

Método analítico para la determinación de etilentiourea (etu) subproducto del Mancozeb en un Andisol del Oriente Antioqueño

Analytical method for determining ethylenethiourea (etu) by-product of Mancozeb in Andisol of East Antioquia

María Carolina Domínguez^{1}, Gustavo Peñuela¹, María Teresa Flórez²*

¹Grupo de Investigación en Diagnóstico y Control de la Contaminación (GDCON), Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Apartado Aéreo 1226, Medellín, Colombia

² Grupo de Investigación en Gestión y Modelación Ambiental (GAIA). Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, Apartado Aéreo 1226, Medellín, Colombia

(Recibido el 6 de octubre de 2008. Aceptado el 26 de mayo de 2009)

Resumen

El Mancozeb (etilenbisditiocarbamato de cinc y manganeso) es uno de los fungicidas de mayor uso en Colombia, y está clasificado en la categoría toxicológica IV. La etilentiourea (ETU) es el principal producto de degradación del Mancozeb, estando clasificada en la categoría toxicológica I debido a que es carcinogénico y mutagénico, lo que lo convierte en un compuesto de alto riesgo para la salud de las personas. En el presente trabajo se validó un método de análisis de la ETU utilizando la cromatografía de líquidos (CL) con detector de arreglo de diodos (DAD), el cual se usó para la cuantificación de la ETU en suelos del municipio de Marinilla (Oriente de Antioquia). El suelo usado en el análisis de la ETU se determinó como un Acrudoxic Fulvudand medial arcilloso mezclado, isomésico; estos suelos son los más utilizados para la agricultura en el Departamento de Antioquia y en Colombia. El límite de detección del análisis fue 0,00046 mg/L, el límite de cuantificación fue 0,0015 mg/L y el porcentaje de recuperación en el suelo fue 93%.

----- *Palabras clave:* Mancozeb, etilentiourea (ETU), cromatografía de líquidos (CL), andisoles.

* Autor de correspondencia: teléfono: + 57 + 4 + 219 65 71, fax: + 57 + 4 + 219 65 71, correo electrónico: cagual@udea.edu.co (M. Domínguez).

Abstract

The Mancozeb (etilenbisditiocarbamato of zinc and manganese) is one of the fungicides of greater use in Colombia, and is classified in toxicological category IV. Ethylenethiourea (ETU) is the main product of degradation of the Mancozeb, classified in toxicological category I because of its carcinogenic and mutagenicity, which turns it a compound of high risk for people health. In the present work a method of analysis of the ETU was validated using the chromatography of liquids with diode array detector, which was used for the quantification of the ETU in soils of the municipality of Marinilla (East of Antioquia). The soil used in the analysis of the ETU was determined as an Acrudoxic mixed argillaceous medial Fulvudand, isomésico, these soils are used for agriculture in the Department of Antioquia and Colombia. The detection limit of analysis was 0,00046 mg/L, the limit of quantification was 0,0015 mg/L and the percent recovery in soil was 93%.

----- *Keywords:* Mancozeb, etilentiourea (ETU), chromatography of liquids (CL), andisols.

Introducción

En Colombia se emplea un número apreciable de compuestos químicos para la protección de los cultivos, sin embargo, el uso inadecuado e incontrolado, ha sido causa de múltiples afecciones de salud que van desde intoxicaciones leves o alergias, hasta casos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y muerte, así como también de la destrucción de ecosistemas completos [1]. En Latinoamérica, Colombia ocupa el tercer lugar en la utilización de plaguicidas, después de Brasil y México, con un consumo anual de 21 millones de kilogramos, de los cuales 17,1 se aplican en el sector agrario. No obstante, Colombia supera a dichos países en el grado de exposición, indicador que establece la relación entre el consumo de un producto y la población económicamente activa en el sector agrario, siendo superada sólo por Panamá y Costa Rica [2].

El departamento de Antioquia tiene una producción agrícola de gran importancia para el abastecimiento de otras zonas del país, con productos como: flores, café, frijol, papa, maíz, tomate y hortalizas en general; cultivos con los cuales se reconoce el uso y el abuso de los agroquímicos, representados por herbicidas, fungicidas, insecticidas y fertilizantes. Los plaguicidas más usados

en el departamento son: mancozeb, endosulfan, malation, carbofuran, carbaril, metomil, dime-toato, metamidofos, metilparation, clorpirifos y paration.

