

# Implementación y validación de una metodología analítica para la determinación de etilentiourea en orina y parches de extracción

Ángela Viviana Barreto

Ana Lucía Castiblanco\*<sup>1</sup>

Stella Ospina de Nigrinis\*

Álvaro Javier Idrovo\*\*

## Resumen

Los etilén-bis-ditiocarbamatos (EBDC) están entre los plaguicidas más usados actualmente en Colombia; su principal producto de degradación es la etilentiourea (ETU). Este trabajo presenta los resultados de la implementación y validación de una metodología para cuantificar ETU en orina y parches de extracción basada en cromatografía líquida de alta eficiencia y detección ultravioleta. Para los parches el límite de detección fue de 0.015 µg/mL, para las muestras de orina de 0.150 µg/mL. Los porcentajes de recuperación fueron 81.59% para los parches y 50.53% para la orina. Se sugieren algunas modificaciones para poder cuantificar ETU en poblaciones expuestas a EBDC.

**Palabras clave:** Plaguicidas – Etilen-bis-ditiocarbamatos (EBDC) – Etilentiourea (ETU) – Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) – Estudios de validación.

## Summary

### Implementing and validating an analytical method for ethylenethiourea determination in urine and extraction patches

In Colombia Ethylene-Bis-Dithiocarbamates (EBDC) are among the most used pesticides. Ethylene-Thiourea (ETU) is EBDC main degradation product. Therefore, human

\* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia.

1. E-mail: luciacastiblanco@cable.net.co

\*\* Instituto de Salud Pública, Departamento de Salud Pública y Tropical, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia. E-mail: idrovoaj@hotmail.com

Recibido para evaluación: 8 de Abril de 2003  
Aceptado para publicación: 31 de Mayo de 2003

exposure to EBDC can be established by determining ETU levels. In this work we transfer and validate a method to quantify ETU in urine and Dermal Extraction Patches by means of High Performance Liquid Chromatography using a UV detector. Minimal Limit of Detection (MLD) for Urine and Dermal Patches were 0.150 and 0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. Percentages of recovery were 81.59% (Urine) and 50.53% (Dermal Patches). Some modifications to the method in order to measure ETU in exposed populations are suggested.

**Key words:** Pesticides – Ethylenebis-dithiocarbamates (EBDC) – Ethylenethiourea (ETU) – High performance liquid chromatography (HPLC) – Validation studies.

## Introducción

El consumo de etilen-bis-ditiocarbamatos (EBDC) ha aumentado con el paso del tiempo (1), llegando a ser actualmente uno de los tipos de plaguicidas más utilizados en Colombia (2). Su cuantificación directa, o bien la cuantificación de sus metabolitos es un elemento clave en la vigilancia de la población expuesta, tanto a nivel ocupacional como general. Los EBDC se emplean en diversos tipos de cultivos donde los hongos constituyen una plaga importante. Entre los más utilizados se encuentran el mancozeb, maneb, nabam, zineb y propineb.

La principal ruta de absorción de los EBDC a partir de la exposición ocupacional es la piel, seguida de la vía inhalatoria (3). Su principal metabolito es la etilentiourea (ETU), la cual se excreta en más del 90% por vía urinaria (4, 5). Aunque no se conoce con certeza su potencial tóxico para la salud humana, algunos hallazgos sugieren como efecto una disminución de la función tiroidea (6). Entre los individuos expuestos son frecuentes las reacciones alérgicas en piel; la exposición a plaguicidas EBDC también ha sido asociada a vitiligo (7).

Aunque el monitoreo de las concentraciones de ETU no permite cuantificar de manera directa la exposición a EBDC, la detección de sus metabolitos sí constituye un indicio de la presencia de estos plaguicidas. Ante la

necesidad de vigilar la exposición a EBDC en poblaciones ocupacionalmente expuestas, el objetivo del presente trabajo fue adaptar, implementar y validar una metodología analítica para la determinación de ETU en orina y parches de extracción

La metodología seleccionada fue la descrita por Kurtio y colaboradores (8), debido a que en diversas experiencias (9, 10) se ha reportado su uso exitoso, siendo mejor que otras técnicas basadas en cromatografía líquida con detección polarográfica o electroquímica (8, 11, 12).

