

Determinación de nitratos adicionados en papaya, piña y jitomate utilizando el método del fenol

Vázquez Morales Ana Laura, Ramírez Castillo María Leticia, Valdez Castro Lucila, Martínez Ortiz Verónica Miroslava

Universidad Politécnica de Puebla, Laboratorio de Investigación y Posgrado, 3er Carril del Ejido Serrano S/N, San Mateo Cuanalá, Juan C. Bonilla, CP 72640, Puebla, México.
E-mail: analauravm@gmail.com

Resumen

El exceso de nitratos en los alimentos tiene un efecto tóxico por sus productos de reacción, en este trabajo se utilizó una técnica espectrofotométrica con fenol para la determinación de nitratos en vegetales. En el proceso se evaluaron la linealidad, la exactitud y la reproducibilidad del método. El análisis fue satisfactorio para jitomate y papaya ya que presentan un nivel de recuperación cercano al 100 %, mientras que para la piña la técnica muestra baja reproducibilidad.

Palabras clave: nitratos, frutas, espectrofotometría

1. Introducción

El nitrato (NO_3^-) es un compuesto iónico que se encuentra en la naturaleza formando parte del ciclo del nitrógeno. Está presente en aire, suelo, agua así como en alimentos y es producido naturalmente en el cuerpo humano [1-2]. Su versatilidad química ha asegurado su utilización en una multitud de actividades industriales, en procesos que van desde la fabricación de cristales y explosivos hasta su utilización como conservador y antimicrobiano en alimentos (E-251 nitrato sódico, E-252 nitrato potásico) [3]. Los nitratos son esenciales para el crecimiento de las plantas y se utilizan como fertilizantes, pues permiten la mejora de los productos agrícolas. Sin embargo, su uso excesivo tiene como consecuencia una acumulación en las plantas [4]. Este compuesto en sí mismo no es tóxico, pero sus metabolitos y productos de reacción, como el nitrito, el óxido nítrico y los compuestos N-nitrosos, están implicados en efectos adversos para la salud humana [5]. El ión nitrato (NO_3^-) al ser ingerido se reduce fácilmente a nitrito (NO_2^-) por acción de las bacterias presentes en la saliva y tracto gastrointestinal. El nitrito reacciona con las aminos

dando lugar a compuestos nitrosos como las nitrosaminas, las cuales ejercen un efecto carcinogénico directo sobre la mucosa gástrica [6]. Es también responsable del síndrome del bebé azul (metahemoglobinemia) [7-8], enfermedad que causa la obstrucción del transporte del oxígeno desde los alvéolos a los tejidos y que puede conducir a la muerte [2-9]. Debido a lo anterior, el comité de la FAO/OMS recomienda una Ingesta Diaria Aceptable (IDA) entre 0-3.68 mg/kg peso corporal; es decir que la ingesta diaria de nitratos de una persona con peso corporal de 70 kg no debería exceder los 259 mg [10].

Diversas metodologías se han utilizado para su determinación; dentro de estas técnicas se encuentran la titulación, la colorimetría [11-12], la destilación por arrastre de vapor [13], la espectrofotometría (UV/Vis) [14], el uso de electrodos selectivos [15], la cromatografía de gases [3] y el HPLC [16]. Los métodos espectrofotométricos son los más utilizados y aceptados debido a su simplicidad, bajo costo y alta precisión. La determinación de nitratos puede hacerse de manera directa o indirecta, en esta última el nitrato se reduce a nitrito utilizando una columna de cadmio [17] o por medio de una mezcla reductora que contiene Zn [18]. En la determinación directa se puede utilizar el ácido salicílico [11], el ácido fenoldisulfónico [16,19] o también el 2-sec-butil fenol propuesto por Tanaka *et al.* [20]. En este último método el 2-sec-butil fenol reacciona cuantitativamente con el nitrato en una solución ácida; un proceso análogo fue propuesto por Gaya *et al.* [21] quienes desarrollaron un método para la determinación de nitratos en productos vegetales mediante el uso de fenol como el reactivo activo. El principio se basa en la nitración del fenol y la formación de la sal de sodio correspondiente. Las reacciones implicadas en el proceso se muestran en la Figura 1.

