



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**TESINA PRESENTADA PARA OBTENER EL
GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO EN
QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE RESIDUOS DE ZINEB (FUNGICIDA DE CONTACTO) EN
VEGETALES CONSUMIDOS EN LA CIUDAD DE SANTA ROSA, LA PAMPA”**

Matías Ombroni

2010

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

Esta tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio, del Departamento de Química dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, durante el período comprendido entre el 27 de Agosto del 2010 y la presente fecha, resolución 368/10 de la Comisión Directiva, bajo la dirección de Dra. Bartel Laura y bajo la codirección de la Dra. Bellozas Reinhard Mónica.

Agradecimientos:

A mi directora y co-directora de la tesina, Dra. Laura Bartel y Dra. Mónica Bellozas Reinhard respectivamente. Muchas gracias Laura por haberme presentado este tema tan interesante, y por haber apostado a esto, y por todo el esfuerzo que realizaste para que se lleve a cabo, pesar de la distancia! Muchas gracias Mónica por la paciencia, ayuda y la dedicación experimental, hubo momentos complicados pero siempre estuviste ahí para ayudarme en todo y guiarme. Gracias!

A toda mi familia; especialmente a mama, papa y mi querida hermanita; por todo su apoyo y preocupación en estos años, y por haberme brindado todo para mi felicidad y bienestar en la carrera.

A Mauro Filippi (colo) y su familia; por haber vivido una convivencia tan buena en los años de la carrera. Tantas anécdotas y vivencias! Gracias colo por estos años.

A Mariana, por su apoyo y su cariño durante el transcurso de la elaboración de la tesina. Hiciste que el esfuerzo valiera la pena. Te quiero mucho.

A los Heros, por su amistad y vivencias en estos últimos 4 años.

Al Dr. José Camiña, por su valiosa ayuda en la parte estadística de la tesina.

Al Ing. Alberto Sparnocchia, por su valiosa ayuda de manera desinteresada con el muestreo.

A mis compañeros de curso; gracias por su amistad y por soportar cada anécdota y actitud dispar, aunque no pueden negar que no tuvieron momentos inolvidables!

A los docentes del pabellón de química; gracias por ayudarme en cuestiones puntuales y por haberme soportado siempre de la mejor manera en estos años, me llevo muy lindos momentos.

Firma

Día Mes Año

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

RESUMEN

El estudio sistemático de sustancias tóxicas en los alimentos es de relevancia en la actualidad ya que los contaminantes químicos alimentarios tienen una dimensión toxicológica más compleja que los mismos productos aislados. Entre ellos se encuentran los residuos de plaguicidas. Los fungicidas etilenbisditiocarbamatos (EBDC) son utilizados en el tratamiento de diversas plagas vegetales. El Zineb, un EBDC de Zinc utilizado en la región central y norte de la Argentina es considerado, junto con sus metabolitos, como un agente potencialmente carcinogénico, mutagénico y teratogénico. En este trabajo se propuso detectar la presencia de residuos de Zineb en tomates comercializados en la ciudad de Santa Rosa, y compararlo con el valor correspondiente al límite máximo residual (LMR) establecido por SENASA. Se utilizó el método de Keppel, mediante el cual se cuantificó espectrofotométricamente el CS_2 obtenido por descomposición térmica de las muestras. Los resultados indican la presencia de residuos de Zineb en todas las muestras obtenidas en bocas de expendio de tomates producidos fuera de la Provincia, aunque con valores siempre por debajo del LMR. En cambio, no se detectaron residuos en las muestras oriundas de la zona. La toxicidad crónica potencial de este compuesto y la presencia de contaminación en muestras no producidas localmente, sugieren la necesidad de control de residuos de éste y otros plaguicidas en los vegetales consumidos en la región.

ABSTRACT

The relevance of the systematic study of toxic substances in food is related with the fact that chemical contaminants have more toxicological magnitude than the isolated compounds due to interactions. Pesticide residues in foods are founded among these substances. Ethylenebisdithiocarbamates fungicides are used for the treatment of various plant pests. Zineb, zinc EBDC used in the Central and Northern area from Argentina, is considered by itself or through its metabolites as a potential carcinogen, mutagenic and teratogenic agent. The aim of the present work was to detect the presence of residues of Zineb in tomatoes sold in Santa Rosa, comparing these values with the maximum residue limit (MRL) set by SENASA. The method of Keppel was used to spectrophotometrically quantify the CS₂ obtained by thermal decomposition of the samples. The results showed that Zineb contamination was found in samples from supermarkets, being some values near the MRL established in Argentina. No residue levels were detected in samples originated in the local production. These results suggest that positive contamination is founded in vegetables not produced locally and indicate that more control is needed.

ÍNDICE

1. Introducción	Pág.1
1.1. Enfermedades de los tomates: Hongos.	Pág.5
1.2. Metabolismo de xenobióticos y toxicidad	Pág.10
1.2.1. Generalidades	Pág.10
1.2.1.1. Absorción	Pág.10
1.2.1.2. Distribución	Pág.11
1.2.1.3. Biotransformación	Pág.11
1.2.1.4. Eliminación	Pág.12
1.2.2. Metabolización y toxicidad del Zineb en mamíferos	Pág.12
1.2.2.1. Efectos agudos	Pág.13
1.2.2.2. Efectos crónicos	Pág.13
1.2.2.3. Efectos reproductivos	Pág.15
1.2.2.4. Efectos teratogénicos	Pág.15
1.2.2.5. Efectos mutagénicos	Pág.16
1.2.2.6. Efectos carcinogénicos	Pág.17
1.3. Persistencia del Zineb en el ambiente y sus Efectos ecológicos	Pág.18
1.3.1. Descomposición en suelos, agua y vegetación	Pág.18
1.3.2. Efectos sobre la fauna	Pág.18
1.4. Descripción general y propiedades del formulado	Pág.19
1.4.1. Identificación de la empresa y del producto	Pág.19
1.4.2. Propiedades físicas y químicas	Pág.19
1.4.3. Identificación del riesgo	Pág.20
1.4.4. Primeros auxilios	Pág.20
1.5. Técnicas para la determinación de los EBDC	Pág.20
1.6. Relevamiento previo de residuos del Zineb	Pág.21
1.7. Hipótesis del trabajo	Pág.21

2. Objetivos	Pág.23
2.1. Objetivo general	Pág.23
2.2. Objetivos específicos	Pág.23
3. Materiales y métodos	Pág.24
3.1. Materiales y reactivos utilizados	Pág.24
3.2. Fundamento de la técnica analítica (método de Keppel)	Pág.25
3.3. Plan de muestreo	Pág.26
3.3.1. Esquema de muestreo	Pág.27
3.4. Procedimiento del análisis	Pág.28
3.4.1 Esquema del procedimiento	Pág.30
3.5. Preparación de soluciones patrón CS₂ y curva	
De calibrado	Pág.31
3.5.1 Solución madre	Pág.31
3.5.2. Solución estándar (intermedia)	Pág.31
3.5.3. Preparación de la curva de calibrado	Pág.31
3.6. Calibración del método	Pág.32
4. Resultados y discusiones	Pág.33
4.1. Curva de calibrado	Pág.33
4.2. Calibración del método	Pág.34
4.3. Límite de detección y de cuantificación del método	Pág.35
4.4. Análisis de residuos del Zineb	Pág.36
5. Conclusiones	Pág.38
5.1. Calibración del método	Pág.38
5.2. Límite de detección y de cuantificación del método	Pág.38
5.3. Análisis de residuos del Zineb	Pág.38
6. Bibliografía	Pág.42

7. Apéndice	Pág.47
7.1. Calibración del método	Pág.47
7.2. Glosario	Pág.49
7.3. Abreviaturas	Pág.50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula molecular de grupos de fungicidas.	Pág.3
Figura 2. Estructura química del Zineb.	Pág.4
Figura 3. Estructura química de la ETU.	Pág.4
Figura 4: Sitios de acción de los fungicidas en la célula del hongo.	Pág.5
Figura 5: Oídio.	Pág.6
Figura 6: Podredumbre gris.	Pág.6
Figura 7: Podredumbre blanca.	Pág.7
Figura 8: Mildiu.	Pág.7
Figura 9: Alternariosis.	Pág.8
Figura 10: Fusarium.	Pág.8
Figura 11: Verticilium.	Pág.9
Figura 12: Caída de plántulas.	Pág.9
Figura 13: Formulación comercial utilizada en la tesina.	Pág.19
Figura 14: Ecuación química de la generación de CS₂ a partir de la descomposición del fungicida.	Pág.25
Figura 15: Formación del complejo a determinar. espectrofotométricamente.	Pág.25
Figura 16: Diagrama de muestreo.	Pág.28
Figura 17: Fotografía del equipo armado para la determinación de CS₂	Pág.29
Figura 18: Trampa SH₂	Pág.29
Figura 19: Trampa CS₂	Pág.29

Figura 20: Esquema del procedimiento.	Pág.30
Figura 21: Ecuación del desvío estándar de la muestra blanco.	Pág.32
Figura 22: Curva de calibración de CS₂	Pág.33
Figura 23: Curva de calibración de CS₂ luego de ajuste por regresión lineal.	Pág.35
Figura 24: Ecuación del desvío estándar de una muestra.	Pág.37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de plaguicidas según especie a combatir.	Pág.2
Tabla 2: Reactivos utilizados en la tesina.	Pág.24
Tabla 3: Materiales utilizados en la tesina.	Pág.24
Tabla 4: Equipamiento utilizado en la tesina.	Pág.24
Tabla 5: Comercios muestreados en Santa Rosa.	Pág.26
Tabla 6: Norma IRAM 23003 - 1. Número de muestras primarias a tomar según unidades de tomate por lote.	Pág.27
Tabla 7: Valores de la curva de calibración del patrón de CS₂.	Pág.33
Tabla 8: Valores medios y varianzas de los patrones de la curva de calibración.	Pág.34
Tabla 9: Valores utilizados en cálculos estadísticos.	Pág.34
Tabla 10: Resultados obtenidos luego de los análisis.	Pág.36

1. INTRODUCCION

El estudio sistemático de las sustancias tóxicas o potencialmente tóxicas de los alimentos es de relevancia en la actualidad ya que los contaminantes químicos alimentarios tienen una dimensión toxicológica más compleja que los mismos productos aislados. Esto es debido, entre otros aspectos, a las posibles interacciones con los restantes constituyentes.

Entre ellos, se encuentran los residuos de plaguicidas en alimentos, que se clasifican con propósito regulatorio como aditivos no intencionales o incidentales¹, teniendo entonces límites máximos residuales (LMR) permitidos y otras regulaciones relacionadas con su uso y aplicación como tiempos de carencia (TC), dosificación, etc.

Los plaguicidas llevan al menos 3.000 años siendo utilizados por el hombre para controlar organismos no deseados, como insectos, hierbas, hongos, bacterias, etc.¹ Estos compuestos son requeridos globalmente para la producción de alimentos y permanecen como residuos en alimentos de origen vegetal y animal, así como en el aire y en el agua.²

Según la OMS, un plaguicida es cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, producción de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, también aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.³

Los plaguicidas están sujetos a diversas clasificaciones, y la más común de ellas es según la especie a combatir (Tabla 1), donde encontramos entre los más utilizados a los Insecticidas Minerales, Herbicidas (hierbas), **Fungicidas** (hongos) y Rodenticidas (roedores).⁴

Evaluación de residuos de Zineb (fungicida de contacto) en vegetales consumidos en la ciudad de Santa Rosa, La Pampa

INSECTICIDAS MINERALES	Minerales	Compuestos arsenicales Compuestos fluorados Azufre Derivados del selenio
	Orgánicos de síntesis	Organofosforados Organoclorados Carbamatos
	A base de aceites minerales	Aceites antracénicos Aceites de petróleo
	De origen vegetal	Nicotina Piretrina Rotenona
HERBICIDAS	Minerales	Sales de NH_4^+ , Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{+++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ , en forma de sulfatos, nitratos, cloruros, cloratos.
	Orgánicos	Fitohormonas Derivados de la urea Triazinas y Diazinas Derivados de los fenil sustituidos y las quinoxalinas Derivados de la oxiquinoleína Derivados de las tiadizinas y tiadiazoles
	Otros	Parquat Diquat Piclorame
FUNGUICIDAS	Minerales	Sales de cobre Compuestos arsenicales Aceites minerales
	Organometálicos	Derivados organomercuriales
	Orgánicos	Carbamatos y ditiocarbamatos Derivados del benceno Amicidas Benzonitrilos
RODENTICIDAS	Derivados cumarínicos	Warfarinas Sales de talio
	Inorgánicos	

Tabla 1 - Clasificación de plaguicidas según especie a combatir

Los fungicidas son agentes químicos capaces de proteger a los vegetales de la acción patógena de los hongos. Una clasificación de los fungicidas se basa en su modo de acción; donde se pueden encontrar fungicidas sistémicos (son absorbidos por los tejidos vegetales y traslocados en la planta), y fungicidas de contacto (no penetran los tejidos vegetales).⁴

