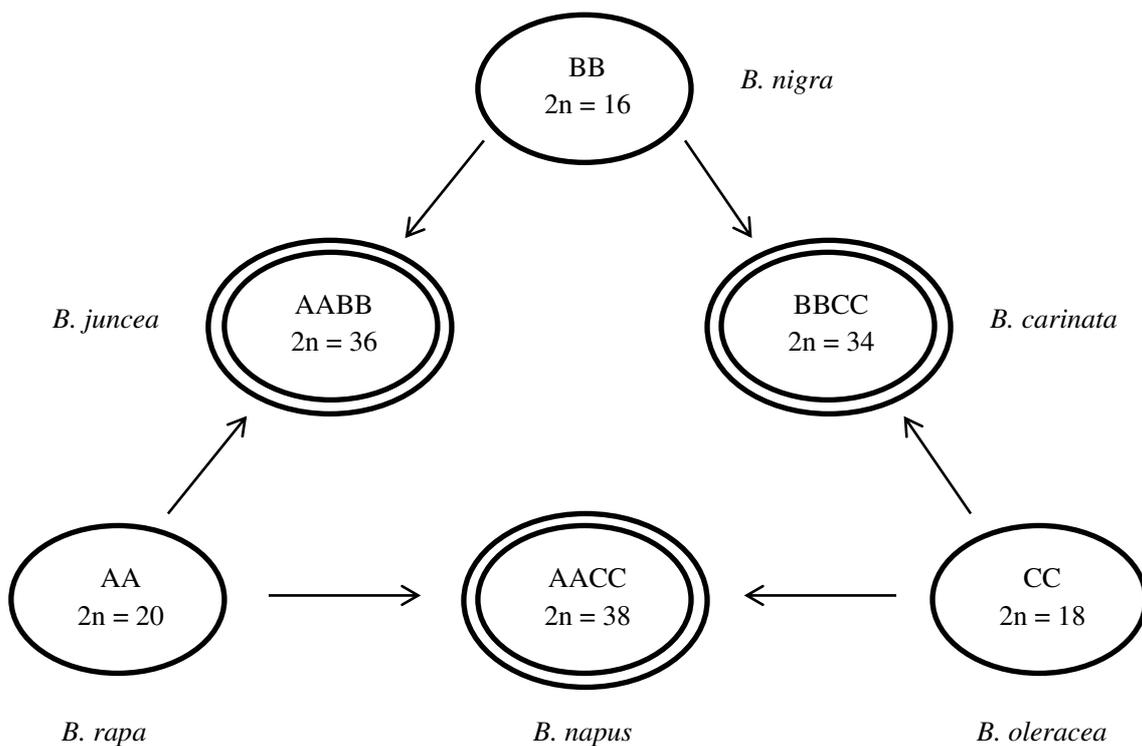


Figura I.1. Triángulo en U que muestra las relaciones entre las especies cultivadas del género *Brassica* (Nagaharu U, 1935). Adaptado de Dixon, (2007) y Prohens y Nuez, (2007).

La especie *Brassica oleracea* L. comprende las denominadas “coles” donde se encuentra el brócoli; *Brassica rapa* L. comprende nabos y col china; el tetraploide entre

ellos, *B. napus* L. incluye la colza y rutabaga. Las otras especies representan varios tipos de mostazas (Prohens y Nuez, 2007).

Brassica oleracea L. es una especie versátil que ha sido seleccionada por el hombre generando varios cultivos. La orientación del proceso de selección a permitido el aprovechamiento con fines comestibles de diferentes órganos de la planta (hojas a lo largo del tallo: coles; hojas que rodean la yema terminal: repollo; brotes axilares: col de Bruselas; inflorescencias: coliflor y brócoli; tallos engrosados: colirábano. Estos diferentes cultivos han sido clasificados como variedades, convariedades o grupos de cultivares (Dixon, 2007; Prohens y Nuez, 2007) (Tabla I.1).

Tabla I.1. Cultivares de la especie *Brassica oleracea* L. de importancia comestible.

Cultivares	Nombre común
Acephala	Kale
Albogabra	Kale chino
Botrytis	Coliflor
Capitata	Repollo
Costata	Repollo portugués
Gemmífera	Repollo de Bruselas
Gongylodes	Colirábano
Italica	Brócoli
Medullosa	Col medular
Ramosa	Col de mil cabezas
Sabauda	Col de Savoy

Adaptado de Prohens y Nuez, (2007)

1.3. Domésticación y dispersión

Las especies de *Brassicac*s eran ya conocidas por los griegos, romanos, antiguos germanos, sajones y celtas (Jaramillo y Díaz, 2006). Algunos escritos del período clásico de la civilización occidental muestran evidencia de que ciertos tipos de *Brassicac*s habían sido cultivadas por los antiguos griegos. Teofrasto (372-287 a. C.) enumera tres variedades de uso común. Cato (234-149 a. C.) también identifica tres tipos, una variedad de hojas lisas y tallos gruesos, y otra de hojas rizadas, suaves y tallo pequeño. Plinio (23-79 d. C) lista seis tipos diferentes que, según su descripción, algunas parecen ser repollo, colirábano, coliflor y brócoli (Dixon, 2007; Prohens y Nuez, 2007).

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *itálica* Plenck) ha sido un cultivo muy popular en Italia ya desde los días del Imperio Romano. Las intensas relaciones comerciales entre numerosos países del Mediterráneo apoyaron su difusión y el intercambio en varias regiones. Los procesos de adaptación a diferentes condiciones de clima y suelo, el cultivo y la selección de genotipos con interesantes características agronómicas y cualitativas, permitieron la identificación de varios tipos y formas de brócoli (Nuez *et al.*, 1999).

En Francia, el cultivo de brócoli se práctica desde el siglo VI, sin embargo, era desconocido en Inglaterra (Sinaluisa, 2012), donde fue introducido luego del siglo XVIII y de allí habría sido llevado a Estados Unidos por inmigrantes italianos a principios del siglo XX (Krarup, 1992; Dixon, 2007).

El brócoli se ha convertido en un vegetal muy popular, y se ha propagado a muchos países desde los Estados Unidos y Japón y otras partes de la Cuenca del Pacífico durante los últimos 50 años (Dixon, 2007). El origen de su nombre proviene del término italiano “broco” que quiere decir brote, en alusión a la parte comestible y apreciada de la planta, que también es conocida vulgarmente como “pella” (Cevallos Ruíz, 2010; MAGAP, 2013).

1.4. Morfología de la especie

El brócoli es una planta herbácea anual que presenta un sistema radicular pivotante, leñoso y poco profundo, las raíces secundarias y terciarias se concentran mayoritariamente en los primeros centímetros de suelo, llegando a profundizar hasta 0,40 a 0,60 m (Krarup, 1992; Maroto, 1995).

El tallo principal es corto (0,20 a 0,50 m de alto) y grueso (0,02 a 0,06 m de diámetro) sobre el cual se disponen las hojas en forma helicoidal en entrenudos cortos. Las hojas son pecioladas y grandes (0,50 m de longitud y 0,30 m de ancho) y varían en número de 15 a 30 según los diferentes cultivares. La lámina es de borde ondulado y presenta una característica tonalidad verde-grisácea debido a la presencia de ceras epicuticulares (Krarup, 1992).

La inflorescencia es una masa globosa de yemas hipertrofiadas, denominada vulgarmente “pella”, en las axilas de las hojas se pueden desarrollar brotes hipertrofiados de yemas florales, que aparecen en forma sucesiva y escalonada, generalmente tras el corte de la pella principal. Las pellas son de color verdoso, grisáceo o morado, con un grado de compactación menor que en coliflor y constituyen la parte aprovechable para el consumo (Baron *et al.*, 1997; Di Benedetto, 2005).

Las flores son perfectas, actinomorfas, con cuatro pétalos libres, amarillos, dispuestos en forma de cruz. A pesar de tener flores perfectas, debido a problemas de autoincompatibilidad, la especie presenta polinización cruzada, la que es realizada por insectos, principalmente abejas y moscas. El fruto es una silicua con más de 10 semillas que a su madurez se liberan al exterior (Krarup, 1992).

1.5. Fisiología del crecimiento y desarrollo

Es posible detectar en brócoli cuatro fases de crecimiento y desarrollo. Al principio, una fase juvenil que comienza con la germinación, en donde solo se forman hojas y raíces, una fase de inducción floral, que esta influida principalmente por la temperatura, siendo variable según los cultivares. Posteriormente, continúa una fase de formación de la inflorescencia o pella, donde la planta cesa la formación de hojas, y las existentes poseen una menor tasa de crecimiento. Finalmente, una fase de floración que comienza con el crecimiento en longitud de las ramificaciones preflorales de la pella (Di Benedetto, 2005).

Algunos autores definen que la duración del período juvenil varía según los cultivares, pudiendo extenderse de 5 a 8 semanas en variedades de otoño hasta 10 a 15 semanas en variedades de verano (Di Benedetto, 2005). Sin embargo, la duración de la fase juvenil es muy poco predecible, no existiendo relaciones cuantitativas que puedan definir la culminación de la misma, debido a ello se han desarrollado múltiples modelos de tiempo térmico que intentan predecir el final de esta fase y comienzo de la iniciación floral (Tan, 1999).

En brócoli la fase de inducción floral depende de la ocurrencia de temperaturas bajas, o vernalización, aunque a diferencia del coliflor puede iniciar sus primordios florales a temperaturas relativamente más elevadas (24 - 27 °C), siendo efectivas las temperaturas solo si las plantas han superado el periodo juvenil. La temperatura óptima que permite acelerar el efecto de la vernalización es muy variable con los cultivares, en general, partiendo de temperaturas cercanas a 0 °C la tasa de vernalización aumenta conforme lo hace la temperatura hasta un valor máximo y luego declina (Wien y Wurr, 1997).

Durante la fase de formación de la pella, los requerimientos de temperatura son menos rigurosos que en coliflor. En particular, y como ya fue señalado anteriormente, brócoli puede iniciar sus primordios florales con temperaturas relativamente altas. Un factor relevante que incide sobre el rendimiento es la densidad de plantación, incrementándose el mismo por unidad de área con el aumento en el número de plantas

hasta un máximo, mientras que el tamaño de las pellas disminuye (Griffith y Carling, 1991; Wien y Wurr, 1997).

1.6. Requerimientos climáticos y edáficos

El cultivo de brócoli requiere climas templados a fríos (Sarli, 1980; SFA, 2011). Es un cultivo primordialmente de zonas altas, su mejor desarrollo y calidad se obtiene por encima de los 1.500 m.s.n.m. (Lardizábal y Theodoracopoulos, 2008), con un intervalo térmico óptimo para un buen desarrollo vegetativo de entre 15,5 y 18,5 °C (Di Benedetto, 2005; Aprea, 2008).

La planta es muy resistente a las heladas, aunque pueden ser afectadas las inflorescencias, produciéndose manchas de color marrón que desmerecen la calidad comercial, al contrario, si las temperaturas son muy elevadas se presentan con anomalías, menos compactas, descoloridas y con sabor fuerte (Vigliola, 1996). Sin embargo, la sensibilidad de la inflorescencia a las altas temperaturas es variable según los cultivares (Jones *et al.*, 1990) y el estado de desarrollo de la misma (Bjorkman y Pearson, 1995).

Durante el periodo vegetativo, cuando las plantas son expuestas a altas temperaturas, no presentan ningún daño, pero por encima de 26 °C y una vez iniciada la etapa reproductiva, empiezan a presentarse síntomas de daño por calor. En general, el crecimiento de esta especie es muy rápido, a temperaturas por encima de 20 °C durante la formación de la inflorescencia, siendo necesario cosecharlo a tiempo, para evitar la apertura de las yemas florales (Jaramillo y Díaz, 2006).

El brócoli es bastante exigente en calidad del suelo, siendo preferibles para su cultivo los suelos francos y sueltos con muy buen drenaje ya que tiene un sistema radicular particularmente sensible al exceso de agua. Su pH óptimo está entre 5,5 y 6,5 (Di Benedetto, 2005; Lardizábal y Theodoracopoulos, 2008). Sin embargo, es interesante considerar que se adapta mejor a suelos con cierta alcalinidad, con pH en el orden de 7,5 a 7,8 (Aprea, 2008).

En cuanto a los requerimientos hídricos, para la obtención de rendimientos elevados e inflorescencias de óptima calidad se necesitan no menos de 450 a 900 mm para completar el ciclo del cultivo, con un pH de 5,5 a 6,8; conductividad eléctrica de 90 a 155 mmhos cm⁻¹, una dureza de 135 ppm, alcalinidad de 3 a 4,5 %, y concentración de cloro de 155 a 195 ppm (Ecofroz, 1998; Puenayan *et al.*, 2010).

1.7. Nutrición del cultivo

Para garantizar la calidad y la obtención de un rendimiento determinado en este cultivo, es fundamental proporcionar una nutrición acorde a la demanda requerida y con un balance recíproco entre los elementos minerales. Dentro de los elementos considerados esenciales para el brócoli se destacan el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre y boro (Nolasco *et al.*, 2005; Pomares *et al.*, 2007b). La demanda de estos nutrientes es muy variable en función del cultivar, condiciones climáticas, edáficas, época del año y rendimiento del cultivo (Jaramillo y Díaz, 2006; Carrillo Riofrio, 2011; De Chaves, 2016).

1.7.1. Nitrógeno

El nitrógeno (N) es el elemento más importante en la nutrición de las plantas. Una deficiencia de nitrógeno en brócoli puede provocar una marcada disminución del crecimiento y vigor de la planta, con las hojas pequeñas y de color verde pálido, y la consecuente disminución de la biomasa y el rendimiento (Pomares *et al.*, 2007a).

Por contraparte, un exceso de nitrógeno puede retardar la maduración del cultivo, la formación de las pellas, provocar un menor desarrollo del sistema radicular y causar el ahuecamiento del tallo principal de la inflorescencia (Tamayo Veléz, 2006; Carrillo Riofrio, 2011).

Muchos estudios sobre la nutrición en brócoli se han centrado en la fertilización nitrogenada. Algunos autores plantean que para alcanzar el máximo rendimiento se necesitan por hectárea: 540 kg de N (Magnífico *et al.*, 1979); 400 kg de N (Greenwood *et al.*, 1980; Castellanos *et al.*, 2000); 270 kg de N (Letey *et al.*, 1983); 250 kg de N (Kowalenko y Hall, 1987); 224 kg de N (Hipp, 1974); 170-200 kg de N (Pascual Antón, 1994), valores similares a los 150-200 kg de N planteados por Maroto *et al.* (1995).

Rincón *et al.* (1999) determinaron para una producción comercial de 19,2 Mg ha⁻¹ de inflorescencias, una absorción total de 244 kg ha⁻¹ de N, produciéndose la mayor velocidad de absorción en el periodo de mayor crecimiento foliar, mientras que en otros nutrientes como el calcio se produjo en el período de mayor crecimiento de inflorescencias, y de Magnesio se mantuvo prácticamente constante durante todo el ciclo de cultivo.

Jaramillo y Díaz (2006) indicaron que para alcanzar un rendimiento de 20 Mg ha⁻¹ se requirió una extracción de 90 kg ha⁻¹ de N, coincidiendo con Tamayo Veléz (2006) que logró excelentes rendimientos con ese mismo nivel de N. Sin embargo, Lardizábal y

Theodoracopoulos (2008), recomiendan para lograr un rendimiento de 16,3 Mg ha⁻¹, valores más elevados, en el orden de 145 kg ha⁻¹ de N.

Bouzo *et al.* (2003) utilizan modelos matemáticos para predecir la demanda de N en cultivos hortícolas a partir de atributos inherentes al cultivo como índice de cosecha (IC), proporción de materia seca del producto cosechable (MS) y requerimiento interno de N (RIN). Considerando para brócoli un IC de 0,25; MS de 0,10 y un RIN de 0,030, se obtiene para un rendimiento esperado de 16,3 Mg ha⁻¹, un valor de demanda de 195,6 Kg ha⁻¹ de N.

1.7.2. Fósforo

El fósforo (P) juega un papel importante en la vida de las plantas, interviene en la síntesis de ácidos nucleicos, la formación de membranas celulares (fosfolípidos), de las coenzimas NAD y NADP, y más importante aún, forma parte del ATP, compuesto transportador de energía en la planta (Tamayo Veléz, 2006). En virtud de estas funciones, este elemento ejerce una acción estimuladora de la germinación, el desarrollo radicular, la formación de las inflorescencias. Además, el fósforo se requiere en altas concentraciones en las regiones de crecimiento activo, pues es indispensable en los procesos donde hay transformación de energía (De Chaves, 2016).

Una deficiencia de este elemento se manifiesta principalmente en el sistema radicular, acompañado de síntomas generales de perturbación en el crecimiento, las plantas crecen lentamente y a menudo quedan enanas llegando a madurez (Tamayo Veléz, 2006), las hojas más viejas presentan síntomas de coloración verde-azulada, y en caso de deficiencia severa, los extremos de las mismas se tornan de color púrpura (Uchida, 2000).

El requerimiento de P del brócoli es bastante más bajo que el de nitrógeno, pero su demanda también varía según diferentes condiciones de cultivo (De Chaves, 2006). Algunas referencias indican una demanda por hectárea que oscila desde 15 kg de P (Jaramillo y Díaz, 2006); a 24 kg de P (Lardizábal y Theodoracopoulos, 2008), similares a los 23 kg planteados por Magnífico *et al.*, (1979), otras manifiestan una necesidad de 28,7 kg de P (Rincón *et al.*, 1999), 34 kg de P (Tamayo Veléz, 2006) y hasta valores muy superiores de 50 a 100 kg de P (Pascual Antón, 1994).

Sin embargo, depende del rendimiento obtenido (kg ha⁻¹) la demanda de P del cultivo. Siguiendo la metodología aplicada por Bouzo *et al.* (2003), para un rendimiento

objetivo de 20 Mg ha⁻¹, y un requerimiento interno de P (RIP) de 0,003, la demanda sería de 24 Kg ha⁻¹ de P.

Maroto *et al.* (1995) tras varios experimentos de cultivares con distintas densidades de plantación, dan valores medios orientativos sobre la cantidad de P necesario para el correcto desarrollo del brócoli de 60 a 80 kg ha⁻¹ de P₂O₅, esto representaría una demanda de 26 a 35 kg ha⁻¹ de P.

Lestrangle *et al.* (2003) manifiesta que las aplicaciones de P pueden variar entre 24 y 120 kg ha⁻¹. Puenayan *et al.*, (2010) lograron el máximo diámetro (15,8 cm) y peso (505,9 g) de pellas frescas con el agregado de 150 kg ha⁻¹ de N y 86 kg ha⁻¹ de P.

1.7.3. Potasio

El potasio (K), junto con el nitrógeno y el fósforo son los minerales más requeridos por las plantas superiores (Marschner, 1995). Para un adecuado crecimiento, las plantas necesitan elevada disponibilidad de potasio, ya que este nutriente interviene en la síntesis y traslocación de carbohidratos y proteínas, así como en la apertura y cierre de estomas. En virtud de su acción como regulador osmótico, aumenta la resistencia al frío y déficit hídrico e induce a una mayor resistencia a plagas y enfermedades (Pomares *et al.*, 2007b).

La proporción de K requerida por el brócoli es superior a la de fósforo y nitrógeno, su absorción varía de 84 kg ha⁻¹ (Tamayo Veléz, 2006) hasta valores tan elevados como 723 kg ha⁻¹ (Magnífico *et al.*, 1979). Rincón *et al.* (1999) mencionan rangos de 160 a 230 kg ha⁻¹. Krarup (1992), coincide en que la extracción de K en brócoli es altamente significativa, mencionando para la producción de una tonelada de inflorescencias en peso fresco una demanda de 22,4 kg ha⁻¹ de K, y considerando que prácticamente el 80% del elemento quedará luego en los restos de cosecha.

Aplicando la metodología de Bouzo *et al.* (2003), se obtiene un valor muy similar, ya que si se considera un rendimiento de 1.000 kg ha⁻¹ de producto cosechable con una MS de 0,10; un IC de 0,20 y un requerimiento interno de K (RIK) de 0,042, la demanda de K sería de 21 kg ha⁻¹.

Un déficit total o parcial de K en brócoli produce deformaciones en las plantas, las hojas adquieren un color rosado y se necrosan principalmente en los bordes. Contenidos de K inferiores al 0,5% en las hojas externas son desfavorables para la formación de la pella. El suministro de K es necesario tanto en los estadios tempranos como en los tardíos de

crecimiento, ya que este elemento asegura la formación de una pella firme y compacta (Tamayo Veléz, 2006).

Más allá de la existencia de discrepancias significativas en relación a las demandas nutricionales de brócoli para obtener determinados rendimientos, como resultado a las variaciones intrínsecas existentes entre cultivares, manejo y sitios de producción, el conocimiento de niveles críticos de nutrientes constituye una herramienta de gran utilidad, que permite, de alguna manera, hacer un diagnóstico sobre la probabilidad de respuesta del cultivo ante el suministro de determinados elementos nutricionales (Jaramillo y Díaz, 2006). Las investigaciones continuas en materia de nutrición mineral en brócoli permitirán ajustar las recomendaciones de cada estrategia de cultivo en particular.

2. Tratamiento y utilización de Efluentes Urbanos

Los efluentes urbanos, o también denominados aguas residuales urbanas, son aquellos cuyas características originales han sido modificadas por las actividades humanas y que por su calidad requieren de un tratamiento previo, antes de ser utilizados, vertidos a un cuerpo natural de agua o descargados al sistema de alcantarillado (Gámez *et al.*, 2017). Más allá de conocer la composición química de las aguas residuales urbanas, existen tres características muy importantes que se deben destacar, desde un punto de vista sanitario y en relación con su tratamiento: la gran cantidad de sólidos presentes, la abundancia de sustancias biodegradables y la presencia de microorganismos patógenos (Guerrero *et al.*, 2018).

En muchos lugares del mundo y en Argentina, los efluentes urbanos son vertidos directamente al cauce de una cuenca, argumentando que los ríos constituyen un excelente dispositivo natural de filtración, sin admitir la contaminación que se está produciendo aguas abajo, no sólo por el impacto en sí misma, sino también por la potencial proliferación de un gran número de enfermedades (Crespi *et al.*, 2009; FAO, 2014), el deterioro del agua subterránea y de otros ecosistemas locales (Guerrero *et al.*, 2018).

Actualmente existen más de 3.300 instalaciones de tratamiento de efluentes a nivel mundial con diversos grados de regeneración de agua para diversas aplicaciones: riego agrícola, diseño urbano y usos recreativos, procesamiento y refrigeración industrial y producción indirecta de agua potable, muchas de ellas se encuentran en Japón y Estados Unidos. En 2013, la región mediterránea y el Medio Oriente tenían alrededor de 100

plantas, América Latina unas 50 y el África subsahariana contaba con unas 20 plantas (FAO, 2013).

En la agricultura el uso de efluentes urbanos tratados posee un gran desarrollo, principalmente en países de regiones áridas, constituyendo una importante fuente de agua para riego y aporte de nutrientes para los cultivos y materia orgánica para los suelos (González y Rubalcaba, 2011; D'andrea *et al.*, 2014). La utilización de efluentes urbanos tratados en el riego agrícola, garantiza no sólo una fuente constante y segura de agua aún en años secos, sino también un aporte continuo de nutrientes y microelementos para las plantas, reduciendo gastos de fertilización (Crespi *et al.*, 2009).

Algunas previsiones indicaban que el 70% del agua que demandará la agricultura en el año 2040 va a ser obtenida mediante el tratamiento de efluentes (Lorenzo *et al.*, 2009). El uso de aguas residuales para el riego de cultivos representa una oportunidad importante para garantizar el sustento adecuado en los países industrializados y la seguridad alimentaria en las regiones en desarrollo (Orlofsky *et al.*, 2015).

Sin embargo, aunque los efluentes constituyan un recurso valioso, contienen microorganismos patógenos, por lo tanto, se debe poner especial énfasis en minimizar el riesgo que su uso presenta para la salud de quienes consumen los productos regados, como así también de los agricultores que manejan estos cultivos (Fasciolo *et al.*, 2005).

En Argentina, el uso de efluentes urbanos tratados es una actividad muy incipiente y puntual en el país, incluso a veces desarrollada de manera informal. La escasez de antecedentes locales despierta la necesidad de ahondar en investigaciones para facilitar la vinculación de inversiones en plantas de tratamiento de efluentes y su posterior utilización, replicando modelos sostenibles y eficientes en el tiempo.

3. El brócoli: Alimento funcional

El brócoli es llamado "la joya de la nutrición" por tratarse de una hortaliza rica en vitaminas A y C, fibra, y pobre en calorías. Se considera como una de las hortalizas de mayor valor nutricional por unidad de peso de producto comestible (Krarup, 1992), ya que posee un amplio número de nutrientes esenciales, imprescindibles para el logro de una dieta equilibrada (Buenaño, 2011).

El brócoli posee componentes que incrementan la actividad de enzimas protectoras, que previenen la formación de tumores cancerosos. Las vitaminas A y C reducen y previenen los daños en las células que favorecen enfermedades como la artritis, el mal de

Alzheimer y diversas cardiopatías. Por su bajo contenido en calorías contribuye a reducir la obesidad y sus enfermedades asociadas, por su riqueza en beta carotenos previene los riesgos de ataques cardíacos. Todos estos beneficios para la salud determinan que el brócoli sea considerado un “Alimento Funcional o Nutraceutico” (Sheldon y Margen, 1992).

El término “Alimento Funcional” o “Nutracéutico¹” fue propuesto por primera vez en la década de 1980 con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use"), y se refiere a aquellos alimentos que, en forma natural o procesada, contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos para la salud humana y que van más allá de la nutrición (Olagnero *et al.*, 2007; Fernández León, 2012).

El brócoli es considerado un alimento funcional siendo esta condición una posible explicación al incremento observado en su consumo a nivel mundial en los últimos años (Chasquibol *et al.*, 2014). Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que un consumo regular de brócoli y otras hortalizas afines de la familia de las *Brassicáceas*, ayuda a disminuir el riesgo de padecer ciertos tipos de enfermedades cancerígenas. Este efecto beneficioso es atribuido a los compuestos bioactivos o funcionales que poseen estos vegetales (Cohen *et al.*, 2000).

3.1. Biofortificación de brócoli con Selenio

Además de los atributos que posee el brócoli como alimento funcional, existe otra característica que destaca a esta hortaliza, convirtiéndola en un alimento con gran potencial, y es la capacidad que posee para acumular ciertos elementos esenciales para la dieta, uno de estos elementos es el Selenio (Se) (López Heras, 2013).

El Se es esencial en la salud humana, siendo un componente clave de proteínas denominadas “selenoproteínas” (OMS, 2006), que desde el punto de vista bioquímico, están involucradas en aspectos metabólicos sumamente importantes como (Finley *et al.*, 2000; López Bellido, 2014):

- Adecuado funcionamiento del sistema inmune.
- Reducción de la virulencia y la progresión de infecciones virales (hepatitis, virus de la gripe y VIH).

¹El término fue acuñado a partir de las palabras “nutrición” y “farmacéutico” en la Foundation for Innovation in Medicine, FIM, en Cranfor, Nueva Jersey, Estados Unidos en la década de 1980.

- Esenciales para la fertilidad masculina y femenina.
- Regulación del estado anímico y de algunos neurotransmisores en el cerebro (reduce la incidencia de depresión, ansiedad, confusión mental y hostilidad, ataques epilépticos y Alzheimer).
- Función tiroidea.
- Actúa como agente antioxidante y antiinflamatorio (efectos beneficiosos contra la artritis reumatoide, pancreatitis, cáncer, enfermedad de Keshan y asma).

Aunque se ha reportado que una ingesta extremadamente baja de Se ($< 10 \mu\text{g día}^{-1}$) es inusual; si se han observado ingestas subóptimas de Se en varias poblaciones del mundo (Meplan y Hesketh, 2012). Son múltiples las alternativas para incrementar el consumo diario de Se, desde consumir alimentos ricos en Se (ajo, carnes, pescados), adición de Se en formas inorgánicas al agua potable, consumo de preparados farmacológicos, incorporar Se en la fabricación de los alimentos o aprovechar la capacidad de acumulación que poseen ciertas especies alimenticias para lograr su biofortificación a través de la fertilización con Se (López Bellido, 2014).

En la familia de las *Brassicáceas*, el brócoli es considerado una hortaliza acumuladora de Se (Borghese y Stoffel, 2017), y por lo tanto muy adecuada para llevar a cabo procesos de biofortificación (Pedrero *et al.*, 2006; López Heras, 2013), pudiendo así llegar con un alimento fortificado a poblaciones con acceso limitado a ello, especialmente en zonas rurales con problemas de déficit de este elemento en su dieta (Nestel *et al.*, 2006).

HIPÓTESIS GENERAL

El riego con aguas provenientes del tratamiento de efluentes urbanos y la fertilización con selenio tendrá una incidencia positiva en la producción de biomasa, rendimiento, calidad nutracéutica y acumulación de Se en brócoli .

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del riego con aguas provenientes del tratamiento de efluentes urbanos y de la fertilización con selenio sobre la producción y calidad nutracéutica de brócoli

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I

- Evaluar el efecto de la utilización de efluentes urbanos tratados aplicados mediante riego por goteo subterráneo sobre la producción de biomasa, rendimiento, calidad e inocuidad de brócoli.

Capítulo II

- Evaluar el efecto del riego con efluentes urbanos tratados sobre la síntesis de compuestos nutracéuticos en brócoli.

Capítulo III

- Evaluar el efecto de la biofortificación con Se sobre la producción de biomasa, acumulación de Se y síntesis de compuestos nutracéuticos en brócoli.

CAPÍTULO I

EFFECTOS DE LA UTILIZACIÓN DE EFLUENTES URBANOS TRATADOS SOBRE EL RENDIMIENTO Y CALIDAD SANITARIA DE BRÓCOLI



I. RESUMEN

En los últimos años la agricultura bajo riego se ha incrementado, esto sumado a la disponibilidad limitada de agua potable para la población, hace que la utilización de agua residual tratada constituya una alternativa viable para satisfacer la demanda del recurso en sistemas agrícolas. El tratamiento de efluentes urbanos y su utilización significan no sólo un aporte de agua para riego, sino también una importante fuente de nutrientes para los cultivos. Su aplicación mediante sistemas de riego subterráneo, es recomendable ya que permite localizar el recurso en las raíces, haciendo un uso más eficiente y menos riesgoso del mismo. El objetivo del estudio fue evaluar la utilización de efluentes urbanos tratados en la producción de brócoli durante dos temporadas (2016 y 2017), para ello se trasplantaron en un diseño en parcelas divididas, tres cultivares F1: 'Matsuri' (C1), 'Green Pia' (C2) y 'Almanor' (C3), regados con dos calidades de agua: Efluentes Urbanos Tratados (EUT) y Agua de Acuífero (AC), mediante riego por goteo subterráneo. Se evaluó la calidad del EUT y AC, y a la cosecha del brócoli se determinó partición de asimilados (PA) en hojas, tallo y pella; diámetro de pella y pedúnculo; peso individual de pella y rendimiento. La calidad sanitaria de las pellas se evaluó mediante análisis microbiológicos y parasitológicos. Los resultados determinaron diferencias significativas en PA, diámetro de pella y pedúnculo, y rendimiento a favor de los cultivares regados con EUT. A cosecha el recuento de microorganismos patógenos fue inferior a los límites de tolerancia establecidos en el Código Alimentario Argentino, no se detectaron larvas y estructuras parasitarias infectantes que pudieran afectar la salud humana, por lo cual, las pellas fueron aptas para su consumo directo en fresco, esto demostró la factibilidad de utilizar este recurso en la producción de brócoli.

Palabras claves: brócoli, efluentes urbanos tratados, rendimiento, calidad sanitaria.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Utilización y tratamiento de efluentes urbanos

Considerando que dos tercios de la superficie de la Tierra está cubierta por agua, solo el 2,5% de ella es agua dulce. De esta proporción, el 1,73% pertenece a hielos continentales, pudiéndose deducir entonces que solo un 0,77% se encuentra potencialmente disponible para uso humano y la agricultura. Sin embargo, de ésta última proporción a su vez el 0,66% esta acumulada en acuíferos de difícil acceso, por lo tanto, la cantidad de agua dulce efectivamente disponible se reduce a un 0,11% (Migani y Crespi, 2010).

Considerando que a nivel mundial la población humana se incrementa a una tasa de crecimiento de 1,21% anual, la cantidad de habitantes supera los 7.500 millones, y la proyección para el año 2050 es de 9.700 millones, probablemente se agraven los problemas de acceso al agua potable e incrementen los conflictos regionales sobre los recursos hídricos (FAO, 2013; ONU, 2018).

Siendo este recurso tan escaso, sumado al crecimiento demográfico, urbanización, industrialización y cambio climático (Beneduce *et al.*, 2017), sin dudas obliga a priorizar el uso del agua de primera calidad para el abastecimiento público y aprovechar aguas de menor calidad en usos menos exigentes, como es el riego agrícola (Parra y Arbos, 1997; Gonzáles y Rubalcaba, 2011).

La utilización de efluentes para el riego en la agricultura se considera una oportunidad importante para los países áridos y semiáridos, donde la escasez de agua dulce es fundamental para la agricultura y el desarrollo urbano (Kalavrouziotis *et al.*, 2010). No obstante, todavía es necesario investigar muchos aspectos sobre el posible impacto ambiental y la evaluación de la seguridad y el riesgo que conlleva el uso de estas aguas (Beneduce *et al.*, 2017).

I.1.1. Utilización de efluentes urbanos tratados en el mundo

En valor absoluto México, China y Estados Unidos son los países con mayor volumen de utilización de aguas residuales, pero en los dos primeros se contabilizan las residuales no tratadas. Así, México utiliza el 31% de las aguas residuales ($1.290 \text{ hm}^3 \text{ año}^{-1}$) y EE.UU. el 30% ($1.264 \text{ hm}^3 \text{ año}^{-1}$) (Rico Amorós *et al.*, 2016). China cuenta con una

capacidad de uso de aguas residuales de 20,2 millones de m³ día⁻¹ que representan el 13,1% de los efluentes tratados (FAO, 2013).

En California (Estados Unidos), donde se encuentra el sistema de reabastecimiento de agua subterránea más grande del mundo, se han invertido 142 millones de dólares para aumentar la capacidad actual de la planta de reciclaje de aguas residuales de 270 a 380 millones de L día⁻¹ (Tran *et al.*, 2016).

California posee un 37% de las áreas agrícolas irrigadas con aguas residuales tratadas. Pudiendo dividirse estas áreas en 6 categorías: uso mixto (16%), alimentos cosechados, fibras y semillas (14%), pasturas (4%), jardines y viñedos (1%), cultivos alimenticios (1%) y viveros y césped (1%) (EPA, 2004).

Las posibilidades de utilización de aguas residuales depuradas son numerosas y variadas, dependiendo del nivel de tratamiento a que se sometan, lo que determinará la calidad del efluente obtenido (Parra y Arbos, 1997), sin embargo, el uso más extendido de las aguas depuradas es el riego agrícola (Kalavrouziotis *et al.*, 2010; Rico Amorós *et al.*, 2016; Vergine *et al.*, 2017).

En este sentido, Israel está a la vanguardia en el uso planificado de aguas residuales, ya en 1997 aprovechaban más del 65% de los efluentes del área metropolitana de Tel Aviv para riego de la región de Dan. Túnez tiene una alta cobertura de saneamiento, entre el 30 y 43% de las aguas residuales tratadas se utiliza para el riego agrícola y de jardines (FAO, 2013).

En Europa la utilización de aguas residuales no está muy extendida, con la excepción de algunas regiones áridas de España e Italia con problemas de escasez de agua. En España, según datos del Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino, el volumen depurado superaba los 3.300 hm³ donde se destacan las comunidades de Andalucía, Cataluña y Valencia (Rico Amorós *et al.*, 2016).

I.1.2. América Latina

En América Latina, en 1950 unos 150 millones de habitantes vivían en ciudades, cifra que se ha incrementado a más de 360 millones a fines del siglo XX (73,6% de su población total), debido a la intensa migración de la población rural. La creciente presión de esta población sobre los recursos hídricos y el suelo, en muchos casos ha desbordado los esfuerzos de los gobiernos por lograr un crecimiento urbano planificado, y ha obligado a atender con prioridad sólo los servicios de agua potable y alcantarillado, dejando de lado el

tratamiento de las aguas residuales y la disposición de los residuos sólidos (Cavallini y Young, 2002).

Sin embargo, en algunos países la actividad agrícola desarrollada en la periferia de las ciudades utiliza aguas residuales para el riego de pasturas, cultivos industriales, hortalizas y frutales. Entre los principales se encuentra México con 350.000 ha, Chile con 16.000 ha, Perú con 6.600 ha, además de Bolivia y Colombia (CEPIS, 2002a; D'andrea *et al.*, 2014). En Perú, del total de aguas residuales que se generan, sólo el 19% es tratada para su reutilización, el 81% restante es dispuesta sin ningún tratamiento en ambientes acuáticos como ríos, lagos y tierras agrícolas (Ushñahua, 2004).

Debido a la poca disponibilidad de agua subterránea para el uso de riego, agricultores de los municipios de San Luis Potosí y Soledad de Graciano Sánchez, (México), utilizan para el riego de las zonas agrícolas periurbanas, con una extensión aproximada de 5.000 ha, aguas residuales provenientes de descargas domésticas e industriales (Sarabia Meléndez, 2011).

De todos los países de la región, Chile es el más avanzado en la materia, ya que posee un sistema universal de tratamiento de aguas residuales urbanas. Otros países han hecho avances importantes en cuanto al aumento del tratamiento de aguas residuales, como Brasil y Uruguay con planes ambiciosos para la ampliación de obras en grandes ciudades, pero en su mayoría han sido aplazados debido a restricciones presupuestarias e institucionales (Suárez *et al.*, 2017).

I.1.3. Contexto Nacional

En Argentina, el acceso al agua potable alcanzaba una cobertura del 81% de la población, sin embargo, no se ha modificado sustancialmente el porcentaje de viviendas que están conectadas a redes cloacales que es de 55% (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2010). Esto hace que una de las consecuencias más importantes sea la prevalencia de enfermedades infecciosas y contagiosas, que se refleja en el índice de morbilidad general de estas enfermedades, que es de 8,7% comparado con el 1% observado en aquellos países donde las necesidades de agua potable y saneamiento han sido exitosamente satisfechas (CONAGUA, 2007).

El 85% de los recursos hídricos superficiales de Argentina se localizan en la Cuenca del Río de La Plata que abarca un 30% de su superficie, mientras que un 75% del territorio nacional corresponde a zonas áridas o semiáridas, donde la presencia de ríos,

cuerpos lacustres o acuíferos no asegura la disponibilidad en su totalidad, ni su sustentabilidad (Subsecretaría de Recursos Hídricos, 2006).

La diversidad de ambientes del país, que van desde zonas con reiterados eventos de inundaciones a otras que sufren recurrentes ciclos de sequía, se verán afectadas por los efectos del cambio climático, por lo que se impone desarrollar estrategias preventivas y remediales, para preservar cada uno de esos ambientes, generando condiciones para favorecer el desarrollo sustentable de sus comunidades (Sartor y Cifuentes, 2012).

Este panorama se agrava si se analiza la irregular distribución poblacional de la Argentina, con un 90% de población urbana, de la que un 75% se localiza sobre la Cuenca del Plata y las subcuencas de los ríos Paraná, Uruguay y Paraguay. En este caso, la recuperación y uso de agua residuales se convierte en una estrategia desde la perspectiva medioambiental, con el objetivo de disminuir la carga contaminante sobre los cuerpos receptores finales (Sartor y Cifuentes, 2012).

Argentina no tiene un marco legal que establezca los requisitos mínimos ni políticas de promoción para el tratamiento y reutilización de aguas residuales, las experiencias existentes solo son aisladas, especialmente en actividades de carácter productivo. La excepción es la provincia de Mendoza, que cuenta con una arquitectura institucional y jurídica compleja en materia de gestión de agua y utilización de las aguas residuales, que debiera convertirse en antecedente valioso para definir los criterios esenciales de una ley a nivel nacional (Bertranou y Araujo, 2002; Sartor y Cifuentes, 2012).

En el año 1920 comienzan a instalarse en Mendoza las primeras redes cloacales cuyas aguas residuales eran vertidas en campos fiscales donde se asentaban agricultores que utilizaban estas aguas para el riego de sus cultivos. Actualmente la provincia cuenta con una superficie bajo riego con aguas residuales tratadas de 6.580 ha en los acres de Campo Espejo, Paramillo, Costa de Araujo, Potrerillos y Penitenciaría, con un volumen de efluentes reutilizados de $355.000 \text{ m}^3 \text{ día}^{-1}$ (Luraschi y Rauek, 2017).

Otras experiencias se desarrollan en las localidades de Puerto Madryn, Rada Tilly y Comodoro Rivadavia, en la provincia de Chubut donde se utilizan con fines forestales, y en Villa Nueva, Córdoba para el riego hortícola, florícola y forestal (Calcagno *et al.*, 2000). En Cafayate (Salta) se utilizan aguas residuales tratadas para el riego de vid, pasturas, pimiento para pimentón y frutales con resultados muy promisorios (D'andrea *et al.*, 2014).

I.2. Procesos de tratamiento de efluentes urbanos

Para el tratamiento de efluentes existen diversos procesos y operaciones que requieren de una adecuada selección y combinación, pudiendo resolver la mayoría de las necesidades de disposición final o reaprovechamiento. En términos generales, existen procesos fisicoquímicos y procesos biológicos, los primeros hacen uso de las diferencias en ciertas propiedades entre el contaminante y el agua (operaciones de sedimentación y flotación), o mediante la adición de reactivos cambian la forma del contaminante a otra de mayor facilidad para separar del agua (Noyola, 2003).

Los segundos utilizan microorganismos que se alimentan de la materia orgánica contaminante y con ello, la eliminan en forma de nuevas células que se separan fácilmente del agua. Se puede considerar que las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en estos procesos son las mismas que se realizan en el medio natural (ríos, lagos, suelo), solo que en forma controlada dentro de tanques o reactores, y a velocidades de reacción mayores (Noyola, 2003). A continuación, se describen los principales procesos utilizados en el tratamiento de aguas residuales (Rojas, 2002; FAO, 2013):

- Tratamiento preliminar: filtrado y eliminación de materiales sólidos gruesos y otros materiales grandes que se encuentran suspendidos frecuentemente en las aguas residuales crudas (Tabla I.2).

Tabla I.2. Procesos y objetivos del tratamiento preliminar de aguas residuales

Procesos	Objetivo
Rejas o tamices	Eliminación de sólidos gruesos
Trituradores	Desmenuzamiento de sólidos
Desarenadores	Eliminación de arenas y gravilla
Desengrasadores	Eliminación de aceites y grasas
Pre-aireación	Control de olores y mejoramiento del comportamiento hidráulico

- Tratamiento primario: sedimentación simple de los materiales sólidos en un tanque de sedimentación primario. Las partículas sólidas se asientan en el fondo y los aceites y grasas suben a la superficie. Este material es eliminado como fango para un tratamiento en forma diferenciada. El tratamiento primario es capaz de remover una fracción importante de la carga orgánica, y que puede representar entre el 25% y el 40% de la Demanda

Biológica de Oxígeno (DBO_2) y entre el 50% y el 65% de los sólidos suspendidos. Entre los tipos de tratamiento primario se citan:

- Sedimentación primaria
 - Flotación
 - Precipitación química
 - Filtros gruesos
 - Oxidación química
 - Coagulación, floculación y filtración
- Tratamiento secundario: La reducción de los compuestos orgánicos presente en el agua residual, acondicionada previamente mediante tratamiento primario, se realiza exclusivamente por procesos biológicos. Este proceso reduce o convierte la materia orgánica finamente dividida y/o disuelta, en sólidos sedimentables floculantes que puedan ser separados por sedimentación en tanques de decantación. Los procesos biológicos más utilizados son los lodos activados y filtros percoladores. Son muchas las modificaciones de estos procesos que se utilizan para hacer frente a los requerimientos específicos de cada tratamiento. Asimismo, dentro de este grupo se incluyen las lagunas de estabilización y aireadas, así como el tratamiento biológico empleando oxígeno puro y el tratamiento anaeróbico. Los tratamientos biológicos de esta categoría tienen una eficiencia remocional de la DBO_2 entre el 85% al 95% (Tabla I.3).

Tabla I.3. Tipos de tratamiento secundario de aguas residuales

Tratamiento secundario	Tipos
Fijación biológica	Baja capacidad (filtros clásicos). Alta capacidad (filtros comunes, biofiltros, aerofiltros y accelofiltros).
Lodos activados	Convencional. Alta capacidad. Contacto estabilización. Aireación prolongada.
Lagunas de estabilización	Aeróbicas. Facultativas. Maduración.
Lagunas aireadas	Mezcla completa. Aireada facultativa. Facultativa con aireación mecánica.
Otros	Anaeróbicos (Contacto. Filtro anaerobio. Reactor anaeróbico de flujo ascendente). Oxígeno puro (Unox / linde) y Discos rotatorios.

- Tratamiento terciario: implica la eliminación de contaminantes específicos, por ej: nitrógeno, fósforo y/o contaminantes industriales. El efluente luego puede desinfectarse para eliminar microorganismos perjudiciales mediante cloración o desinfección ultravioleta. Las sustancias o compuestos comúnmente removidos son:

- Fosfatos y nitratos
- Huevos y quistes de parásitos
- Sustancias tensioactivas
- Algas
- Bacterias y virus (desinfección)
- Sólidos totales y disueltos

A pesar de que las aguas residuales sin tratar se usan frecuentemente en agricultura en muchos lugares, también es usual la utilización de efluentes tratados, al menos a un nivel secundario. Utilizar sistemas de tratamiento puede solucionar problemas de salud pública, con limitaciones apropiadas de uso y medidas preventivas. El efluente tratado a un nivel secundario aún contiene nutrientes de valor para los agricultores, mientras que algunos tratamientos terciarios eliminan el nitrógeno y el fósforo que son ingredientes fundamentales para la fertilización (FAO, 2013).

I.3. Calidad agronómica de los efluentes urbanos tratados

Respecto a la composición típica de las aguas residuales, es importante tener presente que generalmente contienen 99,9% de agua y solo el 0,1 % corresponde a la fracción sólida, de las cuales, aproximadamente el 70% son compuestos orgánicos como proteínas y grasas, y el resto son compuestos inorgánicos como arcillas y arenas (Cortez Cádiz, 2003).

Los efluentes urbanos tratados pueden aportar nutrientes en cantidades suficiente como para reducir o eliminar la necesidad de fertilizar, además de agregar materia orgánica como acondicionador de suelo. La concentración de nutrientes de las aguas residuales tratadas varía entre 10 a 100 mg L⁻¹ de N; de 5 a 25 mg L⁻¹ de P; 10 a 40 mg L⁻¹ de K; de 41 a 445 mg L⁻¹ de Ca y de 24 a 29 mg L⁻¹ de Mg; entre otros, con un pH de 7,16 a 8,1 y una conductividad eléctrica de 1,44 a 1,69 dS m⁻² (Silva *et al*, 2008; Navarro López, 2010).

Por ejemplo, una ciudad con una población de 500.000 habitantes y un consumo per cápita de 120 L produce diariamente 48.000 m³ de aguas residuales, suponiendo que el 80% del agua fuese tratada y utilizada, se podrían regar 3.500 ha con una lámina de 5.000 m³ ha⁻¹ año⁻¹, con un aporte de nutrientes equivalente a 250 kg ha⁻¹ de N; 50 kg ha⁻¹ de P y 150 kg ha⁻¹ de K. Además, de aportar otros micronutrientes y materia orgánica que proporcionaría beneficios adicionales (FAO, 2002).

