

Evaluación de metodologías para el análisis de productos tóxicos de la degradación de fungicidas ditiocarbamatos

Resumen

Se evaluaron cuatro metodologías para la determinación de etilentiourea y propilentiourea en frutas y hortalizas; se seleccionó y optimizó un método de extracción usando una mezcla metanol:agua (3:1) y posterior limpieza con partición líquido-líquido soportada sobre extrelut. La determinación y cuantificación se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia con detección de arreglo de diodos. La metodología validada es específica y selectiva, con porcentajes de recuperación entre 77,82% y 83,57%, coeficientes de variación menores al 20% y límites de detección entre 0,003 y 0,006 mg·kg⁻¹. Los parámetros estadísticos de linealidad mostraron resultados adecuados en los rangos de concentración evaluados. La metodología es robusta para las variables evaluadas y no se observó efecto matriz. Se encontraron trazas de etilentiourea y propilentiourea en una muestra de tomate y una muestra de papa, respectivamente.

Palabras clave: etilentiourea, propilentiourea, validación, HPLC, frutas y hortalizas.

Evaluation of methodologies for the analysis of toxic degradation products of dithiocarbamates fungicides

Abstract

Four methodologies were evaluated for the determination of ethylenethiourea and propylenethiourea in fruits and vegetables. An extraction method using a mixture of methanol:water (3:1) and subsequent clean up with liquid-liquid partition supported on extrelut was selected and optimized. Identification and quantification was carried out using high-efficiency liquid chromatography with diode array detection. The validated methodology is specific and selective, with recoveries between 77.82% and 83.57% with coefficients of variation below 20% and detection limits between 0.003 and 0.006 mg·kg⁻¹. Linearity parameters showed adequate results in the concentration range. The method is robust for the evaluated factors and matrix effect was not observed to any analyte in the whole concentration range tested. It was found traces of ethylenethiourea in one sample of tomato and propylenethiourea in one sample of potato.

Keywords: Ethylenethiourea, propylenethiourea, validation, HPLC, fruits and vegetables.

Avaliação de metodologias para a análise dos produtos de degradação tóxicos dos ditiocarbamatos fungicidas

Resumo

Quatro metodologias para a determinação de Etilenotioureia e propilenotioureia foram avaliadas em frutas e legumes, foi selecionado e otimizado um método de extração utilizando um metanol:água (3:1) e limpeza posterior com partição líquido-líquido suportado em Extrelut. A identificação e quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de diodos. A abordagem validado é específica e seletiva, com recuperações entre 77,82% e 83,57%, coeficiente de variação inferior a 20% e limites de detecção entre 0,003 e 0,006 mg·kg⁻¹. Os parâmetros de resultados estatísticos mostraram linearidade adequada nas faixas de concentração testados. O método é robusta para a matriz de variáveis avaliadas e nenhum efeito foi observado na resposta dos analitos. Encontrado vestígios de etileno tioureia e propylenethiourea numa amostra de tomate e batata amostra, respectivamente.

Palavras-chave: ethylenethiourea, propylenethiourea, validação, HPLC, frutas e legumes.

Introducción

LOS PLAGUICIDAS DITIOCARBAMATOS son ampliamente usados en la agricultura debido a sus propiedades como fungicidas de amplio espectro. El mancozeb y el propineb forman parte de esta familia química y son los fungicidas más vendidos en Colombia ya que se aplican en gran variedad de cultivos. Recientemente se ha incrementado su uso en cultivos de frutas tropicales de exportación tales como la uchuva, banano y frutas de la pasión. La etilentiourea (ETU) y la propilentiourea (PTU) son los principales productos de degradación de mancozeb y propineb, respectivamente; éstos revisten particular importancia debido a que son moléculas estables en agua, se absorben y se metabolizan fácilmente en las plantas, tienen elevada movilidad debido a su alta solubilidad y bajos coeficientes de adsorción y han sido reportados como cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos (1, 2). Se han reportado variedad de métodos analíticos para la determinación de ETU y PTU por cromatografía de gases, sin embargo son metodologías que involucran una derivatización pre-columna para convertirlos en compuestos volátiles, implicando altos consumos de tiempo, reactivos y solventes (3).

