

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 782**

21 Número de solicitud: 201300841

51 Int. Cl.:

G01N 21/17 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.04.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/000144

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
C/ Ancha, 16
11001 Cádiz ES**

72 Inventor/es:

**CORZO RODRIGUEZ, Alfonso;
GARCIA ROBLEDO, Emilo Guillermo y
PAPASPYROU, Sokratis**

54 Título: **Procedimiento para la determinación secuencial de nitrito y nitrato.**

57 Resumen:

Procedimiento para la determinación secuencial de nitrito y nitrato.

Comprende una detección inicial de NO_2^- con reactivo de Griess, seguida por la reducción del NO_3^- a NO_2^- con VCl_3 y detección posterior del NO_2^- producido con el exceso de reactivo de Griess presente.

Su límite de detección es $< 0.05 \mu\text{M}$ y proporciona alta precisión en la determinación de NO_2^- y NO_3^- para muestras donde la concentración sumada de ambos compuestos sea inferior a $30 \mu\text{M}$.

Permite el análisis rápido de series grandes de muestras usando volúmenes pequeños, al reducir a la mitad la cantidad de muestra y de reactivo de Griess utilizados.

Adicionalmente permite diseñar un sistema de análisis mediante inyección de flujo para medir nitrito y nitrato en la misma muestra y el mismo canal, utilizando así la mitad de la cantidad de muestra y reactivo de Griess que emplean los métodos tradicionalmente empleados.

ES 2 533 782 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN SECUENCIAL DE NITRITO Y NITRATO.

SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 Química analítica, análisis de nutrientes/compuestos de nitrógeno.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El nitrato es un compuesto clave del ciclo del nitrógeno de los ecosistemas naturales (océanos, estuarios, lagos, etc) y en ambientes artificiales (plantas de
10 tratamiento de aguas residuales, embalses, redes de suministros de agua potable, etc),
siendo sustrato y producto de varios procesos metabólicos microbianos, vegetales y
animales. En sistemas acuáticos, el nitrato se produce por la nitrificación en una reacción
de dos pasos: oxidación de amonio a nitrito y oxidación de nitrito a nitrato. El nitrato
puede ser asimilado por organismos fotosintéticos, siendo de este modo un nutriente
15 importante en los estudios de producción primaria. El nitrato también es consumido en
una variedad de procesos bacterianos tales como desnitrificación o reducción
disimilatoria de nitrato a amonio (DNRA). La desnitrificación reduce nitrato a óxido
nitroso, un potente gas invernadero (Lashof & Ahuja 1990) o nitrógeno molecular, otro
gas, reduciendo la carga de nitrógeno del sistema, mientras que DNRA reduce nitrato a
20 amonio, biológicamente disponible que permanece en el sistema (Megonigal et al. 2003).
Por lo tanto, la medida de concentración de nitrito y nitrato en sistemas acuáticos es un
aspecto importante de la mayoría de los estudios relacionados con el ciclo del nitrógeno
para determinar sus niveles de producción y consumo.

Los nitratos también se usan en actividades humanas, sobre todo como
25 fertilizantes y conservantes alimentarios. Cuando se usan como fertilizantes, la
concentración de nitrato en ciertos tipos de cultivos vegetales puede aumentar. Además,
el exceso de nitrato es lavado y entra en los sistemas de aguas subterráneas, lagos, o
pantanos, contaminando de esta forma los suministros de agua potable. Además, el
nitrato en combinación con nitrito se usa con frecuencia como conservante alimentario,
30 en particular en embutidos, y carnes en general. Sabemos que la exposición al nitrato por
encima de determinados niveles tiene efectos adversos para los humanos (p.e. aumenta

el riesgo de cáncer para adultos, el síndrome del bebé azul, y metahemoglobinemia infantil) (Greer et al. 2005, Bryan et al. 2012, Bryan et al. 2013, Chan et al. 2013, Martínez et al. 2013), por ello medir su nivel de forma precisa y rápida es esencial.

5 En la literatura científica hay disponibles numerosos métodos para la determinación del nitrato. Métodos altamente sensitivos se basan en la reducción de nitrato a óxido nítrico, el cuál es determinado por luminiscencia química (Aoki y col. 1997, Braman y Hendrix 1989), o a óxido nitroso pudiendo ser cuantificado por cromatografía de gases (Christensen y Tiedje 1988). Sin embargo, ambas técnicas requieren un equipamiento especializado y caro. Otros métodos implican el uso de
10 ácidos fuertes con frecuencia a temperaturas elevadas (Mir 2008, Zhang y Fischer 2006), lo cual complica el manejo y análisis de las muestras. Por el contrario, el método más simple y comunmente aplicado implica la reducción de nitrato a nitrito y su consecuente medida por colorimetría usando la reacción de Griess (Grasshoff y col. 1983, Marzinzig y col. 1997). El método de basado en la reacción de Griess tiene la ventaja de permitir un
15 límite de detección bajo, alta precisión y una alta especificidad, sin usar instrumentos caros o procedimientos complejos.

El paso crítico de este método para la determinación precisa del nitrato es su reducción eficiente a nitrito. La reducción de nitrato a nitrito se puede conseguir con nitrato reductasas específicas (Guevara y col. 1998, Marzinzig y col. 1997) o por el uso
20 de diferentes metales reductores, siendo el cadmio el más utilizado habitualmente (Grasshoff y col. 1983, Wood y col. 1967). Aunque se han propuesto varias adaptaciones del método de reducción por cadmio para incrementar el número de muestras analizadas por unidad de tiempo, y a la vez reducir el volumen de muestra necesario (Harris y Mortimer 2002, Jones 1984), dicho método tiene varios defectos: es relativamente lento, la eficiencia de la columna de reducción de Cd varía, requiere una continua activación de
25 la columna Cd, y el cadmio es altamente tóxico, haciendo peligroso el manejo de muestras y residuos.

Miranda y col. (2001) describieron un método espectrofotométrico usando una solución de vanadio (VCl_3) para la reducción de nitrato. El V(III), menos tóxico que el
30 cadmio, ha sido comúnmente usado para la reducción tanto de nitrato como de nitrito a altas temperaturas (80-90°C) para luego medirlo por lumniscencia química (Braman y Hendrix 1989). Miranda y col. (2001) mostraron que a temperatura ambiente el nitrato se reduce a nitrito, el cuál puede reaccionar con los reactivos de Griess y ser medido

espectrofotométricamente. Sin embargo el protocolo propuesto resulta en una baja absorptividad molar para el nitrato, indicando una baja eficiencia en la reacción de la reducción de NO_3^- a NO_2^- . Como resultado el nitrito interfiere bastante en la determinación de nitrato. Beda y Nedospasov (2005) incluyeron un paso inicial en el método, eliminando el nitrito en una reacción con ácido sulfámico, reduciendo de esta forma la alta interferencia de NO_2^- en la determinación del NO_3^- . Sin embargo como los siguientes pasos relacionados con la reducción de NO_3^- a NO_2^- no se modificaron, la eficiencia media de la reacción no mejoró. Como resultado, la precisión del método era más baja que usando la clásica columna Cd para la reducción de nitrato.