Los fungicidas de contacto generan una barrera protectora en la superficie foliar contra el desarrollo de hongos. Se espera que sean efectivos con baja toxicidad para la planta y toxicidad selectiva para el hongo; que tengan una buena penetración en el hongo para llegar a su sitio de acción y que generen un depósito protector en la superficie del vegetal, resistente a factores climáticos como luz, humedad, viento, etc.⁵

Dentro de esta clase de fungicidas, tenemos grupos de compuestos (Fig. 1) como quinonas (Diclona, Ditianona), ditiocarbamatos (Tiram, Ziram, Ferbam), y etilenbisditiocarbamatos (**Zineb**, Propineb, Maneb, Mancozeb, Metiram).⁴

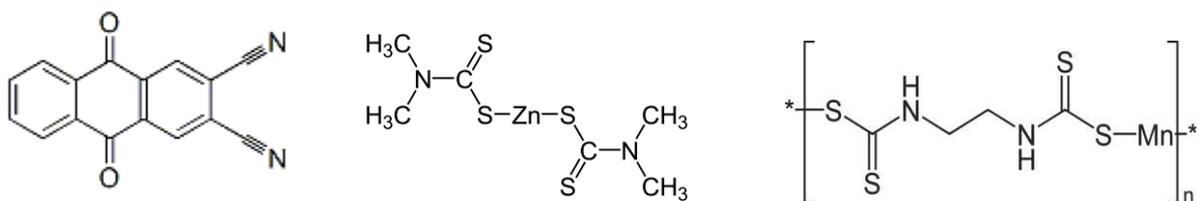


Figura 1 – a) Quinonas: Ditianona. b) Ditiocarbamatos: Ziram. c) Etilenbisditiocarbamatos: Maneb

Los fungicidas etilenbisditiocarbamatos (EBDC) son ampliamente utilizados en el tratamiento de diversas plagas vegetales. Aunque son considerados de baja toxicidad, deben tenerse en cuenta su toxicidad crónica y subcrónica. Además, los EBDC se degradan produciendo etilentiourea (ETU), un metabolito con capacidad carcinogénica, teratogénica y mutagénica en diferentes bioensayos y en modelos animales.⁶

Los EBDC se obtienen por síntesis mediante la reacción de la etilendiamina con sulfuro de carbono en medio alcalino (NaOH o NH₄OH). También se pueden obtener por reacción directa de la etilendiamina con sulfuro de carbono y óxido de zinc, en presencia de

amoníaco en frío y con agitación.⁶

El Zineb (Fig. 2), etilen-1,2-bis- ditiocarbamato de zinc, es un fungicida orgánico de contacto de la clase de los EBDC.⁷

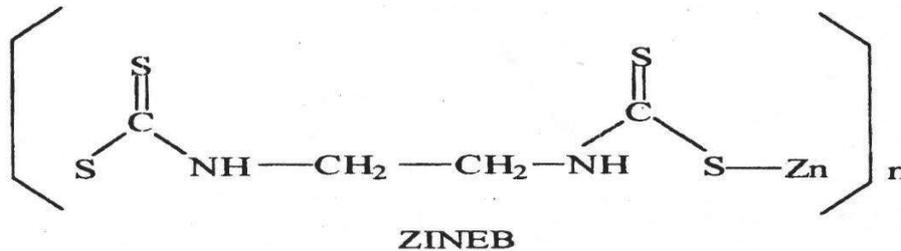


Figura 2 – Estructura química del Zineb

La acción fungicida de estos se atribuye a la precipitación del metal pesado que contiene o a la liberación de sulfuro de hidrogeno por hidrólisis, lo que podría ocasionar alteraciones en enzimas vitales del patógeno.⁷

El Zineb se utiliza mundialmente desde hace más de 60 años para el control de enfermedades causadas por alrededor de 400 hongos.⁵ Se aplica en frutas, verduras, plantas ornamentales, granos, papas, zanahorias, cebollas, tomates, coliflor, lechuga, cítricos y vid, entre otros.^{2,8-10} La DL₅₀ oral en ratas es mayor a 2500 mg/kg, indicando baja toxicidad aguda por ingestión. En cambio, las DL₅₀ inhalatoria y dérmica en ratas y conejo respectivamente indican un peligro agudo moderado.⁸

En general, es un producto seguro aunque con capacidad de causar irritación en vías respiratorias, piel y ojos, principalmente por manipuleo incorrecto.¹⁰

La ETU (Fig. 3) es un producto de la degradación del Zineb en condiciones de humedad y altas temperaturas. Este derivado tiene una DL₅₀ oral en rata de 1832 mg/kg, además de ser carcinogénico y teratogénico. La ETU podría formarse por simple aireación o durante la cocción de los vegetales tratados, lo que implica un riesgo de exposición por el uso continuado del producto.^{7,11}

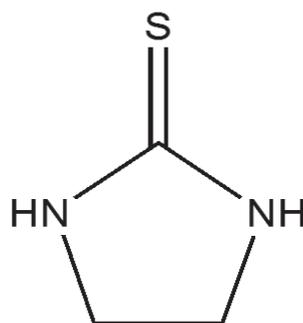


Figura 3 – Estructura química de la ETU

El Zineb se formula como polvo mojable azul, con una composición porcentual de alrededor del 60% de principio activo; es insoluble en agua y en una amplia variedad de solventes orgánicos.⁷

1.1. ENFERMEDADES DE LOS TOMATES: HONGOS

Los hongos constituyen un grupo diverso de organismos unicelulares o pluricelulares que se alimentan mediante la absorción directa de nutrientes. Los alimentos se disuelven mediante enzimas que secretan los hongos; después se absorben a través de la fina pared de la célula y se distribuyen por difusión simple en el protoplasma.⁴

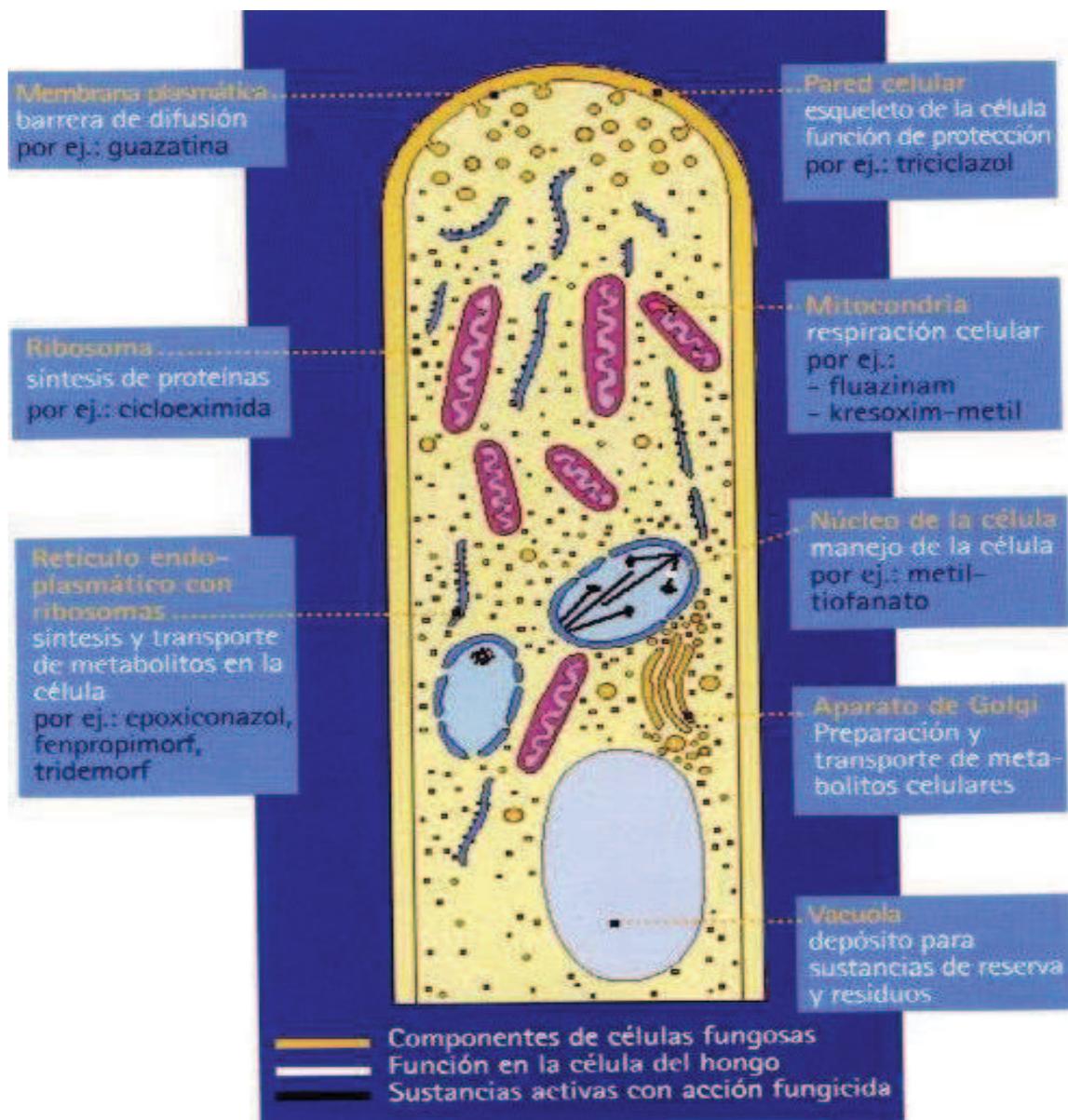


Figura 4 - Sitios de acción de los fungicidas en la célula del hongo.

En cultivos de tomates, podemos encontrar diversas enfermedades ocasionadas por hongos, virus, bacterias; así como también alteraciones ocasionadas por factores físicos, químicos, y mecánicos.¹³

Dentro de las enfermedades ocasionadas por hongos, podemos detallar las siguientes:

Oídio, Ceniza u Oidiopsis (*Leveillula taurica*)



Figura 5 – Oídio sobre la hoja del tomate.

Se manifiesta por manchas amarillas en el haz que se necrosan por el centro, observándose un polvillo blanquecino (Fig.5). En caso de fuerte ataque la hoja se seca y se desprende, provocando importantes defoliaciones.¹³

Podredumbre gris o Botritis (*Botrytis cinerea*)



Figura 6 - Podredumbre gris sobre el fruto del tomate.

En hojas y flores se producen lesiones pardas. En frutos se produce una podredumbre blanda, en los que se observa el micelio gris del hongo (Fig. 6).¹³

Podredumbre blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*)



Figura 7 - Podredumbre blanca en planta del tomate.

En planta produce una podredumbre blanda, acuosa en primera instancia, que posteriormente se seca dependiendo de la intensidad de los tejidos afectados, cubriéndose de un abundante micelio algodonoso blanco (Fig. 7), observándose la presencia de numerosos esclerocios, blancos al principio y posteriormente negros.¹³

Mildiu (*Phytophthora infestans*)



Figura 8 – Mildiu en hojas del tomate.

En hojas aparecen manchas irregulares de aspecto oleoso al principio que rápidamente se necrosan e invaden casi todo el foliolo (Fig. 8). Alrededor de la zona afectada se observa un pequeño margen que, en presencia de humedad y en el envés, aparece un fieltro blancuzco.¹³

En tallo, aparecen manchas pardas que aumentan su tamaño y que suelen circundarlo.¹³

Afecta a frutos inmaduros, manifestándose como grandes manchas pardas, vítreas y superficie y contorno irregular. Las infecciones suelen producirse a partir del cáliz, por lo cual los síntomas cubren la mitad superior del fruto.¹³

Alternariosis del tomate (*Alternaria solani*)



Figura 9 – Alternariosis en hoja del tomate.

En hoja se producen manchas pequeñas circulares o angulares, con marcados anillos concéntricos (Fig. 9). En tallo y pecíolo se producen lesiones negras alargadas, en las que se pueden observar a veces anillos concéntricos. Los frutos son atacados a partir de las cicatrices del cáliz, provocando lesiones pardo-oscuras ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas del hongo.¹³

Fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*)



Figura 10 – Fusarium en el ápice del tomate.

Comienza con la caída de pecíolos de hojas superiores. Las hojas inferiores amarillean avanzando hacia el ápice y mueren.¹³

También puede ocurrir que se produzca un amarilleo que comienza en las hojas más bajas y que termina por secar la planta. Si se realiza un corte transversal al tallo se observa un

oscurecimiento de los vasos (Fig. 10). El hongo puede permanecer en el suelo durante años y penetra a través de las raíces hasta el sistema vascular.¹³

Verticilium (*Verticillium dahliae*)



Figura 11 – Verticilium en raíces de la planta de tomates.