El análisis de ETU y PTU es más apropiado realizarlo mediante cromatografía líquida debido a su elevada polaridad y gran solubilidad en agua, razón por la cual se encuentran un mayor número de publicaciones que usan esta técnica para su separación y detección. Sin embargo, presenta ciertos inconvenientes, ya que por su alta polaridad no se retienen en un sistema de cromatografía en fase reversa o se quedan retenidos por largos tiempos en un sistema cromatográfico en fase normal. La extracción en matrices complejas, como son las frutas y hortalizas, implica el uso de solventes polares, los cuales extraen una gran cantidad de interferentes, siendo necesario involucrar estratégicamente etapas de limpieza que retiren dichas interferencias sin dar lugar a pérdidas de los analitos de interés.

En la última década se han publicado diferentes estudios para la determinación de estos compuestos en varias matrices, para lo cual se han empleado técnicas como la extracción con mezclas de solventes clorados (4), extracción con metodología QuEChERS (5), dispersión de matriz en fase sólida (6, 7) y extracción con solventes polares, como agua y mezclas de agua:metanol (8), utilizando variados métodos para la detección, como ultravioleta, arreglo de diodos, detección electroquímica o detector selectivo de masas.

En nuestro país no se han desarrollado metodologías para determinar ETU y PTU en frutas y hortalizas ni existe legislación respecto a su residualidad, así como no se tienen estudios sobre su impacto en la salud de los consumidores y en el medio ambiente. Es por esto que es necesario desarrollar metodologías rápidas y confiables que sirvan de base para posteriores estudios que permitan garantizar la inocuidad de los alimentos. El objetivo de este estudio fue seleccionar, optimizar y validar una metodología para el análisis de ETU y PTU en frutas y hortalizas bajo los criterios del documento SANCO (9) y aplicar dicha metodología para determinar residuos de éstos compuestos en algunas muestras del mercado local.

Materiales y métodos

Materiales de referencia, reactivos y solventes

Los estándares de ETU y PTU empleados en este trabajo fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer con pureza mayor al 98%. Las soluciones madre fueron preparadas en acetonitrilo (ACN) y fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Diluciones de $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ETU y $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PTU

fueron preparadas en ACN y a partir de ellas se prepararon a diario los estándares de calibración para la inyección en HPLC utilizando agua como disolvente.

Todos los solventes utilizados en este estudio fueron marca J.T. Baker grado residuos y grado HPLC. Previo a su uso en HPLC fueron filtrados a través de una membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Para el método QuEChERS se utilizaron cloruro de sodio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, citrato tribásico de sodio, citrato di básico de sodio sesquihidratado, hidróxido de sodio y cloruro de amonio marca J.T. Baker. Para la limpieza con el método QuEChERS se utilizó PSA marca Varian. En los ensayos de dispersión de matriz en fase sólida se utilizaron adsorbentes C18 y carbón grafitizado marca Agilent Technologies y carbón activado proporcionado por el grupo de investigación de carbones del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. La limpieza en el método de extracción con solventes polares se realizó utilizando Extrelut bulk marca Merck.

Instrumentos y equipos

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) con bomba cuaternaria G1310A, detector de arreglo de diodos G1365B, compartimento termostado para columna G1316A y sistema de desgasificación G1379A de la serie 1100 acoplado a un sistema de inyección automática G1329A de la serie 1200. Para la homogeneización de las matrices de ensayo se contó con un homogeneizador Stephan Blender 2010 y una licuadora Waring. El pesaje de las muestras se llevó a cabo en una balanza de platillo externo Mettler Toledo y los estándares de referencia se pesaron en una balanza analítica Scaltec SAC22.

Condiciones cromatográficas

La separación se realizó en una columna analítica LiChrosphere RP-18, $250\text{ x }4\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de partícula con guarda columna C18, utilizando una fase móvil compuesta de agua:ACN (98:2) en modo isocrático a $1,2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La temperatura de la columna fue de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el volumen de inyección $100\text{ }\mu\text{L}$. La detección se llevó a cabo a 232 nm .

