



DETERMINACIÓN DE NITRATOS EN VEGETALES COMPARACIÓN DE CUATRO MÉTODOS ANALÍTICOS

DETERMINATION OF NITRATES IN VEGETABLES COMPARATION OF FOUR ANALYTIC METHODS

Analía Valdés
Luis Martí

María Flavia Filippini
Carlos Salcedo

Originales
Recepción: 16/07/2003
Aceptación: 11/11/2003

RESUMEN

Para la cuantificación de nitratos hay numerosas técnicas y no existe entre los analistas unanimidad en la selección de la más adecuada. Por tal motivo, se compararon cuatro métodos para la determinación de nitratos en muestras vegetales con el fin de evaluar la correlación entre los mismos y establecer pautas para su utilización. Se utilizaron 690 muestras de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*), pertenecientes a los tipos arropollado y mantecoso, recolectadas a lo largo de un año en el Mercado Cooperativo de Guaymallén (Mendoza, Argentina). Según los tenores de nitratos encontrados en la población estudiada se efectuó un sub-muestreo aleatorio estratificado proporcional para lograr un número de muestras que representaran la variabilidad del total de la población.

Se utilizaron cuatro métodos para la determinación de nitratos:

1. destilación por arrastre con vapor, considerado como método de referencia
2. colorimetría por nitración con ácido salicílico
3. colorimetría modificada
4. potenciometría con electrodo selectivo

Se probaron diferentes modelos de regresión entre el método de referencia y los otros tres, siendo el lineal el que mejor se ajustó en todos los casos. Los métodos estudiados tuvieron comportamiento semejante. La mayor correlación ($r^2 = 93\%$) se observó entre la destilación por arrastre con vapor y la potenciometría; no obstante, los restantes también presentaron alta correlación. Consecuentemente, la elección del procedimiento analítico dependerá principalmente del número de muestras a analizar, del tiempo requerido por el análisis y del costo del mismo.

ABSTRACT

A number of methods have been devised for the determination of nitrates in plant tissue, but no unanimous agreement has been reached as to which is the most satisfactory. This paper looks at four such methods of plant tissue analysis and seeks to establish correlations among them and set guidelines for their selection and applicability. A total of 690 samples for iceberg an butterhead lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) were collected within a one year period at the Mercado Cooperativo de Guaymallén (Mendoza, Argentina). According to the tenors of NO_3^- found in the entirety of the studied population, a proportional stratified random sub-sampling was made in order to obtain a number of samples that would represent total population variability.

Four methods were used in the determination of nitrates:

1. the steam distillation method, taken as reference method
2. the colorimetric method, for nitration with salicylic acid
3. the modified colorimetric method.
4. the potentiometric method, with ion selective electrode

Different regression models were used in evaluating the correlation between the reference and the other methods, with the result that being the lineal model the one better suited to all cases. The biggest correlation ($r^2 = 93\%$) existed between the distillation and potentiometric methods. Nevertheless the remaining methods also presented high correlation. Method selection will depend mainly on the number of samples to be analyzed, the required analysis time and the cost.

Palabras clave

nitratos • vegetales • métodos analíticos

Key words

nitrates • vegetables • analytic methods

INTRODUCCIÓN

La valoración de nitratos (NO_3^-) interesa en las disciplinas agrícolas y ambientales. Es una de las especies químicas analizadas con mayor frecuencia como constituyente normal en abonos y fertilizantes, o como contaminante en productos alimenticios, aguas de consumo, desechos urbanos e industriales. Además, la cuantificación de nitratos es utilizada corrientemente para diagnosticar el estado nutricional de las plantas cultivadas.

La excesiva presencia de NO_3^- en alimentos y agua compromete seriamente sus características higiénico-sanitarias. La OMS y la FAO indican 3.7 mg NO_3^-/kg peso como dosis diaria admisible en adultos (7). Dado que aproximadamente el 75 % de los nitratos ingeridos es aportado por las verduras (11) es importante su determinación en las mismas. El contenido varía según la especie, variedad, parte de la planta comestible, etc. (6, 8, 14). La lechuga (*Lactuca sativa* L.), consumida en ensaladas, es una de las especies con mayor tendencia a alcanzar alta concentración en hojas y nervaduras. Por tal causa, en varios países europeos se ha fijado límite: 2 500 - 4 500 mg NO_3^-/kg peso fresco (12).

Entre las técnicas de determinación se destacan la destilación por arrastre con vapor y los métodos potenciométricos, colorimétricos y cromatográficos (13). No hay consenso unánime en la elección del procedimiento más adecuado debido a las distintas interferencias posibles, originadas por cloruros, nitritos y amonio, y a la diferente sensibilidad de cada método (5). En el análisis de NO_3^- en agua potable las interferencias son ínfimas pero en vegetales y alimentos, en general, son significativas (13).