Otro atributo de los efluentes es que la mayor parte de los nutrientes, una vez absorbidos por los cultivos, no entran en el ciclo del agua, y consecuentemente no contribuyen a la eutrofización de ríos y lagunas (FAO, 2013).

El uso en la agricultura de efluentes tratados además de aportar nutrientes para el desarrollo de los cultivos, preserva la fertilidad y estructura de los suelos. Por otro lado, en muchos países en vías de desarrollo, es la única opción de fertilización agrícola y además permite la disminución de los organismos patógenos en las aguas excedentes de riego por el proceso de retención que se produce en el suelo, con lo cual resulta en un tratamiento adicional de depuración de las aguas (Esteller, 2002).

I.4. Calidad sanitaria de los efluentes urbanos tratados

La calidad sanitaria está determinada por la concentración de microorganismos. Dentro de los principales microorganismos patógenos de humanos encontrados en efluentes urbanos están las bacterias como *Escherichia coli* 0157:H7 (Ackers *et al.*, 1998; Hilborn *et al.*, 1999), *Salmonella sp.* (Isaacs *et al.*, 2005), *Listeria monocytogenes* (Lin *et al.*, 2002), *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia*; parásitos y virus (hepatitis A, norovirus) (FAO, 2013).

Algunos estudios dirigidos a determinar la posible presencia de estos microorganismos patógenos, determinaron la capacidad que poseen los mismos para sobrevivir en los tejidos vegetales como frutas y hortalizas (Ibarra Sánchez *et al.*, 2004; Raj *et al.*, 2005).

Los parásitos transmitidos por el consumo de alimentos son una importante carga para la salud pública en todo el mundo, sobre todo en áreas donde existen servicios sanitarios deficientes y en poblaciones que tradicionalmente consume alimentos crudos sin prever un conveniente lavado y desinfección. Las infecciones pueden tener consecuencias prolongadas, graves y a veces fatales, además de causar dificultades importantes en

términos de inocuidad alimentaria, seguridad y calidad de vida, así como repercusiones negativas en los medios de subsistencia (FAO/OMS, 2016).

Entre los parásitos más importantes transmitidos por las frutas y hortalizas se incluyen, *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* sp., *Ascaris* sp., *Giardia duodenalis*, *Fasciola* sp., *Cyclospora cayetanensis*, *Trichuris trichiura*, *Balantidium coli* y *Toxocara* spp. En ciertas frutas y hortalizas que se consumen crudas, y sin una desinfección para eliminar los parásitos, revisten una especial importancia los controles que reducen el riesgo de contaminación parasitaria a un nivel aceptable durante la producción primaria (FAO/OMS, 2016).

I.4.1. Directrices sobre la calidad de efluentes empleados en agricultura

Las normas establecidas han sido siempre muy estrictas, basándose en evaluaciones de los posibles riesgos que para la salud tiene la supervivencia de agentes patógenos en las aguas residuales, el suelo y los cultivos; más que en pruebas epidemiológicas fehacientes del riesgo real. Estas primeras normas se basaron en un concepto de riesgo nulo, con el fin de lograr un medio antiséptico o carente de agentes patógenos. Por ejemplo, las normas del Departamento de Salud Pública del Estado de California permiten un total de sólo 2,2 a 2,3 coliformes por cada 100 mL de agua, según el cultivo regado y el método de riego empleado (CEPIS, 2002b).

En 1971, el Grupo de Expertos en aprovechamiento de efluentes de la OMS reconoció que las normas extremadamente estrictas fijadas en California no tenían justificación en las pruebas epidemiológicas existentes. Por tal motivo, recomendó una directriz sobre la calidad microbiológica del agua empleada para riego sin restricciones en hortalizas que se consumen cocidas, según la cual el número de coliformes totales no puede ser mayor de 100 por cada 100 mL de agua, lo que representó una gran medida de liberalización (CEPIS, 2002b).

Desde entonces, la OMS, el Banco Mundial, el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (Canadá), el Centro Internacional de Referencia sobre Evacuación de Desechos (Suiza), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, el Organismo Estadounidense de Protección Ambiental y muchas instituciones académicas de todo el mundo han hecho un magno

esfuerzo por establecer una base epidemiológica más racional para las directrices sobre el riego con aguas residuales.

En una reunión celebrada en Engelberg, Suiza por la Organización Mundial de la Salud, el Banco Mundial y el Centro Internacional de Referencia sobre Evacuación de Desechos en el año 1985, conocido luego como el “Informe de Engelberg”, se recomendaron nuevas directrices que contienen normas menos estrictas para los coliformes fecales. Sin embargo, son más estrictas para los huevos de helmintos (de las especies *Ascaris*, *Trichuris* y *Anquilostomas*) que, según se reconoció, constituyen el mayor riesgo real para la salud humana proveniente del riego con aguas residuales en las zonas donde la helmintiasis es endémica, como es el caso de muchos países en desarrollo (Lorenzo *et al.*, 2009).

Estas nuevas directrices sobre la calidad bacteriológica fueron comparables con la calidad real del agua de algunos ríos empleada para riego sin restricciones en cultivos de muchos países, sin efectos nocivos conocidos. Las concentraciones de coliformes fecales típicas en varios ríos del mundo son de 1.000 por cada 100 mL y cerca del 15% tiene concentraciones de 10.000 por cada 100 mL o más. Estas aguas se emplean en varios países de América Latina para riego, sin ninguna restricción legislativa al respecto (Rivera *et al.*, 2007).

Por tanto, no es razonable ni lógico mantener las antiguas directrices sobre el riego con aguas residuales semejantes a las establecidas para el agua potable, cuando las autoridades sanitarias consideran aceptables para riego las aguas naturales de los ríos y las domésticas, con concentraciones de coliformes fecales en muchos casos superiores a 1.000 por cada 100 mL (Lorenzo *et al.*, 2009).

La necesidad de conocer la calidad sanitaria es sumamente importante para evitar enfermedades en el hombre. Algunos valores de referencia indican que para provocar una infección y causar enfermedad a un individuo se necesitan ingerir de 1×10^6 a 1×10^{10} bacterias de *Escherichia coli*; entre 1×10^3 a 1×10^8 organismos de *Vibrio cholera*; 1×10^5 a 1×10^9 de *Salmonella* y de 1×10^2 a 1×10^3 de *Shigella* (Sandoval Yoval, 2004).

I.4.1.2. Selección de cultivos

Para el riego de ciertos cultivos, sobre todo las hortalizas que se consumen crudas, se necesitan aguas residuales de alta calidad microbiológica, mientras que en otros se pueden emplear aguas de calidad inferior, donde el público no esté expuesto a

contaminación. De acuerdo a ello, los cultivos se pueden clasificar según el grupo expuesto y las medidas de protección de la salud que exige de la siguiente manera (OMS, 1989):

- Categoría A: se necesita protección para los consumidores, los trabajadores agrícolas y el público en general. Aquí se incluyen cultivos que se consumen crudos, frutas regadas por aspersión y lugares sembrados de pasto (campos de deporte, parques públicos y prados).
- Categoría B: se necesita protección sólo para trabajadores agrícolas. Esto incluye cultivos de cereales, cultivos industriales (como el algodón) y cultivos alimenticios empleados para fabricación de enlatados, cultivos forrajeros, praderas y árboles. En ciertas circunstancias, se podría considerar que algunos cultivos pertenecen a la Categoría B si no se consumen crudos (por ejemplo, la papa) o si crecen a una distancia considerable del suelo. En esos casos hay que evitar la contaminación del cultivo mediante riego por aspersión y asegurarse de que la contaminación de la cocina con esos productos antes de su preparación no represente un peligro para la salud.

De acuerdo a las recomendaciones y conclusiones de múltiples estudios y reuniones de expertos, la OMS reafirmó en el año 2006 las directrices que habían sido recomendadas en 1989 (Tabla I.4).

La Unión Europea, como consecuencia de la crisis de *Escherichia coli* verotoxígena (ECVT) en 2011, a través de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) emitió seis dictámenes científicos estableciendo criterios para la evaluación de riesgos de utilización de aguas residuales en la producción agrícola primaria según la combinación de fuentes de agua, método de riego o potencial contacto con frutas y hortalizas. En este sentido, determinó para *Escherichia coli* un límite máximo de 10.000 NMP 100 mL⁻¹ de agua residual tratada utilizada en riego de frutas y hortalizas con probabilidad de consumo cocinadas, donde el agua no entra en contacto directo con la parte comestible del producto (DOUE, 2017).

Tabla I.4. Directrices sobre la calidad microbiológica de los efluentes empleados en agricultura^a.

Cat.	Condiciones de aprovechamiento	Grupo expuesto	Nemátodos intestinales ^b	Coliformes fecales ^c	Tratamiento ^d
A	Riego de cultivos que comúnmente se consumen crudos, campos de deporte, parques públicos	Trabajadores, consumidores, público	≤ 1	$\leq 1.000^e$	Tanques de estabilización para lograr la calidad microbiológica indicada o tratamiento equivalente
B	Riego de cultivos de cereales industriales y forrajeros, praderas y árboles ^f	Trabajadores	≤ 1	No se recomienda ninguna norma	Retención en estanques de estabilización por 8 a 10 días o eliminación equivalente de helmintos y coliformes fecales
C	Riego localizado de cultivos en la cat. B cuando ni los trabajadores ni el público están expuestos	Ninguno	No es aplicable	No es aplicable	Tratamiento previo según lo exija la tecnología de riego por no menos que sedimentación primaria

- a- En casos específicos, se debería tener en cuenta los factores epidemiológicos, socioculturales y ambientales de cada lugar y modificar las directrices de acuerdo a ellos.
- b- Especies *Ascaris* y *Trichuris* y anquilostomas (media aritmética - N° de huevos L⁻¹).
- c- Durante el periodo de riego (media geométrica - N° 100 mL⁻¹).
- d- Tratamiento necesario para lograr la calidad microbiológica exigida.
- e- Conviene establecer una directriz más estricta (≤ 200 coliformes fecales por 100 mL) para prados públicos, como los de hoteles, con los que el público puede entrar en contacto directo.
- f- En el caso de los árboles frutales, el riego debe cesar dos semanas antes de cosechar la fruta y ésta no se debe recoger del suelo. No es conveniente regar por aspersión.

Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2006.

I.4.1.3. Directrices en la provincia de Córdoba

La provincia de Córdoba (Argentina) a través del Decreto 847/16 en su anexo único de la Ley N° 10.208/14 de Política Ambiental, establece la “*Reglamentación de Estándares y Normas sobre vertidos para la preservación del recurso hídrico provincial*” cuyo objetivo es determinar los mecanismos de control, fiscalización y seguimiento de las actividades antrópicas que se vinculan a la gestión en materia hídrica, fijar estándares de emisión o efluentes, estándares tecnológicos y ambientales para los vertidos de efluentes

líquidos así como también su utilización, promoviendo el uso de los recursos hídricos con una visión sustentable (Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos, 2016). En esta normativa se clasifican a los efluentes tratados según su destino en los siguientes tipos:

- Reúso urbano (Tipo 1): riego de zonas verdes (campos de golf, parques, cementerios), lavado de automóviles, inodoros, combate de incendios, y otros usos con similar acceso o exposición al agua. Personas expuestas: Público en general y trabajadores.
- Reúso para riego con acceso restringido (Tipo 2): cultivo de césped, silvicultura, y otras áreas donde el acceso del público es prohibido, restringido o poco frecuente. Personas expuestas: Trabajadores
- Reúso agrícola en cultivos de alimentos que no se procesan comercialmente (Tipo 3): riego de cualquier cultivo comestible, incluyendo aquellos que se consumen crudos. Personas expuestas: Público en general y trabajadores
- Reúso agrícola en cultivos de alimentos que se procesan comercialmente (Tipo 4): estos cultivos son aquellos que, previo a su venta al público, han recibido el procesamiento físico o químico necesario para la destrucción de los organismos patógenos que pudieran contener. Personas expuestas: Trabajadores
- Reúso agrícola en cultivos no alimenticios (Tipo 5): riego de pastos para ganado, forrajes, cultivos de fibras, otros no alimenticios. Personas expuestas: Trabajadores
- Reúso recreativo (Tipo 6): contacto accidental (pesca, canotaje), y contacto primario con aguas regeneradas. Personas expuestas: Público en general y trabajadores
- Reúso paisajístico (Tipo 7): aprovechamiento estético, donde el contacto con el público no es permitido, y dicha prohibición esté claramente rotulada. Personas expuestas: Trabajadores
- Reúso en la construcción (Tipo 8): compactación de suelos, control del polvo, lavado de materiales, producción de concreto. Personas expuestas: Trabajadores

En la Tabla I.5 se fijan los estándares fisicoquímicos de calidad que deben reunir los efluentes urbanos tratados para su posible utilización como fuente de agua según lo

establecido por el Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos de la provincia de Córdoba, Argentina.

Tabla I.5. Estándares fisicoquímicos de calidad para la utilización de efluentes urbanos tratados

Estándar	Unidad	Valor	Estándar	Unidad	Valor
Sólidos disueltos	mg L ⁻¹	≤ 500	Litio	mg L ⁻¹	≤ 2,5
Sólidos suspendidos	mg L ⁻¹	≤ 50	Manganeso	mg L ⁻¹	≤ 0,2
Aluminio	mg L ⁻¹	≤ 5	Mercurio	mg L ⁻¹	≤ 0,001
Antimonio	mg L ⁻¹	≤ 0,1	Nitrógeno	mg L ⁻¹	≤ 30
Arsénico	mg L ⁻¹	≤ 0,1	Nitratos	mg L ⁻¹	≤ 30
Berilio	mg L ⁻¹	≤ 0,1	Níquel	mg L ⁻¹	≤ 0,2
Bicarbonatos	mg L ⁻¹	≤ 100	Plomo	mg L ⁻¹	≤ 0,5
Boro	mg L ⁻¹	≤ 0,7	Potasio	mg L ⁻¹	≤ 250
Cadmio	mg L ⁻¹	≤ 0,01	Selenio	mg L ⁻¹	≤ 0,02
Carbonato de sodio	mg L ⁻¹	≤ 2,5	Sodio	mg L ⁻¹	≤ 250
Cloruros	mg L ⁻¹	≤ 142	Sulfatos	mg L ⁻¹	≤ 130
Cobalto	mg L ⁻¹	≤ 0,1	Zinc	mg L ⁻¹	≤ 2
Cobre	mg L ⁻¹	≤ 0,2	Temperatura	°C	≤ 40
Cromo	mg L ⁻¹	≤ 0,1	pH	UpH	≤ 6,5 a 8
Fluoruro	mg L ⁻¹	≤ 1,5	Cond. eléctrica	µmho cm ⁻¹	≤ 1.000
Fosfatos	mg L ⁻¹	≤ 5	RAS		≤ 3
Hierro	mg L ⁻¹	≤ 5	Demanda Biol. O ₂	mg L ⁻¹	30

Fuente: Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos, (2016).

A continuación, en la Tabla I.6 se fijan los estándares biológicos de calidad según el tipo de efluente de acuerdo a su destino de reúso.

Tabla I.6. Estándares biológicos de calidad para la utilización de efluentes urbanos tratados

Estándar	Unidad	Valor máximo	
		Tipo 1-3-6	Tipo 2-4-5-7-8
Nematodos intestinales ^a	Media aritmética N° de		
	huevos por L ^b	< 1	≤ 1
Coliformes fecales	NMP 100 mL ⁻¹	< 200	≤ 1000

a-Especies Ascaris y Trichuris y anquilostomas

b- Durante el período de riego

Fuente: Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos, (2016).

I.5. Calidad e inocuidad de los alimentos

La presencia de algunos microorganismos en los alimentos no representa necesariamente un índice de riesgo para el consumidor. Vegetales y animales son la principal fuente de los alimentos que consumen los humanos y se encuentran naturalmente asociados a microorganismos. Por lo tanto, al momento de definir un criterio, los microorganismos seleccionados para la elaboración del mismo deben ser relevantes para el alimento y circunstancias particulares (producto crudo o listo para consumir, perfil del consumidor del producto) (ANMAT, 2004).

Si el criterio establece la búsqueda de microorganismos indicadores, su propósito debe ser detallado claramente (por ejemplo, detectar higiene inadecuada, indicar posible presencia de patógenos). Es importante tener presente que, mientras para un alimento cocido o listo para consumir la tolerancia para un determinado microorganismo es cero, sí se puede permitir la presencia del mismo en el alimento crudo, dentro de ciertos niveles, si éste fuera sometido a un tratamiento previo a su consumo por el cual se eliminará dicho microorganismo (por ejemplo, cocción). En este sentido, la interpretación del resultado es diferente según se trate de producto crudo o producto cocido o listo para consumir (ANMAT, 2004).

En Argentina, la normativa actual rige en el Código Alimentario Argentino, que fue puesto en vigencia por la Ley 18.284/69, reglamentada por el Decreto 2.126/71. Se trata de un reglamento técnico en permanente actualización que establece disposiciones higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial que deben cumplir las personas físicas o jurídicas, los establecimientos y los productos que se enmarcan en su órbita (CONAL, 2018).

El Capítulo XI del Código Alimentario Argentino se refiere al grupo de “Alimentos Vegetales”, donde están incluidas las hortalizas frescas. En el Artículo 925 quater (Res. Conj. SPRel 4 E/2017 y SAV 4E/2017) se establecen las normas microbiológicas a las cuales deben ajustarse las frutas y hortalizas frescas (Tabla I.7).

Tabla I.7. Normas microbiológicas para frutas y hortalizas frescas.

Parámetro	Criterio microbiológico	Método de referencia ^a
<i>E. coli</i> NMP/g	n=5 c=2 m=10 M=100	BAM-FDA: 2002, método I o II
<i>Salmonella</i> spp.	n=5 c=0 Ausencia en 25 g	BAM-FDA: 2011, ISO 6579: 2002, Co: 2004
<i>E. coli</i> O157: H7/NM	n=5 c=0 Ausencia en 25 g	BAM-FDA: 2011, ISO 16654: 2001
<i>E. coli</i> no O157 ^b	n=5 c=0 Ausencia en 25 g	ISO 13136: 2012, BAM-FDA: 2014

Referencias: n= tamaño de la muestra; c= cantidad máxima de unidades defectuosas que se permite en la muestra para que se acepte el lote; m= límite microbiológico que, en un plan de dos clases, separa la calidad aceptable de la rechazable, y en un plan de tres clases separa la calidad aceptable de la marginalmente aceptable; M= límite microbiológico que en un plan de tres clases separa la calidad marginalmente aceptable de la rechazable.

a- O su versión más actualizada. b- *E. coli* productor de toxina Shiga de los serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103. Se tendrán en cuenta sólo los aislamientos positivos para los genes *stx* y *eae*, de los serogrupos mencionados.

Fuente: Comisión Nacional de Alimentos (2018).

Los planes de muestreo se dividen en dos o tres clases. Un plan de muestreo de dos clases, es aquel donde la calidad de un producto puede dividirse en dos grados (aceptable o rechazable), en cambio, en un plan de muestreo de tres clases la calidad del producto se divide en tres grados (aceptable, marginalmente aceptable o rechazable) (ANMAT, 2004; Rodríguez Balza, 2018).

El Código Alimentario Argentino tiene como objetivo primordial la protección de la salud de la población, además de velar por más posibilidades de acceso a alimentos que tengan garantía de inocuidad como un valor agregado en calidad. En Argentina, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) constituye el organismo oficial encargado de las tareas de asesoramiento, apoyo y seguimiento del Sistema Nacional de Control de Alimentos, establecido por el Decreto 815 del año 1999 (CONAL, 2018).

I.6. Riego por goteo subterráneo

El riego por goteo subterráneo es un sistema caracterizado por el suministro de agua localizado bajo la superficie del suelo, a bajo caudal, generalmente similar al sistema de riego por goteo superficial. La primera referencia de su uso general, data de principios de los años '70 en California para el riego de frutales (Barberá Alarcón, 2003).

Existen abundantes referencias específicas de su utilización en cultivos agrícolas, como la caña de azúcar en Hawái, algodón, cereales y melones en Arizona, manzanas en Israel, vid en California, e incipientemente en olivo, vid y cítricos, en España (Barberá Alarcón, 2003).

En los últimos años los sistemas de riego por goteo subterráneo han experimentado importantes avances, de la misma forma los conocimientos científico-técnicos han servido para clarificar algunas limitaciones de este sistema. A continuación, se enumeran las principales ventajas y desventajas del uso de riego por goteo subterráneo (FAO, 2013; Lanchimba Morales, 2016; Lucas y Alarcón, 2018):

Ventajas

- Mejora el aprovechamiento del agua y nutrientes aplicados, lográndose mayores rendimientos y calidad de los productos agrícolas.
- Mejora el aprovechamiento de nutrientes poco móviles, como fósforo, al colocarlos en la zona de mayor densidad radicular.
- Mayor eficiencia en el uso del agua, reduciendo las pérdidas por evaporación.
- Permite la utilización de aguas de baja calidad agronómica, con mayor contenido salino.
- Facilita el tránsito de maquinarias y equipos ya que en la superficie del suelo no se encuentra ningún componente del sistema de riego.
- Reduce notablemente la aparición de malezas, ya que la superficie del suelo se encuentra más seca.
- Reduce la aparición de enfermedades fúngicas, al no entrar en contacto el agua con la parte aérea del cultivo
- Permite el uso de aguas residuales tratadas, reduciendo el contacto con elementos que podrían actuar como fuentes de infecciones para los humanos y minimiza la presencia de olores desagradables.
- Incrementa la vida útil del sistema, al permanecer el equipo protegido de rayos solares, heladas, roedores, granizo y otros factores adversos.

Desventajas

- Disminuye el contenido hídrico en la superficie del suelo pudiendo dificultar la germinación y posterior desarrollo de plántulas, siendo a veces necesario emplear otro sistema de riego hasta conseguir un desarrollo radicular mínimo del cultivo.

- Incrementa los costos de instalación y mantenimiento.
- Provoca una mayor dificultad para inspeccionar y evaluar el sistema, ya que se encuentra enterrado para su mantenimiento y reparación.
- Mayor probabilidad de obturación de emisores, debido a la acumulación de sedimentos, succión de suelo e intrusión radicular.

La eficiencia del uso del agua es el principal criterio para elegir el método de riego, pero cuando se usan aguas residuales existen otros factores que deben tenerse en cuenta, como los riesgos de contaminación de los trabajadores y de los cultivos (Moscoso, 1995). El riego por goteo subterráneo implica un menor riesgo sanitario, ya que limita el contacto del agua con las personas, partes vulnerables del medio ambiente o cultivos, en comparación a sistemas de riego superficiales, ya sea riego en manto, aspersión e incluso goteo superficial (FAO, 2013).

El riego por goteo subterráneo con aguas residuales, además de ofrecer un mayor grado de protección de la salud, permite un uso más eficiente del agua y obtener mayores rendimientos en los cultivos. Sin embargo, es costoso y se necesita un tratamiento seguro y completo del agua (para retirar los sólidos en suspensión) con el fin de evitar un defectuoso funcionamiento del sistema, debido al taponamiento de los emisores (CEPIS, 2002b).

En el riego de cultivos hortícolas el riesgo asociado al uso de aguas residuales es muy elevado, cualquier cultivo que se consuma crudo como cultivos de hojas, no deben crecer en contacto con efluentes de aguas residuales, por tal motivo, el empleo de sistemas de goteo subterráneo constituye una excelente alternativa (FAO, 2013).

El potencial de la tecnología de goteo subterráneo ha quedado demostrado en varios cultivos alrededor del mundo. En Estados Unidos, muchos proyectos están centrados en el riego de campos de maíz y alfalfa, donde se han instalado más de 500.000 ha en los últimos años. En Latinoamérica, Perú lleva adelante un proyecto de más de 8.000 ha, que contempla el riego de caña de azúcar para la producción de biocombustibles. En Argentina, en tanto, es una tecnología en desarrollo que se utiliza para el riego de especies como cebolla, ajo, maíz dulce y caña de azúcar (Muñoz, 2018).

Existen muchos antecedentes a nivel mundial del uso de riego por goteo subterráneo en diferentes cultivos agrícolas, incluyendo hortalizas y jardinería, así como también del reúso de aguas residuales tratadas en la agricultura, sin embargo, a pesar de las ventajas que estos sistemas ofrecen, son escasas las experiencias que combinen esta tecnología de riego con el uso de aguas residuales.

I.7. Antecedentes

En cuanto al uso agrícola de aguas residuales tratadas se pueden mencionar muchos antecedentes que dan cuenta de los beneficios que arroja este recurso en el aumento del rendimiento de múltiples cultivos.

Jungersen (1991) en un estudio realizado sobre remolacha, zanahoria, coliflor, cilantro, lechuga, espinaca, nabo y rábano, evaluó el efecto del riego con agua dulce y aguas residuales diluidas en agua dulce (1:1). Los cultivos fueron cosechados ocho semanas después de la siembra, excepto el cilantro que fue cosechado a las seis semanas. Los resultados mostraron que el crecimiento fue mejor en las hortalizas regadas con aguas residuales. Sin embargo, el porcentaje de germinación fue mayor en las hortalizas regadas con agua dulce.

Pérez Nieto *et al.* (2001) lograron rendimientos de 11,5 Mg ha⁻¹, muy superiores a la media nacional (8,0 Mg ha⁻¹) en zapallo Zucchini, utilizando riego con aguas residuales tratadas en Chiconautla, México.

Moscoso y Merzthal (2001) analizaron el uso de aguas residuales tratadas y no tratadas en la agricultura urbana, en un proyecto realizado en 1991 por el Ministerio de Agricultura de Perú, el cual consistió en evaluar el grado de sustitución de fertilizantes inorgánicos por el aporte de nutrientes desde las aguas residuales tratadas, ensayando en diferentes cultivos tales como frijol, brócoli y maíz, pudiendo demostrar que este tipo de aguas, aportan los nutrientes requeridos por los cultivos, permitiendo ahorrar en costos de fertilización.

Moscoso (2002) en un proyecto a escala de campo utilizando efluentes tratados en riego de cultivos hortícolas, durante un período de 5 años, cultivando alcachofas, brócoli, coliflor, lechuga y apio; determinó diferencias significativas en la producción de apio y brócoli utilizando este tipo de aguas.

Sandoval Yoval y Colli Misset (2004) evaluaron la producción de hortalizas (lechuga, rábano, cebolla y cilantro) regadas con distintas calidades de agua, concluyeron que la productividad de las hortalizas fue equivalente entre las aguas de pozo y las provenientes de un tratamiento secundario con o sin desinfección.

García Peña (2004) en un estudio desarrollado en el campo experimental de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Buenavista, (México), evaluó el efecto del riego con aguas residuales y agua de pozo sobre la producción de brócoli. Los

resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en favor del riego con agua residual para las variables peso de pella y diámetro de pella, logrando un producto apto para el consumo humano.

Gómez (2004) en el Municipio de Carazo, El Aguacate (Nicaragua) para implementar el riego con efluentes de una pequeña zona en cultivo de maíz (*Zea mays* L.), estudió las características físicas y químicas del suelo en una etapa inicial, intermedio y final del ciclo de maíz. El uso de aguas residuales no presentó variaciones significativas en las características del suelo evaluadas, es decir, que el riego con estas aguas no alteraría significativamente en principio sus características fisicoquímicas. Los rendimientos del cultivo de maíz regado con agua residual tratada que se obtuvieron fueron superiores hasta en un 60% con respecto a los rendimientos medios tradicionales en la zona donde se realizó el estudio.

Grosso *et al.* (2005) trabajaron en Río Cuarto, Córdoba (Argentina), con cultivares de ajo blanco y morado regados con efluentes urbanos tratados y agua de perforación, y si bien no encontraron diferencias estadísticas entre ambas calidades de agua para el rendimiento, peso y calibre de los bulbos, los tratamientos regados con efluentes resultaron seguros para la salud humana, ya que los análisis bacteriológicos no detectaron *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

En México, el rendimiento de tomates regados con agua residual fue de 35 Mg ha⁻¹ contra 18 Mg ha⁻¹ regado con agua limpia. En Perú, papa regada con efluentes provenientes de lagunas de estabilización secundaria rindió 45 Mg ha⁻¹ mientras que la regada con agua de perforación solo rindió 12 Mg ha⁻¹ (Sáenz Forero, 2006).

Fasciolo *et al.* (2007), durante los años 1998, 1999, 2000 y 2002 realizaron en la provincia de Mendoza, (Argentina), experimentos en cultivos de ajo y cebolla regados con efluentes domésticos tratados, con agua de perforación con fertilizante y con agua de perforación sin fertilizante (Testigo). Como impactos positivos se concluye que el riego con efluentes domésticos tratados aumentó el calibre y el rendimiento de ajo en un 19% y el de cebolla en un 15%, con respecto al riego con el tratamiento testigo, como consecuencia del potencial fertilizante de los efluentes. Entre los impactos negativos se concluye que el riego con efluentes aumentó el crecimiento de malezas y el % de bulbos descartados por defectos, el fósforo aumentó un 11% respectivamente pero no se detectaron cambios en la concentración de plomo, arsénico, mercurio, cadmio, zinc y boro.

Montero *et al.* (2009), determinaron en el municipio de San Miguel del Padrón, La Habana (Cuba), la respuesta del riego con aguas residuales en los cultivos de (*Sorghum*

bicolor. L. Moench var. Blanco C-21) y maíz (*Zea mays*. L var. Tusón), como alternativa para la producción de alimento animal. Los tratamientos de estudio fueron: riego con aguas residuales y condiciones de secano (sin riego). Se aplicó una dosis neta total de 1.775,4 m³ ha⁻¹ de aguas residuales, distribuida en 31 riegos que permitieron incrementar significativamente el rendimiento en granos de sorgo y maíz en 4,29 Mg ha⁻¹ y 1,73 Mg ha⁻¹ respectivamente, con relación al tratamiento de secano.

Navarro López (2010) menciona que en la zona del Valle del Mezquital (México), el riego con agua residual sin tratamiento, parcialmente tratada o mezclada con agua de lluvia, produce un incremento en el rendimiento de algunas hortalizas como poroto de 1,4 a 1,8 Mg ha⁻¹ (28 %), ají de 7 a 12 Mg ha⁻¹ (71 %).

Plevich *et al.* (2012) evaluaron la producción de biomasa aérea, la eficiencia del uso de agua y el valor nutritivo de alfalfa regada con agua residual urbana, agua de perforación y un testigo en secano. Los tratamientos de riego tuvieron un efecto positivo sobre la producción de biomasa aérea obteniéndose un 24% más de producción que en secano. A su vez, la biomasa de la alfalfa regada con aguas residuales urbana superó en un 19% a la cultivada con agua de perforación y en calidad nutricional, encontrándose un 39% más de proteínas, 14% más de digestibilidad e igual porcentaje de energía metabólica.

Ramos *et al.* (2013) evaluaron el efecto del riego con efluentes tratados sobre el rendimiento y la calidad sanitaria de ajo blanco bajo cobertura vegetal de suelo, el riego con efluentes tratados aportó por hectárea 94 kg de N; 12 kg de P y 47 kg de K, con una lámina de 292 mm. El rendimiento máximo obtenido fue de 11.683,6 kg ha⁻¹, los análisis microbiológicos de los bulbos determinaron que fueron aptos para su consumo en fresco.

Gatta *et al.* (2015) en Apulia (Italia), realizaron un estudio comparativo para evaluar los efectos del riego con aguas subterráneas (GW) y aguas residuales agroindustriales (TW) tratadas sobre la calidad y rendimiento de tomate. *Escherichia coli*, *Enterococci fecales* y *Salmonella sp.* fueron determinadas tanto en el agua de riego, como en las plantas y frutos de tomate, como así también en el suelo hasta la profundidad enraizable del cultivo. Los resultados obtenidos no encontraron diferencias significativas en rendimiento comercial, no obstante, fue mayor con TW (82 vs. 79 Mg ha⁻¹ con GW). En las plantas de tomate y los frutos, no se aisló *E. coli*, y la cuantificación fue menor en el suelo irrigado con GW que en TW (3,69 vs. 4,02 x 10⁶, respectivamente). Estos datos muestran que la composición de la comunidad y dinámica de la población bacteriana en el suelo se ve influenciada por las diferentes calidades de aguas utilizadas para el riego.

Beneduce *et al.* (2017) en Italia evaluaron la reutilización de efluentes en un sistema de cultivo en el que se usaron aguas subterráneas y aguas residuales para el riego de brócoli y tomate. El efluente, el ambiente y los productos se monitorearon en busca de indicadores microbianos de contaminación. La calidad microbiana de las aguas de riego influyó en la presencia de indicadores microbianos en el suelo. *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* se detectaron en muestras de suelo, independientemente de la fuente de agua de riego. No se encontró ningún patógeno que contaminara las plantas de tomate, mientras que *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 se detectaron en la planta de brócoli, pero cuando se cosecharon los productos finales, no se detectó ningún patógeno en la parte comestible.

Moazeni *et al.* (2017) evaluaron los riesgos microbianos para agricultores y consumidores de lechuga irrigada en Irán, con efluente proveniente de dos plantas de tratamiento de aguas residuales de lodo activado. El muestreo del efluente de aguas residuales se llevó a cabo durante un período de nueve meses, y se determinó la presencia de coliformes fecales y enterovirus (EV). Las bacterias coliformes fecales se encontraron en un alto nivel que excedió los límites para la utilización de aguas residuales en la agricultura. El riesgo estimado para los consumidores de lechuga exhibió un nivel más bajo de infección y carga de la enfermedad, pero más alto que los límites requeridos para riego agrícola.

De acuerdo a todo lo expuesto precedentemente, resulta de interés profundizar los estudios orientados a evaluar usos alternativos de los efluentes urbanos tratados en la producción agrícola, sobre todo en los sistemas de producción hortícola, ya que éstos se encuentran muy próximos a las zonas urbanas, conformando los denominados “Cinturones Verdes”, donde existe una mayor producción de efluentes y se debe priorizar el uso del agua dulce para el abastecimiento público.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la utilización de efluentes urbanos tratados sobre el crecimiento, calidad de pella y rendimiento total de cultivares de brócoli, utilizando un sistema de riego por goteo subterráneo para minimizar los riesgos potenciales de contaminación y obtener un producto de calidad e inocuidad. Además de los aportes al conocimiento en la elucidación del tema propuesto, los resultados de este proyecto pueden posteriormente ser transferidos al medio con el objetivo de lograr un impacto favorable sobre el sector productivo hortícola.

I. HIPÓTESIS

El riego con efluentes urbanos tratados aumentará la producción de biomasa y rendimiento de brócoli, logrando obtener pellas de calidad e inocuidad para consumo en fresco.

I. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos que se plantearon para evaluar el efecto de la utilización de efluentes urbanos tratados en brócoli fueron:

- Evaluar la partición de asimilados en hoja, tallo y pella en brócoli.
- Evaluar la calidad de las pellas (diámetro, peso medio individual, diámetro del pedúnculo y presencia de hollow stem), rendimiento total y precocidad en brócoli.
- Evaluar al momento de la cosecha de las pellas la presencia de coliformes fecales y totales, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y parásitos perjudiciales para la salud humana.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

I.1. Caracterización del sitio

Los experimentos se realizaron en el Campo Experimental de la Universidad Nacional de Río Cuarto (33° 06' 94'' Sur, 64° 18' 75'' Oeste; 425 m.s.n.m.), departamento de Río Cuarto, provincia de Córdoba (Argentina), utilizándose los efluentes provenientes de una Planta Piloto de Tratamiento y Reutilización de Efluentes Urbanos instalada en el año 2005.

El departamento de Río Cuarto se caracteriza por presentar un régimen de precipitaciones tipo monzónico. La precipitación media anual varía entre 550 y más de 990 mm. La precipitación media de los últimos 20 años en Río Cuarto fue 801 mm, siendo los meses de mayor precipitación diciembre y enero, con 130 mm mes⁻¹, mientras que para junio y julio la media alcanza los 12 mm mensuales (ADESUR, 1999).

La región presenta una marcada amplitud térmica a lo largo del año, con temperaturas bajo cero en los meses más fríos (junio y julio) y por encima de 35 °C en los meses de verano (diciembre y enero). El periodo libre de heladas es de 256 días y comprende desde mediados de septiembre hasta mediados de mayo (ADESUR, 1999).

La dirección predominante del viento es de NE a SO teniendo sus mayores velocidades en el periodo comprendido entre los meses de julio a noviembre. Los suelos son de textura franca arenosa, clasificados como Haplustoles típicos y de aptitud agrícola (Cantero *et al.*, 1986).

I.1.1. Planta Piloto de Tratamiento de Efluentes Urbanos

La Planta Piloto de Tratamiento y Reutilización de Efluentes Urbanos posee una capacidad para tratar un caudal de 25.000 L día⁻¹ de efluentes generados por un complejo de 104 Residencias Estudiantiles Universitarias, pertenecientes a la Universidad Nacional de Río Cuarto, que albergan a una población total de 415 estudiantes.

I.1.1.2. Proceso de Tratamiento de Efluentes Urbanos

I.1.1.2.1. Tratamiento preliminar

La recolección del efluente urbano crudo proveniente de las Residencias Estudiantiles Universitarias se realiza mediante una red domiciliaria que los conduce a través de una tubería de PVC tipo K4 de 160 mm de diámetro con una pendiente proyecto de 1,5% y se descarga en una cámara receptora de cemento de 1,5 m de ancho por 2,5 m de largo por 5 m de profundidad donde comienza la etapa de pretratamiento, en principio, el material pasa a través de un disco perforado de acero inoxidable de 0,30 m de diámetro, que actúa como primer filtro de material grueso, y luego vierte por gravedad a un canasto de acero inoxidable de 0,075 m³ cubierto de perforaciones que actúa como segundo filtro, para retener el material grueso remanente del filtrado anterior, semanalmente el canasto es retirado para su limpieza.

Desde la cámara receptora, por medio de bombas que operan alternativamente en forma automática, cada vez que se almacena un volumen de efluentes de 3.000 L, éstos son enviados a través de una tubería de PVC hacia un tanque sedimentador de lodos que posee una capacidad de 10.000 L, y su función es concentrar el efluente urbano derivado y permitir la deposición de los sólidos contenidos en el mismo en forma de lodos en la parte inferior del tanque para su posterior separación.

I.1.1.2.2. Tratamiento primario y secundario

En la parte superior del tanque sedimentador de lodos se genera un líquido sobrenadante que se deriva a una primera laguna facultativa con presencia de macrófitas acuáticas flotantes de los géneros *Lemna*, *Spirodela* y *Wolffia*, en la que permanecen los efluentes durante un Tiempo de Residencia Hidráulico (TRH) de 13 días, produciéndose una remoción cercana al 97% de los coliformes fecales y un 73% de coliformes totales. Una vez transcurrido ese tiempo son derivados a una segunda laguna facultativa, también con macrófitas, y con un TRH de 13 días más se produce una remoción cercana al 100% de coliformes fecales, quedando un remanente de coliformes totales de 4×10^5 NMP por cada 100 mL de efluente urbano tratado.

Posteriormente, los efluentes son derivados a una laguna de maduración que consiste en un tanque de fibrocemento de 158.000 L y de poca profundidad, su función es reducir aún más la presencia de microorganismos a través de la exposición a la radiación generada naturalmente por el sol, cuando la radiación tipo UV penetra las paredes de las células de un organismo, ésta destruye su capacidad de reproducción (EPA, 2000).

En la Figura I.2 se muestra un esquema del recorrido que realiza el efluente urbano crudo para su tratamiento y disposición final en las parcelas experimentales.

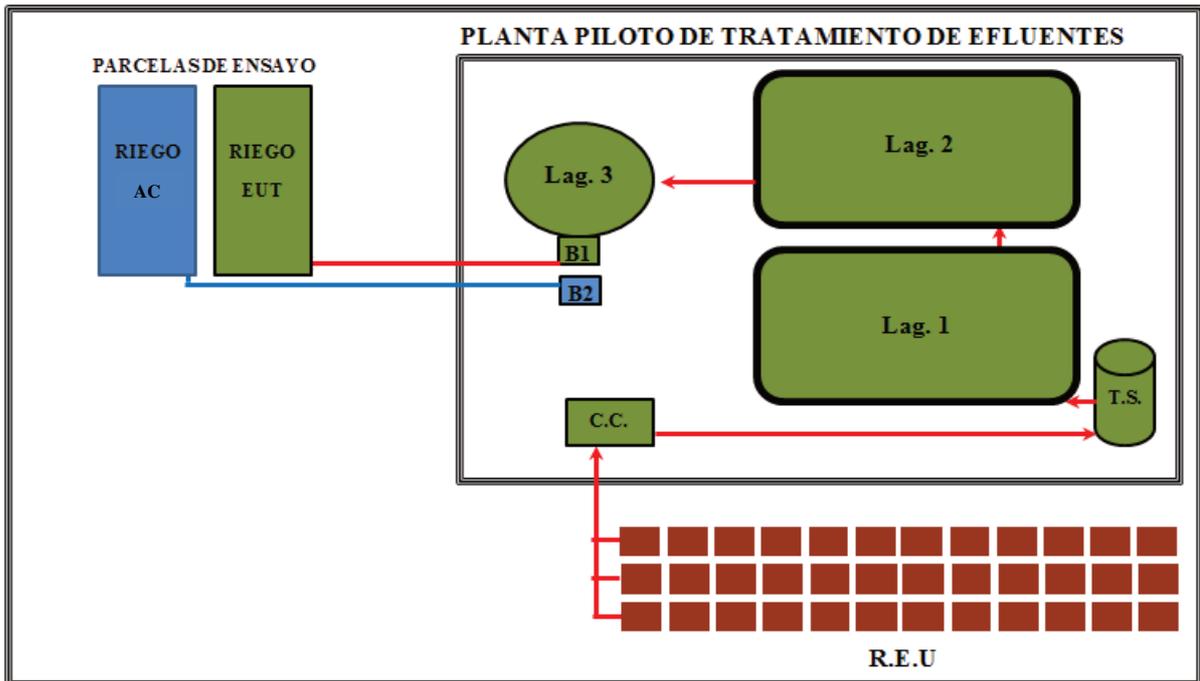


Figura I.2. Esquema de tratamiento del efluente urbano crudo. Referencias: R.E.U.: Residencias Estudiantiles Universitarias. C.C.: cámara concentradora de efluentes crudos. T.S.: tanque sedimentador. Lag 1 y 2: lagunas facultativas. Lag. 3: laguna de maduración. B1: estación de bombeo de efluentes urbanos tratados. B2: estación de bombeo de agua de acuífero.

I.1.1.3. Riego por goteo subterráneo

I.1.1.3.1. Instalación del equipo

En el área experimental se instalaron a una profundidad de 0,4 m, dos redes malladas constituidas por tuberías de PVC K6, Clase S de 50 mm de diámetro, una de ellas para la aplicación de riego con efluentes urbanos tratados y la otra para aplicar agua de acuífero.

En cada red mallada se insertaron, a un distanciamiento de 0,50 m, conectores tipo gromet y líneas portagoteros de polietileno (PE) de 16 mm de diámetro, con emisores tipo laberinto no autocompensantes de flujo turbulento y con una descarga de 1 L h^{-1} . En los extremos de la red se instaló una "T" con salida a superficie, un manómetro y una llave para realizar actividades de mantenimiento, como flushing (lavado) y verificación del comportamiento hidráulico de la instalación.

El EUT y AC fueron conducidos hasta las parcelas experimentales, mediante una tubería de PVC K4. Un cabezal o centro de control, integrado por una electrobomba marca Czerweny modelo ZII de 10.200 L h⁻¹, se usó para extraer los EUT desde la laguna de maduración, y una electrobomba sumergible de 10.000 L h⁻¹ para la extracción del AC. El sistema además estuvo provisto de filtros de malla y anillas de 2" para evitar obturaciones y reguladores de presión de 15 PSI para mantener una presión constante en el sistema de 1 kg cm⁻².

Además del proceso de filtrado, los emisores se protegieron para evitar obturaciones e introducción de raíces al sistema mediante una cobertura con manta elástica, cuya densidad era de 30 g m⁻² y estaba compuesta por fibras sintéticas de alta resistencia. Para su instalación se cortaron paños rectangulares de 0,10 m x 0,20 m y se cubrió a cada emisor.

I.1.1.3.2. Programación del riego

Para determinar el momento de riego con EUT y AC se tomaron muestras de humedad de suelo con barreno sacabocado en forma semanal a cuatro profundidades 0-0,10 m; 0,10-0,20 m; 0,20-0,30 m y 0,30-0,40 m, se pesaron y se llevaron a estufa a 105 °C hasta lograr peso constante. La densidad aparente (D_a) se determinó utilizando el método de Uhlund, (1949) mediante cilindros de acero inoxidable de 50 mm de altura por 47 mm de diámetro interno, para posteriormente establecer la humedad volumétrica de los diferentes horizontes del perfil del suelo.

Para evitar condiciones de estrés hídrico en el cultivo y lograr la mayor precisión posible en el manejo de los EUT y AC, una vez instalado el equipo de riego por goteo subterráneo, se determinó la Curva de Capacidad Hídrica de la parcela. Las constantes hídricas se determinaron en laboratorio mediante el empleo de ollas de presión a -30 kPa y -1.500 kPa de potencial para Capacidad de Campo y Punto de Marchitez Permanente, respectivamente. Con estos valores se construyó la Curva de Capacidad Hídrica de la parcela, y la programación del riego se definió evitando que el contenido de humedad del suelo este por debajo de un valor umbral correspondiente al 60% del Agua Útil.

Los resultados promedios de humedad de suelo, hasta una profundidad de 0,40 m, fueron de 24,1% a Capacidad de Campo; 7,4% a Punto de Marchitez Permanente y 16,6% de Agua Útil (Figura I.3).

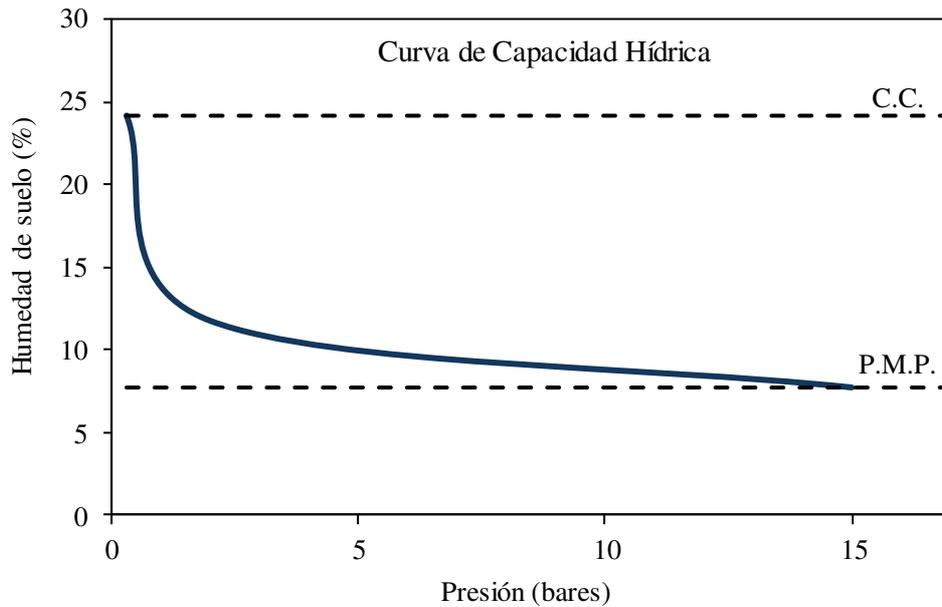


Figura I.3. Curva de Capacidad Hídrica del suelo en la parcela experimental. C.C.: Capacidad de Campo. P.M.P.: Punto de Marchitez Permanente.