Preparación y homogeneización de las matrices de ensayo

Para la validación de la metodología se utilizaron muestras de uchuva (*Physalis peruviana*), granadilla (*Passiflora ligularis*), pitaya (*Hylocereus triangularis*), banano bocadillo (*Musa acuminata*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) exentas de plaguicidas, obtenidas en supermercados de cadena y certificadas como orgánicas. Un kilogramo de cada matriz se homogeneizó en el Stephan blender durante 3 minutos. Luego, se homogeneizaron porciones de 400 g en la licuadora Waring durante 2 minutos. La totalidad de la muestra de cada matriz fue mezclada y almacenada en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Selección de la metodología de extracción

Se ensayaron cuatro métodos de extracción nombrados como M1, M2, M3 y M4, para lo cual se utilizó matriz blanco de uchuva. Cada lote de ensayos estaba compuesto por tres blancos de matriz y tres blancos fortificados con la mezcla de ETU y PTU a $0,05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $0,10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,

respectivamente. En todos los ensayos, la fortificación se llevó a cabo sobre la muestra homogeneizada a temperatura ambiente, se mezcló utilizando agitador vortex y se dejó en reposo por una hora.

M1: extracción con solventes de baja polaridad

1 g de matriz se sometió a tres extracciones sucesivas con 3 mL de mezcla ACN:CH₂Cl₂:CHCl₃ (1:1:1). El extracto se combinó y se concentró en un evaporador rotatorio hasta 0,5 mL, se llevó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno y finalmente se reconstituyó con 0,5 mL de agua y se inyectó en el sistema cromatográfico (4).

M2: dispersión de matriz en fase sólida

1g de matriz se mezcló en un mortero con 1,5 g de Na₂SO₄ y 0,5 g de cada adsorbente: carbón activado (M2CA), carbón grafitizado (M2CG) y C18 (M2C18), durante 5 minutos. La mezcla se transfirió cuantitativamente a una columna que contenía en su parte inferior 1 g de alúmina. Posteriormente se adicionaron 2 mL de ACN y se dejó el sistema en extracción estática 5 minutos, al cabo de los cuales los analitos se eluyeron con 4 mL de ACN. El extracto se llevó a sequedad, se reconstituyó en 2 mL de agua y se inyectó en HPLC (6).

M3: extracción con metodología QuEChERS

A 10 g de matriz se le adicionaron 10 mL de ACN y la mezcla se agitó fuertemente durante 1 minuto. Posteriormente se adicionaron 4 g de sulfato de magnesio anhidro, 1g de cloruro de sodio, 1 g de citrato trisódico y 0,5 g de citrato disódico. Se sometió la mezcla a agitación vigorosa durante un minuto, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. Se tomaron 2 mL del extracto en un tubo que contenía una mezcla de 50 mg de PSA y 150 mg de MgSO₄. La mezcla se agitó en vortex durante 2 minutos y luego se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos. 1 mL del sobrenadante se llevó a sequedad, se reconstituyó con 1 mL de agua y se inyectó en HPLC (5).

M4: extracción con metanol: agua – limpieza con partición

A 10 g de matriz se le adicionaron 20 mL de una mezcla metanol:agua (3:1) y se agitó fuertemente durante 2 minutos. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. Luego, 2 mL del sobrenadante se concentraron a 0,5 mL y se llevaron a 1 mL con agua. La totalidad del extracto (1mL) se adicionó sobre una columna (5 mm d.i.) formada por 0,5 g de extrelut sobre 0,5 g de sulfato de sodio anhidro, donde permaneció en equilibrio durante 20 minutos, al cabo de los cuales se realizó la elución con 20 mL de diclorometano. El extracto se llevó a sequedad, se reconstituyó en 1 mL de agua y se inyectó en HPLC (8).

Resultados y discusión

Se evaluaron cuatro metodologías con el fin de seleccionar una de ellas para la determinación de ETU y PTU en frutas y hortalizas. Como criterio de selección se tuvo en cuenta, en primer lugar, el porcentaje de recuperación, ya que era necesario que la metodología pudiera ejecutarse sin dar lugar a pérdidas de los analitos durante la extracción y limpieza; el rango establecido por el documento SANCO indica que el porcentaje de recuperación debe encontrarse entre el 70 y el 120% (9). Así mismo, la metodología seleccionada debería tener bajos límites de detección y cuantificación y la posibilidad de ejecutarse como método de rutina en laboratorios de control de inocuidad.

Los experimentos de dispersión de matriz en fase sólida utilizando sorbentes carbonáceos (M2CA y M2GC) no dieron resultados adecuados, pues los compuestos se quedaron retenidos completamente sobre la superficie del adsorbente. En el caso del carbón grafitizado, la baja fuerza de elución del ACN no logró eluir los compuestos y, en el caso del carbón activado, los procesos de fisiadsorción y quimiadsorción en

la superficie de elevada área, altamente porosa y químicamente activa, retuvieron los analitos irreversiblemente (10).

