

**Determinación de etilentiourea en acelgas tratadas con Zineb.  
Efecto del calor húmedo por ebullición  
Determination of ethylenethiourea in chard treated with Zineb.  
Effect of wet heat by boiling**

Ríos, Francisco Teodoro; Wierna, Norma Rosario; Ruggeri, María Alejandra; Bovi Mitre María Graciela\*

Grupo INQA. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Jujuy. Alberdi 47. 4600. San Salvador de Jujuy. Jujuy. Argentina. Te/Fax 0388 4233014

\*gbovi@imagine.com.ar

Recibido: 25 de febrero de 2016

Aceptado: 24 de agosto de 2016

**Resumen.** El Zineb es un plaguicida perteneciente a la familia de los etilenbisditiocarbamatos (EBDC) ampliamente utilizado en la provincia de Jujuy (Argentina). La toxicidad de este fungicida está dada por la etilentiourea (ETU) que es el principal producto de su degradación. La ETU tiene efectos mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos en animales. La EPA la clasifica como probable cancerígeno humano. El objetivo del trabajo fue determinar la transformación del Zineb a ETU en acelgas cultivadas en Jujuy, por efecto del calor húmedo por tratamiento térmico. El método se basó en la extracción de la ETU con agua y su posterior reextracción con diclorometano a pH alcalino. El extracto se purificó por cromatografía en columna de alúmina y la ETU se cuantificó por HPLC con un detector UV-Visible a 232 nm. Para cumplir con el objetivo planteado se realizó un cultivo experimental de acelgas a las que se aplicó el fungicida Zineb, el cual luego se cuantificó a diferentes periodos de tiempo. La ETU se cuantificó con y sin aplicación de calor húmedo. La concentración de ETU en las acelgas sometidas a tratamiento térmico fue de 8,07 mg/kg y transcurridos 30 días disminuyó a 0,05 mg/kg, lo que representa una disminución de más del 99 % respecto a la concentración inicial. Simultáneamente, se determinó la concentración de Zineb en las acelgas y se obtuvo, inicialmente, 44 mg/kg y luego de 36 días la concentración de Zineb disminuyó a 3,83 mg/kg, lo que representa una disminución del 91 % respecto a la concentración del plaguicida al inicio. La detección de ETU en acelgas sometidas a tratamientos térmicos confirma la transformación del fungicida Zineb a un producto de degradación clasificado según el IARC en el grupo 3. Esto pone en discusión la reglamentación Argentina vigente, por cuanto al finalizar los tiempos de carencia no se evalúan la presencia de metabolitos o productos de degradación potencialmente tóxicos.

**Palabras clave:** Etilentiourea; Zineb; Acelgas; Tratamiento térmico

**Abstract.** Zineb is a pesticide belonging to the family of ethylenebisdithiocarbamates (EBDC) widely used in the province of Jujuy, Argentina. The toxicity of this fungicide is given by the ethylenethiourea (ETU) which is the main product of degradation. The ETU has mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects in animals. The EPA classifies it as a probable human carcinogen. The aim of the study was to determine the transformation of Zineb to ETU in cultivated chards in Jujuy, by treatment with humid heat. The method is based on extraction of ETU with water and subsequent extraction of the aqueous phase with dichloromethane. The extract was cleaned by alumina column chromatography and the ETU was quantified by HPLC with a UV-Visible detector at 232 nm.

An experimental cultivation of chards was carried out and the Zineb fungicide was applied and then quantified at different time periods. The ETU was quantified with and without application of moist heat.

The concentration of ETU in heat treated chards was 8.07 mg/kg and after 30 days decreased to 0.05 mg/kg, representing a decrease of more than 99 % over the initial concentration. Simultaneously, Zineb concentration in chard was initially determined as 44 mg/kg and, 36 days later, the Zineb concentration decreased to 3.83 mg/kg, representing a 91% decrease with respect to the concentration of the pesticide at the beginning.

