

**REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

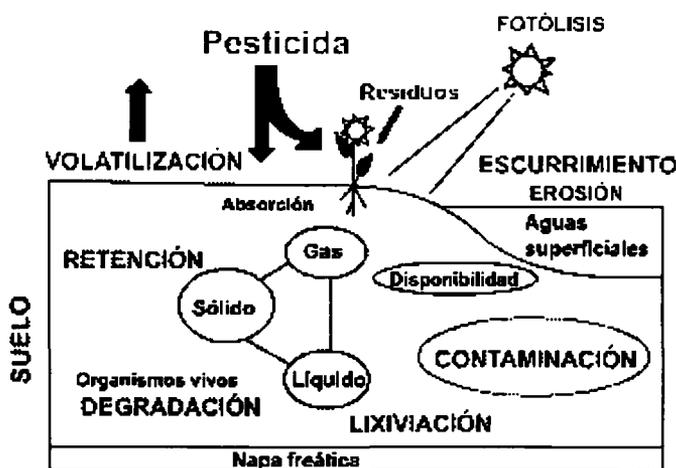
**MÉTODOS PARA DETERMINAR CARBOFURAN (2,3-DIHIDRO-2,2-DIMETILBENZOFURAN-7-IL METILCARBAMATO)**

Castillo, Alicia E.; Rojas, Julieta M.; Monteros Solito, Ramiro I., Nardelli, José I., Guasch, Gabriela  
Química Orgánica y Biológica- FCA- UNNE  
castillo@agr.unne.edu.ar

**INTRODUCCIÓN**

El término pesticida ó plaguicida agrupa una gran variedad de compuestos con estructuras y propiedades muy diferentes. Son productos químicos cuyo uso ha aumentado en grandes cantidades en las últimas décadas con el objeto de controlar las plagas, malezas y enfermedades que afectan a los cultivos. El comportamiento de los pesticidas en la biosfera está relacionado a su origen y fuente, su uso indiscriminado se ha convertido en un riesgo potencial como fuente de contaminación de las superficies del suelo y napas subterráneas, e incluso se han encontrado vestigios de pesticidas en muestras de aire

(Fig.1). El transporte global de pesticidas volátiles y estables, ha sido demostrado por su presencia en zonas remotas (circulo ártico) y en el aire de océanos del mundo (Barriuso, 2000). Los pesticidas incluyen a insecticidas, acaricidas, nematocidas, rodenticidas, herbicidas, funguicidas y otros compuestos destinados a prevenir y controlar organismos vegetales ó animales que perjudican la producción agropecuaria. Los productos más comúnmente aplicados en los ecosistemas agrícolas de la región del NEA son carbamatos, fosforados y clorados, presentados con diferentes nombres comerciales.



**Figura 1:** Representación esquemática de los principales fenómenos implicados en la dinámica de los pesticidas en el suelo.

Existen diferentes criterios de clasificación para los insecticidas; la clasificación que toma en cuenta el modo de acción incluye dentro de los neurotóxicos a: fosforados y carbamatos como inhibidores de la colinesterasa ; clorados y piretroides que actúan sobre la membrana de las neuronas; y a la nicotina, que actúa sobre el neuroreceptor acetilcolina.

### Carbamatos

Su importancia e incidencia en el medioambiente y la salud humana reside en que los carbamatos actúan inhibiendo la acción de la enzima colinesterasa, especialmente la acetilcolinesterasa, llevando a una acumulación de la acetilcolina en las sinapsis nerviosas, desencadenando una serie de efectos parasimpáticos. Inhiben a dicha enzima también en los glóbulos rojos, en el plasma y en otros órganos. Este efecto de los carbamatos es similar al de los insecticidas organofosforados, pero a diferencia de éstos , tienen un efecto menos dañino, ya que la unión enzima-carbamil es reversible, lo que origina un síndrome clínico más leve con una duración más corta, pero de todas formas tienen alta penetración en el sistema nervioso central, pudiendo llegar a ser igualmente tóxicos. Se

absorben por la piel, ingestión e inhalación. Los efectos indeseados producidos dependen de la clase, dosis, vía y tiempo de exposición. No se acumulan en el organismo, pero como su biotransformación es muy lenta, provocan efectos acumulativos en las personas expuestas, llegando a tener potencial carcinogénico.

