



Nueva técnica colorimétrica para la determinación de nitratos en el plasma

Fernando Palomino, MD., Profesor Asistente, Unidad de Fisiología. Manuel Rojas, MVD., Docente Ocasional, Unidad de Toxicología, Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Medicina. Mauricio Beltrán, BLC., Laboratorio Clínico Central. Hospital San Juan de Dios. Universidad Nacional de Colombia.

Se presenta una nueva técnica colorimétrica para la cuantificación de la concentración del ión nitrato en el plasma. El método se basa en la reacción de nitración del ácido salicílico en medio ácido con la formación de un compuesto con un pico de absorción en 410 nm. El límite de detección es alrededor de 0.1 mmol/l y la linealidad llega hasta 9.46 mmol/l de NO₃. Se hace una comparación con otras técnicas publicadas para la determinación de nitrato.

SUMMARY

It presents a new colorimetric technique for quantification of plasma nitrate ion concentration. The method is based upon the nitration reaction of salicylic acid in acidic media with the formation of a compound with an absorption peak at 410 nm. The detection limit is about 0.1 mmol/l and linearity up to 9.46 mmol/l NO₃. It makes a comparison with other published techniques for nitrate determination.

INTRODUCCION

En el pasado el ión nitrato (NO₃) ha sido de interés como sustancia causante de intoxicaciones agudas poco frecuentes en humanos, pero muy importantes en el ganado (1,2,3), siendo responsable de esta toxicidad su capacidad para relajar al músculo liso y para oxidar la hemoglobina a metahemoglobina (4,5).

En las últimas décadas se ha venido dando atención al nitrato (principalmente al contenido en los alimentos) como agente etiológico del adenocarcinoma gástrico. Se ha documentado suficientemente una correlación directa entre la ingesta de nitratos inorgánicos y la frecuencia de cáncer gástrico (6,7,8,9,10). Los nitratos presentes en el estómago son reducidos a nitrito, principalmente en presencia de hipoclorhidria (11). El nitrito, a su vez, reacciona con aminos orgánicas para formar nitrosaminas (12,13), las cuales ejercen un efecto carcinogénico directo sobre la mucosa gástrica (14,15).

Más recientemente, el incremento del interés científico sobre el ión nitrato se debe al descubrimiento de la importancia fisiológica del óxido nítrico (NO) (16,17), el cual se ha caracterizado como mediador de la inflamación y como agente antitumoral en la respuesta inmune (18,19,20,21), como neurotransmisor central y periférico (22,23) y como regulador periférico de la presión arterial y del flujo sanguíneo (24,25,26).

El producto estable principal del catabolismo del óxido nítrico es el nitrato (19,21), por suerte que la producción de NO se suele determinar midiendo el nitrato.

Los hechos citados han obligado a buscar técnicas de laboratorio que permitan una determinación fácil, sensible y lineal de nitrato en el plasma y otros líquidos biológicos. Diversas metodologías se han utilizado para la determinación de nitratos en especímenes biológicos, aguas, suelos y alimentos. Dentro de estas se encuentran técnicas

colorimétricas directas e indirectas luego de la conversión de nitrato a nitrito (27,28,29,30,31,32), fotométricas UV (33), cromato-gráficas - gas/líquido y HPLC- (34,35,36) y electroquímicas (37).

Varias de las anteriormente mencionadas presentan deficiencias por falta de sensibilidad o de linealidad, o bien, por escasa reproducibilidad. Otras requieren equipamiento complejo y costoso y, todas son laboriosas y demoradas, dificultándose por lo tanto el estudio del metabolismo del óxido nítrico y del nitrato, así como el diagnóstico toxicológico de este último. Estas consideraciones, reforzadas por la experiencia previa con varias de estas técnicas, motivaron el desarrollo de una metodología colorimétrica sensible, rápida, sencilla y al alcance de los laboratorios sin equipamiento complejo, para la determinación de la concentración de nitratos en el plasma (con posibilidad de adaptarse a otros líquidos biológicos) y cuyas características se presentan en este

trabajo. La metodología de laboratorio en cuestión ha sido probada y utilizada en trabajos de campo en estudios sobre la nitrato-nitrito toxicosis en ovinos y bovinos (38,39).

Para el desarrollo de la técnica se decidió explotar la reacción de nitración de los compuestos aromáticos, la cual se usa para la determinación de la concentración de algunos de estos, p.ej. el salicilato (40,41), y que fué utilizada por Cataldo y cols. (31) para la determinación de nitratos en extractos acuosos de tejidos vegetales.

METODO :

1-Muestra :

Plasma (separado prontamente)

Anticoagulante : EDTA al 10% (p/v) en agua, en la proporción de 4 gotas (80 ul) para 5 ml de sangre.