Al final, 1 mol de nitrofenóxido de sodio se produce a partir de un mol de nitrógeno en forma de

nitrato. El nitrofenóxido de sodio absorbe la luz ultravioleta a 407 nm, la cual proporciona la base para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato (N-NO₃).

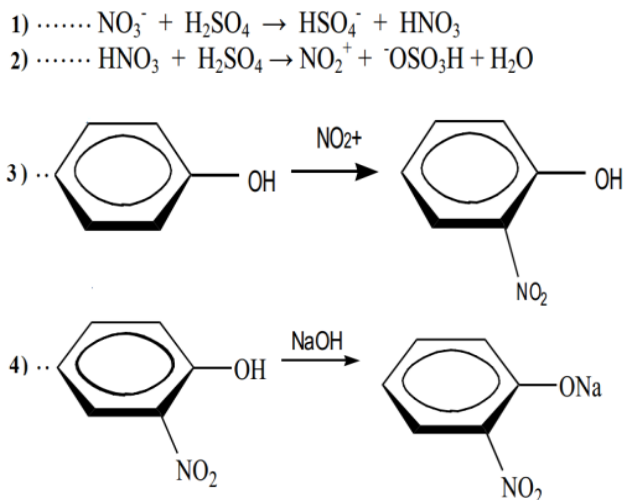


Figura 1 Reacción de nitración del fenol y la formación de la sal de sodio correspondiente de acuerdo al método de determinación de nitratos usando fenol [21].

El objetivo de este trabajo es determinar nitratos en papaya, piña y jitomate utilizando el método del fenol propuesto por Gaya *et al.* [21].

2. Materiales y Métodos

2.1 Materia prima

La materia prima utilizada fue jitomate y papaya adquiridos en el mercado local de Cholula en Puebla. También se analizó piña de la variedad cayena lisa y esmeralda del municipio de Villa Azueta en Veracruz.

2.2 Determinación de nitratos

Para la determinación de nitratos se usó el método del fenol propuesto por Gaya *et al.* [21]. En un matraz de precipitados de 250 cm³ se colocaron 10 g de la muestra, 70 cm³ de agua destilada y 2.5 cm³ de NaOH al 4%, se calentó a 80 °C por 25 min con agitación ocasional. Se tomó una alícuota de 4 cm³ del extracto y se colocó en tubos de vidrio enfriados con hielo, adicionándose 1 cm³ de una solución de Ag₂SO₄ al 5%, seguida por 7 cm³ de H₂SO₄ al 98 % y 0.1 cm³ de una solución de fenol al 5 %. La solución se dejó en reposo durante 20 min con agitación ocasional. Se llevaron a cabo dos extracciones:

- ♦ Extracción I: en un embudo de separación se adicionaron 5 cm³ de tolueno agitándose de 5 a 10 min. La capa acuosa se descartó. La fase orgánica se lavó dos veces con 10 cm³ de agua destilada y se agitó durante 2 min descartando la fase acuosa en cada lavado.

- ♦ Extracción II: se llevó a cabo con 10 cm³ de Na₂CO₃ al 10 %, agitando durante 1 min.

Finalmente se realiza la lectura de absorbancia a 407 nm. La cantidad de nitrato (µg/g) en el vegetal se calculó por medio de la ecuación 1:

$$\text{Nitrato} = \frac{C * 100}{Ws * 4} \quad \text{Ec. (1)}$$

Dónde:

C = concentración de nitratos (µg/cm³)

Ws = es el peso de la muestra utilizado (g)

La curva de calibración se realizó con soluciones estándar de nitrógeno en forma de nitrato (N-NO₃), la cual se lleva a cabo al mismo tiempo que las muestras.

2.3 Intervalo de trabajo

Se desarrolló la curva de Ringbom a partir de los datos obtenidos en la curva de calibración, graficando el porcentaje de la absorbancia (% As) contra los logaritmos de las concentraciones (Log C). El objetivo es seleccionar la zona de mínimo error del método y con ello determinar el intervalo de trabajo de que garantice una mayor confianza de los resultados que se generan.