I.1.1.4. Análisis del Efluentes Urbanos Tratados y Agua de Acuífero

Para conocer la calidad del EUT y AC se realizaron determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas en el laboratorio de Tecnología Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Río Cuarto.

I.2. Implantación de las parcelas experimentales

I.2.1. Siembra y trasplante

Para evaluar el efecto del uso de efluentes urbanos tratados sobre el cultivo de brócoli se utilizaron tres cultivares de ciclo intermedio frecuentemente empleados en el cinturón verde local: Matsuri F1 de la empresa Tokita Seed cuyo ciclo medio de cultivo es de 95 días (C1); Green Pia F1 de la empresa Nongwoobio Seed con un ciclo de 90 días (C2) y Almanor F1 de la empresa Rijk Zwaan de 100 días (C3).

El estudio se desarrolló mediante dos experimentos realizados en años sucesivos (2016 y 2017). La siembra de los cultivares se realizó el 28/03/2016 y el 18/03/2017 en bandejas de germinación de poliestireno de 200 celdas ($13 \text{ cm}^3 \text{ celda}^{-1}$). Inmediatamente luego de sembradas, se introdujeron las bandejas en una cámara de germinación situada en

el laboratorio de semillas de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, U.N.R.C., permaneciendo en la misma durante 48 hs a 20 °C con el objetivo de lograr condiciones ambientales uniformes en la etapa de germinación. El sustrato utilizado fue turba *Sphagnum* enriquecida con aditivos marca Kekkilä.

Posteriormente, las bandejas se trasladaron a un invernadero de policarbonato con condiciones ambientales controladas ubicado en el Campo de Docencia y Experimentación, UNRC para la etapa de crecimiento de los plantines.

El trasplante a las parcelas experimentales se realizó el 17/05/2016 y el 9/05/2017, a una densidad de 4 plantas m⁻², y en un marco de plantación de 0,50 m entre hileras y 0,50 m entre plantas. Previo a la plantación se realizó un análisis de suelo, tomando muestras compuestas hasta una profundidad de 0,20 m, determinando: materia orgánica (%), nitrógeno de nitrato, nitrato, fósforo, potasio (ppm), concentración de hidrogeniones (pH) y conductividad eléctrica (dS m⁻¹) (Tabla I.8).

Tabla I.8. Contenido de Materia Orgánica (MO), Nitrógeno de Nitratos (N-NO₃⁻), Nitratos (NO₃⁻), Fósforo (P), Potasio (K), pH y Conductividad Eléctrica (CE) de 0 a 20 cm de profundidad.

Experimento (años)	MO (%)	N-NO ₃ ⁻ (ppm)	NO ₃ ⁻ (ppm)	P (ppm)	K (ppm)	pH	CE (dSm ⁻¹)
2016	2,23	24,4	108,3	37,4	785,9	7,09	0,25
2017	2,01	15,5	68,8	44,4	692,1	6,79	0,17

I.2.2. Diseño de la experimentación

Los tratamientos planteados resultaron de la combinación factorial de tres cultivares de brócoli: Matsuri (C1), Green Pia (C2) y Almanor (C3); y dos calidades de agua para riego: Efluentes Urbanos Tratados (EUT) y Agua de Acuífero (AC), en un total de seis tratamientos:

1. Cultivar Matsuri regado con Efluentes Urbanos Tratados (C1 - EUT)
2. Cultivar Green Pia regado con Efluentes Urbanos Tratados (C2 - EUT)
3. Cultivar Almanor regado con Efluentes Urbanos Tratados (C3 - EUT)
4. Cultivar Matsuri regado con Agua de Acuífero (C1- AC)
5. Cultivar Green Pia regado con Agua de Acuífero (C2 - AC)
6. Cultivar Almanor regado con Agua de Acuífero (C3 - AC)

El diseño experimental se realizó en parcelas divididas. La superficie total del área experimental fue de 135 m², dividida en 2 parcelas principales de 67,5 m² cada una correspondiente a la calidad de agua (EUT y AC), a su vez cada parcela principal se dividió en 3 subparcelas de 4,5 m² cada una correspondiente a los cultivares de brócoli (C1, C2 y C3), y de éstas se realizaron 5 repeticiones. En cada subparcela se trasplantó un total de 18 plantas de cada cultivar de brócoli. A través de una estación meteorológica automática Licor modelo Li1200S situada en cercanías al sitio experimental se registró temperatura del aire y precipitaciones durante el ciclo de los cultivares.

I.2.2. Labores culturales

Durante el ciclo de crecimiento del cultivo en los dos experimentos (2016 y 2017) se realizaron controles manuales de malezas, no habiendo sido necesarias aplicaciones fitosanitarias, ya que los umbrales de plagas y enfermedades que se presentaron no justificaron su control.

I.2.3. Cosecha

La cosecha de los cultivares se realizó cuando las pellas de brócoli alcanzaron la madurez de consumo (Cantwell y Suslow, 1997), este momento se definió cuando las mismas presentaron un color verde uniforme, compactas y sin apertura de las estructuras florales.

I.2.3.1. Partición de asimilados en hoja, tallo y pellas

Para evaluar la partición de asimilados, se tomaron 30 plantas de cada tratamiento al momento de la cosecha y se colocaron en bolsas de polietileno previamente identificadas. En laboratorio las plantas se diseccionaron en sus distintos órganos: hojas, tallo y pella, y se determinó el peso de masa fresca y seca. Para ésta última, las muestras se llevaron a estufa a 65 °C hasta lograr peso constante. Para el pesaje se empleó una balanza marca Mettler BB240. La partición de asimilados se expresó en g MS acumulada en hojas, tallo y pella, con relación al total de la planta.

I.2.3.2. Determinación de la calidad, rendimiento y precocidad

Para determinar la calidad de las pellas se midió el diámetro (mm) en tres posiciones diferentes para la obtención de un valor medio del mismo, se determinó el peso fresco individual de las pellas (g), se midió el diámetro de pedúnculo (mm) de cada inflorescencia, se determinó la presencia de hollow stem (pedúnculo hueco), y se calculó el rendimiento total (Mg ha^{-1}). Posteriormente se determinó la precocidad de los cultivares evaluando la duración total del ciclo y el período de recolección de los mismos.

I.2.3.3. Determinación de la calidad sanitaria

Para establecer la presencia de organismos perjudiciales para la salud durante los dos años de experimento, se evaluó la calidad sanitaria de las pellas mediante análisis microbiológicos y parasitológicos al momento de la cosecha de las pellas. Para ello, se tomaron 5 muestras de todos los tratamientos, se colocaron en bolsas de polietileno identificadas y se enviaron a laboratorio para los análisis correspondientes.

Se procedió a cuantificar la presencia de Coliformes totales, Coliformes fecales y *Escherichia coli* utilizando el método ISO 16649-2:2001 (modificado). Para la determinación de *Salmonella* sp se empleó el método ISO 6579:2002. Los estudios microbiológicos fueron realizados en el laboratorio bromatológico “Dr. Guillermo Montes” del Mercado de Abasto de la ciudad de Río Cuarto.

Para la cuantificación de parásitos perjudiciales se evaluó la presencia de larvas y estructuras parasitarias mediante la técnica de Mwegoha y Jorgensen (1977) y la presencia de céstodos, nemátodos y ooquistes mediante la técnica de Teuscher (1965). Las determinaciones fueron realizadas en el laboratorio de Parasitología, Departamento de Parasitología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

I.3. Análisis estadísticos

Todos los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa Infostat (Di Rienzo, 2011), aplicando análisis de varianza, comprobando que los datos cumplieran los principios de normalidad y homogeneidad de varianza, y comparación de medias con el test de Fisher ($p \leq 0,05$).

I. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.1. Riego con Efluentes Urbanos Tratados y Agua de Acuífero

I.1.1 Lámina de riego

En la Figura I.4 se muestra para cada experimento la dinámica de la lámina de agua en el suelo a distintas profundidades desde el trasplante hasta la cosecha de los cultivares.

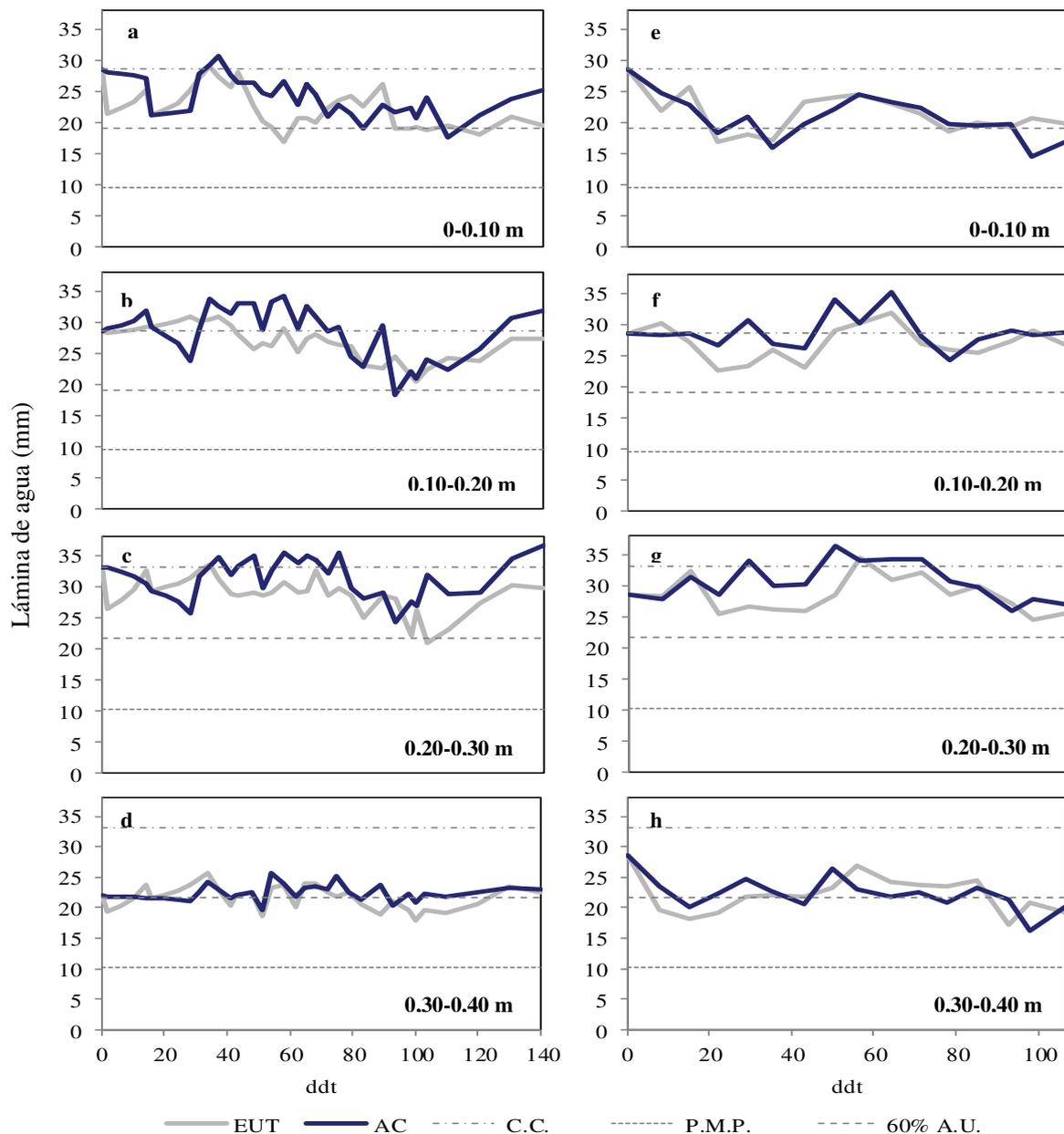


Figura I.4. Dinámica de la lámina de agua (mm) de 0-0,40 m de profundidad para EUT y AC durante el ciclo de los cultivares en las temporadas 2016 (a-d) y 2017 (e-h).

En los sistemas de riego de alta frecuencia es posible regar con valores cercanos a capacidad de campo para mantener al cultivo con un buen suministro hídrico (INTA, 2010). En este sentido, el contenido hídrico del suelo se mantuvo en valores cercanos a la capacidad de campo y por encima del valor umbral de agotamiento, principalmente entre los 0,20 a 0,40 m, donde se situaron las tuberías de goteo subterráneas los niveles de humedad fueron más elevados, y es allí donde se concentra la mayor proporción de raíces del cultivo (Krarup, 1992; Maroto, 1995).

Mientras que en la porción más superficial del suelo (0-0,10 m), fue dificultoso mantener niveles de humedad elevados, en coincidencia con lo descrito por Lucas y Alarcón (2018), lo cual significó que fuera necesario recurrir a un riego superficial (manteniendo en cada caso la procedencia del agua de riego asignada a cada unidad experimental) sólo al momento del trasplante para facilitar la implantación del cultivo.

El brócoli es un cultivo de altos requerimientos hídricos (Risco *et al.*, 2018), el correcto manejo del agua constituye uno de los principales factores para lograr una adecuada producción, su mayor demanda hídrica se manifiesta durante la fase de formación de la pella (Jaramillo y Díaz, 2006; Murcia y Arayón, 2016).

En el 2016 la lámina de riego total aplicada fue de 340 mm, distribuida en 42 riegos y con un tiempo promedio de 2 horas riego⁻¹. La lámina promedio de reposición fue de 4 mm hora⁻¹, siendo la misma para EUT y AC durante todo el ciclo del brócoli. Las precipitaciones aportaron 108 mm, por lo tanto, la lámina total de agua entregada al cultivo fue de 448 mm (Figura I.5).

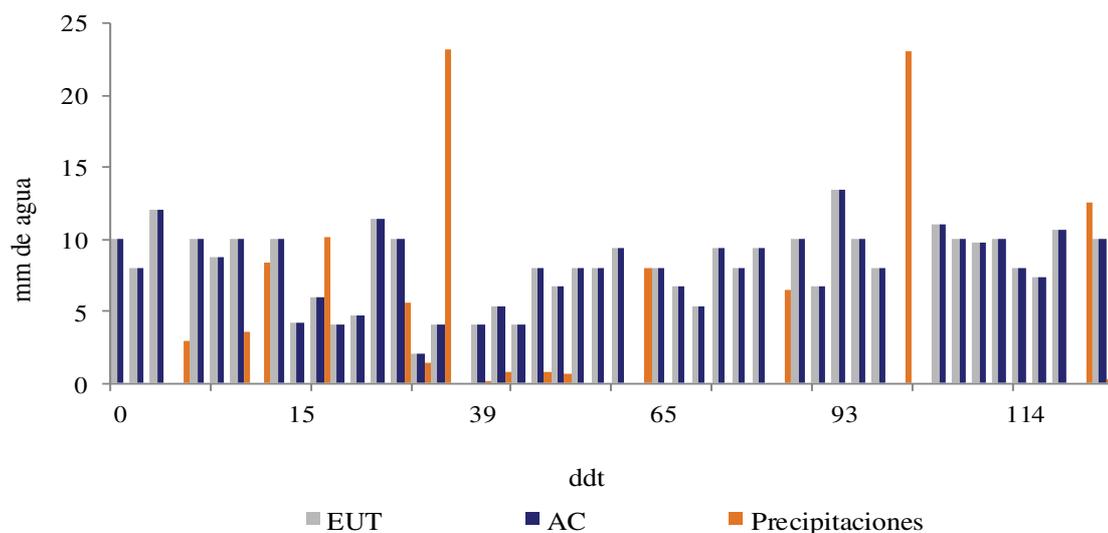


Figura I.5. Lámina de agua aplicada (mm) mediante riego por goteo subterráneo con EUT y AC, y precipitaciones durante el ciclo de los cultivares (año 2016).

En el año 2017 los cultivares fueron más precoces reduciéndose sus necesidades hídricas, por lo cual la lámina de riego aplicada fue de 292 mm, distribuida en 28 riegos, con un tiempo promedio de 2,5 horas riego⁻¹, y una lámina de reposición de 4 mm hora⁻¹. Las precipitaciones aportaron 114 mm, determinando una lámina total de 406 mm (Figura I.6).

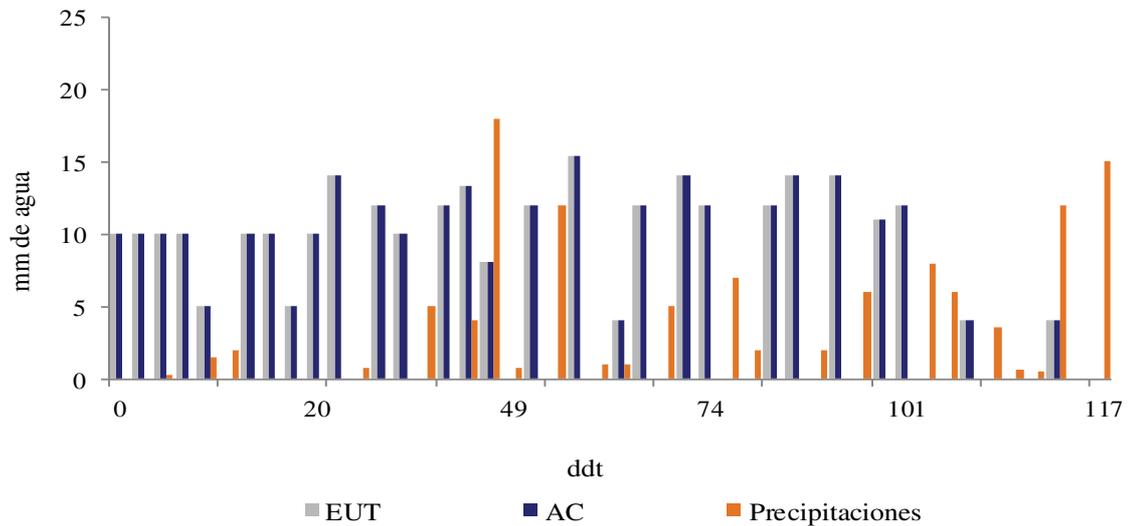


Figura I.6. Lámina de agua aplicada (mm) mediante riego por goteo subterráneo con EUT y AC, y precipitaciones durante el ciclo de los cultivares (año 2017).

La lámina de riego aplicada se encuentra dentro del rango recomendado para brócoli (De Chaves, 2016). No obstante, la cantidad de agua necesaria a suministrar al cultivo siempre deberá ajustarse a cada situación en particular, principalmente en función de las condiciones edafoclimáticas, cultivares y sistema de riego empleado (Risco *et al.*, 2018). Estos factores permiten explicar las diferencias encontradas entre diferentes investigadores.

Así, por ejemplo, Johnson *et al.* (2016) en Estados Unidos calcularon un promedio de 600 mm de agua aplicada; Erie *et al.* (1981) informaron para Arizona (EEUU) unos 500 mm. En España, López Urrea *et al.* (2009) determinaron un consumo de 345 mm para un rendimiento de 12 Mg ha⁻¹, mientras que Imtiyaz *et al.* (2000) usaron 323 mm para lograr 19,1 Mg ha⁻¹ en Botswana (África).

El seguimiento constante de la condición hídrica del suelo, y los ajustes en la entrega de agua durante el ciclo del cultivo, constituye la herramienta más precisa para lograr un crecimiento y desarrollo sin restricción hídrica, sumado a una condición

nutricional y edafoclimática óptima, se podrá alcanzar rendimientos próximos al potencial de esta especie hortícola.

I.1.2. Calidad fisicoquímica del Efluente Urbano Tratado y Agua de Acuífero

I.1.2.1. Efluente Urbano Tratado

A partir de la caracterización de la calidad fisicoquímica del EUT, fue posible identificar si la práctica de utilización en el riego de brócoli se efectuó conforme a las directrices internacionales (OMS, 2006) y las directrices locales (Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos, 2016). En la Tabla I.9 se muestran los resultados obtenidos de dichas determinaciones.

Tabla I.9. Valores medios de las determinaciones fisicoquímicas del EUT utilizado en el riego de brócoli durante los años 2016 y 2017

Determinación	Unidad	Valor	Determinación	Unidad	Valor
Sólidos sedimentables (120´)	mg L ⁻¹	0,80	Litio	mg L ⁻¹	nd†
Sólidos totales	mg L ⁻¹	842,0	Boro	mg L ⁻¹	0,14
Sólidos totales fijos	mg L ⁻¹	298,0	Cromo	mg L ⁻¹	0,04
Sólidos totales volátiles	mg L ⁻¹	544,0	Magnesio	mg L ⁻¹	11,6
Sólidos disueltos totales	mg L ⁻¹	590,0	Manganeso	mg L ⁻¹	0,08
Sólidos disueltos fijos	mg L ⁻¹	380,0	Níquel	mg L ⁻¹	nd†
Sólidos disueltos volátiles	mg L ⁻¹	210,0	Potasio	mg L ⁻¹	12,0
Sólidos suspendidos totales	mg L ⁻¹	252,0	Plomo	mg L ⁻¹	nd†
pH	UpH	7,82	Selenio	mg L ⁻¹	nd†
Conductividad eléctrica (C.E.)	dS m ⁻¹	1,13	Sodio	mg L ⁻¹	158,0
Turbiedad	FAU	263,5	Aluminio	mg L ⁻¹	0,99
Nitrógeno total	mg L ⁻¹	72,4	Arsénico	mg L ⁻¹	0,017
Cloruros	mg L ⁻¹	138,0	Cadmio	mg L ⁻¹	0,00014
Sulfatos	mg L ⁻¹	14,5	Calcio	mg L ⁻¹	50,0
Alcalinidad total	mg L ⁻¹	350,0	Zinc	mg L ⁻¹	0,11
Alcalinidad carbonatos	mg L ⁻¹	<1	Cobalto	mg L ⁻¹	nd†
R.A.S.		7,3	Cobre	mg L ⁻¹	nd†
Fósforo total	mg L ⁻¹	3,2	Demanda Quím. O ₂	mg L ⁻¹	177,0
Hierro	mg L ⁻¹	1,3	Demanda Biol. O ₂	mg L ⁻¹	112,6

Referencias: nd† (No detectable)

La calidad fisicoquímica de los EUT determinó su aptitud para su uso en riego, pero con restricciones ligeras a moderadas, debido principalmente a la presencia de sodio, su contenido en sales y su relación de adsorción de sodio (R.A.S.) (Tchobanoglous y Burton, 1991; García Alvaro, 2012). Cuando el agua de riego presenta una elevada concentración de sodio puede ocasionar a mediano o largo plazo, deterioros en la estructura del suelo y reducción de la permeabilidad (Azpilcueta Pérez *et al.*, 2017).

En este estudio, tanto en el primero como en el segundo experimento, no se observaron dificultades en la infiltración y movimiento de agua en el suelo, que puedan indicar algún tipo de alteración en la estructura del mismo. No obstante, de acuerdo a los niveles de sales y sodio, es necesario realizar mediciones continuas de las propiedades fisicoquímicas del suelo ante un uso prolongado de este EUT, para evitar riesgos de salinización e infiltración.

Algunos autores aconsejan alternar el uso de EUT con otras fuentes de agua para evitar problemas a largo plazo (Vergine *et al.*, 2017), en este estudio al emplearse en riego de cultivos a campo y considerando un régimen pluviométrico de 801 mm en la región (ADESUR, 1999), esto contribuiría a reducir en cierta medida potenciales inconvenientes.

Debido al origen urbano de los efluentes, la presencia de metales pesados como cadmio, plomo y cromo no fueron significativos, ya que estos se relacionan generalmente a aguas provenientes de sectores industriales y minería (Rosas Rodríguez, 2001; Gómez Álvarez *et al.*, 2004). La utilización de aguas residuales industriales tratadas en riego rara vez se adopta, debido al peligro potencial de compuestos no biodegradables que pueden estar presentes, generando perjuicios medioambientales (Vergine *et al.*, 2017).

Otros elementos potencialmente tóxicos en exceso como cobalto, cobre, níquel y hierro no superaron los umbrales máximos permitidos, la presencia de bicarbonatos fue inferior a 90 mg L^{-1} , lo cual determinó que el EUT pueda utilizarse sin riesgos de acumulación de dichos compuestos (Kretschmer *et al.*, 2002).

Por otra parte, un elemento que presentó niveles elevados en el EUT fue el nitrógeno, que con un valor de $72,4 \text{ mg L}^{-1}$, superando los niveles permitidos según las directrices locales (Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos, 2016).

El exceso de nitrógeno es riesgoso principalmente si los EUT se vierten en ecosistemas acuáticos, donde provocan aumento de la acidez, eutrofización e incluso toxicidad (Calvachi y Ortiz, 2013). Si se utiliza para el riego de cultivos, su acumulación en el suelo dependerá de la extracción que realicen las plantas. Para resolver este problema

podría plantearse un proceso de tratamiento terciario del agua residual, para eliminar contaminantes específicos como el nitrógeno (Rojas, 2002; FAO, 2013).

I.1.2.2. Agua de Acuífero

En la Tabla I.10 se muestran los resultados obtenidos de las determinaciones fisicoquímicas realizadas sobre el Agua de Acuífero (AC) que se utilizó como fuente de agua para riego en las parcelas experimentales.

Tabla I.10. Determinaciones fisicoquímicas del AC utilizada en el riego de brócoli.

Determinación	Unidad	Valor	Determinación	Unidad	Valor
Nitrógeno	mg L ⁻¹	nd†	Sodio	mg L ⁻¹	29,0
Fósforo	mg L ⁻¹	nd†	Cloruros	mg L ⁻¹	14,1
Potasio	mg L ⁻¹	4,3	Sulfatos	mg L ⁻¹	20,7
Calcio	mg L ⁻¹	28,4	Carbonatos	mg L ⁻¹	nd†
Magnesio	mg L ⁻¹	9,1	Bicarbonatos	mg L ⁻¹	207,4
Conductividad Eléctrica (C.E.)	dS m ⁻¹	0,4	pH	UpH	7,4
R.A.S.		1,2			

Referencias: nd† (No detectado)

En función de estos resultados, se puede considerar a este tipo de agua como muy adecuada para el riego, ya que los valores de R.A.S., C.E. y pH como índice de acidificación, se encuentran dentro de límites normales, además los niveles de cloruros no presentarían problemas de toxicidad específicos para los cultivos (Follet y Soltanpour, 1989). Las características fisicoquímicas del AC indicaron su posibilidad de uso como agua para riego sin inconvenientes, clasificándola en forma general, como de buena calidad (Hershey, 1993).

I.1.2.3. Aporte de macronutrientes del Efluente Urbano Tratado y Agua de Acuífero

De acuerdo a la lámina total de riego aplicada y las características analíticas de los EUT y AC, se realizó un cálculo del aporte de macronutrientes (Nitrógeno, Fósforo y Potasio) que recibieron los cultivares de brócoli. Los EUT aportaron una importante

cantidad de N, y en menor medida de P y K, mientras que los cultivares regados con AC, sólo recibieron un aporte significativo de K, ya que no se determinó la presencia de N y P en este tipo de agua.

Por otra parte, al comparar los experimentos, en el año 2017 al ser los cultivares más precoces y reducirse las necesidades de riego, el aporte de macronutrientes fue inferior al año 2016. En la Tabla I.11 se muestra las cantidades de N, P y K aportadas con el riego con EUT y AC durante el ciclo de los cultivares.

Tabla I.11. Aporte de N, P y K durante el ciclo de los cultivares de brócoli.

Experimento (años)	EUT			AC		
	N	P	K	N	P	K
	kg ha ⁻¹			kg ha ⁻¹		
2016	246,1	10,9	40,8	ns†	ns†	66,6
2017	211,4	9,3	35,0	ns†	ns†	57,2

Referencias: ns† (No significativo)

I.1.2.3.1. Nitrógeno

Como se mencionó anteriormente, el aporte de nitrógeno que se realizó con el EUT fue el más importante en relación a los macronutrientes, dado por la alta concentración de este elemento. El nitrógeno (N) es esencial en la nutrición de las plantas, en brócoli su deficiencia puede provocar una marcada disminución del crecimiento, las hojas resultan pequeñas y de color verde pálido, algunas se tornan púrpuras y el rendimiento disminuye (Pomares *et al.*, 2007a). En cambio, el exceso de N puede retardar la maduración del cultivo, la formación de las pellas, y un menor desarrollo radicular. Además, provocar el ahuecado del pedúnculo de la inflorescencia (Tamayo Veléz, 2006).

Las demandas de N en brócoli pueden ser muy variables según el cultivar, condición de suelo, clima y técnicas de cultivo (Jaramillo y Díaz, 2006; Pomares *et al.*, 2007a). Algunos autores plantean para alcanzar el máximo potencial de rendimiento por hectárea un requerimiento de 540 kg de N (Magnífico *et al.*, 1979); 400 kg de N (Greenwood *et al.*, 1980, Castellanos *et al.*, 2000); 270 kg de N (Letey *et al.*, 1983); 224 kg de N (Hipp, 1974); y hasta 200 kg de N (Pascual Antón, 1994; Maroto *et al.*, 1995).

Considerando estos antecedentes, podría afirmarse que mediante el uso de los EUT fueron aportadas cantidades suficientes de N, y posiblemente estos niveles serían

adecuados para alcanzar altos rendimientos, sin necesidad de aplicar otras fuentes nitrogenadas.

Una ventaja del uso de EUT en riego por goteo fue que el suministro de N se realizó a manera de fertirrigación durante todo el ciclo del cultivo, y no en un momento en particular. Sin embargo, una gran desventaja fue la imposibilidad de ajustar las dosis necesarias según la demanda del cultivo para cada etapa fenológica.

I.1.2.3.2. Fósforo

Los niveles que aportaron los EUT en ambos experimentos serían muy bajos para cumplir con los requerimientos del cultivo, y en virtud de que las mediciones de P en el suelo de la parcela experimental arrojaron valores elevados, 93,4 kg ha⁻¹ de P (2016) y 111,0 kg ha⁻¹ de P (2017), esto indicaría que el suelo fue la principal fuente de P que suplió la demanda del brócoli, no así lo aplicado con el EUT.

Sin embargo, el P que se encuentran bajo la forma de compuestos solubles en estas aguas, permitirían una mejor asimilación por parte de las plantas, ya que son aportados con la misma frecuencia que el riego durante el cultivo (Moscoso, 1995).

La demanda de fósforo (P) del brócoli es bastante más baja que la de nitrógeno, y al igual que este elemento puede ser muy variable, oscilando por hectárea desde 15 kg de P (Jaramillo y Díaz, 2006); 24 kg de P (Lardizábal y Theodoracopoulos, 2008), que se corresponden en gran medida con los 23 kg planteados por Magnífico *et al.*, (1979); 28,7 kg de P (Rincón *et al.*, 1999), 34 kg de P (Tamayo Veléz, 2006) y hasta 50 kg de P (Pascual Antón, 1994).

A diferencia del nitrógeno, el fósforo es un elemento poco móvil en el suelo, por tal motivo es conveniente la aplicación de fuentes fosforadas en cercanías de las raíces del cultivo (Pomares *et al.*, 2007b), y en este sentido, la utilización de efluentes en riego por goteo subterráneo permitiría una mejor distribución de este elemento en la zona radicular, aumentando la posibilidad de absorción por parte de las raíces.

I.1.2.3.3. Potasio

Los aportes de K a través del EUT no han sido significativos, el contenido de este nutriente fue inferior al nitrógeno, los cultivares regados con AC recibieron una dosis superior de este elemento.

Es importante considerar, que el suelo de la parcela experimental también presentó niveles elevados de K, normal para los suelos de la región pampeana debido a su material de origen (Correndo *et al.*, 2012). Posiblemente los cultivares de brócoli alcanzaron a cubrir su demanda, teniendo en cuenta que la proporción de potasio requerida por el brócoli oscila de 84 kg ha⁻¹ (Tamayo Veléz, 2006) hasta valores de 160 a 230 kg ha⁻¹ (Rincón *et al.*, 1999).

El potasio (K), junto con el nitrógeno y el fósforo son los minerales más requeridos por las plantas superiores (Marschner, 1995). Para un adecuado crecimiento las plantas necesitan elevada disponibilidad de potasio, este nutriente interviene en la síntesis y traslocación de carbohidratos y proteínas, así como en la apertura y cierre de estomas. En virtud de su acción como regulador osmótico, aumenta la resistencia al frío y al déficit hídrico e induce a una mayor resistencia a plagas y enfermedades (Pomares *et al.*, 2007b).

I.2. Producción de brócoli

I.2.1. Partición de asimilados en hoja, tallo y pellas

Una evaluación directa del efecto de los tratamientos con EUT y AC lo proporcionó el crecimiento de los cultivares de brócoli. Los resultados determinaron que la MS total acumulada en cada cultivar aumentó cuando se regaron con EUT. No obstante, estas diferencias fueron sólo significativas para los cultivares C2 y C3, siendo este último aquel que presentó la mayor respuesta con incrementos de 11,5% (2016) y 13,6% (2017).

En todos los cultivares, el principal componente en la partición de MS fueron las hojas, seguido de la pella y el tallo. En el cultivar C1 las diferencias fueron ligeramente superiores en favor del riego con EUT, pero no hubo significancia estadística, las plantas presentaron un desarrollo foliar y tamaño de pella similares entre ambas calidades de agua (Tabla I.12).

El aporte de nutrientes de los EUT contribuyó a una mayor producción de MS en los cultivares de brócoli, a diferencia de las plantas regadas con AC. García Peña (2004) en riego con aguas residuales obtuvieron plantas de brócoli de alto vigor, un mayor tamaño y apariencia, como consecuencia del alto contenido de materia orgánica y nutrientes en estas aguas.

Tabla I.12. Efecto del riego con EUT y AC sobre la materia seca acumulada en hojas, tallo y pella (g MS planta⁻¹) al momento de la cosecha de brócoli

Exp.	CV	Calidad de agua	Hojas	Tallo	Pella	Total
			(g MS planta ⁻¹)			
2016	C1	EUT	64,1 a	20,2 a	31,5 a	115,8 a
		AC	65,1 a	18,1 a	29,3 a	112,5 a
	C2	EUT	80,0 a	21,9 a	42,4 a	144,5 a
		AC	78,7 a	22,1 a	32,7 b	133,5 b
	C3	EUT	98,6 a	30,5 a	38,2 a	167,3 a
		AC	89,9 a	27,2 b	32,9 b	150,0 b
2017	C1	EUT	31,3 a	12,3 a	21,7 a	65,4 a
		AC	30,2 a	11,6 a	21,3 a	63,2 a
	C2	EUT	34,0 a	15,6 a	17,1 a	66,8 a
		AC	30,4 b	12,6 b	16,0 a	59,0 b
	C3	EUT	48,4 a	20,3 a	36,9 a	105,6 a
		AC	43,3 b	17,5 b	32,0 b	92,9 b

Diferentes letras en columnas de un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Resultados similares se obtuvieron en plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) regadas con agua residual doméstica tratada (Cruz Gómez, 2012), y en experiencias sobre otros cultivos, se reportan incrementos de 19% en la producción de MS en alfalfa (Plevich *et al.*, 2012); y hasta un 30% más de MS en plantaciones de *Eucaliptus grandis* (INTA, 2018).

La mayor producción en los cultivos regados con EUT se atribuye a los nutrientes que se encuentran bajo formas solubles en estas aguas, los cuales son asimilados más fácilmente por las plantas y aportados con la misma frecuencia que el riego durante el cultivo (Moscoso, 1995).

I.2.2. Calidad de pellas, rendimiento y precocidad de los cultivares

I.2.2.1. Diámetro de pella

La respuesta de esta variable al riego con EUT fue positiva, lográndose diámetros de pella grandes, con valores que oscilaron entre 141 y 185 mm en el año 2016, y

diámetros de medianos a grandes, entre 115 y 155 mm en el año 2017, donde los cultivares fueron más precoces.

En términos generales, diámetros de pella mayores a 160 mm se consideran grandes, de 120 a 160 mm se consideran medianas, y menores de 120 mm pequeñas (Cifuentes Ochoa, 2014). Otros autores consideran un diámetro de pella grande a aquellas que superan los 200 mm, y medianas de 100 a 200 mm (Sinaluisa, 2011). El diámetro de las pellas en brócoli puede variar según los cultivares, época del año y densidad de plantación, entre otros factores (Di Benedetto, 2005; Jaramillo y Díaz, 2006).

Las diferencias encontradas entre las plantas regadas con EUT y AC fueron de mayor magnitud en el año 2016, siendo significativas en el cultivar C2 y C3, con incrementos de 18,6 y 5,9 mm, respectivamente. En el año 2017 las plantas regadas con EUT sólo mostraron diferencias en el cultivar C3, mientras que el cultivar C2 presentó valores inferiores a las regadas con AC, lo cual denotó una mayor variabilidad entre las dos temporadas de estudio (Figura I.7).

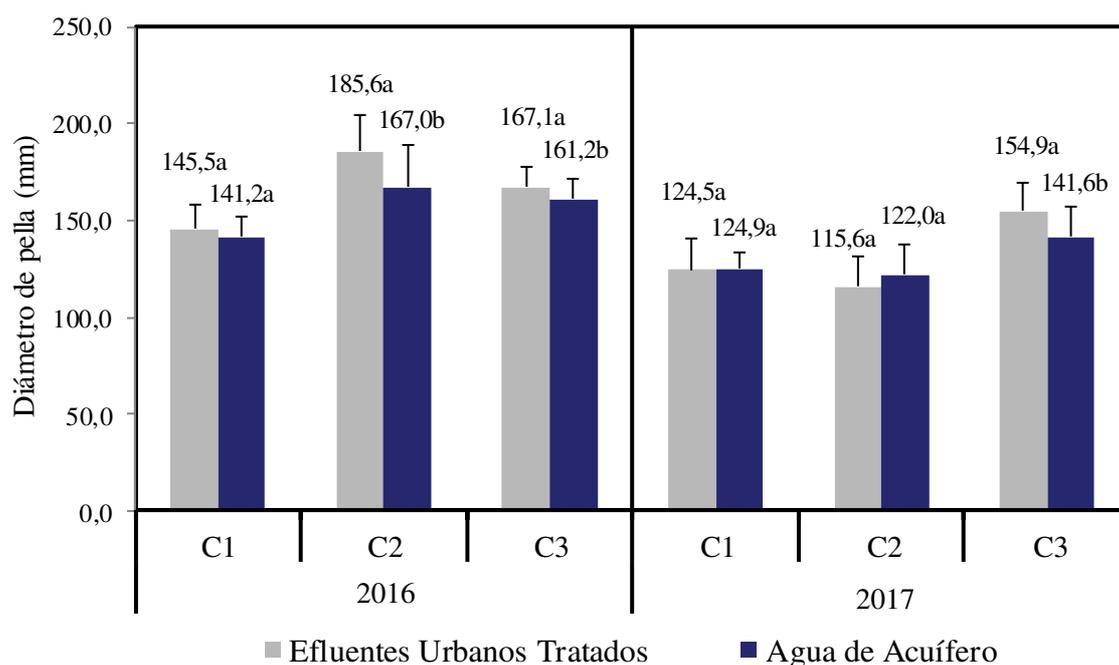


Figura I.7. Diámetro de pella (mm) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor). Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Los resultados coinciden con otros antecedentes del uso de EUT que demostraron el efecto positivo sobre el diámetro de pella en brócoli. Agote (2013), obtuvo valores promedios de 148,3 mm de diámetro en cultivares de brócoli regados con EUT y utilizando

mulching plástico como cobertura de suelo. García Peña (2004) en un estudio desarrollado en México, en riego de brócoli con agua residual y agua subterránea, obtuvo diferencias estadísticas en diámetros de 176,9 mm y 154,5 mm, respectivamente.

Puenayan *et al.* (2010) comprobaron que el diámetro de la pella aumentaba significativamente ante el aporte de nitrógeno en una solución nutritiva para riego. De acuerdo a estos resultados, es posible inferir que el elevado contenido de este elemento en los EUT contribuyó para lograr un mejor tamaño de las pellas.

Según Petracek y Sams (1987) otro nutriente que influye significativamente en el desarrollo del diámetro de pellas de brócoli es el Boro (B), y en este sentido, los autores evaluaron la aplicación de soluciones nutritivas de B a distintas concentraciones (0,08; 0,41; 0,61; 0,81; 4,06 y 8,11 ppm), si bien a medida que incrementaron la concentración de B se generaron síntomas de toxicidad en las hojas, el diámetro de las pellas aumentó. La concentración de B en el EUT fue de 0,14 mg L⁻¹, este aporte adicional pudo haber contribuido a aumentar el tamaño de las pellas, teniendo en cuenta que el AC no presentaba dicho elemento.

I.2.2.2. Diámetro de pedúnculo y presencia de hollow stem

En relación al diámetro de pedúnculo, se observó un aumento manifiesto en el diámetro del mismo que efectivamente estuvo correlacionado con el aumento en el diámetro de la pella en respuesta al riego con EUT. Sin embargo, las diferencias estadísticas con el tratamiento AC fue determinado solamente en el año 2016 (Figura I.8).

El nitrógeno contenido en los EUT pudo haber contribuido a lograr un mayor diámetro en el pedúnculo de las pellas. Kahn *et al.* (1991) determinaron que a tasas muy bajas de incorporación de nitrógeno como fertilizante se incrementa el diámetro del pedúnculo de la pella, a dosis de 37 kg ha⁻¹ de N obtuvieron diámetros de 29 mm.

En brócoli, el diámetro del pedúnculo de la pella está relacionado directamente con el diámetro de la pella, y es importante considerarlo ya que forma parte del órgano de consumo (De Chaves, 2016). Esta afirmación no se correspondió con lo observado en el C1 (2016) y C3 (2017).

En experiencias con riego con EUT, Gómez (2013) obtuvo valores de 27,5 mm de diámetro de pedúnculo en brócoli cv. Federer regado con EUT, pero sin lograr diferencias estadísticas significativas respecto a un testigo con agua de perforación. Sin embargo, Alonso (2015) logró resultados positivos en el diámetro del pedúnculo con valores

promedios de 29,6 mm en cultivares regados con EUT y utilizando cobertura de mulching plástico.

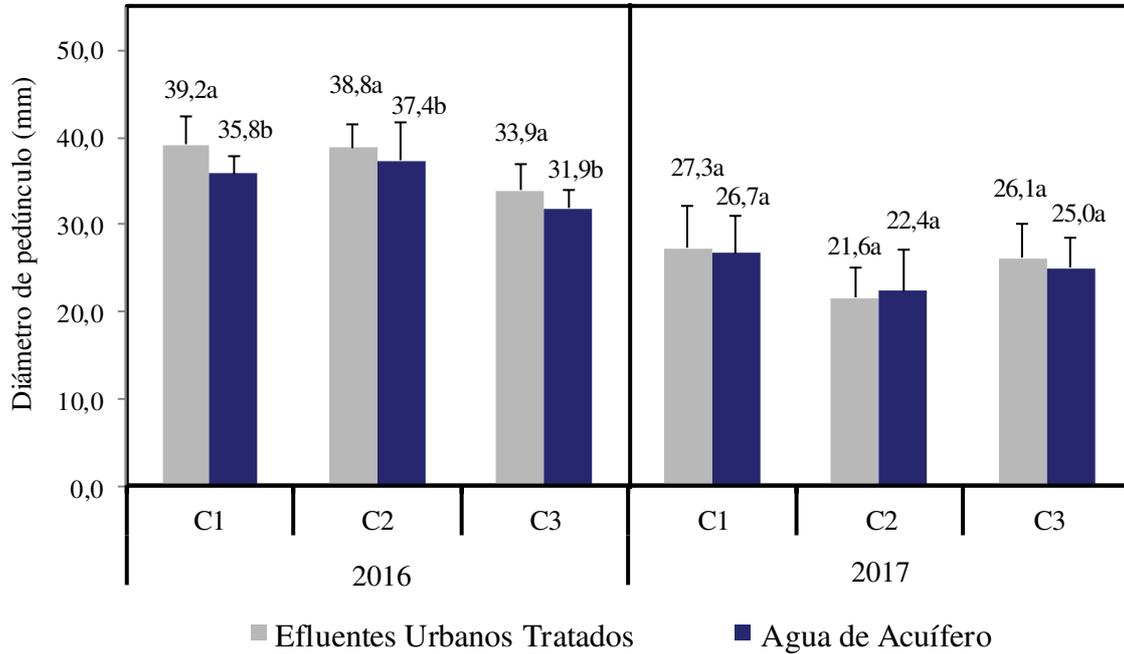


Figura I.8. Diámetro de pedúnculo (mm) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor). Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Otra variable analizada en el pedúnculo de la pella fue la presencia de hollow stem (pedúnculo hueco), un desorden fisiológico que puede ser causado por un exceso de nitrógeno (Tamayo Veléz, 2006; Carrillo Riofrio, 2011), como también por una deficiencia de boro (Uchida, 2000). Los resultados mostraron que solo se manifestó este desorden fisiológico en el año 2016 y en mayor medida en riego con EUT, los valores en porcentaje de presencia fueron de 13,3; 50,0 y 6,7 % para los cultivares C1, C2 y C3, respectivamente. Mientras que en riego con AC se presentó sólo en un 30 y 3,3% para los cultivares C2 y C3, respectivamente. El cultivar C1 no desarrolló hollow stem.

Posiblemente, el efecto del nitrógeno en exceso fue el causante de la aparición de este desorden fisiológico, considerando además que el aporte del EUT fue más significativo en 2016 en relación a 2017.

I.2.2.3. Peso individual de pella

En ambos experimentos el aumento del peso de las pellas fue notable en las plantas que se regaron EUT. Los cultivares C2 y C3 fueron los que presentaron un mayor incremento, siendo los valores porcentuales promedios de 9,5% (C1), 34% (C2) y 21% (C3) para el año 2016; y 5,5% (C1), 8% (C2) y 12% (C3) para el 2017, estos resultados afirman las aseveraciones que indican la importancia agronómica como fertilizante orgánico que presentan los efluentes tratados (González y Rubalcaba, 2011; D'andrea *et al.*, 2014), pudiendo utilizarse como un complemento estratégico de la fertilización química (Crespi *et al.*, 2009) (Figura I.9).

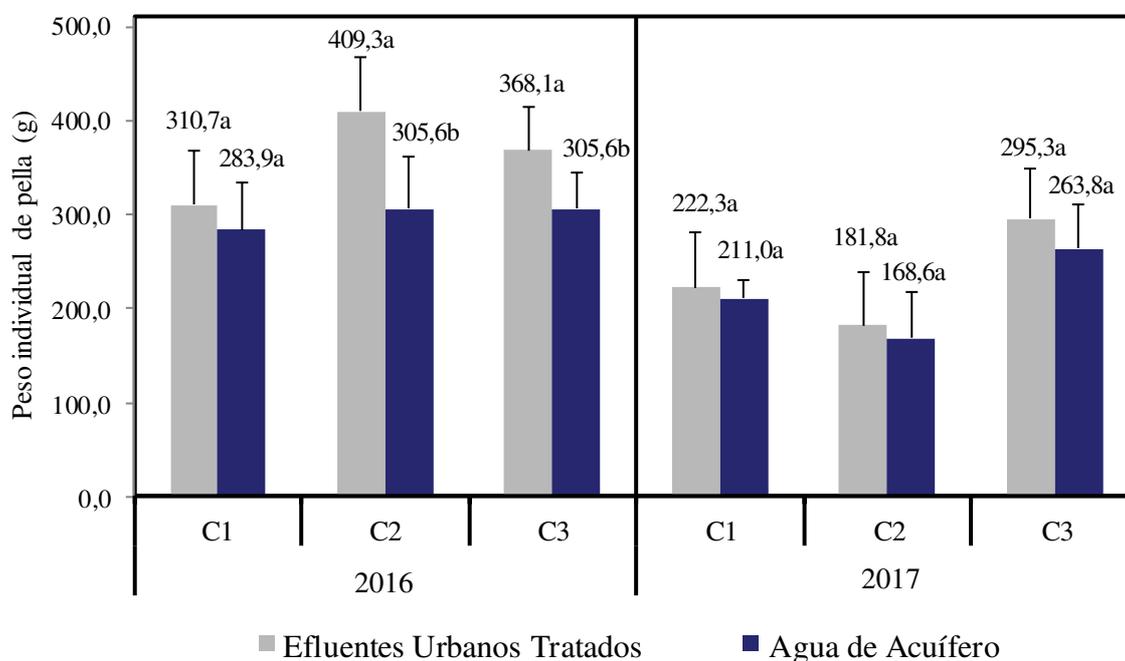


Figura I.9. Peso individual de pella (g) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor). Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Según su peso, las pellas pueden clasificarse en pequeñas, aquellas que presenten valores inferiores a 250 g, medianas entre 250 y 350 g, y grandes las que superen los 350 g (Cifuentes Ochoa, 2014). De acuerdo a ello, los resultados fueron promisorios, logrando obtener pellas de medianas a grandes. García Peña (2004) obtuvo pellas con un peso promedio superior de 587,7 g, mientras que Agote (2013) sólo alcanzó un valor máximo de 168 g, ambos utilizando aguas residuales.