El uso exagerado, persistencia y lipofilicidad de los plaguicidas favorece su residualidad y acumulación en alimentos, animales, aguas y suelos [3]. La contaminación del suelo por plaguicidas se da por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados y dispuestos en el suelo. Esta contaminación ocasiona la degradación de los suelos que puede conducir a un impacto negativo en el ambiente y particularmente en la productividad [4]. Los productos de degradación son compuestos derivados de la transformación del plaguicida por procesos físicos, químicos y biológicos [5, 6], y que varios de ellos pueden ser más tóxicos, e incluso más persistentes, que el plaguicida original.

Uno de los fungicidas que por su alto espectro de acción y bajo costo, que se ha venido utilizando en grandes cantidades, son los de tipo etilenbisditiocarbamatos (EBDTC) tales como mancozeb, dithane, manzeb, mancofol y manzate, entre otros. Estos plaguicidas se utilizan en suelos destinados

al cultivo de hortalizas y algunos tubérculos, tanto para el proceso de acondicionamiento del suelo (acción preventiva) como para su aplicación sobre la planta (acción correctiva). Sin embargo, ellos se degradan rápidamente en metabolitos más tóxicos, entre ellos la etilenotiourea (ETU), de características cancerígenas, teratogénicas y mutagénicas, con un amplio efecto antifúngico, y que aportan metales como manganeso y cinc que pueden generar un desequilibrio nocivo entre micronutrientes o macronutrientes para los cultivos [7]. La ETU se produce por múltiples mecanismos de degradación como la hidrólisis, oxidación o degradación microbiana [8].

En el Oriente antioqueño se encuentran suelos Andisoles, altamente conocidos por sus propiedades morfológicas, físicas y químicas únicas, atribuidas a la fracción arcilla de composición amorfa y a la formación de compuestos aluminio-humus. Estos suelos poseen altos contenidos de materia orgánica, alta capacidad de fijar fosfatos, baja densidad aparente así como aluminio e hierro extractables con oxalato ácido de amonio, relacionados con contenidos proporcionales de vidrio volcánico y cantidades significativas de alófana, imogolita, ferrihidrita y/o complejos aluminio-humus que son nombradas como minerales de bajo grado de cristalización (mbgc) [9]. Las partículas pequeñas de los minerales de bajo grado de cristalización (mbgc) que contienen los Andisoles absorben iones para equilibrar la carga de las partículas. Las cargas insaturadas son en su mayoría negativas, por ello, son los cationes los que se adsorben. Tales iones se pueden intercambiar por otros debido a que permanecen en la superficie y no en el seno del cristal. Esto retrasa la pérdida de iones del suelo y los retiene en estados disponibles para que puedan ser captados por las plantas [10].

Materiales y métodos

Equipos

Cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent technologies modelo 1100, equipado con bomba cuaternaria G1311A, detector de arreglo

de diodos DAD G1315B e inyector automático G1329A modelo 1200, Columna Zorbax 5B-C18 (250 x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula), membrana de PVDF 0,45 µm de poro, 13 mm de diámetro (Millex-HV). Vortex marca IKA Words, modelo MS1, baño maría marca Yamato, modelo BM200, baño de ultrasonido marca Branson, modelo 2510 y centrífuga marca Indulab Serie 4610 acoplada con un rotor para tubos falcón de 50 mL.

Patrones, solventes y reactivos

2-imidazolidinethione (etilenotiourea), pureza de 99% (Chem Service), agua milliQ (agua desionizada) obtenida al pasar agua destilada por un equipo de Millipore Simpak OR1, Acetonitrilo grado cromatográfico, Hidróxido de Sodio, Grado reactivo (Merk) y Dithane- M45 wp NT, (Dow agrosiences).

Procedimiento

Suelos

Las muestras analizadas se recolectaron en suelos cultivados con tomate chonto bajo invernadero. En el suelo se realizó una calicata de dimensiones 1.00 x 0.50 x 1.50 metros lo que facilitó su muestreo. Definidos los diversos horizontes del suelo (Ap 0- 38cm, Ah de 38 – 46cm y A/Bw de 46 – 55cm en el espesor del suelo), se procedió a medir algunos parámetros como pH, textura, estructura, color, porosidad, consistencia, plasticidad, etc. Cada horizonte, una vez descrito, fue muestreado tomando aproximadamente 1 kg de muestra y se empacó en bolsa plástica hermética, y se llevó al laboratorio del grupo GDCON (En la sede de investigaciones Universitarias, Medellín) con el fin de realizar los análisis cromatográficos para determinar la concentración de la ETU en las muestras recogidas en campo. La procedencia y la descripción del suelo se presentan en la tabla 1.

