

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**EVOLUCIÓN DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN
FRUTAS CÍTRICAS FRESCAS. INCIDENCIA SOBRE LOS
ACEITES ESENCIALES
TESIS DOCTORAL**

Presentada por:
Prof. Hilda F. Rousserie

Dirigida por:
Dra. Isabel Fernández Segovia
Dr. Hugo Rodolfo Cives

Enero de 2016

AGRADECIMIENTOS

**A todas las personas que de una u otra
manera han colaborado en la realización
de esta tesis.**

**Evolución de los Residuos de Plaguicidas en frutas cítricas frescas.
Incidencia sobre los aceites esenciales**

RESUMEN

En Argentina la producción cítrica constituye una de las actividades de fundamental importancia en la economía nacional y regional. Abastece al mercado interno y al mercado exterior con frutas frescas y productos industrializados.

El empleo de agroquímicos durante la producción en campo y en empaque, para el control y tratamiento de enfermedades de los cítricos, conlleva que queden residuos en los frutos tratados. Es esencial controlar los niveles de plaguicidas que quedan en los frutos, tanto para el consumo en fresco, como para su empleo como materia prima en la industria de procesado. En la actualidad, las exportaciones de cítricos se han incrementado considerablemente. Con ello, las exigencias respecto a los niveles de tolerancia de residuos de plaguicidas también han ido en aumento, por lo que cobra especial relevancia disponer de técnicas analíticas capaces de evaluar niveles de plaguicidas a concentraciones traza.

El objetivo general de este trabajo fue establecer la correlación entre los niveles iniciales de agroquímicos en naranjas que llegan a la industria de elaboración de aceites esenciales y los niveles hallados en el producto terminado (aceites esenciales descerados). Para ello, se estableció otro objetivo general que fue validar metodologías analíticas para la determinación de clorpirifos,

carbendazim, procloraz y tiabendazol por cromatografía de gases y cromatografía líquida, acopladas a espectrometría de masas, en diferentes matrices cítricas (naranjas y aceite esencial desecado de naranja).

En fruta entera se empleó la técnica de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas tipo simple cuadrupolo (GC-MS) para la cuantificación de clorpirifos, mientras que para la cuantificación de tiabendazol se utilizó la técnica de cromatografía líquida con doble detector de masas triple cuadrupolo (LC-MS/MS). Para aceites esenciales se utilizó la técnica LC-MS/MS para la determinación de procloraz, carbendazim y tiabendazol, y la cromatografía de gases con doble detector de masas triple cuadrupolo (GC-MS/MS) para la cuantificación de clorpirifos.

Las técnicas de extracción de los analitos empleadas fueron la extracción con disolventes y la extracción en fase sólida dispersiva. Para comprobar el efecto matriz, se emplearon blancos de muestras de naranjas de producción orgánica y aceites esenciales obtenidos a partir de ellas. Para cada uno de los métodos se evaluó la linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

Todos los métodos evaluados fueron lineales en el rango de concentraciones estudiadas en las distintas matrices. Los parámetros de precisión y exactitud, en todos los casos presentaron valores dentro del rango establecido para métodos exactos y precisos. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron adecuados, teniendo en cuenta los límites máximos de residuos (LMRs) establecidos en la legislación argentina y europea, para naranjas.

Los residuos evaluados en las muestras de naranja que llegan a la industria presentaron valores inferiores a los LMRs establecidos en Argentina y en la Unión Europea. Para todos los plaguicidas evaluados se pudo establecer una correlación entre los niveles presentes en la fruta y los valores residuales obtenidos en los aceites esenciales.

El desarrollo y validación de los métodos de análisis de estos plaguicidas, en naranjas y aceites esenciales descerados, permite ofrecer una valiosa herramienta al sector industrial, con la que determinar de forma exacta y precisa los niveles de plaguicidas de los productos que adquieren, elaboran y/o comercializan. Esto ayudará a la mejora de los procesos de control de calidad, permitiendo seleccionar solo materias primas que cumplan con los criterios exigidos por la legislación en materia de residuos, a la vez que establecer estrategias apropiadas de comercialización, teniendo en cuenta las diferencias de los LMRs que hay en los distintos mercados.

Palabras Claves

Cítricos, Aceites esenciales, Plaguicidas, Validación, Cromatografía de gases, Cromatografía líquida

RESUM

La producció cítrica en Argentina constitueix una de les activitats de fonamental importància en l'economia nacional i regional. Abastix al mercat intern i al mercat exterior amb fruites fresques i productes industrialitzats.

L'ús d'agroquímics durant la producció en camp i en embalatge per tal de controlar i tractar les malalties dels cítrics té com a conseqüència la permanència de residus en els fruits tractats. És essencial controlar els nivells de plaguicides que queden tant en els fruits com en aquells destinats a ser matèria primera per a la indústria del processat. En l'actualitat, les exportacions de cítrics s'han incrementat considerablement. Amb això, les exigències respecte als nivells de tolerància de residus de plaguicides també han augmentant. D'esta manera cobra especial rellevància disposar de tècniques analítiques capaces d'avaluar nivells de plaguicides a concentracions traça.