Produce los mismos síntomas que *Fusarium* y es necesario su estudio en laboratorio para confirmar que se trata de *Verticillium dahliae*. La penetración se realiza en el suelo, favorecida por heridas en las raíces (Fig. 11).¹³

Caída de plántulas o Damping-off



Figura 12 - Caída de plántulas de tomates.

En semilleros, los hongos de las raíces causan gran mortandad en plántulas recién germinadas. A nivel del cuello quedan ennegrecidos y se doblan cayendo sobre el sustrato

(Fig. 12). Los causantes son *Fusarium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*. La infección se expande con rapidez por todo el semillero.¹³

1.2. METABOLISMO DE XENOBIOTICOS Y TOXICIDAD

1.2.1. Generalidades

1.2.1.1. Absorción

Una sustancia ajena al organismo, o xenobiótico, usualmente debe absorberse e ingresar al torrente sanguíneo antes de producir un efecto adverso, a menos que pueda actuar tópicamente (como es el caso de un ácido o un producto cáustico) y para ello, debe darse anteriormente la exposición al tóxico.

Las principales rutas de exposición son las vías respiratorias, la oral y la dérmica.¹⁴ Las sustancias absorbidas por vía respiratoria generalmente son gases, vapores de líquidos volátiles, aerosoles, etc, en el que el tamaño medio de partícula en el aerosol juega un rol determinante en la toxicidad. A menor tamaño, mayor será la toxicidad, por alcanzar zonas más profundas del árbol alveolar. Afortunadamente, la capacidad de excreción de material particulado de los pulmones es eficiente y remueve una gran parte de la carga total de polvos que entran durante el transcurso de una vida.¹⁴

El sistema digestivo puede visualizarse como un tubo que recorre todo el cuerpo. La absorción puede producirse en cualquier sitio a lo largo del TGI, desde la boca hasta el recto. Si el tóxico es un ácido o una base débil, se absorberá por difusión en aquella zona del tracto donde el pH asegure la máxima concentración de la forma no ionizada, la más liposoluble. Dado que el jugo gástrico es muy ácido y que el contenido intestinal es prácticamente neutro, veremos que la absorción de un tóxico puede ser marcadamente distinta según qué zona del TGI sea considerada. Un ácido débil alcanza su máxima proporción de forma neutra en el estómago (menor pH) y por lo tanto será mayormente absorbido allí. Por el contrario, una base débil se absorberá preferentemente en el intestino (mayor pH). Por otra parte, este análisis no contempla la capacidad del intestino delgado para absorber ácidos orgánicos débiles: debido a su gran área absorptiva respecto a la del estómago, la cantidad absoluta de sustancia que finalmente pasa es grande, aún cuando la forma no ionizada es proporcionalmente menor.¹⁴

Además, hay que tener en cuenta los factores capaces de alterar la absorción gastrointestinal de tóxicos. Por ej. Las membranas celulares se labilizan en presencia de EDTA, debido al secuestro de iones calcio, aumentando la permeabilidad hacia todo tipo de compuestos.¹⁴

La piel humana no es demasiado permeable, por lo tanto es una barrera eficiente contra el ingreso de tóxicos desde el exterior. Sin embargo, algunas sustancias pueden absorberse en cantidad suficiente como para resultar tóxicas: como puede observarse en casos mortales de intoxicaciones con organofosforados absorbidos por piel. Para que un tóxico ingrese de este modo deberá atravesar las células de la epidermis, o las células de glándulas sudoríparas, sebáceas, o entrar por los folículos capilares. De estas posibilidades, la más relevante cuantitativamente es el pasaje por las células epidérmicas que están en mucho mayor número (las glándulas y folículos se encuentran relativamente dispersos). Un tóxico debe atravesar primero la densa capa de células epidérmicas queratinizadas, luego la capa germinal de la epidermis, siguiendo por el dermis hasta llegar a la circulación capilar. Esto implica un gran número de células, contrariamente al caso de la absorción oral o pulmonar, donde las capas a pasar son sólo dos.¹⁴

1.2.1.2 Distribución

Luego de ingresar al torrente sanguíneo, el xenobiótico está disponible para su distribución en todo el organismo. Ésta dependerá fundamentalmente de su capacidad para atravesar membranas y de su afinidad por distintas moléculas endógenas. Algunos compuestos no pueden atravesar las membranas fácilmente, limitando así su distribución. Otros se acumulan en diferentes partes del cuerpo como resultado de una fuerte afinidad físico-química, transporte activo o alta liposolubilidad. Además, estos sitios pueden o no ser los lugares donde finalmente se ejerza la acción tóxica.¹⁴

1.2.1.3. Biotransformación

Una vez que el tóxico es distribuido en un ser vivo (sea hombre o animal), sufrirá procesos de biotransformación (toda modificación en su estructura química producida *in vivo*) generando productos más o menos activos o inactivos biológicamente.¹⁴

Si bien el hígado es el órgano más activo en la biotransformación de sustancias extrañas al organismo, otros tejidos cuentan con sistemas enzimáticos con capacidad metabolizante como las esterases plasmáticas o las enzimas en riñón, pulmón y TGI. La biotransformación es a menudo un requisito para la excreción renal de tóxicos muy

liposolubles y que de otro modo se reabsorberían en los túbulos renales luego de su filtración.¹⁴ Esto se logra disminuyendo la liposolubilidad de los tóxicos a través de transformaciones químicas catalizadas por enzimas que introducen grupos polares. Estas transformaciones son las llamadas “reacciones de Fase I” (oxidaciones, reducciones o procesos de hidrólisis) y “reacciones de Fase II” (reacciones de conjugación, por medio de enzimas que combinan los xenobióticos o sus metabolitos provenientes de la Fase I, con otras moléculas endógenas de bajo peso molecular).¹⁴

1.2.1.4. Eliminación

Luego de su metabolización, los tóxicos pueden ser eliminados por diferentes rutas. El riñón es considerado el órgano de excreción más importante; sin embargo existen otras vías alternativas para compuestos particulares. Por ej., el plaguicida DDT y el plomo se eliminan fundamentalmente por el sistema hígado-bilis y el monóxido de carbono es excretado por los pulmones. Todas las secreciones tienen la capacidad de excretar sustancias extrañas, y es así que se pueden encontrar sustancias tóxicas en el sudor, las lágrimas y la leche.¹⁴

1.2.2. Metabolización y Toxicidad del Zineb en mamíferos

Las rutas principales de exposición al Zineb son la vía dérmica, la oral y la respiratoria.¹⁶ Todas ellas están relacionadas generalmente con el manipuleo incorrecto del producto, sin las barreras de contención adecuadas¹⁵ y se dan principalmente durante la aplicación del formulado o con la ingestión accidental de alimentos contaminados.¹⁴

La vía oral es la principal vía de absorción¹⁴, aunque se estima que sólo 11-17% de una dosis oral del Zineb es absorbida por el TGI de una rata.¹⁶

El Zineb es transportado por el sistema circulatorio, generalmente unido a proteínas plasmáticas, dañando el Sistema Nervioso Central.^{2,45,16}

En tejidos mamíferos es biotransformado a metabolitos reactivos de mayor toxicidad como la ETU y CS₂¹⁶; y además puede unirse a varios metales divalentes, formando complejos de mayor lipofilia, aumentando su capacidad de ingresar al Sistema Nervioso Central.⁴⁵ Además, se ha observado su capacidad de causar daño en riñón e hígado.^{2,45,16}

Respecto a su excreción, se estima que luego de su ingestión, alrededor del 70% de una dosis ingerida de Zineb es rápidamente excretada por vía renal.⁴⁵

1.2.2.1. Efectos agudos

Estudios llevados a cabo en roedores, indican que luego de la administración de una dosis elevada de Zineb los animales presentan incoordinación, hiperactividad seguida de inactividad y pérdida de tono muscular y de cabello.^{16,17} En otro estudio donde se utilizaron ovejas, se observó que una dosis de 500 mg/kg les produjo la muerte luego de tres semanas.¹⁷

Se ha determinado que las formulaciones de Zineb en polvo o en spray resultan moderadamente irritantes a la piel, ojos y membranas de la mucosa respiratoria. Además, la aplicación conjunta con maneb y mancozeb puede producir sensibilización dérmica, generando un cuadro de picazón, problemas de garganta, estornudos, tos, inflamación y bronquitis.^{17,18}

Observaciones en humanos incluyen cansancio, mareo y debilidad general entre los síntomas tempranos de exposición al Zineb. Sin embargo, los síntomas más severos encontrados incluyen jaquecas, náusea, fatiga, dificultad en el habla, convulsiones e inconsciencia.^{16,17}

El Zineb inhibe a una enzima fundamental en el metabolismo hepático del etanol. La inhibición de la acetaldehído deshidrogenasa produce una rápida e intensa resaca luego del consumo de alcohol etílico. Estos síntomas asociados a la acumulación de acetaldehído en la sangre forman parte del conocido “efecto Antabuse®” y es la base del tratamiento del alcoholismo crónico con disulfiram.^{8,16,19}

Además de la toxicidad del Zineb se debe tener en cuenta a uno de sus metabolitos, el sulfuro de carbono, que posee una toxicidad aguda mayor.^{8,16} A altas concentraciones, este metabolito puede poner en riesgo la vida, debido a sus efectos sobre el sistema nervioso; así como también puede causar quemaduras en la piel por contacto dérmico.²⁰

1.2.2.2. Efectos crónicos

Algunos plaguicidas son un factor muy importante asociado con la etiología de desordenes neurodegenerativos humanos, como la Enfermedad de Parkinson. Este es caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro medio; y es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, después del Mal de Alzheimer.^{2,21,22}

La etiología del Mal de Parkinson esta relacionada con múltiples variables como la edad y factores hereditarios. Además, estudios epidemiológicos relacionan la exposición a plaguicidas con la incidencia de este desorden neurológico. Los humanos se encuentran expuestos diariamente a mezclas complejas de compuestos tóxicos, en ambientes

residenciales y ocupacionales. Esta exposición incluye particularmente a los plaguicidas, que a veces son utilizados en grandes cantidades indiscriminadamente, o se aplican dosis mayores a las recomendadas por el fabricante.²

Muchos de los plaguicidas utilizados en nuestro país (entre ellos el Zineb) ejercen sus efectos tóxicos a través de mecanismos de estrés oxidativo (EO), generando especies reactivas de oxígeno (ERO) o nitrogenadas que afectan los niveles antioxidantes e inhiben la actividad de enzimas relevantes para las células.²

Uno de los blancos más importantes del Zineb es el Sistema Nervioso Central, ya que es altamente sensible a los daños por radicales libres. Una razón por la cual neuronas que contienen dopamina son extremadamente vulnerables al EO, se basa en la presencia de una alta densidad de células microgliales en reposo en la sustancia negra del cerebro medio (comparada con otras regiones del cerebro).²

Otros órganos blancos del Zineb son el hígado, riñón y plasma, que también resultan afectados por un aumento importante en el nivel de EO.²

La exposición inhalatoria ocupacional al Zineb puede llevar a cambios en las enzimas hepáticas, anemia moderada y otros cambios en sangre, incrementando los síntomas de envenenamiento durante el embarazo, y cambios cromosomales en linfocitos.¹⁷ Reportes de otros autores indican modificaciones en el funcionamiento del hígado, en parámetros sanguíneos y anemia moderada por exposición ocupacional.¹⁶ Un estudio que duró 5 meses, demostró que concentraciones de 20 y 200 mg/l de Zineb causan disminución en la actividad de la colinesterasa, una enzima esencial del sistema nervioso. Además, la exposición inhalatoria puede crear una disminución en el tamaño de los conductos bronquiales y una exposición dérmica prolongada puede causar dermatitis o conjuntivitis.^{16,17}

Anteriormente se hizo mención al metabolismo del Zineb, haciendo hincapié en la importancia de la biotransformación (Reacciones de Fase I y II) de este compuesto. Uno de los sistemas enzimáticos que cataliza las reacciones de Fase I, las monooxigenasas microsomales, disminuyen notablemente su actividad ante altos niveles de Zineb. Diversos autores concluyeron que esto se debe a la desnaturalización del citocromo P450, y la inhibición de la actividad de la NADPH citocromo c reductasa. En la experiencia realizada, tratamientos con concentraciones mayores a $2,5 \cdot 10^{-5}$ M de Zineb causaron decrecimientos significativos en los niveles del citocromo P450 y citocromo b5 y además, concentraciones de Zineb entre $2,5 \cdot 10^{-4}$ y $2,5 \cdot 10^{-3}$ M inhibieron significativamente la actividad de la NADPH citocromo c reductasa.¹¹