2-Desproteínización :

Cloruro mercurico (HgCl ₂)	
al 5% (p/v) en agua	1.0 ml
Carbonato de sodio 0.5M	1.1 ml
Plasma	0.9 ml

Agitar, dejar reposar 2 minutos y centrifugar a 1500-2000 G durante 5 minutos. Se obtiene un sobrenadante incoloro y libre de turbidez, el cual se utiliza a continuación para la reacción de color.

3-Reacción de color:

a) Reactivos:

Reactivo A: Acido salicílico al 8% (p/v) en ácido sulfúrico concentrado.

Reactivo B: NaOH 2.5 N.

b)Reacción:

Primera fase:

Mezclar en tubos de ensayo 16 x 150 mm:

Reactivo A	0.4 ml
Deproteinizado	1.0 ml

Esta reacción es exérgica y deben tenerse precauciones con las salpicaduras de ácido sulfúrico. Dejar reposar 30 minutos.

Segunda fase:

Agregar al tubo de ensayo 8.0 ml de reactivo B ; mezclar bien y leer la absorbancia a 410 (405-415) nm de longitud de onda, contra blanco preparado utilizando agua desionizada en lugar de plasma.

Calcular la concentración de nitrato (NO₃) en la muestra a partir de una curva de calibración realizada con soluciones de nitrato de sodio (estándares) en solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) con concentraciones entre 0 y 660 ppm de NO₃. Estos estándares de calibración se preparan a partir de NaNO₃ anhidro grado analítico. El estándar de concentración cero es tomado como patrón negativo.

La concentración final de ácido salicílico obtenida antes de la lectura fotométrica es 0.34% (246.19 mM).

RESULTADOS

1-Characterización del compuesto formado:

El espectro de absorción del ácido salicílico (disuelto en ácido sulfúrico) se presenta en la Figura 1a y, aquel del compuesto formado luego de reaccionar con el NO₃ (1.0 mmol/l en solución acuosa) se presenta en la Figura 1b.

El ácido salicílico disuelto en ácido sulfúrico presenta tres picos de absorbancia : 206, 232, y 296 nm, característicos de la di-substitución sobre el anillo aromático (R1 =

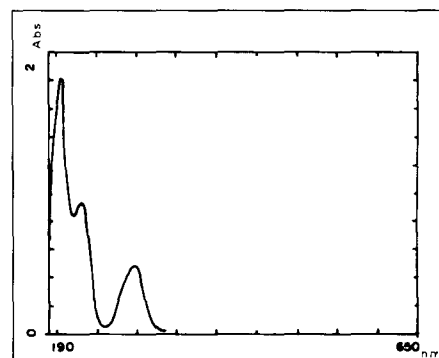


Figura 1a. Espectro de absorción del ácido salicílico disuelto en ácido sulfúrico. (hp diode array; 2nm ancho de banda).

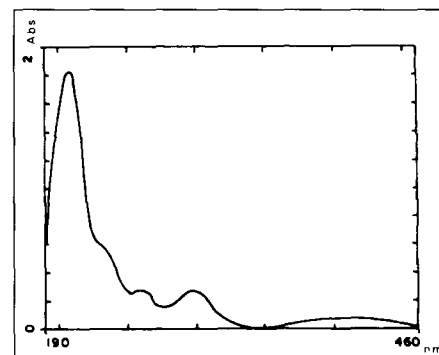


Figura 1b. Espectro de absorción del compuesto formado tras la reacción del nitrato con el ácido salicílico en medio ácido. (hp diode array; 2nm ancho de banda).

COOH y R₂ = OH en posición "para") con un corrimiento hacia el rojo de la banda primaria (203.5 nm) por el pH ácido. El compuesto formado luego de la reacción muestra cinco picos de absorción: 208, 232 (solapado), 260, 298 y 410 nm. Los picos a 208 y 298 nm son equivalentes a aquellos del ácido salicílico en 206 y 296 nm (el desplazamiento de 2 nm en ambos puede interpretarse como un corrimiento al UV por el cambio de pH generado por la adición final de NaOH). La aparición del pico en 260 nm correspondería al corrimiento de la banda de 232 nm del ácido salicílico debido a la nitración del anillo bencénico en posición "meta" y/o "para" al carboxilo (42). El pico observable en el visible (410 nm máx), correspondería a un

desplazamiento de 114 nm hacia el rojo del pico a 296 nm del ácido salicílico por nitración en posición "para" al hidroxilo (42,43). La persistencia, aunque con intensidad muy disminuída, de un pico a 296-298 nm indicaría la remanencia de moléculas sin reaccionar con el NO₃, o bien, la nitración en posición "meta" al hidroxilo, en cuyo caso sucede un corrimiento de 65 nm de la banda a 232 nm (42). Por consiguiente, en las condiciones de ensayo, sucede la formación de los compuestos 1-OH,3-Nitro benzoico y 1-OH,4-Nitro benzoico (C1 y C2 respectivamente en la Figura 2), siendo responsable de la absorción en el visible (410 nm) el compuesto C2. Las estructuras propuestas corresponden a productos de nitración de la molécula del ácido salicílico. La nitración del benceno y sus derivados sucede por reacción con el ácido nítrico en ácido sulfúrico concentrado (44), en la cual el reactante es el ión nitronio.