L'objectiu general d'este treball va ser establir la correlació entre els nivells inicials d'agroquímics en taronja que arriba a la indústria d'elaboració d'olis essencials i els nivells trobats en el producte acabat (olis essencials descerats). Per a això, es va establir un altre objectiu general: validar metodologies analítiques per a la determinació de clorpirifos, carbendazim, procloraz i tiabendazol per cromatografia de gasos i cromatografia líquida, acoblades a espectrometria de masses en diferents matrius cítriques (taronges i oli essencial descerat de taronja).

En fruita sencera es va emprar la tècnica de cromatografia de gasos amb detector d'espectrometria de masses tipus simple quadrupolo (GC-MS) per a la quantificació de clorpirifos, mentre que per a la quantificació de tiabendazol es va utilitzar la tècnica de cromatografia líquida amb doble detector de masses triple quadrupolo (LC-MS/MS) . Per a olis essencials es va utilitzar la tècnica LC-MS/MS per a la determinació de procloraz, carbendazim i tiabendazol, així com la cromatografia de gasos amb doble detector de masses triple quadrupolo (GC-MS/MS) per a la quantificació de clorpirifos.

Les tècniques d'extracció dels analits emprades van ser l'extracció amb dissolvents i l'extracció en fase sòlida dispersiva. Per a comprovar l'efecte matriu, es van emprar blancs de mostres de taronges de producció orgànica i olis essencials obtinguts a partir de les mateixes. Per a cadascun dels mètodes es va avaluar la linealitat, exactitud, precisió, límit de detecció i límit de quantificació.

Tots els mètodes avaluats van ser lineals en el rang de concentracions estudiades en les diferents matrius. Els paràmetres de precisió i exactitud, en tots els casos van presentar valors dins del rang establert per a mètodes exactes i precisos. Els límits de detecció i quantificació obtinguts van ser adequats, tenint en compte els límits màxims de residus (LMRs) establerts a la legislació argentina i europea per a taronges.

Els residus avaluats en les mostres de taronja al moment d'arribar a la indústria van presentar valors inferiors als LMRs establerts en Argentina i la Unió Europea. Per a tots els plaguicides

avaluats es va poder establir una correlació entre els nivells presents en la fruita i els valors residuals determinats en els olis essencials.

El desenvolupament i validació dels mètodes d'anàlisi d'estos plaguicides en mostres de taronges i olis essencials descerats, permet oferir una eina valuosa al sector industrial, amb la qual determinar de forma exacta i precisa els nivells de plaguicides dels productes que s'adquireixen, elaboren i/o comercialitzen. Açò ajudarà a la millora dels processos de control de qualitat i permetran seleccionar només matèries primeres que complisquen amb els criteris exigits per la legislació en matèria de residus. Al mateix temps permetrà establir estratègies apropiades de comercialització, tenint en compte les diferències dels LMRs que hi ha en els diferents mercats.

Paraules Claus

Cítrics, Olis essencials, Plaguicides, Validació, Cromatografia de gasos, Cromatografia líquida

SUMMARY

Citrus fruit production in Argentina is one of the activities of fundamental importance in the national and regional economy. It supplies the internal and the foreign market with fresh and processed fruits.

The use of agrochemicals during production in the field and packaging, for the control and treatment of diseases of citrus, involves residues in treated fruits. It is essential to monitor pesticide levels remaining in fruits, for both fresh consumption and for use as raw material in the processing industry. At present, citrus fruit exports have considerably increased. As a result, the demands on tolerance levels for pesticide residues have also been increasing, so is of special relevance the availability of analytical techniques able to assess levels of pesticides at trace levels.

The overall objective of this study was to establish the correlation between the initial levels of agrochemicals in oranges reaching the processing industry of essential oils and the levels found in the finished product (essential oils dewaxed). For this, another general objective was established that was to validate analytical methodologies to determine chlorpyrifos, carbendazim, prochloraz and thiabendazole by gas chromatography and liquid chromatography, coupled with mass spectrometry, in different citrus matrices (orange and orange essential oil dewaxing).

In whole fruit, the gas chromatography technique with mass spectrometric detector type simple quadrupole (GC-MS), was used for quantification of chlorpyrifos, while for thiabendazole quantification,

liquid chromatography/tandem mass spectrometry detection (triple quadrupole) (LC-MS/MS) was used. For essential oils LC-MS/MS was used for determining prochloraz, carbendazim and thiabendazole, and gas chromatography/tandem mass spectrometry detection (triple quadrupole) (GC-MS/MS) for quantification of chlorpyrifos.

The extraction techniques employed were solvent extraction and dispersive solid phase extraction. To check the matrix effect, blank samples of oranges from organic production and essential oils made from them were used. For each method linearity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification were assessed.