### Química de los carbamatos

Los carbamatos químicamente derivan del ácido carbámico. Su metabolismo puede darse por hidrólisis, hidroxilación y oxidación con productos con azufre existentes en la molécula. Su persistencia es variable, son fotosensibles, y tienen alta presión de vapor (Bachman y Patterson, 1999). Se han encontrado productos de degradación de carbamatos (Cuadro 1) en muestras de suelo y sedimentos (Steinheimer, 2000; Cogger *et al.*, 1998; Getzin *et al.*, 1989 y 1990), aire (Hawthorne *et al.*, 1996), agua (Werner y Johnson, 1994), tejidos animales (Gruber y Munn, 1998), y muestras vegetales (AOAC, 1990; Minelli *et al.*, 1997). Además, se han extraído de membranas gastrointestinales en humanos (Harper *et al.*, 1998).

**Cuadro 1** : Carbamatos y algunos productos de degradación

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Aldicarb             | Methiocarb |
| Aldicarb Sulfónico   | Methomyl   |
| Aldicarb Sulfóxido   | 1-Naphthol |
| Carbaryl             | Oxamyl     |
| Carbofuran           | Prophan    |
| 3-Hidroxi-carbofuran | Propoxur   |

De los carbamatos usados en nuestra zona, el carbofuran es el más común y su nombre según IUPAC es 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato. Es un insecticida y nematocida sistémico y de contacto y es uno de los carbamatos más utilizados, se lo conoce entre otros, con los nombres comerciales de Curaterr, Furadan y Carfural. El carbofuran es aplicado al suelo, tiene baja constante de adsorción y moderada vida media (1-8 semanas), lo que da como consecuencia un lavado hacia las napas en algunos suelos (Cogger *et al.*, 1998). A pesar de su potencial de movilidad, este pesticida es encontrado menos frecuentemente en aguas subterráneas que otros. Una de las posibles contribuciones a su lixiviación reducida es la degradación, la

cual es bien conocida después de aplicaciones repetidas (Getzin y Shanks, 1990), lo que sugiere que dicho fenómeno es proporcional a la concentración aplicada de carbofuran. El carbofuran se degradada por hidrólisis en varios productos , entre ellos los más tóxicos son el 3-hidroxicarbamatato y 7-fenol, el resto de los degradados son menos peligrosos que el compuesto original.

### Extracción

Debido a su naturaleza química, los métodos clásicos para extracción de los carbamatos generalmente implican el uso de un solvente selectivo respecto del material de la muestra madre (AOAC, 1990; Getzin *et al.*, 1989;

Werner y Jonson, 1994). Las extracciones más conocidas requieren de aplicación de fuerzas externas aplicadas a las distintas mezclas material-solvente. Además es probable que esta primera extracción requiera al menos dos tratamientos adicionales previos al análisis por métodos cromatográficos. Normalmente, requiere ser concentrado para asegurar suficiente masa de analito presente en el volumen final; puede requerir también una limpieza adicional y así asegurar la calidad de la separación. Actualmente la extracción de fase sólida en cartucho se ha convertido en una forma rápida y eficiente de purificar el extracto; el cual en este estado se puede guardar y preservar durante muchos meses refrigerado a  $-10^{\circ}\text{C}$  (Steinheimer, 2000).

En la actualidad se usan además otras técnicas de extracción para dichos pesticidas: Soxhlet, fluido supercrítico, microondas asistida y ultrasonido. El más usado es el extractor Soxhlet, el cual trabaja con una muestra de suelo contenida en un pequeño recipiente de fibra porosa o vidrio y ubicado sobre el solvente en ebullición. Después de un período de varios ciclos de vaporización-condensación (de 24-48hs), deja un residuo para ser purificado o directamente analizado por cromatografía (Steinheimer, 2000). Se pueden utilizar como solventes hexano y acetona, ó hexano-cloruro de metileno. Las muestras de suelo y sedimentos en algunos casos se tratan previamente con sulfato de sodio anhidro (López-Avila, 1991).

La extracción con Soxhlet es simple, efectiva y relativamente económica; para muchos pesticidas proporciona una buena recuperación. Actualmente se usan equipos automatizados basados en la técnica tradicional que implica una opción para laboratorios pequeños donde la inversión es mínima. Este método presenta una serie de modificaciones, como la técnica de Goldfish modificada por Randall (1974) en la cual el recipiente que contiene la muestra se sumerge totalmente en solvente hirviendo.

### Análisis

La detección clásica de los carbamatos se apoya sobre métodos de la química analítica (cromatografía, espectrometría UV, espectrometría de masa). En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para la detección de dichos productos utilizando biosensores (Nunes y Barcelo, 1998; Noguez *et al.*, 1999; Abad *et al.*, 1998.; Evtugyn *et al.*, 1998; Everett *et al.*, 1998; Skladal *et al.*, 1997; Mulchandani, 1998).

