

REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA DETERMINACIÓN DE DITIOCARBAMATOS EN PLANTAS DEL GÉNERO *BRASSICA*

Systematic review of the determination of dithiocarbamates in plants of the genus *brassica*

Alba Picón-Martínez, José Oliva, José Manuel Veiga-del-Baño, Pedro Andreo-Martínez

Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia 30100 España.

Autor de correspondencia: Pedro Andreo-Martínez, pam11@um.es

Tipo de artículo: Trabajo fin de Grado (Ciencia y Tecnología de los Alimentos)

Enviado: 29/11/2022

Aceptado: 30/03/2023

RESUMEN

Los ditiocarbamatos (DTCs) son un grupo de compuestos organosulfurados utilizados principalmente como plaguicidas para controlar enfermedades fúngicas en cultivos agrícolas. Además de esto, los DTCs se utilizan como aditivos de vulcanización en la fabricación de caucho, aditivos en lubricantes o antioxidantes, entre otros. Los DTCs se clasifican en función de su esqueleto organosulfurado ya que la principal diferencia entre ellos se debe a los elementos presentes en su esqueleto de carbono azufrado, que pueden ser Zn, Mn, Fe, Na o Se.

El abuso en la utilización de DTCs puede suponer un riesgo para los consumidores, cuando la concentración en los alimentos es elevada. También puede ser nocivo para los trabajadores agrícolas, bien por inhalación o por exposición *dérmica*.

Este trabajo utiliza la metodología PRISMA para realizar una revisión sistemática sobre la determinación de residuos de DTCs en plantas del género *Brassica* donde se han encontrado 8 artículos, en los que se utilizan diferentes métodos y técnicas analíticas para la determinación de DTCs

Los métodos analíticos más comunes son espectrofotometría UV-visible, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, cromatografía líquida o cromatografía gaseosa. Algunos de los métodos se centran en determinar el fungicida etileno-bis-ditiocarbamato. Otros se centran en la determinación de pen-cycurum, fungicida del grupo de la fenilurea, utilizado para el tratamiento contra los hongos. También se han

encontrado *métodos basados* en la extracción del complejo Se-pirrolidina ditiocarbamato de amonio.

La presencia de DTCs se expresa como CS_2 . El principal inconveniente se debe a que las plantas del género *Brassica* presentan azufre en su estructura pudiendo generar CS_2 fitogénico y generar errores en la cuantificación, dando lugar a falsos positivos. Además de esto, otro inconveniente es la incapacidad de diferenciar entre los diferentes DTCs

Palabras clave: *Brassica*; Ditiocarbamatos; Disulfuro de carbono; PRISMA

ABSTRACT

Dithiocarbamates (DTCs) are a group of organosulfur compounds used mainly as pesticides to control fungal diseases in agricultural crops. In addition to this, DTCs are used as vulcanization additives in rubber manufacturing, additives in lubricants or antioxidants, among others. DTCs are classified according to their organosulfur skeleton, since the main difference between them is due to the elements present in their sulfur carbon skeleton, which can be Zn, Mn, Fe, Na or Se.

Abuse in the use of DTCs can pose a risk to consumers, when the concentration in food is high. It can also be harmful to agricultural workers, either by inhalation or dermal exposure.

This work uses the PRISMA methodology to perform a systematic review on the determination of DTCs residues in *Brassica* plants where 8 articles have been found, in which different methods and analytical techniques are used for the determination of DTCs.

The most common analytical methods are UV-visible spectrophotometry, inductively coupled plasma mass spectrometry, liquid chromatography or gas chromatography. Some of the methods focus on determining the fungicide ethylene-bis-dithiocarbamate. Others focus on the determination of pencycurum, a fungicide of the phenylurea group, used for the treatment of fungi. Methods based on the extraction of the ammonium Se-pyrrolidine-dithiocarbamate complex have also been found.

The presence of DTCs is expressed as CS_2 . The main drawback is due to the fact that plants of the *Brassica* genus present sulfur in their structure and can generate phytoxic CS_2 and generate errors in the quantification, giving rise to false positives. In addition to this, another drawback is the inability to differentiate between the different DTCs.

Keywords: *Brassica*; Dithiocarbamates; Carbon disulfide; PRISMA

1. INTRODUCCIÓN

Los ditiocarbamatos (DTCs) son un grupo de compuestos organosulfurados que se han utilizado ampliamente como plaguicidas no sistémicos en la agricultura desde hace más de 80 años (Van Boxtel et al., 2010; Fanjul-Bolado et al., 2020). Específicamente, se utilizan para controlar enfermedades *fúngicas* en la producción agrícola de frutas y verduras. Los DTCs también se utilizan como conservantes de madera, como antimoho en la fabricación de pulpa y papel, como aceleradores de la vulcanización en la industria del caucho, para el tratamiento de los suelos, como repelente de roedores y como

aditivos de lubricantes. Clínicamente, los DTCs se utilizan para el tratamiento de alcoholismo crónico y como agentes antitóxicos y anticancerígenos (Crnogorac y Schwack, 2009; Schmidt et al., 2013). Se sabe que el abuso de DTCs puede suponer un riesgo para la salud humana debido a que su uso puede generar residuos en frutas y verduras, y los consumidores pueden, en consecuencia, estar expuestos a DTCs a través de la ingestión de alimentos. La exposición laboral a los DTCs también puede ocurrir en un entorno agrícola por exposición dérmica o por inhalación (Prudente et al., 2018).

Los DTCs según su esqueleto organosulfurado pueden clasificarse en tres subclases:

Propileno-Bis-ditiocarbamatos (PBs) incluyendo el propineb; Etileno-Bis-ditiocarbamatos (EBs) incluyendo el mancozeb, maneb y zineb; y Dimetil Ditiocarbamatos (DDs) incluyendo el tiram, ziram y ferbam. La diferencia entre los DTCs se debe a elementos presentes en su esqueleto de carbono azufrado tales como Zn, Se, Mn, Na y Fe (Schmidt et al., 2013; Fanjul-Bolado et al., 2020). Los ditiocarbamatos se metabolizan fácilmente en Etilentiurea (ETU), Propilentiurea (PTU) y otros productos de transformación, incluido el disulfuro de carbono (CS_2). En la Figura 1 se muestra la estructura química de nueve de los DTCs.