## Metodología

### Equipos

Balanza analítica (Sartorius BP 210), plancha de calentamiento y agitación (Cimarec 3), rotaevaporador (Buchi), potenciómetro CG 840B (Schott), equipo de ultrasonido (Transonic T460/H, Geprüfte, Sicherheit), equipo de agitación mecánica C<sub>76</sub> (New Brunswick Scientific), cromatógrafo para cromatografía líquida de alta eficiencia (Waters) con detector Waters 996 UV con arreglo de diodos y PDA, bomba Waters 600, columna Nova-pak C18 (60<sup>o</sup>A, 4  $\mu\text{m}$ , 3.9x300 mm) y filtro 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

## Patrones y reactivos

N,N-etilentiourea (Fluka HPLC), óxido de aluminio 90 Aktiv neutral (aktiver I nach Brockmann) de Merck, acetato de amonio (JT Baker HPLC), silicagel 60 silinized (0.063 – 0.200 mm) de Merck, metanol Omnisolv (Merck HPLC), diclorometano Omnisolv (Merck HPLC), acetona (Merck), ácido nítrico 65% (Merck), agua MilliQ, y n-heptano RA (Merck).

## Procedimientos preliminares

Las muestras analizadas provenían de un grupo de nueve mujeres que laboraban en las secciones, administrativa, de cultivo y de postcosecha de tres empresas floricultoras que hacían uso de plaguicidas EBDC. Cada una de ellas llevó 12 parches de papel de filtro sobre su ropa (parches de extracción) durante una jornada laboral. Las muestras de orina fueron recolectadas a partir de micción única durante 5 días alternados a lo largo de dos semanas.

Para extraer la ETU de los parches se hizo un lavado con agua, llevando a ultrasonido sin calentamiento, posteriormente se sometió a una agitación mecánica, y por último se filtra por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . El producto de este filtrado es cuantificado por el equipo.

Para la extracción de ETU en orina fue necesario realizar un tratamiento previo de limpieza con el fin de eliminar los posibles interferentes. Inicialmente la muestra se lleva a sequedad mediante rotaevaporación, el residuo es reconstituido con 2 mL de metanol y se lleva a sequedad, este residuo se hace pasar por la columna de extracción fabricada previamente así: se toma una jeringa de 25 mL y se adiciona un tapón de lana de vidrio, se rellena de sílica gel y alúmina, luego se activa con una solución de pH 3.0. Se eluye con tres porciones de 5 mL de una solución de metanol en diclorometano. El eluato se evapora en campana y el residuo es

reconstituido en 1 mL de agua milli Q, se filtra por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se cuantifica. La descripción detallada de estos procedimientos se encuentra en el trabajo de grado que da origen a este artículo (13).

Las condiciones cromatográficas del método para el análisis de ETU en orina y parches de extracción se encuentran resumidas en la Tabla 1. La idoneidad del sistema se evaluó mediante la determinación de los parámetros: factor de capacidad, resolución, factor de separación, factor de asimetría y número de platos teóricos en tres cromatogramas con concentraciones de 0.200  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 1.** Condiciones cromatográficas para el análisis de etilentiourea (ETU) en parches dérmicos y en orina.

Parámetros del instrumento	Metodología analítica	Metodología bioanalítica
Rango de $\lambda$ (nm)	220 - 300	220 - 300
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	50	50
Volumen de inyección ( $\mu\text{L}$ )	20	20
Columna	C <sub>18</sub> 3.9 x 300 mm, 4 $\mu\text{m}$	C <sub>18</sub> DOS 4.6 x 250 mm, 5 $\mu\text{m}$
Fase móvil	acetato de amonio 0.05M metanol 90 - 10%	acetato de amonio 0.05M metanol 90 - 10%
Rango de presión (psi)	0 - 4 000	0 - 4 000
Flujo (mL/min)	0.7	0.7

## Validación de la metodología analítica (parches de extracción)

La determinación de la especificidad se llevó a cabo realizando determinaciones con seis soluciones blanco, provenientes del lavado de parches de extracción, y con soluciones con acetaminofén, ibuprofeno y cafeína.