All methods evaluated were linear in the range of concentrations studied in the different matrices. The parameters of precision and accuracy in all cases showed values within the range established for accurate and precise methods. The limits of detection and quantification obtained were adequate, taking into account the maximum residue limits (MRLs) established in Argentina and European legislation, for oranges.

The residues evaluated in orange samples, which reach the industry exhibited values below MRLs established in Argentina and the European Union. For all the pesticides evaluated, a correlation between the levels in the fruit and residual values obtained in essential oils, could be established.

The development and validation of analytical methods of these pesticides, in oranges and essential oils dewaxed, can provide a valuable tool for the industrial sector, with which to determine accurately and precise levels of pesticides in the products they buy,

produce and/or market. This will help to improve the quality control processes, allowing the operator to select only raw materials that meet the criteria required by the legislation on residues, as well as to establish appropriate marketing strategies, taking into account the differences in MRLs that exist in the different markets.

Keywords:

Citrus, Essential oils, Pesticides, Validation, Gas chromatography, Liquid chromatography.

Índice.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. PRODUCCIÓN NACIONAL Y REGIONAL DE CITRUS EN ARGENTINA	1
I.2. PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	4
I.3. ENFERMEDADES Y PLAGAS EN CITRUS.....	14
I.3.1. <i>Cancrosis de los citrus</i>	15
I.3.2. <i>Clorosis variegada de los cítricos (CVC)</i>	16
I.3.3. <i>Virus de la tristeza de los cítricos o citrus tristeza virus (CTV)</i>	17
I.3.4. <i>Sarna de los cítricos</i>	18
I.3.5. <i>Mancha negra de los cítricos</i>	19
I.3.6. <i>Moho verde y Moho azul</i>	21
I.3.7. <i>Podredumbre amarga de los cítricos</i>	22
I.3.8. <i>Podredumbre morena o marrón</i>	23
I.3.9. <i>Podredumbres pedunculares</i>	23
I.3.10. <i>Mosca de la fruta (Ceratitis capitata)</i>	24
I.3.11. <i>Pulgones (Aphis spiraecola, A. gossypii, A. citricola, Toxoptera aurantii, Myzus persicae)</i>	24
I.3.12. <i>Cóccidos o cochinillas</i>	25
I.4. PLAGUICIDAS	26
I.4.1. <i>Denominación y clasificación</i>	30
I.4.2. <i>Características de plaguicidas utilizados en la citricultura</i>	38
I.4.2.1. Benzimidazoles	39
I.4.2.1.1. Tiabendazol.....	41
I.4.2.1.2. Carbendazim	43
I.4.2.2. Organofosforados	45
I.4.2.2.1. Clorpirifos.....	48
I.4.2.2.2. Imidazoles: Procloraz	49
I.5. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS.....	51
I.5.1. <i>Metodología de preparación de la muestra</i>	53
I.5.1.1. Extracción con solventes.....	55
I.5.1.2. Extracción mediante adsorción en superficies sólidas.....	58
I.5.2. <i>Técnicas cromatográficas de análisis</i>	65
I.5.2.1. Cromatografía de gases (GC)	68
I.5.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	71
I.5.2.3. Tipos de detectores en cromatografía.....	75
I.5.3. <i>Validación de métodos</i>	77
II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	85

Índice

II.1. OBJETIVOS	85
II.1.1. <i>Objetivos generales</i>	85
II.1.2. <i>Objetivos Específicos</i>	86
II.2. PLAN DE TRABAJO	86
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
III.1. REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO	92
III.1.1. <i>Reactivos</i>	92
III.1.2. <i>Equipamiento</i>	92
III.2. PLAN DE MUESTREO	94
III.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS EN LABORATORIO	100
III.3.1. <i>Submuestreo</i>	100
III.3.2. <i>Procedimiento de extracción de plaguicidas en fruta entera</i>	101
III.3.3. <i>Procedimiento de extracción de plaguicidas en aceites esenciales</i>	102
III.3.4. <i>Preparación de estándares</i>	103
III.3.5. <i>Preparación de muestras adicionadas</i>	103
III.4. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS	104
III.4.1. <i>Determinación de clorpirifos en fruta por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas tipo simple cuadrupolo (CG-MS)</i>	105
III.4.2. <i>Determinación de clorpirifos en aceites esenciales por cromatografía de gases con doble detector de masas/masas tipo triple cuadrupolo (GC-MS/MS)</i>	105
III.4.3. <i>Determinación de procloraz, carbendazim y tiabendazol por cromatografía líquida con doble detector de masas/masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS)</i>	106
III.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS	107
III.6. ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN DE LOS NIVELES RESIDUALES DE PLAGUICIDAS ENTRE FRUTA CÍTRICA ENTERA Y ACEITES ESENCIALES.....	111
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	117
IV.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFOS EN FRUTA ENTERA POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS TIPO SIMPLE CUADRUPOLO (CG-MS)	117
IV.1.1. <i>Clorpirifos</i>	118
IV.1.1.1. <i>Análisis unidimensional</i>	118
IV.1.1.2. <i>Linealidad</i>	119
IV.1.1.3. <i>Precisión y exactitud</i>	126
IV.1.1.4. <i>Límites de detección y cuantificación</i>	128