Detection of ETU in chards subjected to heat treatment confirms the transformation of the fungicide Zineb to a degradation product classified by the IARC as group 3. This puts into discussion the current Argentine regulations since, at the end of the deficiency times the presence of potentially toxic metabolites or degradation products is not evaluated.

**Key words:** Ethylenethiourea; Zineb; Chards; Heat treatment

## Introducción

Los fungicidas son usados extensamente en la industria, en la agricultura, en el hogar y en el jardín para distintos propósitos que incluyen: la protección de las semillas durante su almacenamiento, transporte y germinación; la protección de los cultivos, hierbas silvestres, frutas y flores, tanto durante su almacenamiento como durante su transporte. En cuanto al hogar, pueden ser utilizados para la eliminación de los mohos que atacan las superficies pintadas, así como la protección de alfombras y telas.

El Zineb es un fungicida del grupo de los etilenbisditiocarbamatos (EBDC) y, según la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), su nombre es etilenbisditiocarbamato de zinc. Los fungicidas EBDC son metabolizados a etilentiourea (ETU) en organismos vivos y también degradados a ETU en el medio ambiente (Rossi Lemes y col. 2014). El nombre químico de la ETU es imidazolina-2-tiona. Su fórmula química es  $C_3H_6N_2S$  y tiene una masa molar de 102,2 g/mol.

La ETU también se puede formar durante la manufactura de estos fungicidas y se encuentra como impureza en los productos formulados (Saltamiras y Lemley 2000). El proceso de degradación de los EBDC a ETU se ve favorecido durante el almacenamiento, por tratamiento a altas temperaturas y por cocción de los alimentos (Hwang y col. 2002); además influyen en esta degradación el oxígeno disponible (Marshall 1997) y el pH (IARC 2001).

Se ha estudiado la descomposición química de los EBDC a temperatura ambiente bajo distintas condiciones. Los productos de degradación son, entre otros el disulfuro de carbono ( $CS_2$ ), sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), etilendiamina (EDA), etilentiourea (ETU), etilen-tiuram-disulfuro (ETM), etilen-tiuram-monosulfuro (ETD), azufre elemental (Marshall 1997), etilenobis (isotiocianato) sulfuro (EBIS) y etilenurea (EU) (Garcinuño y col. 2004). En condiciones ácidas el principal producto es la EDA y  $CS_2$ , mientras que en condiciones neutras y alcalinas es favorecida la transformación a ETU (Lasage 1980). La ETU es el principal metabolito de la hidrólisis de los EBDC. Se ha demostrado que los EBDC son teratogénicos, cancerígenos y mutagénicos en pruebas con animales y además tienen un efecto antitiroideo (Mnif y col. 2011), por otra parte la ETU induce daños al ADN, riñón, pulmón y bazo en ratones (Saltamiras y Lemley 2000; Mora y Rodríguez 2002). La ETU es clasificada dentro de la categoría 1 (sustan-

cias para las cuales la actividad endócrina se ha documentado en al menos un estudio en un organismo vivo. A estas sustancias se les da la más alta prioridad para estudios posteriores) por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Dinamarca.

La  $DL_{50}$  de la ETU es de 1832 mg/kg en ratas. La ETU ha sido clasificada en el grupo IIB por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) como un probable cancerígeno humano en base a las evidencias de los estudios en animales (Hwang y col. 2001), mientras que para la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) está clasificada en el grupo 3 (no carcinógeno para humanos), aunque el programa Nacional de Toxicología de U.S. considera que es razonable anticipar a la ETU como cancerígeno humano (Panganiban y col. 2004).

Kontou y col. (2004) estudiaron el efecto de la temperatura en la degradación del Maneb, el etilenbisditiocarbamato de manganeso, en el rango de 50-90 °C. Por estos estudios se conoce que la mayor formación de ETU se produce en los primeros 15 minutos de calentamiento y que a altas temperaturas, más rápida y mayor es la degradación del Maneb. A 90 °C, la conversión a ETU en pH alcalino es mucho más alta que la conversión a pH ácido (Kontou y col. 2004).

La ETU es estable en solución acuosa en un rango de pH 5 a 9 (Kontou y col. 2001).