La destilación por arrastre con vapor (3) ha sido utilizada como método standard (13). Actualmente se prefieren la colorimetría por nitración con ácido salicílico (5) y la potencimetría con electrodo selectivo para NO_3^- (13).

Objetivos

- Ensayar cuatro métodos para la determinación de NO_3^- en muestras de plantas comerciales de lechuga (*Lactuca sativa* L.).
- Evaluar si existe correlación entre el método de referencia y las otras metodologías estudiadas.
- Indicar pautas para su utilización adecuada.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el Mercado Cooperativo de Guaymallén, durante un año, se recolectaron 690 muestras de lechuga fresca de los tipos arrepollado y mantecoso para determi-

nar los niveles de NO_3^- por el método colorimétrico de nitración con ácido salicílico (5).

Dicho método es muy usado en la Unión Europea ya que permite trabajar con un número elevado de muestras simultáneamente, empleando un espectrofotómetro con rango visible. La población muestral se dividió en estratos según el tenor de NO_3^- calculándose el tamaño de la muestra para un error de estimación del 10 % de la media general y un nivel de confianza del 95 %. A continuación se efectuó un sub-muestreo aleatorio estratificado proporcional con el fin de lograr un número de muestras que representara la variabilidad del total de la población. El tamaño muestral resultante fue 31. Sobre esta selección se valoró el NO_3^- empleando los siguientes métodos:

I. Destilación por arrastre con vapor (3)

- Extracción de las formas solubles de nitrógeno del material vegetal seco en contacto con solución 1N de NaCl en caliente y agitando durante 10 minutos (relación 1:200 p/v)
- Determinación de nitrógeno amoniacal (N-NH_4) sobre 10 ml del extracto mediante destilación por arrastre con vapor en ambiente alcalino por presencia de óxido de magnesio.
- Recepción del destilado sobre 5 ml de ácido bórico al 2 %, con indicadores. Éste retiene el amoníaco virando su coloración del rojo vinoso al azul verdoso.
- Determinación de nitrógeno nítrico (N-NO_3) mediante destilación por arrastre con vapor, previa reducción de nitrato a amoníaco (NH_3) por adición de aleación Devarda.
- Recepción del destilado en otro erlenmeyer con igual cantidad de ácido bórico 2 %.
- Titulación del amoníaco con solución 0.005 N de H_2SO_4 hasta reaparición de la coloración roja vinosa original.
- Cálculos:
 $1 \text{ ml de } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ 0.005 N equivale a } 70 \text{ } \mu\text{g N-NO}_3/\text{ml}$
 $\mu\text{g N-NO}_3/\text{ml} = \text{ml (gastados en la titulación)} * 70 \text{ } \mu\text{g/ml} * 1000 / \text{peso muestra}$
 $\mu\text{g NO}_3/\text{g} = \mu \text{ N-NO}_3/\text{g} * 4.43$

II. Colorimetría por nitración con ácido salicílico (5)

El complejo formado por nitración de ácido salicílico bajo condiciones fuertemente ácidas presenta máxima absorción a una longitud de onda de 410 nm en soluciones básicas ($\text{pH} > 12$). La absorbancia del cromóforo es directamente proporcional a la cantidad de N-NO_3^- presente en la muestra. Los iones NH_4^+ , NO_2^- y Cl^- no interfieren. Se trabaja en tubos con muestra y contramuestra, para eliminar el efecto de la absorción provocada por los pigmentos vegetales y así cuantificar solamente la absorbancia del complejo formado.

A continuación se detalla el procedimiento seguido.

- Extracción del N-NO_3^- : ebullición de 0.5 g de muestra en 50 ml de agua destilada durante 30 minutos.
- Filtración y transferencia cuantitativa a matraz de 50 ml.
- Pipeteo de alícuotas de 0.2 ml de extracto por duplicado en tubos de vidrio de 25 ml (tubo testigo y tubo problema).
- Adición al tubo problema de 0.8 ml de solución de ácido salicílico al 5 % (p/v) en ácido sulfúrico concentrado. Adición de 0.8 ml de ácido sulfúrico concentrado al

tubo testigo.