Uno de los problemas relacionados con el uso de DTCs como fungicida se debe a que son compuestos que dejan una elevada cantidad de residuos en los alimentos y forrajes. La actividad biológica que presentan los DTCs

aumenta cuando se presentan en forma de sales metálicas. Otra característica a cerca de los DTCs es que presentan una elevada capacidad para unirse a otros compuestos pudiendo actuar como inhibidores de enzimas causando un amplio efecto adverso en los sistemas biológicos (Schmidt et al., 2013).

Los DTCs presentan algunos inconvenientes analíticos, como por ejemplo la baja estabilidad en presencia de una matriz vegetal y además son compuestos que presentan baja solubilidad, lo que limita el uso de métodos cromatográficos utilizados para la detección de otros pesticidas (Schmidt et al., 2013; Fanjul-Bolado et al., 2020).

Algunos fungicidas, como por ejemplo el Zineb, fueron prohibidos en muchos lugares del mundo incluida la UE debido a la toxicidad que presentan. Actualmente la Unión Europea

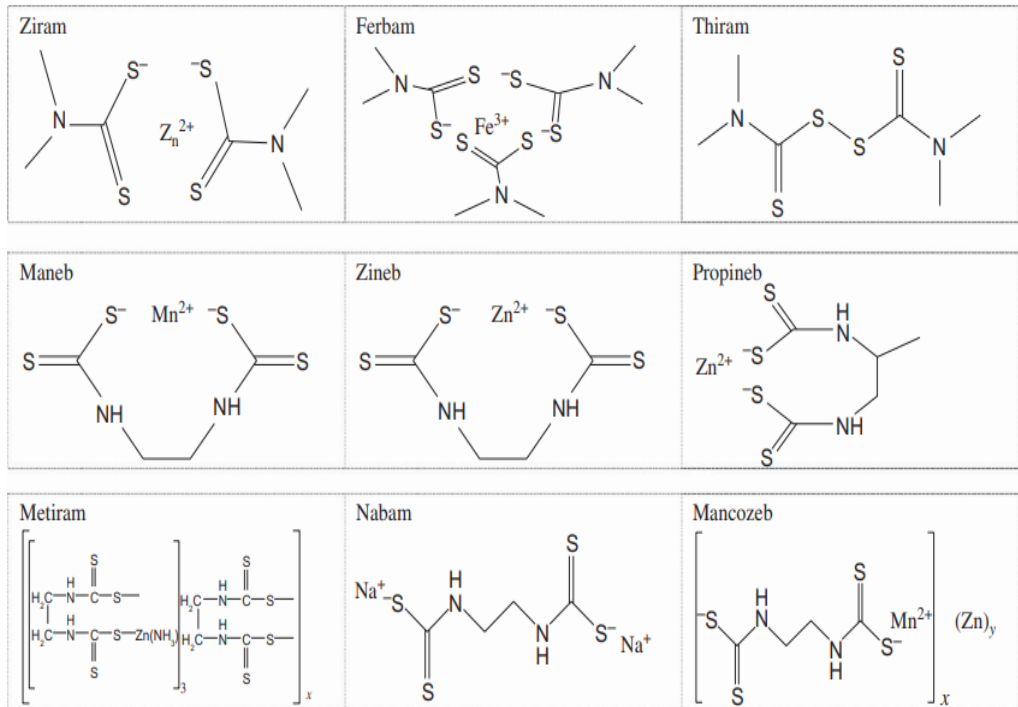


Figura 1. Estructura de nueve ditiocarbamatos (Schmidt et al., 2013).

ha establecido límites máximos de residuos (LMR) en rangos de ppm en una gran variedad de alimentos y productos agrícolas. Los LMR deben entenderse como la cantidad mínima de DTCs necesaria para lograr una protección eficaz contra los patógenos causantes de infecciones en frutas, verduras y cereales, y seguir siendo aceptables para la ingesta de los consumidores (Schmidt et al., 2013; Fanjul-Bolado et al., 2020).

Actualmente, la definición a cerca de los LMR debe entenderse como el total de residuos derivados de alguno de los DTCs determinados como CS₂. La conversión de los DTCs a CS₂ puede ser debida a una digestión ácida. Cuando los DTCs entran en contacto con los jugos ácidos de las plantas, éstos se degradan debido a que los ácidos ditiocarbámicos en estado libre no existen y como consecuencia se convierten en CS₂ y su amina respectiva (Crnogorac y Schwack, 2009; Schmidt et al., 2013). A partir de la curva de calibración se deduce la cantidad de CS₂ que se encuentra presente en nuestra muestra, siendo ésta la suma del CS₂ procedente de los posibles DTCs presentes en la muestra junto con el CS₂ endógeno.

La ecuación utilizada para determinar la masa de residuo (w), en términos de CS₂, expresada en miligramos por kilogramos, es la siguiente:

$$w = \frac{m_c}{m_t}$$

donde m_c hace referencia a la masa de CS₂ que ha sido liberada, expresada en miligramos. Este valor se obtiene por deducción a partir de la curva de calibración. En cambio, m_t representa la masa de la muestra antes de eliminar cualquier parte, expresada en gramos.

Cuando los resultados de la determinación de la cantidad de CS₂ se encuentran cerca o sobrepasan el LMR se deben analizar como mínimo dos porciones de la muestra. El límite depende de la cantidad de muestra empleada.

Por ejemplo, si la masa de la muestra pesa en torno a 50 g el LMR se sitúa alrededor de 0,01 mg/kg (UNE-EN 12396-2:2000).

El principal inconveniente en el análisis de DTCs basado en la cantidad de CS₂ es que puede verse afectado dando lugar a falsos positivos o puede generarse una sobreestimación de la concentración de DTCs en productos agrícolas que presenten elevados niveles de compuestos orgánicos de azufre (Schmidt et al., 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, los DTCs son compuestos muy utilizados en el sector de la agricultura. A pesar de esto, presenta una gran limitación en el campo de la investigación de métodos analíticos para su detección en comparación con el resto de los fungicidas. Actualmente se pueden utilizar diversos métodos para su detección (Fanjul-Bolado et al., 2020).

