

**Nota Técnica**

## Eliminación del color del extracto para determinar nitrato en muestras secas de lechuga

Beretta Andrés<sup>1</sup>, Casanova Omar<sup>1</sup>, Monza Jorge<sup>2</sup>, Perdomo Carlos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Suelos y Aguas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Garzón 780. 12900 Montevideo, Uruguay.*

*Correo electrónico: andbere@yahoo.com*

Recibido: 2/5/11 Aceptado: 4/9/11

### Resumen

A nivel internacional la implementación de sistemas de control de la concentración de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) en alimentos para humanos, obliga a contar con métodos de determinación que además de precisos, sean prácticos y económicos. En este trabajo se compararon dos métodos para la determinación de la concentración de nitratos en extractos de hojas secas de lechuga, el potenciométrico basado en el uso del electrodo de actividad específica, y el colorimétrico propuesto por Cataldo *et al.* (1975). Los valores obtenidos por colorimetría fueron 30% mayores a los obtenidos por potenciometría, diferencia originada por la interferencia que genera el color de los extractos. Cataldo *et al.* (1975) habían propuesto descontar la absorbancia del color del extracto a cada muestra para eliminar esa interferencia, pero solamente cuando los extractos eran obtenidos a partir de tejido fresco. Cuando utilizamos este procedimiento en extractos de tejido seco, la diferencia en la concentración de nitratos determinada por ambos métodos no fue estadísticamente significativa. El otro procedimiento evaluado para eliminar el color del extracto fue el agregado de carbón activado, que produjo resultados similares a los obtenidos con la cuantificación del blanco. El uso de carbón activado, sin embargo, resultó más simple, ya que no requiere utilizar un blanco para cada muestra.

**Palabras clave:** Cataldo, electrodo actividad específica, carbón activado, determinación potenciométrica y colorimétrica

### Summary

## Color Removal From Dried-lettuce Extracts When Nitrate is Determined

There is an increasing trend in many countries towards the implementation of control measures to ensure low nitrate ( $\text{NO}_3$ ) levels of human food, therefore the methods used to measure nitrate concentration should be precise, practical and inexpensive. In this work two methods were evaluated to determine nitrate concentration in extracts of dry lettuce leaves, the potentiometric based on the electrode of specific activity and the colorimetric of Cataldo *et al.* (1975). Nitrate concentrations measured by colorimetry were 30% higher than those obtained by potentiometry, and this difference was due to the interference caused by the color of the extracts. Cataldo *et al.* (1975) suggested a procedure to avoid this interference which consisted in discounting the absorption of the extract before color development, using hence one blank per sample, but these authors considered that this procedure would only be needed for water extracts obtained from fresh samples. When this procedure was applied to dry-leaves extracts, the difference between the colorimetric and the potentiometric methods was statistically non-significant. The other procedure evaluated was the addition of activated carbon to the extract, which also eliminated this background absorbance. Although both procedures were equally effective in eliminating the background color of the extract, the use of activated carbon is recommended because it does not require the use of one blank per sample.

**Key words:** Cataldo, specific electrode activity, activated carbon

## Introducción

Los altos contenidos de nitrato en las hortalizas de hoja pueden presentar un riesgo para la salud, ya que su consumo en exceso se asocia a metahemoglobinemia infantil, formación de sustancias cancerígenas como nitrosaminas y nitrosamidas, disminución de la reserva de tocoferoles en el hígado y bocio (Böckman *et al.*, 1993; Muro *et al.*, 1998; Urquiaga y Zapata, 2000). A causa de esta problemática, actualmente se analiza en Europa, y también en Uruguay, la introducción de límites de concentración de  $\text{NO}_3$  en hojas de hortalizas, por encima de los cuales su consumo no sería recomendable. En Uruguay se ha incrementado la demanda para determinar la concentración de  $\text{NO}_3$  en hojas de hortalizas en general, y específicamente en lechuga, debido a la creciente demanda de los consumidores por alimentos de calidad. Por esto es necesario contar con una metodología precisa y rápida para determinar la concentración de  $\text{NO}_3$  en hojas de hortalizas.