10

Bibliografía

- Lashof, D.A. and Ahuja, D.R. (1990) Relative contributions of greenhouse gas emissions to global warming. *Nature* 344(6266), 529-531.
- Megonigal, J.P., Hines, M.E. and Visscher, P.T. (2003) *Biogeochemistry*, pp. 317-424, Elsevier Pergamon.
- Greer, F. R. , Shannon, M., The Committee on Nutrition, and the Committee on Environmental Health (2005) Infant Methemoglobinemia: The Role of Dietary Nitrate in Food and Water. *Pediatrics* 116 (3), 784 -786
- Bryan, N. S., Alexander, D. D., Coughlin, J.R., Milkowski, A.L., Boffetta, P. (2012) Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. *Food and Chemical Toxicology* 50 (10) 3646–3665
- Bryan N.S., van Grinsven H. (2013) The Role of Nitrate in Human Health. *Advances in Agronomy*, Volume 119, 153-181
- Chan, D.S.M., Aune, D., Norat T. (2013) Red Meat Intake and Colorectal Cancer Risk: A Summary of Epidemiological Studies. *Current Nutrition Reports* 2(1) 56-62
- Martinez, A.; Sanchez-Valverde, F.; Gil, F.; Clerigué, N.; Aznal, E.; Etayo, V.; Vitoria, I.; Oscoz, M. (2013) Methemoglobinemia induced by vegetable intake in infants in Northern Spain. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*: 56: 573–577
- Braman, R.S. and Hendrix, S.A. (1989) Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium(III) reduction with chemiluminescence detection. *Analytical Chemistry* 61(24), 2715-2718.

30

- Aoki, T., Fukuda, S., Hosoi, Y. and Mukai, H. (1997) Rapid flow injection analysis method for successive determination of ammonia, nitrite, and nitrate in water by gas-phase chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta* 349(1–3), 11-16.
- Christensen, S. and Tiedje, J.M. (1988) Sub-Parts-Per-Billion Nitrate Method: Use of an N₂O-Producing Denitrifier to Convert NO₃⁻ or ¹⁵NO₃⁻ to N₂O. *Applied and environmental microbiology* 54(6), 1409-1413.
- 5 Mir, S.A. (2008) A rapid technique for determination of nitrate and nitric acid by acid reduction and diazotization at elevated temperature. *Analytica Chimica Acta* 620(1-2), 183-189.
- 10 Zhang, J.-Z. and Fischer, C.J. (2006) A simplified resorcinol method for direct spectrophotometric determination of nitrate in seawater. *marine Chemistry* 99(1-4), 220-226.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M. and Kremling, K. (1983) *Methods of sea water analysis*, Verlag Chemie, New York.
- 15 Marzinzig, M., Nussler, A.K., Stadler, J., Marzinzig, E., Barthlen, W., Nussler, N.C., Beger, H.G., Morris Jr, S.M. and Brückner, U.B. (1997) Improved Methods to Measure End Products of Nitric Oxide in Biological Fluids: Nitrite, Nitrate, and S-Nitrosothiols. *Nitric Oxide* 1(2), 177-189.
- Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., 20 Gołąbek, I., Bartuś, S., Malczewska-Malec, M. and Szczudlik, A. (1998) Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta* 274(2), 177-188.
- Wood, E.D., Armstrong, F.A.J. and Richards, F.A. (1967) Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 47(01), 23-31.
- 25 Jones, M.N. (1984) Nitrate reduction by shaking with cadmium. Alternative to cadmium columns. *Water Research* 18(5), 643-646.
- Harris, S.J. and Mortimer, R.J.G. (2002) Determination of nitrate in small water samples (100?l) by the cadmium-copper reduction method: a manual technique with application to the interstitial waters of marine sediments. *Intern. Journal of environmental and analytical Chemistry* 82(6), 369-376.
- 30

Miranda, K.M., Espey, M.G. and Wink, D.A. (2001) A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. Nitric Oxide 5(1), 62-71.

5 Beda, N. and Nedospasov, A. (2005) A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. Nitric Oxide 13(2), 93-97.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

El uso de vanadio (III) se ha propuesto recientemente como una alternativa posible al cadmio para la reducción de NO_3^- a NO_2^- y su consecuente medida, usando la
10 típica reacción de Griess, con un simple análisis espectrofotométrico. Sin embargo, los métodos propuestos hasta la fecha no son satisfactorios por sufren de una disminución de la sensibilidad, requieren un aumento de temperaturas o de tiempo de reacción, y pasos adicionales para la medida de nitrito y nitrato. Nosotros hemos desarrollado un protocolo mejorado rápido y secuencial que permite la determinación de bajas concentraciones de
15 nitrito y nitrato en muestras acuáticas usando pequeños volúmenes. La concentración de NO_2^- se determina en primer lugar usando la reacción de Griess. Posteriormente se la añade una solución de VCl_3 en HCl a la misma muestra y la reacción a 60°C durante 25 minutos resulta en una reducción eficiente de NO_3^- a NO_2^- ($> 95\%$), el cual es detectado por los reactivos de Griess previamente añadidos. De esta forma se reducen el volumen y
20 costo tanto de los reactivos como de la muestra. El método tiene un límite de detección muy bajo y a la vez una alta eficacia para la determinación de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ a concentraciones menores de $30 \mu\text{M}$. La comparación entre el método propuesto con el método establecido de columna Cd usando muestras de una variedad de medios ambientales (embalses, agua intersticial del sedimento extraída tras congelación, agua de
25 estuario y un embalse ácido afectado por drenaje ácido de minas) muestran una buena concordancia entre los dos métodos. Los análisis se pueden realizar en tandas grandes (~ 60 muestras) usando muestras con pequeños volúmenes ($\leq 1 \text{ mL}$) para la determinación tanto de NO_3^- y NO_2^- en menos de una hora.

30

DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

- Figura 1.** (A) Efecto de la variación de temperatura y concentración del reactivo de VCl_3 en 10N HCl en la reducción y medida de la máxima absorbancia para una solución de 15 μM NO_3^- (2.5 mL standard + 250 μL reactivo Griess + 250 reactivo de VCl_3); (B) Efecto de la variación de temperatura y de concentración de HCl (usando 2% VCl_3) en la reducción y medida de la máxima absorbancia para una solución de 15 μM NO_3^- (2.5 mL standard + 125 μL reactivo Griess + 250 μL reactivo de VCl_3); (C) y (D) representan el tiempo de reacción que se requiere para alcanzar la máxima absorbancia para (A) y (B) respectivamente.
- 5
- Figura 2.** (A) Evolución temporal de la absorbancia molar de NO_3^- a diferentes temperaturas siguiendo la reacción (1 mL standard + 50 μL reactivo Griess + 100 μL 2% VCl_3 en 6N HCl) de curvas de calibración para el NO_3^- (rango 0-15 μM). Los niveles se medían cada 5-10 minutos. (B) Efectos de las variaciones de volumen del reactivo Griess (1 mL standard + 2, 10, 20, 50, 100 o 200 μL reactivo Griess + 90 μL del reactivo de VCl_3) y reactivo de VCl_3 (1 mL standard + 50 μL reactivo de Griess + 10, 20, 50, 100, 150 or 200 μL reactivo de VCl_3) en la absorbancia molar de NO_3^- calculada a partir de las curvas de calibración (rango 0-15 μM). Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño de agua a una temperatura controlada de 60°C durante 25 minutos. Todos los análisis se realizaron por triplicado.
- 10
- 15
- Figura 3.** (A) Amplitud del rango lineal. (B) Curva de calibración de concentraciones bajas de nitrato con el cálculo del límite de detección (LOD). (C) Descenso de la absorbancia molar a lo largo del tiempo a temperatura ambiente (25°C) expresado como porcentaje de la inicial. Las reacciones se llevaron a cabo durante 25 minutos a una temperatura de 60°C usando 1mL de los estándares de NO_3^- (n = 3 - 6) + 50 μL reactivo de Griess- + 100 μL reactivo VCl_3 y la absorbancia medida usando cubetas de 1 cm.
- 20
- 25
- Figura 4.** Efecto de la salinidad en la absorbancia molar de NO_2^- en la reacción de Griess normal, y de NO_3^- y NO_2^- después de la reacción con VCl_3 (1 mL + 50 μL reactivo de Griess + 100 μL reactivo de VCl_3) expresado como el porcentaje del valor obtenido en agua pura (MilliQ).
- Figura 5.** (A). Curvas de calibración obtenidas en la medición secuencial de NO_2^- y NO_3^- para NO_2^- después del *paso 1* (standard + reactivo de Griess) y separadamente para NO_2^- y NO_3^- después del *paso 2* (muestra + reactivo de Griess- + reactivo de VCl_3 , reacción
- 30

de 25 minutos a 60°C); (B) curvas de calibración de NO_3^- (0 to 20 μM) medida en la presencia de diferentes concentraciones NO_2^- (0 a 20 μM). La absorbancia medida se representa con puntos. Las líneas representan los valores calculados usando las curvas de calibración mostradas en (A) y en la ecuación 4 del texto.