Índice

IV.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFOS EN ACEITES ESENCIALES DE NARANJA POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON DOBLE DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS TIPO TRIPLE CUADRUPOLO (CG-MS/MS).....	129
<i>IV.2.1. Clorpirifos</i>	129
IV.2.1.1. Análisis unidimensional	129
IV.2.1.2. Linealidad	130
IV.2.1.3. Precisión y exactitud.....	135
IV.2.1.4. Límites de detección y cuantificación	136
IV.3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CARBENDAZIM, PROCLORAZ Y TIABENDAZOL POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA CON DOBLE DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS TIPO TRIPLE CUADRUPOLO (LC-MS/MS).....	137
<i>IV.3.1. Validación del de determinación de tiabendazol en fruta entera</i>	138
IV.3.1.1. Análisis unidimensional	138
IV.3.1.2. Linealidad	139
IV.3.1.3. Precisión y exactitud.....	146
IV.3.1.3. Límites de detección y cuantificación	147
<i>IV.3.2. Validación de los métodos de determinación de procloraz, carbendazim y tiabendazol en aceites esenciales descerados de naranja</i>	148
IV.3.2.1. Procloraz	148
<i>IV.3.2.1.1. Análisis unidimensional</i>	148
<i>IV.3.2.1.2. Linealidad</i>	149
<i>IV.3.2.1.3. Precisión y exactitud</i>	154
<i>IV.3.2.1.4. Límites de detección y cuantificación</i>	155
IV.3.2.2. Carbendazim.....	155
<i>IV.3.2.2.1. Análisis unidimensional</i>	155
<i>IV.3.2.2.2. Linealidad</i>	156
<i>IV.3.2.2.3. Precisión y exactitud</i>	161
<i>IV.3.2.2.4. Límites de detección y cuantificación</i>	162
IV.3.2.3. Tiabendazol	163
<i>IV.3.2.3.1. Análisis unidimensional</i>	163
<i>IV.3.2.3.2. Linealidad</i>	163
<i>IV.3.2.3.3. Precisión y exactitud</i>	167
<i>IV.3.2.3.4. Límites de detección y cuantificación</i>	168
IV.4. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRUTAS ENTERAS Y EN ACEITES ESENCIALES Y DETERMINACIÓN DE SU CORRELACIÓN.....	169
<i>IV.4.1. Presencia de residuos de plaguicidas en frutas y aceites esenciales descerados</i>	169
<i>IV.4.2. Determinación de la correlación entre los niveles residuales de plaguicidas en aceites esenciales y la fruta de la cual provienen</i>	173
V. CONCLUSIONES	183

Í N D I C E D E T A B L A S

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad.	31
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas recomendada por la OMS (OMS, 2004)....	32
Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su vida media	33
Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas, según la familia química	34
Tabla 5. Gradiente de elución	106
Tabla 6. Serie de pares de las variables en cada lote	112
Tabla 7. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones patrón de clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)	118
Tabla 8. Análisis estadístico unidimensional. Fruta pre-adicionada con clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)	118
Tabla 9. Análisis estadístico unidimensional. Fruta post-adicionada con clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)	119
Tabla 10. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de clorpirifos en fruta (n=21, $\alpha=0,05$)	128
Tabla 11. Características de identificación para clorpirifos por GC-MS/MS	129
Tabla 12. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones de patrón de clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)	130
Tabla 13. Análisis estadístico unidimensional. Muestras de aceite adicionadas con clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)	130
Tabla 14. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de clorpirifos en aceites esenciales	135
Tabla 15. Características de identificación para procloraz, carbendazim y tiabendazol por LC-MS/MS.....	137
Tabla 16. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones patrón de tiabendazol (n=21 y $\alpha=0,05$)	139
Tabla 17. Análisis estadístico unidimensional. Fruta pre-adicionada con tiabendazol (n=21 y $\alpha=0,05$)	139
Tabla 18. Análisis estadístico unidimensional. Fruta post-adicionada con tiabendazol (n=21 y $\alpha=0,05$).....	139