El valor máximo permitido de residuos de ETU en productos agrícolas es de 0,05 mg/kg según normas de la Unión Europea. El programa de monitoreo de la *Food and Drugs Administration* (FDA) establece 10 ng/g como residuo máximo de ETU en alimentos (Tran y col. 2013). La legislación Argentina no establece un valor de límite máximo de residuo para ETU.

Investigaciones realizadas en la provincia de Jujuy, por el Grupo Investigación Química Aplicada (INQA) de la Universidad Nacional local detectaron el uso de fungicidas de la familia de los EBDC (Bovi Mitre y Bardón 1998). Entre los productos más usados se encontraron: Mancozeb, Maneb y Zineb (Wierna y col. 2001). Se detectaron residuos de Zineb en el 63 % (N= 164) de las muestras de tomates, siendo los valores encontrados en los mercados tres veces mayores a los registrados en las verdulerías (Bovi Mitre y col. 1998). En el período 2003-2004 se analizaron espinacas comercializadas en la capital de la provincia y en el 100 % de las muestras se detectaron residuos de

Zineb (Wierna y col. 2005).

Con estos datos, surge la necesidad de investigar si se genera la ETU en hortalizas de consumo masivo tratadas con Zineb.

El objetivo del trabajo fue determinar la transformación del Zineb a ETU en acelgas cultivadas y tratadas con el fungicida en Jujuy (Argentina), sometidas a cocción en agua, ya que la degradación del fungicida a ETU se ve favorecida durante el procesamiento a altas temperaturas.

### Materiales y métodos

#### Reactivos y equipos

Se trabajó con un patrón de etilentiourea marca Sigma Aldrich (Pestanal).

El producto comercial utilizado en el cultivo de acelgas fue el Zineb 70 %.

Para la determinación de ETU se usó carbonato de sodio decahidratado, sulfato de sodio anhidro y alúmina neutra de grado analítico Merck, metanol grado HPLC y diclorometano grado analítico Merck.

Las cuantificaciones de ETU fueron realizadas con un cromatógrafo líquido de alta performance (CLAP) equipado con un inyector Rheodyne y un detector UV 6000LP con arreglo de diodos (180-800 nm). Los datos fueron procesados con un *software* ChromQuest 4,1. Se usó una columna C<sub>18</sub> (5 µ), longitud 250 mm por 4,6 mm de diámetro interno.

Se preparó el estándar primario de 100 mg/L de ETU en fase móvil (agua/metanol, 95/5) y se hicieron diluciones en un intervalo de concentraciones entre 0,05 a 10 mg/L. Se construyeron dos curvas de calibración con rangos que van de 0,05 a 1 mg/L y de 1 a 10 mg/L.

La técnica analítica que se usó para la determinación de Zineb por espectrofotometría es la desarrollada por Keppel (1971).

#### Cultivo experimental

Se trabajó con acelgas (*Beta vulgaris*, Chenopodiaceae), cultivadas en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Jujuy (UNJu). El suelo se preparó en forma manual. Se usaron plantines y se colocaron cinco plantas por raya (líneas sencillas) a una distancia aproximada entre ellas de 0,25 cm, el espacio entre líneas fue de 50 cm. Se utilizó riego por goteo. Para el diseño experimental se dividió la plantación en 5 bloques de 3,5 m<sup>2</sup> cada uno (Figura 1).

La aplicación del plaguicida en los bloques I, II, III y IV se realizó a una concentración de 2 gra-

mos por litro (dosis recomendada por la guía fitosanitaria-CASAFE) del producto comercial Zineb 70 %, con una mochila Manual Jacto de 20 litros tratando de repetir las prácticas de los pequeños productores de la región.