Entre los métodos más selectivos para la detección de DTCs encontramos los métodos cromatográficos. En la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GS-MS), se extraen los compuestos como sales de Na solubles en agua con cisteína y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). A continuación, se realiza una derivatización por metilación, permitiendo así diferenciar los diferentes tipos de DTCs.

La cromatografía líquida de fase inversa acoplada con detectores electroquímicos, ópticos o de espectrometría de masas se basa en la formación de pares iónicos entre los aniones de los DTCs y los cationes de tetrabutilamonio en medios alcalinos que contienen EDTA. Este método solo proporciona resultados precisos para vegetales que presentan una superficie intacta. Además, la cromatografía líquida con espectrometría de masas es un método de determinación que incapacita la posibilidad de diferenciar los diferentes tipos de DTCs debido a las transiciones de masa que se presentan y los tiempos de retención. Los tiempos de retención para los DTCs de elución temprana como Ferbam, Thiram y Ziam se encuentran sobre 2,2 min y los de elución tardía como Zineb, Nabam y Maneb presentan un tiempo de retención en torno a los

14,5-15 minutos. El único DTC que presenta un tiempo de retención menor es el Metiram. La inestabilidad que presentan los DTCs da lugar a sobreestimaciones o subestimaciones de la concentración real presente en las muestras. Los resultados positivos encontrados por este método tampoco permiten diferenciar los distintos tipos de DTCs presentes, simplemente han permitido comprobar que la cantidad de DTCs presentes en la muestra, expresados como CS_2 , no excedían los LMR (Schmidt et al., 2013; Fanjul-Bolado et al., 2020). Posteriormente, este método de detección se combinó con el análisis por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), para poder determinar elementos como son el Fe, Mn y Zn con el propósito de así poder diferenciar los distintos elementos presentes en los extractos y de esta manera poder diferenciar o excluir el posible tipo de DTC presente en la muestra (Fanjul-Bolado et al., 2020). Puede resultar prohibitivo, hablando en términos económicos, el uso de estas técnicas para la detección de DTCs en productos agrícolas de manera rutinaria (Schmidt, B et al., 2013). También se utiliza la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) para determinar DTCs que contienen otros metales presentes en su esqueleto de carbono azufrado como el selenio (Grijalba et al., 2017).

Otro método de detección es la espectroscopia de Raman. Se trata de una técnica muy apropiada para la determinación de DTCs debido a que presenta una alta selectividad de detección de cada molécula proporcionada por el espectro de huellas dactilares, además de presentar una alta sensibilidad debido al efecto SERS (del inglés Surface Enhanced Raman Scattering) donde se trabaja con sustratos especialmente de Au, Cu o Ag (Fanjul-Bolado et al., 2020). Esta metodología permite su aplicación en el análisis de campo. Además, puede utilizarse para productos vegetales que presentan superficies irregulares. Como principal inconveniente encontramos la recolección de muestras e inmovilización de

los sustratos SERS para poder obtener análisis cuantitativos (Fanjul-Bolado et al., 2020).

Además de SERS, se han desarrollado ensayos basados en la detección óptica y electroquímica. En los ensayos basados en la detección electroquímica la detección de DTCs se realiza a través de los grupos tiol ya que cuando se encuentran en condiciones acuosas se ve favorecida la disociación de los DTCs en complejos metálicos para producir aniones carbamato. En los electrodos inertes, como puede ser el carbono o el platino, los aniones carbamato se oxidan por un paso monoeléctrico formando radicales intermedios que se dimerizan a través de átomos de azufre para formar productos disulfuro. La baja solubilidad de los DTCs mejora su sensibilidad al ser detectado mediante métodos electroquímicos. El principal problema con este tipo de detección de DTCs se debe a que ni las superficies de los electrodos ni las formas de onda seleccionadas son lo suficientemente específicas para la detección rutinaria, además de ser un método de detección propenso a interferencias (Fanjul-Bolado et al., 2020).

Los métodos basados en la detección óptica son ensayos colorimétricos sencillos en los que se trabaja con nanopartículas metálicas que pueden ser de Cu, Ag o Au (Fanjul-Bolado et al., 2020). La detección del pesticida se debe al cambio de color producido al agregar la nanopartícula en presencia del analito. La principal ventaja de este método es la facilidad de uso y la ausencia de costosos instrumentos analíticos (Fanjul-Bolado et al., 2020). Por el contrario, el principal inconveniente es la falta de selectividad, ya que las enzimas empleadas no son inhibidas por un compuesto específico sino por una amplia gama de plaguicidas pertenecientes a diferentes grupos químicos específicos (Fanjul-Bolado et al., 2020).

Los biosensores han aparecido como una nueva alternativa de detección rápida, selectiva, portátil y simple en comparación con los métodos basados en la separación. Este método de detección de DTCs se basa en la inhibición enzimática. En los biosensores basados en la

inhibición, la señal analítica se mide antes y después de la exposición del sensor a la muestra que contiene el DTC y los cambios producidos en la señal están relacionados con la concentración del pesticida. Los DTCs son inhibidores de la enzima lacasa, la tirosinasa y el aldehído deshidrogenasa. La utilización de lacasa en los electrodos para la detección de Ziram da lugar a recuperaciones entre el 97,6 y el 101,1 %, mostrando una recuperación satisfactoria de este biosensor. Cuando se combinan la lacasa y la tirosinasa la sensibilidad de los biosensores aumenta. Los factores que tenemos que tener en cuenta ya que afectan al rendimiento analítico de los biosensores enzimáticos que se basan en la inhibición son: el tipo de inmovilización y la cantidad de enzima, el tiempo de incubación, el diseño del dispositivo y la capa de detección (Fanjul-Bolado et al., 2020).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión sistemática sobre la determinación de residuos de ditiocarbamatos en plantas del género *Brassica* pertenecientes a la familia *Brassicaceae*.

La pregunta principal que se pretende responder es porque el análisis de estos residuos de ditiocarbamatos puede verse afectado dando lugar a falsos positivos o bien puede producirse una sobreestimación de la concentración en productos agrícolas que presenten elevados niveles de compuestos orgánicos de azufre.