Índice

Tabla 19. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de tiabendazol en fruta (n=21, $\alpha=0,05$)	147
Tabla 20. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones patrón de procloraz (n=21 y $\alpha=0,05$)	148
Tabla 21. Análisis estadístico unidimensional. Muestras de aceite adicionadas con procloraz (n=21 y $\alpha=0,05$)	149
Tabla 22. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de procloraz en aceites esenciales	154
Tabla 23. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones patrón de carbendazim (n=21 y $\alpha=0,05$)	156
Tabla 24. Análisis estadístico unidimensional. Muestras de aceite adicionadas con carbendazim (n=21 y $\alpha=0,05$).....	156
Tabla 25. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de carbendazim en aceites esenciales	162
Tabla 26. Análisis estadístico unidimensional. Muestras de aceite adicionadas con tiabendazol (n=21 y $\alpha=0,05$).....	163
Tabla 27. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de tiabendazol en aceites esenciales	167
Tabla 28. Valores medios de niveles residuales de plaguicidas expresados en mg/Kg y desviación estándar (valores entre paréntesis) (n=9, $\alpha=0,05$). Temporada 2012, 2013 y 2014	170
Tabla 29. Resumen estadístico para los niveles de residuos de procloraz, para el par aceite-fruta.....	174
Tabla 30. Resumen estadístico para los niveles de residuos de clorpirifos, para el par aceite-fruta.....	175
Tabla 31. Resumen estadístico para los niveles de residuos de carbendazim, para el par aceite-fruta.....	176
Tabla 32. Resumen estadístico para los niveles de residuos de tiabendazol, para el par aceite-fruta.....	177
Tabla 33. Coeficientes de correlación hallados entre los niveles de residuos de plaguicidas de la fruta entera y los aceites esenciales de naranja Valencia. Temporadas 2012, 2013 y 2014.....	178

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de producción de naranjas en Argentina.	2
Figura 2. Distribución de la producción de cítricos en las regiones del NOA y el NEA en Argentina	5
Figura 3. Diagrama del proceso de extracción simultanea de jugo, emulsión aceites-agua y cáscaras, semillas, pulpa y membranas. Tecnología FMC.....	9
Figura 4. Diagrama del proceso de aceite descerado en línea.....	12
Figura 5. Estructura química del benzimidazol	40
Figura 6. Estructura química del tiabendazol.....	42
Figura 7. Estructura química del carbendazim	43
Figura 8. Estructura química general de compuestos organofosforados.	45
Figura 9. Estructura química general de plaguicidas organofosforados	46
Figura 10. Estructura química del clorpirifos	48
Figura 11. Estructura química del procloraz	50
Figura 12. Etapas de la metodología de Extracción en Fase Sólida (SPE).....	60
Figura 13. Ejemplo de distintos pasos en la preparación de una muestra de naranja siguiendo el método QuEChERS. (Fuente: Fuentes et al. (2015))	65
Figura 14. Esquema de la separación de pigmentos en una columna cromatográfica de Tsweet.	66
Figura 15. Esquema del proceso de separación cromatográfica	68
Figura 16. Respuesta en función de la concentración del analito. Atributos de los métodos	81
Figura 17. Diagrama del proceso de obtención de aceite esencial descerado	96
Figura 18. Esquema del plan de muestreo para frutas de ingreso	97
Figura 19. Recolección de muestras de frutas enteras	98
Figura 20. Toma de muestra y acondicionamiento de muestras de aceites esenciales descerados	99
Figura 21. Preparación de muestras de frutas enteras.....	100
Figura 22. Cromatograma de clorpirifos obtenido por GC-MS	117
Figura 23. Regresión lineal con disoluciones patrón de clorpirifos.....	120
Figura 24. Regresión lineal en muestras de fruta entera pre-adicionada con clorpirifos	121
Figura 25. Regresión lineal en muestras de fruta entera post-adicionada con clorpirifos.	123

Índice

Figura 26. Rectas de regresión de clorpirifos de las disoluciones patrón y de las muestras de fruta pre-adicionadas.	124
Figura 27. Rectas de regresión de clorpirifos de las disoluciones patrón y de las muestras de frutas post adicionadas.	125
Figura 28. Regresión lineal con disoluciones patrón de clorpirifos.....	131
Figura 29. Regresión lineal en muestras de aceite esencial adicionadas con clorpirifos	132
Figura 30. Rectas de regresión de clorpirifos de las disoluciones patrón y de las muestras de aceite esencial adicionadas.	134
Figura 31. Cromatogramas obtenidos por LC-MS/MS: (a) Carbendazim, (b) Procloraz, (c) Tiabendazol	138
Figura 32. Regresión lineal con disoluciones patrón de tiabendazol	140
Figura 33. Regresión lineal en muestra de fruta entera pre-adicionada con tiabendazol.....	141
Figura 34. Regresión lineal en muestras de fruta entera post-adicionada con tiabendazol.....	142
Figura 35. Rectas de regresión de tiabendazol de las disoluciones patrón y de las muestras de frutas pre-adicionadas.....	144
Figura 36. Rectas de regresión de tiabendazol de las disoluciones patrón y de las muestras de frutas post-adicionadas.	145
Figura 37. Regresión lineal con disoluciones patrón de procloraz.....	149
Figura 38. Regresión lineal en muestras de aceite esencial adicionada con procloraz	151
Figura 39. Rectas de regresión de procloraz de las disoluciones patrón y de las muestras de aceite esencial adicionadas.	153
Figura 40. Regresión lineal con disoluciones patrón de carbendazim	157
Figura 41. Regresión lineal en muestras de aceite esencial adicionada con carbendazim	159
Figura 42. Rectas de regresión de carbendazim de las disoluciones patrón y de las muestras de aceite esencial adicionadas.	160
Figura 43. Regresión lineal en muestras de aceite esenciales adicionadas con tiabendazol.....	164
Figura 44. Rectas de regresión de tiabendazol de las disoluciones patrón y de las muestras de aceite esencial adicionadas	166
Figura 45. Diagrama de cajas y bigotes para procloraz en el par muestral aceite-fruta.....	174
Figura 46. Diagrama de cajas y bigotes para clorpirifos en el par muestral aceite-fruta.....	175