Los ensayos de dispersión de matriz en fase sólida mostraron mejores resultados de recuperación utilizando C18 como fase adsorbente, M2C18, pues la ETU se recuperó en un 76,3% y la PTU en un 45,0%, sin embargo, los cromatogramas mostraron la presencia de interferencias en tiempos de retención cercanos al de los analitos. Así mismo, la pequeña cantidad de muestra limita la capacidad del método para obtener límites de detección y cuantificación adecuados y, además, no es apropiada debido a la poca representatividad de la porción analítica.

Con la metodología QuEChERS (M3) se observó que los extractos presentaban demasiadas interferencias que no permitieron distinguir los analitos en el detector DAD. Esto ocurre debido a que el adsorbente PSA no es capaz de retirar las sustancias coextraídas eficientemente y a la poca selectividad en la detección, pues la metodología QuEChERS se usa generalmente en sistemas acoplados a detector selectivo de masas (5).

Usando la metodología de extracción con solventes de baja polaridad (M1) se obtuvieron bajos límites de detección y cuantificación y porcentajes de recuperación dentro de los rangos esperados, como se muestra en la Tabla 1. Sin embargo, la representatividad de la porción analítica es una desventaja para su ejecución como método de rutina, pues un gramo no es representativo de la muestra de laboratorio.

En la Tabla 1 se observa que la metodología con la que se obtuvieron los mejores porcentajes de recuperación y los límites de detección y cuantificación más bajos es la extracción con solventes polares, M4; además es la más adecuada para la ejecución como metodología de rutina debido a la representatividad de la muestra, la cual es 10 gramos (11). Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Kontou *et al.* (8) en cuanto a la recuperación y sensibilidad de la ETU, pues en este artículo no se reportan porcentajes de recuperación ni límites críticos para la PTU. A pesar de que las cantidades de muestra, reactivos y solventes empleados son 10 veces superiores a las utilizadas en el presente estudio, los resultados son similares, pues en este estudio se obtuvo un 80,8% de recuperación para la ETU con un valor de RSD de 5,16% en comparación con un 79,3% de recuperación obtenido por Kontou *et al.* (8) con un RSD de 6,9%.

Los cromatogramas muestran extractos limpios sin interferencias ni ruido causado por la matriz, lo cual indica que gran parte de las sustancias coextraídas son retiradas en la etapa de limpieza, permitiendo así que se incremente la relación S/N, lo que permitió obtener límites de detección inferiores a 0,01 mg·kg⁻¹.

Optimización de la metodología

Con el objetivo de eliminar interferencias y hacer la metodología más selectiva se optimizó la etapa de limpieza. Se consideraron tres parámetros, pH, adición de sal y volumen de diclorometano necesario para eluir los analitos. Se realizaron ensayos consecutivos completamente al azar y se aplicó un análisis de varianza para determinar la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos de datos. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey para determinar las mejores condiciones.

Tabla 1. Exactitud y límites críticos para las metodologías M1 y M4.

Metodología	%Rec (n=3)		LD (mg·kg ⁻¹)		LC (mg·kg ⁻¹)	
	ETU	PTU	ETU	PTU	ETU	PTU
M1	74,6	75,8	0,030	0,060	0,100	0,200
M4	80,8	66,6	0,003	0,006	0,010	0,020

LD: Límite de detección; LC: Límite de cuantificación.

Debido a que el proceso de limpieza implica una partición líquido-líquido soportada en extrelut, la forma en la que se encuentren los analitos en solución es de gran importancia. ETU y PTU son moléculas que presentan tautomería tiona-tiol, por lo que las especies presentes en solución se ven afectadas por el pH, así que se evaluó la recuperación ajustando el pH a 4 y 9 usando solución de cloruro de amonio 1 N e hidróxido de sodio 1 N, respectivamente. Se observó que el ajuste de pH no tiene efecto significativo en la recuperación de la ETU ($p < 0,05$), lo cual concuerda con lo reportado por Kontou *et al* (8); sin embargo hay significancia en la recuperación de la PTU, encontrándose un valor mayor a pH levemente básico ($p < 0,05$).

Con el fin de modificar la capacidad de las moléculas de ETU y PTU para migrar de la fase acuosa al diclorometano, se evaluó el efecto de la adición de sal, adicionando 0,01, 0,05 y 0,10 g de NaCl antes de la partición. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la recuperación para ningún analito al adicionar la sal.