Como se expresó anteriormente, la ETU es un compuesto derivado de la descomposición de los EBDC con propiedades toxicológicas adversas. Posee una baja toxicidad aguda, pero en estudios en animales de experimentación evidenció tener propiedades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas. El aspecto más importante de su toxicología es su acción sobre la glándula tiroidea, causando hiperplasia y un decrecimiento en los niveles hormonales de la misma.^{2,16,24,25} Estudios en ratas demostraron que una exposición dietaria a bajas cantidades del Zineb o ETU, durante un periodo corto de 5 días, resultaron en alteraciones estadísticamente significativas de la glándula tiroidea, por medio de los valores de actividad de la tiroxina, triyodotironina, tiroxina libre y hormona estimulante de la tiroidea, en sangre.²⁵ Otros estudios en animales concuerdan con estos resultados, mostrando una rápida reducción en la incorporación de iodo e hinchazón de la glándula tiroidea, luego de la exposición al Zineb.^{16, 24, 25}

Además, se sabe que el Zineb es nocivo para hígado y músculos.^{2, 16} En un estudio realizado con ovejas expuestas al Zineb, y en el que murieron luego de una exposición a dosis orales del Zineb de 500 mg/kg.día durante tres semanas, se observaron lesiones en riñón e hígado.¹⁶

1.2.2.3. Efectos reproductivos

Se han observado daños en fetos y efectos adversos en el sistema reproductor de mujeres embarazadas expuestas al Zineb.^{16, 26}

En estudios en animales, una única inyección intraperitoneal de aproximadamente 160 mg/kg del Zineb en ratones, durante el segundo estadio de preñez, resultó en abortos y crías débiles. Al suministrárseles dosis orales de Zineb a razón de 100 mg/kg.día durante 2 meses, se observaron esterilidad, reabsorción de fetos, y colas anormales en las crías.^{16,17} Además, luego de la ingestión oral de Zineb, se encontraron concentraciones similares de ETU en tejidos maternos y fetales de ratas.¹⁶

1.2.2.4. Efectos teratogénicos

Estudios realizados en ratas a las que se suministraron dosis orales de 200 mg/kg.día de Zineb, en los días 11 o 13 de preñez, mostraron una alta incidencia en malformaciones del esqueleto y defectos en el cierre del tubo neural de las crías (tubo embriónico que desemboca en el cerebro y en la médula espinal).²⁷ Otro trabajo indica que una única dosis oral muy alta de 8000 mg/kg en ratas, en el día 11 de gestación, produjo numerosas deformidades en la cría.¹⁶ Los efectos teratogénicos también fueron evaluados en ratones,

a través de inyecciones intraperitoneales de 150 mg/kg.²⁸ En ratas preñadas que fueron alimentadas con 5 mg/kg.día, se observó un endurecimiento retrasado en el cráneo de las crías.²⁶

El metabolito del Zineb, la ETU, puede causar un desarrollo anormal del feto.²⁶ La teratogénesis potencial de este compuesto es específica sobre ratas, mientras que en ratones preñados, hámsters y gatos, produce teratogénesis limitada, o no la produce, excepto a dosis muy altas. Además, la ETU puede reaccionar con nitritos y formar N - nitroso - ETU, que es un compuesto mutagénico y teratogénico.²⁴

1.2.2.5. Efectos mutagénicos

Tanto el Zineb como la ETU, pueden ser considerados como agentes mutagénicos débiles.¹⁷

A pesar de que el Zineb es considerado por la IARC como un agente no mutagénico en sistemas bacterianos, esto no implica necesariamente que este ditiocarbamato no dañe directamente el material genético. A favor de esta presunción, hay reportes de inducción de mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas en linfocitos de trabajadores expuestos ocupacionalmente al Zineb, y un informe reciente de su habilidad para inducir aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos *in vitro*.⁹

En estudios de cultivos *in vitro*, se ha observado que tanto el Zineb como su formulación comercial, causan un incremento significativo en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), alteraciones en la cinética de proliferación celular y en el índice mitótico, tanto en células de ovarios de hámsters Chinos (CHO) como en linfocitos humanos. Ambos originan rupturas simples de cadena en el ADN de células CHO y promueven la inducción de micronúcleos en linfocitos humanos cultivados *in vitro*. Sin embargo, las células CHO fueron eficientes en la reparación total del daño previamente inducido por estos compuestos.²³ Otra característica es la inducción de mitosis anormales, evidenciando el efecto deletéreo ejercido por el Zineb, el cual puede estimular procesos aneugénicos.

En presencia de un sistema antioxidante (por ej., vitamina E) incorporado a los cultivos de células CHO junto con los plaguicidas, se observó una disminución significativa de la frecuencia de ICH. Contrariamente, la incorporación de vitamina E no modificó el daño inducido en la cinética de proliferación celular ni la actividad mitótica provocada por ambos compuestos.

Estos hallazgos indican que el efecto deletéreo estaría mediado parcialmente por la

liberación/producción de ERO. Ambos compuestos mostraron el mismo patrón de daño en todos los análisis, sugiriendo que el efecto producido por la formulación comercial estaría causado por el principio activo presente en la misma, descartando la posibilidad de la presencia de otro agente inductor de daño constituyente de la composición comercial.²³

Otros estudios demuestran que el Zineb es un agente no mutagénico cuando se lo emplea en ensayos con *Salmonella typhimurium*, mientras que se obtienen resultados positivos para ensayos de mutaciones puntuales y conversión de genes cuando se evaluó en *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*. El Zineb ejerce citotoxicidad relacionada con altas dosis en células de ratón BALB/c 3T3 *in vitro*, pero sólo en ausencia de un sistema de metabolización exógeno. Además, se ha reportado al Zineb como un posible agente genotóxico en células somáticas y microbianas en *Drosophila*. Además, luego de su administración subcutánea en ratones y ratas, se observaron carcinomas en el retículo celular sistemático y una variedad de sarcomas, respectivamente.⁹

1.2.2.6. Efectos carcinogénicos

La información disponible acerca del Zineb indica que a bajas dosis el compuesto no es carcinogénico. Sin embargo, dosis muy altas de este compuesto causaron tumores en algunos animales. Dosis orales de 3500 mg/kg.semana, durante 6 semanas, produjeron tumores benignos en ratones.¹⁶

Como se expuso anteriormente, el Zineb (al igual que todos los EBDC), puede ser degradado y metabolizado en ETU^{6,7,29,30}, que ha sido clasificado como un probable carcinógeno humano por la USEPA.^{29,30}

En estudios realizados sobre ratones alimentados con dosis de 32,3 mg ETU/kg.día durante 80 semanas, se observó un aumento en la incidencia de tumores hepáticos. En ratas alimentadas durante 2 años con dosis de 0,1; 1,25; 6,25; 12,5 y 25 mg ETU/kg.día, se observó un aumento de tumores en la glándula Tiroides a partir de la dosis de 12,5 mg ETU/kg. Ratones hembra alimentados durante 2 años con dosis de 16,7 y 50 mg ETU/kg.día mostraron un 58 y 96% de incidencia de tumores hepáticos malignos, respectivamente. En el mismo estudio, se produjo un aumento importante en la incidencia de tumores de la glándula Tiroides para la dosis mayor.²⁹

Estos resultados, indican que el Zineb presenta la capacidad de producir daño no sólo al ADN de los diferentes tipos celulares estudiados, sino que además, produce efectos deletéreos en otros blancos celulares. De este modo, su uso masivo podría comprometer la salud de los organismos expuestos a estos plaguicidas ditiocarbámicos, entre ellos, los

seres humanos. Es por esto que, varios autores concluyen que la clasificación propuesta por las organizaciones internacionales tales como la Agencia Internacional para la Investigación contra el Cáncer (IARC), o la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) minimizando el riesgo carcinogénico del Zineb para los humanos, debería ser reevaluada en un futuro próximo y en consecuencia, regular el uso de este plaguicida.²³

1.3. PERSISTENCIA DEL ZINEB EN EL AMBIENTE Y SUS EFECTOS ECOLOGICOS

1.3.1 Descomposición en suelos, agua y vegetación

El Zineb está sujeto a descomposiciones químicas, como la hidrólisis, y su persistencia en el suelo es baja. Es adsorbido fuertemente a las partículas de suelo y usualmente no se mueve hacia las capas freáticas del mismo.³¹ Por esta razón, es poco probable que el Zineb pueda contaminar aguas subterráneas³², además de ser prácticamente insoluble en agua.³³ Es inestable e hidroliza rápidamente, produciendo ETU y otros compuestos.³²

En un estudio realizado a campo, luego de 4 meses de aplicado el Zineb sobre un cultivo de alfalfa, se perdió el 99.7% del producto aplicado.³² La ETU fue detectada en sólo una de 1295 muestras de agua potable de pozo testeadas, con una concentración de 0.016 mg/l.²⁹

El Zineb es generalmente no-tóxico para las plantas, excepto las variedades sensibles al zinc, como tabaco y cucurbitáceas. En algunos casos se han encontrado ligeros daños en peras.¹⁷ La ETU es el mayor metabolito del Zineb presente en plantas.³³

1.3.2. Efectos sobre la fauna

El Zineb es prácticamente no-tóxico en aves. La DL₅₀ del Zineb en patos reales y faisanes jóvenes es mayor que 2000 mg/kg.³⁴ Sin embargo, es moderadamente tóxico en peces. La concentración letal 50 (CL₅₀) de 96 horas en peces es 2 mg/l.^{17, 33}

El Zineb es no-tóxico en abejas.^{17, 33} Un estudio realizado en huertos de Nueva Escocia con las dosis de Zineb recomendadas, no se observó una reducción marcada en el número de predadores benéficos o artrópodos. Sin embargo, se ha reportado sensibilidad al Zineb por parte de ácaros.³⁵

1.4. DESCRIPCION GENERAL Y PROPIEDADES DEL FORMULADO

La información detallada a continuación es la aportada por el fabricante en la hoja de seguridad del producto.

1.4.1. Identificación de la empresa y del producto



Figura 13 - Formulación comercial utilizada en la tesina

Nombre del producto: Zineb Línea Jardín (Zineb 70 %) (Fig.13).

Nombre químico: etilen-bisditiocarbamato de zinc.

Nombre común: Zineb

Clasificación química: etileno – bis ditiocarbamato.

Empresa: NINIVE SACIFIA – Argentina.

Fórmula molecular: C₄H₆N₂S₄Zn (ingrediente activo).

Peso molecular: 275,8 (ingrediente activo)

Uso: Fungicida.

1.4.2. Propiedades físicas y químicas

Tipo de formulación: WP. Polvo mojable.

Color: Azul.

Olor: Inoloro.

Solubilidad en Agua a 20°C: aproximadamente 10 mg/l (ingrediente activo).

Temperatura de descomposición: Descompone a 157°C.

El producto se descompone bajo la influencia del oxígeno, humedad y alta temperatura (es inestable a temperaturas superiores a 60°C).

Es reactivo ante ácidos fuertes, bases fuertes y los agentes oxidantes fuertes.

1.4.3. Identificación del riesgo

Inflamabilidad: Punto de inflamación (copa abierta): 139-143°C (los productos de descomposición producen ignición)

Toxicidad aguda: Oral: DL₅₀ Oral aguda, en ratas: > 2000 mg/kg.

Categoría: IV. Producto que normalmente no ofrece peligro.

Dermal: DL₅₀ Dermal aguda en conejo: > 1000 mg/kg.

Categoría: III. Producto poco peligroso.

Inhalación: CL₅₀ Inhalatoria aguda, en ratas: > 0,91 mg/l.

Categoría: II. Producto moderadamente peligroso.

Toxicidad subaguda: NOEL ratas 5000 mg/kg dieta.

Toxicidad crónica: NOEL (2 años) perros 50000 mg/kg dieta. Puede causar dermatitis por exposiciones prolongadas.

1.4.4. Primeros auxilios

Ya sea en casos de inhalación (irrita las membranas de las mucosas), ingestión (puede causar náuseas, vómitos, diarreas, etc.), contacto ocular (irritante) o dérmico; es necesario obtener asistencia médica. Este formulado no posee antídoto, por lo que debe aplicarse tratamiento sintomático.³⁷ En este ditiocarbamato debe tenerse en cuenta el “efecto Antabuse®”, que como fuera explicado anteriormente, deriva en la acumulación de acetaldehído, provocando náusea, vómito, dolor de cabeza agudo, mareo, desmayo, confusión mental, erupción de la piel, etc.^{10, 36}

1.5. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS EBDC

Existen diversos métodos instrumentales para la determinación de EBDC, que se basan principalmente en la cuantificación del CS₂ generado por hidrólisis ácida. La desventaja de esta metodología es la falta de selectividad ya que todos los ditiocarbamatos liberan este compuesto por hidrólisis ácida.