2.4 Exactitud del método

Se realizó una prueba de recuperación de nitratos para asegurar la validez del método. En la etapa de filtración se adicionaron 5 cm³ de 50 µg/cm³ de una solución estándar de nitratos y se aforó hasta 100 cm³ con agua destilada. El porcentaje de recuperación de los nitratos añadidos se calculó por medio de la ecuación 2, como cien veces la diferencia entre las series dividida entre la cantidad del analito añadida:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{Cr}{Ca} * 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

Dónde:

Cr: es la cantidad recuperada del analito.

Ca: es la cantidad añadida.

3. Resultados y discusión

3.1 Determinación de la curva estándar

Para la construcción de la curva de calibración se prepararon soluciones de nitratos de diferentes concentraciones, se trataron igual que las muestras y se leyeron por duplicado. Con el promedio de los datos obtenidos se procedió a realizar la curva de calibración mediante un análisis de regresión por el

método de mínimos cuadrados y se determinaron las características de desempeño del método. La curva ajustada se presenta en la Figura 2 para la determinación de nitrógeno en forma de nitrato (N-NO₃) por espectrofotometría.

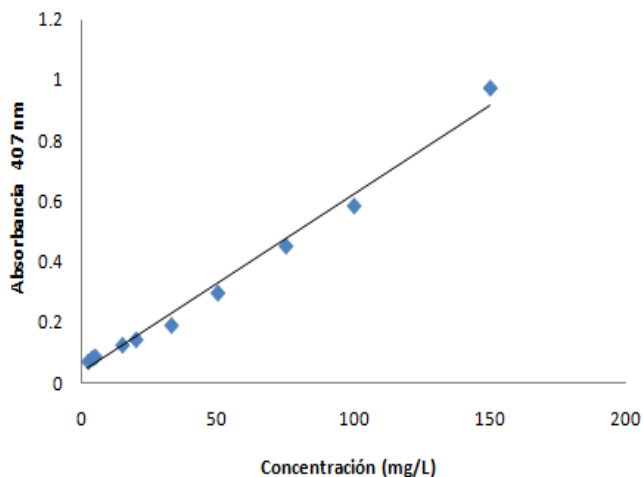


Figura 2 Curva de calibración para determinar nitrógeno en forma de nitrato.

Se realizó la curva de Ringbom para determinar el intervalo óptimo de concentraciones, la cual se muestra en la Figura 3. La parte lineal de la figura permite obtener el intervalo que presenta mayor relación lineal entre la absorbancia y la concentración. De acuerdo con Bermejo [22], la inspección se hace de manera visual; se observa que hay una desviación de la línea recta en las zonas de alta y baja concentración manteniéndose prácticamente recta en la zona central, lo que significa que el intervalo de trabajo más confiable del método se encuentra entre 25 y 100 mg/L. En este intervalo se comete el mínimo error.

3.2 Análisis estadístico

Para comprobar si el modelo lineal se ajusta o no al método se determinaron: la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación (R) y el coeficiente de determinación (R²) de la línea de regresión. Asimismo, se realizó el análisis de varianza de la regresión lineal y se determinaron el test de proporcionalidad (t de student para el intercepto) y el test de linealidad (Coeficiente de variación, C.V., de los factores de respuesta F y t de student para la pendiente).

Los cálculos se hicieron en Microsoft Excel 2007, obteniéndose un modelo para describir la relación entre absorbancia y la concentración. La ecuación del modelo ajustado se muestra en la ecuación 3:

$$Abs = 0.032519 + 0.00594311Concentración \quad Ec. (3)$$

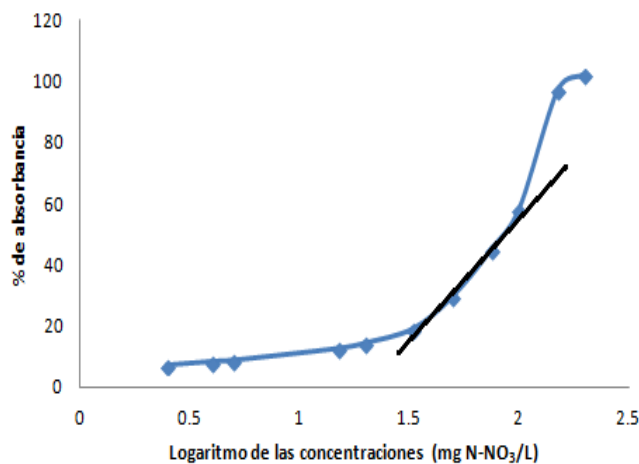


Figura 3 Curva de Ringbom.