Propiedades fisicoquímicas del suelo

Las propiedades se determinaron siguiendo la metodología utilizada en el Laboratorio de Suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi.

Tabla 1 Descripción y propiedades del suelo en estudio

Parámetros**	Horizontes		
	<i>Ap</i>	<i>Ah</i>	<i>A/Bw</i>
Taxonomía	Acrudoxic Fulvudand medial arcilloso mezclado, isomésico		
Uso Actual	Cultivo de tomate chonto bajo invernadero		
Localización geográfica	Municipio de Marinilla, Departamento de Antioquia, Cuenca media de la quebrada La Marinilla, Vereda Juan Bosco. Altitud: 2430 msnm. Posición fisiográfica: Parte media de la ladera de colinas bajas, redondeadas, desarrolladas en saprolito de anfibolita y recubiertas con ceniza volcánica, régimen climático Údico, bien drenado.		
Horizonte Profundidad (cm)	0 – 38	38 – 46	46 – 55
Textura*	FA	LAr	ArL
pH * (1:1)	5,87	5,28	5,63
Materia Orgánica (M.O.) (%) **	8,10	24,14	16,72
Fósforo Disponible (mg/L) (Bray II modificado) **	15,10	1,60	2,40
Capacidad intercambio catiónico (CIC) (cmol/kg de suelo) **	8,11	74,90	55,40
Ca ²⁺ - intercambiable (cmol/kg de suelo) **	3,50	1,70	0,93
Mg ²⁺ - intercambiable (cmol/kg de suelo) **	0,69	0,40	0,25
K ⁺ disponible (cmol/kg de suelo) **	1,30	0,88	0,74
Boro disponible (cmol/kg de suelo) **	5,51	3,09	2,09
Acidez intercambiable (Al) (cmol/kg de suelo) **	1,50	0,80	0,12

* Corresponden a las texturas al tacto y a los pH realizados en campo.

**MÉTODOS: Textura: Bouyoucos; A.I.: con KCl; Fósforo disponible: Bray II; MO: Walkley - Black; CIC y bases intercambiables (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺): Acetato de amonio 1 normal y neutro; Boro disponible: agua caliente.

Extracción de la ETU del suelo

Los ensayos se realizaron con suelo ándico húmedo, ya que este tipo de suelos en condiciones de sequedad puede producir cambios importantes en las propiedades de los suelos, hasta el punto de dificultar la extracción debido a la retracción que sufren los suelos por la presencia de las estructuras alófanas e imogolita [11,12].

Para la determinación del porcentaje de recuperación se emplearon 1,5 g de suelo ándico, a los cuales previamente se le agregó ETU a tres niveles de concentraciones (79,7, 246,1 y 522,2 mg/L), realizándose la extracción con el procedimiento descrito en la Figura 1.

Análisis Cromatográfico

Las condiciones cromatográficas para el análisis de la ETU en los suelos se encuentran resumidas

en la tabla 2. La idoneidad del sistema se evaluó mediante la determinación de los parámetros: factor de capacidad, resolución, factor de separación y asimetría.