La determinación espectrofotométrica es el método más sencillo, aunque en la actualidad se utilizan otros como: cromatografía líquida de alta performance (HPLC-UV) y gaseosa (CG-headspace); espectrometría de absorción atómica (EAA), polarografía de pulso diferencial y espectrometría infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), entre otros.⁸

Los límites de detección y cuantificación del Zineb en tomates que se pueden obtener con distintas metodologías varían en función de la sensibilidad y precisión del instrumental utilizado. Por ejemplo, con HPLC acoplado a un detector espectrómetro de masa o con un CG-headspace, se obtienen límites de detección y cuantificación similares, que rondan los 0,01 - 0,05 ppm con un porcentaje de recuperación cercano al 100%.^{37,38} Sin embargo, con el método de Keppel, utilizado en este trabajo, los límites de detección y cuantificación obtenidos son mayores (0,91 y 1,90 ppm respectivamente), con un porcentaje de recuperación de alrededor del 100%.

1.6. RELEVAMIENTO PREVIO DE RESIDUOS DE ZINEB.

En noviembre de 2006 se dieron a conocer los resultados de un estudio sistemático sobre residuos de plaguicidas en alimentos del mercado, que se lleva adelante en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Jujuy.

En el total de las 37 muestras analizadas se hallaron residuos de un EBDC de Zinc, en el 17,1% se superaron las 3 ppm (LMR permitido en Argentina) y el 94% superaba el límite propuesto por la Unión Europea¹² (0,01 ppm).^{12,46}

Este grupo de investigadores, analiza desde el año 1992 y bianualmente los niveles de residuos de éste y otros plaguicidas utilizados en la zona, y concluyen que los valores encontrados refieren básicamente al mal uso del plaguicida, el uso excesivo y reiterado, y el factor de no respetar los tiempos de carencia y dosis de uso recomendadas. De esta manera, aseguran que “la recolección de los frutos está determinada por cuestiones de mercado y económicas más que por cuestiones sanitarias, afectando la salud de todas las personas”.¹²

1.7. HIPOTESIS DE TRABAJO

La hipótesis de este trabajo se basó en tres aspectos fundamentales relacionados con la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos, y en particular de Zineb en tomates, un fungicida ampliamente utilizado en producciones pequeñas.

La falta de control oficial de la aplicación y uso de plaguicidas en la producción y comercialización local de verduras y hortalizas, la detección de residuos elevados de Zineb

Evaluación de residuos de Zineb (fungicida de contacto) en vegetales consumidos en la ciudad de Santa Rosa, La Pampa

en tomates cultivados en Jujuy y que luego son comercializados en el resto del país, y el riesgo potencial que representa la presencia de un compuesto que se descompone en metabolitos con toxicidad crónica relevante, motivaron este estudio.

La determinación de la exposición a un tóxico a través de los niveles de residuos encontrados, junto con la identificación del peligro (recopilación de datos bibliográficos, epidemiológicos, de estudios en animales, etc.), podrían ser utilizadas en la primera etapa de evaluación del riesgo por exposición a Zineb a través del consumo de tomates en la zona estudiada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo es estimar la exposición a Zineb a través del consumo de tomates comercializados y/o producidos en la ciudad de Santa Rosa y zona de influencia.

2.2. Objetivos específicos

-Determinar el grado de uso de Zineb en el tratamiento de frutos de tomate, a través de la detección de sus residuos en las muestras evaluadas.

Se cuantificarán los residuos de Zineb en tomates comercializados en la ciudad de Santa Rosa y zona de influencia. La determinación química de los residuos se llevará a cabo por medio de la descomposición en medio ácido y la cuantificación colorimétrica del CS₂ generado. Todo el procedimiento analítico se llevará a cabo en las instalaciones del Departamento de Química de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNLPam.

-Evaluar si los valores hallados cumplen con lo estipulado en la reglamentación oficial.

El LMR del Zineb permitido en Argentina es de 3 ppm¹² y el TC para el tomate es de 15 días, aunque hay que tener presente que varía en función del tipo de vegetal y las condiciones ambientales de cada región (por ejemplo, el TC para cítricos es de 5 días, para papas 2 días, para cebollas 8 días, etc).^{16, 40}

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales y reactivos utilizados

Reactivos	Marca	Grado
Acetato de Cobre Hidratado	Mallinckrodt	p.a.
Acido Clorhídrico 30%	Cicarelli	p.a.
Cloruro Estannoso Dihidratado 40%	Anedra	p.a.
Dietanolamina	Anedra	p.a.
Etanol Absoluto Puro	Dorwill	p.a.
Glicerina		Técnico
Hidróxido de Sodio 10%	Cicarelli	p.a.
Sulfuro de Carbono	Merck	Espectroscópico
Tolueno	Mallinckrodt	p.a.
Zineb	Ninive Sacifia	70%

Tabla 2 - Reactivos utilizados en la tesina

Materiales
Balón de 2 bocas
Bureta
Celda de cuarzo
Frascos lavadores
Kitasato
Matraces
Pinzas
Pipetas
Soportes
Tubo refrigerante
Uniones de silicona y vidrio

Tabla 3 - Materiales utilizados en la tesina

Equipamiento
Balanza Granataria Ohaus [®] PRECISION Standard
Balanza Analítica Mettler H20
Bomba de vacío
Espectrofotómetro UV – Visible Metrolab [®] 1700
Manto calefactor Barnstead/Thermolyne [®] (Nuova Stir Plate)

Tabla 4 - Equipamiento utilizado en la tesina

3.3. PLAN DE MUESTREO

El muestreo se llevó a cabo siguiendo las normas IRAM generales aplicadas al análisis de residuos de plaguicidas y a la referida al muestreo de vegetales (N° 23008 y N° 23003 – 1, respectivamente).^{39, 40}

Las 20 muestras independientes analizadas fueron obtenidas de manera aleatoria en comercios (minimercados y supermercados) de la ciudad de Santa Rosa, durante el otoño del corriente año entre los meses de Marzo y Junio, encontrándose descriptos en la Tabla 5.

Nombre del comercio	Procedencia de la muestra	Tipo de comercio
Lo de Cucha	Santa Rosa	Minimercado
Martínez	Santa Rosa	Minimercado
Callaqueo	Santa Rosa	Minimercado
La Esperanza	Mendoza	Minimercado
Los Ramones	Buenos Aires	Minimercado
Proveeduría Av.Roca	Mendoza	Minimercado
La Anónima Sucursal	No informado	Supermercado
Carrefour	No informado	Supermercado
El Semáforo	Buenos Aires	Minimercado
Chile	Santa Rosa	Minimercado
Chango Más	No informado	Supermercado
La Anónima Central	No informado	Supermercado
King	Santa Rosa	Minimercado
Loma dorada	Santa Rosa	Minimercado
Franca	Buenos Aires	Minimercado
Frutamanía	Buenos Aires	Minimercado
Telén	Santa Rosa	Minimercado
Natalia	Santa Rosa	Minimercado
San Rafael	Santa Rosa	Minimercado
San Cayetano	No informado	Minimercado

Tabla 5 - Comercios muestreados en Santa Rosa.

Se eligió tomate por su gran importancia hortícola en la provincia. Según una publicación periódica del rubro, en La Pampa su consumo anual es de 9 kg/persona.año, relativamente alto.⁴²

La obtención de la muestra representativa de cada comercio se realizó según la norma IRAM³⁹, procediendo de la siguiente manera:

- 1) Se obtuvieron 5 muestras primarias del lote (cajón de tomates) de cada mercado.
- 2) El conjunto de esas 5 muestras primarias de cada lote conformaron la muestra global (con un peso aproximado de 1 kg).
- 3) Se conservó la muestra global previo a su análisis (congelamiento a -7°C , evitando su descomposición térmica).
- 4) Se procedió a cortar en pequeños trozos a la muestra global con un cuchillo. Luego la misma fue homogeneizada y cuarteada.
- 5) Del cuarteo se obtuvo la muestra para análisis y su duplicado correspondiente (con un peso aproximado de 100 gr cada una).
- 6) Se procedió al análisis.

3.3.1. Esquema de muestreo

Previo al muestreo (Fig. 16), se presenta la tabla 6 donde se indica el número mínimo de muestras primarias que se deben tomar para conformar una muestra global, según el número de tomates por lote.³⁹

N° de unidades en el lote	N° mínimo de muestras primarias que se deben tomar
2 a 15	2
16 a 25	3
26 a 90	5
91 a 150	8
151 a 500	13
501 a 1200	20
más de 1200	32

Tabla 6 - Norma IRAM 23003 - 1. Número de muestras primarias a tomar según unidades de tomate por lote.

El muestreo se diagramó de la siguiente manera:

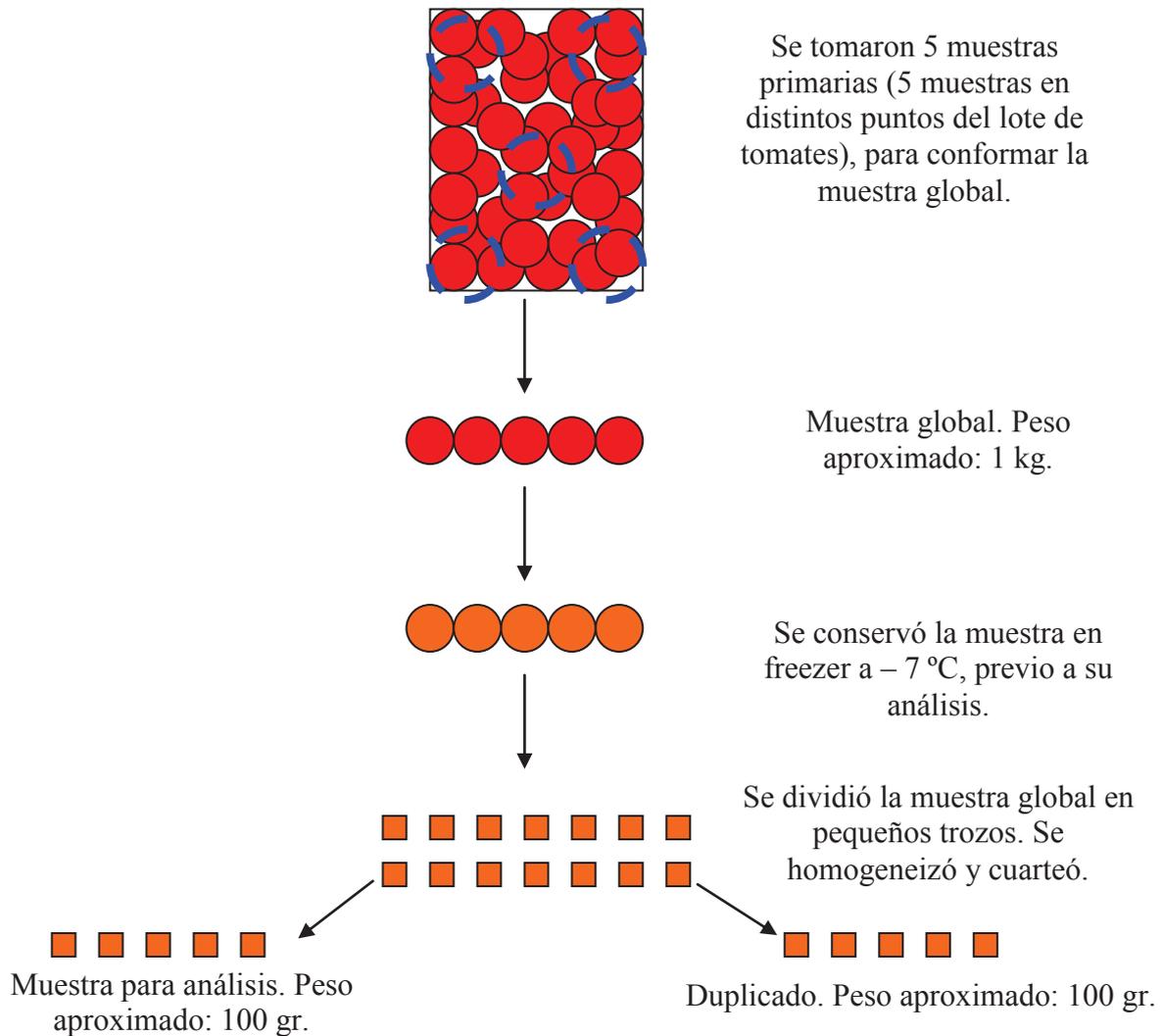


Figura 16 – Diagrama del muestreo.