Para ello, la metodología que se sigue es la recomendada por el protocolo Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis (PRISMA), por sus siglas en inglés (Moher et al., 2015).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Protocolo y registro

El diseño utilizado para esta revisión sistemática se llevó a cabo siguiendo las pautas de

la metodología PRISMA. El método PRISMA consta de 27 etapas las cuales se encuentran bien definidas lo que permite llevar a cabo un proceso de revisión sistemático. Entre las etapas se incluye el desarrollo de unos criterios de elegibilidad, los procesos utilizados para la selección de estudios, las estrategias de búsqueda utilizadas y la síntesis de resultados obtenidos a partir de los distintos estudios seleccionados (Urrútia y Bonfill, 2010; Moher et al., 2015).

Por otra parte, el método PRISMA tiene una aplicabilidad más amplia que el método utilizado antes de este conocido como QUOROM, debido a que no se centra simplemente en metaanálisis de ensayos clínicos de manera aleatoria, sino que también es utilizada para realizar revisiones de otros tipos de estudios (Urrútia y Bonfill, 2010).

3.2. Criterios de elegibilidad

Los criterios de elegibilidad utilizados como límites de la presente revisión sistemática fueron:

Criterios de inclusión: 1) artículos que hablen a cerca de la determinación analítica de ditiocarbamatos en brassicas.

Criterios de exclusión: 1) artículos que presenten un lenguaje diferente al inglés, 2) revisiones narrativas no sistémicas 3) actas de conferencias y “proceedings”, y 4) libros y capítulos de libros.

Dentro de los criterios de exclusión se han incluido las revisiones no sistémicas ya que deben considerarse como artículos de opinión según la metodología PRISMA (Tonelli et al., 2008).

3.3. Fuentes de información

La búsqueda bibliográfica se realizó en trabajos publicados en las bases de datos desde que existen bases de datos hasta el 24 de enero de 2022. La metodología PRISMA aconseja realizar una búsqueda bibliográfi-

ca en, al menos, una base de datos principal como puede ser la Web of Science (WoS). El problema es que el uso de una sola base de datos no nos garantiza que se encuentren todos los resultados relevantes sobre ditiocarbamatos. Esta es la razón por la cual se debe realizar diferentes búsquedas en diversas bases de datos. Para este trabajo se realizaron búsquedas en 4 bases de datos diferentes para reducir posibles sesgos. Las bases de datos utilizadas fueron: WoS, Scopus, PubMed y Science Database.

3.4. Estrategia de búsqueda

Las palabras clave que se seleccionaron para la búsqueda en las bases de datos fueron “dithiocarbamate” AND “*Brassica*”. En todas las búsquedas se incluyeron trabajos publicados en diferentes idiomas. En la base de datos WoS la opción de búsqueda utilizada fue “tema”. Para la base de datos PubMed la opción de búsqueda utilizada fue “todos los campos”. En la base de datos Scopus las opciones de búsqueda llevadas a cabo fueron “título, resumen y palabras clave”. Finalmente, para la base de datos Science Database la opción de búsqueda utilizada fue todos los campos excepto texto completo.

3.5. Selección de estudios

Todos los títulos, resúmenes y textos completos de los diferentes estudios fueron revisados según los criterios de inclusión o exclusión previamente discutidos en el apartado de selección de criterios de elegibilidad para su posible inclusión. Los 86 estudios encontrados en las bases de datos WoS, Scopus, PubMed y Science Database fueron cruzados para detectar posibles duplicados con el software EndNote X9. Tras esto, se revisaron los resúmenes de los restantes trabajos para poder seleccionar los que se encontraban relacionados con el tema a tratar. Seguidamente,

los trabajos completos fueron descargados para una evaluación adicional. Finalmente, una totalidad de 8 artículos fueron seleccionados, después de evaluar el texto completo, para el presente trabajo fin de grado.

3.6. Recopilación de datos

Los datos cuantitativos y cualitativos se extrajeron de los 8 artículos encontrados en esta revisión sistemática utilizando un formulario de extracción de datos que fue desarrollado para utilizarse en este trabajo de fin de grado. La Tabla 1 recoge el formulario utilizado para la extracción de datos.

3.7. Datos extraídos y síntesis de resultados

Los datos extraídos de los 8 artículos seleccionados fueron: autor/es, tipo de alimento, ditiocarbamato estudiado, *método utilizado para el análisis, volumen de la muestra, pH de extracción, límite de detección (LOD)*, desviación estándar relativa (RSD) y en último lugar los valores de recuperación.

4. RESULTADOS

4.1. Selección de los estudios

Como se ve reflejado en la Figura 2, se encontraron un total de 86 estudios que se ajustaban al objetivo inicial perseguido para este trabajo de fin de grado. 44 pertenecían a la base de datos WoS, 26 a la base de datos Scopus, 15 a la base de datos PubMed y 1 a la base de datos Science Database. Tras la eliminación, mediante el software EndNote X9, de los trabajos que se encontraban duplicados (36), el total de trabajos disminuyó a 50. Seguidamente se aplicaron los criterios de elegibilidad lo que dio lugar a reducción del total de artículos a 40. Finalmente, el número de artículos seleccionados para realizar la presente revisión sistemática fue 8.

Tabla 1. Resumen de los resultados bibliográficos obtenidos con el método PRISMA.