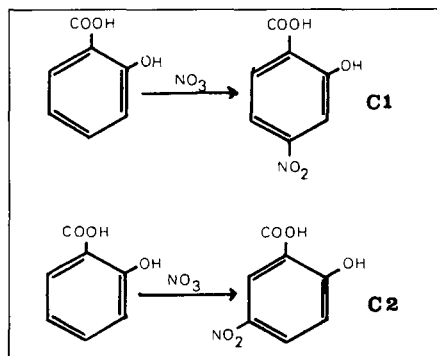


Figura 2. Estructuras propuestas, con base en espectroscopia de absorción UV-VIS, para el compuesto formado por nitración del ácido salicílico.

El espectro detallado en la región NUV-VIS del compuesto formado aparece en la Figura 3. Se encuentra un lambda máximo = 410 nm, con un pico casi simétrico alrededor de dicha longitud de onda y con un ancho de banda considerable (78.4 nm), lo cual hace posible la lectura colorimétrica en longitudes de onda

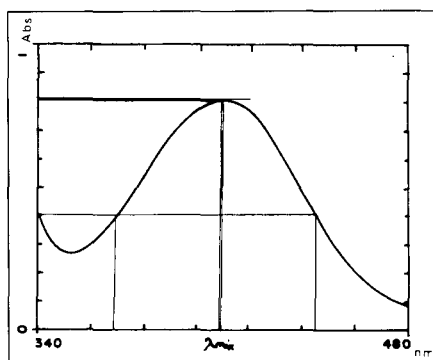


Figura 3. Detalle de la región NUV-VIS del espectro del compuesto formado por nitración del ácido salicílico. (hp diode array; 2 nm ancho de banda).

diferentes a 410 nm. A la longitud de onda propuesta para la lectura colorimétrica no existen interferencias fotométricas con ninguno de los dos reactivos, los cuales no presentan absorción de luz en esta región del espectro.

2-Linearidad y sensibilidad de la prueba:

Los valores de absorbancia y los coeficientes de extinción obtenidos utilizando estándares de nitrato de sodio equivalentes a una concentración de ión nitrato entre 25 y 600 ppm se presentan en la Tabla 1. La reacción es lineal en todo el rango mencionado (Figura 4), siendo la reacción estequiométrica hasta por lo menos una concentración de NO₃ de 600 ppm (9.46 mmol/l); para muestras con una concentración de nitrato superior a 1000 ppm es necesario hacer una dilución de la misma. El coeficiente de extinción promedio es de 0.0818 +/- 0.0004 UAbs/mmol/l. El límite de

Tabla 1. Valores de absorbancia obtenidos para concentraciones de nitrato entre 25 y 600 ppm en agua.

NO3		(*)	
ppm	mmol/l	Absorbancia	C.Extinción
25	0.403	0.030	0.0744
50	0.806	0.065	0.0806
75	1.209	0.101	0.0835
100	1.612	0.125	0.0775
150	2.419	0.210	0.0868
300	4.838	0.405	0.0837
600	9.467	0.818	0.0864
			x = 0.0818

(*) UAbs/mmol/l/cm

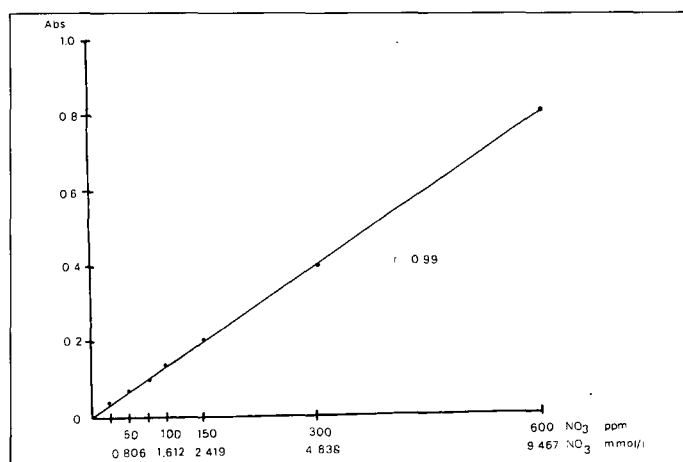


Figura 4. Curva de calibración para la determinación de nitrato disuelto en agua a 410 nm (*). (Carl Zeiss Spekol 10; 8 nm ancho de banda). (*)Promedio de cinco determinaciones seriadas

sensibilidad se encuentra alrededor de 6.2 ppm NO₃ (0.1 mmol/l); sin embargo, la sensibilidad puede mejorarse utilizando cubetas de mayor recorrido óptico (los datos aquí presentados se obtuvieron con cubetas de 1 cm de paso de luz).