- 5 **Figura 6.** (A) Regresión lineal comparando los métodos de la columna de cadmio y vanadio. L 1-6: Muestras de agua del embalse de Bornos (Cádiz, España), A1: Embalse ácido del Sancho (Huelva) afectado por drenaje ácido de minas, E 1-5: Estuario del Golfo de Nicoya (Costa Rica), F 0-4: Muestras de agua marina y agua intersticial de sedimentos marinos de la Bahía de Cádiz extraída tras congelación. Los puntos ($n = 17$) representan
- 10 el promedio de determinaciones por triplicado. Las muestras se diluyeron adecuadamente para analizarlas dentro de los límites de la curva de calibración de ambos métodos. Se muestran los coeficientes de regresión y su error estándar. (B) Perfil vertical de nitrato en la interfase sedimento agua del saco interno de la Bahía de Cádiz (España) determinado con los dos métodos. (C) Transecto horizontal de las concentraciones de nitrato medidas
- 15 con los dos métodos a lo largo del estuario del Golfo de Nicoya (Costa Rica). Barras de error en los gráficos (B) y (C) representan intervalos de confianza de 95%.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Reactivos

- 20 Los reactivos son de grado de pureza analítica.

Todas las soluciones y diluciones se preparan con agua pura (Milli-Q).

- Reactivo de Griess para el análisis de NO_2^- se preparan como se describe en Grasshoff. et al. (1983): Reactivo de sulfanilamida se prepara disolviendo 5.0 g de sulfanilamida en 50 mL de ácido clorhídrico (HCl) concentrado (12N) diluido en
- 25 aproximadamente 300 mL de agua pura y después de enfriar enrasado hasta 500 ml con agua pura. El reactivo N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato (NED) se prepara disolviendo 0.5 g de NED en 500 mL de agua pura (MiliQ). Ambos reactivos se mezclan en proporciones iguales (1:1) justo antes de realizar el análisis (en lo sucesivo esta mezcla se denomina reactivo de Griess).

- 30 El reactivo de Cloruro Vanadio (III) (VCl_3) al 2% p/v se prepara en una solución de ácido clorhídrico 6N (en adelante reactivo de VCl_3). El tiempo necesario para la

completa disolución es aproximadamente 1 hora. La disolución completa es evidente por el cambio de una solución turbia a una transparente. La solución se filtra entonces a través de un filtro de fibra de vidrio de 0.7 μm de tamaño de poro para eliminar las impurezas del reactivo.

- 5 El agua de mar artificial se prepara siguiendo la composición completa de sal descrita por Grasshoff et al. (1983).

La disolución de partida para la preparación de los patrones de nitrato (Disolución Stock) (10 mM) se prepara disolviendo 1,011 g KNO_3 secado en un horno (100 ° C, 1 h) en 1 L de agua pura. Solución stock de nitrito (10 mM) se prepara disolviendo 0,690 g NaNO_2 secado en horno (100 ° C, 1 h) a 1 L de agua pura. Para todos los experimentos de optimización inicial del método, las distintas soluciones de trabajo requeridas se prepararon a partir de las soluciones stock por dilución con agua pura. Se prepararon soluciones estándar en agua de mar artificial de la salinidad apropiada para el experimento del efecto de la salinidad.

15

Procedimiento propuesto para la determinación secuencial de NO_2^- y NO_3^-

Se ha probado y validado un protocolo de 2 pasos, con el fin de permitir la determinación secuencial de ambos NO_2^- y NO_3^- en la misma muestra como sigue:

20 Se transfieren dos volúmenes de muestra a un vial apropiado seguido por la adición de 0,1 volúmenes de reactivo de Griess y se mezcla bien. Los viales se incuban a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) durante 20 minutos. Entonces, se mide la absorbancia de la mezcla del reactivo de Griess a 540 nm en un volumen de la muestra. Las concentraciones de NO_2^- se determinan por análisis paralelo de una serie de estándares de NO_2^- de concentración conocida.

25

Paso 2: Determinación de nitrito más nitrato

Una cantidad de reactivo de VCl_3 equivalente a 0.1 veces el volumen de la muestra y el reactivo de Griess restante en el frasco se agrega en el mismo vial utilizado anteriormente y se mezcla. El vial se cierra para evitar la evaporación y se incuba a 60°C durante 25 minutos. Después, el vial se enfría a temperatura ambiente, se agita y se mide la absorbancia a 540 nm. Se realiza un análisis paralelo de un conjunto de estándares de

30

NO_2^- y NO_3^- para la determinación de NO_3^- como se describe más adelante en el epígrafe curvas de calibración, dentro de este mismo apartado.

Dependiendo de la cantidad de muestra y los instrumentos disponibles, el procedimiento puede ser aplicado en diferentes maneras como se explica a continuación.

- 5 Puede utilizarse un espectrofotómetro o un lector de microplacas para medir absorbancia.

Para calentar los viales puede utilizarse un baño de agua de temperatura controlada, un bloque calentador o un lector de microplacas con función de calefacción.

- 10 Para enfriar los viales puede utilizarse un baño de agua de temperatura controlada, un bloque de refrigeración o un lector de microplacas con una función de refrigeración.

Para mezclar las muestras pueden utilizarse diversos tipos de agitadores o un lector de microplacas con una función de agitación.

- 15 **Ejemplo 1. Usando viales eppendorf de 1,5 mL y un lector espectrofotométrico de microplacas.**

Paso 1: Determinación de nitrito

- 20 Un volumen de muestra de 1 mL fue transferido a un vial eppendorf de 1,5 mL, seguido por la adición del reactivo de Griess (50 μL) y mezclado. Los viales se incubaron a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) durante 20 minutos. Entonces, 350 μL de la solución (muestra + reactivo de Griess) se transfieren a microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano y se mide la absorbancia a 540 nm. Las concentraciones de NO_2^- se determinan por análisis paralelo de un conjunto de estándares de NO_2^- de concentraciones conocidas.

- 25 *Paso 2: Determinación de nitrito más nitrato*

- 30 Se añade un volumen de 70 μL de reactivo de VCl_3 a la muestra + reactivo Griess que quedan en los viales eppendorf empleados en el paso 1 (es decir, 700 μL) y se mezcla. Se cierran los viales para evitar la evaporación y se incuban en un baño de temperatura controlada a 60°C durante 25 minutos. Una vez que los viales son enfriados a temperatura ambiente en un baño de agua, son agitados y se transfieren 350 μL de cada

vial un pocillo de una microplaca de poliestireno, de 96 pocillos de fondo plano, y se mide la absorbancia a 540 nm. La determinación de NO_3^- se realiza mediante el análisis paralelo de un conjunto de estándares de NO_2^- y NO_3^- como se describe más adelante en el epígrafe curvas de calibración, dentro de este mismo apartado.