REFERENCIA	TIPO DE ALIMENTOS	DITIOCARBAMATOS	MÉTODO	CANTIDAD DE MUESTRA	PH DE EXTRACCIÓN	TIEMPO DE EXTRACCIÓN	LOD	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA	VALORES DE RECUPERACIÓN
(Grijalba et al., 2017)	Ajo, cebolla, puerro brócoli y coliflor	Se(IV)-pirrolidina ditiocarbamato de amonio (APDC)	IL-VA-LLME y ETAAS	2-10 mL	0,15	1-15 min	5 ng/L	4,9 %	96 - 104 %
(Kailasa et al., 2019)	Arroz, patata, repollo y agua	Penycyurum (1-(4-clorobencil)-1-ciclopentil-3-fenilurea)	ATT-AuNP + Espectrofotometría UV-Visible	5,10, 15 y 20 µM	2,0-12	55 min	-----	<2 %	Agua:97,33 - 98,40 % Arroz:95,30 - 97,20 % Patata:93,30 - 96,73 % Col:94,20 - 98,10 %
(Kaur et al.,2009)	Triego, arroz y repollo	EBDC	Molidato de sodio y Espectrofotometría UV-Visible	10 g	Se le añade ácido	1 hora	----	1,9 - 2,4 %	97- 100,5 %
(Chen et al., 2017)	Hojas de col	EBDC	CE-ICP-MS	5 mg/L	9	20 min		<6 %	95 - 107 %
(Schmidt et al., 2013)	Manzanas y tomates	9 DTCs	LC-MS/MS	0,05 mg/kg	12	30 min	0,03-0,19 mg/kg	9 - 41 %	39 - 221 %
(Perz et al., 2000)	coliflor, col rizada, col lombarda, col de raíz, de nabo	----	Digestión ácida y espectrometría UV-Visible + LC-MS/MS	*	*	*	*	*	*
(Heureman, 1957)	Verduras de hoja	Dialquil ditiocarbamato	Determinación de la cantidad de residuos de ditiocarbamato por la evolución de aminas y Espectrofotometría UV-Visible	1 Kg	*	15 min para la sal de zinc y 60 minutos para la sal de cobre	*	*	95 %
(Ahmad et al.,1996)	Brócolis, coles, uva, pepino, kiwis	Residuos de EBDC	Cromatografía de gases y cromatografía líquida	*	*	*	*	*	*

IL-VA-LLME: microextracción líquido-líquido asistida por vórtice; ETAAS: espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica; EBDC: Étileno-bis-ditiocarbamato; LC-MS/MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas; CE-ICP-MS: espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente; ATT-AuNP: nanopartículas de oro funcionalizadas con 6-aza-2-iotomina; DTCs: ditiocarbamatos; Se: selenio; Pencycurum: 1-(4-clorobencil)-1-ciclopentil-3-fenilurea.

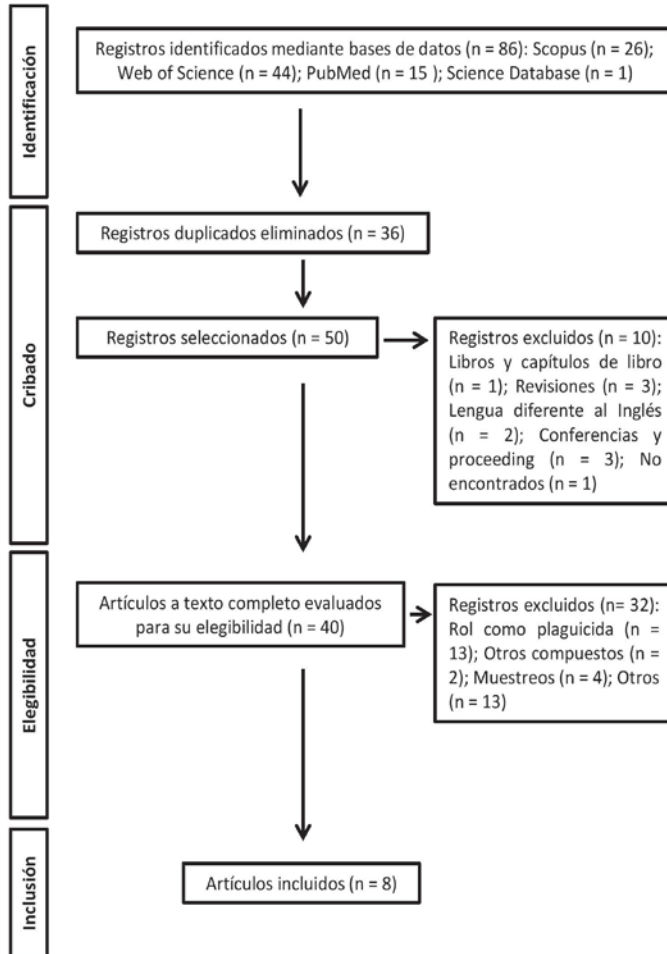


Figura 2. Diagrama de flujo de los artículos seleccionados.

4.2. Características y resultados de los estudios

Las características y los principales hallazgos encontrados en los 8 artículos seleccionados para el presente trabajo fin de grado como el tipo de alimento, el tipo de ditiocarbamato estudiado, el método utilizado para la detección de ditiocarbamatos en los alimentos, el volumen de la muestra necesario para realizar el análisis, el pH de extracción, el tiempo en el que se rea-

liza la extracción, el límite de detección (LOD), la desviación estándar relativa (RSD) y, por último, los valores de recuperación, se encuentran resumidos en la Tabla 1.

4.3. Limitaciones

Las revisiones sistemáticas tienen varias ventajas, sin embargo, también presentan limitaciones que pueden afectar a la conclusión. Por definición, la presente revisión sistemática estu-

vo limitada por las bases de datos utilizadas, los términos de búsqueda elegidos y los criterios de inclusión/exclusión establecidos. La estrategia de búsqueda fue bastante exhaustiva, por lo que se espera que pocos estudios relevantes no hayan sido identificados. Sólo se incluyeron trabajos escritos en inglés lo que también podría sugerir un sesgo en la búsqueda.

5. DISCUSIÓN

5.1. Disulfuro de carbono fitogénico en plantas del género *Brassica*

Tal y como se observa en la Tabla 1, los asteriscos corresponden a los estudios que han determinado la producción de CS₂ fitogénico (Heureman, 1957; Ahmad et al., 1996; Perz et al., 2000).

Los DTCs son uno de los fungicidas más utilizados y, como se comentó anteriormente, los LMR se expresan como unidades de CS₂ por kilogramo. Sin embargo, la principal desventaja se encuentra en la incapacidad para poder diferenciar entre los diferentes DTCs. Uno de los problemas que presenta mayor gravedad es el análisis de plantas que presentan CS₂ fitogénico como lo son las plantas pertenecientes al género *Brassica* (Perz et al., 2000).