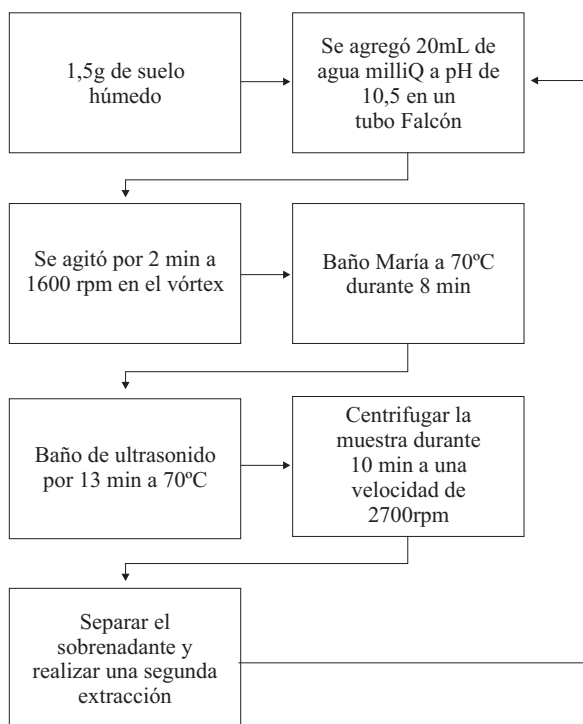


Figura 1 Extracción de la ETU en suelo

Tabla 2 Condiciones cromatográficas para la determinación de ETU en suelo

Parámetros instrumentales	Metodología Analítica
Longitud de onda (nm)	232
Temperatura °C	25
Volumen de Inyección (µl)	20
Columna	Zorbax C18 250mm x 4,6 mm I.D, 5µm
Fase Móvil	Agua – Acetonitrilo (98:2)
Flujo (ml/min)	0,9
Tiempo de Corrido (min)	7

Resultados y Discusión

Suelo

El suelo estudiado presenta propiedades químicas típicas de los Andisoles, correspondientes de la cuenca de la quebrada La Marinilla en general del Oriente Antioqueño [13,14]. Es un suelo fuertemente ácido en la superficie hasta moderadamente ácido en la profundidad con alto contenido de materia orgánica, pobre en bases intercambiables y presenta disminución del fósforo disponible a medida que se incrementa la profundidad del perfil. La capacidad de intercambio catiónica efectiva (CICE) es alta, lo que indica, junto con el pH, que su carga variable es de alta densidad. De acuerdo a lo anterior, se trata de un suelo con bajo nivel de fertilidad que proporciona bajo contenido de macro y micronutrientes en las plantas y que podría presentar toxicidades por aluminio, hierro y manganeso, de acuerdo a la caracterización química y fertilidad de Andisoles del Oriente Antioqueño [15]. El suelo estudiado cumple los conceptos centrales de la clasificación taxonómica norteamericana [16] y ha sido clasificado como: Acrudoxic Fulvudand medial arcilloso mezclado, isomésico.

Validación

Se realizaron curvas de calibración a dos rangos de concentración, una entre 0,015 y 1,0 mg/L (Figura 2) y otra entre 0,2 y 15,0 mg/L (Figura 3), cuyos datos se analizaron con el programa Statgraphics versión 5.6 plus, mostrando que existe una fuerte relación entre la concentración y su respuesta medida como área (coeficientes de correlación de 0,999). La ETU se cuantificó a una longitud de onda de 232 nm y el tiempo de retención de la ETU fue 4,7 minutos (Figura 4). Cada una de las muestras se inyectó por duplicado y en algunas ocasiones hasta por triplicado, para lograr una mayor reproducibilidad y confiabilidad en el dato obtenido.

En la tabla 3 se observan los parámetros de linealidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad y exactitud, los cuales cumplen con los criterios de

aceptación postulados para la validación de métodos analíticos por CL de Quattochi [17]. Las curvas de calibración exhiben un amplio rango de linealidad lo que permite analizar las muestras sin muchas restricciones en la concentración de la muestra extraída. La repetibilidad y reproducibilidad es buena, menos del 5% de coeficiente de variación, y el modelo exhibe un amplio rango de linealidad, lo que permite un buen nivel de sensibilidad para la detección de concentraciones bajas de la ETU.

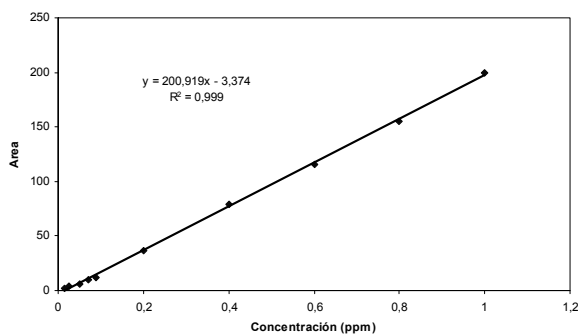


Figura 2 Curva de calibración de la ETU (0,015 – 1 mg/L)