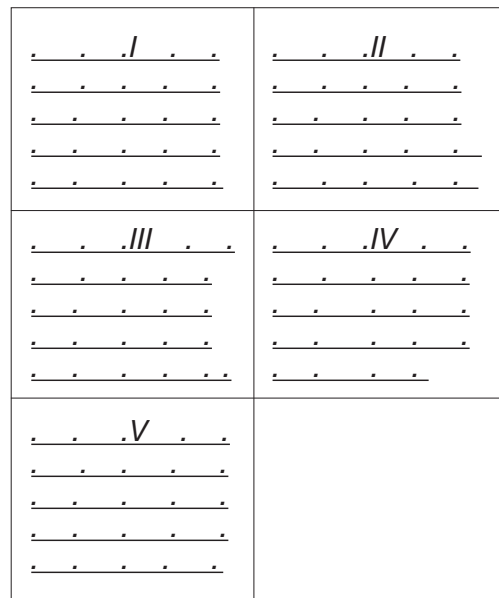


Figura 1. Bloques en los que se dividió el cultivo experimental

En la puesta a punto y validación de la técnica, se utilizó acelgas del bloque V que no recibió aplicación del fungicida. El patrón de ETU se usó como estándar externo en las hortalizas utilizadas como blanco.

La recolección de las muestras se realizó de forma aleatoria de todos los bloques excepto el V, utilizando la hoja y eliminando su tallo para la cuantificación.

#### Técnica analítica

Se eligieron en forma aleatoria cinco hojas de acelga con buen desarrollo, se cortaron, homogeneizaron y pesaron 50 g. Se sometieron a calor húmedo por ebullición durante 30 minutos, se agregó 30 mg de carbonato de sodio. La ETU disuelta en agua se reextrajo tres veces con porciones de 100 mL de diclorometano. Se concentró en rotavapor a 45 °C y 80 revoluciones por minuto. Debido a que la ETU es un compuesto altamente polar tiene un bajo coeficiente de partición en diclorometano por lo que es indispensable agregar el carbonato de sodio para su remoción cuantitativa de la fase acuosa.

El extracto del diclorometano se sometió a clean up por cromatografía en columna, usando 50 mL de diclorometano/metanol 99/1(v/v). La columna se preparó con 5 g de alúmina desactivada/agua (95/5) y aproximadamente 1 g de sulfato de sodio.

La ETU se cuantificó por HPLC con un detector UV-visible a 232 nm, siendo la fase móvil agua/metanol (95/5). Las condiciones en las que se realizaron las corridas cromatográficas fueron: flujo isocrático 0,8 mL/min;  $\lambda = 232$  nm y un volumen de inyección de 20  $\mu$ L. (Ríos y col. 2008)

#### Tratamiento de la muestras

Para estudiar el efecto del calor húmedo por ebullición en la transformación del Zineb a ETU, se trabajó con las acelgas tratadas con el fungicida y recolectadas a partir del primer día de aplicado el Zineb.

Se cuantificó ETU hasta 30 días después de aplicado el plaguicida. Simultáneamente se investigó la presencia de ETU en muestras del mismo cultivo sin someterlas a la etapa de calentamiento descrito en el método analítico.

Se analizaron por duplicado y se hicieron tres inyecciones en el HPLC de cada una de ellas. Las concentraciones de ETU en acelgas registradas en las tablas son promedios.

#### Estabilidad de un patrón de ETU

Para determinar la estabilidad de la ETU se preparó un estándar de 10 mg/L. Una alícuota se refrigeró a  $7 \pm 2$  °C, otra se congeló a  $-27 \pm 1$  °C, una tercera se dejó en condiciones ambientales protegida de la luz y una cuarta alícuota se conservó a temperatura ambiental sin protección. Se determinó la concentración de ETU a diferentes intervalos de tiempo, en las cuatro alícuotas.

### Resultados y discusión

#### Curvas de calibración

El límite de detección (LD) obtenido fue de 0,015 mg/L y el límite de cuantificación (LC) de 0,05 mg/L.

Para determinar la recuperación del método se utilizaron acelgas que no recibieron tratamientos con plaguicidas (bloque V de la Figura 1). Se trabajó con dos muestras por duplicado, enriquecidas con 0,0010 g de ETU/50 g de acelga. La recuperación del método fue del 94 %.