Se pueden definir rangos de CS₂ fitogénico en plantas del género *Brassica* durante la digestión ácida natural que se produce durante la poscosecha. Estos rangos están caracterizados por la aparición de varios compuestos que contienen azufre como es el caso del aceite de mostaza, que liberan isotiocyanatos después de que se produzca una reacción enzimática, y brasininas que son derivados antifúngicos del indol. La digestión/descomposición de los DTCs se realiza en el laboratorio para la determinación de CS₂ como xantato, y el reactivo etilendiamida para la determinación simultánea de CS₂ y sulfuro de carbonilo (Perz et al., 2000).

La aparición de CS₂ fitogénico en verduras como la col también ha sido ampliamente

estudiada. En muestras congeladas se produce un incremento en los resultados mostrando valores de hasta 4 mg/kg, superando fácilmente los LMR. En cambio, las muestras que son procesadas con calor presentan valores inferiores. También puede ser un problema en la detección de alimentos destinados para elaborar alimentos infantiles ya que la legislación establece un LMR de 0,01 mg/kg, pudiendo ser fácilmente superados por el CS₂ que se encuentre de forma natural en las coles que aparentemente estén en perfectas condiciones, pero puedan estar alteradas por estrés. Ni las brasininas ni los isotiocyanatos son responsables de la formación de CS₂ fitogénico, aunque sí que presentan la capacidad de formar CS₂ en presencia de sulfuro. También se puede dar su formación durante la digestión, probablemente por reacciones autolíticas o descomposición microbiana de la panta que proporciona H₂S y aminas biogénicas como base para la formación de DTCs “naturales” (Perz et al., 2000).

Los falsos positivos en frutas y verduras se han reducido significativamente con el desarrollo de nuevos métodos para mejorar la detección de DTCs. Un ejemplo de estos métodos es la cromatografía de gas-líquido para detectar ETU, que es un residuo derivado de etileno-bis-ditio-carbamato. Pero a pesar de ello, el CS₂ fitogénico puede causar sobreestimaciones de la concentración de DTCs. Los compuestos endógenos también pueden liberar CS₂ cuando las matrices se calientan en medio ácido (Ahmad et al., 1996), pudiendo también contribuir a un alto porcentaje de detección positiva (hasta el 100 %) de CS₂.

También se estudió la posibilidad de determinar el ditio-carbamato de dialquilo por medio de la amina secundaria evolucionada para la determinación de la pirofosforamida de octilo. El método se basa en la evolución de una dialquilamina secundaria en lugar de CS₂, aunque el compuesto colorimétrico final es similar. Este método no sería aplicable a los etileno-bis-ditio-carbamatos ya que no producen aminas secundarias tras la hidrólisis ácida (Heureman, 1957).

5.2. Alimentos utilizados para el análisis de ditiocarbamatos

El alimento donde más se ha estudiado la presencia de DTCs en el presente trabajo de fin de grado es la col (Heureman, 1957; Ahamad et al., 1996; Perz et al., 2000; Chen et al., 2017). Además de la col, la coliflor, el brócoli y el repollo también son alimentos utilizados con frecuencia para el análisis de DTCs (Heureman, 1957; Ahamad et al., 1996; Perz et al., 2000; Grijalba et al., 2017; Kailasa et al., 2019). Finalmente, los alimentos menos estudiados son el puerro, el ajo, la cebolla, el agua, la patata, la manzana, el tomate, la uva y el pepino (Ahamad et al., 1996; Kaur et al., 2009; Schmidt et al., 2013; Grijalba et al., 2017; Kailasa et al., 2019).

5.3. Métodos analíticos

De los ocho artículos seleccionados, 3 utilizaron espectrometría UV-Visible (Heureman, 1957; Kaur et al., 2009; Kailasa et al., 2019), 2 utilizaron ICP-MS (Chen et al., 2017; Grijalba et al., 2017), 1 utilizó la cromatografía líquida con espectrometría de masas (Schmidt et al., 2013), 1 artículo utilizó la cromatografía de gases y cromatografía líquida (Ahmad et al., 1996), y 1 artículo utilizó la espectrometría UV-Visible y cromatografía líquida (Perz et al., 2000).

Kailasa et al. (2019) emplearon un método colorimétrico que utiliza nanosensores basados en nanopartículas de oro (AuNP) para la detección de Pencycurum. El uso de nanosensores proporciona altos coeficientes de extinción, alta sensibilidad y fácil funcionalidad, además de ser idóneos para el análisis visual. Por ello, el uso de estas nanopartículas de oro permite realizar una detección del pesticida de manera selectiva y sensible. Pencycurum es un fungicida del grupo de la fenilurea [1-(4-clorobencil)-1-ciclopentil-3-fenilurea], utilizado para el tratamiento contra los hongos. Para su detección colorimétrica en la superficie de las nanopartículas de oro se ensamblaron moléculas de 6-aza-2-tiotimina

(ATT). La presencia de Pencycurum provoca que la sonda de ATT-AuNP pase de color rojo a azul, permitiendo así una fácil lectura a simple vista. La detección colorimétrica se produce debido a que pencycurum presenta una elevada afinidad para formar enlaces no covalentes. La unión se genera debido a que la molécula de ATT presenta en su estructura un grupo -OH tras haberse unido a la superficie de AuNP. En cambio, Pencycurum presenta en su estructura un grupo -NH como resultado de la unión ente ATT-AuNP y Pencycurum mediante puentes de hidrógeno, generándose ATT-AuNP unido a la superficie de AuNP. Finalmente, esta unión se desestabiliza y como resultado provoca el cambio de color de rojo a azul. El límite de detección de Pencycurum es de $0,42 \mu\text{M}$ coincidiendo con el límite *máximo recomendado por la* Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

Kaur et al. (2009) utilizó un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz para la detección exclusiva de pesticidas como Zineb y Ziram, pertenecientes al grupo de etileno-bis-ditiocarbamato. El espectrofotómetro UV-Visible es un método de detección rápido, selectivo y sensible para la detección de Zineb convirtiéndolo en un complejo de molibdeno. Zineb reacciona junto a molibdato de sodio tras un calentamiento durante 5 minutos formándose un complejo de color azul. Una vez formado el complejo, el pesticida Zineb libera su contenido de Zn_2 y su cantidad de DTC. Seguidamente, el DTC forma un complejo con molibdato de sodio y posteriormente se extrae en forma de metil-isobutilcetona que se determina espectrofotométricamente. Para conseguir una absorbancia máxima la cantidad de ácido añadida se encuentra entre 1 y 1,5 mL. Este método puede determinar una cantidad de $0,006 \mu\text{g/mL}$ de Zineb, lo que equivale a una cantidad de $0,0033 \mu\text{g/mL}$ de CS_2 desprendido.