Los métodos usados comúnmente para determinar la concentración de  $\text{NO}_3$  en hojas son el potenciométrico, para el que se utiliza un electrodo de actividad específica, y el colorimétrico, basado en la nitratación del ácido salicílico propuesto por Cataldo *et al.* (1975), de ahora en adelante método de Cataldo. El método potenciométrico es simple pero los electrodos son costosos, poco sensibles, requieren de una continua reestandarización, y la membrana y el módulo sensor tienen una vida corta, de pocos días a varios meses (Mulvaney, 1996). Además, si la concentración de  $\text{NO}_3$  de la muestra es superior al máximo valor de la escala, se debe recalibrar el equipo, lo que implica repetir la extracción con una relación mayor de agua/materia seca.

La cuantificación de la concentración de  $\text{NO}_3$  por el método de Cataldo es similar en rapidez y confiabilidad a la cuantificación por el método potenciométrico, pero el primero permite cuantificar el  $\text{NO}_3$  en un rango más amplio de concentraciones, sin necesidad de ser recalibrado.

Debido a las limitaciones que presenta el método potenciométrico, nos propusimos usar la técnica sugerida por Cataldo *et al.* (1975), pero observamos un sesgo en la estimación de la concentración de  $\text{NO}_3$ , que atribuimos a la pigmentación amarilla/verdosa del extracto. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue poner a punto un procedimiento que permita utilizar la técnica de Cataldo para determinar la concentración de  $\text{NO}_3$  en muestras de hojas secas de lechuga.

## Materiales y métodos

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

La extracción de  $\text{NO}_3$  se realizó con agua a temperatura ambiente, con una relación agua/muestra de 100:1, que se mantuvo en agitación durante 1 h y se filtró con papel Whatman N° 2. Cuando la concentración de  $\text{NO}_3$  de la muestra fue mayor a 10000  $\text{mg kg}^{-1}$  N- $\text{NO}_3$  de tejido seco, se usó una relación agua/muestra 200:1 para que la concentración estuviera dentro de la escala utilizada para calibrar el electrodo de actividad específica.

La determinación potenciométrica se realizó con un electrodo de actividad específica de  $\text{NO}_3$  (Hach, modelo 48680), que se calibró con soluciones de  $\text{KNO}_3$  de 1, 10, 20, 40, 100  $\text{mg L}^{-1}$  N. Previo a la determinación, se mezclaron 15 mL del extracto de la muestra y 10 mL de una solución de  $\text{AgSO}_4$ ,  $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$ ,  $18\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_2\text{HSO}_3$  y  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a efectos de homogeneizar la fuerza iónica y eliminar interferencias (Gelderman y Beegle, 1998).

Para la determinación colorimétrica se usó el método de Cataldo *et al.* (1975) con modificación de los volúmenes que consistieron en: 0,1 mL de extracto, 0,4 mL de ácido salicílico al 5% (p/v) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y luego de 20 min se agregaron 5 mL de  $\text{NaOH}$  3,8 M. La absorbancia se midió a 410 nm. Se utilizaron los dos blancos propuestos por Cataldo *et al.* (1975): i) el blanco para extractos de muestras secas (denominado blanco A en adelante) que consiste en 0,1 mL de agua destilada y los reactivos de la técnica, y ii) el blanco para extractos de muestras frescas (denominado blanco E en adelante) que consiste en 0,1 mL de extracto de cada muestra,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (sin ácido salicílico) y  $\text{NaOH}$ . El blanco E había sido sugerido por Cataldo *et al.* (1975) como el procedimiento indicado para eliminar el color del extracto en muestras frescas.

El otro procedimiento usado para eliminar el color del extracto consistió en agregar una «cucharadita de té» de carbón activado a 30 mL del extracto, se agitó la mezcla y se filtró con papel Whatman N° 2. La curva de calibración se hizo con soluciones de  $\text{NO}_3$  de concentración conocida, que fueron tratadas igual que las muestras.