Los resultados estadísticos de la regresión se muestran en la Tabla 1. Como se observa el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta (absorbancia) a partir de la variable concentración, ya que, tanto R como R² son cercanas a uno, lo que indica una alta correspondencia entre los valores obtenidos con la recta de ajuste y con los obtenidos experimentalmente.

Tabla 1 Estadísticas de la regresión

Parámetro	Valor
Coefficiente de correlación R	0.9940
Coefficiente de determinación R ²	0.9880
R ² ajustado	0.9865
Error típico	0.0339

Por otra parte se realizó el análisis de varianza el cual permitió determinar que el valor de $F_{calculado}=657.84 > F_{crítico}=5.0725 \times 10^{-09}$, indicando que el modelo se ajusta para la relación entre la absorbancia a partir de la concentración, con un nivel de significancia del 5 %.

Se comprobó la significación del intercepto con respecto al cero a través de la prueba de t student. El intercepto de la recta fue cercano a cero. Al aplicar la prueba se obtuvo un valor de $t_{experimental} = 1.83$ que es menor que el valor de $t_{tabulado} = 2.92$ para una probabilidad del 95 % con nueve grados de libertad. Lo anterior permite establecer que no existe diferencia significativa.

En lo que respecta al coeficiente de variación total de los factores respuesta (4.525 %), fue menor al 5 % lo que indica que la pendiente es distinta de cero ratificando la linealidad.

3.3 Análisis de las muestras

Dado que el análisis inicial de las muestras no mostró presencia significativa de nitratos, para evaluar

la pertinencia del método se realizó un ensayo de recuperación adicionando 50 µg/cm³ de nitratos sobre muestras de jitomate, papaya y dos variedades de piña (cayena lisa y miel) obteniéndose los datos que se representan en la Tabla 2. Se observa que tanto para el jitomate como para la papaya los porcentajes de recuperación son cercanos al 100 %, para estos productos el método muestra la exactitud necesaria y por lo tanto una reproducibilidad de los datos.

Tabla 2 Resultados de exactitud del método

Muestra	Jitomate	Papaya	Piña (Miel)	Piña (cayena lisa)
Nitrato añadido (mg/L)	50	50	50	50
Nitrato recuperado (mg/L)	50 ± 4.24	45 ± 7.07	63.5 ± 26.16	61.5 ± 19.09
Recuperación (%)	100 ± 8.48	90 ± 14.14	127 ± 52.32	123 ± 38.18
Coefficiente de variación (%)	8.49	15.71	41.2	31.04

El coeficiente de variación en las muestras de piña es muy alto al igual que su desviación estándar. Sin embargo aunque con esta metodología no se puede determinar cuantitativamente nitrato en muestras de piña, la reacción si presenta cambios cualitativos, es decir que manifiesta variación en su coloración dependiendo de la variedad de la piña (cayena lisa o miel). A este respecto, la cantidad de azúcares presentes en la piña puede interferir en la técnica; cabe recordar que en el conocido método para la determinación cuantitativa de azúcares y sustancias relacionadas establecido por Dubois *et. al.* [23], se utiliza fenol en presencia de ácido sulfúrico desarrollándose un color amarillo-naranja. Es necesario realizar más pruebas para determinar las interferencias por azúcares o sustancias relacionadas.

4. Conclusiones

La metodología estudiada para la determinación de nitratos en frutas utilizando fenol es lineal en el intervalo de concentración 25 a 100 mg/L basado en el valor obtenido para el coeficiente de correlación lineal.

Adicionalmente, se comprobó la linealidad mediante la determinación del coeficiente de variación de los factores de respuesta, se corroboró que el valor de la pendiente es significativamente distinto de cero y

que el intercepto no está estadísticamente alejado de cero.