Heureman (1957) utilizó un método basado en la evolución de una dialquilamida secundaria en lugar de CS_2 , generando un compuesto colorimétrico final similar.

Grijalba et al. (2017) utilizó un método basado VA-LLME que presentan altas eficiencias de extracción y bajos límites de detección. El líquido iónico usado para la extracción del complejo Se-pirrolidina ditiocarbamato de amonio fue el decanoato de trihexil-tetradecilfosfonio (APDC), seguido de la determinación de Se con espectrometría de absorción atómica electrotrémica. La utilización de este método requiere una cantidad muy pequeña de disolvente para lograr la dispersión de la fase extractante, reduciendo así el coste del método. La determinación concreta de la cantidad de selenio se debe a una adecuada optimización de las temperaturas, ya que se consigue una descomposición completa de la matriz enriquecida con líquidos iónicos. Para eliminar la elevada volatilización de Se, se realiza una inyección de Cu en el horno de grafito. Esto es debido a que los metales de transición, como es el caso del Cu, son capaces de evitar o reducir la pérdida de sensibilidad generada, ya que forman seleniuros metálicos que son estables a elevadas temperaturas e impiden la volatilización del complejo de selenio.

Chen et al. (2017) utilizó CE-ICP-MS para la detección simultánea de Zineb y Ziram. Este método, en comparación con el resto de los métodos utilizados para la detección de Zineb y Ziram, presenta una serie de ventajas como son una mayor separación, una mayor eficacia, requiere un pequeño volumen de muestra, el consumo de reactivo es menor y se pueden realizar varios modos de separación. Para la determinación de Zineb y Ziram con CE-ICP-MS, en primer lugar, se elabora una solución mixta que se incuba durante un periodo de dos horas para quelar Zineb y Ziram con *ácido* 1,2-ciclohexanodinitrilotetraacético (DCTA). Seguidamente la solución se diluye con la solución tampón. Tras esto, los complejos Ziram-DCTA y Zineb-DCTA se separan utilizando un pH 9,0 para prolongar el tiempo de migración y favorecer la electroforesis, y se inyecta mediante inyección electrocinética en

CE-ICP-MS con un voltaje de separación de 15 Kv y un tiempo de inyección de 14 segundos. Zineb y Ziram no podrían ser separados con facilidad por electroforesis capilar debido a las propiedades de carga neutra de ambos compuestos. Por ello, este método incorporó α -ciclodextrina en la solución tampón favoreciendo la separación de compuestos quilares y alquilaros. Los límites de detección que nos proporciona este instrumento son de 1,9 ng Zn/mL para Ziram y 3,0 ng Zn/mL para Zineb.

Schmidt et al. (2013) utilizó un cromatógrafo líquido conectado a un espectrómetro de masas. En este método los nueve ditiocarbamatos se dividen en 4 grupos: Nabam y Ziram; Propineb, Zineb y Tiram; Mancozeb y Metiram; y Ferbam y Maneb con la finalidad de que todos los DTCs lleven una validación adecuada a pesar de la incapacidad para diferenciarlos por presentar tiempos de retención y transmisiones iguales. La única característica que los diferencia es el ion que forma complejos con el esqueleto de carbono que contiene azufre. El tiempo de retención que presentan los DTCs de elución temprana (Feram, Thiram y Ziram) se encuentra en torno a los 2,2 minutos y los de elución tardía (Zineb, Nabam y Maneb) presentan un tiempo de retención comprendido entre 14-15 minutos. Este estudio encontró que un porcentaje superior a la media de las muestras analizadas presentaban DTCs, no pudiendo identificar el tipo de DTC presente. En otras palabras, los resultados mostraron que ninguna de las muestras analizadas excedía el LMR, expresado como CS_2 , pero no indicaban la cantidad concreta de cada DTC. Por ello, este método se combinó con ICP-MS que permite identificar Fe, Mn y Zn presente en los extractos y de esta manera poder identificar, o al menos excluir, los diferentes DTCs. Otro problema de este método es que solo es efectivo cuando la muestra presenta una elevada cantidad de DTCs.

Ahmad et al. (1996) utilizó la cromatografía de gases para detectar ETU, un residuo derivado de etileno-bis-ditiocarbamato. Aunque este mé-

todo presenta interferencias, pudiéndose generar sobreestimaciones a causa del CS₂ fitogénico.

Por último, Perz et al. (2000) utilizó la espectrometría UV-Visible y la cromatografía líquida, métodos que también se ven afectados por la cantidad de CS₂ fitogénico.

5.4. Resultados en la desviación estándar relativa (RSD) y valores de recuperación

Grijalba et al. (2017) obtuvieron una desviación estándar relativa de 4,9 % y unos valores de recuperación comprendidos entre el 96 y el 104 % para el complejo Se-pirrolidina ditiocarbamato de amonio.

Kailasa et al. (2019) obtuvieron unos porcentajes de recuperación de *Pencycurum* del 97,33 % al 98,40 % en agua; del 95,30 % al 97,20 % en arroz; del 93,30 % al 96,73 % en patata y del 94,20 % al 98,10 % en col y una desviación estándar relativa < 2%.

Kaur et al. (2009) y Chen et al. (2017) dedicaron sus estudios a la determinación de EBDC. Kaur et al. (2009) obtuvieron una desviación estándar relativa que se encuentra entre el 1,9 y el 2,4 % y unos valores de recuperación del 97-100,5 %. En cambio, Chen et al. (2017) obtuvieron una desviación estándar relativa inferior al 6 % y unos valores de recuperación del 95-107 %.

Finalmente, Schmidt et al. (2013) obtuvieron una desviación estándar del 9 al 41 % y unos valores de recuperación de entre el 39 y el 221 % en la determinación de DTCs mediante cromatografía líquida.