Los resultados fueron analizados mediante técnicas de comparación de medias y análisis de regresión, utilizando

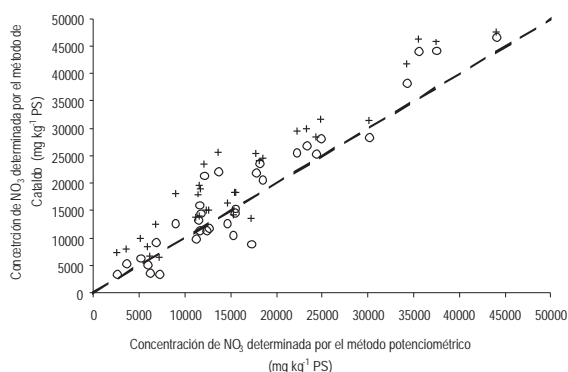
rutinas del Programa Excel (Microsoft Corp., 1997). En todos estos análisis el valor de probabilidad de 1% fue considerado como el límite de significación estadística.

## Resultados y discusión

Los valores promedio de concentración de  $\text{NO}_3$  obtenidos con el método de Cataldo cuando se usó el blanco A (común a todas las muestras), fueron mayores que los obtenidos con el método potenciométrico (24132 versus 16533  $\text{mg NO}_3 \text{ kg}^{-1}$  PS). Esta diferencia fue estadísticamente significativa, de acuerdo a la prueba *t* para medias de dos muestras apareadas (test a dos colas). Parte de esta diferencia es atribuible a la coloración amarillo-verdosa del extracto que no pudo cuantificarse correctamente con el procedimiento de determinación del «color del blanco» propuesto por Cataldo *et al.* (1975).

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

Prácticamente en todo el rango de análisis, las concentraciones de  $\text{NO}_3$  determinadas por el método de Cataldo con el blanco A fueron mayores que las obtenidas por el método potenciométrico (Figura 1). En cambio, cuando se usó el método de Cataldo con blanco E las concentraciones de  $\text{NO}_3$  fueron similares a las determinadas con el método



**Figura 1.** Relación entre la concentración de  $\text{NO}_3$  en hojas secas de lechuga determinada por el método colorimétrico de Cataldo y por el potenciométrico. En la determinación colorimétrica se emplearon dos blancos: Blanco A (cruces) y Blanco E (círculos vacíos). El Blanco A consistió de agua más los reactivos, el Blanco E consistió del extracto de cada muestra y los reactivos excepto el ácido salicílico. La línea es la línea 1:1.

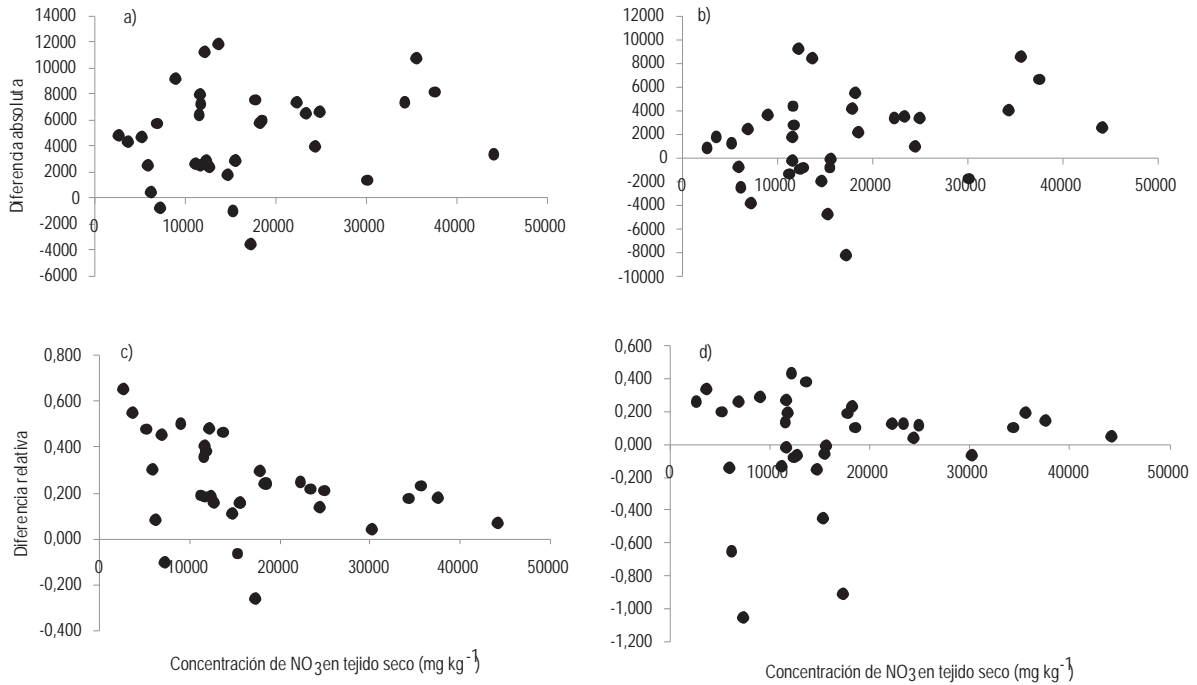
potenciométrico, y las diferencias entre ambos métodos tendieron a distribuirse entorno a la línea 1:1 (Figura 1). En ambos casos, el coeficiente de correlación (*r*) entre el método potenciométrico y el de Cataldo fue alto ( $r = 0,9526$  y  $0,9527$  cuando se usó blanco A y E en el método de Cataldo respectivamente) y estadísticamente significativo.