Para la determinación de la recuperación del método en los análisis de Zineb se trabajó con

dos muestras por duplicado de acelgas a las que se adicionaron 0,0010 g de Zineb comercial/ 100 g de acelga. El valor obtenido fue de 86,4 %.

#### Estabilidad de un patrón de ETU

Los resultados obtenidos en esta investigación, que demuestran la estabilidad de la ETU (tabla 1) en la fase móvil durante 62 días, sin refrigeración y sin protección a la luz, están de acuerdo con las investigaciones de Newsome y Laver (1973) que demostraron esta propiedad del tóxico en aguas, tanto superficiales como profundas.

**Tabla 1.** Estabilidad de la ETU a distintas condiciones de almacenamiento.

Condiciones de ensayo	Estabilidad en días
Refrigeración ( $7 \pm 2^\circ$ C)	68
Freezado ( $-27 \pm 1^\circ$ C)	36
Condiciones ambientales con protección de la luz artificial	49
Condiciones ambientales sin protección de la luz artificial	62

#### Determinación de ETU en el producto comercial

En el producto comercial utilizado en las aplicaciones (Zineb 70 %) se detectó una contaminación con ETU en una concentración del 1,05 mg de ETU/g de Zineb comercial, es decir el 0,1 % es ETU. Este resultado es menor aún al descrito por Jacobsen y Bossio (1997) que registraron a la ETU como una impureza en el grupo de los EBDC en un porcentaje cercano al 10 %. Saltamiras y Lemley (2000), describen brevemente las restricciones internacionales en el uso de los EBDC, generadas en torno a este hallazgo.

#### Concentraciones de ETU y Zineb en las acelgas tratadas con el plaguicida y sometidas al tratamiento térmico

En la Tabla 2 se registran los datos de las concentraciones de ETU en las hortalizas analizadas con una etapa de ebullición con calor húmedo y las concentraciones de Zineb en las acelgas del cultivo experimental.

Se observó que las concentraciones de ETU disminuyen en el tiempo lo que coincide con

la disminución del contenido del fungicida en las hojas tratadas.

**Tabla 2.** Concentraciones de ETU y Zineb a partir del primer día de aplicado el fungicida.

Muestra	Recolección (días)	ETU (mg/kg)	Zineb (mg/kg)
M1	1	8,07	44
M2	8	7,52	37,20
M3	16	1,49	26,83
M4	23	0,43	19,54
M5	30	0,05	13,91
M6	36	≤0,05	3,83

Los valores de ETU disminuyeron de 8,07 hasta 0,05 mg/kg transcurridos 30 días de la aplicación, en análisis posteriores a esta fecha no se detectó ETU. Los valores de Zineb disminuyeron de 44 mg/kg a un valor de 3,8 mg/kg a los 36 días. Se observó en estos datos una tendencia similar a los resultados publicados por Trotter y Pardue (1982) quienes detectaron concentraciones de Zineb que van desde 80 a 5,2 mg/kg, mientras que, las concentraciones de ETU varían de 2,3 a 0,12 mg/kg.

El valor de 3,8 mg/kg de Zineb a los 36 días es cercano a las 3 mg/kg de Zineb, que es el límite máximo de residuos (LMR) establecido por la legislación Argentina y está muy por encima de los 0,05 mg/kg, correspondiente al LMR para Zineb establecido por la Unión Europea. La legislación establece como tiempo de carencia 15 días.

Según esta investigación el LMR se alcanza después de 36 días de aplicación del fungicida. Datos como estos ponen la urgencia de discutir y establecer los límites máximos de residuos y los tiempos de carencia.

Son múltiples los estudios que describen la toxicidad asociada a la exposición simultánea a los EBDC y a su metabolito ETU. Así Nebbia y Fink-Gremmels (1996) y Mnif y col. (2011), describen los efectos adversos aún a bajas dosis de Zineb y ETU en la función tiroidea de animales de experimentación, datos que sirven para reglamentar restricciones en el uso de estos plaguicidas.