La linealidad se determinó mediante la preparación de una curva de calibración con

cinco niveles de concentración de ETU (0.050, 0.100, 0.150, 0.200 y 0.250  $\mu\text{g/mL}$ ) y tres réplicas, tanto para el sistema como para el método; y se evaluó usando las pruebas de intercepto y pendiente, y análisis de varianza. El rango lineal fue definido de acuerdo al nivel más bajo de concentración que pudo ser cuantificado por el instrumento y se tomaron cuatro niveles superiores.

La determinación de la cantidad mínima detectable se realizó por el método visual, preparando soluciones diluidas del estándar con concentraciones entre 0.01 y 0.04  $\mu\text{g/mL}$  hasta encontrar una cuya respuesta fuera igual a tres veces la señal ruido.

La determinación de la cantidad mínima cuantificable se realizó preparando soluciones del estándar hasta encontrar un nivel de concentración que fuera cuantificable por el instrumento, cumpliendo con los requerimientos de exactitud y de precisión.

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Para la repetibilidad se escogieron tres niveles de concentración dentro del rango lineal (0.050, 0.150 y 0.250  $\mu\text{g/mL}$ ), haciendo seis determinaciones por nivel en un solo día, partiendo de una única solución homogénea del estándar. Para el estudio de precisión intermedia se usaron tres niveles de concentración (0.050, 0.100 y 0.200  $\mu\text{g/mL}$ ) con seis determinaciones por nivel, las cuales se llevaron a cabo por dos analistas en un periodo de tres días consecutivos.

La exactitud fue determinada mediante la comparación de la pendiente del método con la del sistema; los resultados se expresaron en porcentajes de recuperación.

La estabilidad de la ETU en agua se estudió con una solución de 0.150  $\mu\text{g/mL}$  a temperatura ambiente ( $\approx 20^\circ\text{C}$ ), de refrigeración, y a  $-70^\circ\text{C}$ , medida durante cuatro semanas.

## Validación de la metodología bioanalítica (muestras de orina)

La especificidad para la metodología bioanalítica fue desarrollada siguiendo el mismo procedimiento empleado en la metodología para la determinación de ETU en parches.

La linealidad fue determinada mediante la preparación de la curva de calibración con cinco niveles de concentración (0.200, 0.250, 0.300, 0.350 y 0.400  $\mu\text{g/mL}$ ) y tres réplicas, tanto para el sistema como para el método. Para su evaluación se utilizaron las pruebas de pendiente e intercepto, y análisis de varianza. Para el rango de determinación lineal se escogió el nivel más bajo de concentración cuantificado por el instrumento y cuatro niveles de concentración superiores.

La determinación de la cantidad mínima detectable se realizó por el método visual preparando soluciones del estándar con concentraciones entre 0.050-0.150  $\mu\text{g/mL}$  hasta encontrar una cuya respuesta fuera igual al triple de la señal ruido.

La cantidad mínima cuantificable se determinó como la correspondiente al primer punto de la curva de calibración.

La precisión fue evaluada mediante la repetibilidad y la precisión intermedia. Para la primera se escogieron tres niveles de concentración (0.200, 0.250 y 0.350  $\mu\text{g/mL}$ ) dentro del rango lineal, haciendo seis determinaciones por nivel en un mismo día, partiendo de una única solución homogénea del estándar. Para la precisión intermedia se usaron tres niveles de concentración (0.200, 0.300 y 0.400  $\mu\text{g/mL}$ ) con seis determinaciones por nivel, las cuales se llevaron a cabo por dos analistas en un periodo de tres días consecutivos.