Índice

Figura 47. Diagrama de cajas y bigotes para carbendazim en el par muestral aceite-fruta.....	176
Figura 48. Diagrama de cajas y bigotes para tiabendazol en el par muestral aceite-fruta.....	177

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Producción nacional y regional de citrus en Argentina

Argentina manifiesta un continuo crecimiento del sector citrícola, tanto en frutos frescos como en procesados. Su producción provoca un importante impacto socioeconómico, fundamentalmente en la región del Noroeste Argentino (NOA) con la representación del 63% de la producción nacional y el resto en la región Noreste Argentino (NEA). La producción nacional de citrus en el contexto internacional sitúa a Argentina como uno de los países más importantes en la exportación de frutos frescos, jugos concentrados y aceites esenciales. El principal mercado de aceites esenciales es la industria de aromas y bebidas (Cohn y Cohn, 1996). El Informe Regional 2011-2012 del Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias destaca que el volumen de producción total estimado para cítricos en Argentina es de 2.895.761 toneladas (Federación Argentina del Citrus, 2012).

La producción citrícola nacional abastece al mercado interno de frutos frescos y a la producción de jugos. El resto de la producción, como jugos concentrados, aceites esenciales, cáscara deshidratada y pulpa congelada, es exportada a diferentes países. La provincia de Entre Ríos, ubicada en la región del NEA, localiza su producción sobre la costa del Río Uruguay en los Departamentos de Concordia, Federación y zona norte de Colón. Esta región de la provincia es la principal productora nacional de naranjas y mandarinas, con una

participación del 46% para naranjas y 63% para mandarinas con respecto a la producción nacional, y un 90% entre ambas con respecto a la producción provincial. Las variedades de limón y pomelo se producen mayoritariamente en la región del NOA, especialmente en la provincia de Tucumán, representando un 75% de la producción de dicha provincia. En la provincia de Entre Ríos se estima que un 22% de la producción de frutas frescas es destinada al mercado exterior, 58% a mercado interno y el 20% a industria (Informe Provincia de Entre Ríos, 2011).

En la figura 1 se indica la distribución geográfica de la producción citrícola de naranjas en la región Noreste Argentino (NEA).



Figura 1. Distribución geográfica de producción de naranjas en Argentina.
Región NEA

Fuente: CECNEA, 2015. <http://www.cecnea.com/es/exportacion/default.htm>

El sector cítrico continuamente se esfuerza para estar tecnológicamente actualizado y mejorar su producción primaria, transporte, capacidad de empaque y procesado industrial, a pesar de las dificultades fiscales actuales del país que continúan siendo desfavorables para el exportador. Además, se han desarrollado políticas con el fin de afianzar las relaciones con la Unión Europea, España en especial, lo que ha contribuido al incremento permanente de las exportaciones y al reconocimiento de la calidad de estos productos en los mercados mundiales (Federación Argentina del Citrus, 2012). Esto implica que es necesario adaptarse a las legislaciones de los distintos países, cada vez más exigentes en relación a los niveles de plaguicidas. Es imprescindible hacer un esfuerzo para reducir el uso de los mismos y desarrollar metodologías analíticas que permitan controlar los residuos de plaguicidas en los productos que van a ser comercializados, tanto en las frutas frescas como en los productos derivados.

El tema de los residuos de plaguicidas en frutos cítricos es particularmente importante debido a que, por el carácter lipófilo de la mayor parte de ellos (aunque no de todos), estas sustancias penetran con facilidad en las celdillas donde se encuentran los aceites esenciales que tapizan la corteza de los frutos cítricos y quedan allí bloqueadas y retenidas, con lo que su persistencia es mayor de lo que sería en otro tipo de productos vegetales (Coscollá, 2003).

I.2. Producción de aceites esenciales.

En materia de producción de aceites esenciales, Argentina se encuentra entre los principales exportadores del mundo, fundamentalmente el aceite obtenido a partir de limón producido en el NOA, con la mayor participación de la provincia de Tucumán. A menor escala se cuenta con la producción de aceites a partir de naranjas y mandarinas, especialmente en la región del NEA. En la última década, Argentina se ha destacado en la producción de aceites esenciales de limón llegando a producir 2413 toneladas durante el año 2014 y habiendo alcanzado su mayor producción en el año 2006 con 6000 Tn (FEDERCITRUS, 2015). El principal mercado de estos productos es la industria de aromas y bebidas, ya que el contenido de compuestos oxigenados, le confieren el bouquet y calidad olfativa característica, estimándose su valor comercial por la riqueza de estos constituyentes, principalmente aldehídos, alcoholes y ésteres monoterpénicos (Retamar, 1982).