3-Estabilidad de color:

El color obtenido es estable por lo menos durante 30 minutos luego de adicionar el NaOH.

4-Interferencias:

a)Interferencia del cloruro:
La gran mayoría de las técnicas publicadas para la determinación del nitrato sufren una marcada interferencia por el cloruro. La

técnica aquí presentada fué probada con diferentes concentraciones de cloruro adicionadas a la muestra. En la Tabla 2 se presentan los datos obtenidos para estándares de nitrato entre 25 y 600 ppm disueltos en solución salina fisiológica (concentración de Cl = 155 mmol/l). En este caso, comparativamente con las soluciones acuosas, se observó un ligero incremento de la absorbancia en la reacción. La concentración de Cl utilizada fué más de 16 veces mayor a la máxima de nitrato, por suerte que el cambio observado en el coeficiente de extinción promedio de 0.0036 Uabs/mmol/l equivale a un cambio de 2.32×10 (Exp -3) Uabs/mmol/l, cifra no muy importante si se compara con el coeficiente de extinción encontrado para NO₃. Sin embargo, se recomienda realizar la curva de calibración utilizando solución salina.

Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos para concentraciones de nitrato entre 25 y 600 ppm en NaCL 0.9%. Curva de calibración.

NO ₃		(*)	
ppm	mmol/l	Absorbancia	C.Extinción
25	0.403	0.032	0.0794
50	0.806	0.066	0.0818
75	1.209	0.106	0.0976
100	1.612	0.128	0.0794
150	2.419	0.218	0.0901
300	4.838	0.429	0.0886
600	9.467	0.862	0.0910
		x =	0.0854

(*) UAbs/mmol/l/cm

b) Interferencia del nitrito :

Análogamente a lo que sucede con otras técnicas fotométricas, cromatográficas y electroquímicas para la determinación de nitrato, este método presenta una fuerte interferencia por el nitrito. Dicha interferencia es directamente proporcional y lineal a la concentración de nitrito. La significancia de esta interferencia por NO₂ en muestras de plasma se discute más adelante.

La figura 5 presenta las absorbancias para concentraciones de NO₂ en solución salina, en el rango de 25 a 600 ppm (1.08 a 13.04 mmol/l). El coeficiente de extinción promedio obtenido para el nitrito es de 0.0244 +/- 0.0016 Uabs/mmol/l y es equivalente al 29.8% de aquel del nitrato. Por lo tanto, para corregir el efecto de la interferencia por el nitrito se debe encontrar la concentración de este en la muestra, por ejemplo mediante la reacción con Naftil-etilen-diamina (NEDA)(30), luego multiplicar esta concentración por el coeficiente de extinción para el nitrito en la técnica del ácido salicílico, para así obtener la absorbancia calculada debida a NO₂; a continuación se calcula la "absorbancia corregida" debida al nitrato "verdadero":

$$\text{Abs. corregida} = \text{Abs. obtenida} - 0.0244 [\text{NO}_2]$$

A partir de la absorbancia corregida y utilizando la curva de calibración (Figura 4) se obtiene la concentración de nitrato.

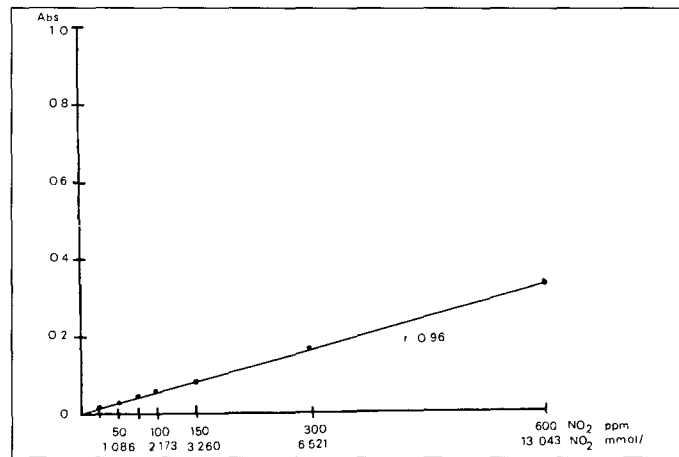


Figura 5. Lecturas de absorbancia a 410 nm obtenidas para estándares de nitrito de sodio disuelto en solución salina fisiológica (*). (Carl Zeiss Spekol 10; 8 nm ancho de banda). (*)Promedio de cinco determinaciones seriadas

5-Especificidad:

Con el fin de determinar la especificidad de la técnica se procesaron, de manera análoga a los estándares de nitrato, soluciones

acuosas de hidróxido de amonio, urea, anilina y asparagina en concentraciones de 5 y 10 mM. Los valores de absorbancia obtenidos se presentan en la Tabla 3. Estos datos muestran que la técnica presentada es marcadamente específica frente a diferentes tipos de compuestos nitrogenados. Adicionalmente, ninguno de los compuestos mencionados mostró interferencia alguna al ser adicionados para una concentración final de 10 mM a los estándares de nitrato y a muestras de plasma.