Con el objetivo de minimizar la cantidad de diclorometano utilizado en la etapa de partición, se determinó el volumen mínimo necesario para eluir los analitos de la columna de extrelut. El experimento se realizó recogiendo las fracciones entre 0-5 mL, 5-7 mL y 7-10 mL, obteniendo como resultado bajas recuperaciones en las primeras fracciones como se observa en la Figura 1, y un aumento significativo ($p < 0,05$) cuando se completan los 10 mL de solvente, siendo mayor el porcentaje de recuperación utilizando 10 mL de diclorometano, el cual es estadísticamente igual ($p < 0,05$) al obtenido utilizando 20 mL, que era el volumen utilizado inicialmente.

Una vez optimizada la etapa de limpieza se evaluó el efecto de la composición del solvente en la etapa de extracción, utilizando agua, mezcla metanol:agua 2:1 y metanol:agua 3:1. Se observaron disminuciones significativas en los porcentajes de recuperación de los dos analitos ($p < 0,05$) al disminuir el contenido de metanol en la mezcla de extracción. La extracción con metanol:agua (3:1) presentó los mejores resultados.

Evaluación de la metodología con diferentes matrices

Una vez obtenidas las mejores condiciones de extracción y limpieza, se realizó la evaluación de la recuperación fortificando uchuva, granadilla,

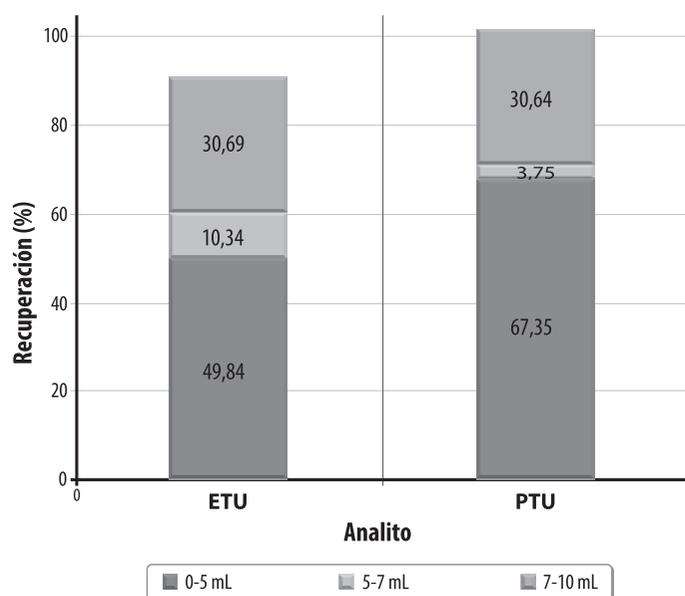


Figura 1. Volumen de diclorometano necesario para realizar la elución de los analitos.

pitaya, banana bocadillo y tomate a 0,05 mg·kg⁻¹ por triplicado cada una. No hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en los porcentajes de recuperación para ninguno de los dos analitos en las diferentes matrices. Los porcentajes de recuperación estuvieron entre el 70,83 y 89,87% para ETU y PTU respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Validación de la metodología

La validación de la metodología se llevó a cabo mediante la extracción de 10 g de matriz congelada con 20 mL de metanol:agua (3:1) utilizando agitación manual fuerte durante 2 minutos y una limpieza posterior con extracción líquido-líquido soportada sobre extrelut, en la cual se tomaron 2 mL del extracto crudo, se ajustó el pH a 9 y se concentraron a 1 mL evaporando el metanol; el extracto se depositó en una columna que contenía 0,5 g de extrelut sobre 0,5 g de sulfato de sodio, se dejó en reposo durante 20 minutos al cabo de los cuales se eluyeron los analitos con 10 mL de diclorometano los cuales posteriormente se llevaron a sequedad. Finalmente el extracto se reconstituyó en 1 mL de agua.