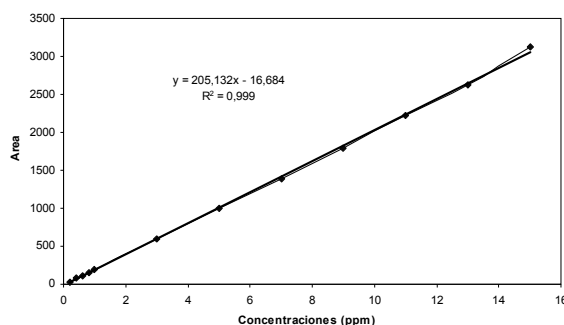


Figura 3 Curva de Calibración de la ETU (0,2-15 mg/L)

De acuerdo al límite de cuantificación del método (1,5 µg/L) se pueden analizar muestras con muy baja concentración, y no se requeriría para estas muestras realizar grandes preconcentraciones de la muestra. Las muestras de suelos que se usaron para la determinación del porcentaje de recuperación, no presentaron concentración de ETU (por debajo del límite de detección) durante los tres meses de muestreo, y por lo tanto, la recuperación que se realizará en el procedimiento era debido al que se agregará a la muestra de suelo.

Tabla 3 Validación del método analítico

Parámetro	Procesamiento estadístico	Resultados			Criterios de aceptación
LINEALIDAD	Coeficiente de correlación y determinación	r ² = 0,999 r = 0,999			r ² = 0,98 r = 0,99
	Test de Linealidad	CV _f = 10,106% t _{exp} = 179,672 t _{tab} = 2,313			CV _f = 16% t _{exp} > t _{tab}
	Test de proporcionalidad	t _{exp} = 1,939 t _{tab} = 2,313			t _{exp} < t _{tab}
	Ecuación de regresión	Área = 205,132 * Concentración – 16,684			
PRECISIÓN		Conc. baja	Conc. media	Conc. alta	
Repetibilidad y	%CV _{repet}	1,009	0,594	1,435	%CV < 5
Reproducibilidad	%CV _{reprod}	0,587	1,727	0,445	
EXACTITUD	t de Student	t _{exp} = 1,727 t _{tab} = 1,739			t _{exp} < t _{tab}
SENSIBILIDAD	Limite de Detección (LD)	Limite de Cuantificación (LC)			
	0,00046mg/L	0,0015mg/L			

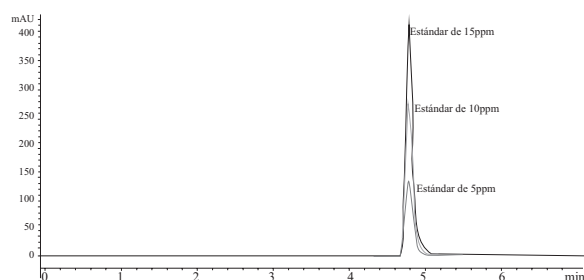


Figura 4 Cromatograma del análisis de la ETU a diferentes concentraciones.

El volumen de solución extractora (tabla 4) con el que se alcanzó los mejores porcentajes de recuperación fue con 40 mL (93, 92 y 92% para cada nivel de concentración).

El tiempo de la homogenización de la matriz en el solvente con el fin de extraer el analito,

el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo dejándolo 2 minutos. Tanto con el baño maría y como con el baño ultrasonido, el porcentaje de extracción aumentó al elevar la temperatura hasta 70°C debido a que la solubilidad del analito se incrementa proporcionalmente con el aumento de la temperatura.

El mayor porcentaje de recuperación (90%) en la extracción de la ETU ocurrió a pH 10,5, lo cual se debe a que la ETU cuando no tiene protonados los nitrógenos es más soluble a pH básico. Sin embargo, a pHs muy altos, por arriba de 12,0, se dificulta la extracción por la solubilización de los ácidos húmicos y fúlvicos que contiene el suelo, los cuales le dan una coloración vino tinto al solvente, que permanecía a pesar de filtrar la muestra, y que no es conveniente inyectarla al cromatógrafo para no deteriorar la columna o ensuciar el detector.