Tabla 3. Valores de absorbancia obtenidos para compuestos nitrogenados diferentes a NO₃ (410 nm)

Compuesto	Absorbancia
Hidróxido de amonio 5mM	0.006
Hidróxido de amonio 10mM	0.006
Anilina 5 mM	0.001
Anilina 10 mM	0.002
Asparagina 5 mM	0.003
Asparagina 10mM	0.003
Urea 5 mM	0.001
Urea 10 nM	0.006

6-Índice de recuperación:

Para evaluar el índice de recuperación, se adicionaron

cantidades conocidas de nitrato de sodio al plasma (con una concentración base de 28 ppm de NO₃), para obtener adiciones de 160, 180, 380 y 450 ppm. Las concentraciones observadas y los respectivos coeficientes de recuperación se presentan en la Tabla 4, para un

promedio de 97.11%.

7-Precisión :

En la Figura 6 se presenta el perfil

Tabla 4. Valores del coeficiente de recuperación para diversas cantidades de NO₃ adicionadas al plasma.

Cantidad adicionada ppm	Concentración encontrada ppm	Coeficiente de recuperación
0	28.0	n.d.
60	87.2	98.66%
180	189.9	89.94%
380	404.3	99.02%
450	481.7	100.82%
X =		97.11%

de precisión obtenido luego de 50 determinaciones seriadas de estándares de nitrato con concentraciones de 50, 300 y 600 ppm, obteniéndose un CV que varía desde 6.2% para concentraciones bajas de NO₃, hasta 1.4% para concentraciones altas (600 ppm), apreciándose un perfil análogo al de la mayoría de las técnicas analíticas.

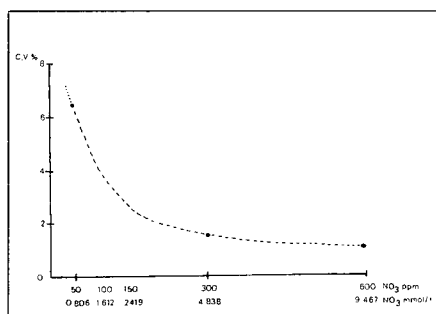


Figura 6. Perfil de precisión de la técnica para la determinación de nitratos por medio de la nitración del ácido salicílico (*).
 (*)Obtenido a partir de 50 determinaciones en cada rango de concentración

8-Comparación con otras técnicas fotométricas :

Debido a la poca reproducibilidad obtenida con las técnicas colorimétricas basadas en la reducción de NO₃ a NO₂, se realizó una comparación con la determinación UV directa (33). Para tal fin se analizaron estándares de NO₃ en el rango de concentración de 50 a 600 ppm a 210 nm, obteniéndose el espectro que aparece en la Figura 7. Para concentraciones en el rango 100-300 ppm los resultados de las dos técnicas fueron equivalentes (r=0.93); sin embargo, a

concentraciones mayores la linealidad de la determinación UV disminuye, en parte por Abs>2, obteniéndose una correlación pobre.

DISCUSION Y CONCLUSIONES:

La utilización de plasma en lugar de suero en el método aquí presentado se debe a la posible oxidación por los eritrocitos del nitrito presente, durante el tiempo que dura la coagulación y la retracción del coágulo. En este orden de ideas se aconseja la pronta separación del plasma por centrifugación. Si bien anticoagulantes como el citrato de sodio y la heparina nos permitieron obtener buenos resultados, la escogencia final de EDTA se basó en su uso rutinario en el laboratorio, gran estabilidad y bajo costo.

Las técnicas que se desarrollaron inicialmente para la determinación de nitratos y nitritos lo fueron para análisis de aguas o de extractos acuosos de material vegetal. El manejo de muestras con alto contenido de proteínas implica una deproteinización previa, debido, entre otros, al hecho de la formación de precipitados y turbidez a partir de las proteínas por el medio fuertemente ácido utilizado, lo cual impide las lecturas fotométricas. El ácido tricloroacético (TCA) como agente deproteinizante fué descartado porque lleva a pérdidas de nitrato, probablemente por nitración de las proteínas plasmáticas por su pH ácido. La precipitación etanólica es poco confiable y con frecuencia

lleva a la gelificación de la muestra. La escogencia final del cloruro mercúrico se debió a la rapidez del proceso, a la obtención de un sobrenadante libre de turbidez y a la conservación del nitrato, tal como se demuestra por el adecuado índice de recuperación obtenido utilizando este compuesto como desproteínizante (Tabla 4). En este sentido, el pH alcalino aportado por el carbonato de sodio hace poco probable la nitración de las proteínas plasmáticas.