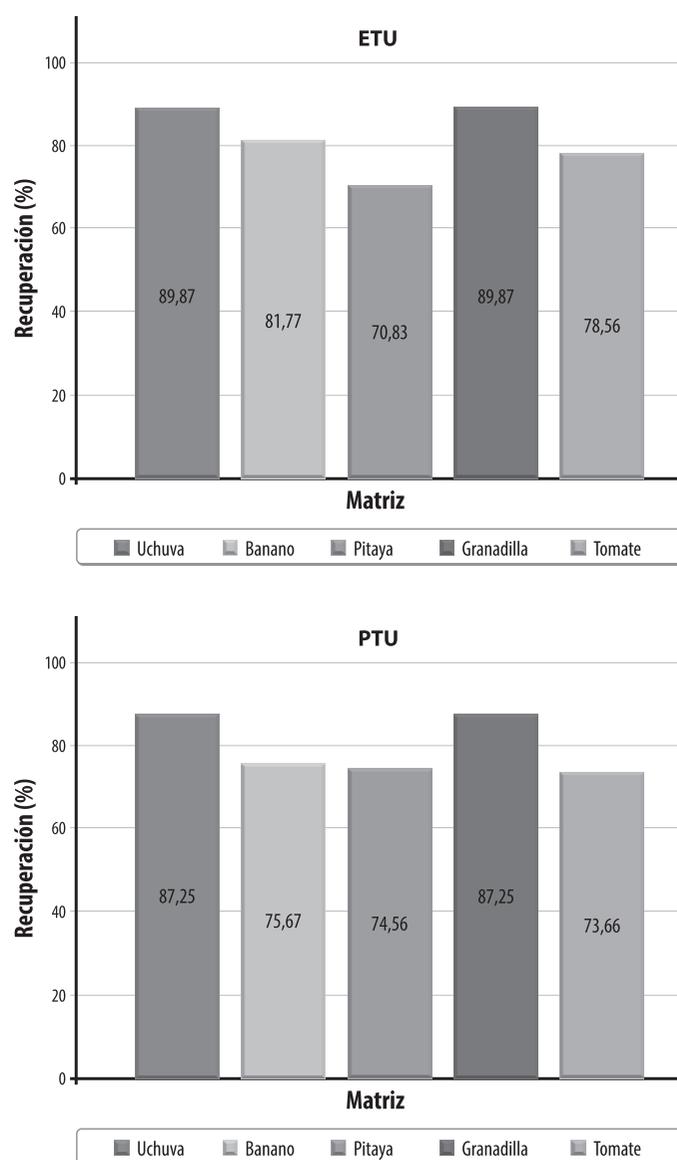
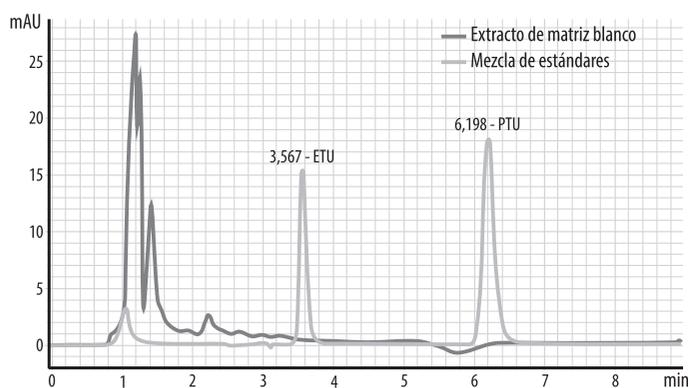


Figura 2. Evaluación de la recuperación de ETU y PTU en diferentes matrices.

Tabla 2. Precisión y exactitud de la metodología.

Nivel	ETU			PTU		
	% Recuperación promedio (n=7)	%CV Repetibilidad (n=3)	%CV Precisión intermedia (n=4)	% Recuperación promedio (n=7)	%CV Repetibilidad (n=3)	%CV Precisión intermedia (n=4)
N1	79,04	4,55	7,64	83,97	19,40	9,08
N3	72,68	9,58	2,12	80,21	9,85	5,63
N5	81,75	5,16	5,14	86,52	6,02	3,16

% CV: Coeficiente de variación. N1: ETU: 0,010 mg kg⁻¹. PTU: 0,020 mg kg⁻¹. N3: ETU: 0,050 mg kg⁻¹. PTU: 0,100 mg kg⁻¹. N5: ETU: 0,250 mg kg⁻¹. PTU: 0,500 mg kg⁻¹.

**Figura 3.** Especificidad/selectividad de la metodología: cromatograma obtenido para blanco de matriz de uchuva y mezcla de analitos.