5

Ejemplo 2. Utilizando un espectrofotómetro y cubetas de 1 cm

Paso 1: Determinación de nitrito

Volúmenes de muestras de 1 mL se transfieren a cubetas de 1,5 mL, seguido por la adición de 50 μL de reactivo de Griess y se agitan convenientemente. Las cubetas se incuban a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) durante 20 minutos y se mide la absorbancia a 540 nm. Las concentraciones de NO_2^- se determinan por análisis paralelos de un conjunto de estándares de NO_2^- de concentraciones conocidas.

Paso 2: Determinación de nitrito y nitrato

Una vez medida la absorbancia en el paso 1, se añade a la misma cubeta un volumen de 100 μL de reactivo de VCl_3 y se agita bien. Las cubetas son cerradas con una tapa para evitar la evaporación y se incuban en un baño de temperatura controlada a 60°C durante 25 minutos. Tras este tiempo, las cubetas se enfrían a temperatura ambiente en un baño de agua y se mide la absorbancia a 540 nm. La determinación de NO_3^- se realiza mediante el análisis paralelo de un conjunto de estándares de NO_2^- y NO_3^- como se describe más adelante en el epígrafe curvas de calibración, dentro de este mismo apartado.

15

20

Ejemplo 3. Utilizando microplacas y un lector espectrofotométrico de microplacas

Paso 1: Determinación de nitrito

Se transfiere un volumen de muestra (por ejemplo 300 μL) a un pocillo de una microplaca de poliestireno, seguida por la adición de 0.05 volúmenes de reactivo de Griess (e.g. 15 μL) y se mezclan bien. Las Microplacas se incuban a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) durante 20 minutos y se mide la absorbancia de la muestra a 540 nm. Las concentraciones de NO_2^- se determinan por análisis paralelos de un conjunto de estándares de NO_2^- de concentraciones conocidas.

25

30

Paso 2: Determinación de nitrito y nitrato

Una cantidad de 0.1 volumen de la muestra (por ejemplo 30 μL) de reactivo de VCl_3 se agrega a la solución muestra + reactivo Griess, en el mismo pocillo empleado en el paso 1, y se mezcla convenientemente. La microplaca, sellada para evitar la evaporación, se incuba en un sistema de control de temperatura a 60°C durante 25 minutos. Entonces, la microplaca se enfría hasta temperatura ambiente en un baño de agua, se agita de nuevo y se mide la absorbancia de la muestra a 540 nm. La determinación de NO_3^- se realiza mediante el análisis paralelo de un conjunto de estándares de NO_2^- y NO_3^- como se describe a continuación.

10

Curvas de calibración*-Determinación de nitrito (paso 1)*

Durante el *paso 1* se utilizan un conjunto de estándares de diferentes concentraciones conocidas de NO_2^- para determinar las concentraciones de NO_2^- en la muestra usando la ecuación:

15

$$\text{ABS}_{\text{NO}_2}^1 = S_{\text{NO}_2}^1 \times [\text{NO}_2^-] + \text{ABS}_{\text{reactivos}}^1 \quad (1)$$

20

Donde $\text{ABS}_{\text{NO}_2}^1$ es la absorbancia de los estándares de NO_2^- ; $S_{\text{NO}_2}^1$ es la pendiente de la curva de calibración ($\text{ABS } \mu\text{M}^{-1}$) para NO_2^- ; $[\text{NO}_2^-]$ es la concentración de NO_2^- , y $\text{ABS}_{\text{reactivos}}^1$ es la absorbancia de los reactivos, es decir, la intersección de la curva de calibración

-Determinación de nitrato (paso 2)

En las muestras, donde el NO_3^- y NO_2^- están ambos presentes, la contribución de cada uno de ellos a la absorbancia a 540 nm tiene que ser discriminada. Después de la reacción con el reactivo de VCl_3 , la absorbancia medida ($\text{ABS}_{\text{NOX}}^{\text{V}}$) es una combinación de la contribución individual de cada compuesto (NO_2^- y NO_3^-) además de la absorbancia de los reactivos, es decir:

25

$$\text{ABS}_{\text{NOX}}^{\text{V}} = \text{ABS}_{\text{NO}_2}^{\text{V}} + \text{ABS}_{\text{NO}_3}^{\text{V}} + \text{ABS}_{\text{reactivos}}^{\text{V}} \quad (2)$$

El uso de los estándares de NO_2^- y NO_3^- permite realizar una calibración de la reacción completa en presencia del reactivo de VCl_3 , siendo:

30

$$\text{ABS}_{\text{NO}_2}^{\text{V}} = S_{\text{NO}_2}^{\text{V}} \times [\text{NO}_2^-] + \text{ABS}_{\text{reactivos}}^{\text{V}} \quad (3)$$

$$ABS_{NO_3}^V = S_{NO_3}^V \times [NO_3^-] + ABS_{reactivos}^V \quad (4)$$

donde, $ABS_{NO_2}^V$ y $ABS_{NO_3}^V$ son la absorbancia de los estándares de NO_2^- y NO_3^- respectivamente; $S_{NO_2}^V$ y $S_{NO_3}^V$ son las pendientes de las curvas de calibración ($ABS \mu M^{-1}$) para NO_2^- y NO_3^- , respectivamente; $[NO_2^-]$ y $[NO_3^-]$ son las concentraciones de los estándares de NO_2^- y de NO_3^- respectivamente y $ABS_{reactivos}^V$ es la absorbancia de los reactivos sin NO_2^- o NO_3^- , es decir, la intersección de la curva de calibración.

La absorbancia medida es una combinación de la contribución individual de cada compuesto y la absorción de los reactivos, es decir, la combinación de las ecuaciones 3 y 4:

$$10 \quad ABS_{NOX}^V = S_{NO_3}^V \times [NO_3^-] + S_{NO_2}^V \times [NO_2^-] + ABS_{reactivos}^V \quad (5)$$

La concentración de NO_3^- de la muestra se calcula como:

$$[NO_3^-] = (ABS_{NOX}^V - ABS_{reactivos}^V - S_{NO_2}^V \times [NO_2^-]) / S_{NO_3}^V \quad (6)$$

Dónde: $[NO_2^-]$ es la concentración de NO_2^- determinado en el paso 1 y $[NO_3^-]$ es la concentración de NO_3^- de la muestra.

15

Efecto de la temperatura y las concentraciones de HCl y VCl_3

La absorbancia máxima y el tiempo mínimo necesario para alcanzarla en función de concentraciones variables de VCl_3 y de HCl se representan en la figura 1. Para el VCl_3 , la absorbancia máxima se obtuvo cuando las concentraciones fueron igual o superior al 20 1% (máximo 2%) (Fig. 1A). Para el HCl, la máxima absorbancia se midió cuando la concentración fue superior a 4 N (máximo en 6-8 N) (Fig. 1B). La temperatura también tuvo un efecto significativo en la absorbancia, con la absorbancia siendo máxima a 40 ° C y mínima a 80 ° C (Fig. 1A). Los efectos combinados de la temperatura y concentración de VCl_3 afectan considerablemente el tiempo de reacción (Fig. 1C). Aunque el desarrollo 25 máximo de color se midió a 40 ° C, tiempos de reacción superiores a 2 horas, limitan su aplicación práctica en análisis rutinarios. En contraste, las temperaturas de 50-70 ° C, combinado con una solución al 2% de VCl_3 , produjeron una alta absorbancia con tiempos de reacción < 1 hora. El tiempo de reacción también fue influenciado por la concentración de HCl, disminuyendo exponencialmente al mínimo el tiempo de reacción a 30 concentraciones $\geq 6N$ HCl (Fig. 1D). Por lo tanto, las condiciones seleccionadas que consideramos óptimas en conjunto, produciendo la máxima absorbancia en el menor

tiempo posible fueron una solución de 2% p/v VCl_3 en HCl 6N y una temperatura de reacción de 60°.