Tanto la sensibilidad como la linealidad de la técnica presentada (0.1 mmol/l y 0.33-9.4 mmol/l) son superiores a las informadas para el método colorimétrico directo basado en la reacción con el ácido fenoldisulfónico (1 y 1-5 mmol/l, respectivamente)(27).

Otras técnicas colorimétricas (28,30,32) se basan en la estimación de la concentración de nitrato luego de reducirlo a nitrito, determinando este último por su reacción con NEDA; la reacción de reducción se cataliza por la adición de polvo de zinc o de cobre, o bien, haciendo circular la muestra por una columna de vidrio empacada con escamas de cadmio. Estas técnicas son dispendiosas, poco reproducibles (por cambios en la eficiencia del catalizador), demoradas y muy poco lineales debido al hecho que la conversión de nitrato a nitrito no es necesariamente estequiométrica. Se han hecho intentos para estandarizar las columnas de reducción de cadmio (45), pero a pesar de esto, las determinaciones no son muy reproducibles y, por experiencia personal con estas se puede afirmar que la regeneración de la columna entre muestra y muestra es poco confiable; adicionalmente, su sensibilidad no supera los 0.5 mmol/l de NO₃. A pesar de lo anterior, la

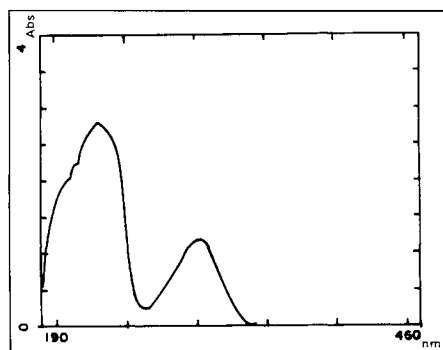


Figura 7: Espectro de absorción del nitrato de sodio disuelto en solución salina fisiológica. (hp diode array; 2 nm ancho de banda)

técnica de reducción en columna de cadmio ha sido utilizada recientemente en investigaciones sobre el óxido nítrico (18,19,21). La reducción de nitrato a nitrito con fines analíticos se ha realizado también por paso de la muestra durante 3 minutos por un serpentín de calentamiento, previa adición de sulfato de hidrazina y sulfato de cobre (5).

En todas estas técnicas con reducción previa se obtiene un dato que es la sumatoria del nitrito producido por reducción del nitrato más el nitrito presente previamente en la muestra; por lo tanto, el valor del nitrato "verdadero" se obtiene restando el valor obtenido en una alícuota sometida a reducción menos el nitrito determinado en otra alícuota de la muestra no sometida a dicho proceso. Este tipo de técnicas presenta un CV entre 0.91 y 6.83% y un coeficiente de recuperación entre 86% y 103% y, presentan de manera similar a la técnica del ácido difenildisulfónico una fuerte interferencia por el cloruro. Esto obliga a una remoción previa del cloruro, p.ej. por la adición de un exceso de iones de plata.

Con base en lo anterior, la técnica propuesta fundamentada en la nitración del ácido salicílico, muestra ventajas notorias sobre las técnicas colorimétricas previamente desarrolladas: rapidez, sencillez, sensibilidad, linealidad, escasa interferencia por el cloruro (lo cual, al menos en el caso del plasma, puede obviarse realizando la curva de calibración en solución salina), buena precisión, especificidad, bajo costo y, posibilidad de realizarse con colorímetros sencillos de filtros.

Vale la pena insistir en el hecho que todas las técnicas colorimétricas existentes para la determinación de nitrato incluyen como error el nitrito previamente presente, obligando a un cálculo por sustracción. La técnica presentada permite hacer una sustracción adecuada del nitrito presente, debido al conocimiento del coeficiente de extinción del compuesto formado a partir de este último. Sin embargo, debido al hecho que el nitrito posee un coeficiente de extinción de solo 28.5% de aquel del nitrato y, a que la proporción de la concentración de nitrato a nitrito esperado en el plasma normal o en casos de intoxicación es de 50:1 a 500:1 (46) la no sustracción de la absorbancia debida al nitrito llevaría, en casos de diagnóstico toxicológico a un error por exceso desde una parte en 175.4 partes hasta de una en 1754.3, lo cual no es muy apreciable.

La determinación del nitrato por medio de espectrofotometría ultravioleta a 210 y 300 nm (33), posee una alta sensibilidad y una buena linealidad en concentraciones bajas, pero requiere de una instrumentación más compleja y costosa y, además, está sujeta a

múltiples interferencias tales como aquellas del nitrito (el cual posee un coeficiente de extinción a 210 nm equivalente al 55% de aquel del nitrato) y del hierro; muestra un CV de 6-10% y requiere de varias correcciones.

En el caso de la utilización de electrodos ión-selectivos para evaluación potenciométrica del nitrato es necesario hacer una estimación indirecta luego de la adición a la muestra de una cantidad conocida de NaNO_3 ; la sensibilidad es similar a la de las técnicas colorimétricas pero el electrodo está sujeto a la interferencia de por lo menos 18 aniones diferentes (35,37).