Tabla 4 Porcentajes de recuperación con diferentes volúmenes de extracción

<i>Volumen de extracción</i>	<i>Concentración de la ETU</i>	<i>% de recuperación</i>	<i>Coefficiente de variación</i>
25 mL	79,78	54,30	2,76
	280,43	66,58	1,18
	552,66	78,10	2,28
30 mL	79,78	76,24	0,48
	280,43	82,56	1,77
	552,66	82,59	4,27
40 mL	79,78	93,86	1,22
	280,43	92,98	2,46
	552,66	92,93	0,63
50 mL	79,78	75,02	1,93
	280,43	83,25	3,74
	552,66	85,63	1,17

Conclusiones

El suelo estudiado es un Acrudoxic Fulvudand medial arcilloso mezclado, isomésico, que se encuentra cultivado con tomate chonto bajo invernadero.

El método validado tuvo un límite de cuantificación de 1,5 µg/L, que es muy bajo, apropiado para determinar la residualidad de plaguicidas en suelos ándicos, no reportados previamente.

El método presenta un amplio rango de linealidad que permite la cuantificación de la ETU en un amplio rango de concentraciones.

La metodología de extracción permite altos porcentajes de recuperación disminuyendo los efectos de matriz.

La buena repetibilidad y reproducibilidad obtenida con el método, garantiza la precisión, permitiendo la aplicabilidad de la técnica para el análisis de la ETU por métodos cromatográficos.

Referencias

1. A. R. Arenas. "Impacto ambiental de los plaguicidas". *Semana de la salud ocupacional en Antioquia. Primer congreso nacional de plaguicidas, Memorias*. Medellín. 1997. pp. 64
2. S. Henao, J. Finkelman, L. Albert, H.W. De Koning. *Plaguicidas y salud en las Américas*. México. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 1993. pp.110.
3. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. *Incidencia de factores sociales, económicos, culturales y técnicos en el uso de agroquímicos por pequeños productores del departamento de Antioquia*. 2001. pp.170.
4. S. Ardila. *Los Agroquímicos y la Relación Agricultura y Medio Ambiente*. Universidad de los Andes. Facultad de Economía. Vol. 13. 1995. pp.15.
5. H. L. Barra. *Contaminación del Río Cauca por residuos de pesticidas*. Universidad del Valle. Selección de Saneamiento Ambiental. 1993. pp. 78
6. M. G. Hayo, D. W. Van. "Assessing the impact of pesticides on the environment-agriculture". *Ecosystems and Environment*. Vol. 60. 1996. pp. 81-96.
7. R. Boopsthy. "Factors limiting bioremediation technologies". *Bioresource Technology*. Vol. 74. 2000. pp. 63-67.
8. R. Engst, W. Schnaak. "Studies on the metabolism of the ethylenebisdiithiocarbamate fungicides maneb and zineb". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* Vol. 143. 1970. pp 81-85.
9. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y Organización Mundial de la Salud. 1996. *Eliminación de grandes cantidades de plaguicidas en desuso en los países en desarrollo*. <http://www.fao.org/docrep/w1604s/w1604s00.htm#Contents>. Consultada el 15 de marzo de 2008.
10. Soil Survey Division Staff (SSDS). *Soil survey manual. Soil Conservation Service*. U.S. Department of Agriculture Handbook 18. USDA. Washington D. C. 1993. pp. 437.
11. P. A. Pinzón. "Propiedades físicas de los suelos derivados de cenizas volcánicas de Colombia". *Suelos Ecuatoriales*. Vol. 23. 1993. pp. 22-30.
12. D. F. Jaramillo. "Efecto del secado de las muestras sobre la extracción selectiva de Fe y Al activos en Andisoles del norte de la cordillera central colombiana". *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. Vol. 53. 2000. pp. 1077-1090.
13. S. Castro, O. Pulgarín. *Evaluación del efecto de materiales orgánicos sobre algunas propiedades físicas del horizonte Ap. de un Andisol y el rendimiento de un crisantemo var. Vero*. Tesis I.A. Universidad Nacional. Medellín. 1998. pp. 117.
14. D. F. Jaramillo. *Repelencia al agua en suelos: con énfasis en Andisoles de Antioquia*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 2004. pp. 197.
15. D. F. Jaramillo. *Andisoles del Oriente Antioqueño; Caracterización química y fertilidad*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 1995. pp. 35.
16. Soil Survey Staff (SSS). *Keys to soil taxonomy*. 9ª ed. USDA. Washington D. C. 2003. pp. 332.
17. O. A. Quattrochi, S.I. Abelaira, R.F. Laba. *Introducción a HPLC: aplicación y práctica*. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires. 1992. pp. 407.