3.4. PROCEDIMIENTO DEL ANALISIS

Sobre un manto calefactor se coloca un balón de 2 bocas, el cual contiene 200ml de agua destilada, 20ml de HCl, 5ml de SnCl_2 y 100gr de muestra procesada; posteriormente se conecta a un tubo refrigerado (Fig. 17). Este se une a una serie de trampas de SH_2 (Fig. 18) y de CS_2 (Fig. 19) respectivamente, y esta última se conecta a una bomba de vacío.⁷

En cada trampa se colocan los reactivos correspondientes (NaOH y tolueno en la primera; acetato de cobre en dietanolamina en la segunda), junto con unas perlas de vidrio para

permitir un mejor contacto de los gases con la solución. Las conexiones se realizan con mangueras de silicona. Se calienta hasta hervor durante una hora y se aplica extracción con vacío.⁷

Una vez cumplido el tiempo de descomposición, se coloca el contenido de la última trampa en un matraz de 25ml, completando el volumen con etanol. Se determina la absorbancia a 435 nm, calculando la concentración en ppm a partir de la curva de calibrado realizada con patrones de concentración conocida.⁷



Figura 17 - Fotografía del equipo armado para la determinación de CS₂

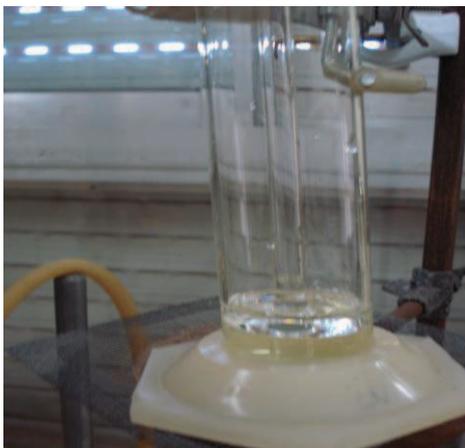


Figura 18 - Trampa SH₂: colocar 15ml de NaOH 10% y cubrir con 5ml de tolueno.



Figura 19 - Trampa CS₂ (con el complejo ya formado): colocar 15ml de Reactivo de Color (acetato de cobre en dietanolamina).

3.4.1. Esquema del procedimiento

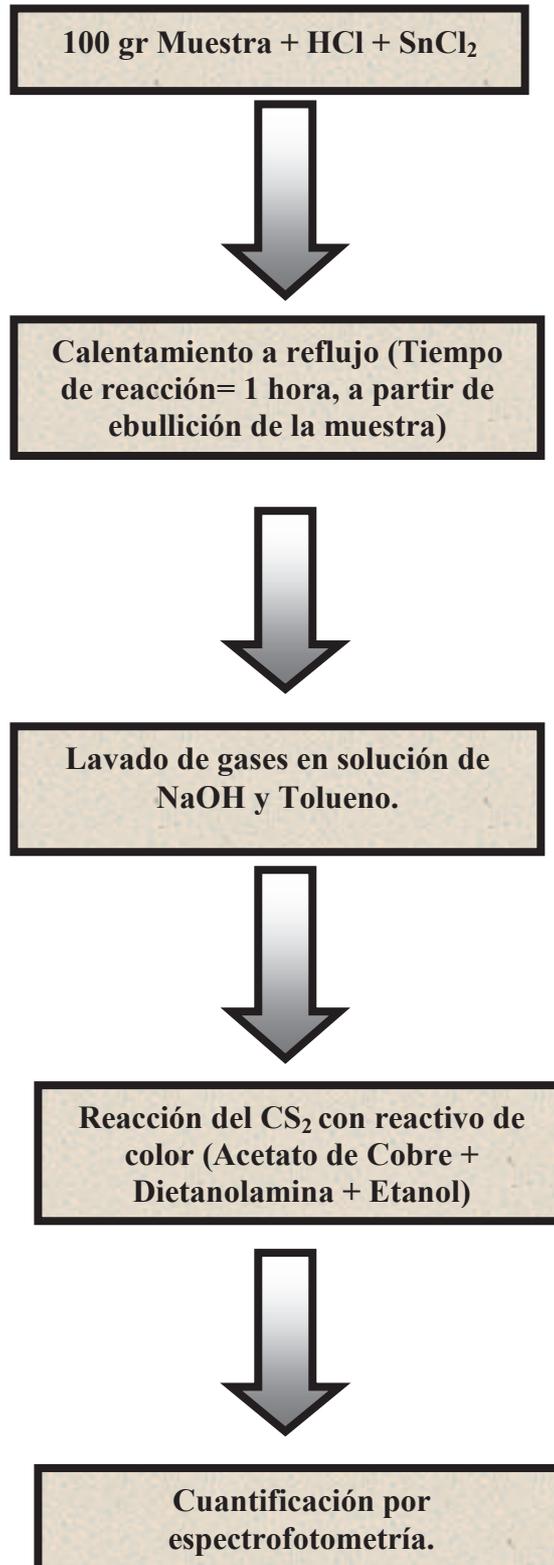


Figura 20 – Esquema del procedimiento.

3.5. Preparación de soluciones patrón CS₂ y curva de calibrado

3.5.1. Solución madre

Para preparar la solución madre de CS₂ se utiliza CS₂ grado espectroscópico. En un matraz de 25 ml, se coloca 5 ml de etanol y se pesa en balanza analítica. Luego se adiciona 0,1 ml de CS₂ patrón y se pesa nuevamente. Se obtiene la masa de CS₂ por diferencia aritmética entre ambos pesos, se lleva a volumen con etanol y se calcula la concentración de la solución madre.

3.5.2. Solución estándar (intermedia)

Se toman 2 ml de la solución madre, diluyendo a 100 ml con etanol.

3.5.3. Preparación de la curva de calibrado

A una serie de 9 matraces de 25 ml se agregan volúmenes de solución estándar entre 0,1 y 3 ml. A cada uno se adiciona 15 ml del reactivo de color y se diluye con etanol. Se deja reposar durante 15 min, leyendo a 435 nm frente a un blanco preparado con 15 ml del reactivo color más 10 ml de etanol. Se preparan 5 réplicas independientes de cada patrón. Se grafica absorbancia vs ppm de CS₂.¹⁶

3.6. CALIBRACION DEL METODO

Para validar el método estadísticamente, se aplicaron los análisis estadísticos de regresión y correlación para la curva de calibración. Para ello se utilizó un programa denominado “Reg0”.

Para calcular el LOD y el LOQ, primero es necesario calcular el desvío estándar de la muestra blanco (S_B) (Fig. 21).

$$S_B = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}}$$

Figura 21 - Ecuación del desvío estándar de la muestra blanco.

Referencias

S_{y/x} = desvío estándar de los residuos de la regresión.

m = número de patrones de la curva de calibración.

\bar{x}^2 = Valor medio de las concentraciones de los patrones de calibración.

Q_{xx} = Sumatoria de cuadrados de las concentraciones de los patrones de calibración.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Curva de calibrado

Los resultados obtenidos de la curva de calibrado se presentan en la Tabla 7, cuya gráfica se presenta en la Figura 22.

Patrón	Concentración CS ₂ (ppm)	Absorbancia (promedio)
0	0	0
1	0,371	0,0122
2	1,855	0,0858
3	2,968	0,1734
4	3,71	0,2772
5	5,565	0,3852
6	7,42	0,4932
7	9,274	0,698
8	11,129	0,8714

Tabla 7 - Valores de la curva de calibración del patrón de CS₂.

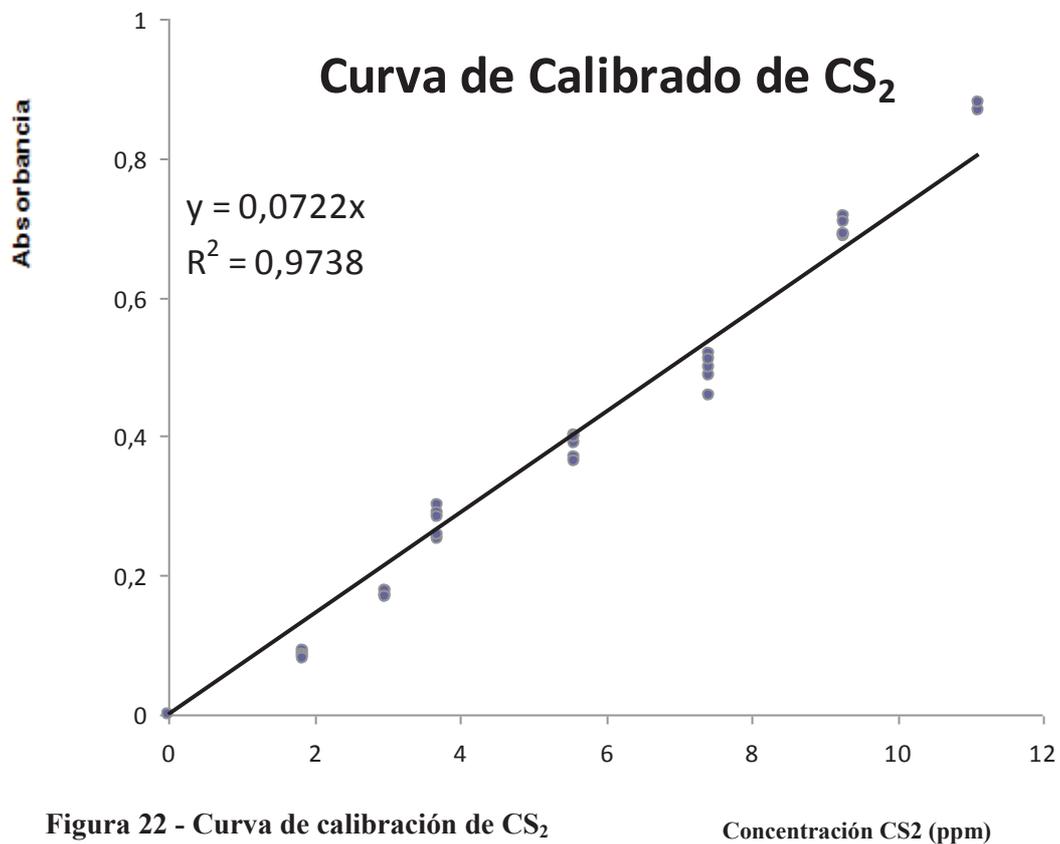


Figura 22 - Curva de calibración de CS₂

Concentración CS₂ (ppm)

4.2. Calibración del método

Los datos utilizados para los cálculos estadísticos se presentan en la Tabla 8.

X	Med(Y)	Des.(Y)	Var(Y)	n
0	0	0	0	5
0,371	0,012	0,002	0,0000047	5
1,855	0,086	0,005	0,0000232	5
2,968	0,173	0,004	1,63E-05	5
3,71	0,277	0,021	0,0004277	5
5,565	0,385	0,017	0,0002837	5
7,42	0,493	0,023	0,0005047	5
9,274	0,7	0,013	0,000169	5
11,129	0,871	0,009	7,33E-05	5

Tabla 8 - Valores medios y varianzas de los patrones de la curva de calibración

Referencias

x: Concentración (ppm) de los patrones de calibración.

Med (y): Valores medios de la absorbancia obtenida de cada patrón.

Des. (y): Valores del desvío estándar de cada patrón.

Var (y): Valores de varianza de cada patrón.

n: número de réplicas independientes de cada patrón.

Los datos correspondientes a la curva de calibración de CS₂ ajustada por regresión lineal se presentan en la Tabla 9, cuya gráfica se presenta en la Figura 23.

R²	0,9885
N° de valores de X	9
N° total de Datos	45
Media Total (X)	4,6991111
Media Total (Y)	0,3329333
Pendiente (b)	0,0778608
Ordenada (a)	-0,0329433

Tabla 9 - Valores utilizados en cálculos estadísticos.

Referencias

Media Total (X): Valor que surge del promedio de todas las concentraciones de los patrones.

Media Total (Y): Valor que surge del promedio de absorbancias de todos los patrones con sus réplicas independientes correspondientes.

Pendiente (b): Valor nuevo de la pendiente de la recta, obtenido luego de ajuste por regresión lineal.

Ordenada (a): Valor nuevo de la ordenada al origen de la recta, obtenido luego de ajuste por regresión lineal.

4.3. Límite de detección y de cuantificación del método

El S_b resulta = 0,0115.

De este modo, se aplicaron las formulas del LOD y LOQ (Apéndice), obteniendo los siguientes resultados:

LOD = 0,91 ppm.

LOQ = 1,90 ppm.