La cuantificación del NO_3 por medio de cromatografía HPLC usando columnas de intercambio iónico y detector electroquímico o conductimétrico tiene una muy buena sensibilidad (aprox. 0.1 mmol/l) y linealidad, pero existen dificultades para resolver los picos de NO_3 y NO_2 , sufre interferencia fuerte por el cloruro y requiere de una instrumentación compleja y costosa (35,36). Además, dado el tiempo gastado en la separación en la columna y en la regeneración de la misma, el tiempo de análisis es relativamente prolongado y se dificulta por lo tanto el procesamiento de una serie grande de muestras.

Por último, la linealidad de la técnica aquí presentada es buena y posee un amplio rango, no requiriendo durante su calibración de correcciones más allá de la regresión lineal simple (47) y, dados su CV y perfil de precisión, llena los requisitos necesarios para tener utilidad en procesos de diagnóstico (48) y en investigación.

REFERENCIAS

1. Guzmán V.H., Morales G., Ochoa R. : Intoxicación en bovinos por nitratos acumulados en pasto elefante (*Pennisetum purpureum*). *Rev.ICA* 1978; 13:113-118.
2. Trheebilcoock E., Montañó J., León J., Villafañe F. : Síndrome "caída del ganado".

Consideraciones experimentales con base en plantas acumuladoras de nitratos. *Rev. ICA* 1981; 16:151-160.