Lamont (1992) obtuvo en brócoli un peso de pellas de 270 a 280 g, con un aporte de 94 kg ha⁻¹ de N, inferior al aplicado en este estudio, considerando que el aporte de N que se realizó con EUT fue de 246 (2016) y 211 kg ha⁻¹ (2017). Sin embargo, los resultados fueron similares a los obtenidos por Toivonen *et al.* (1994) quienes con una dosis de 250 kg N ha⁻¹ lograron pellas en un rango de 200 a 250 g.

Por su parte, Kahn *et al.* (1991) en ensayos de brócoli a dosis variables de fertilización nitrogenada obtuvieron diferentes pesos de pella, con aplicaciones de 112; 168; 224 y 280 kg ha⁻¹ de N, lograron valores de 162; 175; 176 y 177 g, respectivamente. Concluyendo que las dosis más altas de N no presentaron beneficios para lograr un aumento significativo en el peso de pellas.

La mayoría de las investigaciones existentes en brócoli indican principalmente el efecto de la fertilización nitrogenada sobre el tamaño de pellas, o bien la influencia del uso de aguas tratadas sobre el rendimiento por unidad de superficie, lo cual indicaría que ante una misma densidad de plantación, el incremento en rendimiento estaría explicado por el aumento en el tamaño de las pellas.

I.2.2.4. Rendimiento total en fresco

Como se explicó anteriormente, el uso de EUT influyó sobre el peso individual de las pellas, por lo tanto, y como era de esperar, ese efecto se correspondió con el rendimiento total fresco (Mg ha⁻¹) (Figura I.10).

Podría afirmarse que los rendimientos en fresco promedio alcanzados con el uso de EUT fueron aceptables. El cultivar C2 fue el que mejor respondió con un incremento de 4,2 Mg ha⁻¹, seguido del C3 con 2,5 Mg ha⁻¹ respecto al uso de AC (2016). Durante el 2017 las diferencias no tuvieron significancia.

Vergine *et al.* (2017) evaluando la utilización de distintas calidades de agua residual tratada a base de tratamientos primarios y secundarios en el riego de brócoli en Apulia (Italia), obtuvieron un rendimiento medio de 7,4 Mg ha⁻¹, resultados menores a los rendimientos medidos aquí.

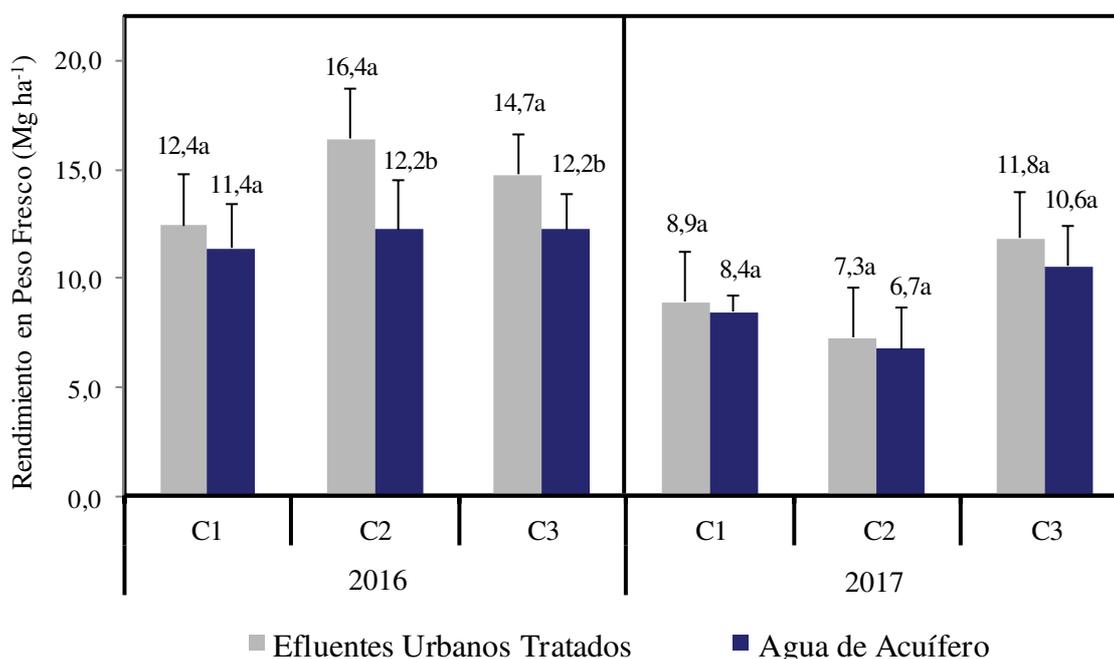


Figura I.10. Rendimiento total en fresco (Mg ha^{-1}) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor). Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

I.2.2.5. Rendimiento total en seco

El rendimiento en peso seco del brócoli sólo se torna importante cuando el destino de este producto es la industria del deshidratado para la fabricación de polvos o harinas (Maldonado y Delahaye, 2003). Aumentar el rendimiento en MS es fundamental para tener mayores rendimientos en harinas.

En tal sentido, el rendimiento en peso seco siguió la tendencia del rendimiento en fresco, el cultivar C1 fue el que menos respondió, sólo se incrementó en un 7% en 2016, incluso en 2017 fue ligeramente superior cuando se regó con AC. Los cultivares C2 y C3 presentaron un 32 y 14% más de rendimiento en seco (2016), y un 12 y 13% (2017), respectivamente (Figura I.11).

Si bien no es frecuente el consumo de brócoli como producto deshidratado, en comparación al consumo en fresco, algunos estudios destacan el valor del polvo de brócoli en la alimentación, principalmente como suplemento vitamínico en centros deportivos y dietéticos por su importante contenido en vitamina A y C, potasio, fibra, calcio y hierro y

por ser bajo en grasas, calorías y sodio. Se destina también a personas de mediana edad que desean mejorar su nutrición (García Viguera, 2016).

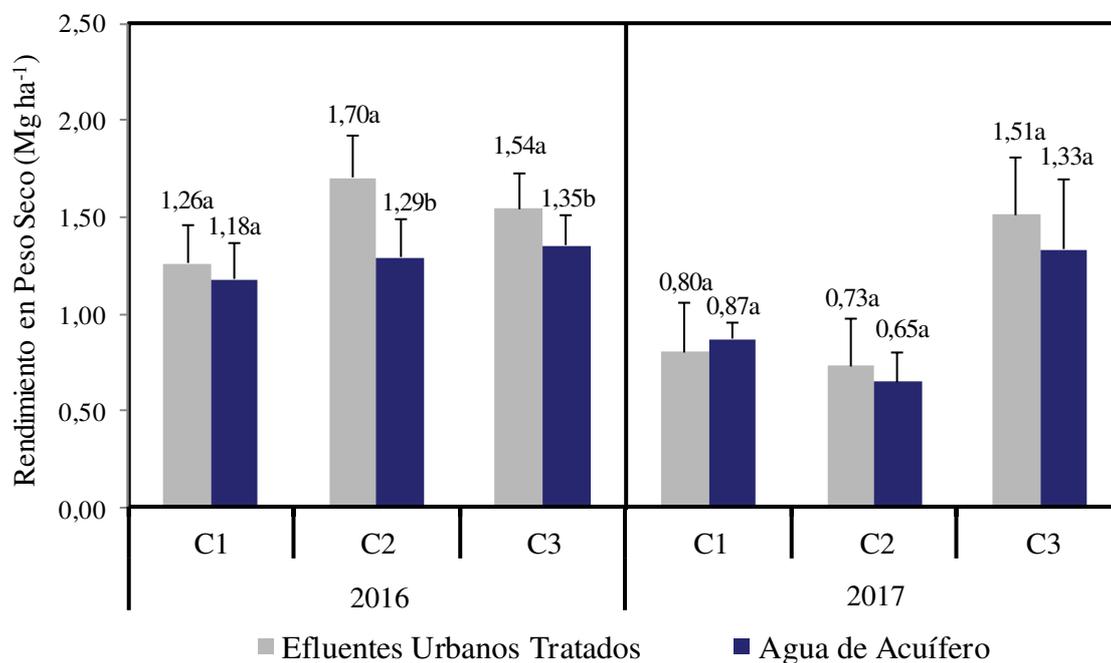


Figura I.11. Rendimiento total en seco (Mg ha^{-1}) en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor). Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

I.2.2.6. Precocidad

En la Figura I.12 se muestra para ambos experimentos la duración total del ciclo de cada cultivar y los días en cosecha para EUT y AC. A pesar de que existieron algunas diferencias en determinados cultivares respecto a la calidad de agua de riego, prácticamente no fueron de gran magnitud. Las diferencias más importantes se manifestaron entre cultivares para un mismo experimento y entre experimentos, el uso de EUT no tuvo efecto sobre la precocidad.

Los cultivares ensayados eran de ciclo intermedio, C1 (95 días); C2 (90 días) y C3 (100 días), en ambos experimentos se modificó la duración de los ciclos, el cultivar C1 fue el más precoz, seguido del cultivar C2 y por último el cultivar C3. Las diferencias que existieron para un mismo cultivar entre ambos experimentos se atribuyen a las condiciones ambientales de cada año de estudio.

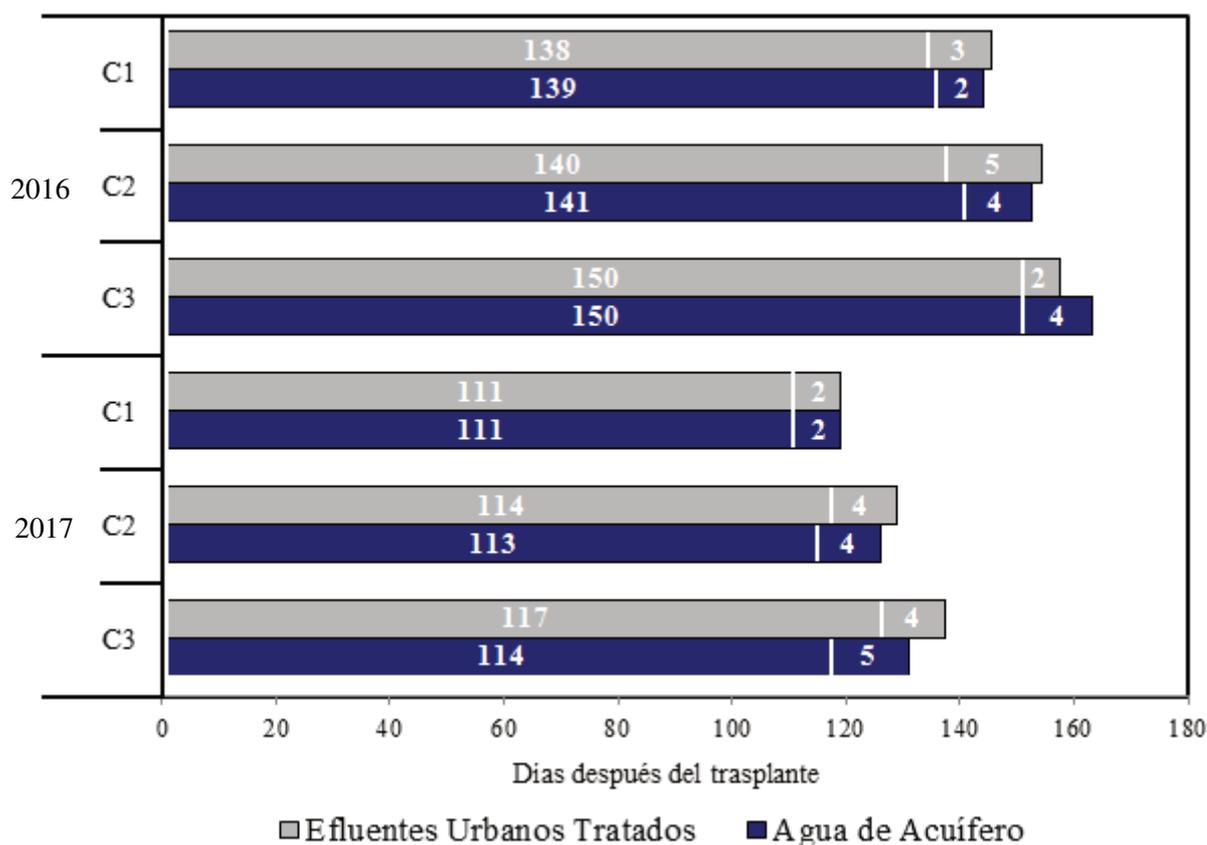


Figura I.12. Precocidad en días después del trasplante y días en cosecha en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego.

Principalmente, se produjeron temperaturas más bajas durante la etapa de crecimiento vegetativo en el primer experimento (2016) con heladas suaves, prolongando ésta etapa del cultivo, coincidiendo con Dixon (2007); mientras que en el segundo experimento (2017), durante la etapa vegetativa las temperaturas fueron más elevadas, y a pesar de haberse producido heladas fuertes con mínimas absolutas que alcanzaron los $-4,2$ °C, la tasa de progreso en la diferenciación de las pellas fue mayor, hubo un menor tamaño de plantas y un acortamiento en el tiempo de madurez en promedio de 25 a 30 días en relación a 2016. En la Tabla I.13 se presentan las temperaturas mínimas, medias y máximas para ambos experimentos en la etapa de crecimiento vegetativo y formación de la pella.

Tabla I.13. Temperaturas mínimas, media y máximas (°C) durante el ciclo de los cultivares (2016-2017)

Etapa	2016			2017		
	T° mín media	T° máx media	T° media	T° mín media	T° máx media	T° media
Crecimiento vegetativo	3,4	15,8	8,9	4,7	17,3	10,2
Formación de pella	6,4	23,2	14,3	5,6	21,0	12,6

En general, el manejo de los cultivos de *Brassicáceas* como el brócoli es notoriamente difícil cuando ocurren períodos alternados de altas y bajas temperaturas que aceleran o retrasan la madurez del cultivo (Dixon, 2007). A temperaturas por encima de 20 °C durante la formación de la pella, es necesario cosecharlo a tiempo para evitar la apertura de las yemas florales (Jaramillo y Díaz, 2006).

I.3. Calidad sanitaria del Efluente Urbano Tratado

Durante el proceso de tratamiento secundario de los efluentes urbanos en las lagunas facultativas, se fue reduciendo su carga microbiana. En la Tabla I.14 se presentan los datos microbiológicos como resultado de evaluaciones realizadas en diferentes etapas de dicho proceso hasta su disposición final en el riego de la parcela experimental.

Tabla I.14. Determinaciones microbiológicas del EUT utilizado como fuente de agua para riego.

Etapa de Tratamiento	Coliformes totales (NMP 100 mL ⁻¹)	Coliformes fecales (NMP 100 mL ⁻¹)
Cámara concentradora de efluentes crudos	2,4 x 10 ⁷	1,1 x 10 ⁶
Primera laguna facultativa	7,0 x 10 ⁵	4,0 x 10 ⁵
Segunda laguna facultativa	4,6 x 10 ⁴	7,5 x 10 ³
EUT para riego	1.100	240

Como resultado de la cuantificación de los microorganismos patógenos en el proceso de depuración de los efluentes, se observó una notable disminución de la presencia de bacterias coliformes, llegando a alcanzar niveles inferiores a los recomendados (<1000 NMP 100 mL⁻¹) por las directrices internacionales (OMS, 2006; DOUE, 2017), para el riego de cultivos de categoría A.

La Unión Europea, a través de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), establece un límite máximo de 10.000 NMP 100 mL⁻¹ de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal en aguas residuales tratadas utilizada en riego de frutas y hortalizas que se consuman cocinadas y el agua de riego no entre en contacto directo con la parte comestible del producto, que se corresponderían como el caso de brócoli del experimento (DOUE, 2017).

Sin embargo, los valores logrados fueron ligeramente superiores si se comparan con los propuestos según las directrices provinciales (<200 NMP 100 mL⁻¹), y muy superiores a las directrices de California (EEUU) cuyos límites de coliformes fecales se establecen en 2,2 NMP 100 mL⁻¹ para el riego de brócoli como cultivo alimenticio que presenta el órgano comestible sobre la superficie del suelo, sin contacto directo con el agua residual. Estas directrices son más estrictas para la misma categoría de cultivos.

A pesar de que la presencia de microorganismos patógenos se considera como uno de los principales inconvenientes del uso de aguas residuales tratadas (Crespi, 2005), el sistema de riego subterráneo funcionaría como una excelente alternativa para reducir en gran medida la posibilidad de contaminación de los cultivos, ya que con un buen manejo del riego, nunca se alcanzan niveles de saturación de agua en la superficie del suelo, lo cual evita el contacto directo de las aguas residuales con el producto comestible.

I.4. Calidad sanitaria del brócoli

En la Tabla I.15 se muestran los resultados de los análisis microbiológicos y parasitológicos realizados sobre las pellas frescas de brócoli al momento de la cosecha de los cultivares en cada experimento.

Tabla I.15. Recuento de microorganismos y parásitos en pellas frescas de brócoli a cosecha.

Determinación	Unidad (*)	2016		2017	
		EUT	AC	EUT	AC
Recuento Coliformes Totales	UFC g ⁻¹	1,02 x 10 ⁵	1,6 x 10 ⁵	3,6 x 10 ⁵	4,4 x 10 ⁴
Recuento Coliformes Fecales	Mo g ⁻¹	< 10	< 10	< 10	< 10
Recuento <i>E. coli</i> O157: H7/NM	Mo g ⁻¹	< 10	< 10	< 10	< 10
Recuento <i>Salmonella spp</i>	A/P	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Larvas parasitarias	A/P	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Huevos de céstodos	A/P	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Nemátodos y ooquistes	A/P	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

(*) UFC g⁻¹: Unidades Formadoras de Colonia por gramo de muestra; Mo g⁻¹: Microorganismos por gramo de muestra; A/P: Ausencia/Presencia.

De acuerdo a estos resultados, se puede afirmar que en el recuento de microorganismos los niveles detectados de *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. sobre las pellas frescas de brócoli se encontraron por debajo de los límites de tolerancia establecidos en el Código Alimentario Argentino, por lo cual, las pellas fueron aptas para su consumo directo en fresco.

Además, no se detectaron larvas y estructuras parasitarias infectantes, huevos de céstodos, nemátodos y ooquistes que pudieran afectar la salud humana en coincidencia con lo obtenido por Beneduce *et al.* (2017). Estos hallazgos también coinciden con estudios previos que sugieren que el riego con efluentes tratados no implica necesariamente la contaminación de los cultivos (Vergine *et al.*, 2017). El sistema de riego por goteo subterráneo utilizado contribuyó en gran medida a la obtención de estos resultados, al evitar el contacto directo del efluente con el brócoli.

I. CONCLUSIONES

- El riego con EUT aumentó la producción de MS de hojas, tallo y pella solo en los cultivares C2 y C3 de brócoli.
- El aporte de nutrientes a través del riego subterráneo con EUT mejoró la calidad de las pellas de brócoli, lográndose un aumento en el diámetro y peso individual de las mismas, y un aumento del diámetro de pedúnculo.
- Los cultivares de brócoli regados con EUT presentaron una mayor incidencia de hollow stem.
- El rendimiento total de pellas (Mg ha^{-1}) se incrementó con la utilización de los EUT.
- Los análisis microbiológicos y parasitológicos sobre las pellas determinaron ausencia de patógenos perjudiciales para el ser humano, por lo cual las pellas fueron aptas para su consumo directo en fresco.

CAPÍTULO II

EFFECTOS DE LA UTILIZACIÓN DE EFLUENTES URBANOS TRATADOS SOBRE LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS NUTRACÉUTICOS EN BRÓCOLI



II. RESUMEN

El uso de aguas residuales tratadas constituye una alternativa viable en los sistemas hortícolas, considerando que el aporte de agua y la carga de nutrientes contribuyen a mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos. El brócoli es una hortaliza de alto valor nutricional, considerada como un alimento nutracéutico ya que posee compuestos bioactivos que ejercen efectos beneficiosos para la salud humana. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la utilización de efluentes urbanos tratados (EUT) sobre las propiedades nutracéuticas de brócoli durante dos temporadas (2016 y 2017). Para ello se trasplantaron, en un diseño en parcelas divididas, tres cultivares F1: 'Matsuri' (C1), 'Green Pia' (C2) y 'Almanor' (C3), regados con dos calidades de agua: Efluentes Urbanos Tratados (EUT) y Agua de Acuífero (AC), mediante riego localizado por goteo subterráneo. Al momento de la cosecha se evaluó en las pellas el contenido de compuestos fenólicos totales, contenido de clorofilas y carotenoides, proteínas solubles y totales y contenido de sólidos solubles. Los resultados determinaron que el riego con EUT sólo tuvo efectos significativos sobre el contenido de compuestos fenólicos, el resto de los compuestos nutracéuticos no se modificaron con la calidad de agua de riego, lo cual indicaría que el aporte de nutrientes a través del uso de EUT no sería determinante para mejorar de manera contundente la calidad nutracéutica del cultivo de brócoli.

Palabras claves: efluentes urbanos, brócoli, compuestos bioactivos, calidad nutracéutica.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. Alimentos funcionales o nutracéuticos

El término “Alimento Funcional” o “Nutracéutico” propuesto por primera vez en la década de 1980, se refiere a aquellos alimentos que contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos para la salud humana y que van más allá de la nutrición (Olagnero *et al.*, 2007; Fernández León, 2012).

Estos conceptos aluden entonces a un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, que incluyen la prevención y/o el tratamiento de enfermedades (Alvírez Morales *et al.*, 2002). Aunque en esta tesis se adoptan como sinónimos, algunos proponen identificar como nutracéutico el suplemento que aporta a la dieta una forma concentrada de un compuesto biológicamente activo, en un envase no alimentario como una cápsula o ampolla, por ejemplo. En contraposición, proponen como funcional a un producto consumido como parte de una alimentación normal, y que contiene uno o más ingredientes activos incorporados en una matriz alimentaria (Luengo Fernandez, 2007). Muchas de las enfermedades crónicas que provocan altos índices de morbilidad y mortalidad como el cáncer, la obesidad, la hipertensión y los trastornos cardiovasculares, se relacionan de un modo muy estrecho con la dieta alimenticia (Jones, 2002).

Desde hace algunos años, existe una clara preocupación en la sociedad por la posible relación entre el estado de salud de las personas y su alimentación. Incluso se acepta que la salud es un bien preferentemente controlable a través de la alimentación, por lo que es perceptible en muchos consumidores una marcada preferencia por aquellos alimentos que se anuncian como beneficiosos para la salud (Alvírez Morales *et al.*, 2002).

La investigación en el campo de la epidemiología y la dietética permiten establecer ciertas relaciones entre los estilos de vida y los hábitos alimenticios, a la vez que es posible destacar la incidencia de algunas enfermedades sobre la tasa de mortalidad de la sociedad occidental. Algunos trabajos científicos han puesto de relieve que ciertos ingredientes naturales de los alimentos proporcionan beneficios y resultan extraordinariamente útiles para la prevención de enfermedades e incluso para su tratamiento terapéutico (Bello, 2000).

Los alimentos funcionales ejercen su actividad en múltiples sistemas, especialmente el gastrointestinal, cardiovascular e inmunológico. Se comportan como potenciadores del

desarrollo y la diferenciación, moduladores del metabolismo de nutrientes, la expresión génica, el estrés oxidativo y la esfera psíquica (Rodríguez *et al.*, 2003).

Estudios recientes han demostrado que de 128 medicamentos contra el cáncer comercializados entre los años 1981 y 2010, aproximadamente 12 de ellos son productos naturales y 21 derivados de éstos, lo que justifica la importancia de la búsqueda de nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer en alianza con productos naturales, con énfasis en alimentos funcionales (Newman y Cragg, 2012).

Muchos de estos estudios se enfocan en el conocimiento de los principales compuestos fitoquímicos presentes en especies de la familia de las *Brassicáceas*, como es el caso del brócoli. Dichas investigaciones dirigen sus líneas de trabajo hacia la mejora tanto de la calidad como la producción de estos vegetales (López Chillón, 2017).

II.2. Propiedades nutraceuticas del brócoli

El brócoli (*Brassica oleraceae* var. *itálica* Plenck) es una hortaliza con un alto valor nutricional, posee un alto contenido de fibras, proteínas, vitaminas y carotenos; es rica en vitamina K, indispensable en la coagulación de la sangre y ayuda a mantener la elasticidad de las arterias. Posee un gran contenido de calcio, indoles, flavonoides, vitamina A y C, que contribuyen al buen funcionamiento del sistema inmunológico del organismo. Esta crucífera tiene propiedades diuréticas, antianémicas, laxantes y depuradoras de la sangre (Jaramillo y Díaz, 2006).

El brócoli es un producto rico en compuestos fitoquímicos, de los que existen evidencias que ejercen protección contra ciertas enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y cáncer. En particular, estos efectos benéficos son ejercidos por la acción de compuestos bioactivos que influyen positivamente en el sistema inmunológico y sobre mecanismos antioxidantes en los individuos que consumen este tipo de vegetales (Krizaj, 2014).

Los principales compuestos bioactivos son nutrientes antioxidantes (beta carotenos, polifenoles y vitamina C), sustancias fitoquímicas (glucosinolatos, isotiocianatos e indoles) entre los que destaca el sulforafano y el indol-3-carbinol, que actúan fundamentalmente aumentando la actividad de enzimas protectoras del organismo (Beecher, 1994; Campas Baypoli *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2013). El contenido de estos compuestos varía según distintos factores como genotipo, condiciones de cultivo, condiciones postcosecha, entre

otros (Fernández León *et al.*, 2012). En la Tabla II.1 se muestra la composición nutricional de una porción comestible de 100 g de brócoli.

Tabla II.1. Composición nutricional de una porción comestible de 100 g de brócoli

Componente	Unidad	Valor	Componente	Unidad	Valor
Agua	%	89,92	Leucina	mg	158,00
Cenizas	%	0,26	Lisina	mg	142,00
Energía	Cal	42,00	Metionina	mg	53,00
Proteína	g	5,45	Treonina	mg	119,00
Lípidos	g	0,30	Triptofano	mg	36,00
Grasa	g	0,30	Valina	mg	169,00
Glucósidos	g	4,86	Calcio	mg	130,00
Carbohidratos	g	3,70	Hierro	mg	1,30
Fibra	g	1,90	Fósforo	mg	76,00
Vitamina A (Tiamina)	U.I.	3.500	Potasio	mg	355,00
Vitamina B1 (Tiamina)	mg	100,00	Sodio	mg	15,00
Vitamina B2 (Riboflavina)	mg	210,00	Zinc	mg	0,18
Vitamina B3 (Niacina)	mg	0,90	Magnesio	mg	9,00
Vitamina B6	mg	0,14	Cobre	mg	0,03
Vitamina C (Ac. ascórbico)	mg	118,00	Manganeso	mg	0,14
Fenilalanina	mg	107,00	Azufre	mg	55,00
Isoleucina	mg	123,00	Cloro	mg	11,80

Fuente: Di Benedetto (2005); Jaramillo y Díaz, (2006).

La síntesis de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante se relaciona con determinadas situaciones de estrés durante el ciclo de cultivo, lo cual altera el metabolismo celular, provocando una acumulación de especies reactivas del oxígeno que son tóxicas en las plantas y derivan en una situación de estrés oxidativo. Como respuesta a la aparición de estas moléculas, se sintetizan metabolitos secundarios y otros compuestos con capacidad antioxidante que sirven como sustrato para los procesos de detoxificación, y que son altamente apreciados para la salud humana debido a sus propiedades nutraceuticas (Krizaj, 2014).

II.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un amplio grupo de metabolitos secundarios de diferente actividad y estructura química (Jáuregui y Escudero, 2007). Estos compuestos se

encuentran en casi todos los alimentos de origen vegetal aportando color, sabor amargo, astringencia y/o aroma, siendo su distribución muy diversa en la organografía de las plantas. Los compuestos fenólicos poseen diferente actividad biológica, pero las más importantes son aquellas vinculadas con su capacidad antioxidante y el efecto inhibidor de varias clases de tumores (Czeczot, 2000).

El interés nutricional de muchas *Brassicáceas* está relacionado en parte con su contenido en compuestos fenólicos, cuya composición varía entre las especies, variedades dentro de la misma especie e inclusive se distribuyen de manera diferente en las partes de una planta (Cartea *et al.*, 2010).

Entre los cultivos incluidos en la especie *Brassica oleracea* L., el brócoli ha sido el más exhaustivamente estudiado en relación a su composición en polifenoles. Diversos estudios han demostrado que este cultivo contiene un alto potencial antioxidante relacionado con su importante nivel de compuestos fenólicos, además de constituir una excelente fuente de derivados del flavonol e hidroxicinamoilo (Llorach *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006).

II.2.2. Clorofila

La clorofila es una biomolécula extremadamente importante, esencial en el proceso de la fotosíntesis al posibilitar la absorción de la energía de los fotones provenientes del espectro de la radiación fotosintéticamente activa (Moreno *et al.*, 2008). Los compuestos clorofílicos mayoritarios en las plantas son la clorofila a y clorofila b, ambas son componentes genuinos de las membranas de los tilacoides de los cloroplastos y están normalmente en una relación de 3:1, respectivamente (Fernández León, 2012). Sin embargo, algunas condiciones ambientales y de crecimiento, entre otras, pueden modificar esta relación (Lichtenthaler *et al.*, 1982).

La descomposición de las clorofilas está fuertemente ligada a la senescencia de las plantas luego de su recolección (Lemoine, 2009), o a la marchitez de las hojas (Fernández León, 2012). La importancia de estos compuestos sobre la salud humana, reside en que existen antecedentes científicos que han demostrado una vinculación directa entre la actividad antimutagénica y antioxidante con el contenido en clorofilas en muchos extractos vegetales (Lai *et al.*, 1980). En el caso de brócoli específicamente, algunos estudios indican que el contenido de clorofila total presente en las pellas frescas puede oscilar de 250 mg kg⁻¹ (Lemoine, 2008) hasta 375 mg kg⁻¹ (Hasperué *et al.*, 2015). En clorofila a, se

han obtenido mediciones desde 50 mg kg⁻¹ (Schonfof *et al.*, 2007); 93 mg kg⁻¹ (Fernández León, 2012) hasta 265 mg kg⁻¹ (Hasperué *et al.*, 2015). Mientras que en clorofila b desde 19 mg kg⁻¹ (Schonfof *et al.*, 2007); 32 mg kg⁻¹ (Fernández León, 2012) a 111 mg kg⁻¹ (Hasperué *et al.*, 2015).

II.2.3. Carotenoides

Desde el punto de vista químico, los carotenoides pertenecen a la familia de los terpenos, más concretamente se tratan de compuestos tetraterpenoides. Se dividen en dos tipos básicos: los carotenos que son hidrocarburos y las xantófilas que son sus derivados oxigenados. Son de color amarillo, naranja y rojo, y se encuentran presentes en muchas frutas y hortalizas como pigmentos (Fernández León, 2012).

La principal función de los carotenoides es complementaria a las clorofilas, al captar energía luminosa, que luego es transferida a las clorofilas para ser transformada durante la fotosíntesis. Además, intervienen especialmente en la protección contra la fotooxidación, ya que en su estructura química poseen dobles enlaces conjugados, los que le otorgan su capacidad para neutralizar radicales libres, aportando efectos antioxidantes, como son la protección cardiovascular y antitumoral una vez consumidos (Podsdek, 2007). Por esto, los carotenoides juegan un papel importante en la salud humana actuando como antioxidantes biológicos y protegiendo a las células y tejidos.

Compuestos carotenoides como beta carotenos, luteína, violaxantina y neolaxantina se encuentran en brócoli, siendo la luteína uno de los más abundantes al formar parte de la fracción lipídica de los sistemas biológicos, protegiendo a las membranas de los radicales libres (Buenaño, 2011). Tienen un efecto muy importante sobre la vista, puesto que el beta caroteno es precursor de la vitamina A y la luteína se encuentra específicamente en la mácula y la lente del ojo, reduciendo el riesgo de enfermedades oculares graves, tales como la degeneración macular relacionada con la edad y las cataratas (Singh *et al.*, 2006).

II.2.4. Proteínas

El consumo de proteínas es imprescindible para un correcto funcionamiento del organismo, son indispensables en la regeneración de tejidos, originan anticuerpos, actúan en el metabolismo de lípidos, generan energía e intervienen como coenzimas en reacciones metabólicas (Quirantes Hernández, 2017).

Uno de los alimentos vegetales que aporta proteínas es el brócoli, que junto al repollo de Bruselas, las habas y espinaca, integra un grupo de hortalizas que poseen más proteínas que hidratos de carbono (Pérez Del Pozo, 2016).

Losada *et al.* (1992) en un estudio desarrollado en Iztapalapa (México), midieron los niveles de proteína que podrían aportar diferentes cultivos hortícolas (zanahoria, brócoli), maíz y alfalfa en la alimentación de ganado bovino con fines lecheros, de los cultivos evaluados el brócoli fue el que presentó mayor concentración proteica, con valores de 36% de proteína total en hojas y 31% en inflorescencias.

II.3. Uso de efluentes en la mejora de las propiedades nutricionales de brócoli

Como ya se describió en el Capítulo I el uso de efluentes urbanos tratados para riego de sistemas agrícolas representan una importante fuente de macro y micronutrientes para los cultivos, como así también de materia orgánica para los suelos (D'andrea *et al.*, 2014). Desde el punto de vista agronómico, este tipo de aguas influye en el rendimiento y los atributos de calidad de los productos agrícolas (Christou *et al.*, 2016).

Cuando las aguas residuales se usan continuamente como única fuente de agua de riego, se aplican simultáneamente cantidades excesivas de nutrientes y su acumulación en el suelo puede causar efectos no sólo en la productividad sino también en la calidad de los cultivos (Kiziloglu *et al.*, 2008).

En la actualidad se presentan dos tendencias muy marcadas que relacionan los sistemas agroalimentarios y los hábitos alimenticios, por un lado, mantener o incrementar la productividad de los cultivos empleando tecnologías ambientalmente sustentables, y por otro la necesidad de los consumidores de mejorar su salud utilizando alternativas naturales (Chacón Lee, 2011).

El suministro de nutrientes en el cultivo de hortalizas, favorece la obtención no solamente de cultivos más productivos, sino que además podría promover la síntesis de sustancias nutricionales y funcionales de interés para el cuidado y la mejora de la salud de los consumidores. Hay evidencia que vincula la cantidad y calidad de nutrientes disponibles para las plantas durante su crecimiento con la producción de diversos compuestos nutraceuticos (Martínez Ballesta *et al.*, 2008).

II.4. Antecedentes

Existen antecedentes del uso de aguas residuales en la irrigación de cultivos agrícolas y sus efectos sobre el metabolismo vegetal y la síntesis de biocompuestos. Sin embargo, no hay referencias que vinculen su efecto directo sobre la calidad nutricional de brócoli.

Kiziloglu *et al.* (2008) hallaron modificaciones en las propiedades nutricionales de coliflor (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) y repollo (*Brassica oleracea* L. var. rubra) regados con aguas residuales con tratamiento primario, observando un aumento significativo en el contenido de los minerales como N, P, K, Ca, Mg y Na en ambos cultivos.

Naaz y Pandey (2010) determinaron que en lechuga, el riego con aguas residuales industriales provocó una disminución del rendimiento en materia seca, aunque al mismo tiempo aumentó la actividad de enzimas antioxidantes, azúcares y el contenido de clorofilas y carotenoides.

Gupta *et al.* (2010) en un estudio desarrollado para evaluar el efecto del riego con aguas residuales en relación a la bioacumulación de metales pesados y cambios bioquímicos en cultivos de rabanito (*Raphanus sativus* L.), taro (*Colocasia esculentum* L.) y mostaza negra (*Brassica nigra* L.), determinaron una disminución en la concentración de clorofila total y los niveles de algunos aminoácidos en las plantas, y un aumento de azúcares solubles, proteína total, ácido ascórbico y compuestos fenólicos. A excepción de *B. nigra* L. que no presentó cambios en el nivel de proteínas cuando fue regada con aguas residuales en comparación con el control.

Naguib *et al.* (2012) evaluaron el efecto de la aplicación de fertilizantes orgánicos (a base de estiércol de pollo), y biológicos (bacterias fijadoras de N y solubilizadoras de P) en la calidad nutricional de cultivares de brócoli, obteniendo un incremento notable en el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, glucosinolatos y actividad antioxidante como resultado del tratamiento con este tipo de fertilizantes.

Selim y All Mosa (2012) evaluaron el efecto de la fertirrigación con sustancias húmicas (SA) sobre la calidad y rendimiento de brócoli. El experimento consistió en seis tratamientos de fertirrigación (50%, 75% y 100% de la dosis recomendada de N, P y K para el cultivo, combinado con y sin aplicación de SA a razón de 120 L ha⁻¹). Las sustancias húmicas aumentaron el rendimiento total y el diámetro de la cabeza del brócoli,

así también algunos compuestos relacionados con la calidad del producto como sólidos solubles, proteínas y vitamina C.

Hashem *et al.* (2013) evaluaron el impacto del riego con aguas residuales industriales sobre el crecimiento, contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides), sólidos solubles y actividad antioxidante en cultivos hortícolas de tomate, lechuga y nabo. Como resultado de la presencia de metales pesados en este tipo de aguas los cultivos presentaron una disminución en el crecimiento, una reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos y un incremento significativo en la actividad de enzimas antioxidantes y sólidos solubles como mecanismos de defensa inducidos en respuesta al estrés de metales pesados.

Gatta *et al.* (2015) utilizaron aguas subterráneas y aguas residuales agroindustriales tratadas para la irrigación de un cultivo de tomate. Si bien lograron un mayor rendimiento en frutos en los tratamientos regados con aguas residuales agroindustriales, no se mejoró significativamente su calidad organoléptica medida a través del porcentaje de materia seca, concentración de sólidos solubles (°Brix) y color de los frutos.

Pedrero *et al.* (2018) midieron un mayor contenido de compuestos fenólicos totales y compuestos antioxidantes en nectarines (*Prunus persica* L.) irrigados con aguas residuales tratadas.

Christou *et al.* (2016) evaluaron la calidad de un cultivo de frutilla (*Fragaria × ananassa* cv. camarosa) regado con aguas residuales con tratamiento terciario y agua de pozo. Los resultados revelaron que el tipo de agua no tuvo efecto significativo en la calidad y el sabor de la frutilla, el porcentaje de materia seca, pH, sólidos solubles, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos.

Elfanssi *et al.* (2018) determinaron en alfalfa irrigada con agua residual cruda, tratada y agua de pozo, que las plantas presentaron respuestas fisiológicas diferentes al uso de aguas residuales en comparación al agua de pozo. La prevalencia de enzimas antioxidantes en las plantas aumentó con el riego de aguas residuales crudas, como así también la acumulación de prolina y azúcares. Sin embargo, la fisiología de las plantas presentó diferencias a través de su conductancia estomática y la concentración total de clorofilas, ya que fueron afectadas adversamente en las plantas irrigadas con aguas residuales crudas en comparación con las tratadas y agua de pozo.

Hassena *et al.* (2018) obtuvieron resultados positivos en la irrigación de olivos (*Olea europaea* L.) con aguas residuales, logrando un importante enriquecimiento de los tejidos de las plantas con macro y micronutrientes, una mejora en la actividad fotosintética

y un aumento de azúcares solubles. Concluyeron que el uso de aguas residuales actuaría como un biofertilizante para las plantas debido a su considerable cantidad de nutrientes, por lo que su aplicación permitiría reducir el uso de fertilizantes de síntesis química.

Su *et al.* (2018) demostraron que la deposición de aguas residuales provenientes de la industria de la fabricación del papel promovió el crecimiento de la biomasa, el aumento de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y total) y la tasa neta de fotosíntesis en diferentes especies vegetales.

Aunque existen antecedentes relacionados con la temática expuesta, los mismos son escasos en demostrar la influencia que tiene el uso de aguas residuales sobre la síntesis de compuestos nutraceuticos en brócoli. La realización de estudios como los propuestos aquí, permitiría no sólo profundizar en el conocimiento del uso alternativo de las aguas residuales tratadas, sino también para determinar su influencia sobre el metabolismo secundario de brócoli y sus propiedades nutraceuticas.

II. HIPÓTESIS

El riego con efluentes urbanos tratados producirá un aumento de la síntesis de compuestos nutraceuticos en brócoli.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos planteados para evaluar el efecto del riego con efluentes urbanos tratados sobre la síntesis de compuestos nutraceuticos en las pellas de brócoli fueron:

- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales en las pellas de brócoli.
- Cuantificar el contenido de clorofilas y carotenoides en pellas.
- Cuantificar el contenido de proteínas solubles y totales en pellas.
- Cuantificar el contenido de sólidos solubles en pellas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Descripción de los experimentos

Para cumplir con los objetivos planteados se realizaron dos experimentos durante los años 2016 y 2017 para cuantificar el efecto del uso de efluentes urbanos tratados sobre la síntesis de compuestos nutracéuticos en brócoli. La implantación de las parcelas experimentales se realizó según lo descrito en el Capítulo I. Sección I.2. del presente trabajo de investigación.

II.1.2. Preparación de las muestras para las determinaciones analíticas

Al momento de la cosecha se extrajeron muestras de 5 pellas de cada tratamiento, las que fueron inmediatamente cubiertas con papel aluminio, adecuadamente identificadas e introducidas en ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación. Posteriormente, estas muestras se trituraron en frío utilizando un molinillo a hélice marca Arcano modelo FW 100, y se volvieron a conservar en ultrafreezer hasta la realización de las determinaciones correspondientes.

II.1.2.1. Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales mediante Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 760 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles. La oxidación de los polifenoles se cuantificó por espectrofotometría en base a una curva de calibración empleando ácido gálico (Martínez *et al.*, 2015).

Preparación del extracto: El extracto se preparó colocando 0,7 g de brócoli triturado y congelado en 1,5 mL de metanol:agua destilada (75:25), la mezcla se homogeneizó con vortex y se llevó a baño ultrasónico durante 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10.000 revoluciones por minuto durante 15 minutos, luego se extrajo el sobrenadante, se midió el volumen recuperado y se colocó en tubos eppendorf de 2 mL.

Preparación del reactivo: Se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu. Simultáneamente se preparó una curva de calibración utilizando ácido gálico ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) como estándar en un rango de concentraciones de 0 a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Determinación: Se preparó una solución agregando $10 \mu\text{L}$ de extracto + $1290 \mu\text{L}$ de agua destilada + $50 \mu\text{L}$ de reactivo de Folin-Ciocalteu, se llevó a baño ultrasónico durante 5 minutos y se añadieron a la mezcla 250 mL de Na_2CO_3 al 20% (m/v). La mezcla se incubó a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos en oscuridad. Se midió la absorbancia a la longitud de onda de 760 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (GAE) en base al de peso seco de las pellas (mg kg^{-1}).

II.1.2.2. Determinación del contenido de clorofilas y carotenoides

Una variable que debe tomarse en consideración para determinar el estatus fisiológico de un vegetal en un momento determinado es el contenido en clorofilas y carotenoides. Esto se debe principalmente a la respuesta que pueden presentar las plantas ante cualquier condición medioambiental, fitosanitaria o de fertilización que afecte al propio metabolismo del vegetal y por lo tanto se modifique su contenido en clorofilas y carotenoides (Callejas *et al.*, 2013).

Preparación del extracto: El extracto se preparó colocando 0,25 g de brócoli congelado en un mortero, se molió en frío agregando 2 mL de acetona:agua destilada (80:20), la mezcla se homogeneizó en vortex y se centrifugó a 6.000 revoluciones por minuto durante 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Se cuantificó el volumen del sobrenadante recuperado y se llevó a 2 mL cuando fue necesario, agregando acetona y agua destilada con una relación 80:20 v/v, respectivamente. Los resultados se expresaron como contenido de clorofila y carotenoides en base al peso seco de las pellas (mg kg^{-1}).

Determinación de clorofilas: Para determinar la concentración de clorofilas se midió sobre el extracto la absorbancia a 646 y 663 nm, y se determinó el contenido de clorofila a (Cl_a), clorofila b (Cl_b) y clorofila total (Cl_{a+b}) utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3:

$$Cl_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = (12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{646}) \quad \text{Ec. 1}$$

$$Cl_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = (21,50 \times A_{646} - 5,10 \times A_{663}) \quad \text{Ec. 2}$$

$$Cl_{a+b} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (7,15 \times A_{663} + 18,71 \times A_{646}) \quad \text{Ec. 3}$$

Determinación de carotenoides: Para determinar el contenido de carotenoides totales se midió sobre el extracto la absorbancia a 470 nm, y se determinó utilizando la ecuación 4:

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1.000 \times A_{470} - 1,82 \times Cl_a - 85,02 \times Cl_b) / 198 \quad \text{Ec. 4}$$

II.1.2.3. Determinación del contenido de proteína soluble y total mediante el método de Bradford

El método de Bradford es una técnica sensible que consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible de un colorante (Coomasie Blue G-250) cuando éste se une a las proteínas. La unión se realiza a través de grupos ionizados y se comprueba proporcionalidad con la concentración de proteínas contenidas en la muestra. El colorante cambia del color marrón al azul cuando se une a las proteínas (Montoya y Torres, 2013).

Preparación del extracto:

- Proteína soluble: El extracto se preparó colocando 0,3 g de brócoli congelado en un mortero, se molió en frío agregando 1 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH= 7, se recuperó la muestra y se centrifugó a 10.000 revoluciones por minuto durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se colocó en tubos eppendorf de 1,5 mL y se descartó el precipitado.
- Proteína total: El extracto se preparó colocando 0,3 g de brócoli congelado en un mortero, se molió en frío agregando 1 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH= 7, y se recuperó la muestra en tubos eppendorf de 1,5 mL.

Preparación del reactivo: El reactivo de Bradford se preparó colocando en un vaso de precipitado 50 mg de Coomassie Blue G-250 + 25 mL de etanol al 96% + 50 mL de ácido fosfórico al 85%. La mezcla se llevó a un volumen de 500 mL agregando agua destilada y se agitó durante 3 días a temperatura ambiente y protegida de la luz. Finalmente se filtró utilizando un embudo buchner y bomba de vacío.

Determinación: Para determinar el contenido de proteína soluble y total se preparó una solución agregando 5 μL del extracto + 175 μL de agua destilada + 1.800 μL de reactivo Bradford. Se preparó una curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) como estándar. Se midió la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron como contenido de proteína total y soluble en base al peso seco de las pellas (mg kg^{-1}).