- Adición lenta, transcurridos 20 minutos, de 19 ml solución 2N NaOH a cada tubo.
- Desarrollo de color durante 24 horas (color estable hasta 72 hs).
- Preparación de soluciones patrón de NO_3^- con 10, 20, 30, 40, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/g}$ a partir de una solución madre de 1000 $\mu\text{g NO}_3\text{K/g}$.
- Pipeteo de alícuotas de 0.2 ml de las soluciones patrón. Adición a cada tubo de los mismos reactivos que para el tubo problema.
- Lectura de la absorbancia de las soluciones patrón en un espectrofotómetro de doble haz a longitud de onda = 410 nm. Con los valores obtenidos se ajusta una recta de regresión y se calcula el coeficiente angular (m) para establecer la concentración del N- NO_3^- en las muestras problema.
- Lectura de la absorbancia ($\text{Abs}_{\text{muestra}}$) de cada muestra con su blanco.
- Cálculos:

$$\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g} = m * \text{Abs}_{\text{muestra}} * 50 \text{ ml} / \text{peso de muestra (g)}$$

$$\mu\text{g NO}_3^-/\text{g} = \mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g} * 4.43$$

III. Colorimetría por nitración con ácido salicílico, modificada

La colorimetría descrita anteriormente es modificable a nivel de extracción del NO_3^- en tejidos vegetales (5) extrayéndolo con 50 ml de agua destilada y agitando durante 2 horas a temperatura ambiente.¹

IV. Potenciometría con electrodo selectivo

El electrodo de NO_3^- mide la actividad del ión nitrato ($a\text{NO}_3^-$) relacionada con la concentración molar ($m\text{NO}_3^-$) según la ecuación:

$$m\text{NO}_3^- = a\text{NO}_3^- * \gamma\text{NO}_3^-$$

siendo γNO_3^- el coeficiente de actividad.

El potencial medido: E, se vincula con $a\text{NO}_3^-$ mediante la siguiente ecuación:

$$E = E_1 - S \log a\text{NO}_3^-$$

donde:

E_1 : constante (porción del potencial E debido al electrodo de referencia externo y a factores internos en el electrodo de NO_3^-)

S: factor de Nernst = 59.16 mV, a 25 °C

A continuación se realizan los siguientes pasos:

- Preparación de soluciones patrón de 1, 10, y 100 $\mu\text{g NO}_3^-/\text{g}$
- Lecturas con el electrodo para construir la curva de calibración [(mV vs $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$] que permite calcular las concentraciones de N- NO_3^- en las muestras
- Lectura de muestras (se pesa 0.5 g de muestra foliar seca y pulverizada y se agrega solución extractante de sulfato de aluminio)
- Cálculos:

La concentración del N- NO_3^- en el extracto ($\text{mg N-NO}_3^-/\text{g}_{\text{ext.}}$) se determinó mediante la curva de calibración.

$$\mu\text{g N-NO}_3^- / \text{g} = \mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}_{\text{ext.}} * 100$$

¹ Malorgio, F. 1995. Determinazione dei nitrati in tessuti vegetali. Metodo modificado dell'acido salicil-solforico Cataldo et. Al, 1975. Comunicación oral.

$$\mu\text{g NO}_3^- / \text{g (p.s.)} = \mu\text{g N-NO}_3^- / \text{g} * 4.43$$

RESULTADOS

Para determinar los modelos que relacionan los diferentes métodos se realizó un análisis de regresión probando las funciones lineal, exponencial, logarítmica, recíproca y potencial.

En todos los casos, el modelo lineal fue el que mejor se ajustó al análisis re-

Modelo	Ecuación	Método destilación por arrastre con vapor vs.					
		Colorimetría		Colorimetría modificada		Potenciometría	
		r	r ²	r	r ²	r	r ²
Lineal	Y = a + bX	0.902	0.814	0.866	0.741	0.966	0.933
Exponencial	Y = e ^(a+bX)	0.883	0.779	0.846	0.746	0.887	0.788
Logarítmico	Y = a + b ln(X)	0.834	0.697	0.812	0.661	0.952	0.906
Recíproco-Y	Y = 1 / (a + bX)	-0.795	0.633	-0.766	0.587	-0.753	0.567
Recíproco-X	Y = a + b / X	-0.735	0.541	-0.734	0.539	-0.853	0.729
Recíproco doble	Y = 1 / (a + b/X)	0.769	0.591	0.752	0.567	0.908	0.825
Potencial	Y = a X ^b	0.854	0.729	0.823	0.678	0.939	0.883

querido, como se aprecia en la siguiente tabla:

Análisis de regresión lineal

- Método de destilación por arrastre con vapor vs colorimetría
Ecuación de regresión: $y = 726.92 + 0.89 x$
Probabilidad hasta F: $4,21 \cdot 10^{-12}$
Coeficiente de determinación (r²): 81.4 %