Además, cuando se usó blanco A, la diferencia entre los valores absolutos de las concentraciones de  $\text{NO}_3$  encontradas por ambos métodos tendieron a ser independientes de la concentración de  $\text{NO}_3$  (Figura 2a), mientras que la diferencia relativa tendió a decrecer exponencialmente con el incremento de la concentración de este anión (Figura 2b). Por otra parte, cuando se usó blanco E, el error absoluto promedio fue cercano a cero (Figura 2c) y la relación entre el error relativo y la concentración de  $\text{NO}_3$  fue relativamente constante (Figura 2d). Estos resultados sugieren la existencia de una fuente de error relativamente constante cuando se usa blanco A, y que adjudicamos al «color del blanco». Nosotros observamos esta coloración no sólo en el extracto de hojas secas de lechuga, sino también en el de muestras de acelga, espinacas, ryegrass y avena (datos no publicados).

Teutsch y Tilson (2004) también usaron una corrección del «color del blanco» en el análisis de tejido seco de *Digitaria sanguinalis*. Sin embargo, en algunos trabajos en los que se ha utilizado el método de Cataldo para determinar la concentración de  $\text{NO}_3$  en muestras secas de distintos vegetales, no se hace referencia a la necesidad de hacer corrección por el «color del blanco» (Inal *et al.*, 1999; Druart *et al.*, 2000; Fontes *et al.*, 2000; Caputo *et al.*, 2001; Unides *et al.*, 2001; Beninni *et al.*, 2002). De todas formas, trabajos como el de Foyer *et al.* (1998), que utilizaron extractos de tejido fresco, realizaron corrección por el «color del blanco».

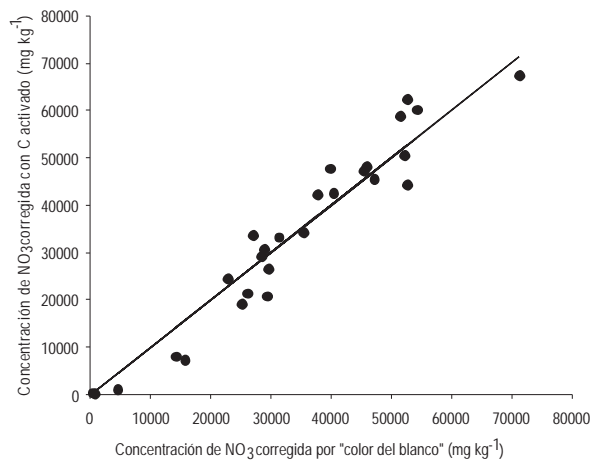
El hecho de que se hayan comparado variaciones del método Cataldo con el potenciométrico, no implica que consideremos que el potenciométrico sea el de referencia. La conclusión que surge de esta comparación es que la diferencia observada entre ambos métodos se debió al color del extracto. Las diferencias remanentes entre los métodos potenciométrico y de Cataldo con blanco E fueron menores y desde el punto de vista práctico no relevantes.