Optimización de la temperatura y el tiempo de reacción

5 La dependencia de la señal máxima y del tiempo de reacción de la temperatura se analizó en más detalle empleando un baño de agua de temperatura controlada. Este método de calentamiento es el procedimiento más común en los laboratorios y la eficiencia de transferencia de calor es superior a la que brinda el portacubetas termostatzado de un espectrofotómetro. En las temperaturas más altas ensayadas (70 y 80
10 ° C), el V(III) reduce el nitrato en 5 minutos o menos (Braman y Hendrix 1989) y el nitrito producido reacciona rápidamente con el reactivo de Griess resultando en una señal máxima en la primera medición (incubación de 5 min) (Fig. 2A). Sin embargo, se ha demostrado que la adición de compuestos reducidos interfiere de forma compleja con la reacción de Griess (Norwitz y Keliher 1985), resultando en una disminución progresiva
15 de absorción molar con tiempo. En contraste, a 40 ° C la reacción fue lenta, dando lugar a tiempos de reacción superior a 2 horas. En temperaturas de 50 y 60 ° C, las respuestas máximas fueron obtenidas después de 40 y 25 minutos de incubación respectivamente y se mantienen constantes durante otros 15 minutos de incubación (Fig. 2A). Considerando que, la máxima absorbancia molar se obtuvo después de 25 minutos de incubación a 60 °
20 C, un 5% más alto que el valor obtenido a 50 ° C, se confirman las condiciones óptimas, elegidas para el método en las pruebas anteriores.

Optimización del volumen de reactivo

25 Se ajustaron distintos volúmenes de reactivo para producir la dilución mínima de la muestra y obtener la máxima absorbancia molar. La eficiencia máxima se obtuvo utilizando 100 μ L de una solución al 2% de VCl_3 por mL de muestra (Fig. 2B). Con volúmenes menores, la concentración de VCl_3 probablemente era demasiado pequeña para reducir todo el nitrato de la muestra en 20 minutos. Por el contrario, un exceso de VCl_3 favoreció la reducción de nitrito a óxido nítrico, resultando en una disminución de la
30 señal medida. Por otra parte, los volúmenes de reactivo de Griess superiores a 25 μ L dieron lugar a una señal similar, aunque fue ligeramente superior con la adición de 50 μ L / mL de muestra (Fig. 2B).

Límite de detección, rango de medida y estabilidad

Las condiciones óptimas seleccionadas fueron ensayadas con el fin de determinar el rango de medida, el límite de detección y la precisión del método (Fig. 3). Cuando solo existe NO_3^- en la muestra, la reacción fue lineal entre 0-40 μM NO_3^- (Fig. 3A), similar a las obtenidas con columnas reductoras de cadmio (Wood et al. 1967).

El procedimiento demostró una alta exactitud; la desviación estándar de los patrones analizados fue menor que la precisión del espectrofotómetro utilizado (0.001 ABS), correspondiente a 0,03 μM NO_3^- (Fig. 3B). El límite de detección (LOD) se calculó como 3 veces el error estándar de la intercepción, dividido por la pendiente de la recta de calibración (Konieczka y Namiesnik 2009), resultando en un valor tan bajo como 0.04 μM NO_3^- .

Como se muestra anteriormente, la reducción de NO_3^- y NO_2^- con V(III) progresa rápidamente a altas temperaturas, resultando en una disminución gradual de la señal después de 30-35 min a 60 °C (Fig. 2A). Sin embargo, a temperaturas ligeramente más bajas (por ejemplo 40 °C), la velocidad de reacción disminuye significativamente, requiriendo varias horas para alcanzar la máxima absorbancia (Fig. 2A). Por lo tanto, se sugiere que el tiempo de reacción debe ser controlado para que sean 20-30 min a 60 °C enfrían las muestras a continuación a temperatura ambiente (25 °C). De esta manera, la señal permanece estable durante al menos 1 hora, disminuyendo después lentamente con el tiempo (Fig. 3C). Este procedimiento facilita el análisis de un gran número de muestras simultáneamente sin necesidad de medir la absorbancia de las muestras inmediatamente.

Efecto de la salinidad

Se observó una disminución leve de la absorbancia molar con el aumento de la salinidad en la determinación de NO_2^- utilizando el procedimiento común de la reacción de Griess ($\text{ABS} = 94.163 + 5.822 \cdot \exp(-0.120 + \text{salinidad})$, $r = 0.958$) (Fig. 4), en contraste con informaciones anteriores (Grasshoff et al. 1983). Norwitz & Keliher (1985) también reportaron un efecto de las sales pero en concentraciones mucho más altas que las utilizadas aquí y para sales concretas. El efecto de la salinidad sobre la determinación de NO_2^- fue la misma cuando VCl_3 estuvo presente en la reacción ($\text{ABS} = 93.033 + 7.104 \cdot \exp(-0.088 + \text{salinidad})$, $r = 0.984$). El efecto de la sal se mantuvo estable en salinidades entre 20 y 50, produciendo una absorbancia molar alrededor del 94% del

valor obtenido en agua destilada. Se observó un efecto más fuerte durante la determinación de NO_3^- en presencia de VCl_3 , con la absorptividad molar disminuyendo al 85% del valor obtenido en agua destilada a salinidades entre 30 y 50 ($\text{ABS} = 82.519 + 17.469 \cdot \exp(-0.055 + \text{salinidad})$, $r = 0.998$). Por lo tanto, se sugiere que las curvas de calibración deben realizarse utilizando estándares en salinidades similares a las encontradas en las muestras a analizar o la aplicación un factor de corrección previamente calculado.

Interferencia del nitrito

El NO_3^- se encuentra a menudo en la muestra junto con NO_2^- , aunque generalmente este último en mucha menor concentración. El NO_2^- interfiere en las mediciones utilizando el reactivo de Griess. Todos los protocolos publicados hasta la fecha requieren la reducción de NO_3^- a NO_2^- , seguida por la determinación de la suma de NO_2^- y NO_3^- (NO_x^-). Entonces NO_2^- es determinado por separado en otra muestra y por diferencia se determina la concentración de NO_3^- de la muestra analizada.

El protocolo de Miranda y col. (2001) describe un protocolo espectrofotométrico usando VCl_3 para la reducción de NO_3^- . Sin embargo, ellos describieron una alta interferencia del NO_2^- , siendo el error en la determinación de NO_3^- , proporcional a la concentración de NO_2^- . Como resultado, el error en una muestra con concentraciones más altas de NO_2^- que NO_3^- podría ser superior a la concentración real de NO_3^- (Beda y Nedospasov 2005).

Después de la reacción completa con VCl_3 , tanto el NO_2^- inicialmente presente en la muestra como el NO_2^- producido en la reducción del NO_3^- contribuyen a la absorbancia medida. La absorptividad molar del NO_2^- , en ausencia de NO_3^- , disminuye de un valor de 0.042 a 0.036 $\text{ABS } \mu\text{M}^{-1}$ después de la adición del reactivo de VCl_3 (Fig. 5A). Este valor fue ligeramente inferior a la teórica disminución producida por dilución debido a la adición de reactivos (0.038 $\text{ABS } \mu\text{M}^{-1}$), por tanto es importante determinar el efecto de la adición del reactivo de VCl_3 para la producción señal del compuesto coloreado azo, obtenida en el paso 1, usando un conjunto de patrones de NO_2^- en paralelo a los de NO_3^- . La eficiencia de la reducción NO_3^- a NO_2^- también influirá en la señal medida; la absorbancia molar obtenida para NO_3^- es ligeramente menor que la de NO_2^- , pero la eficiencia de la reacción es superior al 94% durante las pruebas del método (Fig. 5A).