3. **González M.** : Intoxicación en bovinos por nitrito y nitratos acumulados en pasto pará (*Brachiaria mutica*). *Rev. ICA* 1981; 16:189-192.
4. **Asbury A.C., Rhode E.A.** : Nitrite intoxication in cattle. The effects of lethal doses of nitrite on blood pressure. *Am.J.Vet.Res.* 1964; 25:1010-1013.
5. **Vertregt N.** : The formation of methemoglobin by the action of nitrite in bovine blood. *Neth.J.Agric.Sci.* 1977; 25:243-254.
6. **Correa P., Cuello C.** : Estudio de la etiología del cáncer gástrico. I:Epidemiología de cáncer y lesiones precancerosas. *Acta Med.Valle* 1978; 9:1-9.
7. **Cuello C., Correa P.** : Estudio de la etiología del cáncer gástrico. II:Epidemiología analítica de lesiones precancerosas: estudios ambientales. Hipótesis etiológica. *Acta Med.Valle* 1978; 9:10-14.
8. **Tannenbauen S.R., Morán D., Rand W., Cuello C., Correa P.** : Gastric cancer in Colombia.IV.Nitrite and other ions in gastric contents of residents from a high-risk region. *J.Natl.Cancer Inst.* 1979; 62:9-12.
9. **Frazer P., Chilvers C., Bereal V., Hill M.J.** : Nitrate and human cancer : a review of the evidence. *Int.J.Epidemiol* 1980; 9:3-11.
10. **Correa P.** : Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res.* 1992; 52:6735-6740.
11. **Rudell W.S.J., Bone E.S., Hill M.J., Blendis L.M., Walters C.L.** : Gastric-juice nitrite. A risk factor for cancer in the hypochlorhydric stomach. *Lancet* 1976; 2:1037-1039.
12. **Mirvish S.S.** : Kinetics of nitrosamide formation from alkylureas, N-alkylurethans and alkylguanides: possible implications for the etiology of human gastric cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 1971; 46:1183-1193.
13. **Ruddell W.S.J., Walters C.L.** : Nitrite and N-nitroso compounds in gastric juice. *Lancet* 1980; 1:1187.
14. **Monters G., Cuello C., Gordillo G., Pelon W., Johnson W., Correa P.** : Mutagenic activity of gastric juice. *Cancer Lett.* 1979; 7:307-312.
15. **Bulay O., Mirvish S.S., García H., Pelfrene A.F., Gold B., Eagen.** : Carcinogenicity test of six nitrosamides and a nitrosocyanamide administered orally to rats. *J.Natl.Cancer Inst.* 1979; 62:1523-1528.
16. **Snyder S.H., Bredt D.S.** : Funciones biológicas del óxido nítrico. *Invest.Ciencia* 1992; 12:12-20.
17. Editorial. NO molecule of the year. *Science* 1992; 258:1862-1863.
18. **Ding A.H., Nathan C.F., Stuerhr D.J.** : Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages : comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J.Immunol* 1988; 141:2407-2412.
19. **Ibourn R.G., Belloni P.** : Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon-gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1 or endotoxin. *J.Natl.Cancer Inst.* 1990; 82:772-776.
20. **Keller R., Keist R., Erb P., Aebischer T., De Libero G., Balzer M., Grouscurth P., Keller H.V.** : Expression of cellular effector functions and production of reactive nitrogen intermediates: a comparative study including T-Lymphocytes, T-like cells, neutrophil granulocytes and mononuclear phagocytes. *Cell.Immunol.* 1990; 131:398-403.
21. **Rockett K.A., Awburn M.M., Aggarwal B.B., Cowden W.B., Clark I.A.** : In vivo induction of nitrite and nitrate by Tumor Necrosis Factor, lymphotoxin and interleukin-1 : possible roles in malaria. *Infect.Immun.* 1992; 60:3725-3730.
22. **Garthwaite J.** : Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 1991; 14:60-67.
23. **Lipton S.A., Singel D.J., Stamler J.S.** : Nitric oxide in the central nervous system. *Prog.Brain Res.* 1994; 103:359-364.
24. **Amezaca J.L., Palmer R.M.J., de Souza B.M., Moncada S.** : Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *B.J.Pharmacol.* 1989; 97:1119-1124.
25. **Ito S., Carretero O.A. Abe K.** : Nitric oxide in the regulation of blood flow. *New Hor.* 1995; 3:615-623.
26. Editorial : Hemoglobin reveals new role as blood pressure regulator. *Science* 1996; 271:1670.
27. **Johnson C.M., Ubich A.** : Determination of nitrate in plant material. *Anal.Chem.* 1950; 22:1526-1529.
28. **Diven R.H., Pistor W.J., Reed R.E., Trautman R.J., Watts R.E.** : The determination of serum or plasma nitrate and nitrite. *Am.J.Vet.Res.* 1962; 23:497-499.
29. **Housholder G.T., Dollahite J.W., Hulse R.** : Diphenylamine for the diagnosis of nitrate intoxication. *J.A.V.M.A.* 1966; 148:662-665.
30. **Schneider N.R., Yeary R.A.** : Measurement of nitrite and nitrate in blood. *Am.J.Vet.Res.* 1973; 34:133-135.
31. **Cataldo D.A., Harron M., Schraeder L.E., Youngs V.L.** : Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun.Soil Sci.Plant.Analys.* 1975; 6:71-80.
32. **Nrisinha P.S., Donaldson B.** : Improved colorimetric method for determining nitrate and nitrite in foods. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.* 1978; 61:1389.
33. **Cawse P.A.** : The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* 1967; 92:311-315.
34. **Kaspar H.F.** : Response of electron-capture detector to hydrogen, oxygen, nitrogen, carbon dioxide, nitric oxide and nitrous oxide. *J.Chromatogr.* 1980; 193:142-147.
35. **Thayer J.R., Huffaker R.C.** : Determination of nitrate and nitrite by high-pressure liquid chromatography: comparison with other methods for nitrate determination. *Anal.Biochem.* 1980; 102:110-119.
36. **Buermans H.J.** : Diagnosis of nitrate toxicosis in cattle using biological fluids and a rapid ion chromatographic method. *Am.J.Vet.Res.* 1990; 51:491-495.
37. **Carlson M.P., Schneider N.R.** : Determination of nitrate in forages by using selective ion electrode : collaborative study. *J.Assoc.-Off.Anal.Chem.* 1986; 69:196-198.
38. **Rojas M., Palomino F., Osuna O.** : Nuevo enfoque en el tratamiento de la nitrito-toxicosis con base en sales ferrosas. *Rev.ACOVEZ* 1990; 14:56-58.
39. **Gómez J.C., Rojas M., Luque G., Palomino F., Beltrán M.** : Suplementación de sulfato ferroso en la dieta como método profiláctico para la nitrito-nitrito toxicosis en bovinos. *Rev.ACOVEZ* 1994; 19:31-35.
40. **Hirtz J.** : Les méthodes analytiques dans les recherches sur le métabolisme des médicaments. Masson et Cie., Paris, 1968.
41. **Vallejo M.C.** : Toxicología Analítica, Pasto, 1984.
42. **Parik V.M.** : Absorption spectroscopy of organic molecules. Addison-Welsey Publ.Co., Reading MS, 1974.
43. **Rao C.N.R.** : Espectroscopía ultravioleta y visible. Alhambra De., Madrid, 1970.
44. **Reutov O.** : Theoretical principles of organic chemistry. MIR De., Moscú, 1967.
45. **Davison W., Woof C.** : Comparison of different forms of cadmium as reducing agents for the batch determination of nitrate. *Analyst* 1978; 162:403-408.
46. **Schneider N.R.** : Nitrite and nitrate pharmacokinetics in the dog, sheep and pony. *Am.J.Vet.Res.* 1975; 36:941-947.
47. **Tholen D.W.** : Alternative statistical techniques to evaluate linearity. *Arch.Pathol.Laborat.Med.* 1992; 116:746-756.
48. **Ehrmeyer S.S., Laessig R.H.** : The relationship of intralaboratory bias and imprecision on laboratories ability to meet medical usefulness limits. *Am.J.Clin.Pathol.* 1988; 89:14-18.