II.1.2.4. Determinación del contenido de sólidos solubles

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en las sustancias de un tejido vegetal. Los sólidos solubles están constituidos por azúcares, ácidos, sales y demás compuestos solubles en agua. Su determinación por refractometría se basa en los cambios del índice de refracción que sufren las sustancias cuando otra es disuelta en ella, siendo esta refracción directamente proporcional cuanto mayor sea la cantidad de sólidos disueltos (Rodríguez Paucar, 2014).

Preparación del extracto: El extracto se preparó colocando 0,3 g de brócoli congelado en un mortero, se molió en frío agregando 1 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH= 7 y se recuperó la muestra en tubos eppendorf de 1,5 mL.

Determinación: Para determinar el contenido de sólidos solubles totales se tomó una alícuota de 200 μL de extracto y se colocó en un refractómetro marca Hanna HI 9680 para tomar lectura del instrumento. Los resultados se expresaron en °Brix (g de sólido disuelto por 100 g de disolución total).

Todas las determinaciones analíticas se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones en Fisiología y Biología Molecular Vegetal (LIFiBVe), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza (Santa Fe).

II.2. Análisis estadísticos

Todos los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa Infostat (Di Rienzo, 2011), aplicando análisis de varianza, comprobando que los datos cumplieran los principios de normalidad y homogeneidad de varianza, y comparación de medias con el test de Fisher ($p \leq 0,05$).

II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II. 1. Efecto del riego con Efluentes Urbanos Tratados sobre la síntesis de compuestos nutracéuticos en brócoli

II.1.1. Contenido de compuestos fenólicos totales

Se logró una mejora significativa en el contenido de compuestos fenólicos de algunos cultivares en favor del uso de EUT. El cultivar C1 fue aquel que presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos (independientemente de los tratamientos de riego), lo cual indicaría que posee un mayor poder antioxidante. Al igual que los resultados obtenidos aquí, otros autores también encontraron diferencias entre genotipos (Lemoine, 2009; Hasperué *et al.*, 2015) (Figura II.1).

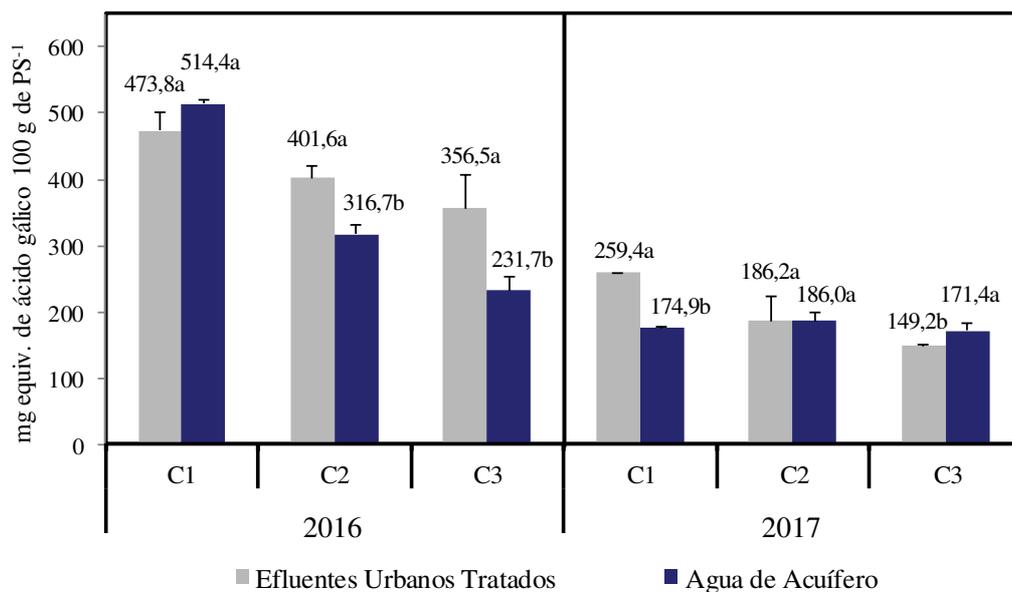


Figura II.1. Contenido de compuestos fenólicos totales en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Los cultivares que manifestaron una respuesta significativa presentaron un incremento de 26 y 53% para C2 y C3 (2016); y un 48% para C1 (2017) cuando se regó con EUT, sin embargo, en C1 (2016) y C3 (2017) se manifestó una mayor concentración con el uso de agua de perforación.

Los resultados revelan que las propiedades nutraceuticas no sólo dependen de factores ambientales, como en este caso la calidad del agua de riego, sino también de factores genéticos. Al respecto y específicamente en brócoli, existen numerosos antecedentes sobre la influencia del genotipo y factores ambientales en la variación del contenido de compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos y vitamina C) (Pérez Balibrea *et al.*, 2011; Chacón Lee, 2011). Es importante considerar que las comparaciones para un mismo cultivar evaluado en condiciones ambientales diferentes pueden arrojar resultados disímiles (Cartea *et al.*, 2010), esto se observó al comparar ambos años de estudio.

Considerando el contenido total de compuestos fenólicos que se midió en todos los tratamientos, este fue superior a los reportados por otros autores (Hasperué *et al.*, 2015). El aporte de nutrientes a través del EUT tuvo un efecto estimulante sobre la acumulación de compuestos fenólicos en las pellas de algunos cultivares, esto puede deberse a las funciones que cumplen este tipo de compuestos en la inducción de vías metabólicas (acetato shikimato), lo que resulta en una mayor producción de flavonoides y compuestos fenólicos (Sousa *et al.*, 2008).

II.1.2. Contenido de clorofilas y carotenoides

II.1.2.1. Contenido de clorofila a, b y total

El contenido de clorofila a, b y total no se modificó significativamente con el uso de EUT, sólo se observó en los cultivares C3 (2016) y C1 (2017) una respuesta positiva a este tipo de agua en el contenido de clorofila a. No se encontraron diferencias en los dos años para ninguno de los cultivares en clorofila b. Y en clorofila total, sólo en el cultivar C1 (2017) se manifestó un efecto favorable al uso de EUT.

De manera que, a partir de este análisis, no se podría asegurar en forma contundente que el uso de EUT incrementó la concentración de clorofilas en las pellas de brócoli (Figura II.2).

Otras investigaciones han demostrado que el reuso de aguas residuales estimula una mayor síntesis de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y total) en distintas especies vegetales (Su *et al.*, 2018). Mejores condiciones medioambientales, o de fertilidad influyen en el metabolismo del vegetal y se traducen en una mayor concentración de

clorofilas, esto promueve una mayor tasa fotosintética, mejorando el crecimiento vegetal y la producción de los cultivos (Orihuela *et al.*, 2007).

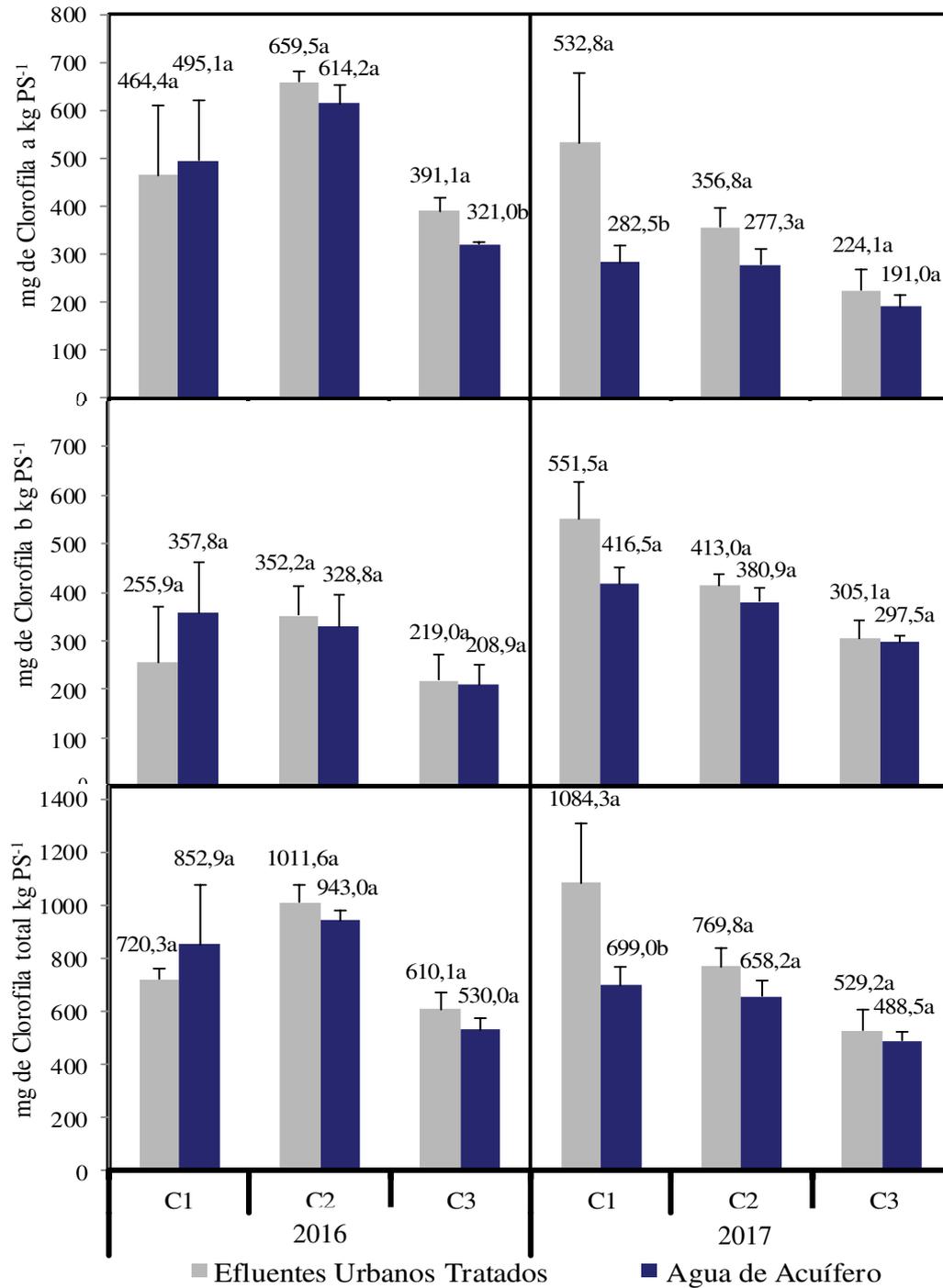


Figura II.2. Contenido de clorofila a, b y total en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Uno de los nutrientes más importantes para la síntesis de clorofilas es el nitrógeno. Una mayor disponibilidad de este nutriente para el cultivo estimula el aumento de clorofilas en hojas (Evans, 1989), esto es sumamente importante, ya que es una de las variables que podría tomarse en consideración para evaluar el estado fisiológico de las plantas en un momento determinado (Callejas *et al.*, 2013). Posiblemente, la disponibilidad de nitrógeno a partir del aporte realizado con los EUT no fue suficiente para modificar el contenido de clorofilas.

No obstante, Gupta *et al.* (2010) evaluando el efecto del riego con aguas residuales observaron cambios bioquímicos negativos en rabanito (*Raphanus sativus* L.), taro (*Colocasia esculentum* L.) y mostaza negra (*Brassica nigra* L.) con una notable disminución en la concentración de clorofila total.

Gassama *et al.* (2015) evaluando distintas concentraciones de aguas residuales municipales tratadas y no tratadas en el agua de riego de arroz, determinaron que a concentraciones superiores al 50% se produjeron efectos inhibitorios sobre el contenido de clorofilas, argumentando posibles efectos tóxicos a la presencia en exceso de ciertos elementos (N, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu y Mn) contenidos en estas aguas. Sin embargo, observaron efectos promotores sobre la síntesis de clorofilas a concentraciones más bajas (<25%). Similares resultados obtuvieron Naaz y Pandey (2010) en lechuga.

Por lo tanto, estas aseveraciones podrían relacionarse con los resultados de este estudio, el contenido de nutrientes en los EUT, las láminas de riego aplicadas en cada experimento, sumado a las condiciones de cultivo podrían haber determinado las variaciones observadas en los resultados obtenidos.

II.1.2.2. Carotenoides

El contenido de carotenoides presentó valores muy similares entre las calidades de agua de riego, sin manifestar diferencias significativas en los cultivares para ambos años de estudio, por lo cual el uso de EUT no tuvo efecto sobre esta variable (Figura II.3).

Naaz y Pandey (2010) informan incrementos significativos del contenido de carotenoides en cultivo de lechuga a medida que aumentaron el contenido de aguas residuales industriales diluidas en el agua de riego, no obstante, esta tendencia sólo se manifestó hasta una concentración máxima de 50%, a valores superiores los resultados fueron decrecientes.

Hashem *et al.* (2013) observaron una marcada reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos en tomate, nabo y lechuga regados con aguas residuales industriales, atribuyendo estos resultados al elevado contenido en metales pesados presentes en estas aguas.

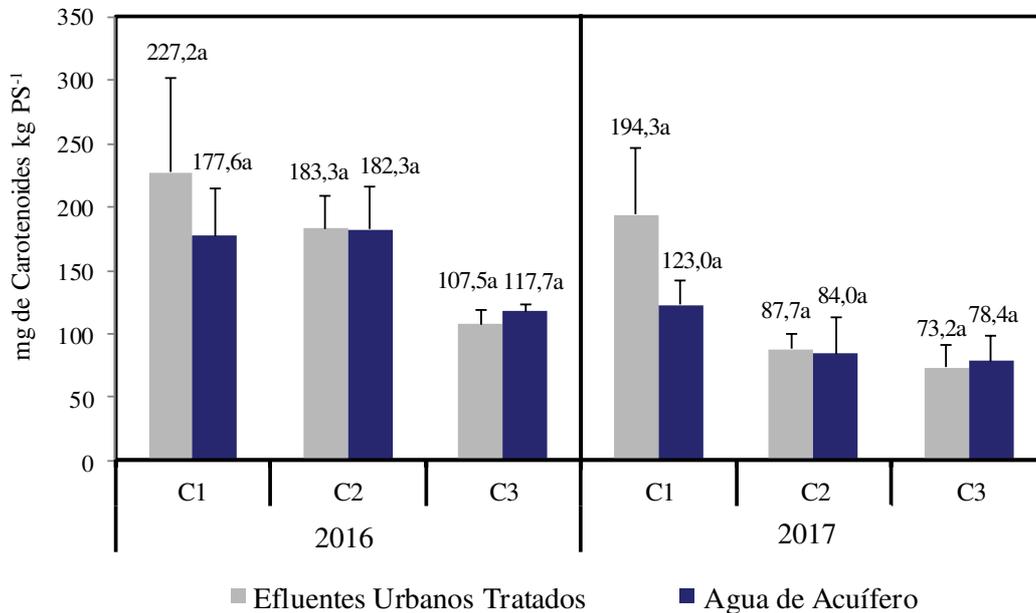


Figura II.3. Contenido de carotenoides en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

A diferencia de los resultados obtenidos en el contenido de clorofila, donde algunos cultivares mostraron respuestas favorables al riego con EUT, podría aseverarse con mayor certeza que el uso de estas aguas no incrementó el contenido de carotenoides en brócoli. Además, los valores obtenidos fueron inferiores a los informados por otros autores, quienes midieron contenidos de 320 a 470 mg kg⁻¹ peso seco (Dote Figueroa *et al.*, 2002).

II.1.3. Contenido de proteína soluble y total

No existieron diferencias significativas en el contenido de proteínas solubles y totales con el uso de EUT. El cultivar C3 fue aquel que presentó los valores promedios más bajos, siendo estos similares a los obtenidos por Masih *et al.* (2002) (Figura II.4).

Dado el aporte de nutrientes realizado con el EUT, el incremento en el contenido de proteínas podría haber sido superior, principalmente considerando la concentración de nitrógeno, nutriente esencial para la síntesis de proteínas. Sin embargo, en comparación a

otras investigaciones, Gupta *et al.* (2010) utilizando riego con aguas residuales sobre cultivo de mostaza negra (*Brassica nigra* L.), no hallaron modificaciones en los niveles de proteínas en comparación a un control.

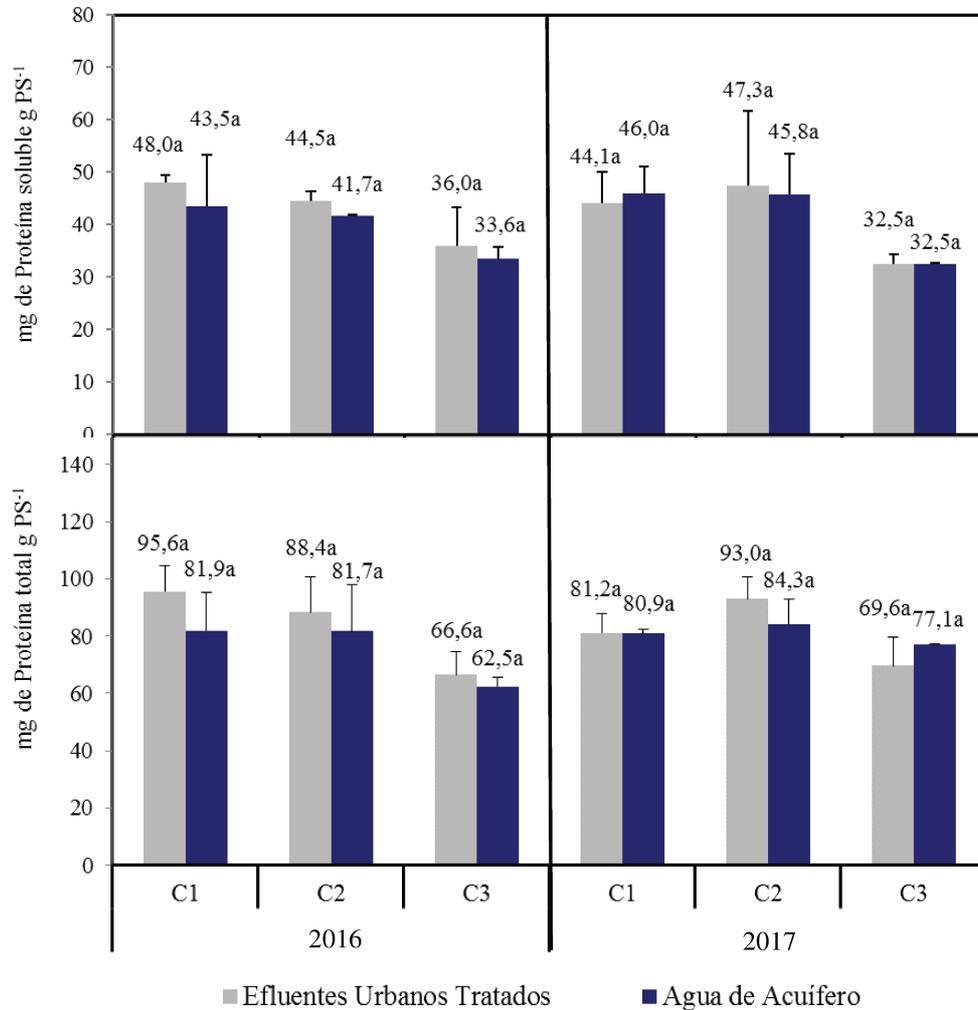


Figura II.4. Contenido de proteína soluble y total en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Algunos autores sugieren que las variaciones en el contenido de proteínas solubles pueden ocurrir debido a que los tejidos vegetales activan sistemas metabólicos que desencadenan la formación de este tipo de proteínas, consideradas también como proteínas del estrés, en respuesta a diversos factores ambientales y nutricionales.

II.1.4. Contenido de sólidos solubles

La cantidad de sólidos solubles no resultó estadísticamente diferente entre las calidades de agua, con la única excepción del cultivar C2 (2017) que respondió favorablemente al riego con EUT, no obstante, la magnitud de la respuesta no fue relevante ya que sólo se incrementaron 0,3 °Brix. Por lo tanto, podría afirmarse que el uso de EUT no modificó el contenido de sólidos solubles en brócoli (Figura II.5).

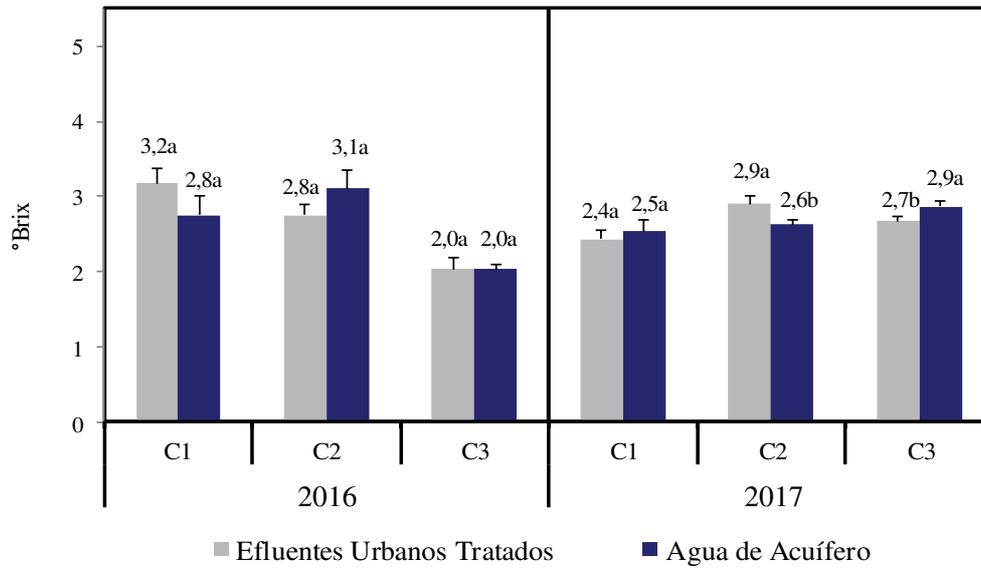


Figura II.5. Contenido de sólidos solubles en los diferentes cultivares de brócoli (C1: Matsuri, C2: Green Pia y C3: Almanor) según la calidad del agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

La determinación de sólidos solubles es un indicador bastante preciso del contenido de azúcares en una sustancia, ya que las mismas representan alrededor del 90 a 94% de los sólidos solubles totales (Rodríguez Paucar, 2014). Diversos autores midieron sólidos solubles en distintos cultivares de brócoli obteniendo valores que fluctuaron de 6,2 a 7,1 °Brix (Kehr y Díaz, 2012); 6,2 a 8,7 °Brix (Giletto *et al.*, 2001); 9,3 °Brix (Fernández León, 2012), resultados similares lograron Nicoletto *et al.*, (2016) comparando 5 cultivares con valores de 6,9; 8,2; 8,6; 9,0 y 9,3 °Brix.

Selim y All Mosa (2012), no encontraron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles totales en pellas de brócoli fertirrigadas con sustancias húmicas. Los cultivares utilizados en este estudio presentaron niveles de sólidos solubles inferiores a los reportados por otras investigaciones.

Si bien son numerosos los factores que pueden afectar el contenido de sólidos solubles en un producto vegetal, desde el cultivar hasta aspectos de la producción como el riego, fertilización y manejo postcosecha (Kleinhenz y Bumgarner, 2012), considerando el efecto de la fertilización ejercida con el uso de los EUT, evidentemente el aporte nutricional no fue determinante para mejorar este parámetro del cultivo.

II. CONCLUSIONES

- El efecto del riego con EUT tuvo una incidencia positiva sobre la síntesis de compuestos fenólicos de algunos cultivares de brócoli. El cultivar C1 fue aquel que presentó el de mayor poder antioxidante.
- No se encontraron evidencias suficientes para afirmar que el riego con EUT incidió favorablemente en la síntesis de clorofilas.
- El contenido de carotenoides, proteínas solubles y totales, y sólidos solubles no mostraron un efecto favorable a la aplicación de EUT.
- El aporte de nutrientes a través del uso de EUT no sería determinante para mejorar de manera contundente la calidad nutracéutica del cultivo de brócoli.

CAPÍTULO III

EFFECTOS DE LA BIOFORTIFICACIÓN CON SELENIO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS NUTRACÉUTICOS EN BRÓCOLI



III. RESUMEN

El Selenio (Se) es considerado un micronutriente esencial para humanos, y normalmente constituye un elemento deficitario en la dieta. Existen varias alternativas para aumentar la ingesta de Se, siendo una de ellas mediante la biofortificación de cultivos. El brócoli es considerado una hortaliza acumuladora de Se, constituyendo un medio viable para incrementar el consumo diario de este nutriente. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la biofortificación con Se en brócoli. Para ello se utilizaron tres cultivares F1: 'Matsuri' (C1), 'Green Pia' (C2) y 'Almanor' (C3), a los que se aplicaron tres dosis de fertilización con Se: 0 g ha⁻¹ (Se0), 50 g ha⁻¹ (Se50) y 100 g ha⁻¹ (Se100). En combinación con estos tratamientos, además se utilizaron dos tipos de calidad de agua para el riego: Efluentes Urbanos Tratados (EUT) y Agua de Acuífero (AC). Al momento de la cosecha se evaluó la partición de asimilados y producción de biomasa, el contenido de Se acumulado y la producción de compuestos nutraceuticos (compuestos fenólicos, contenido de clorofilas y carotenoides, proteínas solubles y totales, y contenido de sólidos solubles) presente en las pellas de brócoli. Los resultados determinaron que las aplicaciones de Se incrementaron la producción de biomasa en algunos cultivares y existió una acumulación significativa de Se en las pellas. No se manifestaron cambios significativos en los niveles de compuestos fenólicos, clorofilas y carotenoides, proteínas y contenido de sólidos solubles ante las aplicaciones de Se. El brócoli posee una elevada capacidad para acumular Se, por lo cual, debería considerarse como una hortaliza con gran potencial para su biofortificación con este nutriente.

Palabras claves: brócoli, selenio, biofortificación, alimento nutraceutico.

III. INTRODUCCIÓN

III.1. Alimentos fortificados

Los alimentos modificados son todos aquellos productos alimenticios con variación en su composición original (con adición de algunos nutrientes, especialmente vitaminas y minerales) para restaurar o aumentar su valor nutricional, o para satisfacer las necesidades específicas de alimentación de un determinado grupo etario de la población. A estos alimentos se los consideran funcionales y se denominan “alimentos fortificados, biofortificados o enriquecidos” (Olagnero *et al.*, 2007).

Los alimentos fortificados son aquellos que tienen suplementos en su contenido natural de nutrientes esenciales. Se fortifican generalmente productos a los que se puede agregar valor con poco costo adicional. El término fortificación, se define como la adición de uno o más nutrientes a un alimento con el fin de mejorar su calidad para las personas que lo consumen, en general con el objetivo de reducir o controlar una carencia de nutrientes (Bonilla Soto, 2016).

La carencia de micronutrientes en una determinada población ocasiona problemas de malnutrición, término erróneamente asociado a la desnutrición. Entre éstos, los nutrientes que suelen escasear más frecuentemente en cantidades adecuadas en la dieta son: hierro, zinc, cobre, calcio, magnesio, yodo y selenio; los cuales producen en la mayoría de los casos deficiencias que implican una mayor propensión a ciertas enfermedades, con la subsiguiente pérdida de calidad de vida y/o muerte prematura (López Bellido, 2014).

La adición de yodo a la sal de mesa sería un buen ejemplo de fortificación, otros ejemplos son productos panificados enriquecidos, cereales para desayuno, lácteos, galletas y pastas. Mediante el enriquecimiento se restauran o se superan los niveles iniciales de los nutrientes perdidos durante la manipulación del alimento (Alvídrez Morales *et al.*, 2002).

En los países occidentales la historia de este tipo de alimentos se remonta a las primeras prácticas de fortificación con vitaminas y minerales, así como también a la práctica de incluir ciertos componentes en los alimentos procesados con el objeto de complementar alguna deficiencia de la población. La búsqueda de terapias alternativas para algunas enfermedades, el envejecimiento de la población mundial, los avances tecnológicos, así como los cambios reglamentarios de diversos países han provocado un gran interés en el desarrollo de este tipo de alimentos (Alvídrez Morales *et al.*, 2002).

Estados Unidos es uno de los países con más desarrollo de alimentos funcionales para prevenir enfermedades en la población, por ejemplo, cereales destinados a mujeres de mediana edad, suplementados con calcio para prevenir la osteoporosis, o con ácido fólico para incrementar la salud cardiovascular, galletas adicionadas con proteínas, zinc y antioxidantes (Hasler, 2000). Otro ejemplo es la inulina, un carbohidrato no digerible que está presente en muchos vegetales, frutas y cereales, en la actualidad, a nivel industrial se extrae de la raíz de la achicoria y endivia (*Cichorium intybus* L.) y se utiliza ampliamente como ingrediente en alimentos funcionales (Madrigal y Sangronis, 2007).

En Europa se utilizan rótulos que indican "valor aumentado", así como en Alemania se comercializan golosinas adicionadas con vitamina Q10 y vitamina E. En Italia se ofrecen yogures con omega 3 y vitaminas, y en Francia azúcar adicionada con fructo-oligosacáridos para fomentar el desarrollo de la flora benéfica intestinal (Alvídrez Morales *et al.*, 2002).

Un programa de fortificación de un alimento debe contemplar que el mismo se consuma por la población en cantidades apropiadas, no diferenciarse perceptiblemente en color, aspecto, o sabor del alimento sin fortificar, ser completamente biológico, ser razonablemente estable en el alimento y estar próximo al precio del alimento sin fortificar (EcuRed, 2018).

III.1.1. Tipos de fortificación de alimentos

En general la fortificación de alimentos puede clasificarse en dos tipos básicos: la obligatoria y la voluntaria. La primera se refiere a la fortificación que según la legislación de cada país, debe realizarse a un alimento en forma obligatoria, sin excepción. Mientras que la voluntaria, es la que realizan las industrias a los alimentos sin que esté establecido por ley, con el fin de mejorar el contenido nutricional de los productos que procesan y otorgarles un valor agregado (Dary y Mora, 2013).

Normalmente la fortificación obligatoria es utilizada cuando un porcentaje importante de la población, o grupo etario específico tiene el riesgo de volverse deficiente en un micronutriente (Chávez Pérez, 2005), y cuando esas necesidades o riesgos pueden atenderse o minimizarse mediante la ingesta regular de alimentos fortificados con esos micronutrientes (Allen *et al.*, 2006).

Para implementar la fortificación obligatoria de un alimento con micronutrientes específicos se requiere de evidencia científica que indique que una población posee

deficiencias en esos nutrientes, como signos clínicos o bioquímicos de la deficiencia y/o bajos niveles de ingesta de micronutrientes; o incluso si se ha demostrado que el aumento en la ingesta de un micronutriente genera un beneficio en la salud pública, aunque la población no presente un riesgo serio de padecer deficiencias de ese micronutriente (Chávez Pérez, 2005).

A pesar de que la fortificación voluntaria no es un requisito indispensable en los alimentos en los que se lleva a cabo, es importante que los gobiernos ejerzan un control adecuado de la misma a través de leyes u otros convenios como códigos y prácticas para la industria (Bonilla Soto, 2016).

III.1.1.1. Biofortificación

Otro tipo de fortificación de alimentos es la “fortificación biológica o biofortificación”, consistente en el desarrollo de cultivos ricos en nutrientes, utilizando técnicas de fitomejoramiento convencional, biotecnología moderna y prácticas agronómicas (Panchón, 2010; HarvestPlus, 2018).

A diferencia de la fortificación, que se realiza durante el procesamiento de los alimentos, la biofortificación implica enriquecer el contenido de micronutrientes de especies vegetales comestibles, siendo definida como la intervención específica en materia de nutrientes, diseñada para potenciar el contenido de micronutrientes de los alimentos mediante el uso de prácticas agronómicas, principalmente vía fertilización (biofortificación agronómica) (López Bellido, 2014).

Desde el año 2004, el proyecto HarvestPlus coordinado por el International Food Policy Research Institute (IFPRI) y el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), lidera esfuerzos internacionales para aumentar el contenido de beta-caroteno, hierro y zinc en los cultivos básicos de mayor importancia en el mundo en vía de desarrollo: Arroz (*Oryza sativa* L.), batata (*Ipomoea batatas* L.), poroto (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum* sp.) y mandioca (*Manihot esculenta* L.). Este proyecto enfoca sus actividades principalmente en África y Asia (Panchón, 2010).

En América Latina y el Caribe en el año 2005 nace el proyecto AgroSalud, a través de una donación de la Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (CIDA), que evalúa, promueve y difunde el desarrollo de cultivos biofortificados (Panchón, 2010).

En la actualidad, se están poniendo en marcha numerosos programas para luchar contra el “hambre oculto”. Estos programas se centran en el consumo de alimentos básicos

ricos en micronutrientes cuya carencia, según la OMS, es responsable de la mayoría de los casos de malnutrición (FAO/OMS, 2014).

Actualmente 2.000 millones de personas sufren la carencia de algún micronutriente, por consiguiente, ésta debe ser una de las máximas prioridades de la comunidad mundial en materia de nutrición para el futuro inmediato. Para hacer frente a estos problemas son precisas medidas integradas e intervenciones complementarias en la agricultura y en el sistema alimentario en general, la sanidad pública y la educación, requiriéndose un apoyo político de alto nivel para fomentar la coordinación necesaria entre los diferentes sectores (López Bellido, 2014).

Resulta evidente que, en este ámbito, las prioridades en materia de investigación y desarrollo agrícola deben incluir la dimensión de la nutrición, y concretamente la obtención de alimentos enriquecidos. Los esfuerzos para aumentar el contenido de micronutrientes de los alimentos básicos directamente a través de la biofortificación son especialmente prometedores.

III.2. Selenio

III.2.1. Importancia del Selenio en la nutrición

El Selenio (Se) constituye un micronutriente esencial para humanos y animales (López Heras, 2013). Tradicionalmente, desde su descubrimiento por Berzelius en 1817, se había considerado un elemento altamente tóxico y contaminante (Gomez Díaz, 2014). No fue hasta inicios de la segunda mitad del siglo XX cuando se empezaron a atribuir funciones esenciales para la salud humana y animal. Sin embargo, el margen entre su toxicidad y su deficiencia es muy estrecho, con el riesgo que ello supone para un adecuado aporte a la población (López Bellido, 2013).

El Se es un componente fisiológico activo de gran importancia, que actúa como protector frente a diversos trastornos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y degenerativas. Además, se considera al Se muy importante para la reproducción, la función de la glándula tiroidea, la producción de ADN y la protección del cuerpo contra infecciones y el daño causado por los radicales libres (NIH, 2017). Se cree que su deficiencia está implicada en la enfermedad de Keshan, también conocida como miopatía cardíaca. Los niveles bajos de Se pueden ser la causa o la consecuencia de enfermedades como artritis, fibrosis quística o enfermedad celíaca (Cortés *et al.*, 2007).

Numerosas enfermedades se asocian con la presencia de radicales libres, los cuales son eliminados por la acción de otras moléculas que se oponen a este proceso tóxico en el organismo, los llamados sistemas antioxidantes defensivos (Castillo Godina *et al.*, 2013). Algunos mecanismos actúan sobre la cadena del radical inhibiendo su activación, otros neutralizan la acción de los radicales libres ya formados. En este último grupo pueden encontrarse enzimas detoxificadoras como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa, que utilizan elementos traza como cofactores para sus reacciones, destacándose la función del Se como elemento esencial y cofactor para su actividad (Bachiega *et al.*, 2015; Fuentes Lara, 2017).

El Se es un elemento esencial y un componente clave de al menos 13 selenoproteínas (OMS, 2006). El Se se presenta en la glutatión peroxidasa como un residuo de selenocisteína siendo el responsable de la eficiencia catalítica de dicha enzima. La protección contra el daño oxidativo por parte de ésta selenoproteína ha hecho que el Se se defina como un quimiorreceptor frente a la aparición de distintos tipos de cáncer (Witte *et al.*, 2001; Ríos Ruíz, 2008).

Las células que se nutren adecuadamente con Se son menos susceptibles a los efectos dañinos de los radicales de oxígeno que pueden reaccionar con ADN causando mutaciones y producir la activación oxidativa de los cancerígenos químicos o virales (Ríos Ruíz, 2008).

Se ha demostrado que una ingesta adecuada de algunas formas químicas específicas de Se resulta en una menor susceptibilidad al desarrollo de cáncer (Rayman *et al.*, 2008). Durante los últimos 20 años, se ha propuesto que la ingesta subóptima de Se podría estar asociada con el aumento en el desarrollo de cáncer colorrectal (Rayman 2000; 2002; Johnson *et al.*, 2010; Krehl *et al.*, 2012). Los compuestos orgánicos de Se son más efectivos en la quimioprotección del cáncer, especialmente el Se-metil-seleno-cisteína (SMSeC) (Ip *et al.*, 2000; Finley y Davis, 2001).

El SMSeC ejerce su acción anticarcinogénica al servir como precursor del ácido metilseleninico y metilselenol, los cuales serían los compuestos anticarcinogénicos activos (Vadhanavikit *et al.*, 1993; Ganther, 1999; Medina *et al.*, 2001). Puesto que el SMSeC es un aminoácido no proteínogénico, se encontraría totalmente disponible para la quimioprotección del cáncer (Wachowicz *et al.*, 2001), este compuesto se convierte fácilmente en selenol metilo y es una forma primaria de Se que se encuentra en el brócoli.

III.2.2. Selenio en la dieta poblacional

Si bien se ha reportado que una ingesta extremadamente baja ($< 10 \mu\text{g día}^{-1}$) es inusual; se observan ingestas subóptimas de Se en varias poblaciones del mundo (Meplan y Hesketh, 2012).

En México se estima una ingesta subóptima de $40 \mu\text{g día}^{-1}$ por persona adulta (Fuentes Lara, 2017). En Brasil, Ramos *et al.* (2010) reportan bajos niveles de Se consumidos por la población. En Europa el consumo oscila entre 11 y $94 \mu\text{g día}^{-1}$, valores muy bajos debido a diferentes factores como los cambios de hábitos alimenticios (López Bellido, 2014). En España, la concentración media de Se en sangre, es menor que la registrada en Estados Unidos y Canadá, con valores medios de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ en suero/plasma (López Bellido, 2013).

En Argentina, en un estudio reciente llevado a cabo por la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral, estimó que la ingesta diaria de Se de la población argentina, teniendo en cuenta el tipo de alimento de mayor consumo, la cantidad de alimento consumido y considerando la concentración de Se en los mismos, sería significativamente menor a los niveles recomendados, sugiriendo una ingesta subóptima de Se en Argentina (Sigrist *et al.*, 2012). Es necesario considerar que la demanda de Se en la población varía según las diferentes etapas de la vida con valores diarios que oscilan de 15 a $70 \mu\text{g}$ (Tabla III.1).

Tabla III.1. Cantidad diaria de Se recomendada según la etapa de la vida, en microgramos (μg)

Etapas de la vida	Cantidad
Bebés hasta los 6 meses de edad	15 μg
Bebés de 7 a 12 meses de edad	20 μg
Niños de 1 a 3 años de edad	20 μg
Niños de 4 a 8 años de edad	30 μg
Niños de 9 a 13 años de edad	40 μg
Adolescentes de 14 a 18 años de edad	55 μg
Adultos de 19 a 70 años de edad	55 μg
Adultos de 71 ó más años de edad	55 μg
Mujeres y adolescentes embarazadas	60 μg
Mujeres y adolescentes en período de lactancia	70 μg

Fuente: NIH, (2017)

No obstante, un consumo excesivo de Se puede causar serios trastornos en el organismo, desde náuseas, diarrea, erupciones en la piel, irritabilidad, cabello y uñas quebradizas, caída de cabello, decoloración de los dientes, y en elevadas cantidades problemas del sistema nervioso, dificultad para respirar, temblores, falla renal, ataques cardíacos e insuficiencia cardíaca (Jaffé, 1992; Torres y Chogar, 2014; Loayza Feijóo, 2015). En la Tabla III.2. se indican los límites máximos recomendados de Se presente en alimentos y suplementos dietéticos.

Tabla III.2. Límite máximo de ingesta diaria de Se según la etapa de la vida, en microgramos (μg)

Etapa de la vida	Límite máximo
Bebés hasta los 6 meses de edad	45 μg
Bebés de 7 a 12 meses de edad	60 μg
Niños de 1 a 3 años de edad	90 μg
Niños de 4 a 8 años de edad	150 μg
Niños de 9 a 13 años de edad	280 μg
Adolescentes de 14 a 18 años de edad	400 μg
Adultos	400 μg

Fuente: NIH, (2017)

III.2.3. Biofortificación de cultivos con Selenio

El consumo diario de Se puede incrementarse al ingerir alimentos ricos en Se (ajo, carnes, pescados), o bien a través de programas que contemplen la adición de Se al agua potable, el consumo de preparados farmacológicos, fortificación con Se en la fabricación de los alimentos o la biofortificación (López Bellido, 2014).

Dentro de la biofortificación se engloba a la complementación con Se en la alimentación del ganado, la producción de huevos ricos en Se, la mejora genética para incrementar la eficiencia en la absorción de Se del suelo (biofortificación genética) y el uso del Se como fertilizante para los cultivos (biofortificación agronómica) (FAO/OMS, 2014)

La capacidad de ciertas plantas para acumular y metabolizar el Se inorgánico a formas orgánicas depende de la biodisponibilidad de éste en el suelo y varía en función de la especie (López Heras, 2013). El Se no es un nutriente esencial para las plantas, a pesar de esto puede ser absorbido y acumulado en los tejidos (Hermosillo Cereceres, 2012).

Numerosos estudios se han enfocado en la biofortificación agronómica de cultivos con Se, como trigo (Hawkesford y Zhao, 2007), brócoli (Ramos *et al.*, 2011; Bachiega *et*

al., 2015; Borghese y Stoffel, 2017), kale (Lefsrud *et al.*, 2006), poroto (Hermosillo Cereceres, 2012; Sida Arreola, 2015), rábano (Pedrero *et al.*, 2006), lechuga (Hartikainen *et al.*, 1997; Ríos Ruíz, 2008; Ramos *et al.*, 2010), tomate (Castillo Godina *et al.*, 2013; Gomez Díaz, 2014), ajo (Ghasemi *et al.*, 2015; Astaneh *et al.*, 2018), espinaca (Saffar Yazdy *et al.*, 2012), achicoria (Germ *et al.*, 2007), acelga (Hernández Castro *et al.*, 2015), pepino (Haghighi *et al.*, 2016), berro (Manion *et al.*, 2014), frutilla (Palencia *et al.*, 2016), té (Zhao *et al.*, 2016), colza (Sharma *et al.*, 2010; López Heras, 2013) y hongos comestibles (Cortés *et al.*, 2007).

Para implementar un programa de biofortificación con éxito es necesario considerar: 1) que los cultivos biofortificados deben ser de alto rendimiento y rentables para el agricultor; 2) los cultivos biofortificados deben mostrar eficacia para disminuir la problemática de malnutrición en la población; 3) el cultivo biofortificado debe ser aceptado por los agricultores y los consumidores en la región de destino (Sida Arreola, 2015).

Las plantas captan el Se del suelo en su forma inorgánica. Las raíces de las plantas pueden absorber Se en forma de selenato, selenito y compuestos de Se orgánicos (selenocisteína y selenometionina) (Gomez Díaz, 2014). Sin embargo, las dos formas más utilizadas son el selenato y selenito de sodio, debido a que las plantas los absorben con mayor facilidad que las formas orgánicas (Ríos Ruíz, 2008).

La aplicación foliar es la forma más adecuada de añadir Se en los cultivos, ya que se reducen notablemente las posibilidades de contaminación de suelo por agregados en exceso (Gomez Díaz, 2014).

En Alemania, Noruega, Finlandia y Austria la concentración de Se en el suelo suele ser inferior a $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$, esta escasez de Se hace que sus habitantes consuman una cantidad de Se inferior a lo recomendado por la OMS. Para solucionar este problema de deficiencia en la dieta, las autoridades finlandesas han aprobado el uso de fertilizantes de Se en la agricultura (principalmente usando selenato de sodio), lo que ha producido un aumento de Se en los productos agrícolas (OMS, 2006; Ríos Ruíz, 2008).

El uso de fertilizantes suplementados con Se es un proceso muy eficaz que favorece la acumulación de Se en las plantas, mejorando incluso el desarrollo de la misma, sin embargo, es importante considerar que el crecimiento de la planta puede verse reducido por mecanismos de retroalimentación cuando la concentración de Se es demasiado elevada (Juárez Maldonado, 2018).

III.2.4. Brócoli biofortificado con Selenio

El brócoli es considerado una hortaliza acumuladora de Se (Borghese y Stoffel, 2017), por lo cual constituyen un medio viable para su biofortificación. Ramos *et al.*, (2011) clasifica al brócoli como una especie acumuladora secundaria de Se. Algunas especies son clasificadas como hiperacumuladoras, teniendo la capacidad de acumular 1.000 mg de Se kg⁻¹ MS, y éstas a su vez pueden ser divididas en acumuladoras primarias, cuando su capacidad de acumulación es superior a 2.000 mg de Se kg⁻¹ MS, y acumuladoras secundarias, cuando acumulan valores inferiores, cercanos a 100 mg de Se kg⁻¹ MS (Bachiega, 2014).

Investigaciones sobre la biofortificación de *Brassicáceas* tienen elevado potencial para el desarrollo de estudios en pacientes adultos sobre los efectos específicos de sus compuestos en la salud. Las investigaciones recientes sugieren que el potencial quimiopreventivo de estos alimentos mediante su inclusión en la dieta requiere del establecimiento de recomendaciones que incluyan de 3 a 5 porciones de *Brassicáceas* a la semana, basado en las evidencias científicas y epidemiológicas sobre la influencia de los compuestos bioactivos, sobre diferentes estados de enfermedades degenerativas y cáncer (López Chillón, 2017).

Finley *et al.*, (2000) en experimentos de laboratorio utilizando brócoli enriquecido en Se (500 mg de Se g⁻¹ de polvo seco) mediante el agregado de una solución fertilizante de selenato de sodio en el cultivo, determinaron una reducción significativa en la aparición de lesiones precancerosas de colon en ratones de laboratorio al ingerir este alimento. Zeng *et al.*, (2003) en un estudio similar determinaron que el brócoli enriquecido con Se activa genes pro-apoptóticos en respuesta a la formación de células tumorales en ratones de laboratorio.

III.3. Antecedentes

Debido a la baja disponibilidad de Se en la dieta y el papel de los vegetales como principal fuente de este elemento, muchos trabajos han surgido en los últimos años relacionados a la biofortificación de cultivos agrícolas con Se para mejorar sus propiedades alimenticias (Pedrero *et al.*, 2006).

Hartikainen *et al.* (1997) determinaron el efecto de la fertilización con Se sobre la composición química y propiedades antioxidantes de ryegrass (*Lolium perenne* L.) y

lechuga (*Lactuca sativa* L.). La adición de Se mejoró el contenido de proteínas solubles e insolubles, y afectó a los sistemas antioxidantes de estas plantas, la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) encontrada en ambas especies aumentó con la fertilización con Se, mientras que la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y la concentración de vitamina E disminuyeron. Concluyeron que la síntesis de SOD y vitamina E se redujo debido a que la función antioxidante del Se disminuyó el requerimiento de estos antioxidantes.

Ramos *et al.* (2001) biofortificaron brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) con Se demostrando que su contenido en los tejidos foliares se incrementó con una diferencia superior a 2 veces respecto a un control. Aproximadamente la mitad del total de Se acumulado en las hojas fue Se-metilselenocisteína y selenometionina.

Cartes *et al.* (2005) evaluaron como se produjo la inducción de la capacidad antioxidante en cultivo de ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. *aries*), a través del incremento de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa como resultado de aplicaciones de Se en las formas de selenito y selenato de sodio.