En la figura 2 se indica la producción de cítricos en las regiones del NOA, donde predomina el limón y la del NEA, donde predomina la producción de naranjas y mandarinas.

Los aceites esenciales son productos en los que se hallan concentrados sabores y aromas característicos, constituidos por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles. Son extraídos de receptáculos o vesículas oleosas del flavedo de cítricos, y la calidad y cantidad de estos aceites depende de la variedad y madurez de la fruta, así como de la

localización de la plantación. El aceite extraído de naranja Valencia es considerado como el de mayor calidad dentro de los aceites de naranja, como así también lo son dentro de su grupo el aceite de limón italiano y el de mandarinas verdes (Mazzuz, 1996). En su composición existe presencia del d-limoneno, el cual comprende más del 95% en el aceite de naranja y 90% en el aceite de limón, aunque su contribución al sabor es limitada. Las fracciones importantes que contribuyen al aroma frutal son ésteres y aldehídos solubles en agua. El aceite concentrado de mandarina (*Citrus reticulata*) puede utilizarse como colorante y saborizante para bebidas, cuando el contenido de carotenoides se concentra por encima de 4000 ppm en el aceite (Cohn y Cohn, 1996).

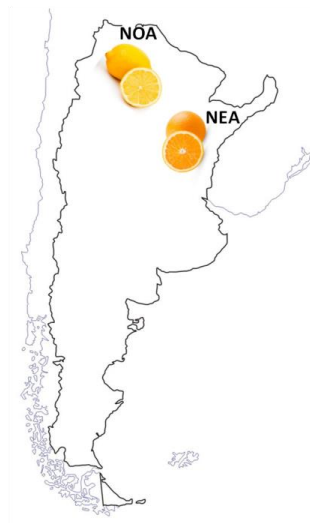


Figura 2. Distribución de la producción de cítricos en las regiones del NOA y el NEA en Argentina

Para la obtención de aceite esencial de frutas cítricas, se emplean tanto frutas provenientes de campo como de descarte de los empaques. Es por ello que el manejo de la materia prima y el control de los lotes de producción resulta de suma importancia para la industria cítrica. Según la procedencia y los métodos extractivos aplicados para su obtención, los aceites esenciales cítricos tienen diferencias marcadas en su composición. Las diferencias en las variedades cítricas, partes de la planta o del tejido vegetal, zona de producción, épocas de recolección, madurez de los frutos, etc., son factores de relevancia en la composición y diversificación de la utilización de estos aceites y, por ende, inciden sobre la calidad y cotización durante la comercialización de los mismos (Kimball, 1999).

Los aceites esenciales son extraídos de todas las variedades de cítricos y de las diferentes partes del tejido vegetal, tal como los obtenidos de hojas, flores y de la cáscara de los frutos. Por ejemplo, aquellos extraídos de la cáscara de los frutos contienen como componente principal del aceite cítrico el d-limoneno, que mayoritariamente proviene de naranjas, como se ha comentado anteriormente. El aceite *petit-grain* es un producto muy buscado por las perfumerías, que se obtiene de las hojas de los árboles cítricos, específicamente del naranjo amargo, y es Paraguay su principal productor y exportador en el mundo. Está constituido fundamentalmente por compuestos oxigenados y en él predomina el acetato de linalilo. Su rendimiento es del orden del 0,2% y su precio en el mercado es muy alto (Pássaro-Carvalho y Londoño-Londoño,

2012). También se extrae el *nerolí* de las flores, cuyos componentes oxigenados de mayor proporción son los alcoholes monoterpénicos. Del mandarino se extraen dos tipos de aceites, el *petit-grain* de las hojas, y el de la cáscara del fruto, el cual tiene un elevado contenido de hidrocarburos terpénicos y su grupo odorante está formado por la asociación de aldehídos, alcoholes y ésteres, que incluye pequeñas fracciones de metilantranilato de metilo. La combinación variable de estos compuestos da lugar a unas características específicas para su uso o aplicación en la industria.

La metodología de extracción es de fundamental importancia en la calidad de los aceites extraídos, como también de los jugos. El rendimiento de extracción para aceites en fruta fresca es de aproximadamente 0,4% en limón, 0,2-0,4% en naranja y 0,2% en pomelo. Para producir 1 tonelada de aceite pulido y descerado, la industria procesadora utiliza entre 250 a 500 toneladas de fruta, relación que puede variar en función de las condiciones climáticas imperantes durante el ciclo de producción (ECA, 2015).

En general, los aceites pueden obtenerse por varios procedimientos. Cuando se obtienen por prensado en frío, seguido de clarificación y centrifugación, no cabe esperar ninguna degradación o pérdida importante de los residuos de plaguicidas que estén en los aceites. Cuando el aceite que no ha sido obtenido por el método anterior, se recupera de las pieles en corriente por destilación de vapor, se favorece la hidrólisis del plaguicida (Dupuis, 1975). En general, el análisis de los aceites, especialmente los obtenidos por

prensado por frío, indican la presencia de altos niveles de residuos de plaguicidas (Coscollá, 1993).