Se evaluó la especificidad y selectividad de la metodología mediante la comparación de la señal obtenida con blancos de matriz y con la mezcla de los analitos en solvente. No se observaron señales interferentes en el tiempo de retención de los analitos y la resolución entre los compuestos fue mayor a 1,5 como se muestra en la Figura 3.

La precisión y exactitud se evaluaron a tres niveles de concentración, un nivel mínimo, equivalente al límite de cuantificación, uno intermedio y uno máximo en el rango de la curva de calibración. La precisión como repetibilidad se evaluó en periodos cortos de tiempo y como precisión intermedia se efectuaron experimentos en días diferentes. En la Tabla 2 se observan los resultados de precisión, como repetibilidad y como precisión intermedia, y la exactitud como porcentaje de recuperación para cada nivel. Los experimentos se realizaron mediante 4 réplicas. Se determinó homogeneidad de varianzas lo cual permitió calcular el porcentaje de recuperación global de 77,82% con un CV de 7,38% para ETU y de 83,57% con un CV de 10,25% para PTU, valores que cumplen con los requerimientos del documento SANCO.

Se evaluó el efecto matriz mediante el porcentaje de la señal en extracto de matriz y la señal en solvente para los dos compuestos y a lo largo de la curva de calibración (12). No se presentó efecto matriz por lo cual se evaluó la linealidad inyectando estándares en solvente.

La linealidad se realizó a cinco niveles de calibración y se inyectó por triplicado cada nivel. Por medio de un ANAVA y una prueba *t* student a un nivel de significancia del 5%, se evaluó la regresión lineal, el desvío de la linealidad, intercepto, pendiente y correlación. Se determinó que para los dos analitos, la pendiente es significativamente diferente de cero y que el intercepto es estadísticamente igual a cero. Que existe correlación y regresión entre la respuesta y la concentración y se comprobó que no existe desvío de la linealidad en el rango de concentración evaluado. La Tabla 3 muestra el rango de la curva de calibración.

Los límites de detección y cuantificación se evaluaron mediante la relación señal/ruido de cada analito en todas las matrices de acuerdo a la metodología de la EPA (13). Además se tuvo en cuenta el porcentaje de recuperación de cada compuesto. En la Tabla 4 se muestran los límites

críticos, así como la exactitud y precisión para el límite de cuantificación, verificando que éstos se encuentran en los rangos esperados (9).

Por último se evaluó la robustez de la metodología mediante el diseño de Youden-Steiner encontrando que no hay cambios significativos en los porcentajes de recuperación al modificar las variables seleccionadas, las cuales se muestran en la Tabla 5.

Análisis de muestras

Se analizaron cinco muestras de papa y cinco muestras de tomate obtenidas en el mercado local; una de las muestras de papa se obtuvo del cultivo directamente.

Ninguna muestra de papa presentó residuos de ETU pero se encontró PTU en la muestra que se obtuvo del cultivo directamente, es decir, en el primer eslabón de la cadena productiva. La concentración encontrada fue a nivel de trazas, esto es, por debajo del límite de cuantificación pero superior al límite de detección. En este caso en particular, el agricultor informó que se realizó la aplicación de Fitoraz®, 20 días antes de la cosecha, producto que contiene propineb al 70%. En tomate no se encontraron residuos de PTU en ninguna de las muestras analizadas, pero se determinó la presencia de ETU, a nivel de trazas, en una

Tabla 3. Concentraciones de los niveles de la curva de calibración.

Analito	ETU		PTU	
	(µg·mL ⁻¹)	(mg·kg ⁻¹)	(µg·mL ⁻¹)	(mg·kg ⁻¹)
1	6,67	0,010	13,33	0,020
2	13,33	0,020	26,67	0,040
3	33,33	0,050	66,67	0,100
4	66,67	0,100	133,33	0,200
5	166,67	0,250	333,33	0,500

Tabla 4. Límites críticos de la metodología y recuperación al límite de cuantificación.

	% de recuperación ETU (n=3) (LD: 0,003 mg/kg; LC: 0,010 mg/kg)	% de recuperación PTU (n=3) (LD: 0,006 mg/kg; LC: 0,020 mg/kg)
R1	77,94	82,30
R2	76,47	93,65
R3	70,59	88,10
Promedio	75,00	88,02
CV	5,19	6,45

LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación.

Tabla 5. Parámetros de evaluación en la robustez del método.