Finley *et al.* (2005) realizaron estudios en ratones para determinar si la biofortificación de brócoli con Se produciría una planta con beneficios superiores para la salud. Aunque el aumento de la concentración de Se en brócoli de 1 a 800 $\mu\text{g g}^{-1}$ MS dio como resultado la inhibición del cáncer de colon en ratones, también disminuyó el contenido de sulforafano en un 80% e inhibió la producción de la mayoría de los compuestos fenólicos en las plantas.

Lefsrud *et al.* (2006) con el objetivo de estudiar la influencia de Se sobre la acumulación de biomasa, pigmentos carotenoides y minerales en kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), evaluaron diferentes niveles de fertilización con Se (0 a 3,5 mg Se L⁻¹) aplicando soluciones de selenato y selenito de sodio. Los aumentos en selenato o selenito dieron como resultado una disminución en la biomasa de los tejidos foliares de kale, y ninguno de los tratamientos tuvo efecto sobre la acumulación de luteína y beta caroteno en las hojas. La aplicación de selenato incrementó significativamente la acumulación de Se, afectando las concentraciones de P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn y Mo en el tejido foliar. Sin embargo, no se observaron cambios en la acumulación de Se con aplicaciones de selenito.

Ríos Ruíz (2008) en un programa de biofortificación de lechuga (*Lactuca sativa* L.) aplicó distintas dosis de Se (5, 10, 20, 40, 60, 80 y 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$) mediante selenito y selenato en la solución nutritiva de riego, determinando que la concentración de Se en hoja aumentó, en mayor medida cuando se aplicó selenato en comparación a selenito, y en

ambas formas su máximo valor de acumulación se presentó con el agregado de $120 \mu\text{mol L}^{-1}$. Además, logró incrementar la capacidad antioxidante de lechuga mejorando su calidad nutricional.

Seppänen *et al.* (2010) investigaron el potencial de *Brassica rapa* y *B. napus* para asimilar Se y acumular formas orgánicas en sus semillas. El objetivo del estudio se centró especialmente en la fracción proteica y el aceite de las semillas como una fuente importante en las dietas de rumiantes. Si bien la aplicación de Se no afectó el contenido de aceite, si existió una alta acumulación (85%) de Se en semillas, principalmente en la forma de selenometionina. La biofortificación agronómica de *B. rapa* y *B. napus* mejoró la calidad nutritiva de las semillas.

Ramos *et al.* (2010) en lechuga, demostraron que el contenido de Se aumentó cuando se incorporó este elemento a través de diferentes dosis de fertilización con selenato y selenito (0, 2, 4, 8, 16, 32 y $64 \mu\text{mol L}^{-1}$). Ambas formas de Se tuvieron efectos sobre el metabolismo de la planta, en dosis bajas actuó como un antioxidante y mejoró el crecimiento del cultivo, mientras que a niveles más elevados tuvo efectos negativos reduciendo el rendimiento.

Sharma *et al.* (2010) afirmaron que altos niveles de Se pueden causar efectos adversos en las plantas. En un experimento con plantas de colza (*Brassica napus* L.) tratadas con dosis de selenato y selenito que oscilaron entre 0 y 4 mg Se kg^{-1} de suelo, el rendimiento total de materia seca de las plantas tratadas con Se disminuyó significativamente en comparación al control. Las plantas tratadas con selenato acumularon 75 a 160 veces más de Se en brotes, y 2 a 18 veces más en las raíces en comparación con las plantas tratadas con selenito. La acumulación de Se en hojas produjo un aumento significativo en la peroxidación de lípidos, clorofila, vitamina C y aminoácidos libres, y una disminución en los compuestos fenólicos, azúcares solubles totales y concentración de almidón.

Hermosillo Cereceres (2012) en un estudio sobre la influencia en plantas de poroto de la biofortificación con diferentes dosis y formas de Se (0, 10, 20, 40, 80 y $160 \mu\text{mol L}^{-1}$) de selenato y selenito en la solución nutritiva de riego, determinó que las mejores dosis fueron de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de selenito y $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato, logrando un efecto positivo sobre el metabolismo nitrogenado, acumulación de biomasa e incremento del rendimiento. El Se incrementó la calidad nutricional ya que aumentó el contenido de Fe y Zn al aplicar selenato, mientras que el selenito favoreció más el incremento de K y Se. Además, hubo un aumento de los compuestos fenólicos en un 33% para la dosis de $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ de selenito,

con lo que también aumentó la capacidad antioxidante, incorporar Se en un programa de biofortificación de poroto constituyó una excelente alternativa.

Saffar Yazdy *et al.* (2012) llevaron a cabo un experimento en hidroponía para investigar los efectos del Se sobre el crecimiento y características fisiológicas en plantas de espinaca (*Spinacia oleracea* L. cv. missouri). Las plantas fueron cultivadas en una solución Hoagland modificada con selenito de sodio a 0 (control), 1, 2, 4, 6 y 10 mg L⁻¹. Los parámetros de crecimiento como peso fresco y seco de parte aérea y raíces aumentaron en respuesta a la concentración más baja de Se (1 mg L⁻¹), sobre el control. Sin embargo, la aplicación de concentraciones más altas redujo estos parámetros en comparación con el control. La concentración de 1 mg L⁻¹ mejoró los niveles de clorofila a y b en 87 y 165%, respectivamente, no así los niveles más elevados. Los compuestos fenólicos totales en las hojas aumentaron directamente al aumentar el nivel de Se y las plantas tratadas con 10 mg L⁻¹ manifestaron los valores más altos.

Castillo Godina *et al.* (2013) evaluaron la biofortificación con Se en tomate mediante aplicaciones de 0, 2 y 5 mg L⁻¹ de selenito en la solución de riego. Como resultado lograron un aumento notable en la concentración de Se en tallo (0,46 y 0,52 mg de Se kg⁻¹), frutos (0,25 y 0,36 mg de Se kg⁻¹) y hojas (0,20 y 0,22 mg de Se kg⁻¹) para las dosis de 2 y 5 mg L⁻¹, respectivamente. Además, se produjo un aumento de 33,8% en el contenido de ácido ascórbico del fruto con la aplicación de 5 mg L⁻¹, lo cual determinó la factibilidad de la biofortificación del cultivo de tomate con dicho elemento.

Sin embargo, Gomez Díaz (2014) mejoró el crecimiento de plántulas de tomate tipo “saladette” en invernadero aplicando soluciones de 1 mg L⁻¹ de Se, mientras que aplicaciones de 5 y 10 mg L⁻¹ provocaron una disminución en el crecimiento de las plantas.

Manion *et al.* (2014) estudiaron en berro (*Nasturtium officinale* R. Br.) la influencia de la fertilización con Se sobre la producción de biomasa, carotenoides y glucosinolatos, cultivado en soluciones enriquecidas con Se (0; 0,125; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 y 4,0 mg Se L⁻¹), administradas como selenato de sodio. La biomasa fresca y seca no se vio afectada con Se, mientras que se produjo una reducción de los niveles de beta caroteno y luteína en respuesta al aumento de Se. Los niveles de glucosinolatos aumentaron, pero a dosis más elevadas se vieron afectados negativamente.

Bachiega *et al.* (2015) evaluaron en brócoli sometido a biofortificación con Se, la actividad antioxidante y acumulación de Se en diferentes estadios del cultivo (brotes, plántulas e inflorescencias), encontrando una respuesta positiva a la biofortificación en

todos los estadios, presentando un aumento de los compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y contenido de Se en los tejidos vegetales.

Ghasemi *et al.* (2015) para evaluar el impacto del Se y ácidos húmicos en la actividad antioxidante y contenidos de fenoles, flavonoides y alicina en ajo (*Allium sativum* L.) pulverizaron soluciones de selenato de sodio (0, 10, 20 y 30 μg de Se mL^{-1}) y aplicaron ácidos húmicos en fertirrigación (0, 10 y 20 kg ha^{-1}). La aplicación de bajas concentraciones de Se con cantidades moderadas de ácido húmico originó la mayor actividad antioxidante en ajo, al igual que la aplicación de altas concentraciones de Se sin ácidos húmicos. El tratamiento con Se disminuyó el contenido de flavonoides y alicina. Los hallazgos mostraron que los ácidos húmicos afectaron positivamente a la mayoría de las variables observadas, pero si el objetivo es la producción de ajo enriquecido con Se, debe aceptarse una disminución en algunos parámetros nutricionales.

Hernández Castro *et al.* (2015) con el objetivo de biofortificar plantas de acelga (*Beta vulgaris* L.) con Fe y Se, y determinar la influencia sobre la acumulación de estos elementos, el contenido de proteínas y nitratos, realizaron aplicaciones foliares de Fe (0, 2.500 y 5.000 mg L^{-1}) y Se (0, 10 y 20 mg L^{-1}). Los resultados indicaron que las concentraciones crecientes de Fe y Se promovieron una mayor acumulación de estos elementos. Las aplicaciones foliares de Se no afectaron la acumulación de nitrato, sin embargo, lograron una mayor acumulación de proteínas.

Palencia *et al.* (2016) evaluaron en un sistema de cultivo sin suelo el efecto del Se en la calidad de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch) en aplicaciones foliares y al sustrato. Los resultados del análisis indicaron efectos positivos del Se sobre la firmeza, sólidos solubles totales y acidez de los frutos. El Se mejoró el crecimiento de la planta, observándose un mayor número de hojas y mayor acumulación de clorofilas, sólo en hojas viejas.

Zhao *et al.* (2016) enriquecieron diferentes cultivares de té (*Camellia sinensis* L.) con Se en etapa de plántula, con el objetivo de identificar variaciones en las concentraciones de Se acumuladas entre cultivares. Los resultados determinaron diferencias significativas en favor de los tratamientos biofortificados respecto a un control sin Se. Además, algunos compuestos indicadores de calidad del té como el contenido de polifenoles y aminoácidos fueron sensibles al suplemento de Se en algunos cultivares, mientras que el contenido de azúcares solubles no se modificó respecto al control.

Haghighi *et al.* (2016) en experimentos con pepino (*Cucumis sativus* L.) añadieron Se a la solución nutritiva de riego en diferentes concentraciones (2, 4 y 6 mg L^{-1}) de

selenito de sodio. Obteniendo como resultado un aumento en peso fresco y seco de los tallos en el tratamiento con 2 mg L^{-1} y una reducción a niveles más elevados de Se. El contenido de clorofila y la tasa de fotosíntesis no fueron afectados por el Se. La concentración interna de CO_2 y la conductancia de los estomas disminuyeron con la adición de Se. Concluyen que una tasa de aplicación de 2 mg Se L^{-1} fue la más efectiva para mejorar características fisiológicas del pepino.

Borghese y Stoffel (2017) en un ensayo de valorización de residuos de cosecha de brócoli para su posible aprovechamiento en la elaboración de productos nutracéuticos, evaluaron el efecto de la suplementación foliar con Se sobre parámetros de calidad nutricional, las plantas fueron tratadas con dosis de 100 g ha^{-1} de Se en aplicaciones foliares de selenato y selenito de sodio, más un testigo sin suplementar. Los resultados obtenidos mostraron un incremento del 25 y 35% en el contenido de materia seca de hoja para selenato y selenito, respectivamente y un aumento del 85% en proteína soluble para selenato. No encontraron diferencias en el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante entre las plantas tratadas con Se y el control.

Khalid *et al.* (2017) evaluaron caracteres de crecimiento vegetativo, pigmentos fotosintéticos a través de determinaciones de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales, y composición de aceites esenciales en variedades de ciboulette (*Allium schoenoprasum* L.) bajo tratamientos foliares con Se (0, 3, 6, 9 y 12 mg L^{-1}). Los datos obtenidos determinaron que la mayor producción de biomasa aérea se logró con 6 mg L^{-1} , mientras que las mayores acumulaciones de clorofila a y carotenoides se produjo en las variedades tratadas con 12 mg L^{-1} , y en algunas variedades los tratamientos con 6, 9 y 12 mg L^{-1} produjeron las cantidades más altas de clorofila b. El tratamiento de 6 mg L^{-1} reportó el mayor incremento en aceites esenciales.

Astaneh *et al.* (2018) evaluaron el efecto de aplicaciones de soluciones de Se (0, 4, 8 y 16 mg L^{-1}) sobre la mejora de la actividad de enzimas antioxidantes en plantas de ajo (*Allium sativum* L.) sometidas a estrés salino en condiciones de hidroponía. Los resultados determinaron que las aplicaciones de Se incrementaron el índice de clorofila y el contenido de carotenoides, además aumentó el contenido relativo de agua y la absorción de K en las hojas de ajo, y disminuyó la absorción de Na bajo las condiciones de estrés salino.

En resumen, a partir de la biofortificación con Se, muchos estudios se han desarrollado con la intención de mejorar la calidad nutracéutica en numerosos cultivos de interés alimenticio, sin embargo, se observan resultados heterogéneos según la especie vegetal, el tipo de fertilizante, la metodología de aplicación y las condiciones de cultivo.

En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la biofortificación con Se en un cultivo de brócoli mediante aplicaciones foliares, y determinar su influencia sobre parámetros de crecimiento, acumulación de Se y síntesis de compuestos bioactivos con propiedades nutracéuticas.

III. HIPÓTESIS

La biofortificación con selenio producirá un aumento en la producción de biomasa, acumulación de Se y síntesis de compuestos nutraceuticos en brócoli.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos que se plantearon para evaluar el efecto de la biofortificación con Se en brócoli fueron:

- Determinar la partición de asimilados en hojas, tallo y pella en brócoli.
- Cuantificar la acumulación de Se en pellas.
- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales en pellas.
- Cuantificar el contenido de clorofilas y carotenoides en pellas.
- Cuantificar el contenido de proteínas solubles y totales en pellas.
- Cuantificar el contenido de sólidos solubles en pellas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Características del ensayo

Para cumplir con los objetivos planteados se evaluó en el segundo año de experimento (2017) el posible efecto de la fertilización con Se mediante aplicaciones foliares sobre la producción de biomasa, la acumulación de Se y síntesis de compuestos nutraceuticos en brócoli regado con EUT y AC. La implantación de las parcelas experimentales, la cosecha y determinación de partición de asimilados (hoja, tallo y pella) se realizó con la misma metodología descrita en el Capítulo I. Sección I.2 del presente estudio.

III.1.1. Diseño experimental

Los tratamientos resultaron de la combinación factorial de tres cultivares de brócoli: Matsuri (C1), Green Pia (C2) y Almanor (C3) y tres dosis de fertilización con Selenio: 0 g ha⁻¹ (Se0); 50 g ha⁻¹ (Se50) y 100 g ha⁻¹ (Se100), siendo todos los tratamientos regados con dos calidades de agua: Efluentes Urbanos Tratados (EUT) y Agua de Acuífero (AC). El diseño experimental se realizó en parcelas divididas con 5 repeticiones, las parcelas principales se correspondieron con la calidad de agua de riego, mientras que las subparcelas con los cultivares de brócoli y las dosis de Se.

III.1.2. Fertilización con Selenio

Para realizar la biofortificación con Se se preparó una solución de selenito de sodio (Na₂SeO₃ - C.A.S. 10102-18-8) en combinación con un coadyuvante marca Rizospray Extremo® (0,1%) con el objetivo de maximizar la eficiencia de penetración del Se. Se realizaron dos aplicaciones mediante un pulverizador de accionamiento manual, utilizándose la mitad de las dosis de cada tratamiento. La primera pulverización se realizó durante la formación temprana de las pellas (inicio de botón floral), y la segunda a los 7 días posteriores, completándose así la dosis total para cada tratamiento. En el tratamiento Se0 se realizó sólo la aplicación de agua destilada en presencia del coadyuvante.

III.1.3. Determinaciones analíticas

La determinación de acumulación de Se en las pellas de brócoli se realizó mediante un sistema en línea de espectrofotometría de absorción atómica con generación de hidruros e inyección de flujos (FI HGAAS), en el Laboratorio Central de Servicios Analíticos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral.

La preparación de las muestras y las determinaciones analíticas de compuestos fenólicos totales, contenido de clorofila y carotenoides, contenido de proteína soluble y total, y contenido de sólidos solubles se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones en Fisiología y Biología Molecular Vegetal (LIFiBVe), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral tal como se describió en el Capítulo II. Sección II.1. del presente estudio.

III.2. Análisis estadísticos

Todos los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa Infostat (Di Rienzo, 2011), aplicando análisis de varianza, comprobando que los datos cumplieran los principios de normalidad y homogeneidad de varianza, y comparación de medias con el test de Fisher ($p \leq 0,05$).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Partición de asimilados en hoja, tallo y pella

La materia seca (MS) acumulada se incrementó en dos cultivares en respuesta a la biofortificación con Se y el riego mediante EUT. Se observaron diferencias significativas en los cultivares C1 y C2 regados con EUT, con aumentos de 25 y 33% para la dosis de Se50; y 17 y 54% para Se100, respectivamente. Por otra parte, el uso de AC y los tratamientos con Se no representaron diferencias estadísticas en el peso de la MS total para ninguno de los tres cultivares utilizados (Tabla III.3).

Tabla III.3. Efecto del Se sobre la MS acumulada en hojas, tallo y pella (g MS planta⁻¹) de brócoli biofortificado con Se y regado con dos calidades de agua.

Riego	CV	Dosis de Se	Hojas	Tallo	Pella	Total
			(g MS planta ⁻¹)			
EUT	C1	Se0	26,8 c	10,7 a	21,7 b	59,3 c
		Se50	37,1 b	14,4 a	22,6 b	74,2 b
		Se100	42,0 a	14,5 a	34,7 a	91,2 a
	C2	Se0	34,3 b	13,6 a	18,4 b	66,4 b
		Se50	46,6 a	19,8 a	21,6 a	88,0 a
		Se100	38,8 ab	17,3 a	21,7 a	77,6 ab
	C3	Se0	42,0 a	20,8 a	30,3 a	93,2 a
		Se50	46,9 a	18,9 a	29,9 a	95,9 a
		Se100	45,4 a	17,3 a	31,4 a	94,2 a
AC	C1	Se0	32,0 a	12,3 a	28,2 a	72,6 a
		Se50	36,4 a	15,0 a	29,0 a	80,5 a
		Se100	38,9 a	15,3 a	27,0 a	81,3 a
	C2	Se0	34,3 a	14,4 a	20,3 a	62,2 a
		Se50	39,6 a	15,7 a	21,3 a	76,7 a
		Se100	33,0 a	13,7 a	19,3 a	66,2 a
	C3	Se0	42,0 a	16,7 a	28,9 a	87,7 a
		Se50	41,9 a	17,2 a	29,2 a	88,5 a
		Se100	45,1 a	18,4 a	26,1 a	89,6 a

Diferentes letras en columnas de un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Borghese y Stoffel (2017), obtuvieron en brócoli aumentos de 25 y 35% en MS de hojas mediante aplicaciones foliares con una dosis de 100 g ha⁻¹ de selenato y selenito de sodio, respectivamente. En comparación a estos resultados, aquí sólo pudieron ser observadas diferencias en el cultivar C1 regados con EUT.

Asimismo, Borghese *et al.* (2018) encontraron diferencias de 9,3 y 4,6% en el contenido de MS de pellas de brócoli cultivar Belstar, e incrementos de 6,3 y 1,4% en cultivar Legend, ambos biofortificados con Se mediante aplicaciones foliares de selenito y selenato de sodio, respectivamente.

En el trabajo aquí realizado se observaron aumentos en MS de pella en los cultivares C1 y C2 con EUT. En el caso del cultivar C1, es notable el incremento del tratamiento de Se100 (de 59%) en relación al testigo (Se0), y en el cultivar C2 el incremento fue menor tanto para Se50 ó Se100 (de 17% en ambos). Sin embargo, es importante mencionar que estas diferencias de incremento en el peso de la MS de pella no fueron observadas en ninguno de los demás tratamientos.

Estos resultados podrían sugerir la existencia de efectos beneficiosos del Se sobre una mayor producción de fotoasimilados e incrementos en la producción de MS en algunos cultivares, como también su traslocación hacia el órgano cosechable del brócoli. No obstante, en otras experiencias en cultivos afines al brócoli, Lefsrud *et al.* (2006) encontraron una disminución en la biomasa del tejido foliar en kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala) y Sharma *et al.* (2010) en plantas de colza (*Brassica napus* L.) tratadas con Se, mientras que Manion *et al.* (2014) no observaron cambios en la biomasa fresca y seca de plantas de berro (*Nasturtium officinale* R. Br.) fertilizadas con Se.

III.2. Acumulación de Se en el tejido vegetal

La acumulación de Se en brócoli fue significativa en todos los tratamientos respecto al testigo (Se0), se observó un aumento importante del contenido de Se en las pellas, afirmando las aseveraciones que destacan la capacidad del brócoli para acumular Se en sus tejidos (Ramos *et al.*, 2011; Borghese y Stoffel, 2017).

En los tratamientos de Se50 los cultivares manifestaron aumentos promedios de 0,70 y 0,76 mg Se kg⁻¹ MS de pella bajo riego con AC y EUT, respectivamente. De igual forma, en los tratamientos de Se100, donde se duplicó la dosis aplicada, se produjo una mayor respuesta a su acumulación con valores promedios de 1,29 y 1,41 mg Se kg⁻¹ MS, tanto para los cultivares regados con AC y EUT (Figura III.1).

Los efectos de Se sobre brócoli coinciden con los resultados que obtuvieron Borghese *et al.* (2018) que en un estudio similar lograron acumular Se en pellas de brócoli, siendo los valores obtenidos más elevados, a razón de 6 a 7 mg Se kg⁻¹ MS, a partir de aplicaciones foliares de selenato y selenito de sodio.

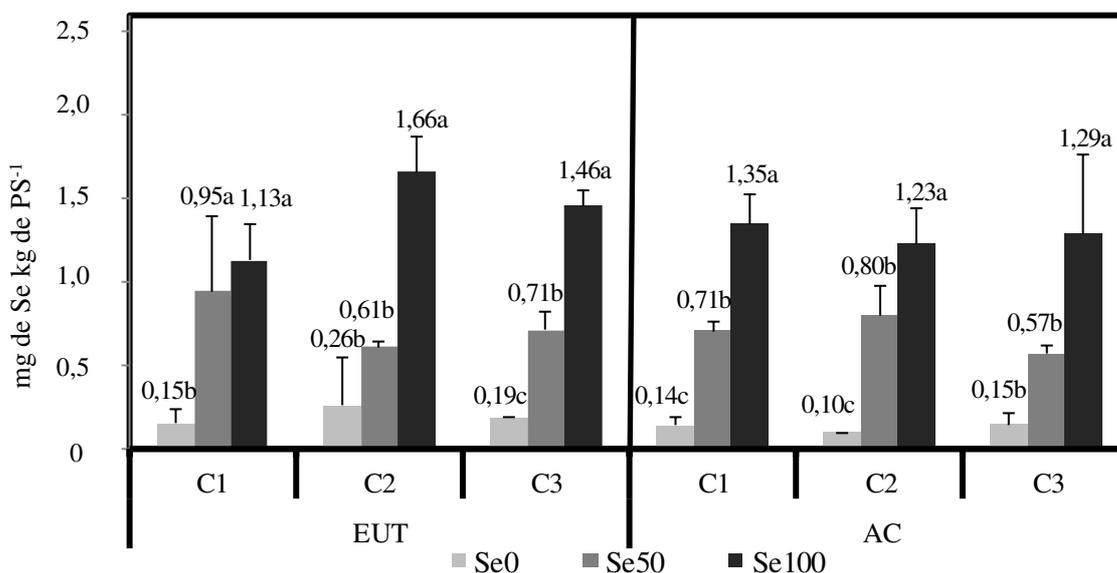


Figura III.1. Acumulación de Se según la dosis aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

En estudios similares de biofortificación con Se en brócoli se lograron alcanzar valores de hasta 166 mg de Se kg⁻¹ de MS de pellas, realizando aplicaciones frecuentes de selenato de sodio a una concentración de 1,5 μmol , desde inicio de formación de pellas hasta su completo desarrollo (Bachiega *et al.*, 2015).

De acuerdo a los valores promedios de Se acumulados en los tratamientos de Se100, se podría inferir que un adulto podría suplir la dosis diaria de Se recomendada según organismos internacionales de la salud (NIH, 2017) con el consumo de una porción aproximada de 340 g de brócoli fresco, esto equivale al peso promedio de una pella mediana (Cifuentes Ochoa, 2014).

El brócoli posee gran potencial como especie hortícola para su biofortificación con Se, y así utilizarse como un medio adecuado y natural para aumentar la incorporación de este elemento en la dieta de la población. Además, se destaca la posibilidad de incorporar Se a este cultivo mediante técnicas de aplicación foliar, mucho más eficientes que otros

métodos de fertilización, como puede ser la incorporación al suelo o sustrato, evitando una posible contaminación por excesos de este nutriente (Gomez Díaz, 2014).

III.3. Efecto de la biofortificación con Se sobre la síntesis de compuestos nutraceuticos en brócoli

III.3.1. Contenido de compuestos fenólicos totales

A partir del análisis de los compuestos fenólicos totales se pudo determinar que los tratamientos con Se50 superaron en promedio al testigo (Se0), sólo en un tratamiento las diferencias fueron significativas, observándose esto en el cultivar C1 y mediante el riego con AC. No obstante, la mayoría de los tratamientos no manifestaron diferencias estadísticas, por lo cual, no podría afirmarse con cierto nivel de significancia que el Se puede estimular una mayor producción de compuestos fenólicos (Figura III.2).

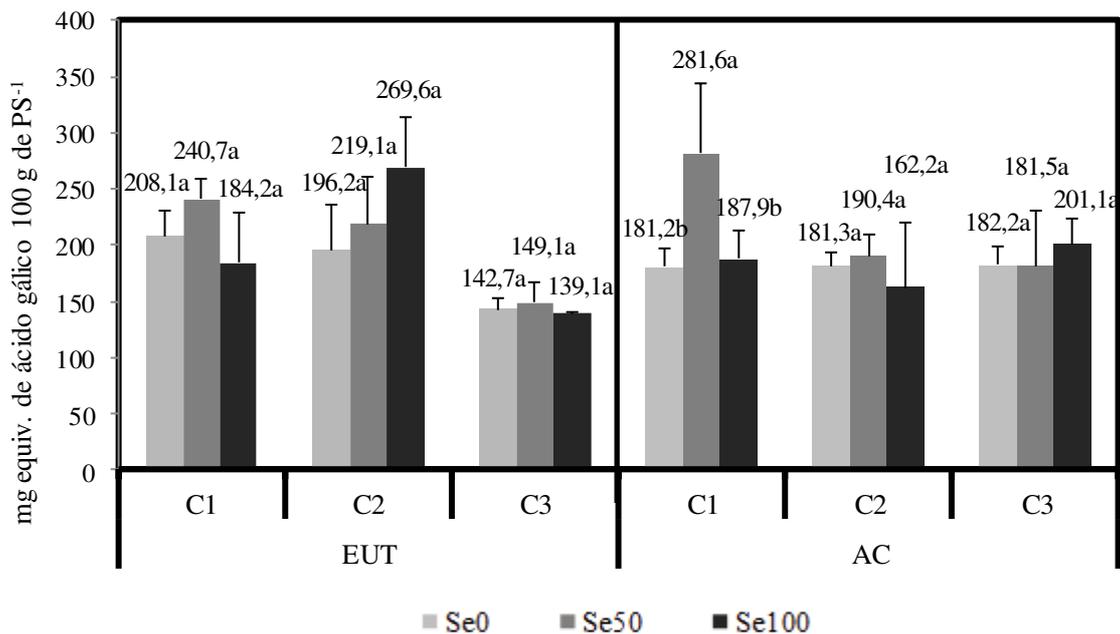


Figura III.2. Contenido de compuestos fenólicos totales según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

En un estudio para determinar el efecto de aplicaciones foliares durante el inicio de formación de pellas sobre el contenido de compuestos fenólicos, se trataron plantas de

brócoli con 100 g ha⁻¹ de selenito de sodio, no encontrando resultados positivos sobre estos compuestos tanto en hojas como en pellas (Borghese y Stoffel, 2017).

Múltiples investigaciones determinan que a concentraciones elevadas el Se puede ejercer un efecto depresor en la producción de compuestos fenólicos totales. Finley *et al.* (2005), aumentaron la concentración de Se en brócoli de 1 a 800 µg g⁻¹ MS de pellas y ocurrió una disminución en la producción de compuestos nutraceuticos como sulforafano y compuestos fenólicos, similares resultados obtuvieron Robbins *et al.*, (2005).

Pöldma *et al.* (2011) evaluando tratamientos foliares con soluciones de Se (10, 50 y 100 µg Se mL⁻¹) sobre cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) y Sharma *et al.* (2010) en experimentos con plantas de colza (*Brassica napus* L.) observaron disminuciones en el contenido de fenólicos al aumentar las dosis de Se. Elguera *et al.* (2013) a dosis superiores a 0,5 mg Se mL⁻¹ observaron una reducción de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en *Lepidium sativum* L.

Sin embargo, algunos autores destacan la capacidad del Se de incrementar el contenido de fenólicos, Bachiega *et al.* (2015) aumentaron un 12% el contenido de estos compuestos en tratamientos con Se durante diferentes estadios fenológicos de brócoli. Gąsecka *et al.* (2015) aumentaron la producción de compuestos fenólicos y flavonoides en hongos comestibles (*Pholiota sp* y *Pleurotus sp*) creciendo en sustratos suplementados con sales de Se. Similares respuestas encontraron Zhao *et al.* (2016), enriqueciendo con Se cultivares de té (*Camellia sinensis* L.) y Saffar Yazdy *et al.* (2012) en espinaca (*Spinacia oleracea* L.).

Por lo tanto, los efectos del Se pueden ser muy disímiles, dependiendo de la especie vegetal, variedad y procesos de biofortificación entre otros factores, se pueden lograr resultados promisorios relativos a la acumulación de Se en los tejidos, pero producirse interacciones con el metabolismo del vegetal que determinen reducciones considerables en la producción de otros compuestos, afectando la calidad nutraceutica de los cultivos en general (Pöldma *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2010, Elguera *et al.*, 2013), y en brócoli la producción de componentes bioactivos como fenólicos y glucosinolatos en particular (Robbins *et al.*, 2005).

III.3.2. Contenido de clorofilas y carotenoides

III.3.2.1. Contenido de clorofila a, b y total

El contenido de clorofila a, b y total no presentaron cambios para los diferentes tratamientos con Se, algunos cultivares mostraron una tendencia a presentar un mayor contenido de clorofilas en el tratamiento testigo (Se0) en relación al resto. En los cultivares regados con EUT los tratamientos de Se100 manifestaron los niveles más bajos para estos parámetros (Figura III.3).

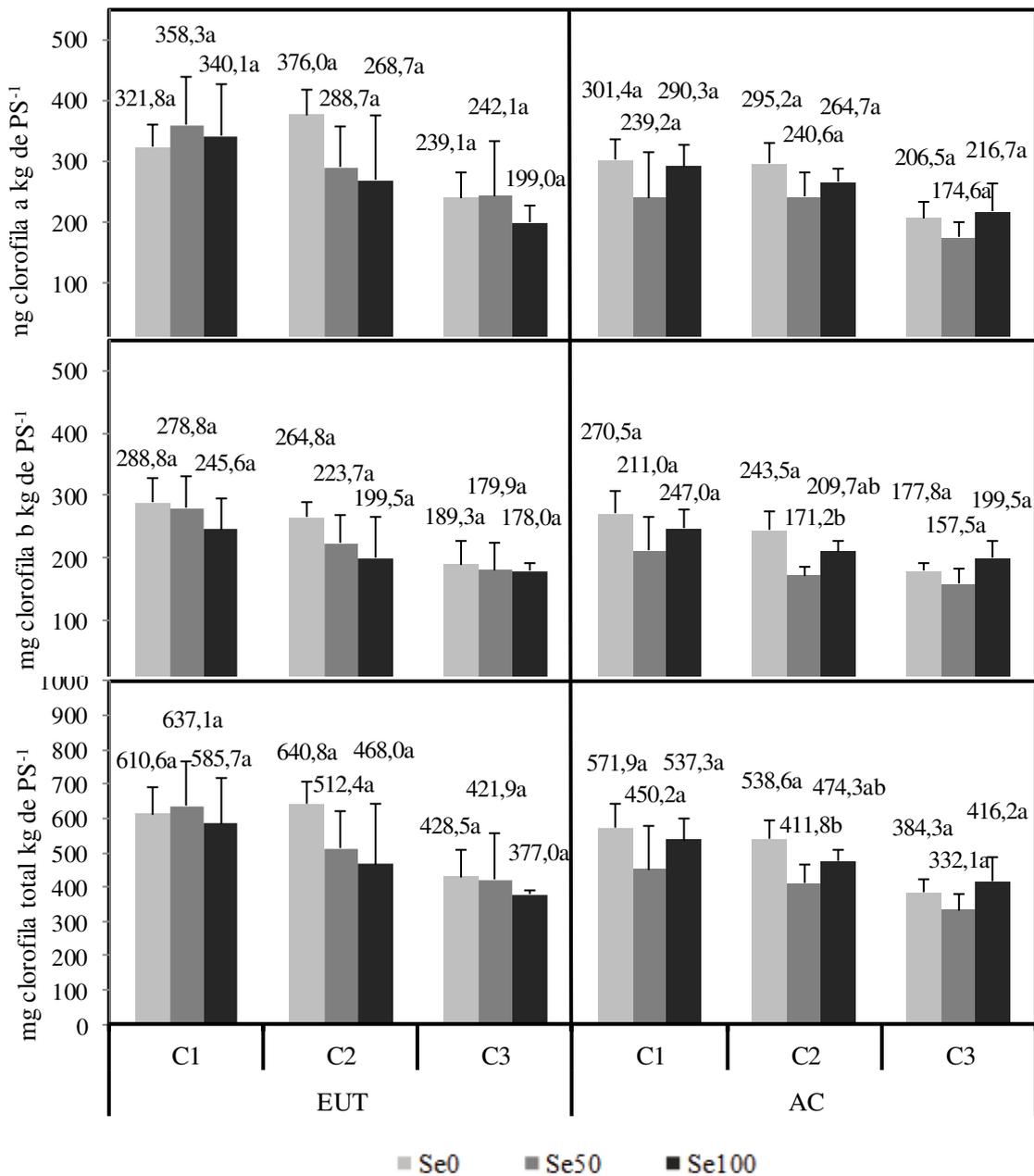


Figura III.3. Contenido de clorofila a, b y total según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

El metabolismo del Se está estrechamente relacionado con el metabolismo del nitrógeno en las plantas (Abbas, 2012), la asimilación del Se en las plantas interviene en las vías metabólicas del nitrógeno, constituyente principal de la molécula de clorofila (Malagoli *et al.*, 2015).

Dong *et al.* (2013) aumentaron el contenido de clorofila a y b en plantas de *Lycium chinense* L. fertilizadas con Se. Por su parte, Khalid *et al.* (2017) en ciboulette (*Allium schoenoprasum* L.) determinaron que una dosis de 3 y 6 mg Se L⁻¹, produjo el mayor contenido de clorofila b, dosis más elevadas no tuvieron efecto.

Palencia *et al.* (2016) obtuvieron efectos beneficiosos del Se en frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch) sobre el contenido de clorofilas en las hojas viejas, no así en las hojas nuevas de las plantas, que no presentaron diferencias en relación al control.

Sin embargo, Saffar Yazdy *et al.* (2012) en espinaca (*S. oleracea* L.) incrementaron los niveles de clorofila a y clorofila b en un 87 y 165%, sólo a dosis bajas de selenato de sodio, a razón de 1 mg L⁻¹, pero cuando aumentaron los niveles de Se a 10 mg L⁻¹, los efectos sobre la producción de clorofilas fueron negativos, obteniendo valores inferiores al control sin Se, estas respuestas fueron similares a las obtenidas en este estudio.

Haghighi *et al.* (2016) en pepino (*Cucumis sativus* L.) no encontraron efectos de la adición de Se sobre el contenido de clorofila y la tasa de fotosíntesis.

Un aumento en el contenido de clorofilas puede atribuirse al efecto de protección que ejerce el Se sobre enzimas del cloroplasto, y por lo tanto, se estimula la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos (Pennanen *et al.*, 2002). No obstante, ante concentraciones muy elevadas de Se se produce un efecto adverso sobre la producción de porfobilinógeno sintetasa, una enzima fundamental para la biosíntesis de clorofila (Padmaja *et al.*, (1995).

Por ende, es sumamente importante considerar que los efectos positivos o negativos del Se con el metabolismo de los pigmentos fotosintéticos depende notablemente de su concentración (Malagoli *et al.*, 2015), existiendo un límite muy estrecho en esta interacción (Kaur *et al.*, 2014).

III.3.2.2. Carotenoides

El nivel de carotenoides presentó una respuesta similar a la obtenida en los análisis del contenido de clorofilas, sin resultados significativos en los tratamientos con Se (Figura III.4). Los resultados coinciden con los encontrados por Lefsrud *et al.* (2006) en kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), que no observaron cambios en la acumulación de

pigmentos carotenoides aplicando soluciones de selenato y selenato hasta una dosis máxima de 3,5 mg Se L⁻¹. Manion *et al.* (2014) en estudios sobre berro (*N. officinale* R. Br.) los niveles de beta caroteno y luteína se vieron afectados negativamente en respuesta al aumento de Se, los mismos resultados encontró Abbas (2012) en sorgo (*Sorghum bicolor* L.).

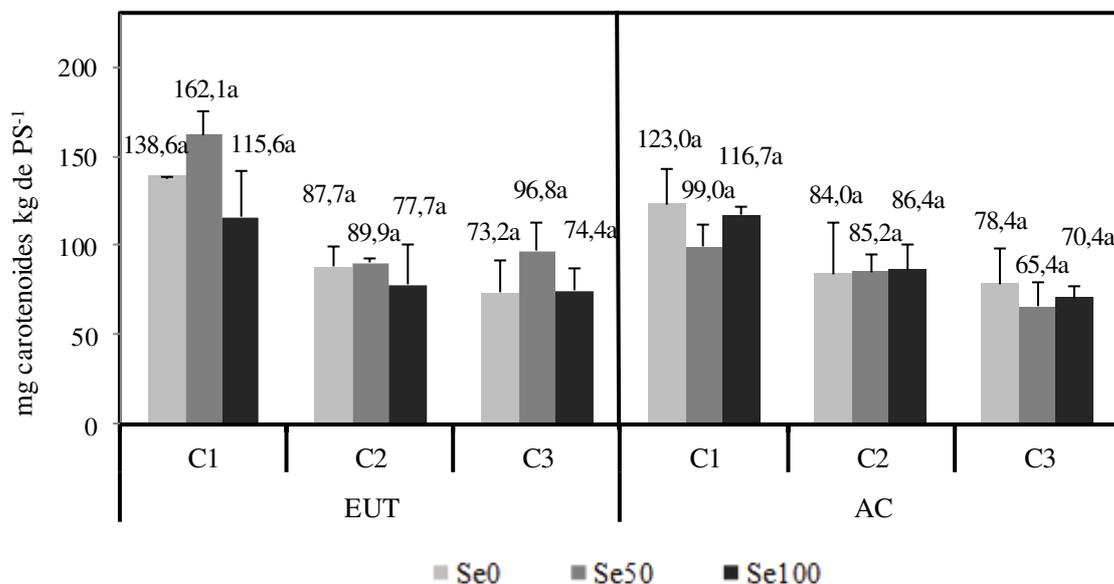


Figura III.4. Contenido de carotenoides según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Sin embargo, algunas investigaciones presentan tendencias opuestas, Dong *et al.* (2013) en estudios sobre *L. chinense* L. biofortificadas con Se, lograron incrementos notables en los niveles de carotenos, en el orden de 200 a 400%. De igual forma, Astaneh *et al.* (2018) en ajo (*A. sativum* L.) y Khalid *et al.* (2017) en ciboulette (*A. schoenoprasum* L.).

III.4. Contenido de proteína soluble y total

Los resultados mostraron una mejora en el contenido de proteínas en los tratamientos con Se, algunos cultivares manifestaron aumentos en promedio de un 5 a 10% para Se50, y hasta un 15% para Se100, pero no podría afirmarse que el Se estimuló efectivamente la síntesis de proteínas, ya que estas diferencias no fueron significativas, a excepción del cultivar C2 regado con EUT (Figura III.5).

Hartikainen *et al.* (1997) lograron mejoras en los niveles de proteínas en ryegrass (*Lolium perenne* L.) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) con la adición creciente de 8, 16 y hasta 33 $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ de suelo. Hu *et al.* (2001) aumentaron la cantidad de aminoácidos esenciales y proteínas en plantas de té (*C. sinensis* L.) enriquecidas con Se, Hernández Castro *et al.* (2015) en acelga (*Beta vulgaris* L.) obtuvieron similares resultados.

Algunas investigaciones reportan que un aumento en los niveles de proteínas es dependiente del tipo de sal de Se utilizada como fertilizante, muchas plantas asimilan al Se principalmente como selenato, y en mucho menor grado como selenito (Broadley *et al.*, 2006).

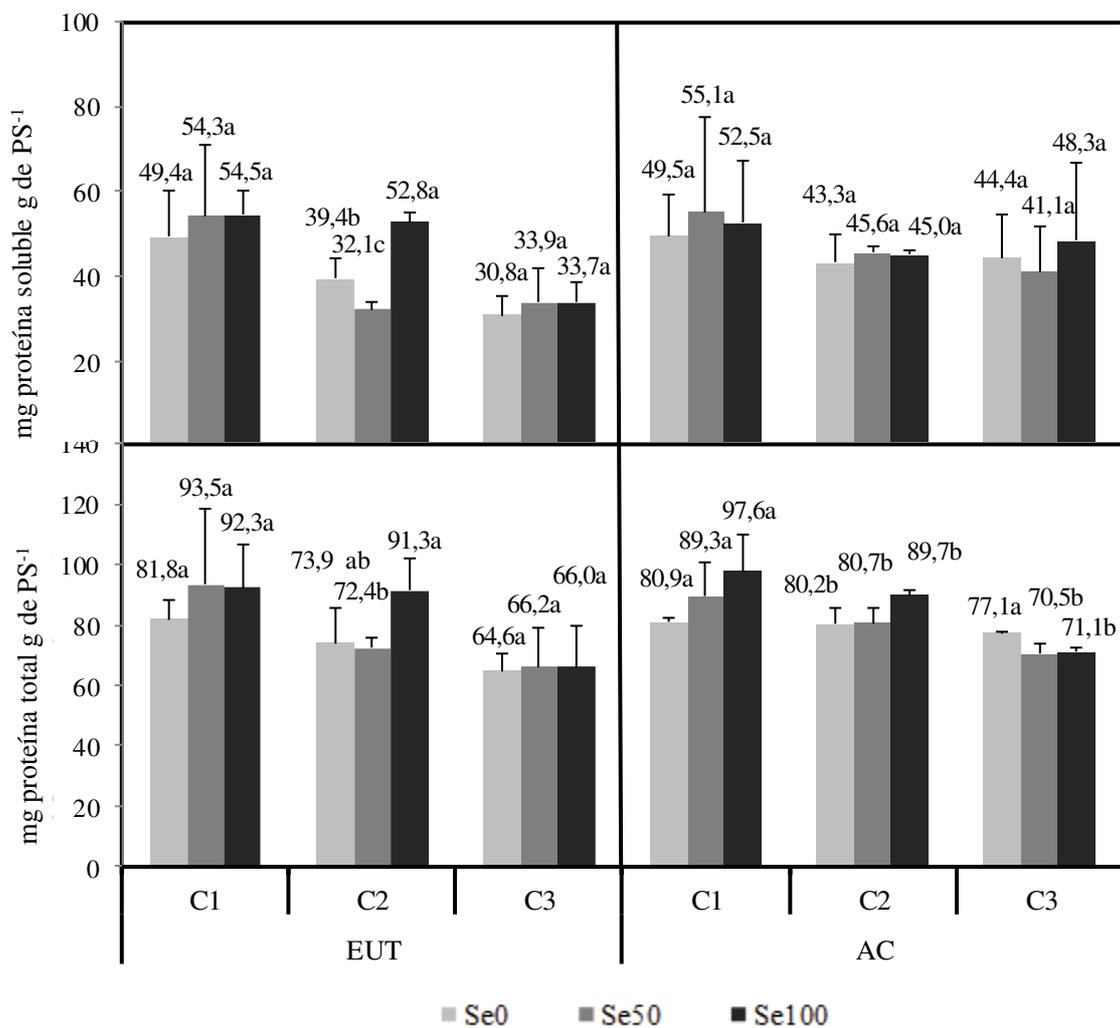


Figura III.5. Contenido de proteína soluble y total según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

En brócoli, Borghese y Stoffel (2017) encontraron diferencias del 85% de proteína soluble respecto a un control sin Se cuando aplicaron selenato de sodio, sin embargo, no lograron efectos al utilizar selenito de sodio. Munshi *et al.* (1990) lograron resultados positivos en papa (*Solanum tuberosum* L.) aplicando al suelo 11,2 kg ha⁻¹ de selenito de sodio, pero a dosis más elevadas no lograron incrementar el contenido de proteínas.

Cuando el Se es suministrado en las plantas se transforma en Se orgánico para incorporarlo en las biomoléculas, siguiendo la ruta metabólica del azufre en la formación de selenocisteína, que luego se incorpora como selenometionina, y finalmente pasa a proteínas (White *et al.*, 2004; Hernández Castro *et al.*, 2015). La biofortificación agronómica de las especies de *Brassica* sp con Se puede mejorar la calidad nutritiva al aumentar la fracción de proteínas, principalmente una cantidad significativa de selenometionina (Seppänen *et al.*, 2010).

Numerosos estudios han demostrado que a través de la aplicación de Se en pequeñas cantidades es posible aumentar el contenido de proteínas en varios cultivos, y la eficacia de este proceso depende de la especie, las sales de selenio y su forma de aplicación (Mao *et al.*, 2014).

III.5. Contenido de sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles no se modificó significativamente ante el agregado de Se, por lo tanto, no se evidenciaron efectos de los tratamientos sobre este parámetro de calidad de brócoli (Figura III.6).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Zhao *et al.* (2016) quienes en estudios sobre cultivares de té (*C. sinensis* L.) enriquecido con Se concluyeron que el contenido de sólidos solubles no fue sensible al suplemento de Se.

No obstante, otros autores encontraron efectos positivos y negativos, Turakainen *et al.* (2004) mediante la adición de Se retrasaron el envejecimiento en estolones y raíces de papa (*S. tuberosum* L.) provocando un aumento considerable en el contenido de azúcares solubles y almidón. Palencia *et al.* (2016) lograron resultados similares en frutilla (*F. x ananassa* Duch). Zhu *et al.* (2018) con la aplicación foliar de 1 mg L⁻¹ de selenato de sodio aumentaron el contenido de azúcares solubles (glucosa y fructosa) en tomate.