Curva de calibrado de CS₂

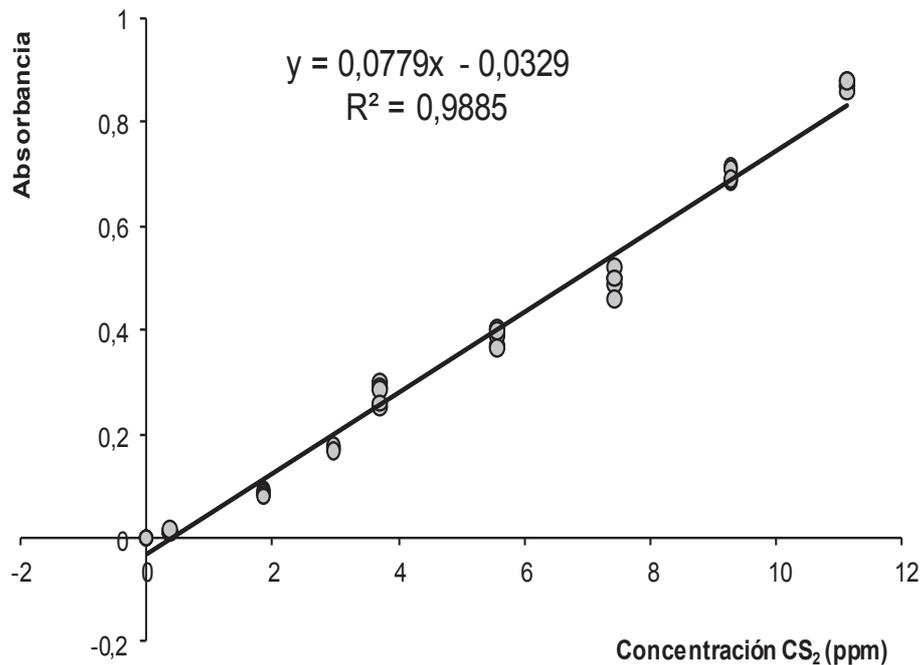


Figura 23 - Curva de calibración de CS₂ luego de ajuste por regresión lineal

4.4. Análisis de residuos del Zineb

Se cuantificaron los residuos de Zineb en tomates, cultivados y/o comercializados en la zona de influencia de Santa Rosa. Los resultados están relacionados con la comprobación de la presencia o ausencia de residuos del Zineb en tomates de dichos comercios.

Los análisis de las muestras se llevaron a cabo en las instalaciones del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa, arrojando los siguientes resultados que se detallan en la Tabla 10:

Comercio	Resultado (ppm Zineb)
Lo De Cucha	ND (LOD = 0,91ppm)
Martínez	ND (LOD = 0,91ppm)
Callaqueo	ND (LOD = 0,91ppm)
La Esperanza	ND (LOD = 0,91ppm)
Los Ramones	ND (LOD = 0,91ppm)
Proveeduría Av.Roca	ND (LOD = 0,91ppm)
La Anónima Sucursal	2,17 ± 0,73 ppm
Carrefour	ND (LOD = 0,91ppm)
El Semáforo	ND (LOD = 0,91ppm)
Chile	ND (LOD = 0,91ppm)
Chango Más	< 1,90 ppm
La Anónima Central	2,30 ± 0,66 ppm
King	ND (LOD = 0,91ppm)
Loma Dorada	ND (LOD = 0,91ppm)
Franca	ND (LOD = 0,91ppm)
FrutaManía	ND (LOD = 0,91ppm)
Telén	ND (LOD = 0,91ppm)
Natalia	ND (LOD = 0,91ppm)
San Rafael	ND (LOD = 0,91ppm)
San Cayetano	ND (LOD = 0,91ppm)

Tabla 10 - Resultados obtenidos luego de los análisis.

Todos los cálculos realizados para las muestras, se llevaron a cabo utilizando los promedios de sus pesos, así como de sus absorbancias.

A modo de ejemplo numérico se detallan los cálculos realizados para la muestra correspondiente al supermercado 1:

Utilizando la ecuación de la recta ajustada a los análisis de regresión (reemplazando el

valor “Y” por el promedio de absorbancias obtenidos de la muestra, para luego despejar y calcular “X”), se obtuvo un resultado de 4,99 ppm de CS₂.

Considerando entonces que tenemos 4,99 mg de CS₂ en 1000 ml; en 25 ml (Volumen en la trampa del complejo + volumen suficiente de etanol para enrasar 25 ml del matraz) tenemos 0,12 mg de CS₂.

Se utilizó la relación “mg Zineb = mg CS₂ x 1,81”; la cual se basa en la relación de masas y pesos moleculares de Zineb y CS₂ (mg Zineb = mg CS₂ x PM Zineb / 2PM CS₂). Sabiendo que esta cantidad del Zineb se encuentra en 100 gr de muestra, se expresó el resultado final en relación a 1 kg de muestra.

Cada resultado obtenido de las muestras, fue informado con su incertidumbre, con un nivel de confianza del 95 % y 7 grados de libertad (n – 2).

$$IC (\text{incertidumbre de la muestra}) = t_{(0,05; n-2)} \cdot S_x$$

Siendo “t” el factor de Student, y S_x el desvío estándar de la muestra analizada (Fig. 24).

$$S(x_{inc}) = \frac{S_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(y_{inc} - \bar{y})^2}{A^2 Q_{xx}}} = \frac{S_{y/x}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(x_{inc} - \bar{x})^2}{Q_{xx}}}$$

Figura 24 - Ecuación del desvío estándar de una muestra (S_x).

5. CONCLUSIONES

5.1. Calibración del método

El valor obtenido de la pendiente está relacionado con la sensibilidad del método. El valor mínimo obtenido luego del ajuste de la curva de calibración de CS₂ por regresión lineal indica entonces, que el método de Keppel utilizado no presenta una alta sensibilidad.

5.2. Límite de detección y de cuantificación del método

Los valores obtenidos del LOD y LOQ (0,91 y 1,90 ppm, respectivamente) indican que el método utilizado no permite cuantificar concentraciones mínimas del Zineb en tomates, pero los valores de los límites son suficientes para detectar con seguridad concentraciones cercanas al LMR permitido en la República Argentina.

5.3 Análisis de residuos del Zineb

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de residuos de Zineb en tomates de la ciudad de Santa Rosa, indican la presencia de este fungicida en el 20% de las muestras analizadas. Se detectó un valor de 1,09 ppm en la muestra que corresponde al supermercado “Chango Más”. Se cuantificaron valores moderadamente altos en las muestras de los supermercados “La Anónima Central” y “La Anónima Sucursal” (2,30 y 2,17 ppm, respectivamente). Si bien estos valores no superan el LMR del Zineb establecido por el SENASA, los 2 valores anteriormente mencionados pueden considerarse altos.

Esto es un índice de la necesidad de realizar controles periódicos de estos residuos de plaguicidas en los grandes mercados, ya que las muestras en las que se detectaron valores altos del Zineb provinieron de dichos mercados, y estos tienen alcance a un número mayor de clientes que los minimercados, aumentando de este modo el riesgo por consumo de productos con dichos residuos. Si bien existen entes de fiscalización y control de dichos residuos (por ej. la actividad realizada por la Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. A través de su Laboratorio Bromatológico, efectúa la detección y cuantificación de Residuos de Plaguicidas en Frutas y Hortalizas y ejerce el poder de policía sanitario y bromatológico)⁴⁷, en la provincia de La Pampa, no hay un ente de fiscalización y control de dichos residuos. Tanto Bromatología Municipal de la ciudad de Santa Rosa como Provincial no realizan análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas, por no ser

considerados como análisis de rutina, y además, por no contar con la infraestructura necesaria para llevarlos a cabo (capital para invertir en equipamiento, mantenimiento, cursos de capacitación, etc.). Es necesaria la inclusión de análisis de plaguicidas a nivel de Bromatología Municipal y Provincial, para crear una barrera de control ante estos productos contaminados. Pueden encontrarse análisis alternativos de bajo costo para realizar. Por ej. El método de análisis desarrollado en este trabajo es de muy bajo costo, y sería aplicable tanto a tomates como a una gran variedad de frutas y hortalizas; pudiéndose emplear para realizar análisis periódicos de estos frutos en Santa Rosa, tanto en la producción local, como en la importación de los mismos.

No fue posible conocer la procedencia de los productos de los supermercados, y 3 de los 4 supermercados muestreados son parte de cadenas nacionales, estimándose que no adquieren tomates de producción local. Por las temperaturas medias a altas en periodos otoñales que se dan en la zona norte de nuestro país, es la única zona con producción en tomates en dicha época del año. Teniendo en cuenta la época del muestreo realizado (Marzo-Junio), inferimos que la procedencia de los tomates correspondería a esta zona geográfica. En los minimercados muestreados con tomates de producción local, no se encontraron concentraciones cuantificables de residuos del Zineb, esto indica que la probabilidad de contaminación es mínima, y que en las huertas locales su uso es nulo o muy bajo. Es por ello que es importante recomendar el consumo de tomates de producción local en esta época del año.

Nuestro país cuenta con un amplio marco para regular distintos aspectos de los plaguicidas, por medio de distintos organismos del gobierno como autoridad de aplicación. En la República Argentina existe el Registro de Plaguicidas de Uso Fitosanitario, que depende de la Dirección de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y Veterinarios del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), organismo bajo la órbita de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA).⁴⁷

En el año 2003, el SENASA estableció por resolución N°256, los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas en productos y subproductos agropecuarios, así como también aquellos productos que se encuentran exentos del requisito de fijación de tolerancias. Allí se fija el LMR del Zineb de 3 ppm, sin mencionar restricción alguna a su uso.⁴⁷

Este organismo modificó en el año 2008, a través de la Resolución N°507 a la anterior, considerando, entre otras cosas, que en ese lapso de 5 años surgió la necesidad de ampliar y modificar los LMR en principios activos de plaguicidas y sus restricciones de uso, para adecuarlos a las exigencias actuales. También consideró para esta modificación, la necesidad imperiosa de reducir los efectos no deseados para los seres humanos y el medio ambiente.⁴⁷ En esta Resolución, el LMR del Zineb se mantuvo en el valor de 3 ppm, y no se contempló ninguna restricción para su uso, a pesar de que este compuesto y su metabolito ETU, pertenecen a un grupo de compuestos con capacidad potencial de dañar al material genético, entre otros efectos tóxicos.

Las legislaciones provinciales normalmente se adhieren al marco regulatorio nacional, aunque algunas provincias y municipios llevan registros independientes de los registros nacionales, a través de una ley provincial de plaguicidas. En el caso de La Pampa, existe la ley provincial 1173 de Agroquímicos, cuya autoridad de aplicación es la Dirección General de Agricultura y Ganadería (Subsecretaría de Asuntos Agrarios, Ministerio de la Producción). Esta ley regula la fabricación, distribución, comercialización, almacenamiento, traslado y utilización de agroquímicos en la provincia. Dicha ley tiene como objetivo la protección de la salud humana y los ecosistemas, así como también la optimización del uso de agroquímicos, y clasifica a estos según el riesgo que entrañan para la salud humana, y especies vegetales y animales. Según esta clasificación de agroquímicos (basada en los DL₅₀ oral, inhalatoria y dérmica), el Zineb se clasifica como “B”: Agroquímicos de uso y venta profesional (Son aquellos cuya utilización entraña algún riesgo).⁴⁸

Si bien el SENASA se mantiene al margen de la restricción de cualquier tipo de uso del Zineb, esta entidad actualmente se encarga de realizar Capacitaciones de Buenas Prácticas Agrícolas por diversas provincias, poniendo énfasis de este modo, no en la restricción del principio activo, sino en el correcto manejo del plaguicida, minimizando así el riesgo a su exposición y la presencia de residuos en frutos y hortalizas por su incorrecto manipuleo.⁴⁷

Estas capacitaciones están centralizadas en concientizar y respetar las medidas de seguridad para el manipuleo y uso de los plaguicidas, respetar las dosis recomendadas para su utilización y TC, etc. Sería fundamental que este organismo realice Capacitaciones de Buenas Prácticas Agrícolas en todo el país, incluyendo La Pampa, y que sean periódicas. De este modo, con un uso correcto de los plaguicidas, respetando normas de seguridad, manipuleo, TC, etc. los riesgos adversos a exposiciones serían mínimos.

Evaluación de residuos de Zineb (fungicida de contacto) en vegetales consumidos en la ciudad de Santa Rosa, La Pampa

Existe un desconocimiento general acerca de la contaminación por plaguicidas en los habitantes de La Pampa, ya sea por exposición a los mismos o por ingestión de alimentos contaminados. Existen casos de enfermedades por contaminación por plaguicidas, y debido a la similitud de patologías con otras enfermedades comunes o a la sintomatología inespecífica, se le puede adjudicar una etiología errónea. Es necesaria la inclusión en los hospitales, de protocolos y de indicadores definidos para que la información sea comparable y reproducible.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1- Crosby D. G. “Environmental Toxicology and Chemistry”. Cap. 2: Environmental Chemicals. Oxford University Press, New York, 1998.
- 2- Astiz M., de Alaniz M. J. T., Marra C. A. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:2025-32, 2009.
- 3- Sitio oficial de la Organización Mundial de la Salud: www.who.int
- 4- Barberá C. “Pesticidas agrícolas”. Omega, Barcelona. 1989.
- 5- Klaassen C. D., Watkins J. B. “Cassaret & Doull’s. Essentials of Toxicology”. Cap 22: Toxic Effects of Pesticides. Mc.Graw Hill, EEUU, 2003.
- 6- Bovi Mitre G., Bardón A. “Residuos Tóxicos en Frutos”. Cap. 4: Estudio del plaguicida de contacto Etilenbisditiocarbamato de Zinc (Zineb). Universidad Nacional de Jujuy, San Salvador de Jujuy, 1998.
- 7- Guía de trabajos prácticos: Determinación de residuos de Zineb en tomates. Toxicología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Pampa, 2008.
- 8- Agarwal S., Aggarwal S. G., Singh P. “Quantification of Ziram and Zineb residues in fog-water samples”. *Talanta* 65:104-110, 2005.
- 9- González M., Soloneski S., Reigosa M., Larramendy M. “Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its comercial formulation, Azzurro. IV DNA damage and repair kinetics assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells”. *Mutation Research* 534:145-54, 2003.
- 10- Hoja de Seguridad Zineb 70%, Línea Jardín
- 11- Nebbia C., Dacasto M., Topi B., Burdino E., Ugazio G. “Zinc Ethylene-bis-

dithiocarbamate (Zineb)-Mediated Inhibition of Monooxygenases and Lipid Peroxidation in Bovine Liver Microsomes”. *Veterinary and Human Toxicology* 39 (5): 272-275, 1997.