La cromatografía, basada en el principio de separación de una mezcla de compuestos orgánicos usando diferentes grados de

interacción molecular con la fase estacionaria, en sus distintas variantes: gaseosa, líquida y líquida de alta resolución (HPLC).

La cromatografía gaseosa (CG) consiste en inyectar una pequeña fracción de la muestra atomizada en una columna que contiene una mezcla de gases a alta temperatura, la cual arrastra los analitos que se van fijando a un sistema de fase sólida (sílica gel ó tierra de diatomeas), en distintos intervalos de tiempo. Este sistema utiliza un registrador de captura de  $e^{-}$ , de N ó  $\text{H}^3$  (tritio). La cromatografía líquida (CL) está constituida en general por un sistema separador de analitos de fase móvil, un inyector, cámara de hidrólisis, un detector de fluorescencia y un registrador. En el sistema HPLC una estructura química determinada (la fase sólida) es fijada a pequeñas partículas de sílice unidas a una columna de acero inoxidable. La muestra se pulveriza dentro de la misma y una vez en la columna comienza a interactuar con las partículas sólidas; el solvente fluye y arrastra los distintos componentes a través de la misma. El método usa los gradientes de elución, ya que cada componente requiere un volumen de solvente distinto para vencer su atracción por la fase sólida. La composición del solvente varía progresivamente: el gradiente de dilución comienza con un solvente relativamente polar y finaliza con uno no polar; así los compuestos se van separando en distintos momentos de acuerdo a sus características moleculares (Rodríguez *et al.*, 1998; Salau *et al.*, 1998; Sanz-Asensio *et al.*, 1999).

Los biosensores se componen de una enzima fijada a un soporte sólido y su actividad es detectada amperométricamente. Si un insecticida está presente, la enzima es inhibida y su actividad residual se correlaciona con la concentración de aquel. Actualmente se intenta encontrar y producir enzimas recombinantes más sensibles a dichos insecticidas, y mejorar los métodos de inmovilización de las enzimas sobre los electrodos. Existen electrodos funcionales capaces de detectar ciertos insecticidas tales como el clorpirifos, oxón, diazinóxón o paraóxón.

Se han ensayado también determinaciones de carbofuran mediante técnicas inmunológicas con anticuerpos monoclonales. Estos inmunoensayos podrían permitir una determinación rápida, de bajo costo, y muy sensible en alimentos, suelos y en el medioambiente en general (Abad *et al.*, 1999; Nunes y Barcelo, 1999).

## Crterios de seleccin de las metodologas de determinacin

Los distintos mtodos que se pueden utilizar para determinar carbamatos obedecen a la conveniencia del investigador tanto en materia de eficiencia, calidad y costos, como en las caractersticas de la muestra con la que se trabaja.

La cromatografa gaseosa se utiliza con efectividad en anlisis de carbamatos en suelos y muestras vegetales variadas: granos de cereales, manzanas, repollos, legumbres verdes, etc. Para determinar Carbofuran, Metalaxyl y Simazina con un mnimo porcentaje de interferencias en suelos ha sido desarrollado este mtodo por Getzin *et al.* (1989). Los lmites de deteccin del mtodo fueron de 0.02 mg kg<sup>-1</sup>, con valores de recuperacin de 92, 93 y 88 %, respectivamente. Los residuos de N- metilcarbamatos (Carbofuran, Carbaryl, Carbanolate y Propoxur) pueden ser detectados a partir de 0.05 mg kg<sup>-1</sup> en muestras vegetales (AOAC, 1990), recuperando de 90 a 110%.

La cromatografa lquida es utilizada para residuos de Aldicarb, Bufencarb, Carbaryl, Carbofuran, Methiocarb, Methomyl, Oxamyl y otros metabolitos (Baglio *et al.*, 1999; Hogenboom *et al.*, 1999; Nunes y Barcelo, 1999). En general, se prefiere el uso de la cromatografa gaseosa, por su mayor facilidad de manejo, resolucin, sensibilidad y selectividad. Sin embargo, el mtodo HPLC se utiliza para determinar carbamatos termolbiles, ya que en la columna de CG se descomponen por la alta temperatura (Werner y Johnson, 1994). Este mtodo permite registrar N-metil carbamatos y N-fenil carbamatos (Moder, 1999; Bouchereau, 1999) y productos de degradacin en aproximadamente 1 L de agua o de muestras de sedimentos en agua que contengan suficiente concentracin para ser recuperado al menos 0.5 μg.L<sup>-1</sup>. Se pueden detectar en cantidades del rango de picogramos por litro cuando se analizan extractos concentrados. Para Aldicarb sulfoxido y Butoxicarboxima son 0.2 y 0.1 μg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. S solo para analitos muy polares (la mayora de los N-metilcarbamiloximas, como Aldicarb Sulfnico, Methomyl, y Oxamyl) se recuperó menos de 20% por este mtodo (Patsias y Papadopoulou-Mourkidou, 1999).