La evaluación de la exactitud se realizó mediante la comparación de la pendiente obtenida en la curva de calibración del método con la

curva de calibración del sistema. Los resultados fueron expresados como porcentajes de recuperación.

La estabilidad de la ETU en orina fue evaluada empleando dos niveles de concentración, a temperatura ambiente, de refrigeración y en tres ciclos de congelamiento-descongelamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Resultados y discusión

### Metodología analítica

El análisis de la especificidad mostró que ni las matrices empleadas ni los fármacos utilizados son interferentes con el tiempo de retención del analito. La ecuación de la recta, resultado de la evaluación de la linealidad, fue  $y = 356.5 + 199707.333x$  ( $r = 0.9943$ ), mostrando una buena correlación. En la Tabla 2 se resumen los principales resultados sobre la validación del método. Respecto a la repetibilidad y la precisión intermedia para los parches de extracción se observó que las mayores variaciones ocurren en las concentraciones más bajas.

El análisis de estabilidad de ETU en agua, y por tanto en las muestras de parches de extracción, mostró degradación a temperatura ambiente ( $\approx 20^{\circ}\text{C}$ ); sin embargo cuando las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  no se observó un cambio significativo en la concentración.

### Metodología bioanalítica

Aunque fue necesario procesar las muestras de orina para eliminar componentes endógenos, el análisis de selectividad mostró que la matriz limpia no presenta interferencias con el tiempo de retención del analito. La ecuación de la recta, resultado de la evaluación de la linealidad, fue  $y = 15.3333 + 117383.3333x$  ( $r =$

$0.9794$ ), mostrando una buena correlación. En la Tabla 2 se resumen los principales resultados sobre la validación del método. Siguiendo lo observado con los parches de extracción, la repetibilidad y la precisión intermedia para las muestras de orina presentaron mayor variación en las concentraciones más bajas. Esto sugiere una baja sensibilidad del detector a pequeñas concentraciones del analito.

Durante las dos semanas de análisis de las muestras de orina se observó asimetrías, picos solapados e impurezas, sugiriendo que la ETU se degrada a temperatura ambiente y de refrigeración; la mejor alternativa de almacenamiento en este caso también es la congelación.

**Tabla 2.** Resultados de la validación de la metodología analítica para cuantificación de etilentiourea en parches dérmicos y orina.

Parámetro	Parches dérmicos	Orina
Rango lineal ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.050-0.250	0.200-0.450
Cantidad mínima detectable ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.015	0.150
Cantidad mínima cuantificable ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.050	0.200
Precisión Repetibilidad (CV)*	0.52-0.85%	1.05-2.77%
Precisión Intermedia (CV)*	0.61-4.05%	1.02-2.91%
Porcentaje de recuperación	81.59%	50.52%

\* CV: Coeficiente de variación.

### Discusión y recomendaciones

Debido a sus características de sensibilidad, el detector UV con arreglo de diodos no resultó el más adecuado para la cuantificación de ETU. Como posibles alternativas para obtener una mayor sensibilidad, especialmente si se trabaja con trazas, es conveniente la preparación de un derivado fluorescente y la cromatografía de alta

eficiencia asociada a la espectrofotometría de masas (14).

Se sugiere que para futuras experiencias se realice un muestreo preliminar para determinar las concentraciones de ETU aproximadas en la población objeto; de esta manera el rango lineal podrá definirse como el valor comprendido entre dos niveles de concentración por debajo y dos superiores del promedio observado. En este trabajo se recurrió a los valores reportados en la literatura, donde la cantidad mínima de ETU cuantificada es de 0.2 µg/L (8); sin embargo esta cantidad no fue detectada, razón por la cual el rango lineal fue escogido de acuerdo a la mínima cantidad cuantificada que cumpliera con los criterios de precisión y exactitud.

Tomando en cuenta los resultados de estabilidad se hace necesario que las muestras sean analizadas tan pronto se efectúe la recolección o se almacenen a temperaturas de congelamiento (entre -20°C y -70°C) para evitar la degradación de la ETU (15).