En un análisis posterior, se comparó en otro grupo de muestras de tejido seco de lechuga la relación entre las concentraciones de  $\text{NO}_3$  medidas con el método modificado de Cataldo (utilizando blanco E) y con el agregado de carbón activado (1,4 g cada 30 ml de extracto). Esta cantidad fue la que aseguró, luego de sucesivas pruebas, la



**Figura 2.** Diferencias absolutas y relativas de concentración de  $\text{NO}_3$  en hojas de lechuga obtenidas con los métodos potenciométrico y colorimétrico. El método potenciométrico se comparó con el método colorimétrico de Cataldo con blanco Blanco A (a y b) y con Blanco E (c y d). Las diferencias entre ambos métodos se relacionaron con la concentración de  $\text{NO}_3$  determinada con el método potenciométrico. La diferencia absoluta se obtuvo como la resta entre cada valor obtenido por el método colorimétrico y el potenciométrico, y la relativa como la diferencia absoluta dividida por la concentración obtenida por el método potenciométrico. En todos los casos, la concentración de  $\text{NO}_3$  fue determinada en muestras de tejido seco.

eliminación total del color del extracto, ya que cantidades menores no lograron eliminar el color del extracto luego del filtrado. Los resultados obtenidos por ambos métodos fueron similares a la Línea 1:1 (Figura 3), ya que el intercepto de la regresión lineal no fue estadísticamente distinto de cero y la pendiente de la regresión lineal no fue estadísticamente distinta de uno (Cuadro 1). Da Silva *et al.* (2001) también utilizaron carbón activado para eliminar el color del extracto de muestras secas de lechuga, pero no compararon este procedimiento con otras técnicas capaces de eliminar esta interferencia.



**Figura 3.** Relación entre la concentración de  $\text{NO}_3$  en hojas secas de lechuga determinada por el método colorimétrico de Cataldo. Los valores en el eje  $x$  corresponden a las determinaciones de  $\text{NO}_3$  de cada muestra, que se corrigieron por el respectivo valor de análisis del «color del blanco»; en el eje  $y$  se eliminó el «color del blanco» de cada muestra previamente a cada medición mediante el agregado de C activado. La línea sólida es la línea 1:1.

**Cuadro 1.** Resultados del análisis de regresión entre las concentraciones de  $\text{NO}_3$  determinadas con el método colorimétrico de Cataldo usando dos procedimientos de eliminación del «color del blanco». Los procedimientos consistieron en usar el Blanco E (X) y en agregar carbón activado con posterior filtración del extracto (Y). El Blanco E consistió del extracto de cada muestra y los reactivos excepto el ácido salicílico. En ambos casos la concentración de  $\text{NO}_3$  fue determinada en muestras de tejido seco.

Parámetro	Valor del parámetro	Valor de probabilidad	Valor de probabilidad
		H0: parámetro =0	H0: parámetro =1
a	-617,333	0,211	NC†
b	1,081	1,78E-16	0,163 (0,529‡)
r	0,968	NC	NC

†NC, no corresponde.

‡ el valor entre paréntesis corresponde al valor de probabilidad H0: parámetro =1, para  $y=bx$ .

## Conclusiones

En relación al método potenciométrico, el método de Cataldo *et al.* (1975) sobrestimó significativamente en 30% la concentración de  $\text{NO}_3$  en extractos de hojas secas de lechuga, debido a la interferencia producida por el color del extracto. Cuando se eliminó la interferencia usando un blanco E para cada muestra, la diferencia en la concentración de  $\text{NO}_3$  determinada por ambos métodos no fue estadísticamente significativa.

El uso del carbón activado fue tan eficiente como el blanco E para eliminar la interferencia debida al color del extracto. Sin embargo, se recomienda usar el carbón activado, ya que no requiere utilizar un blanco diferente para cada muestra. La cantidad a agregar de carbón activado puede variar con la reactividad del producto así como también con la intensidad del color del extracto. Se recomienda agregar la cantidad suficiente para que el color del extracto no vuelva a desarrollarse una vez filtrado.

## Agradecimiento

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por financiar el proyecto.