Variable	Valor nominal		Valor alterado	
	Denominación	Valor	Denominación	Valor
Tiempo de agitación (min)	A	2,0	a	1,5
Modo de agitación	B	manual	b	Vortex
Temperatura de evaporación (°C)	C	35	c	33
Masa de extrelut (g)	D	0,5	d	0,6
Tiempo de contacto (min)	E	20	e	25
Longitud de onda (nm)	F	232	f	240
Fase móvil (composición)	G	98:2	g	99:1

de ellas. Esto puede darse debido a que el mancozeb es ampliamente utilizado para tratar enfermedades asociadas a los hongos en diferentes etapas del cultivo y, de no tenerse en cuenta los periodos de carencia recomendados, pueden encontrarse residuos del ditiocarbamato o de sus metabolitos en el producto de consumo.

Conclusiones

Se evaluaron cuatro metodologías para la determinación de etilentiourea y propilentiourea en frutas y hortalizas. La metodología de extracción con solventes polares y posterior limpieza con partición líquido-líquido fue la metodología que obtuvo mejores resultados; por lo tanto, se optimizó y validó para análisis de rutina de estos compuestos.

Se determinó que la metodología es específica, selectiva, precisa y exacta, con porcentajes de recuperación de 77,82% para ETU y 83,57% para PTU, y coeficientes de variación de 7,38% y 10,25% respectivamente. Los límites de detección determinados fueron 0,003 mg·kg⁻¹ y 0,006 mg·kg⁻¹ para ETU y PTU respectivamente, y los límites de cuantificación fueron 0,010 mg·kg⁻¹ para ETU y 0,020 mg·kg⁻¹ para PTU, con lo cual se concluye que la metodología es adecuada para el análisis de estos compuestos.

Referencias

- O'Neil, W. M.; Marshall, W. D. Goitrogenic effects of ethylenethiourea on rat thyroid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 1984. **21**(1): 92-101.
- Teramoto, S.; Moriya, M.; Kato, K.; Tezuka, H.; Nakamura, S.; Shingu, A.; Shirasu, Y. Mutagenicity testing on ethylenethiourea. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1977. **56**(2): 121-129.
- Dubey, J. K.; Heberer, T.; Stan, H. J. Determination of ethylenethiourea in food commodities by a two-step derivatization method and gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*. 1997. **765**(1): 31-38.
- Garcinuño, R. M.; Fernández-Hernando, P.; Cámara, C. Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A*. 2004. **1043**(2): 225-229.
- Tölgyesi, L.; Kele, P.; Torkos, K. Determination of propylenethiourea, the main metabolite of propineb, in tomato by HILIC-MS. *Chromatographia*. 2010. **71**(0): 75-80.
- Garcinuño, R. M.; Ramos, L.; Fernández-Hernando, P.; Cámara, C. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples. *Journal of Chromatography A*. 2004. **1041**(1-2): 35-41.
- Blasco, C.; Font, G.; Picó, Y. Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004. **1028**(2): 267-276.
- Kontou, S.; Tsipi, D.; Oreopoulou, V.; Tzia, C. Determination of ETU in Tomatoes and Tomato Products by HPLC-PDA. Evaluation of Cleanup Procedures. *J. Agric. Food Chem.* 2001. **49**: 1090-1097.
- SANCO. Method Validation & Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis in Food & Feed. EU. 2011. Document No. 12495. Disponible en: http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727. [Consultado el 15 de septiembre de 2013].
- Huang, C. C.; Li, S. H.; Chen, C. H. Effect of surface acidic oxides of activated carbon on adsorption of ammonia. *J. Hazard. Mater.* 2008. **59**: 523-527.
- Erazo, A. Evaluación de la incertidumbre y la estabilidad de los analitos en el procesamiento de la muestra en el análisis de residuos de plaguicidas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. pp. 53-65. 2006.
- Ahumada, D.; Guerrero, J. Estudio del efecto matriz en el análisis de plaguicidas por cromatografía de gases. *Vitae*. 2010. **17**: 51-58.
- Corley, J. Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. En: *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. Lee, P. W. (editor). Chichester (West Sussex, England): John Wiley & Sons. 2003.

Article citation:

Guerrero, J. A.; Velandia, Y. Evaluación de metodologías para el análisis de productos tóxicos de la degradación de fungicidas ditiocarbamatos. *Rev Colomb Quim*. 2013. **42**(3): 17-22.