12- Jujuy al día. <http://www.jujuyaldia.com.ar/index.php?ID=29214>

13- <http://articulos.infojardin.com/huerto/Fichas/tomate-enfermedades.htm>

14- Toxicología I. Mecanismos de Toxicidad. Curso Postgrado (a distancia), Universidad Nacional de San Martín, 2010.

15- Bioseguridad en laboratorios y en trabajos a campo. Curso dictado por el Med.Vet. Alvarez E. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, 2010.

16- Edwards I. R., Ferry D. G., Temple W. A. “Fungicides & related compounds”. Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes, W. J.; Laws, E. R., (Eds). Academic Press, New York, NY, 1991.

17- U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substances Data Bank. Bethesda, MD, 1995.

18- Morgan D. P. “Recognition and Management of Pesticide Poisonings”, 3° Edición. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC, 1982.

19- Langeland B.T., McKinley - McKee J.S. “The effects of disulfiram on equine hepatic alcohol dehydrogenase and its efficiency against alcoholism: vinegar effect”. *Alcohol & Alcoholism* 31 (1): 75-80, 1996.

20- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Carbon Disulfide. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, USA, 1996.

21- Jia Z., Misra H.P. “Exposure to mixtures of endosulfan and zineb induces apoptotic and necrotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells, in vitro”. *Journal of Applied Toxicology* 27(5):434-46, 2007.

- 22- Jia Z., Misra H.P. #Developmental exposure to pesticides zineb and/or endosulfan renders the nigrostriatal dopamine system more susceptible to these environmental chemicals later in life”. *Neurotoxicology* 28(4):727-35,2007.
- 23- Soloneski S. “Análisis de la sensibilidad diferencial de células de mamíferos a clastógenos químicos”. Tesis n°:0813. Área: Agricultura. Director: Larramendy, M L. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, 2003.
- 24- Camoni I., Di Muccio A., Pontecorvo D., Citti. “Survey of etilentiourea (ETU) in ethylenebis(dihiocarbamate)(EBDC) fungicides”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 16(2): 176-9,1988.
- 25- Nebbia C., Fink - Gremmels J. “Acute Effects of Low Doses of Zineb and Ethylenethiourea on Thyroid Function in the Male Rat”. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56 (5): 847-852, 1996.
- 26- Hallenbeck W. H., Cunningham-Burns K. M. “Pesticides and Human Health”. Springer-Verlag, New York, USA, 1985.
- 27- Shepard T. H., Catalog of Teratogenic Agents, Fifth Edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA, 1986.
- 28- New York State pesticide recommendations. 49° Annual Pest Control Conference. Ithaca, NY, USA, 1987.
- 29- U.S. Environmental Protection Agency. “Ethylene bisdithiocarbamates (EBDCs); Notice of intent to cancel and conclusion of Special Review”. *Federal Register* 57: 7434-7530, 1992.
- 30- “Guidance for the Registration of Pesticide Products Containing Maneb as the Active Ingredient”. Office of Pesticides and Toxic Substances, USA EPA, Washington, DC, USA, 1988.

- 31- Augustijn-Beckers P. W. M., Hornsby A. G., Wauchope R. D. "SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking II; Additional compounds". *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology* 137:1-82, 1994.
- 32- Howard P. H. (Ed.) "Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals: Pesticides". Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1989.
- 33- Kidd H., James D. R. (Eds.) "The Agrochemicals Handbook", 3° Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991.
- 34- Tucker R., Crabtree D. G (Eds.) "Handbook of Toxicity of Pesticides to Wildlife". U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC, 1970.
- 35- Pimentel D. "Ecological Effects of Pesticides on Nontarget Species". U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 1971.
- 36- Dalvi RR. "Toxicology of thiram (tetramethylthiuram disulfide): A review". *Veterinary & Human Toxicology* 30:480-2.1988
- 37- Crnogorac G., Schwack W. "Determination of dithiocarbamate fungicide residues by liquid chromatography/mass spectrometry and stable isotope dilution assay". *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 21(24):4009-16,2007.
- 38- Yao J., Zheng Z., Jiao S., Wang Z., Zhao F. "Gas chromatographic head-space determination of dithiocarbamate fungicide residues on vegetables". *Agricultural Sciences* 22 (5): 76-80, 1989.
- 39- Norma IRAM 23003-1. Residuos de plaguicidas. Directivas generales para el muestreo. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, 1995.
- 40- Norma IRAM 23008. Marcha analítica. Preparación de la muestra. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, 1995.
- 41- Keppel GE. "Modification of the carbon disulfide evolution method for

dithiocarbamate residues”. *Journal of the AOAC* 52 (1):162-7, 1969.

42- Grasso R., Ferrero M., Muguero A., Ferrato J., Mondino M. Densidad de plantación y ciclo de producción, su efecto sobre la productividad del cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo invernadero. Centro Regional de Educación Tecnológica, General Pico. La Pampa.

43- Millar J.N., Miller J.C. “Estadística y Quimiometría para Química Analítica, 4ta. Ed. Prentice Hall, Madrid, 2002.

44- Ramis Ramos G., Garcia Alvares-Coque C. Quimiometría, Síntesis S.A Ed., 2001.

45- Gil Hernandez F., Tratado de Medicina del Trabajo. Elsevier, España. 2005

46- Unión Europea. Artículo 18 (1) (b) Regulación 396 / 2005.

47- www.senasa.gov.ar

48- www.fitoayuda.com/legislacion/la-pampa/ley-1173.pdf

7. APÉNDICE

7.1. CALIBRACION DEL METODO

Los parámetros analíticos evaluados para validar el método utilizado en la determinación del Zineb, fueron los siguientes:

Exactitud: grado de concordancia entre el resultado de una determinación o la media de “n” resultados, y el valor verdadero del analito en la muestra.⁴³

Representatividad: Esta propiedad se refiere al buen muestreo.

Precisión: es el grado de concordancia entre un grupo de resultados que se obtienen al aplicar repetitiva e independientemente el mismo método analítico a alícuotas distintas de la misma muestra.⁴³

Sensibilidad: Expresa la capacidad de un método para discernir entre concentraciones semejantes de un mismo analito, o su capacidad para poder detectar o determinar pequeñas concentraciones de analito en una muestra.⁴³

Selectividad: Un método analítico se dice que es selectivo si es capaz de originar resultados que dependan exclusivamente del analito para su cuantificación.⁴³

Análisis de regresión y correlación: El análisis de regresión es utilizado para estudiar la relación entre dos o más variables. Esta relación se expresa como una función matemática, para estudiar la dependencia entre una variable no controlada y otra que si lo esta durante el experimento.

El análisis de los datos de calibrado mediante regresión lineal implica el calculo de la pendiente (A) y ordenada al origen (B) de la recta ajustada a la ecuación $y = A.x + B$

Cifras de merito del método: Las cifras de un método analítico se utilizar con el propósito de calificar un determinado método y comparar sus propiedades analíticas con las provistas por otras técnicas. Incluyen, entre otras:

Sensibilidad de la calibración:

Es igual a la pendiente de la recta de calibrado.

Indica la variación de respuesta producida por una unidad de variación de concentración del analito, y sus unidades son de señal por la inversa de la concentración.⁴⁴

Limite de detección:

Es la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica. Se calcula en función del desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco (s_b).⁴³

En la práctica se utiliza una ecuación aproximada para el limite de detección:

$$Y_0 = 3,3 \cdot s_b$$

Luego ese Y_0 se reemplaza en la ecuación de la recta ajustada por regresión, y obtenemos un X_0 que es igual al LOD.

Limite de cuantificación:

Es la mínima concentración cuantificable en forma confiable.

Este parámetro se toma como la concentración correspondiente a 10 veces el desvío estándar (en unidades de concentración) del blanco, con lo cual:

$$Y_0 = 10 \cdot s_b$$

Luego ese Y_0 se reemplaza en la ecuación de la recta ajustada por regresión, y obtenemos un X_0 que es igual al LOQ.

Rango dinámico:

Se considera que va desde la menor concentración detectable (LOD) hasta la pérdida de relación entre respuesta y concentración. El rango dinámico es también el rango de aplicabilidad de la técnica.⁴³

7.2 GLOSARIO

Carcinogénesis: Proceso por el cual, células normales se transforman en células cancerosas.

Mutagénesis: Producción de mutaciones sobre el ADN.

Teratogénesis: Alteración morfológica, bioquímica o funcional, en un ser vivo en gestación.

DL₅₀: Dosis de una sustancia que mata al 50% de una población en estudio.

CL₅₀: Concentración de una sustancia que mata al 50% de una población en estudio.

Neuronas Dopaminérgicas: Neuronas cuyo neurotransmisor primario es la dopamina.

Substancia negra: Es una estructura cerebral localizada en el cerebro medio. Tiene un rol importante en el aprendizaje, adicción y movimiento.

Estrés Oxidativo: Fenómeno producido por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, una vez superada la capacidad de defensa celular.

Carcinoma: Es una forma de cáncer con origen en células de tipo epitelial o glandular, de tipo maligno.

Sarcoma: Es una neoplasia maligna que se origina en un tejido conjuntivo, como pueden ser hueso, cartílago, grasa, músculos, vasos sanguíneos, etc.

Índice mitótico: En una población de células, es el coeficiente entre el número de células que experimentan mitosis (multiplicación de células) y el número de éstas que no experimentan mitosis.

Cromátidas hermanas: Son dos copias idénticas de un solo cromosoma que están conectadas por un centrómero.

Hiperplasia: proliferación de células en un órgano o tejido, más allá de lo normalmente visto.

Especies reactivas de oxígeno: Conjunto de moléculas reactivas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno (radicales libres, peróxidos, etc).

Células somáticas: células que forman los tejidos y los órganos, conformando el cuerpo de los seres vivos. Se originan a partir de una célula madre y tras el proceso de diferenciación celular, forman todos los otros tipos de células.

NOEL: Nivel de dosis de plaguicida al cual no se observan efectos.

Limite Máximo Residual: concentración máxima de residuos de un plaguicida o sus productos de degradación (metabolitos), o ambos, que se pueden tolerar en los alimentos, sin esperar riesgos directos en la salud de los consumidores o en la de subsiguientes

generaciones. Se expresa en mg de los residuos definidos por kg de alimento (mg/kg).

Tiempo de carencia: tiempo legalmente establecido expresado usualmente en número de días que debe transcurrir entre la última aplicación de un Producto Fitosanitario y la cosecha o el pastoreo de animales. En el caso de las aplicaciones post cosecha se refiere al intervalo entre la última aplicación y el consumo del producto vegetal.

WP (polvo mojable): Polvo para aplicar como suspensión, luego de ser dispersado en agua.

Difusión simple: Es el paso de moléculas a través de una membrana debido a una diferencia de concentración.

Protoplasma: Es la parte celular compuesta por un 85 – 90% de agua, que contiene proteínas, sustancias grasas y sales inorgánicas.

Esclerocios: Son la fuente de inóculo del hongo.

Foliolo: Es cada una de las piezas separadas en que se encuentra dividido el limbo de una hoja.

Pecíolo: Es la parte de la hoja que une el limbo a la rama.

Túbulos renales: Es el sistema encargado de reabsorber todas las sustancias útiles filtradas a nivel glomerular, como iones Na^+ y K^+ , glucosa, etc.

Xenobióticos: Es toda sustancia extraña al organismo; no cumple ninguna función biológica.

Liposolubilidad: Características de las sustancias para disolverse en lípidos, grasas (compuestos no polares).

Lipofilicidad: Afinidad de las sustancias por grasas y lípidos de alta solubilidad.

7.3. ABREVIATURAS

mg: miligramo.

kg: kilogramo.

l: litro.

nm: nanómetro.

p.a.: Pro – análisis.

ml: mililitro.

min: minuto.

ppm: partes por millón.

fig: figura.