En cuanto a la validación de la metodología bioanalítica, la principal dificultad fue la limpieza de la matriz orina, debido a que la ETU es estructuralmente similar a componentes endógenos de la orina como la urea, la n-metil-nicotinamida y otros compuestos nitrogenados que absorben a longitudes de onda cercanas a 230.1 nm, longitud de onda de absorción de la ETU. Fue posible superar este obstáculo a través de una serie de ensayos en los cuales se modificaron las condiciones iniciales variando la polaridad de la fase de elución y el pH de la fase estacionaria.

Este trabajo permite concluir que la metodología analítica utilizada es más selectiva, sensible y específica para la cuantificación de ETU en parches que para la orina. Debido a la baja sensibilidad del método, los procedimientos descritos solo podrían ser usados para poblaciones con muy alta exposición; para

poblaciones con exposiciones menores serán requeridas otras técnicas.

## Agradecimientos

Este trabajo fue patrocinado por Colciencias (contrato 112-2000), y adicionalmente, por la Facultad de Medicina y la División de Investigaciones de la sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia.

Igualmente agradecemos al Laboratorio de Asesorías e Investigaciones en Microbiología del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

## Bibliografía

1. G. Herrera y H. Polanco, Los plaguicidas utilizados en los últimos cuarenta y cinco años en Colombia, *Agronom. Colomb.*, **12**, 102 (1995).
2. Instituto Colombiano Agropecuario, "Comercialización de Plaguicidas 1996", Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – ICA, Santafé de Bogotá, 1999.
3. B.H. Woollen, Biological monitoring for pesticide absorption, *Ann. Occup. Hyg.*, **37**, 525 (1993).
4. C. Aprea, A. Betta, G. Catenacci, et al., Urinary excretion of ethylenethiourea in five volunteers on a controlled diet (multicentric study), *Sci. Total Environ.*, **203**, 167 (1997).
5. C. Aprea, A. Betta, G. Catenacci, et al., Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study), *Sci. Total Environ.*, **192**, 83 (1996).
6. K. Steenland, L. Cedillo, J. Tucker, et al., Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using

- ethylenebis(dithiocarbamate) (EBDC) fungicides in México, *Environ. Health Perspect.*, **105**, 1126 (1997).
7. J. Liesivuori y K. Savolainen, Dithiocarbamates, *Toxicology*, **91**, 37 (1994).
  8. P. Kurttio, T. Vartiainen y K. Savolainen, A high performance liquid chromatographic method for the determination of ethylenethiourea in urine and on filters, *Anal. Chim. Acta*, **212**, 297 (1988).
  9. P. Kurttio, T. Vartiainen y K. Savolainen, Environmental and biological monitoring of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides and ethylenethiourea, *Br. J. Ind. Med.*, **47**, 203 (1990).
  10. P. Kurttio y K. Savolainen, Ethylenethiourea in air and in urine as an indicator of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides, *Scand. J. Work Environ. Health*, **16**, 203 (1990).
  11. J. Prince, Analysis of ethylenethiourea in urine by high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 93 (1985).
  12. Ch. Lentza-Rizos, Ethylenethiourea (ETU) in relation to use of ethylenebis-dithiocarbamate (EBDC) fungicides, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **115**, 1 (1990).
  13. A.L. Castiblanco y A.V. Barreto, "Desarrollo y Validación de una Metodología Analítica para la Determinación de Etilentiourea en Orina y en Parches Dérmicos Empleando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia", Trabajo de Grado. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., 2002.
  14. P. Kurttio, T. Vartiainen, K. Savolainen y S. Auriola, Measurement of ethylenethiourea using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 85 (1992).
  15. C. Aprea, G. Sciarra, L. Lunghini y N. Bozzi, Il monitoraggio biologico dell'esposizione professionale e non ad antiparassitari, *Ann. Ist. Super. Sanità*, **37**, 159 (2001).