## Bibliografía

- Beninni E, Takahashi H, Neves C, Fonseca I. 2002. Level of nitrate in lettuce cultivated in hydroponic and conventional systems. *Horticultura Brasileira*, 20(2): 183 - 186.
- Böckman O, Kaarstad O, Lie O, Richards I. 1993. Agricultura y Fertilizante : Fertilizantes en perspectiva. 2a ed. Oslo : Ostlands- Posten. 265p.
- Caputo C, Fatta N, Barneix AJ. 2001. The export of amino acid phloem is altered in wheat plants lacking the short arm of chromosome 7B. *Journal of Experimental Botany*, 52(362): 1761 - 1768.
- Cataldo D, Haroon M, Schrader L, Youngs V. 1975. Rapid Colorimetric determination of Nitrate nitrate in plant tissue by nitratation of salicylic acid. *Soil Science and Plant analysis*, 6: 71 - 80.
- Da Silva FJ, Dias Casali VW, Cruz C, Da Silva CA. 2001. Combination capacity in lettuce cultivars based on agronomical characteristics. *Ciência e Agrotecnologia*, 25(4): 831 - 839.
- Druart N, Goupil P, Dewaele E, Boutin JP, Rambour S. 2000. Nitrate assimilation in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) which acquire radial growth. *Journal of Experimental Botany*, 51(344): 539 - 546.
- Fontes P, Sampaio R, Finger F. 2000. Fruit size, mineral composition and quality of trickle-irrigated tomatoes as affected by potassium rates. *Pesquisa Agropecuária*, 35(1): 21 - 25.
- Foyer C, Valadier MH, Migge A, Becker T. 1998. Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. *Plant Physiologists*, 117(1): 283 - 292.
- Gelderman RH, Beegle D. 1998. Nitrate - Nitrogen [En línea]. En: Recommended chemical soil testing procedures for North Central Region. Missouri : Missouri Agricultural Experiment Station. (North Central Regional Research Publication; 221). pp. 17 - 20. Consultado 31 octubre 2011. Disponible en: <http://extension.missouri.edu/explorepdf/special/sb1001.pdf>
- Geraldson CM, Tyler KB. 1990. Plant Analysis as an Aid in Fertilizing Vegetable Crops. En: Kissel DE, Westerman RL. [Eds.]. *Soil Testing and Plant Analysis*. Madison : SSSA. pp. 546 - 562.
- Inal A, Günes A, Alpaslan M, Demir K. 1999. Nitrate versus chloride nutrition effects in a soil-plant system on the growth, nitrate accumulation and N, K, Na, Ca and Cl content of carrot *Daucus carota* L. *Turkish Journal of Biology*, 23: 207 - 214.
- Mulvaney RL. 1996. Nitrogen-inorganic forms. En: Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnston CT, Sumner ME. [Eds.].

- Methods of soil analysis : Part 3 Chemical methods. Madison : Soil Science Society of America. (Book Serie ; 5). pp. 1123 - 1184.
- Muro J, Irigoyen I, Lamsfus C.** 1998. Acumulación de nitratos en hortalizas de hoja. En: Vega JM, Aparicio PJ, Castillo F, Maldonado JM. [Eds.]. Avances en el Metabolismo del Nitrógeno : de la Fisiología a la Biología Molecular : IV Reunión Nacional, Marbella, 1997. Sevilla : Universidad de Sevilla. pp. 453 - 464.
- Teutsch CD, Tilson WM.** 2004. Nitrate accumulation in crabgrass as impacted by nitrogen fertilization rate and application timing [En línea]. Consultado 6 octubre 2004. Disponible en: <http://www.planmanagementnetwork.org/pub/fg/research/2004/crabgrass/>.
- Unides S, Zhou D, Siddigi Y, Kinghorn J, Glass A.** 2001. Apparent genetic redundancy facilitates acological plasticity for nitrate transport. *The EMBO Journal*, 20(22): 6246 - 6255.
- Urquiaga S, Zapata F.** 2000. Manejo eficiente de la fertilización nitrogenada de cultivos anuales en América Latina y el Caribe. Porto Alegre : Gênese. 110p.