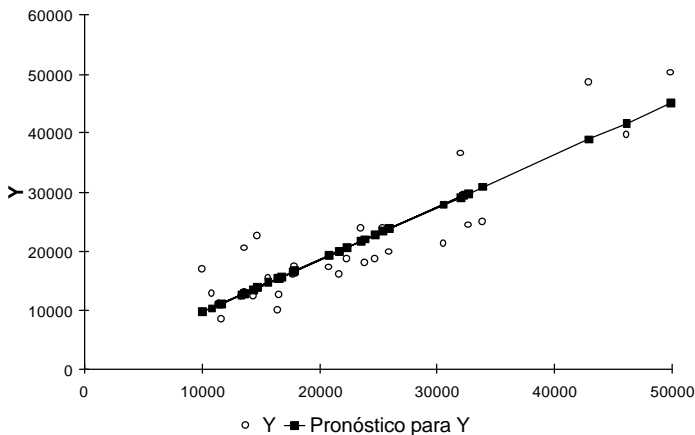


Figura 1. Curva de regresión ajustada: destilación vs colorimetría

- Coeficiente de correlación (r): 0.902

• Método de destilación por arrastre con vapor vs colorimetría modificada

Ecuación de regresión: $y = -6784.55 + 1.76 x$

Probabilidad hasta F: $3,14 \cdot 10^{-10}$

Coeficiente de determinación (r^2): 74.1 %

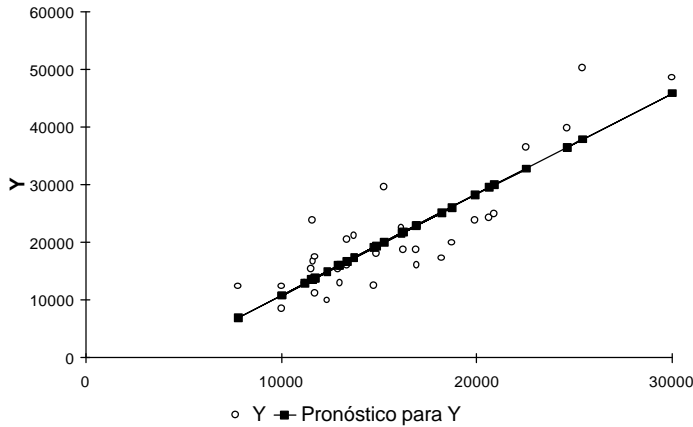


Figura 2. Curva de regresión ajustada: destilación vs colorimetría modificada

- Coeficiente de correlación (r): 0.866

• Método de destilación por arrastre con vapor vs potenciometría

Ecuación de regresión: $y = 6080.69 + 0.56 x$

Probabilidad hasta F: $1,37 \cdot 10^{-18}$

Coeficiente de determinación (r^2): 93.3 %

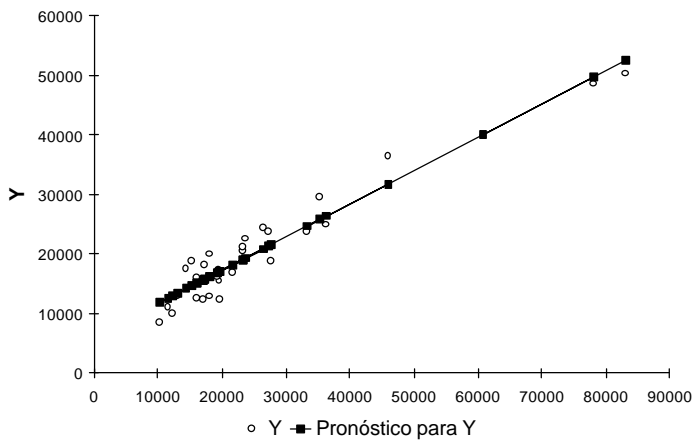


Figura 3. Curva de regresión ajustada: destilación vs potenciometría

Coefficiente de correlación: (r): 0.966

DISCUSIÓN

El coeficiente de determinación obtenido del análisis de regresión entre los métodos de destilación por arrastre con vapor y potenciométrico indica que este último puede pronosticarse en un 93 % de su variación por el método considerado de referencia. Esto coincide con lo reportado por otros autores quienes hallaron alta correlación entre ambos procedimientos (10, 13).

En el método del electrodo selectivo es necesario adicionar cantidades conocidas de NO_3^- a las muestras en estudio cuando la concentración de dicho anión es baja (13). En las determinaciones realizadas en lechuga no se presentó este inconveniente debido a que los extractos contenían tenores de NO_3^- acordes con la sensibilidad del método. Otra desventaja del procedimiento es la interferencia producida por los iones, como Cl^- , Br^- , I^- y S^{2-} , de acuerdo con sus respectivas concentraciones en la muestra. Otro aspecto importante para tener en cuenta es la elección de una combinación apropiada de electrodo-pehachímetro, lo cual representa un elevado costo (4).