5.5. Tiempo y pH de extracción

Como se ve reflejado en la Tabla 1, el tiempo de extracción se encuentra comprendido entre 1 minuto y 1 hora, siendo VA-LLME el método más rápido con un tiempo comprendido entre 1-15 minutos (Grijalba et al., 2017). Por el contrario, el que más tiempo gasta es el método espectrofotométrico utili-

zando molibdato de sodio tardando una hora (Kaur et al., 2009).

En cuanto a los valores de pH necesarios para la extracción, algunos métodos necesitan pH ácidos como VA-LLME utilizando como líquido iónico decanoato trihexil-tetradecil-fosfonio (Grijalba et al., 2017), también la detección colorimétrica basada en la agregación inducida de ATT-AuNP necesita un pH ácido (Kailasa et al., 2019). Por otro lado, hay métodos que necesitan pH básicos como son los métodos que utilizan ICP-MS (Chen et al., 2017; Grijalba, et al., 2017) y la cromatografía líquida con espectrometría de masas (Schmidt, et al., 2013).

6. CONCLUSIONES

Este trabajo se ha realizado siguiendo la metodología PRISMA a partir de la cual se han revisado diferentes artículos sobre la determinación de ditiocarbamatos (DTCs) llegando a un total de 8 artículos.

Los DTCs son un grupo de compuestos organosulfurado utilizados ampliamente como fungicidas. El principal inconveniente en el análisis de ditiocarbamatos, basado en la cantidad de disulfuro de carbono, es que puede verse afectado dando lugar a falsos positivos o puede generarse una sobreestimación de la concentración de ditiocarbamatos en productos agrícolas que presenten elevados niveles de compuestos orgánicos de azufre.

Los artículos se estudiaron en función del tipo de alimento analizado, el ditiocarbamato analizado, el método a través del cual se analizaron, el volumen de la muestra, el pH de extracción, el límite de detección, la desviación estándar relativa y los valores de recuperación.

De los 8 artículos encontrados, 3 se centraron en la determinación de disulfuro de carbono fitogénico en platas del género *Brassica*, demostrando que provocan interferencias en los métodos de detección.

Los alimentos más estudiados fueron col, coliflor, brócoli, repollo y, en menor medida,

puerro, el ajo, la cebolla, el agua, la patata, la manzana, el tomate, la uva y el pepino.

Las técnicas analíticas más comunes para la determinación de DTCs son la espectrofotometría UV-visible, la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas, la cromatografía de gaseosa, y la espectrometría UV-Visible.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, N., Guo, L., Mandarakas, P., Farah, V., Appleby, S., & Gibson, T. (1996). *Head-space gas-liquid chromatographic determination of dithiocarbamate residues in fruits and vegetables with confirmation by conversion to ethylenethiourea*. Journal of AOAC International, 79(6), 1417-1422.
- Chen, J., Fu, F., Wu, S., Wang, J., & Wang, Z. (2017). *Simultaneous detection of zinc dimethyldithiocarbamate and zinc ethylenebisdithiocarbamate in cabbage leaves by capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of separation science, 40(19), 3898-3904.
- Crnogorac, G., & Schwack, W. (2009). *Residue analysis of dithiocarbamate fungicides*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28(1), 40-50.
- Fanjul-Bolado, P., Fogel, R., Limson, J., Purcarea, C., & Vasilescu, A. (2020). *Advances in the Detection of Dithiocarbamate Fungicides: Opportunities for Biosensors*. Biosensors, 11(1), 12.
- van Boxtel, A. L., Kamstra, J. H., Fluitsma, D. M., & Legler, J. (2010). *Dithiocarbamates are teratogenic to developing zebrafish through inhibition of lysyl oxidase activity*. Toxicology and applied pharmacology, 244(2), 156-161.
- Grijalba, A. C., Martinis, E. M., & Wuilloud, R. G. (2017). *Inorganic selenium speciation analysis in Allium and Brassica vegetables by ionic liquid assisted liquid-liquid micro-extraction with multivariate optimization*. Food chemistry, 219, 102-108.
- Heuerman, R. F. (1957). *Determination of Residue Quantities of Dialkyl Dithiocarbamates by Amine Evolution*. Journal of Association of Official Agricultural Chemists, 40(1), 264-270.
- Kailasa, S. K., Nguyen, T. P., Baek, S. H., Raffique, R., & Park, T. J. (2019). *Assembly of 6-aza-2-thiothymine on gold nanoparticles for selective and sensitive colorimetric detection of pencycuron in water and food samples*. Talanta, 205, 120087.
- Kaur, M., Kaur, V., Malik, A. K., Verma, N., Singh, B., & Rao, A. L. J. (2009). *Development of a derivative spectrophotometric method for the determination of fungicide zinc ethylenebisdithiocarbamate using sodium molybdate*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 20(5), 993-998.
- Moher, D., Shamseer, L., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., ... & Stewart, L. A. (2015). *Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement*. Systematic reviews, 4(1), 1-9.
- Perz, R. C., van Lishaut, H., & Schwack, W. (2000). *CS2 blinds in Brassica crops: false positive results in the dithiocarbamate residue analysis by the acid digestion method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(3), 792-796.
- Prudente, I. R. G., Cruz, C. L., de Carvalho Nascimento, L., Kaiser, C. C., & Guimarães, A. G. (2018). *Evidence of risks of renal function reduction due to occupational exposure to agrochemicals: A systematic review*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 63, 21-28.
- Schmidt, B., Christensen, H. B., Petersen, A., Sloth, J. J., & Poulsen, M. E. (2013). *Method validation and analysis of nine dithiocarbamates in fruits and vegetables by LC-MS/MS Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(7), 1287-1298.

Tonelli, M., Hackam, D., & Garg, A. X. (2008). Primer on systematic review and meta-analysis. Clinical Epidemiology, 217-233.

UNE-EN 12396-2:2000. Alimentos no grasos. Determinación de residuos de ditiocarbamato y de disulfuro de tiuram. Parte 2: Método por cromatografía de gases. Disponible en:

<https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0023222>. Consultado el 15/03/2022.

Urrútia, G., & Bonfill, X. (2010). Declaración PRISMA: una propuesta para mejorar la publicación de revisiones sistemáticas y metaanálisis. Medicina clínica, 135(11), 507-511.