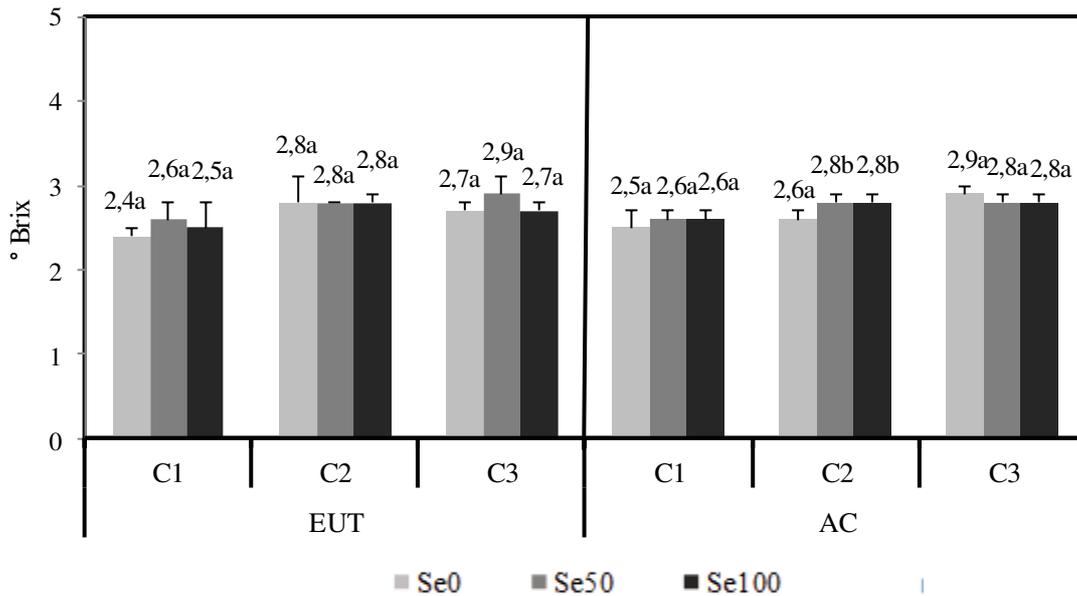


Figura III.6. Contenido de sólidos solubles según las dosis de Se aplicada para los distintos cultivares y tipo de agua de riego. Diferentes letras en un mismo cultivar indican diferencias significativas según test de LSD Fisher ($p \leq 0,05$).

Sin embargo, Pezzarossa *et al.* (2012) con la adición foliar 1 mg L^{-1} de selenato de sodio en durazno (*Prunus persica* L.) resultó en un aumento significativo en la concentración de Se en hojas y frutos, produciendo una disminución en el contenido de sólidos solubles en frutos. Abbas (2012) a una concentración de 12 mg Se L^{-1} , obtuvo un menor contenido de sólidos solubles en sorgo (*Sorghum bicolor* L.) respecto al control, lo mismo encontraron Sharma *et al.* (2010) en colza (*B. napus* L.).

El Se es un nutriente esencial para los animales y el hombre, pero su rol en las plantas necesita una mayor exploración (Kaur *et al.*, 2014). Las investigaciones desarrolladas hasta ahora ponen de manifiesto las complejas interacciones que ocurren en el metabolismo vegetal durante la producción de compuestos bioactivos o nutraceuticos, y como los intentos de maximizar un componente como el Se podrían generar interacciones inesperadas que afecten la síntesis de otros compuestos orgánicos.

En brócoli, se reportan efectos beneficiosos del Se a bajas dosis de fertilización (Finley *et al.*, 2005; Elguera *et al.*, 2013) pero puede tornarse perjudicial e incluso tóxico en niveles más altos. Estas afirmaciones se manifestaron en los resultados del presente estudio, las aplicaciones de Se mostraron algunos resultados positivos sobre la producción de biomasa, se logró una elevada respuesta en la acumulación de Se en pellas, sin embargo,

no se observó una mejora en los niveles de compuestos fenólicos totales, proteínas, clorofilas, pigmentos carotenoides y contenido de sólidos solubles.

Los programas de biofortificación con Se deben prestar especial atención a las interacciones entre el Se y las principales vías metabólicas de la planta, evaluando los efectos recíprocos o antagónicos de esas interacciones (Malagoli *et al.*, 2015), y así realizar los ajustes necesarios para potenciar la capacidad nutraceútica de vegetales como el brócoli, y evitar resultados desfavorables.

III. CONCLUSIONES

- La aplicación foliar de Se estimuló una mayor producción en MS de hojas, pella y total sólo en los cultivares C1 y C2 regados con EUT.
- El contenido de Se en las pellas de brócoli aumentó significativamente en los tratamientos, siendo estos valores crecientes a medida que se incrementó la dosis aplicada de 50 a 100 g ha⁻¹ de Se.
- No se manifestaron cambios significativos en los niveles de compuestos fenólicos totales, proteínas, clorofilas y carotenoides y contenido de sólidos solubles ante las aplicaciones de Se.

CONCLUSIONES GENERALES

- El aporte de agua y nutrientes mediante el riego subterráneo con EUT mejoró la producción de biomasa aérea en algunos cultivares de brócoli, la calidad de las pellas e incrementó el rendimiento total en todos los cultivares, siendo éstas aptas para su consumo en fresco, ya que los análisis microbiológicos y parasitológicos demostraron ausencia de patógenos perjudiciales para el ser humano.
- El riego con EUT no sería determinante para mejorar de manera contundente la calidad nutracéutica de brócoli, tuvo sólo incidencia positiva en la síntesis de compuestos fenólicos de algunos cultivares, sin embargo, no aumentó la síntesis de otros compuestos de interés como carotenoides, proteínas, clorofilas y sólidos solubles.
- La fertilización con Se aumentó significativamente el contenido de este elemento en las pellas de brócoli y estimuló una mayor producción de biomasa en algunos cultivares, no obstante, no se manifestaron cambios significativos en la síntesis de compuestos nutracéuticos.

DISCUSIONES GENERALES

La utilización de Efluentes Urbanos Tratados (EUT) permitió confirmar que constituye una oportunidad de aprovechamiento muy importante para el riego de brócoli, teniendo en cuenta que no sólo aportó el agua necesaria para el ciclo biológico de las plantas, sino también representó una fuente de nutrientes adicionales para el crecimiento y desarrollo del cultivo según lo afirmado por Crespi *et al.* (2009); D'andrea *et al.* (2014).

El brócoli es una de las hortalizas de mayor valor nutricional por unidad de peso, lo que se respalda por los numerosos estudios citados en esta tesis, que han demostrado que su consumo regular reduce el riesgo de padecer determinadas enfermedades (Finley *et al.*, 2000; Zeng *et al.*, 2003), sus efectos beneficiosos se atribuyen a la presencia de nutrientes antioxidantes en su composición, que hacen de esta hortaliza un alimento funcional o nutracéutico. Además, el brócoli posee la capacidad de acumular Selenio (Se) en sus tejidos, un mineral esencial para la protección contra el daño oxidativo de las células humanas, y muchas veces deficitario en la dieta (Borghese y Stoffel, 2017).

En esta tesis se estudiaron durante dos años los efectos de utilizar EUT sobre parámetros de producción, síntesis de compuestos nutracéuticos, calidad e inocuidad de pellas en diferentes cultivares de brócoli. Además, se analizó el posible efecto de la biofortificación del cultivo mediante aplicaciones foliares con Se, midiendo su capacidad para acumular este elemento, y los efectos que el mismo representó sobre la fisiología y síntesis de compuestos nutracéuticos.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron confirmar que el uso de EUT para el riego de brócoli aumentó la producción de materia seca de las plantas, lográndose pellas de mayor diámetro y peso. En coincidencia con lo expresado por Moscoso (1995), estos resultados sugieren que el aporte de nutrientes en las formas solubles que contienen los efluentes tendría una incidencia positiva sobre el crecimiento y desarrollo de brócoli.

En función de las láminas de riego aplicadas y las características analíticas de los EUT, se logró aportar una considerable cantidad de N, debido a una importante presencia de este elemento en los EUT, aunque en menor medida resultaron los aportes de P y K, en comparación a los cultivares regados con AC. Esto seguramente incidió sobre los aumentos en producción de materia seca observados, así como también, la mejora en los rendimientos en fresco y seco de las pellas.

Durante el proceso de depuración y obtención del EUT, no se detectó la presencia de metales pesados como cadmio, plomo, cromo, cobalto o níquel que pudieran ser

perjudiciales no sólo para las plantas, sino para el ambiente de cultivo. Esto concuerda con lo aseverado por Rosas Rodríguez (2001); Gómez Álvarez *et al.* (2004), dado el origen urbano de los EUT.

No obstante, sería aconsejable realizar un monitoreo frecuente de la calidad química de este tipo de aguas, como también la posible acumulación de elementos en el suelo que puedan alterar su composición físico-química, o bien provocar algún tipo de contaminación puntual, como podría ocurrir con el nitrógeno que se detectó en concentraciones significativas, y no se abordó con mayor profundidad en este estudio. En este sentido, según lo planteado por FAO (2013), podría considerarse la posibilidad de resolver este problema a través de tratamientos terciarios del agua residual que permitan eliminar contaminantes específicos como el nitrógeno en su forma nítrica cuando su concentración sea excesiva para el aprovechamiento de los cultivos.

En relación al efecto del uso de EUT sobre la producción de compuestos bioactivos para mejorar la calidad nutraceútica de brócoli, no se observaron evidencias contundentes que permitan afirmar que este tipo de agua lograría aumentar su calidad nutricional. Sin embargo, y como un efecto positivo desde el punto de vista de la nutrición humana, se pudo medir un aumento en el contenido de compuestos fenólicos en algunos cultivares de brócoli. Luego, los resultados que se obtuvieron al evaluar el contenido de clorofilas, carotenoides, proteínas y sólidos solubles, no mostraron respuestas significativas al uso de EUT.

A pesar de haberse aportado una dosis importante de nitrógeno con los EUT, lo que podría estimular un aumento en los niveles de clorofila, o también en el contenido de proteínas, ya que este elemento es un constituyente estructural de estos biocompuestos, esto no se vio reflejado en los resultados. Algunos autores reportan efectos similares a los obtenidos aquí, como así también, muchas investigaciones dan cuenta de efectos negativos utilizando aguas residuales para riego sobre la calidad nutricional de diferentes cultivos (Gupta *et al.*, 2010; Hashem *et al.*, 2013), poniendo de manifiesto la influencia de múltiples factores genéticos y ambientales sobre las complejas interacciones del metabolismo vegetal que determinan la síntesis de estos biocompuestos.

El uso de EUT en cultivos de consumo directo como brócoli, determinan la necesidad imperiosa de evaluar su inocuidad al momento de la cosecha, y en este sentido, los análisis realizados durante este estudio arrojaron resultados favorables para el uso de este tipo de aguas, ya que se pudo demostrar la ausencia de microorganismos perjudiciales para el ser humano tales como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., larvas y estructuras

parasitarias sobre las pellas frescas. Los niveles medidos resultaron inferiores a los límites de tolerancia establecidos en el Código Alimentario Argentino (CONAL, 2018), logrando así un producto apto para su consumo en fresco. Esta situación puede en gran medida resultar del proceso de depuración de los efluentes crudos mediante las lagunas facultativas, en donde se logró una notable disminución de la presencia de microorganismos y parásitos patógenos, alcanzando niveles inferiores a los umbrales permitidos por directrices internacionales para el riego de este tipo de cultivos (OMS, 2006; DOUE, 2017). Sin embargo, no se pudieron alcanzar los umbrales más estrictos que plantean las directrices de la provincia de Córdoba (Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos, 2016). En consecuencia, esto determina la necesidad de intensificar los procesos de tratamiento de los efluentes, o aplicar otro tipo de tecnología a los fines de poder cumplir con la normativa local vigente.

A pesar de que la presencia de microorganismos patógenos se considera como uno de los principales inconvenientes del uso de aguas residuales tratadas, el empleo de un sistema de riego subterráneo, como el que se utilizó en este estudio, minimizó en gran medida los riegos de contaminación ambiental y del propio cultivo de brócoli, según lo propuesto por Lucas y Alarcón (2018), evitando el contacto directo de las aguas residuales con el producto comestible, ya que durante todo el desarrollo del experimento los niveles de humedad observados en la superficie del suelo fueron muy bajos.

Así pues, se demuestra la viabilidad de usar EUT en riego de cultivo de brócoli, sobre todo si se considera que este cultivo posee una demanda hídrica elevada, y se realiza en sistemas hortícolas cercanos a los centros urbanos, donde la producción de efluentes es considerable y se torna necesario priorizar el uso de agua dulce para el abastecimiento público.

Por otra parte, en el presente estudio se evaluó la biofortificación de brócoli con Se y su posible influencia sobre las propiedades nutraceuticas, dado que, a través de los EUT no se lograría un efecto biofortificante, ya que la concentración de este elemento es insignificante, se utilizaron soluciones de Selenito de Sodio mediante aplicaciones foliares, con el objetivo de lograr un alimento de características superiores y además encontrar mecanismos alternativos que permitan aportar este elemento esencial para el organismo, muchas veces deficiente en la dieta de la población.

Los resultados obtenidos fueron muy promisorios con respuestas significativas en todos los cultivares ensayados, con una dosis de 50 g ha⁻¹ se obtuvieron aumentos notables en el contenido de Se de las pellas, y al duplicar la dosis a 100 g ha⁻¹ se mantuvo está

correlación positiva favorable. Asimismo, se incrementó también el contenido de materia seca de los cultivares fertilizados con Se. Estos resultados permitieron confirmar las aseveraciones que dan cuenta de la elevada capacidad que posee el brócoli para acumular este elemento en sus tejidos (Ramos *et al.*, 2001), lo cual lleva a pensar en su biofortificación como una estrategia válida para lograr así un alimento enriquecido y de alto valor nutricional.

Por otra parte, es importante remarcar que el empleo de aplicaciones foliares para enriquecer brócoli con Se como las empleadas en el estudio, podría constituir una técnica mucho más eficiente que otros métodos de fertilización, como puede ser la incorporación al suelo o sustrato de cultivo, donde no se tendría certezas sobre su efectiva absorción por parte de las plantas, dadas las bajas concentraciones que deben utilizarse y los múltiples procesos de interacción que pueden ocurrir con las partículas coloidales del suelo.

Finalmente, si bien algunas investigaciones afirman que aumentar el contenido de Se en brócoli podría tener incidencias positivas en la producción de compuestos nutraceúticos (Borghese y Stoffel, 2017), en muchos estudios las respuestas han sido heterogéneas. En este sentido, los análisis efectuados en esta investigación demostraron que la acumulación de Se no produjo cambios significativos en el contenido de compuestos fenólicos, clorofilas y carotenoides, proteínas y sólidos solubles. Por lo cual, al desarrollar programas de biofortificación con Se debería considerarse las interacciones que puede tener el Se en el metabolismo de brócoli, evaluando sus posibles efectos recíprocos y/o antagónicos sobre otras cualidades nutritivas en el cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S. M. (2012). Effects of low temperature and selenium application on growth and the physiological changes in sorghum seedlings. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 8(1):268-286.
- Ackers, M. L., B. E. Mahon, E. Leía, B. Goode, T. Damrow, P. S. Hayes, W. F. Viv, D. H. Rice, T. J. Barrett, L. Hutwagner, P. M. Griffin y L. Slutsker. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *Journal of Infectious Diseases* 177:1588-1593.
- ADESUR (Asociación Interinstitucional para el Desarrollo del Sur de Córdoba). (1999). Asociación interinstitucional para El sur de Córdoba. Plan director. Secretaría técnica de Adesur. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba. Argentina. 99 p.
- Agote, A. (2013). Efectos de la aplicación de biosólidos en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. italica Plenck) regado por goteo con efluentes urbanos tratados. Tesis. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. 24 p.
- Allen, L., B. de Benoist, O. Dary y R. Hurrell (2006). Guidelines on Food Fortification with Micronutrients. Suiza, World Health Organization. Citado en: Bonilla Soto, A. I. B. (2016). Fortificación de alimentos en Centroamérica y el Caribe. Recopilación bibliográfica. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica.
- Alonso, J. W. (2015). Efectos del mulching plástico y la aplicación de biosólidos sobre la productividad del cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. itálica Plenck) regado con efluentes urbanos tratados. Tesis. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. 32 p.
- Alvídrez Morales, A., B. E. González Martínez y Z. Jiménez Salas (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista salud pública y Nutrición*, 3 (3). En: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2002/spn023g.pdf> Consultado: 11/10/2018.
- ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). (2004). Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos. Instituto Nacional de Alimentos. Buenos Aires. En: http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf Consultado: 15/09/2018.

- Apra, A. (2008). Cultivo de crucíferas: Brócoli y coliflor. Boletín Hortícola de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 13(39):29-32.
- Astaneh, R. K.; S. Bolandnazar; F. Z. Nahandi y S. Oustan (2018). The effects of selenium on some physiological traits and K, Na concentration of garlic (*Allium sativum* L.) under NaCl stress. Information processing in agriculture, 5 (1), 156-161. En: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/B575E04C1F96BF24E3BA5D1160B4FF1F36C587732DA544635D25906EF2F975DF46064D46E14F9F3533FB24B1516B1A33> Consultado: 06/11/2018.
- Azpilcueta Pérez, M. E., A. Pedroza Sandoval, I. Sánchez Cohen, S. Jacobo, M. del Rosario y R. Trejo Calzada. (2017). Calidad química del agua en un área agrícola de maíz forrajero (*Zea mays* L.) en la Comarca Lagunera, México. Revista internacional de contaminación ambiental 33(1):75-83. doi: 10.20937/RICA.2017.33.01.07
- Bachiega, P. (2014). Atividade antiproliferativa in vitro em diferentes estádios de maturação do brócolis (*Brassica oleracea* L. var. itálica) biofortificados ou não com selênio. Tesis de Maestría. Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidad de Sao Pablo. Brasil.
- Bachiega, P., J. M. Salgado, J. E. de Carvalho, A. L. Ruiz, K. Schwarz, T. Tezotto y M. C. Morzelle. (2015). Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea* L. italica) biofortified with selenium. Food Chemistry. 190:771-776.
- Barberá Alarcón, J. M. (2003). Riego subterráneo aplicado a la jardinería: Tecnología para un mejor aprovechamiento del recurso agua. Interempresas. Horticultura. En: <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/71141-Riego-subterraneo-aplicado-a-la-jardineria.html> Consultado: 19/07/2018.
- Baron, C., F. E. Maradei y C. A. Barés. (1997). Manejo poscosecha de brócoli. Boletín Hortícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, 5(15):37-41.
- Beecher, C. W. W. (1994). Cancer prevention properties of varieties of *Brassica oleracea*: a review. Am J Clin Nutr. 59:1166-1170.
- Bello, J. (2000). Alimentos con propiedades saludables especiales. En: Astiasarán I y A. Martínez (eds.) Alimentos composición y propiedades. Ed. Mc. Graw-Hill. Interamericana España, 1ª edición. 343-355 p.

- Beneduce, L., G. Gatta, A. Bevilacqua, A. Libutti, E. Tarantino, M. Bellucci y G. Spano. (2017). Impact of the reusing of food manufacturing wastewater for irrigation in a closed system on the microbiological quality of the food crops. *International journal of food microbiology* 260:51-58.
- Bertranou, A. y E. Araujo (2002). Investigación sistémica sobre regímenes de gestión del agua. Caso Mendoza. INA-CELA. Ed. Global Partnership. Mendoza. Argentina.
- Bjorkman, T. y K. Pearson. (1995). Sensitivity of broccoli inflorescence development to high temperature. *HortScience* 30(4):885-885.
- Bonilla Soto, A. I. B. (2016). Fortificación de alimentos en Centroamérica y el Caribe. Recopilación bibliográfica. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica.
- Borghese, C. y M. M. Stoffel. (2017). Valorización de los residuos de cosecha de brócoli para la generación de productos nutraceuticos. XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral. En: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/coleccion/bitstream/handle/123456789/8786/8.1.1.pdf> Consultado: 12/10/2017.
- Borghese, C., M. M. Stoffel, G. Céccoli, M. Buttarelli, M. G. Guevara, C. A. Bouzo y F. Muñoz. (2018). Effect of selenium foliar treatment on photosynthetic parameters and yield in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. itálica). XXXII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. XVI Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. 11-15 de noviembre, Córdoba (Argentina). Libro de Resúmenes. En: <https://www.fisiologiavegetal.org/vermas-noticias.php?n=255> Consultado: 14/01/2018.
- Bouzo, C. A., Astegiano, E. D. y J. C. Favaro. (2003). Procedimiento para predecir la necesidad de abonos en cultivos hortícolas. *FAVE Sección Ciencias Agrarias* 2(1-2):7-18.
- Broadley, M. R., P. J. White, R. J. Bryson, M. C. Meacham, H. C. Bowen, S. E. Johnson y M. Harriman. (2006). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society* 65(2):169-181.
- Buenaño, C. E. (2011). Aprovechamiento de las propiedades nutritivas del brócoli (*Brassica oleracea*) para generar un aporte nutricional en pastas alimenticias de tipo pre-cocido a partir del extracto vegetal. Tesis. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. En: <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/841> Consultado: 12/10/2018.

- Calcagno, A., N. Mendiburo y M. Gaviño Novillo. (2000). Informe sobre la gestión del agua en la República Argentina. World Water Visión. En: <https://www.cepal.org/drni/proyectos/samtac/inar00200.pdf> Consultado: 01/09/2018.
- Callejas, R., E. Kania, A. Contreras, C. Peppi y L. Morales. (2013). Evaluación de un método no destructivo para estimar las concentraciones de clorofila en hojas de variedades de uva de mesa. *Idesia* 31(4):19-26. En: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-34292013000400003&script=sci_arttext Consultado: 09/09/2018.
- Calvachi, G. L. C. y I. A. S. Ortiz (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Univ. Salud*, 15(1):72-88. ISSN: 0124-7107
- Campas Baypoli, O. N., C. Bueno-Solano, D. M. Martínez-Ibarra, F. Camacho-Gil, A. G. Villa-Lerma, J. R. Rodríguez-Núñez y D. I. Sánchez-Machado (2009). Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 59(1):95-100.
- Cantero Gutiérrez, A., E. M. Bricchi, V. H. Becerra, J. M. Cisnero y H. A. Gil (1986). Zonificación y descripción de las tierras del departamento de Río Cuarto, Córdoba, Argentina. 78 p.
- Cantwell, M. y T. Suslow. (1997). Recommendations for maintaining postharvest quality. Department of Plant Science, University of California, Davis. En: <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Broccoli/>. Consultado: 15/09/2018.
- Carrillo Riofrío, F. M. (2011). Evaluación de la eficiencia de seis mezclas de fertilizantes inorgánicos en el rendimiento del cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var. itálica). Tesis. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales. Riobamba. Ecuador. 122 p.
- Cartea, M. E., M. Francisco, P. Soengas y P. Velasco. (2010). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules* 16(1):251-280.
- Castellanos, J., I. Lazcano, A. Sosa, B. Badillo y S. Villalobos. (2000). Monitoreo nutrimental y fertilización nitrogenada: bases para altos rendimientos y calidad de brócoli cultivado en vertisoles ricos en potasio de la parte central de México. *Informaciones Agronómicas* 4(2):11-14.
- Castillo Godina, R., R. Foroughbakhch Pournavab y A. Benavides Mendoza. (2013). Efecto del selenio sobre la cuantificación de ácido ascórbico en tomate

- (*Lycopersicon esculentum* Mill). Rev. Planta. Universidad Autónoma de Nuevo León 8(17):21-23. ISSN: 2007-1167.
- Cavallini, J. M. y L. E. Young. (2002). Sistemas integrados de tratamiento y uso de aguas residuales en América Latina: Realidad y Potencial. América, 36:360-589.
- CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente). (2002 a). Sistemas Integrados de Tratamiento y Uso de Aguas Residuales en América Latina: Realidad y Potencial. Resumen ejecutivo. IDRC – OPS/CEPIS. En: <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsaar/e/proyecto/proyecto.html>. Consultado: 15/09/2018.
- CEPIS (Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente). (2002 b). Medidas de protección sanitaria en el aprovechamiento de aguas residuales. Directrices sobre la calidad de los efluentes empleados en la agricultura. En: <http://www.bvsde.ops-oms.org/eswww/fulltext/repind57/mps/mpsaar.html> Consultado: 01/09/2018.
- Cessa, R. Z. (2018). México quinto productor mundial de brócoli. Revista El Economista. En: <https://www.eleconomista.com.mx/opinion/Mexico-quinto-productor-mundial-de-brocoli-I-20180404-0116.html> Consultado: 01/09/2018.
- Cevallos Ruíz, M. G. (2010). Proyecto de pre-factibilidad para la exportación de brócoli al mercado noruego período 2010-2019. Tesis. Universidad Tecnológica Equinoccial, Facultad de Ciencias Económicas y Negocios, Escuela de Comercio Exterior, Integración y Aduanas. Quito. Ecuador.
- Chacón Lee, T. L. (2011). Efecto de la aplicación de soluciones de *Chorella Vulgaris* y *Scenedesmus Obliquus* sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli. Tesis. Maestría en Diseño y Gestión de Procesos. Facultad de Ingeniería. Universidad de La Sabana (Bogota). 106p. En: <https://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/167/Tebbie%20Lin%20Chac%C3%B3n%20Lee%20%28Tesis%29.pdf?sequence=4&isAllowed=y> Consultado: 07/08/2018.
- Chasquibol, N., L. Lengua, I. Delmás, D. Rivera, D. Bazán, R. Aguirre y M. Bravo. (2014). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química, 6(2):9-20.
- Chávez Pérez, J. F. (2005). Lineamientos de la Política Nutricional para combatir la deficiencia de Hierro - Fortificación de Alimentos. In Anales Venezolanos de Nutrición. Fundación Bengoa 18(1):49-54.

- Christou, A., G. Maratheftis, M. Elia, E. Hapeshi, C. Michael y D. Fatta-Kassinou. (2016). Effects of wastewater applied with discrete irrigation techniques on strawberry plants productivity and the safety, quality characteristics and antioxidant capacity of fruits. *Agricultural Water Management*, 173:48-54.
- Cifuentes Ochoa, A. (2014). Evaluación de tres niveles de fertirrigación en el rendimiento del cultivo orgánico de brócoli (*Brassica oleracea* var. italica. cv. Mónaco). Tesis. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Agronómica. Riobamba, Ecuador. 92p. En: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3593>. Consultado: 20/09/2018.
- Cohen, J. H., A. R. Kristal y J. L. Stanford. (2000). Fruit and vegetable intakes and prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92:61-68.
- CONAGUA. (2007). Plan Nacional Federal de los Recursos Hídricos. San Miguel de Tucumán. En: www.ica.gov.ar/Documentos/Ingenieria/conclusionesPlanNacionalrrhh. Citado en: Sartor, A. y O. Cifuentes. (2012). Propuesta de Ley Nacional para reúso de aguas residuales. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires, Argentina. En: http://www.edutecne.utn.edu.ar/monografias/aidis_ley_reuso_aguas.pdf Consultado: 01/03/2018.
- CONAL (Comisión Nacional de Alimentos). (2018). Código Alimentario Argentino. En: <http://www.conal.gob.ar/CAA.php> Consultado: 01/03/2018.
- Correndo, A., G. Rubio, I. Ciampitti y F. García. (2012). Dinámica del potasio en Molisoles de la Región Pampeana Norte. XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata (Argentina).
- Cortes Cádiz, E. C. (2003). Fundamentos de ingeniería para el tratamiento de biosólidos generados por la depuración de aguas servidas de la región metropolitana. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Físicas y Matemática. Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile. 99 p.
- Cortés, M., A. García y H. Suárez. (2007). Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. *Rev. Vitae*. ISSN 0121-4004. 14(1):16-24. En: <http://www.redalyc.org/html/1698/169815390003/> Consultado: 17/10/2017.
- Crespi, R. (2005). Reutilización de aguas residuales en la producción agrícola. *Rev. Hydria*, Año I. N° 3. Buenos Aires, Argentina.

- Crespi, R., E. Camacho y J. M. Polo. (2009). Riego subsuperficial con aguas residuales tratadas. En: Ingeniería del agua, 16(2):1134-2196.
- Cruz Gómez, B. A. (2012). Rendimiento del rábano (*Raphanus sativus* L., var. champion) regado con diferentes efluentes en condiciones de invernadero. Tesis. Departamento de Botánica. División Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 46p. En: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/6435/T19244%20CRUZ%20GOMEZ,%20BEATRIZ%20ADRIANA%20%2062146.pdf?sequence=1> Consultado: 07/07/2018.
- Czeczot, H. (2000). Biological activities of flavonoids: A review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 950:3-13.
- D'andrea, M. G., V. Garcés, G. S. Barboza, V. I. Liberal, S. R. Álvarez y L. Seghezzeo. (2014). Reúso de aguas residuales domésticas en la actividad agropecuaria: el caso de Cafayate, Salta. Acta de la XXXVII Reunión de Trabajo de la Asociación Argentina de Energías Renovables y Medio Ambiente. 2: 31-40. ISBN 978-987-29873-0-5.
- Dary, O. y J. O. Mora. (2013). Food Fortification: Technological Aspects. In Caballero, B. Encyclopedia of Human Nutrition. Elsevier, Holanda, 306-314 p.
- De Chaves, A. B. G. (2016). Estudio del comportamiento de cultivares de brócoli y determinación de las necesidades hídricas y coeficiente de cultivo 'Kc'. Tesis de Grado en Ingeniería Agrícola y el Medio Rural. Universidad de La Laguna. 236p.
- Del Pino, M. (2016). Arranco la temporada: a sembrar brócoli. Revista Super Campo. De la Huerta a la Estancia. En: <http://supercampo.perfil.com/2016/08/arranco-la-temporada-a-sembrar-brocoli/> Consultado: 25/11/2017.
- Di Benedetto, A. (2005). Manejo de cultivos hortícolas: Bases ecofisiológicas y tecnológicas. 1^{ed}. Orientación gráfica editora. Buenos Aires. 373p.
- Di Rienzo J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada y C. W. Robledo. (2011). InfoStat. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dixon, G. R. (2007). Vegetable brassicas and related crucifers. CABI, Wallingford. 416p.
- Dong, J. Z., Y. Wang, S. H. Wang, L. P. Yin, G. J. Xu, C. Zheng y M. Z. Zhang. (2013). Selenium increases chlorogenic acid, chlorophyll and carotenoids of Lycium chinense leaves. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(2):310-315.

- Dote Figueroa, J. A., H. Paillán Legue y L. Astudillo Saavedra. (2002). Comportamiento productivo y fluctuaciones varietales de carotenoides, azufre y proteínas en brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) bajo manejo orgánico. Tesis. Escuela de Agronomía. Universidad de Talca (Chile). En: <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/787/1/JDoteFigueroa.pdf> Consultado: 11/10/2018.
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea). (2017). Nota de la Comisión sobre la Guía para combatir los riesgos microbiológicos en frutas y hortalizas frescas en la producción primaria mediante una buena higiene. 2017/C 163/01. En: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC0523\(03\)&rid=2](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC0523(03)&rid=2) Consultado: 01/12/2018.
- Ecofroz. (1998). Cultivo de Brócoli. Requerimientos ambientales. Quito, Ecuador. 6p. Citado en: Sinaluisa, L. M. (2011). Evaluación de la eficacia de ocho mezclas de Fertilizantes Inorgánicos en el rendimiento y rentabilidad del cultivo de Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) en la comunidad Gatazo Zambrano provincia Chimborazo. Tesis de grado. Facultad de Recursos Naturales. Escuela de Ingeniería Agronómica. Riobamba, Ecuador. 175p.
- Ecured. (2018). Alimento fortificado. Conocimiento con todos y para todos. En: https://www.ecured.cu/Alimento_fortificado Consultado: 12/09/2018.
- El Comercio. (2017). El brócoli tiene mercado que aumenta en Europa. Revista Líderes. En: <https://www.revistalideres.ec/lideres/brocoli-mercado-europa-produccion-economia.html> Consultado: 30/09/2018.
- Elfanssi, S., N. Ouazzani y L. Mandi. (2018). Soil properties and agro-physiological responses of alfalfa (*Medicago sativa* L.) irrigated by treated domestic wastewater. *Agricultural Water Management*, 202:231-240.
- Elguera, J. C. T., E. Barrientos y K. Wrobel. (2013). Effect of cadmium (Cd (II)), selenium (Se (IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. *Acta physiologiae plantarum*, 35(2):431-441. En: doi.org/10.1007/s11738-012-1086-8 Consultado: 02/06/2019.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2000). Municipal Technologies. Off. of Wast. Man. 18 p.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2004). Guidelines for water reuse. EPA-265/R-03/108, U.S. Agency for International Development, Cincinnati, Ohio.

- Erie, L. J., O. F. French, D. A. Brucks y K. Harris. (1981). Consumptive use of water by major crops in the southwestern United States. USDA Cons. Res. Rep. Washington D. C. USA. Citado en: Risco, D., A. Gutiérrez, J. Val Falcón, J. León, A. Díaz Simón, P. Benalcázar y H. Prieto. (2018). Programación de riego en brócoli (*Brassica oleracea* L. cv. italiana) en los Andes ecuatorianos. Rev. IDESIA 36(1): 57-63.
- Espinosa, R. P. (2015). Brócoli: España es el principal exportador a nivel mundial. Revista ABC La Rica España. En: <https://www.abc.es/espana/la-rica-espana/20150317/abci-brocoli-exportacion-201503161340.html> Consultado: 28/12/2017.
- Esteller, M. V. (2002). Vulnerabilidad de los acuíferos frente al uso de aguas residuales y lodos en la agricultura. Revista Latino-americana de Hidrogeología. 2:103-113.
- Evans, J. R. (1989). Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C 3 plants. Oecologia, 78(1):9-19.
- FAO. (2013). Reutilización del agua en la agricultura: ¿Beneficios para todos? Informe sobre temas hídricos. 124p. ISSN: 1020-1556. En: <http://www.fao.org/docrep/017/i1629s/i1629s.pdf> Consultado: 01/09/2018.
- FAO. (2014). Fuentes alternativas de riego: Aguas residuales. Córdoba.
- FAO/OMS. (2014). Documento de debate sobre la biofortificación con nutrientes esenciales. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del Codex sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales. 36° Reunión Kuta, Bali (Indonesia). En: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCNFSDU/ccnfsdu36/nf36_11s.pdf Consultado: 12/10/2017.
- FAO/OMS. (2016). Directrices sobre la aplicación de los principios generales de higiene de los alimentos al control de los parásitos transmitidos por el consumo de alimentos CAC/GL 88-2016. Normas Internacionales de los Alimentos. Codex Alimentarius. En: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252FCodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B88-2016%252FCXG_088s.pdf Consultado: 01/09/2018.
- Fasciolo, G., M. I. Meca, E. Calderon y M. Rebollo. (2005). Contaminación microbiológica en ajos y suelos regados con efluentes domésticos tratados. Revista

- de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo, tomo XXXVI. N° 1. Mendoza, Argentina. 31-40 p.
- Fasciolo, G. E., E. Gabriel, J. Morábito y F. Tozzi. (2007). Impactos agroeconómicos del riego con efluentes domésticos tratados en cultivos de ajo y cebolla. III Jornadas de actualización en riego y fertirriego organizadas por la Universidad Nacional de Cuyo, INTA, En: http://www.riegoyfertirriego.com.ar/III_Jornadas/Trabajospresentados/Fasciolo.pdf Consultado: 01/11/2018.
- Fernández León, M. F. (2012). Evolución de los parámetros de calidad físico-química y funcional de distintas bráscas sometidas a diferentes tratamientos postcosecha. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal, Universidad de Extremadura. 301p. En: http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/415/TDUEX_2012_Fern%C3%A1ndez_Le%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y Consultado: 12/10/2018.
- Finley, J. W., C. D. Davis y Y. Feng. (2000). Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *The Journal of nutrition*, 130(9):2384-2389.
- Finley, J. W. y C. D. Davis. (2001). Selenium (Se) from high-selenium broccoli is utilized differently than selenite, selenate and selenomethionine, but is more effective in inhibiting colon carcinogenesis. *Biofactors* 14:191-196.
- Finley, J. W., A. Sigrid-Keck, R. J. Robbins y K. J. Hintze. (2005). Selenium enrichment of broccoli: interactions between selenium and secondary plant compounds. *The Journal of nutrition*, 135(5):1236-1238. En: <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1236> Consultado: 19/01/2019.
- Follett, R. H. y P. N. Soltanpour. (1989). "Irrigation water quality criteria". Colorado St. Univ. Coop. Ext. 4p.
- Fuentes Lara, L. O. (2017). Aplicación poscosecha de selenio en frutos de tomate y su efecto en la calidad nutricional y potencial antioxidante. Repositorio Digital. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. En: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/43364> Consultado: 06/08/2018.
- Gámez, M. R., A. V. Pérez, A. S. Será y Z. M. Ronquillo. (2017). Renewable Energy Sources and Local Development. *International Journal of Social Sciences and Humanities (IJSSH)*, 1(2):10-19.

- Ganther, H. E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 20:1657-1666p.
- García Alvarez, O. (2012). Criterios modernos para evaluación de la calidad del agua para riego. *IAH*, 7:27-36. En: [http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/B3BD6ED103283DDD85257A2F005EF91B/\\$FILE/6%20Art.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/B3BD6ED103283DDD85257A2F005EF91B/$FILE/6%20Art.pdf)
Consultado: 11/09/2018.
- García Peña, M. I. (2004). Efecto del agua residual sobre el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). Tesis. División Ingeniería. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 99p. En: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5518/T14679%20GARCIA%20PE%F1A,%20Ma.%20ISABEL%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
Consultado: 01/09/2018.
- García Viguera, C. (2016). Origen: La revista del sabor rural. En: <https://www.origenonline.es/index.php/2016/09/20/brocoli-polvo-las-mismas-propiedades-fresco/> Consultado: 10/09/2018.
- Gąsecka, M., M. Mleczek, M. Siwulski, P. Niedzielski y L. Kozak. (2015). The effect of selenium on phenolics and flavonoids in selected edible white rot fungi. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1):726-731. En: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.046> Consultado: 19/01/2019.
- Gassama, U. M., Puteh, A. B., Abd-Halim, M. R. y B. Kargbo. (2015). Influence of municipal wastewater on rice seed germination, seedling performance, nutrient uptake, and chlorophyll content. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 18 (1):9-19.
- Gatta, G., A. Libutti, A. Gagliardi, L. Beneduce, L. Brusetti, L. Borruso y E. Tarantino, E. (2015). Treated agro-industrial wastewater irrigation of tomato crop: Effects on qualitative/quantitative characteristics of production and microbiological properties of the soil. *Agricultural Water Management*, 149:33-43.
- Germ, M., V. Stibilj, J. Osvald y I. Kreft. (2007). Effect of selenium foliar application on chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3): 795-798.
- Ghasemi, K., S. Bolandnazar, S. J. Tabatabaei, H. Pirdashti, M. Arzanlou, M. A. Ebrahimzadeh y H. Fathi. (2015). Antioxidant properties of garlic as affected by

- selenium and humic acid treatments. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 43(3):173-181.
- Giletto, C. M., M. A. Losada y J. Cacace. (2001). Brócoli envasado en polietileno de baja densidad y policloruro de vinilo. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires*, 21(3):191-198. En: <http://ri.agro.uba.ar/files/download/revista/facultadagronomia/2001giletto cm.pdf>
Consultado: 10/08/2018.
- Gómez Álvarez, A., A. Villalba Atondo, G. Acosta-Ruíz, M. Castañeda Olivares y D. Kamp. (2004). Metales pesados en el agua superficial del Río San Pedro durante 1997 y 1999. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 20(1):5-12. En: <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/23124/21932>
Consultado: 10/09/2018.
- Gómez Campo, C. (1999). Taxonomy, in: *Biology of Brassica Coenospecies*, ed. Elsevier, Amsterdam. 486p.
- Gomez Díaz, I. (2014). Cambios en la Morfología de Plántulas de Tomate Saladette con la Aplicación de Selenio y *Azospirillum*. Tesis. Departamento de Horticultura. División de Agronomía. Universidad Autónoma Antonio Narro. En: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/75/T20203%20GOMEZ%20DIAZ%2c%20IPOLITO%20%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
Consultado: 12/07/2018.
- Gómez, E. U. (2004). El reusó de aguas residuales para riego en el cultivo de Maíz (*Zea mays* L.) una alternativa ambiental y productiva. Departamento de Gestión Ambiental, Universidad Nacional Agraria (UNA) Managua, Nicaragua.
- Gómez, J. M. (2013). Producción de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) regado por goteo, con efluentes urbanos tratados, aplicación de biosólidos y cobertura del suelo con paja. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. 37p.
- González González, M. I. y S. C. Rubalcaba. (2011). Uso seguro y riesgos microbiológicos del agua residual para la agricultura. *Revista cubana de salud pública*, 37(1):61-73.
- Greenwood D. J., T. J. Cleaver, M. K. Turner, J. Hunt J., K. B. Nienford y S. M. H. Loquens. (1980). Comparison of the effects of nitrogen fertilizer on the yield, nitrogen content and quality of 21 different vegetable and agricultural crops. *J. Agric. Sci.*, 95:471-485. Citado en: Rincón, L., J. Sáez, J. A. Pérez, M. D. Gómez y

- C. Pellicer. (1999). Crecimiento y absorción de nutrientes del brócoli. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg, 14:225-236.
- Griffith, M., y D. E. Carling. (1991). Effects of plant spacing on broccoli yield and hollow stem in Alaska. Canadian Journal of Plant Science, 71(2):579-585.
- Grosso, L., D. Ramos, V. Brizuela, M. Rodríguez, L. Pena y R. Crespi. (2005). Cultivares de ajo (*Allium sativum* L.) regados con efluentes urbanos tratados. Rev. Asociación Argentina de Horticultura. 24:114-120.
- Guerrero, M., Vázquez, A. y M. Rodríguez. (2018). La zeolita en la descontaminación de aguas residuales. Universidad, Ciencia y Tecnología, 1(2):109-117. ISSN: 1316-4821 / 2542-3401.
- Gupta, S., S. Satpati, S. Nayek y D. Garai. (2010). Effect of wastewater irrigation on vegetables in relation to bioaccumulation of heavy metals and biochemical changes. Environmental monitoring and assessment, 165(1-4):169-177.
- Haghighi, M., A. Sheibanirad y M. Pessarakli. (2016). Effects of selenium as a beneficial element on growth and photosynthetic attributes of greenhouse cucumber. Journal of Plant Nutrition, 39(10):1493-1498.
- Hartikainen, H., P. Ekholm, V. Piironen, T. Xue, T. Koivu y M. Yli-halla. (1997). Quality of the ryegrass and lettuce yields as affected by selenium fertilization. Agricultural and Food Science, 6(5-6):381-387.
- Harvestplus. (2018). Biofortification. Better crops Better nutrition. En: <http://www.harvestplus.org/> Consultado: 11/07/2018.
- Hashem, H. A., R. A. Hassanein, M. H. El-Deep y I. A. Shouman. (2013). Irrigation with industrial wastewater activates antioxidant system and osmoprotectant accumulation in lettuce, turnip and tomato plants. Ecotoxicology and environmental safety, 95:144-152.
- Hasler, C. M. (2000). The changing face of functional foods. J. Am. Coll. Nutr. 19:499-506. Citado en: Alvidrez Morales, A., B. E. González Martínez y Z. Jiménez Salas (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. Revista Salud Pública y Nutrición, 3(3):6. En: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2002/spn023g.pdf> Consultado: 12/10/2017.
- Hasperu, J. H., L. Lemoine, A. R. Vicente; A. R. Chaves y G. A. Martínez. (2015). Postharvest senescence of florets from primary and secondary broccoli inflorescences. Postharvest Biology and Technology, 104:42-47.

- Hassena, A. B., M. Zouari, L. Trabelsi, W. Khabou y N. Zouari. (2018). Physiological improvements of young olive tree (*Olea europaea* L. cv. Chetoui) under short term irrigation with treated wastewater. *Agricultural Water Management*, 207:53-58.
- Hawkesford, M. J. y F. J. Zhao. (2007). Strategies for increasing the selenium content of wheat. *Journal of Cereal Science*, 46(3):282-292. En: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.02.006> Consultado: 27/10/2017.
- Hermosillo Cereceres, M. A. (2012). Biofortificación con selenio: influencia en la capacidad antioxidante y calidad nutricional del frijol. Tesis doctoral. Unidad Cuauhtémoc. Fisiología y Tecnología de Alimentos de la Zona Templada. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. 153p. En: https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/221/1/Hermosillo%20Cereceres_2013_DC.pdf#page=148 Consultado: 22/60/2018.
- Hernández Castro, E., L. I. Trejo Téllez, F. C. Gómez Merino, M. N. Rodríguez Mendoza, P. Sánchez García y A. Robledo Paz. (2015). Bioaccumulation of iron, selenium, nitrate, and proteins in chard shoots. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15 (3):694-710.
- Hershey, D. R. (1993). Evaluation of irrigation water quality. *The Am. Biol. Teach.* 55 (4):6.
- Hilborn, E. D., J. H. Mermin, P. A. Mshar, J. L. Hadler, A. Voetsch, C. Wojtkunski, M. Swartz, R. Mshar, F. M. Lambert, J. A. Farrar; M. K. Glynn y L. Slutsker. (1999). A multistate outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. *Archives of Internal Medicine* 159:1758-1764.
- Hipp, B. (1974). Influence of nitrogen and maturity rate on hollow stem in bróccoli. *HortScience*, 9:68-69. Citado en: De Chaves, A. B. G. (2016). Estudio del comportamiento de cultivares de brócoli y determinación de las necesidades hídricas y coeficiente de cultivo 'Kc'. Tesis de Grado en Ingeniería Agrícola y del Medio Rural. 236p.
- Hu, Q., G. Pan y J. Zhu. (2001). Effect of selenium on green tea preservation quality and amino acid composition of tea protein. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(3):344-346.
- Ibarra Sánchez, L.S., S. Alvarado Casillas, M. O. Rodríguez García, N. E. Martínez Gonzales y A. Castillo. (2004). Internalization of bacterial pathogens in tomatoes and their control by selected chemicals. *Journal of Food Protection* 67:1353-1358.

- Imtiyaz, M., N. P. Mgadla, S. K. Manase, K. Chendo y E. O. Mothobi. (2000). Yield and economic return of vegetable crops under variable irrigation. *Irrigation Science*. 19: 87-93.
- INTA. (2010). 2^{da} Reunión Internacional de Riego. Sistemas y Metodologías para asesoramiento a regantes. Procisur Plataforma de Riego. E.E.A. INTA Manfredi. En: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-2010_riego.pdf Consultado: 01/04/2017.
- INTA. (2018). Plantaciones forestales crecen un 30% más bajo riego con aguas residuales. INTA Informa. En: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=42611> Consultado: 01/09/2018.
- Ip, C., M. Birringer, E. Block, M. Kotrebai, J. F. Tyson, P. C. Uden y D. J. Lisk. (2000). Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *Journal of agricultural and food chemistry* 48(6):2062-2070. doi: 10.1021/jf000051f.
- Isaacs, S., J. Aramini, B. Ceibin, J. Farrar, R. Ahmed, D. Middleton, H. Howes, E. Chan, A. Chandran, L. Harris, S. Pichette, K. Campbell, A. Gupta, L. Lior, M. Pearce, C. Clark, F. Rodgers, F. Jameison, I. Brophy y A. Ellis. (2005). An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Protection* 68:191-198.
- Jaffé, W. (1992). Selenio, un elemento esencial y tóxico. Datos de Latinoamérica. *Archivos latinoamericanos de Nutrición*, 42(2):90-93. En: https://www.fundacionbengoa.org/publicaciones/werner_jaffe/art.228.pdf Consultado: 22/10/2018.
- Jaramillo N. J. E. y A. C. D. Díaz. (2006). El Cultivo de las Crucíferas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. Manual Técnico 4. 176 p.
- Jáuregui, A. M. M. y F. R. Escudero, F. R. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Horizonte Médico*, 7(1):23-31.
- Johnson, C. C., F. M. Fordyce y M. P. Rayman. (2010). Symposium on 'Geographical and geological influences on nutrition': Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. *The Proceedings of the Nutrition Society* 69:119-132.
- Johnson, L.F., M. Cahn, F. Martin, F. Melton, S. Benzen, B. Farrara y K. Post. (2016). Evapotranspiration-based Irrigation Scheduling of Head Lettuce and Broccoli.