En técnicas colorimétricas las principales fuentes de interferencias fueron los iones NO_2^- , NH_4^+ y Cl^- . Este último afecta la determinación cuando su concentración es cercana al 2 %, valor que excede los tenores normalmente presentes en tejidos vegetales. Además, se ha observado que el método colorimétrico es adecuado para muestras que contienen entre 500 a 30 000 $\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{g}$ de peso seco, encontrándose el óptimo de la linealidad entre 1 y 60 $\mu\text{g N-NO}_3^-$ (5).

El coeficiente de determinación, resultante de la regresión entre los métodos de arrastre con vapor y colorimétrico señala que el 81 % de las variaciones que experimenta el segundo método están explicadas por el primero.

En la regresión entre el método de referencia y el colorimétrico modificado, el coeficiente de determinación obtenido indica que este último puede pronosticarse en un 74 % de su variación por el método testigo. Se observa que este coeficiente es menor que el obtenido en la regresión anterior, lo cual podría deberse a una disminución en la extracción del NO_3^- por diferencias en la temperatura ambiente y la velocidad de agitación de las muestras. Por esta razón se debería estandarizar y optimizar la extracción controlando la temperatura y el tiempo de agitación.

CONCLUSIONES

- ❖ Los tres métodos estudiados tienen un comportamiento semejante en la cuantificación de NO_3^- en tejidos vegetales con respecto al método de referencia (destilación por arrastre con vapor). Los cambios en las concentraciones foliares fueron detectados de manera similar en todos los casos. La más alta correlación correspondió al método potenciométrico.

- ❖ La elección del método dependerá principalmente del número de muestras a analizar, del tiempo requerido por el análisis y del costo del mismo. Si bien el método del electrodo selectivo da los mejores resultados, requiere una combinación apropiada de electrodo-peachímetro que representa una alta inversión inicial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ananth, S. and Moraghan, J. T. 1987. The effects of calcium and magnesium on soil nitrate determination by automated segmented flow methods. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 51: 664-667. Madison. USA.
2. Blom-Zandstra, M. 1989. Nitrate accumulation in vegetables and its relationships to quality. *Ann. Appl. Biol.*, 115, 553-561.
3. Bremner, J. M. 1965. Inorganic nitrogen. In: C. A. Black et al. (eds.) *Methods of soil analysis. Part II.* Agronomy N° 9: 1179 -1237 Am. Soc. of Agron. Madison. USA.
4. Carlson, R. M. et al. 1990. Rapid direct determination of ammonium and nitrate in soil and plant tissue extracts. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 21: 1519-1529. USA.
5. Cataldo, D. A. et al. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of acid salicylic. *Commun. Soil Sci. and plant analysis.* 6: 71-80. USA.
6. Filippini, M. F. 1996. Aspetti ecofisiologici della nutrizione minerale in radicchio (*Cichorium intybus* L. var. *silvestre Bischoff*). *Agron. Ambientale. Univ. degli Studi. Padova. Italia.*
7. La Malfa, G. 1988. Nuovi orientamenti dei consumi e delle produzioni alimentari. La qualità degli ortaggi destinati al consumo allo stato fresco. *Cons. Naz. delle Ricerche.* 69 pp. Torino. Italia.
8. Magnifico, V. 1984. L'accumulo dei nitrati negli ortaggi. *Not. Ortoflorofruit.* 6: 246-250. Italia.
9. Maynard, D.; Barker, A.; Minotti, P. and Peck, N. 1976. Nitrate accumulation in vegetables. *Adv. Agron.* 28, 71-118.
10. Mitrakas, M. G. et al. 1991. Nitrate determination in sugarbeet sap extracted with Pb(CH₃COO)₂-PbO using an ion-selective electrode. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22: 586-596. USA.
11. Patruno, A. 1984. Influenza dei fattori agronomici sul contenuto dei nitrati nei prodotti agricoli. *Riv. de Agron.* 18: 79-91. Italia.
12. Pimpini, F. 1994. I nitrati negli ortaggi: preoccuparsi è bene, occuparsene è meglio. *Colture Protette.* 12: 7. Italia.
13. Sah, R. N. 1994. Nitrate-nitrogen determination: a critical review. *Commun. Soil Sci. plant anal.* 25 (17-18): 2841-2869. University of California, Davis. USA.
14. Seitz, P. 1986. La problematica dei nitrati in orticoltura. *Colture Protette.* 15: 10, 17-24. Italia.