En la *Tabla 3* se describen los resultados de los

contenidos de ETU en las muestras analizadas con una etapa de ebullición con calor húmedo y muestras analizadas sin calentamiento. Se observa que, en las muestras procesadas sin calentamientos, no se detecta ETU lo que estaría indicando que la contaminación del producto comercial con este tóxico es prácticamente despreciable y no aparece en las hojas de la hortaliza sin cocción. También estaría indicando, en coincidencia a lo descrito por Hwang y col. (2001), que la velocidad de degradación de la ETU generada a partir de los EBDC es mayor que la velocidad de su formación como producto de su metabolización.

**Tabla 3.** Concentraciones de ETU en acelgas que fueron procesadas siguiendo la técnica analítica completa (con calentamiento) y aquellas a las que no se las sometió a calentamiento.

Muestra	Recolección (días)	ETU (mg/kg) (sin calentamiento)	Zineb (mg/kg) (con calentamiento)
M1	1	ND	8.07
M2	8	ND	7.52
M3	16	ND	1.49
M4	23	ND	0.43
M5	30	ND	0.05
M6	36	ND	≤0,05

De los datos obtenidos se puede concluir, además, que hasta los 30 días las hortalizas sometidas a calor húmedo por ebullición están contaminadas con residuos de Zineb y de ETU.

Las hortalizas que no son sometidas a un tratamiento térmico sólo presentan residuos de Zineb.

### Conclusiones

En las hojas de acelgas tratadas experimentalmente con Zineb en una dosis de 2 g/L, se detectaron residuos de éste plaguicida hasta 36 días después de aplicado. Este resultado advierte que a pesar de usar la dosis recomendada (2 g/L) el tiempo de carencia establecido por la legislación argentina (15 días) no coincide con datos empíricos de la región NOA (36 días).

La cuantificación de ETU en las hojas de acelgas tratadas con Zineb y sometidas a calor

húmedo advierte la presencia de este tóxico a concentraciones tan altas como 8 mg/kg inmediatamente de aplicado el fungicida y una permanencia en la hortaliza hasta 30 días después.

Se deben incorporar en las discusiones relativas a plaguicidas, las consideraciones sobre la generación de metabolitos o productos de degradación que ejerzan un efecto adverso en el hombre y su entorno, así como la estabilidad que tienen en el ambiente.

### Recomendaciones

Queda en discusión la reglamentación Argentina vigente en cuanto a los tiempos de carencia los cuales, indefectiblemente, deben determinarse experimentalmente, ya que están muy alejados de la realidad, son demasiado cortos frente a la permanencia de tóxicos en los cultivos. Se recomienda revisar la reglamentación respecto a los LMR establecidos en Argentina ya que son valores más altos que los establecidos en legislaciones internacionales e incorporar la discusión de metabolitos y productos de degradación de los plaguicidas que se generan en productos alimenticios.

No es suficiente establecer dosis recomendadas en el manejo de agroquímicos en cultivos de uso masivo.

### Bibliografía citada

Agencia Internacional para Investigación de Cáncer (IARC). Ethylenethiourea. Monog Eval Carc. 2001; 79 p. 659.

Bovi Mitre M.G., Bardón A. Residuos Tóxicos en Frutos. San Salvador de Jujuy (Argentina). Ed. Universidad Nacional de Jujuy, Jujuy, Argentina.1998; p. 83 .

Bovi Mitre M.G., Ruggeri M.A., Singh J., De Pascuale N., Cormenzana E., De Pascuale A. Detección de Residuos de Zineb en Tomates en San Salvador de Jujuy. Revista de Ciencia y Técnica.1998;3:17-26.

Garcinuño R.M., Fernández-Hernando P., Cámara C. Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection. J Chromatogr A. 2004;1043:225-229.

Hwang E., Cash J., Zabik M. Chlorine and Chlorine Dioxide Treatment to Reduce or Re-

move EBDCs and ETU Residues in a Solution. J Agr Food Chem. 2002; 50:734-4742.

Hwang E., Cash J., Zabik M. Postharvest Treatments for the Reduction of Mancozeb in Fresh Apples. J Agr Food Chem. 2001;49:3127-3132.