- HortScience. 51(7):935-940. Citado en: Risco, D., A. Gutiérrez, J. Val Falcón, J. León, A. Díaz Simón, P. Benalcázar y H. Prieto. (2018). Programación de riego en brócoli (*Brassica oleracea* L. cv. italica) en los Andes ecuatorianos. Rev. IDESIA 36 (1):57-63.
- Jones, A. R., Sanders D. C. y R. J. Dufault. (1990). Early temperatures influence broccoli growth and head quality. Hortscience, 25(8):865-865.
- Jones, P. J. (2002). Clinical nutrition: 7 Functional foods – more than just nutrition. Can. Med. Assoc. J. 166(12):1555.
- Juárez Maldonado, A. (2018). Aplicación de nanopartículas de selenio para inducir capacidad antioxidante y tolerancia a estrés en hortalizas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. México. En: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/43224> Consultado: 14/10/2018.
- Jungersen, E. R. (1991). Tratamiento de aguas de desecho. Instituto Danés de Tecnología del Agua, Universidad de Guadalajara. Citado en: Garcia Peña, M. I. (2004). Efecto del agua residual sobre el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var. italica L.). Tesis. División Ingeniería. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 99p. En: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5518/T14679/%20GARCIA%20PE%F1A,%20Ma.%20ISABEL%20%20TESIS.pdf?sequence=1> Consultado: 11/09/2018.
- Kahn, B. A., P. G. Shilling, G. H. Brusewitz y R. W. Mcnew. (1991). Force to shear the stalk, stalk diameter, and yield of broccoli in response to nitrogen fertilization and within-row spacing. Journal of the American Society for Horticultural Science, 116 (2):222-227.
- Kalavrouziotis, I. K.; P. H. Koukoulakis y A. Mehra. (2010). Quantification of elemental interaction effects on Brussels sprouts under treated municipal wastewater. Desalination, 254(1-3):6-11.
- Kaur, N., S. Sharma, S. Kaur y H. Nayyar. (2014). Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? Archives of Agronomy and Soil Science, 60(12):1593-1624.
- Kehr, E. y P. Díaz. (2012). Producción de Brócoli para la Agroindustria. Informativo N° 61. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura. Temuco-

- Chile. En: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/NR38925.pdf>
Consultado: 29/10/2018.
- Khalid, K. A., H. M. Amer, H. E. Wahba, S. F. Hendawy y T. M. A. El-Razik. (2017). Selenium to Improve Growth Characters, Photosynthetic Pigments and Essential Oil Composition of Chives Varieties. *Asian Journal of Crop Science*, 9(3):92-99.
- Kiziloglu, F. M., M. Turan, U. Sahin, Y. Kuslu y A. Dursun. (2008). Effects of untreated and treated wastewater irrigation on some chemical properties of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) and red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. rubra) grown on calcareous soil in Turkey. *Agricultural water management*, 95(6): 716-724.
- Kleinhenz, M. D. y N. R. Bumgarner. (2012). Using Brix as an indicator of vegetable quality. Linking measured values to crop management. Fact Sheet. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, Columbus, OH. En: <https://pdfs.semanticscholar.org/71e3/5b811a5bfe8433f68c85e381bc4a862ea3e0.pdf> Consultado: 13/10/2018.
- Kowalenko C.G. y J. W. Hall. (1987). Effects of nitrogen applications on direct-seeded broccoli from a single harvest adjusted for maturity. *J. Amer. Soc. Sci.*, 112(1):9-13. Citado en: Rincón, L., J. Sáez, J. A. Pérez, M. D. Gómez y C. Pellicer. (1999). Crecimiento y absorción de nutrientes del brócoli. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 14:225-236.
- Krarup, C. H. (1992). Seminario sobre la producción de brócoli. Quito (Ecuador), PROEXANT. 25 p.
- Krehl, S., M. Loewinger, S. Florian, A. P. Kipp, A. Banning, L. A. Wessjohann, M. N. Brauer, R. Iori, R. S. Esworthy, F. F. Chu y R. Brigelius-Flohe. (2012). Glutathione peroxidase-2 and selenium decreased inflammation and tumors in a mouse model of inflammation-associated carcinogenesis whereas sulforaphane effects differed with selenium supply. *Carcinogenesis* 33:620-628.
- Kretschmer, N., L. Ribbe y H. Gaese. (2002). Wastewater reuse for agriculture. *Technology Resource Management & Development-Scientific Contributions for Sustainable Development*, 2:37-64.
- Krizaj, C. M. (2014). La producción de brócoli (*Brassica oleraceae* L.) como biofábricas en condiciones de ambientes de estrés. Tesis. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral. 11p.

- Lai, J., M. A. Butler y T. Matney. (1980). Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. *Mutation Research*, 77:245-250. En: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165121880900579> Consultado: 11/10/2018.
- Lamont, W. J. (1992). Transplant age has little effect on broccoli head weight and diameter. *HortScience*, 27(7):848.
- Lanchimba Morales, A. K. (2016). Evaluación de dos formulaciones de fertirriego a dos profundidades con fertilización foliar complementaria en la producción de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill.), var. Micaela bajo invernadero. Tumbaco, Pichincha. Tesis. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Ecuador. 78p. En: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/7985> Consultado: 11/09/2018.
- Lardizábal, R. y M. Theodoracopoulos. (2008). Manual de producción. Producción de Brócoli. USAID-RED Proyecto de Diversificación Económica Rural. Honduras. 37 p.
- Le Gall, J. (2010). El Brócoli en Ecuador: La fiebre del oro verde. Cultivos no tradicionales, estrategias campesinas y globalización. *Anuario americanista europeo*, N° 6-7, 2008-2009. 261-288 p.
- Lefsrud, M. G., D. A. Kopsell, D. E. Kopsell y W. M. Randle. (2006). Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5):1764-1771.
- Lemoine, M. L., P. M. Civello, A. R. Chaves y G. A. Martínez (2008). Effect of combined treatment with hot air and UV-C on senescence and quality parameters of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* L. var. Italica). *Postharvest Biology and Technology*, 48(1):15-21.
- Lemoine, L. (2009). Efecto de la aplicación de tecnologías limpias sobre la prolongación de la vida postcosecha de brócoli mínimamente procesado. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 159p. En: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/51601/Documento_completo.pdf?s_equence=3&isAllowed=y Consultado: 01/09/2017.
- Lestrangle, M., K. Mayberry, S. Koyke y J. Valencia. (2003). Producción de brócoli en California. Centro de información e investigación de Hortalizas, serie producción de hortalizas. University of California – Division of Agriculture and Natural

- Resources Publication 7211-Spanish. Citado en: Puenayan, A., F. Córdoba y A. Unigarro. (2010). Respuesta del brócoli *Brassica oleracea* var. itálica L. Híbrido Legacy a la fertilización con N-P-K en el municipio de Pasto, Nariño. Revista de Ciencias Agrícolas, 27(1):49-57.
- Letey, J., M. Jarrel, N. Valoras y R. Beverly. (1983). Fertilizer application and irrigation management of broccoli production and fertilizer use efficiency. Agronomy Journal, 75:502-507. Citado por: De Chaves, A. B. G. (2016). Estudio del comportamiento de cultivares de brócoli y determinación de las necesidades hídricas y coeficiente de cultivo 'Kc'. Tesis de Grado en Ingeniería Agrícola y el Medio Rural. Universidad de La Laguna. 236p.
- Lichtenthaler, H.K., G. Kuhn, U. Prenzel, C. Buschmann y D. Meier. (1982). Adaptation of chloroplast-ultrastructure and chlorophyll-protein levels to high light and low light growth conditions. Zeitschrift für Naturforschung - Section C: Biosciences, 37C:464-475 p. ISSN (Online) 1865-7125 p. ISSN (Print) 0939-5075 En: <https://www.degruyter.com/view/j/znc.1982.37.issue-5-6/znc-1982-5-619/znc-1982-5-619.xml> Consultado: 13/06/2018.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Academic Press. Methods in enzymology. 148:350-382.
- Lin, C. M., S. S. Moon, M. P. Doyle y K. H. Mcwatters. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella enteritica* serotype Enteritidis, and *Listeria monocitogenes* on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. Journal of Food Protection 65:1215-1220 p.
- Llorach, R., A. Gil-Izquierdo, F. Ferreres y F. A. Tomas-Barberan. (2003). HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) agroindustrial byproducts. J. Agric. Food Chem. 51:3895-3899 p. Citado en: Cartea, M. E., M. Francisco, P. Soengas y P. Velasco. (2010). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. Molecules, 16(1):251-280.
- Loayza Feijóo, J. P. (2015). Efectividad de la levadura de selenio, administrada a bovinos como parte de las sales minerales, en el tratamiento de la intoxicación crónica por el consumo de *Pteridium aquilinum* (helecho macho). Tesis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de las Américas. Quito. Ecuador. En: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/2965/8/UDLA-EC-TMVZ-2015-03.pdf> Consultado: 22/10/2018.

- López Bellido, F. J. y L. López Bellido. (2013). Selenio y salud: valores de referencia y situación actual de la población española. *Nutrición Hospitalaria*, 28(5):1396-1406. En: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112013000500005&script=sci_arttext&tlng=pt Consultado: 06/10/2017.
- López Bellido, F. J., M. J. Poblaciones, S. Rodrigo y L. Bellido. (2014). Biofortificación agronómica de los cultivos: el caso del selenio en España. *Cultivos. Fertilización. Vida Rural*. 61-65 p. En: http://www.eumedia.es/portales/files/documentos/cultivos_selenio_VR374.pdf Consultado: 12/10/2017.
- López Chillón, M. T., N. Baenas, D. Villaño, P. Zafrilla, C. García Viguera y D. Moreno. (2017). Papel del brócoli en la alimentación y la salud. *Investigación y retos. Horticultura. Interempresas*. En: <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/184082-Papel-del-brocoli-en-la-alimentacion-y-la-salud-investigacion-y-retos.html> Consultado: 15/12/2017.
- López Heras, M. I. (2013). Biotransformación, acumulación y toxicidad de especies de Selenio. Caracterización de nanopartículas. Tesis doctoral. Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 348p. En: <https://core.ac.uk/download/pdf/19899151.pdf> Consultado: 12/10/2017.
- López Urrea, R., A. Montoro, P. López Fuster y E. Fereres. (2009). Evapotranspiration and responses to irrigation of broccoli. *Agricultural Water Management*. 96:1155-1161.
- Lorenzo, E. V., J. G. L. Ocaña, L. A. Fernández y M. B. Venta. (2009). Reúso de aguas residuales domésticas para riego agrícola. Valoración crítica. *Revista CENIC ciencias biológicas*, 40(1):35-44.
- Losada, H., J. Cortés y D. Grande. (1992). El uso de hortalizas en la producción de leche en sistemas suburbanos. *Livestock Research for Rural Development*, 4(3):15-19.
- Lucas, F. J. y A. L. Alarcón. (2018). Riego Localizado: ventajas e inconvenientes. Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria. Área de Edafología y Química Agrícola. Universidad Politécnica de Cartagena. En: http://www.infoagro.com/riegos/riego_localizadoventajasinconvenientes.htm Consultado: 01/09/2018.
- Luengo Fernandez, E. (2007). Alimentos funcionales y nutraceuticos. Sociedad Española de Cardiología. Publicación Oficial. 82 p. En:

- <https://secardiologia.es/publicaciones/catalogo/libros/5469-alimentos-funcionales-y-nutraceuticos>. Consultado: 23/03/2019.
- Luraschi, M. y T. F. Rauek. (2017). Uso de Aguas Residuales en Agricultura, Mendoza-Argentina. Departamento General de Irrigación. En: <http://www.uncuyo.edu.ar/desarrollo/upload/3-luraschi-compressed.pdf> Consultado: 11/10/2018.
- MCBA (Mercado Central de Buenos Aires). 2018. Brócoli en el Mercado Central, buen precio y muchas propiedades. En: <http://www.mercadocentral.gob.ar/news/br%C3%B3coli-en-el-mercado-central-buen-precio-y-muchas-propiedades> Consultado: 15/06/2019.
- Madrigal, L. y E. Sangronis. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Archivos latinoamericanos de nutrición, 57(4):387-396.
- Magnifico V., V. Lattancio y G. Sarli. (1979). Growth and nutrient removal by broccoli. J. Amer. Hort. Sci., 104(2):201-203. Citado en: Rincón, L., J. Sáez, J. A. Pérez, M. D. Gómez y C. Pellicer. (1999). Crecimiento y absorción de nutrientes del brócoli. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg, 14:225-236.
- Malagoli, M., M. Schiavon y E. A. Pilon-Smits. (2015). Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. Frontiers in plant science. doi.org/10.3389/fpls.2015.00280. En: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00280> Consultado: 19/01/2019.
- Maldonado, R. J. y E. P. Delahaye. (2003). Curvas de deshidratación del brócoli (*Brassica oleraceae* L. var. Italica Plenck) y coliflor (*Brassica oleraceae* L. var. Botrytis L.). Rev. Fac. Agron., 3(20):306-319. En: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000300005 Consultado: 15/09/2018.
- Manion, L. K., D. E. Kopsell, D. A. Kopsell, C. E. Sams y R. L. Rhykerd. (2014). Selenium fertilization influences biomass, elemental accumulations, and phytochemical concentrations in watercress. Journal of plant nutrition, 37(3):327-342.
- Mao, H., J. Wang, Y. Zan, G. Lyons y C. Zou. (2014). Using agronomic biofortification to boost zinc, selenium, and iodine concentrations of food crops grown on the loess plateau in China. J. Soil Sci. Plant Nutr. 14(2):459-470. Citado en: Hernández Castro, E., L. I. Trejo Téllez, F. C. Gómez Merino, M. N. Rodríguez Mendoza, P. Sánchez García y A. Robledo Paz. (2015). Bioaccumulation of iron, selenium,

- nitrate, and proteins in chard shoots. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15 (3):694-710.
- Maroto, J. (1995). *Horticultura herbácea especial 4^{ta} ed* Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa. 568 p.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. London, Academic Press. 889 p.
Citado en: Correndo, A., G. Rubio, I. Ciampitti y F. García. (2012). Dinámica del potasio en Molisoles de la Región Pampeana Norte. XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. XXIII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata (Argentina).
- Martínez Ballesta, M. C., L. López Pérez, M. Hernández, C. López Berenguer, F. G. Nieves y M. Carvajal. (2008). Agricultural practices for enhanced human health. *Rev. Phytochem* 7:251-260. Citado en: Chacón Lee, T. L. (2011). Efecto de la aplicación de soluciones de *Chorella Vulgaris* y *Scenedesmus Obliquus* sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli. Tesis. Facultad de Ingeniería. Universidad de La Sabana (Bogotá). 106p. En: <https://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/167/Tebbie%20Lin%20Chac%C3%B3n%20Lee%20%28Tesis%29.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
Consultado: 11/10/2018.
- Martínez, E. G., I. F. Segovia y A. F. López. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Departamento de tecnología de alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. En: <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>.
Consultado: 24/03/2017.
- Masih, L., H. Roginski, R. Premier, B. Tomkins y S. Ajlouni. (2002). Soluble protein content in minimally processed vegetables during storage. *Food Research International*, 35(7):697-702.
- Medina, D., H. Thompson, H. Ganther y C. Ip. (2001). Se-methylselenocysteine: a new compound for chemoprevention of breast cancer. *Nutrition and cancer* 40:12-17.
- Meplan, C. y J. Hesketh. (2012). The influence of selenium and selenoprotein gene variants on colorectal cancer risk. *Mutagenesis* 27:177-186.
- Migani, C y R. Crespi. (2010). Reutilización de efluentes urbanos: la transformación de un problema en un recurso. XVII Jornada de intercambio de conocimientos científicos y técnicos. FCE. UNRC. 21 p.

- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). (2013). Boletín situacional: Brócoli. Coordinación General del Sistema de Información Nacional. Ecuador.
- Ministerio de Agua, Ambiente y Servicios Públicos. (2016). Anexo único. Reglamentación de estándares y normas sobre vertidos para la preservación del recurso hídrico provincial. En: [http://web2.cba.gov.ar/Web/Leyes.nsf/0/37756ff5e7ed18be032580910054765a/\\$FILE/847-16%20ANEXO%20UNICO.pdf](http://web2.cba.gov.ar/Web/Leyes.nsf/0/37756ff5e7ed18be032580910054765a/$FILE/847-16%20ANEXO%20UNICO.pdf) Consultado: 05/12/2017.
- Moazeni, M., M. Nikaeen, M. Hadi, S. Moghim, L. Mouhebat, M. Hatamzadeh y A. Hassanzadeh. (2017). Estimation of health risks caused by exposure to enteroviruses from agricultural application of wastewater effluents. *Water research*, 125:104-113.
- Montero, L. S. L., R. C. García, J. P. Petitón, M. P. R. Calzadilla; y J. H. Puebla. (2009). Riego con aguas residuales a los cultivos del sorgo y maíz como alternativa para la producción de alimento animal. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 18 (4):44-48.
- Montoya, D. S. C. y J. J. H. Torres. (2013). Comparación de la concentración y actividad enzimática de la bromelina obtenida a partir de la pulpa de la piña (*Ananas comosus*) variedad perolera de dos grados de madurez. Tesis. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador. En: <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/89709/D-79793.pdf> Consultado: 06/06/2018.
- Moreno, D. A., M. Carvajal, C. Lopez-Berenguer y C. Garcia-Viguera. (2006). Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41:1508-1522. Citado en: Cartea, M. E., M. Francisco, P. Soengas y P. Velasco. (2010). Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules*, 16(1): 251-280.
- Moreno, S. G., H. P. Vela y M. O. S. Alvarez. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Rev. de Educación Bioquímica*, 27(4):119-129.
- Moscoso, J. (1995). Aspectos técnicos de la agricultura con aguas residuales. En: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/aya2/tema06.pdf> Consultado: 12/09/2018.

- Moscoso, J. y G. Merzthal (2001). Modulo: Manejo sanitario de las aguas residuales domésticas en la Agricultura Urbana. Documento de la Sesión Ventajas y Desventajas del uso de Aguas Residuales Tratadas en la Agricultura Urbana.
- Moscoso, J. (2002). Casos Prácticos de Uso de Aguas Residuales. CEPIS–Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. OPAS–Organización Panamericana de la Salud (OMS–Organización Mundial de la Salud). En: <http://www.bvsde.ops-ms.org/bvsair/e/repindex/rep84/vleh/fulltext/acrobat/moscoso5.pdf> Consultado: 16/09/2018.
- Munshi, C. B., G. F. Combs Jr y N. I. Mondy. (1990). Effect of selenium on the nitrogenous constituents of the potato. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(11):2000-2002.
- Muñoz, G. L. (2018). El potencial de los sistemas de riego por goteo subterráneos en Chile. *El Mercurio*. En: <http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Noticias/2015/09/07/El-potencial-de-los-sistemas-de-riego-por-goteo-subterraneos-en-Chile.aspx> Consultado: 16/08/2018.
- Murcia, O. M. A. y Arayón, V. D. F. (2016). Estrategias para el uso eficiente del agua a partir de la estimación de huella hídrica en cultivos de lechuga (*Lactuca sativa*) y brócoli (*Brassica*) para una finca de diez hectáreas en Mosquera Cundinamarca. Tesis. Programa de Ingeniería ambiental y sanitaria. Facultad de Ingeniería. Universidad de La Salle. 86p. En: http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/20412/41112702_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y Consultado: 18/07/2018.
- Mwegoha, W. M. y R. J. Jorgensen. (1977). Recovery of infective 3rd stage larvae of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia ostertagi* by migration in agar gel. *Acta Vet. Scand.*, 18:293-299.
- Naaz, S. y S. N. Pandey. (2010). Effects of industrial waste water on heavy metal accumulation, growth and biochemical responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Environmental Biology*, 31(3):273-276.
- Nagaharu, U. (1935). Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization". *Japanese Journal of Botany*. 7:389–452 p. Citado en: Prohens y Nuez. (2007). *Vegetables I:*

- Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae*. Handbook of plant breeding. Springer Science & Business Media. 428p.
- Naguib, A. E. M. M., F. K. El-Baz, Z. A. Salama, H. A. E. B, Hanaa, H. F, Ali y A. A. Gaafar. (2012). Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of Broccoli (*Brassica oleracea*, var. *Italica*) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(2): 135-142.
- Navarro López, E. R. (2010). Uso de agua residual en la producción de tomate hidropónico en invernadero. Departamento de Fitotecnia, Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma de Chapingo. Tesis Doctoral. En: <https://chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISDCH2010062505123414.pdf> Consultado: 09/09/2018.
- Nestel, P., H. E. Bouis, J. Meenakshi, W. Pfeiffer. (2006). Biofortification of staple food crops. *The Journal of Nutrition*. 136, 1064-1067 p. Citado en: Sida Arreola, J. P., E. Sánchez, G. D. Ávila Quezada, C. H. Acosta Muñíz y P. B. Zamudio-Flores. (2015). Biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas y su impacto en la nutrición y salud humana. *Tecnociencia Chihuahua* 9(2):67-74.
- Newman, D. J. y G. M. Craig. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3):311-335.
- Ng, T. B., Ng, C. C. W. y J. H. Wong. (2013). Health benefits of Brassica species: Characterization, functional genomics and health benefits. *Brassicáceas*. Minglin Lang (compilador). Nova Science Publishes. ISBN: 978-1-62808-4.
- Nicoletto C, S. Santagata, S. Pino y P. Sambo. (2016). Antioxidant characterization of different italian broccoli landraces. *Horticultura Brasileira* 34:074-079. DOI - <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620160000100011> Consultado: 12/10/2018.
- NIH (National Institutes of Health). (2017). Datos sobre el selenio. Department of Health & Human Services. USA. En: <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/Selenium-DatosEnEspañol.pdf> Consultado: 05/08/2018.
- Nolasco B. J., A. Outeiriño Pérez, J. Monzó Berenguer, A. González Benavente-García y J. López Marín. (2005). Aplicación de fertilizantes encapsulados en cultivo de brócoli en Murcia. *Horticultura Internacional*. 50:10-14.
- Noyola, A. (2003). Tendencias en el tratamiento de aguas residuales domésticas en Latinoamérica. Seminario Internacional sobre Métodos Naturales para el

- Tratamiento de Aguas Residuales. Universidad del Valle. Instituto Cinará. En: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/agua2003/noyo.pdf> Consultado: 07/06/2018.
- Nuez, F., C. Gomez Campo, P. Fernandez De Cordova, S. Soler y J. V. Valcarcel. (1999). Colección de Semillas de Coliflor y Brócoli. Centro de Conservación y Mejora de la Agro diversidad Valenciana. Ministerio De Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Monografías INIA: agrícola N° 1.
- Olagnero, G., A. Abad, S. Bendersky, C. Genevois, L. Granzella y M. Montonati. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25 (121):20-33. En: <http://andeguat.org.gt/wp-content/uploads/2015/03/Alimentos-funcionales-fibra-prebi%C3%B3ticos-probi%C3%B3ticos-y-simbi%C3%B3ticos1.pdf> Consultado: 10/09/2018.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43412/9241594012_eng.pdf?ua=1 Consultado: 14/01/2018.
- Organización de las Naciones Unidas. (2018). Población. En: <http://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html> Consultado: 07/02/2018.
- Organización Mundial de la Salud. (1989). Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture: report of a WHO scientific group. World Health Organization. Technical Report Series 778. Geneva. En: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39401/WHO_TRS_778.pdf?sequence=1&isAllowed=y Consultado: 07/02/2018.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater - Volume 2. Wastewater use in agriculture. En: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/gsuweg2/en/ Consultado: 07/02/2018.
- Orihuela, D., J. Hernández, R. Maestre y R. López-Bellido. (2007). Calibración de un minolta Spad meter en un cultivo de fresón. *Actas de Horticultura* 48:340-343.
- Pachón, H. (2010). El impacto nutricional de cultivos biofortificados o cultivos con mayor calidad nutricional. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

- Padmaja, K., B. V. Somasekharaiah y A. R. K. Prasad. (1995). Inhibition of chlorophyll synthesis by selenium: involvement of lipoxygenase mediated lipid peroxidation and antioxidant enzymes. *Photosyn* 31:1-7. Citado en: Saffar Yazdy, A., M. Lahouti, A. Ganjeali y H. Bayat. (2012). Impact of selenium supplementation on growth and selenium accumulation on spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(4):95-100. En: <https://profdoc.um.ac.ir/articles/a/1030877.pdf> Consultado: 19/01/2019.
- Palencia, P., F. Martínez, M. Burducea, J. A. Oliveira y I. Giralde. (2016). Efectos del enriquecimiento con selenio en spad, calidad de la fruta y parámetros de crecimiento de plantas de fresa en un sistema de cultivo sin suelo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38(1):202-212. En: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452016000100202&lng=es&tlng=es Consultado: 17/01/2019.
- Parra, J. P. y A. M. V. Arbos. (1997). Reutilización de las aguas residuales de la ciudad de Almería en los regadíos del Bajo Andarax. In *Actas del I y II Seminario del Agua* (265-287). Instituto de Estudios Almerienses.
- Pascual Antón, J. (1994). Brócoli. Su cultivo y perspectivas. *Horticultura*, 97:21-25.
- Pedrero, Z., Y. Madrid y C. Cámara. (2006). Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): a potential dietary source of selenium. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(6):2412-2417.
- Pedrero, F., S. Camposeo, B. Pace, M. Cefola y G. A. Vivaldi. (2018). Use of reclaimed wastewater on fruit quality of nectarine in Southern Italy. *Agricultural Water Management*, 203:186-192.
- Pennanen, A., T. Xue y H. Hartikainen. (2002). Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *J Appl Bot* 76:66-76. Citado en: Saffar Yazdy, A., M. Lahouti, A. Ganjeali y H. Bayat. (2012). Impact of selenium supplementation on growth and selenium accumulation on spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(4):95-100 En: <https://profdoc.um.ac.ir/articles/a/1030877.pdf> Consultado: 19/01/2019.
- Pérez Balibrea, S., C. García Viguera y D. A. Moreno Fernández. (2011). Incremento de compuestos fitoquímicos bioactivos en brotes de brócoli mediante tratamientos inductores de estrés. Dpto. Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC (Murcia). En: <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/49983-Incremento->

compuestos-fitoquimicos-bioactivos-brotes-brocoli-mediante-tratamientos.html

Consultado: 11/09/2018.

- Pérez Del Pozo, P. (2016). La importancia de las proteínas en la alimentación. Alimenta tu bienestar. En: <https://www.alimentatubienestar.es/importancia-de-las-proteinas-en-la-alimentacion/> Consultado: 12/10/2018.
- Pérez Nieto, S., R. M. Elizondo, R. N. Angel, M. A. Scoth, N. H. Fernández y G. R. Delmar. (2001). Efecto de las aguas residuales en la calidad y rendimiento en calabacita, en Chiconautla, México.
- Petracek, P. D. y C. E. Sams. (1987). Micronutrients, *Journal of Plant Nutrition*, 10:9-16, 2095-2107. doi: 10.1080/01904168709363760
- Pezzarossa, B., D. Remorini, M. L. Gentile y R. Massai. (2012). Effects of foliar and fruit addition of sodium selenate on selenium accumulation and fruit quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4):781-786.
- Plevich, J. O., A. R. Delgado, C. Saroff, J. C. Tarico, R. J. Crespi y O. M. Barotto. (2012). El cultivo de alfalfa utilizando agua de perforación, agua residual urbana y precipitaciones. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, 16(12).
- Podsedeck, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40:1-11. Citado en: Fernández León, M. F. (2012). Evolución de los parámetros de calidad físico-química y funcional de distintas brásicas sometidas a diferentes tratamientos postcosecha. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería del Medio Agronómico y Forestal, Universidad de Extremadura. 301p. En: http://dehesa.unex.es/bitstream/handle/10662/415/TDUEX_2012_Fern%C3%A1ndez_Le%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y Consultado: 29/05/2018.
- Pöldma, P., T. Tõnutare, A. Viitak, A. Luik y U. Moor. (2011). Effect of selenium treatment on mineral nutrition, bulb size, and antioxidant properties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(10):5498-5503. doi: 10.1021/jf200226p
- Pomares García, F., C. Baixauli Soria, R. Bartual Pastor y M. Ribó Herrero. (2007 a). El riego y la fertilización de la coliflor y el brócoli. Citado en: De Chaves, A. B. G. (2016). Estudio del comportamiento de cultivares de brócoli y determinación de las necesidades hídricas y coeficiente de cultivo 'Kc'. Tesis de Grado en Ingeniería Agrícola y el Medio Rural. Universidad de La Laguna. 236p.

- Pomares García, F., C. Baixauli Soria, R. Bartual Pastor y R. Albiach Vila. (2007 b). La fertilización de la coliflor y el brócoli. Citado en: De Chaves, A. B. G. (2016). Estudio del comportamiento de cultivares de brócoli y determinación de las necesidades hídricas y coeficiente de cultivo 'Kc'. Tesis de Grado en Ingeniería Agrícola y el Medio Rural. Universidad de La Laguna. 236p.
- Prohens, J. y F. Nuez. (2007). Vegetables I: *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, and *Cucurbitaceae*. Handbook of plant breeding. Springer Science & Business Media. 428p.
- Puenayan, A., F. Córdoba y A. Unigarro. (2010). Respuesta del brócoli *Brassica oleracea* var. itálica L. Híbrido Legacy a la fertilización con N-P-K en el municipio de Pasto, Nariño. Revista de Ciencias Agrícolas, 27(1):49-57.
- Quirantes Hernández, A. (2017). La importancia de las proteínas en la alimentación diaria. Rev. Cuba Ahora. En: <http://www.cubahora.cu/blogs/consultas-medicas/la-importancia-de-las-proteinas-en-la-diaria-alimentacion> Consultado: 11/08/2018.
- Raj, B. S., M. Chandía y R. Agarwal. (2005). Interaction of *Salmonella enteritica* subspecies enteritica Serovar Typhimurium and mung bean (*Phaseolus aureus*) plants. Journal of Food Protection 68:476-481.
- Ramos, S. J., V. Faquin, L. R. G. Guilherme, E. M. Castro, F. W. Ávila, G. S. Carvalho y C. Oliveira. (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. Plant soil environ, 56(12):584-588.
- Ramos, S. J., Y. Yuan, V. Faquin, L. R. G. Guilherme y L. Li. (2011). Evaluation of genotypic variation of broccoli (*Brassica oleracea* var. italic) in response to selenium treatment. Journal of agricultural and food chemistry, 59(8):3657-3665.
- Ramos, D., F. Salusso, L. Grosso, R. Crespi, M. Pugliese y F. Rocchia. (2013). Producción de ajo regado con agua residual y uso de cobertura vegetal de suelo. XXXVI Congreso Argentino de Horticultura. Libro de resúmenes. Tucumán. Argentina.
- Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. Lancet 356:233-241.
- Rayman, M. P. (2002). The argument for increasing selenium intake. The Proceedings of the Nutrition Society 61:203-215.
- Rayman, M. P., H. G. Infante y M. Sargent. (2008). Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. The British journal of nutrition 100:238-253.
- Rico Amorós, R., A. Manuel, A. Arahuetes Hidalgo y Á. F. Morote Seguido. (2016). Depuración y reutilización de aguas residuales regeneradas en las regiones de Murcia y Valencia. Instituto Interuniversitario de Geografía Universidad de

- Alicante. Instituto Interuniversitario de Geografía Universidad de Alicante. En: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/58800/1/Homenaje-Alfredo-Morales_52.pdf Consultado: 13/08/2018.
- Rincón, L., J. Sáez, J. A. Pérez, M. D. Gómez y C. Pellicer. (1999). Crecimiento y absorción de nutrientes del brócoli. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg*, 14:225-236.
- Ríos Ruíz, J. J. (2008). Biofortificación con Se en plantas de lechuga: estudio de la producción, calidad y estado nutricional. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. En: <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/2009/17621380.pdf;jsessionid=8FFC306D23FDBDF05C586A67055C8F52?sequence=1> Consultado: 11/11/2017.
- Risco, D., A. Gutiérrez, J. Val Falcón, J. León, A. Díaz Simón, P. Benalcázar y H. Prieto. (2018). Programación de riego en brócoli (*Brassica oleracea* L. cv. *italica*) en los Andes ecuatorianos. *Rev. IDESIA* 36(1):57-63.
- Rivera, R., O. Palacios, J. Chávez, A. Belmont, I. Nikolskii, M. A. De La Isla, A. Guzmán, L. Terrazas y R. Carrillo. (2007). Contaminación por coliformes y helmintos en los ríos Texcoco, Chapingo y San Bernardino tributarios de la parte oriental de la cuenca del Valle de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(2):69-77.
- Robbins, R. J., Keck, A. S., Banuelos, G., y Finley, J. W. (2005). Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli. *Journal of medicinal food*, 8(2):204-214. En: doi.org/10.1089/jmf.2005.8.204 Consultado: 02/06/2019.
- Rodríguez Balza, M., L. Pérez Ybarra y M. T. Bueno. (2018). Plan de muestreo de tres clases. *INNOTEC Gestión*, 26-34 p. En: http://catalogo.latu.org.uy/opac_css/doc_num.php?explnum_id=2427 Consultado: 11/10/2018.
- Rodríguez Paucar, G. N. (2014). Determinación de sólidos solubles en alimentos. Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú. En: <https://es.slideshare.net/vegabner/determinacin-de-slidos-solubles-en-alimentos> Consultado: 10/10/2018.
- Rodríguez, M. B. S., S. M. Megías y B. M. Baena. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima ¿cerca o lejos? *Rev Esp Salud Pública*, 77(3):317-331.

- Rojas, R. (2002). Gestión integral de tratamiento de aguas residuales. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente: Organización Mundial de la Salud, 1-35 p.
- Rollins, R. (2009). *Brassicaceae*. Flora de Nicaragua. En: <http://www.tropicos.org/Name/42000136?projectid=7>. Consultado: 10/11/2018.
- Rosas Rodríguez, H. (2001). Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat. Tesis. Universitat Politècnica de Catalunya. En: <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/94296> Consultado: 18/10/2018.
- Sáenz Forero, R. (2006). Introducción y uso de aguas residuales tratadas en agricultura y acuicultura: Riego y Salud. En: <http://www.bvsde.paho.org/bvsair/e/repindex/rep53/rys/rys.html>. Consultado: 13/08/2018.
- Saffar Yazdy, A., M. Lahouti, A. Ganjeali y H. Bayat. (2012). Impact of selenium supplementation on growth and selenium accumulation on spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. Notulae Scientia Biologicae, 4(4):95-100. En: <https://profdoc.um.ac.ir/articles/a/1030877.pdf> Consultado: 19/01/2019.
- Sandoval Yoval, M. I. L. (2004). Cultivo de Hortalizas con Aguas Residuales Tratadas. En: <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloIV/4CultivodeHortalizasLuciano.pdf> Consultado: 17/10/2018.
- Sandoval Yoval, L. y Collí Misset, J. (2004). Tratamiento integral de agua municipal, su desinfección y reúso en la agricultura. XXIX Congreso Sanitario y Ambiental. San Juan. Puerto Rico.
- Sarabia Meléndez, I. F., R. Cisneros Almazán, J. Aceves De Alba, H. M. Durán García y J. Castro Larragoitia. (2011). Calidad del agua de riego en suelos agrícolas y cultivos del Valle de San Luis Potosí, México. Revista internacional de contaminación ambiental, 27(2):103-113.
- Sarli, A. (1980) Tratado de Horticultura. 2^{da} edición. Editorial Hemisferio Sur S.A.
- Sartor, A. y O. Cifuentes. (2012). Propuesta de Ley Nacional para reúso de aguas residuales. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires, Argentina. En: http://www.edutecne.utn.edu.ar/monografias/aidis_ley_reuso_aguas.pdf Consultado: 14/08/2018.

- Schonfof, I., H. P. Klaring, A. Krumbein, W. Clauben y M. Schreiner. (2007). Effect of temperatura increase under low radiation conditions on phytochemicals and ascorbic acid in greenhouse grown broccoli. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119:103-111.
- Selim, E. M. y A. All Mosa. (2012). Fertigation of humic substances improves yield and quality of broccoli and nutrient retention in a sandy soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175(2):273-281.
- Seppänen, M. M., J. Kontturi, I. L. Heras, Y. Madrid, C. Cámara y H. Hartikainen. (2010). Agronomic biofortification of *Brassica* with selenium enrichment of SeMet and its identification in *Brassica* seeds and meal. *Plant and Soil*, 337(1-2):273-283.
- SFA (Subsecretaria de Fomento a los Agronegocios). (2011). Monografía de cultivos: Brócoli. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. En: <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estudios/Documents/monografias/brocoli.pdf> Consultado: 15/11/2018.
- Sharma, S., A. Bansal, S. K. Dhillon y K. S. Dhillon. (2010). Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil*, 329(1-2):339-348.
- Sheldon, M. y D. Margen. (1992). *Wellness encyclopedia of food and nutrition*. The University of California at Berkeley. Rebus, New York.
- Sida Arreola, J. P., E. Sánchez, G. D. Ávila Quezada, C. H. Acosta Muñiz y P. B. Zamudio-Flores. (2015). Biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas y su impacto en la nutrición y salud humana. *Tecnociencia Chihuahua* 9(2):67-74.
- Sigrist, M., L. Brusa, D. Campagnoli y H. Beldomenico. (2012). Determination of selenium in selected food samples from Argentina and estimation of their contribution to the Se dietary intake. *Food chemistry* 134:1932-1937.
- Silva J., P. Torres y C. Madera. (2008). Reuso de aguas residuales domésticas en agricultura. Una revisión. *Rev. Agronomía Colombiana*, (26)2:347-359.
- Sinaluisa, S. L. M. (2012). Evaluación de la eficacia de ocho mezclas de Fertilizantes Inorgánicos en el rendimiento y rentabilidad del cultivo de Brócoli (*Brassica oleracea* var. itálica) en la comunidad Gatazo Zambrano provincia Chimborazo.
- Singh, J., A. K. Upadhyay, A. Bhadur, B. Singh, K. P. Singh y R. Mathura. (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). *Scientia Horticulturae*, 108:233-237.

- Song, K., Osborn, T. C. y P. H. Williams. (1990). Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorfism (RFLPs). 3. Genome relationships in Brassica and related genera and the origin of *B. oleracea* and *B. rapa* (syn. *campestris*). *Theoretical and Applied Genetics*, 79:497-506. Citado en: Prohens, J. y F. Nuez. (2007). *Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae*. Handbook of plant breeding. Springer Science & Business Media. 428p.
- Sousa, C.; D. M. Pereira, J. A. Pereira, A. Bento, M. A. Rodrigues, S. Dopico-Garcia, P. Valentao, G. Lopes, F. Ferreres, R. M. Seabra y P. B. Andrade. (2008). Multivariate analysis of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) phenolics: influence of fertilizers. *J. Agric. Food Chem.* 56:2231–2239.
- Stoppani, M. I. y N. Francescangeli. (2010). El brócoli y su potencial: Hortaliza top del tercer milenio. En: www.fca.uner.edu.ar/files/.../El%20brocoli%20y%20su%20potencial.pdf. Consultado: 17/08/2018.
- Su, F., L. Dong, H. Li y T. Wang. (2018). Influence of Paper Mill Wastewater on Reed Chlorophyll Content and Biomass. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2018.06.003>
- Suárez, A., N. Yamid y W. O. Rodríguez Salazar. (2017). Comparación del manejo de aguas residuales domésticas de la ciudad de Ibagué, con las tecnologías empleadas en la ciudad de Sao Carlos Brasil. En: https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/14495/1/TESIS_GRADO_CO_MPARATIVO_PTARS_COLOMBIA_BRASIL.pdf Consultado: 11/10/2018.
- Subsecretaría de Recursos Hídricos. (2006). Bases para un Plan Nacional de los Recursos Hídricos de la Argentina. En: www.hidricosargentina.gov.ar/Base-PlanNac.pdf. Citado en: Sartor, A. y O. Cifuentes. (2012). *Propuesta de Ley Nacional para reúso de aguas residuales*. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires, Argentina. En: http://www.edutecne.utn.edu.ar/monografias/aidis_ley_reuso_aguas.pdf Consultado: 13/08/2018.
- Tamayo Veléz, A. (2006). Suelos y Fertilización. Citado en: Jaramillo N. J. E. y A. C. D. Díaz. (2006). *El Cultivo de las Crucíferas*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA, Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Antioquia, Colombia. Manual Técnico 4. 176 p.

- Tan, D. K. Y. (1999). Effect of temperature and photoperiod on broccoli development, yield and quality in south-east Queensland. En: <http://ses.library.usyd.edu.au/handle/2123/639>. Consultado: 15/10/2018.
- Tchobanoglous, G. y F. L. Burton. (1991). Wastewater Engineering Treatment, Disposal y Reuse. 3^{ra} ed. 1331 p.
- Teuscher, E. (1965). A new single method of examine faeces for diagnosis of helminth disease of ruminants. *Zentralb Veterinärmed* 12:241-248.
- Toivonen, P. M., B. J. Zebarth y P. A. Bowen. (1994). Effect of nitrogen fertilization on head size, vitamin C content and storage life of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Canadian journal of plant science*, 74(3):607-610.
- Torres C. V. y D. O. Chogar. (2014). Magnesio-selenio. *Revista de Actualización Clínica Investiga* 41:2156-2159. En: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000200007&script=sci_arttext&tlng=es Consultado: 22/10/2018.
- Tran, Q. K., K. A. Schwabe y D. Jassby. (2016). Wastewater reuse for agriculture: development of a regional water reuse decision-support model (RWRM) for cost-effective irrigation sources. *Environmental science & technology*, 50(17):9390-9399.
- Turakainen, M., H. Hartikainen y M. M. Seppänen. (2004). Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(17):5378-5382.
- Uchida, R. (2000). Essential nutrients for plant growth: nutrient functions and deficiency symptoms. *Plant nutrient management in Hawaii's soils*, 31-55p. En: <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/pnm3.pdf> Consultado: 12/11/2018.
- Uhland, R. E. (1949). Physical properties of soils as modified by crops and management. *Soil Sci. Soc. Proc.* 14:361-366.
- Ushñahua, L. E. Q. (2004). Valoración de las aguas residuales en Israel como un recurso agrícola: consideraciones a tomar en cuenta para la gestión del agua en el Perú. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 7(13):64-72.
- Vadhanavikit, S., C. Ip y H. E. Ganther. (1993). Metabolites of sodium selenite and methylated selenium compounds administered at cancer chemoprevention levels in the rat. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 23:731-745.

- Vergine, P., C. Salerno, A. Libutti, L. Beneduce, G. Gatta, G. Berardi y A. Pollice. (2017). Closing the water cycle in the agro-industrial sector by reusing treated wastewater for irrigation. *Journal of Cleaner Production*, 164:587-596.
- Vigliola, M. (1996). *Manual de Horticultura*. 2^{da} Edición. 3^{ra} Reimpresión. Hemisferio Sur. Buenos Aires. 235p. ISBN978-95-05042-40-1
- Wachowicz, B., K. Zbikowska y P. Nowack. (2001). Selenium compounds in the environment; their effect on human health. *Cell and Mol Biol Letters* 6:375-381.
- White, P. J., H. C. Bowen, P. Parmaguru, M. Fritz, W. P. Spracklen, R. E. Spiby, M. C. Meacham, A. Mead, M. Harriman, L. J. Trueman, B. M. Smith, B. Thomas y M. R. Broadley. (2004). Interactions between selenium and sulfur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 55:1927-1937. Citado en: Hernández Castro, E., L. I. Trejo Téllez, F. C. Gómez Merino, M. N. Rodríguez Mendoza, P. Sánchez García y A. Robledo Paz. (2015). Bioaccumulation of iron, selenium, nitrate, and proteins in chard shoots. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15(3):694-710.
- Wien, H. C. y D. C. E. Wurr. (1997). Cauliflower, Broccoli, Cabbage and Brussels Sprouts. En: *The Physiology of Vegetable Crops*. 15: 511-552. CABI Publishing. 662p.
- Witte, K. K., A. L. Clark y J. G. Cleland. (2001). Chronic heart failure and micronutrients. *Journal of the American College of Cardiology* 37:1765-1774.
- Zamora, E. (2016). El cultivo de brócoli. Serie guías – Producción de Hortalizas DAG/HORT-010. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora, México.
- Zeng, H., C. D. Davis y J. W. Finley. (2003). Effect of selenium-enriched broccoli diet on differential gene expression in min mouse liver1, 2. *The Journal of nutritional biochemistry*, 14(4): 227-231. En: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286303000056?via%3Dihub> Consultado: 13/01/2019.
- Zhao, H., J. Huang, Y. Li, X. Song, J. Luo, Z. Yu y D. Ni. (2016). Natural variation of selenium concentration in diverse tea plant (*Camellia sinensis*) accessions at seedling stage. *Scientia horticulturae*, 198:163-169.
- Zhu, Z., Y. Zhang, J. Liu, Y. Chen y X. Zhang. (2018). Exploring the effects of selenium treatment on the nutritional quality of tomato fruit. *Food chemistry*, 252:9-15.

ANEXOS



Planta Piloto de Tratamiento de Efluentes Urbanos



Cámara receptora de efluentes crudos



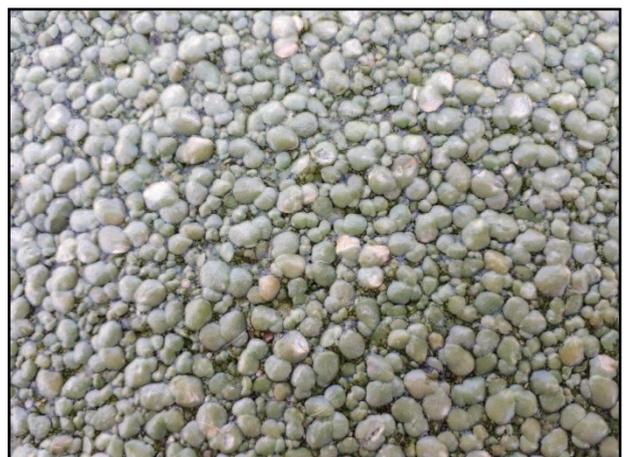
Primer Laguna Facultativa



Segunda Laguna Facultativa



Laguna de Maduración



Macrófitas flotantes (*Lemnas* sp)



Estación de bombeo de EUT y AC



Inicio de los trabajos de instalación del riego subterráneo



Demarcación de la parcela experimental



Colocación de la tubería integrada de goteo subterráneo



Instalación de los cabezales de riego con EUT y AC



Regulador de presión del equipo de goteo



Instalación de la válvula de aire-vacío del sistema



Finalización de los trabajos de instalación del equipo



Evaluación del funcionamiento del equipo de riego



Determinaciones de humedad de suelo



Producción de plantines en bandejas de germinación



Trasplante a la parcela experimental



Parcela de brócoli: 20 días después del trasplante (ddt)



Parcela de brócoli. 50 ddt



Parcela regada con AC (izq.). Riego con EUT (der.)



Parcela de brócoli próxima a cosecha (año 2016)



Pella de brócoli. Cultivar Green Pia



Inicio de cosecha de la parcela experimental (año 2016)



Evaluación de resultados de producción en laboratorio



Comparativa de resultados (año 2016).



Toma de muestras para determinaciones analíticas



Muestras congeladas a -80 °C en ultrafreezer



Preparación de la muestras (molienda en frío)



Acondicionamiento de las muestras



Parcela del segundo año de experimentación (año 2017)



Aplicación foliar de Selenio



Plantas de brócoli. Cultivar Matsuri (año 2017)



Mediciones de biomasa de cultivo (año 2017).



Espectrofotómetro utilizado en las determinaciones



Refractómetro para la determinación de °Brix