Para el estudio de la exactitud mediante la prueba de adición/recuperación la metodología para determinar nitratos puede ser viable en jitomate y papaya ya que el porcentaje de recuperación es cercano al 100 %. Para las muestras de piña esta técnica no es viable, por lo que se deben analizar otros factores (contenido de azúcar, pH, naturaleza y tamaño de la muestra) para validar y generalizar el método.

5. Agradecimientos

Al CONACYT por la beca de maestría de la Ing. Vázquez Morales.

6. Bibliografía

- [1] Walker R. (1990). Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological. *Food Additives and Contaminants*, 7: 717-768.
- [2] Wolff I.A., Wasserman A.E. (1972). Nitrate, nitrites, and nitrosamines. *Science*; 177(4043): 15-19.
- [3] Michalski R., Kurzyca I. (2006). Determination of Nitrogen Species (Nitrate, Nitrite and Ammonia Ions) in Environmental Samples by Ion Chromatography. *Polish Journal of Environmental Studies*; 15(1): 5-18.
- [4] Himmi T., Zaki A., Hasib A., Elgharras H., Bachirat R., Aït Chaoui A. (2004). Daily nitrates and nitrites intake by inhabitants in beni-mellal region (Morocco). *Ciencia y Tecnología Alimentaria, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos, México*; 4(3): 163-168.
- [5] Santamaria P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 86(1): 10-17.
- [6] Cuello C., Correa P. (1978). Estudio de la etiología del cáncer gástrico II: Epidemiología analítica de lesiones precancerosas: estudios ambientales. Hipótesis etiológica, *Acta Médica Valle*; 9: 10-14.
- [7] Fan A.M., Steinberg V.E. (1996). Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 23: 35-43.

- [8] Correa P., Cuello C. (1978). Estudio de la etiología del cáncer gástrico. I: Epidemiología de cáncer y lesiones precancerosas. *Acta Médica Valle*; 9: 1-9.
- [9] Swann P.F. (1975). The toxicology of nitrate, nitrite and N-nitrous compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 26: 1761-1770.
- [10] Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, Maff. (1996) Nitrate in vegetables. Food surveillance information sheet 91: 7.
- [11] Cataldo D.A., Harrison M., Schraeder L.E., Youngs V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*; 6: 71-80.
- [12] Bremner J.M., Keeney D.R. (1965). Exchangeable ammonium, nitrate and nitrite by steam-distillation methods (En: *Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties*. Madison: American Society of Agronomy; Soil Science Society of America. Black C.A. ed.); pp. 1191-1206.
- [13] Follett M.J., Ratcliff P.W. (1963). Determination of nitrite and nitrate in meat products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 14(3): 138-144.
- [14] Urlich A. (1948). Plant analysis methods and interpretation of results (En: *Diagnostic Techniques for Soils and Crops*. The American Potash Institute, Washington, D.C. Kitchen H.B. ed.); pp. 157-198.
- [15] Johnson C.M., Urlich A. (1950). Determination of nitrate in plant material. *Analytical Chemistry*; 22(12): 1526-1529.
- [16] Speijers G.J.A., van den Brandt P.A. (15 de abril de 2013). Nitrate (and potential endogenous formation of N-nitroso compounds). Obtenido de Who Food Additives Series 50: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmon/o/v50je06.htm>
- [17] Sen N.P., Donaldson B. (1978). Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*; 61(6): 1389-1394.
- [18] Carlson M.P., Schneider N.R. (1986). Determination of nitrate in forages by using selective ion electrode: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*; 69(2): 196-198.
- [19] Cawse P.A. (1967). The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectroscopy. *Analyst*; 92: 311-315.
- [20] Tanaka A., Nose N., Iwasaki H. (1982). Spectrophotometric determination of nitrate in vegetable products using 2-sec-butylphenol. *Analyst*; 107: 190-194.
- [21] Gaya U.I., Alimi S. (2006). Spectrophotometric Determination of Nitrate in Vegetables Using Phenol. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*; 10 (1): 79-82.
- [22] Bermejo P. (1998). Los cálculos numéricos en la química analítica. 6ª edición. Tórculo; pp. 418-423.
- [23] Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*; 28(3): 350-356.