Estos mtodos convencionales son costosos, lentos y requieren adem s de personal altamente calificado. Dentro de los mtodos biolgicos de determinacin se han utilizado sensores que inmovilizan la enzima aldehido deshidrogenasa, permitiendo la deteccin de 9 μg kg<sup>-1</sup> de zineb, donde los mtodos clsicos permiten la

determinacin de 400 μg kg<sup>-1</sup>. Los electrodos monitoreados con acetilcolinesterasa pueden detectar 0.5 μg kg<sup>-1</sup> de paraoxn en un buffer acuoso y 1.4 μg Kg<sup>-1</sup> de paraoxon en una mezcla de hexano y agua en volmenes de 80:20 (Noguer *et al.*, 1999). Para el anlisis de agua potable y jugos de fruta tambin se usaron biosensores con deteccin por espectrometra con lentes termales, con lo cual pudieron detectar 2 ng. mL<sup>-1</sup> de paraoxon en menos de 15 min. (Pogacnik y Franko, 1999). Para otros organofosforados, carbaryl y carbofuran, los lmites de deteccin variaron dependiendo de la concentracin de la antiacetilcolinesterasa (Anti ACE) de 1 ng. mL<sup>-1</sup> a 4 μg. mL<sup>-1</sup>. En biosensores oxigenados basados en tiroxinasas (Everett *et al.*, 1998) los lmites de deteccin fueron 5 μM para diazinon y alrededor de 75 para nM para diclorv s.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a la bibliografa consultada se concluye que los mtodos con mayor precisin de anlisis de carbamatos son los cromatogrficos, en particular el uso de HPLC. Aunque en la actualidad haya una mayor tendencia a la utilizacin de biosensores, por practicidad y menor costo, ellos no cuentan aun con la especificidad requerida. Esto seguramente llevar a en un futuro no muy lejano a la adopcin de las tcnicas biolgicas como principales formas de anlisis de la presencia, permanencia y vas de degradacin de los pesticidas carbamatos en trabajos de investigacin relacionados con el medio ambiente, la agricultura y la salud humana.

## BIBLIOGRAFIA

- AOAC. Official Methods of Analysis. 1990. Pesticides and Industrial Chemical Residues. N° 975.40 y 985.23. Pags. 291-292.
- Abad JM.; Pariente F.; Hernandez L.; Abruna HD. and Lorenzo E. 1998. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensor. Anal. Chem. 70(14): 2848-2855.
- Abad A.; Moreno MJ. and Montoya A. 1999. Development of monoclonal antibody-eased immunoassays to the N-methylcarbamate pesticide carbofuran. J. Agric. Food Chem. 47(6): 2475-2485.
- Bachman J. and Patterson HH. 1999. Photodecomposition of the carbamate pesticide carbofuran: Kinetics and the influence of dissolved organic matter. Environ. Sci. Technol. 33(6): 874-881.