Este efecto está incluido en las ecuaciones usadas para calcular las concentraciones de cualquier muestra.

El método desarrollado por Miranda y col. (2001) logra absorptividades molares inferiores para el NO_3^- que las observadas con el presente método debido a 1) el mayor
 5 volumen de los reactivos utilizados por estos autores, resultando en una dilución de 1:2 de la muestra y 2) una menor eficiencia de conversión. Los absorptividades molares obtenidos fueron $0.0089 \text{ ABS } \mu\text{M}^{-1}$ que, después de considerar los absorptividades molares obtenidos para NO_2^- con la reacción de Griess (alrededor de $0.038 \text{ ABS } \mu\text{M}^{-1}$) y la dilución debido a la adición de reactivos como se describió en su protocolo, se traduciría como una
 10 eficiencia de conversión de $\sim 40\%$. Como resultado, la absorbancia obtenida por mol de NO_2^- con el método de Miranda y col. (2001) es más de dos veces mayor que para el NO_3^- . Además, la señal individual obtenida para NO_3^- y NO_2^- no fue tomada en cuenta, resultando en una menor precisión y una mayor interferencia del NO_2^- .

Por el contrario, el procedimiento propuesto aquí alcanza una señal similar de
 15 absorbancia para ambos compuestos, resultando en una mínima interferencia del NO_2^- y una alta exactitud. Además, la señal para el NO_3^- y el NO_2^- se obtienen por separado durante la calibración y es constante durante cada análisis sin importar el ratio $\text{NO}_2^-:\text{NO}_3^-$ presente en la muestra. Esto fue confirmado por el bajo error ($\leq 0.5 \mu\text{M}$) medido en la determinación de NO_3^- en estándares con un rango de concentraciones de NO_2^- (Fig. 5B).
 20 La concentración de NO_3^- fue, sin embargo, subestimada cuando la suma de las concentraciones NO_2^- y NO_3^- (NO_x^-) supera $30 \mu\text{M}$, valor que es más alto que el límite superior para la medición de NO_2^- (Grasshoff et al. 1983). Por lo tanto, para las medidas de NO_x^- por encima de $25 \mu\text{M}$, especialmente con concentraciones altas de NO_2^- ($> 30\% \text{ NO}_x^-$), las muestras deben diluirse con el fin de obtener una medición precisa de NO_3^- .
 25 Finalmente, con el método propuesto aquí, no es necesario la determinación de NO_2^- en una muestra independiente, sino que ambos análisis se realizan secuencialmente con el consiguiente ahorro de muestra, reactivos y tiempo.

Comparación de los métodos de columna de cadmio y reducción con vanadio

30 Un conjunto de muestras ambientales fueron recogidas de diferentes ambientes y se analizaron con el método de reducción de cadmio tradicional en un autoanalizador TRAACS 800 Technicon mediante protocolos estándar (Grasshoff et al., 1983) y con el

- protocolo descrito aquí. Las muestras de columna de agua estuárica fueron recogidas en la superficie a lo largo de un gradiente de salinidad (rango de salinidad 6-26) en la parte interna del Golfo de Nicoya (Costa Rica) en julio de 2011. Se recolectaron muestras de agua dulce de la columna de agua (0-16 m de profundidad, salinidad 0) del embalse de
- 5 Bornos (Cádiz, España), en agosto de 2010. En diciembre de 2011, se recolectaron muestras de agua del embalse ácido (pH ~4) del Sancho (Huelva, España), afectado por vertidos de drenaje ácido de minas, para probar el efecto de altas concentraciones de metales. Se analizaron también muestras de agua intersticial, extraídas de la capa superior (0-3.5 cm, salinidad 32-40) de testigos sedimentos marinos tras su congelación, recogidos
- 10 en marzo de 2013 en un caño mareal “Río San Pedro” (Bahía de Cádiz). El agua intersticial tras la congelación del sedimento, y liberación por lisis celular de los nutrientes, fue extraída conforme a lo descrito en Garcia-Robledo et al (2010). Todas las muestras ambientales se dividieron en alícuotas y se analizaron por triplicado con cada método.
- 15 La comparación entre el método clásico de reducción mediante columna cadmio y el protocolo propuesto aquí en un rango de salinidades amplio (0-40) y tipos y procedencia de las muestras (agua dulce, agua dulce acida y contaminada por drenaje ácido minas, agua estuárica y sedimentos marinos) mostro una excelente concordancia (Fig. 6). La prueba t de Student para muestras emparejadas mostró que los resultados de los dos
- 20 métodos son homogéneos ($t = -0.736$, $p = 0.472$, $n = 17$) con una diferencia promedio \pm error estándar entre los dos métodos de $0.073 \pm 0.099 \mu\text{M}$. Estas determinaciones independientes demuestran que el método de reducción con vanadio y posterior uso del espectrofotómetro no sesga los resultados. Además, por el método de vanadio se analizaron 60 muestras para NO_2^- y NO_3^- en menos de 1 h, sin la necesidad de un técnico
- 25 especializado y un sistema autoanalizador caro capaz de medir NO_3^- por el método de reducción de la columna de cadmio.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

- 30 Como resultado de esta adaptación se podría producir un kit colorimétrico utilizando un sistema de calefacción portátil y un espectrofotómetro para la determinación de nitrato y nitrito en el mismo volumen de muestra.

Además, también se puede diseñar un sistema de análisis de inyección de flujo que permitirá medir el nitrito y nitrato en la misma muestra, usando canales diferentes o usando el mismo canal, utilizando así la mitad de la cantidad de muestra y reactivo de Griess. Alternativamente, la línea usada para la determinación de nitrito podría ser recirculada después de la medida de la absorbancia para la determinación de este compuesto. A la mezcla compuesta por la muestra y el reactivo Griess se le añade el reactivo de Vanadio y la concentración de nitrato+nitrito se mide en el mismo canal o en otro diferente.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación secuencial de nitrito y nitrato, caracterizado porque comprende una fase de detección inicial de NO_2^- con reactivo de Griess, seguido de una segunda fase de reducción del NO_3^- presente en la muestra a NO_2^- con VCl_3 y la posterior detección del NO_2^- producido con el exceso de reactivo de Griess presente.

5

2. Procedimiento para la determinación secuencial de nitrito y nitrato, según reivindicación 1, caracterizado porque la primera fase comprende:

10

 - Adición de un volumen de reactivo de Griess equivalente a 0,1 veces el volumen de muestra,
 - Mezcla e incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos,
 - Determinación de la concentración de NO_2^- mediante técnicas espectrofotométricas y curvas de calibrado del estándar de NO_2^- .

15

3. Procedimiento para la determinación secuencial de nitrito y nitrato, según reivindicación 1, caracterizado porque la segunda fase comprende:

20

 - Adición de una cantidad de VCl_3 equivalente a 0.1 veces el volumen del conjunto de la muestra y el reactivo Griess restante en el medio de reacción empleado en la primera fase para reducir el NO_3^- a NO_2^-
 - Mezcla y posterior incubación a 60 ° C durante 25 minutos
 - Enfriado a temperatura ambiente
 - Agitación
 - Determinación de la concentración del NO_2^- procedente de la reducción de NO_3^- presente y del NO_2^- existente en la muestra, mediante técnicas espectrofotométricas y curvas de calibrado
 - Determinación de la concentración de NO_3^- mediante el empleo de la siguiente ecuación:

25

$$[\text{NO}_3^-] = (\text{ABS}_{\text{NOX}}^{\text{V}} - \text{ABS}_{\text{reactivos}}^{\text{V}} - S_{\text{NO}_2}^{\text{V}} \times [\text{NO}_2^-]) / S_{\text{NO}_3}^{\text{V}} \quad (6)$$

30

 donde
 $[\text{NO}_3^-]$ es la concentración de nitratos
 $\text{ABS}_{\text{NOX}}^{\text{V}}$ es la combinación de las absorbancias individuales de cada compuesto (nitrito y nitrato) además de la absorbancia de los reactivos.