Jacobsen O.S., Bossi R. Degradation of ethylenethiourea (ETU) in oxic and anoxic sandy aquifers FEMS. Microbiol Rev. 1997;20:539-544.

Keppel G.E. Collaborative Study of the Determination of Dithiocarbamate Residues by a Modified Carbon Disulfide Evolution Method. J. Assoc. Off. Anal. Chem.1971,54,528-532.

Kontou S., Tsipi D., Oreopoulou V., Tzia C. Determination of ETU in Tomatoes and Tomato Products by HPLC-PDA. Evaluation of Cleanup Procedures. J Agr Food Chem. 2001;49:1090-1097.

Kontou S., Tsipi D., Tiza C. Kinetics of Maneb Degradation during Thermal Treatment of Tomatoes. J Agr Food Chem. 2004;52:1212-1219.

Lasage S. Ethylenebis (dithiocarbamates) by Cupric Ions in Aqueous Media. J Agr Food Chem. 1980;28:787-790.

Marshall W.D. Thermal Decomposition of Ethylenebis dithiocarbamate Fungicides to Ethylenethiourea in Aqueous Media. J Agr Food Chem.1997; p.25.

Mnif W., Hassine A.I.H., Boucziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2011;8(6):2265-2303.

Mora D., Rodríguez O.M. Optimización de un método por cromatografía líquida de alta resolución para determinar residuos de etilentiourea en muestras de tomate. Ingeniería y Ciencia Química. 2002;20:24-27.

Nebbia C., Fink-Gremmels J. Acute effects of low doses of Zineb and ethylenethiourea on thyroid function in the male rat. Bull Environ Contam Tox.1996;56:847-852.

Newsome W.H., Laver G.W. Effect of boiling on the formation of ethylenethiourea in zineb treated foods. Bull Environ Contam Tox.1973;10:151-154.

Panganiban L., Cortes-Maramba N., Dioquino C., Suplido M.L., Ho H., Rivera, F. Ethylene thiourea. In Report on Carcinogens. NTP 13th ed.; [en línea]. 2004. [consulta 24 de noviembre de 2015] Disponible en: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/ethylenethiourea.pdf>.

Ríos F.T., Wierna N.R., Campos E., Saavedra O. N., Bovi Mitre M. G. Propuesta de un método modificado para determinar residuos de Etilentiourea en acelga y espinaca. *Acta Toxicol Argent.* 2008;16(supl):5-6.

Rossi Lemes V.R., Martins-Júnior H.A., Carvalho de Souza S.V., Colacioppo, S. Ethylenethiourea in fruits: Optimization and in-house validation of a method by liquid chromatography tandem mass spectrometry, occurrence and dietary exposure assessment. *Food Control.* 2014;42:321-328

Saltamiras D.A., Lemley A. Degradation of ethylenethiourea (ETU) with Three Fenton Treatment Processes. *J Agr Food Chem.* 2000;48:6149-61.

Tran K., Mactal L., Cromer R., Smith R. Development and validation of Ethylenethiourea Determination in Foods using Methanol-Based Extraction, Solid-Phase Extraction Cleanup and LC-MS/MS, *Food Chem.* 2013;140:340-342.

Trotter W., Pardue J. The results and Evaluation of a Limited Survey for Ethylenebisdithiocarbamate and Ethylenethiourea Residues in Correlated Raw and Canned Spinach and Tomato Samples. *J Food Safety.* 1982;4:59-68.

Wierna N., Maidana Iriarte S., Bonillo M., Bovi Mitre M. Estudio Comparativo de los Plaguicidas más usados en Jujuy, Argentina, en los últimos diez años. *Revista AIDIS. Ingeniería Sanitaria y Ambiental.* 2001;57:76-80.

Wierna N., Saavedra N., Vargas N., Campos E., Ruiz A., Ruggeri M., Bovi Mitre M. Investigación Preliminar de Residuos de Zineb en Espinaca Comercializadas en San Salvador de Jujuy. *Acta Toxicológica Argentina.* 2005;13:38-39.