- Baglio D.; Kotzias D. and Larsen BR. 1999. Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides. *J. Chromatogr. A.* 854(1-2): 207-220.
- Barriuso, E. 2000. Contaminaciones con pesticidas utilizados en agricultura: el comportamiento de los pesticidas en el suelo como base para la interpretación y la previsión de los riesgos de contaminación. XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata (Argentina).
- Cogger, C.G.; Stark, J.D.; Bristow, L.W.; Getzin, L.W. and Montgomery, M. 1998. Transport and Persistence of Pesticides in Alluvial Soils: II. Carbofuran. *J. Environ. Qual.* 27:551-556.
- Everett WR. and Rechnitz GA. 1998. Mediated bioelectrocatalytic determination of organophosphorus pesticides with a tyrosinase-based oxygen biosensor. *Anal. Chem.* 70(4): 807-810.
- Evtugyn GA.; Budnikov HC. and Nikolskaya EB. 1998. Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination. *Talanta.* 46(4): 465-484.
- Getzin, L.W.; Cogger, C.G. and Bristow, P.R. 1989. Simultaneous gas chromatographic determination of carbofuran, metalaxyl, and simazine in soils. *J. Assoc off Anal. Chem.* Vol. 72, N° 2.
- Getzin, L.W., and Shanks Jr., C.H. 1990. Enhanced degradation of carbofuran in Pacific Northwest soils. *J. Environ. Sci. Health B.* 25:443-446.
- Gruber, S. J. and Munn MD. 1998. Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) inhibition in common carp (*Cyprinus carpio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35(3): 391-396.
- Harper F.D.; Weisskopf CP. and Cobb GP. 1998. Extraction of aldicarb and its metabolites from excreta and gastrointestinal tissue. *Anal. Chem.* 70(15): 3329-3332.
- Hawthorne S.B.; Miller D. J.; Louie P. K. K.; Butler R. D. and Mayer G. G. 1996. Vapor-Phase and Particulate-Associated Pesticides and PCB Concentrations in Eastern North Dakota Air Sample. *Environ. Qual.* 25:594-600.
- Hogenboom A. C.; Niessen W.M.A. and Brinkman U.A.T. 1999. On-line solid-phase extraction-short-column liquid chromatography combined with various tandem mass spectrometric scanning strategies for the rapid study of transformation of pesticides in surface water. *J. Chromatogr. A.* 841(1): 33-44.
- Kawasaki M.; Inoue T., Fukuhara K.; Uchiyama S.; Kawasaki M. and Hatano. 1999. Study on CC/MS (SIM) for determination of carbamate and organonitrogen pesticides in foods with simple clean up by SPE method. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 40(5): 382-390.
- López-Avila, V. 1991. Development of a Soxhlet Extraction Procedure for Extracting Organic Compounds from Soils and Sediments, EPA 600/ X-91/140 .U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, Nevada.
- Minelli, E.V.; Angioni A.; Melis M.; Pirisi F.M. and Cabras P. 1997. Determination of carbamate insecticides in apples, pears, and lettuce by LC with UV detector. *J. AOAC Int.* 80(6): 1315-1319.
- Mulchandani A.; Kaneva I. and Chen W. 1998. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents using recombinant *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. 2. Fiber optic microbial biosensor. *Anal. Chem.* 70(23): 5042-5046.
- Noguer T.; Leca B.; Jeanty G. and Marty JL. 1999. Biosensors based on enzyme inhibition: Detection of organophosphorus and carbamate insecticides and dithiocarbamate fungicides. *Field Anal. Chem. Technol.* 3(3): 171-178.
- Nunes GS. and Barcelo D. 1999. Analysis of carbamate insecticides in foodstuffs using chromatography and immunoassay techniques. *Trac-Trends Anal. Chem.* 18(2): 99-107.
- Patsias J. and Papadopoulou-Mourkidou E. 1999. A fully automated system for analysis of pesticides in water: On-line extraction followed by liquid chromatography tandem photodiode array/postcolumn derivatization/fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 82(4): 968-981.
- Pogacnik L. and Franko M. 1999. Determination of organophosphate and carbamate pesticides in spiked samples of tap water and fruit juices by a biosensor with photothermal detection. *Biosens. Bioelectron.* 14(6): 569-578.
- Randall, E.L. 1974. Improved Method for Fat and Oil Analysis by a New Process of Extraction. *J AOAC.* , 57 (5), 1165-1198. Capítulo 10. 6. Intoxicación por organoclorados, carbamatos y herbicidas.

- Rodriguez E.; de Balugera ZG.; Goicolea MA. and Barrio RJ. 1998. HPLC/diode-array method for the determination of the pesticide diflubenzuron and its major metabolites 2,6-difluorobenzamide, 4-chlorophenylurea, and 4-chloroaniline in forestry matrices. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 21(12): 1857-1870.
- Salau JS.; Honing M.; Tauler R. and Barcelo D. 1998. Resolution and quantitative determination of coeluted pesticide mixtures in liquid chromatography thermospray mass spectrometry by multivariate curve resolution. *J. Chromatogr. A.* 795(1): 3-12.
- Sanz-Asensio J.; Plaza-Medina M.; Martinez-Soria MT. and Perez-Clavijo M. 1999. Study of photodegradation of the pesticide ethiofencarb in aqueous and non-aqueous media, by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 840(2): 235.
- Skladal P.; Nunes GS.; Yamanaka H. and Ribeiro ML. 1997. Detection of carbamate pesticides in vegetable samples using cholinesterase-based biosensors. *Electroanalysis.* 9(14): 1083-1087.
- Steinheimer, T.R. 2000. Soil and sediments: pesticides content sampling, sample preparation and preservation. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry Application, Theory and Instrumentation, Volume 8*, edited by R.A. Meyers, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK, 2000, pp.6565-6582.
- Werner, S.L. and Johnson, S.M. 1994. Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory determination of selected carbamate pesticides in water water by high-performance liquid chromatography. U.S. Geological Survey. Open-file report 93-650.