$ABS_{\text{reactivos}}^V$ es la absorbancia de los reactivos en ausencia de NO_2^- y NO_3^-

$S_{\text{NO}_2}^V$ es la pendiente de la curva de calibrado de los estándares de NO_2^-

$S_{\text{NO}_3}^V$ es la pendiente de la curva de calibrado de los estándares de NO_3^-

- 5 4. Uso del procedimiento descrito en reivindicaciones 1 a 3 para la determinación de concentraciones de nitrito y nitrato en muestras acuáticas.

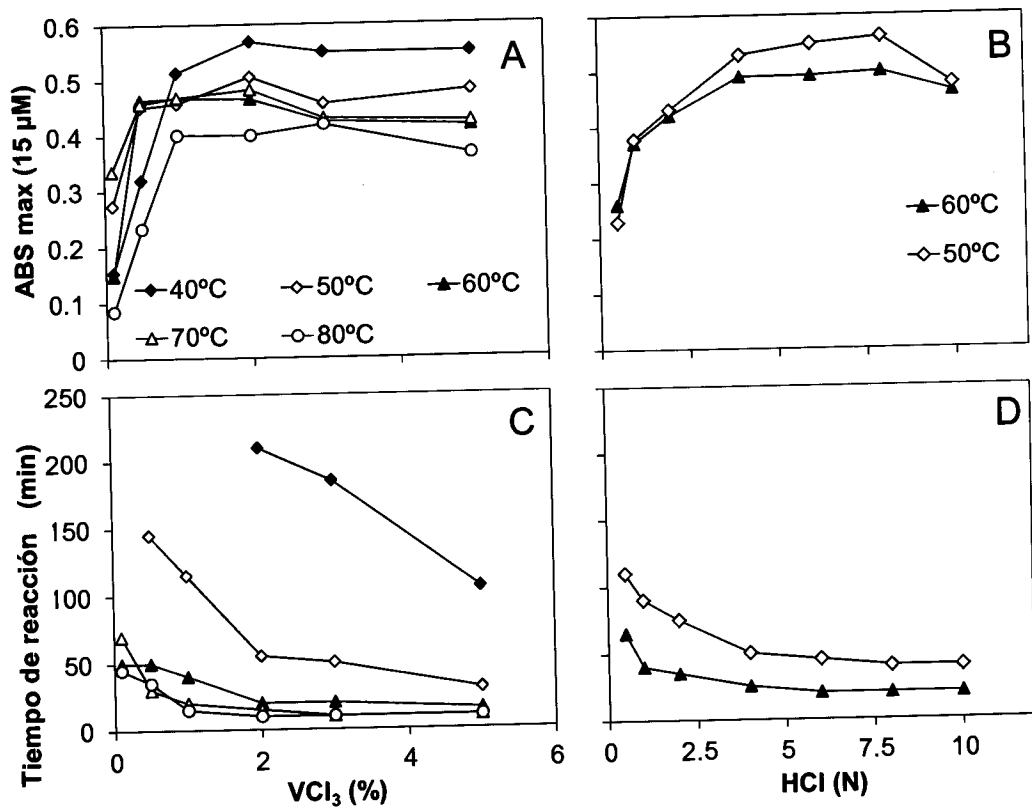


Fig. 1

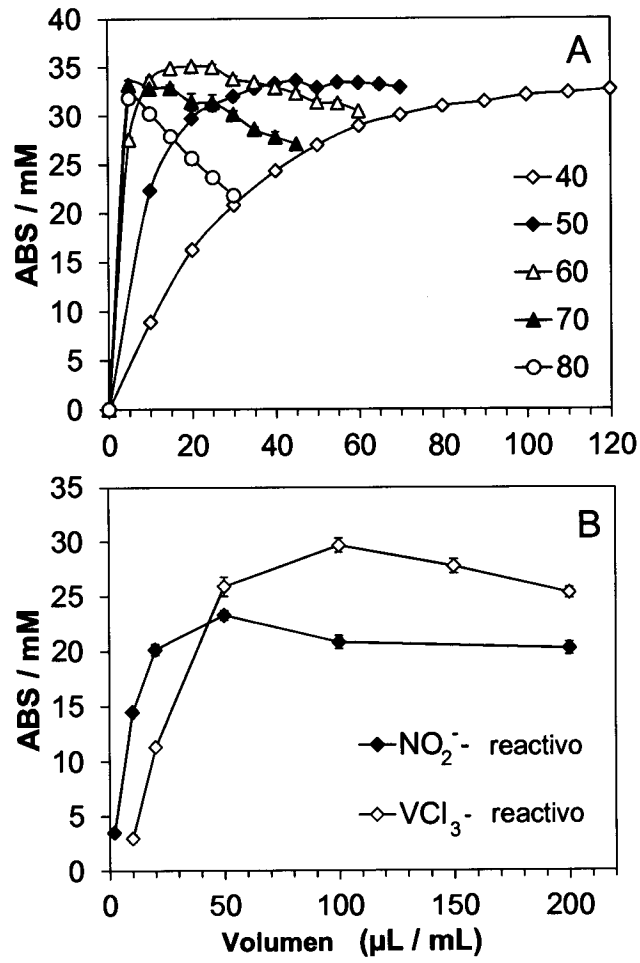


Fig. 2

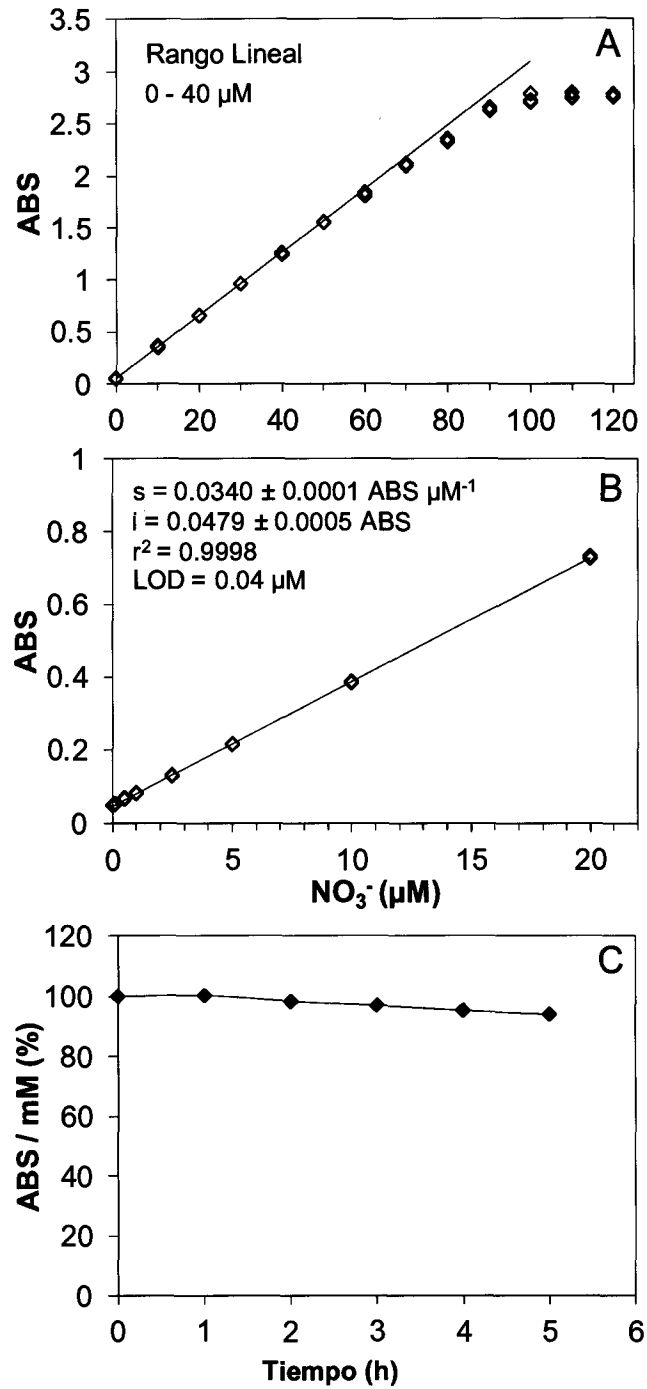


Fig. 3

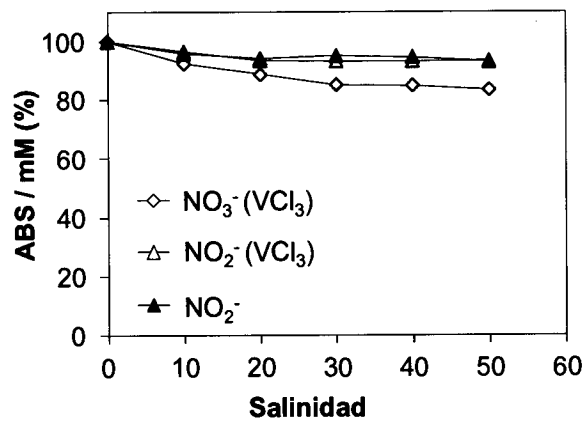


Fig. 4

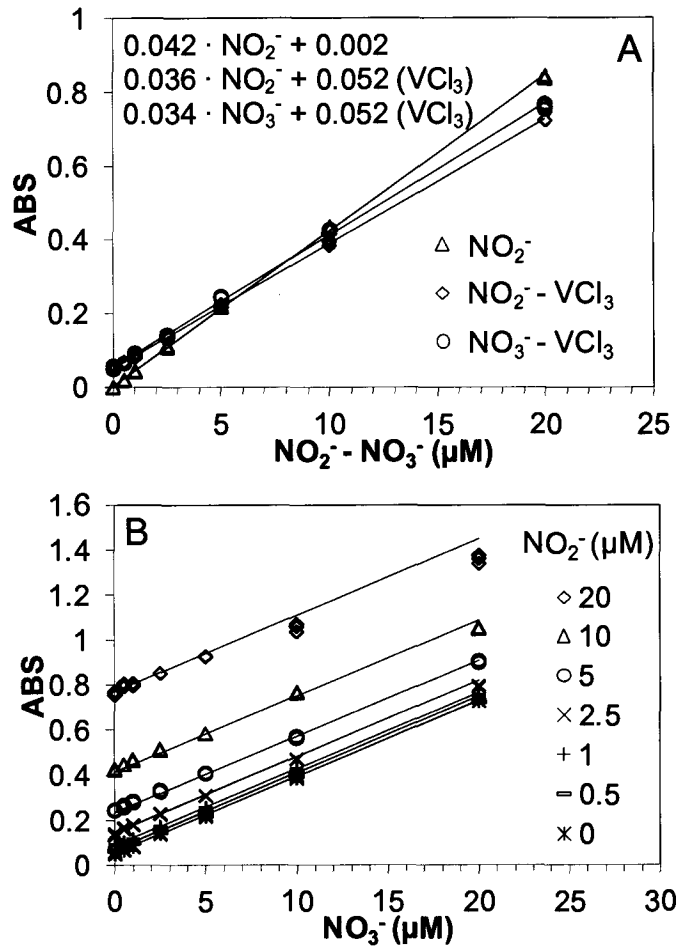


Fig. 5

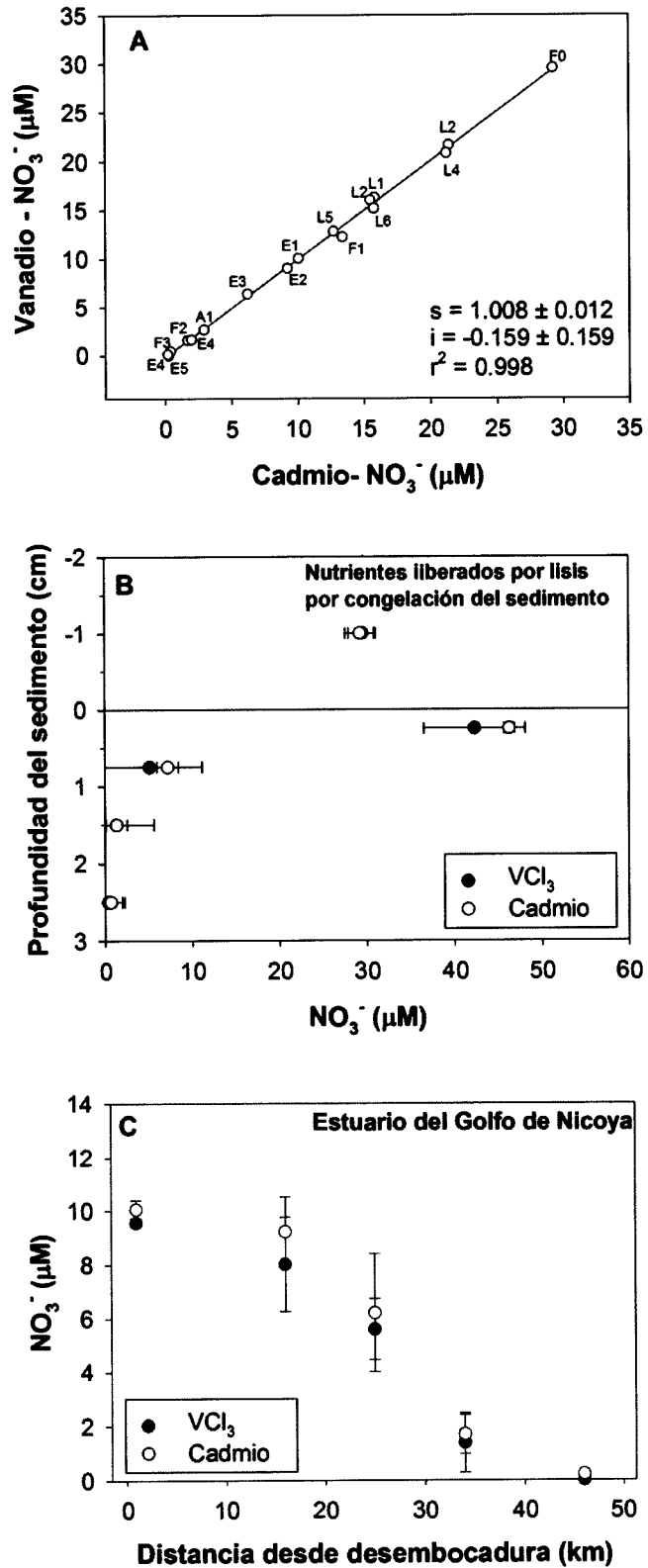


Fig. 6