El método de obtención por frío de los aceites esenciales contenidos en la cáscara de las frutas cítricas, a las cuales se le extraen los jugos contenidos en la pulpa, depende del tipo de extractor de jugo utilizado en la línea de la industria. Existen dos tipos de extractores, uno de ellos separa el aceite de la fruta simultáneamente durante el proceso de extracción de jugo, y se usa en la mayoría de los países productores de cítricos, denominado extractor FMC “In-Line” (Food Machine Corporation) (Lorente et al., 2011), como muestra la figura 3. Se pueden describir las siguientes fases:

- 1- En la primera fase del ciclo de extracción, la copa superior se desplaza hacia abajo provocando una presión en el cítrico de forma que las cuchillas superior e inferior comienzan a cortar los extremos superior e inferior del fruto.
- 2- En la segunda fase, los dedos de las copas se entrecruzan, el aumento de presión sobre el cítrico obliga al zumo y a las partes interiores del fruto (pulpa, membranas y semillas) a pasar a través del fondo al cilindro tamizador, a la vez que la corteza empieza a salir por la parte superior, entre la copa y la cuchilla.
- 3- En la última fase, las porciones interiores del cítrico se hallan localizadas en el interior del cilindro tamizador, el tubo del orificio se mueve hacia arriba, presionando el

contenido del cilindro tamizador, lo que provoca que el zumo y la pulpa pasen a través de los orificios del tamiz y pasen al depósito colector de zumo. Las cortezas rotas al ser forzadas a pasar a través de los dedos de las copas, se eliminan por la parte superior de la máquina y se depositan en un colector.

Durante la extracción, las pieles forzadas a pasar a través de los dedos de las copas, sueltan el aceite esencial contenido en las vesículas. Este aceite puede ser arrastrado mediante una corriente de agua y recogido por separado como una emulsión de aceite (Pássaro Carvalho y Londoño-Londoño, 2012).

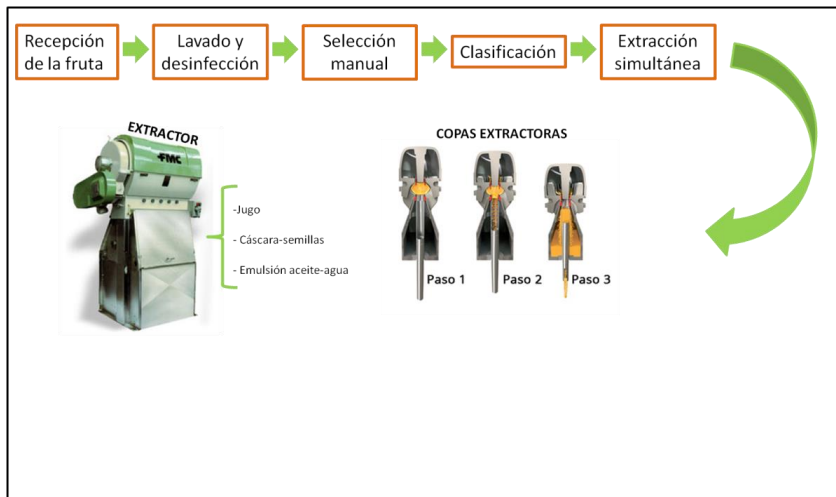


Figura 3. Diagrama del proceso de extracción simultánea de zumo, emulsión aceites-agua y cáscaras, semillas, pulpa y membranas. Tecnología FMC

El otro tipo de extracción corresponde al sistema Brown; en este método la extracción de aceites esenciales es previa a la extracción de jugo, siendo su principio extractivo, el efecto que ejercen sierras circulares sobre la superficie de las frutas parcialmente sumergidas en agua (Kimball, 1999).

El sistema del extractor FMC *In-Line* es capaz de procesar entre 5.000 y 15.000 Kg de fruta. En la FMC *In line*, las partículas de la corteza (raspaduras o *frit*) son separadas resultando una emulsión aceitosa, con tres componentes: agua, gotas de aceite esencial y sólidos finos que han atravesado el *finisher*. Para que éste funcione correctamente, se debe asegurar que el *finisher* empleado tenga capacidad para procesar la mezcla con que es alimentado y retenga los sólidos particulados. La presión del mismo debe de ser cuidadosamente controlada, de forma que se consiga una presión intermedia, ya que si es alta muchos sólidos y pectinas pueden ser forzados a pasar a la emulsión, con lo que aumentaría la viscosidad y dificultaría la separación en las centrífugas. Por el contrario, si es muy baja se perdería gran cantidad de agua y aceite esencial que serían expulsados fuera del sistema a través de la corriente de raspaduras. Usando cabezas de aire o mecánicas se consigue una presión media que permite que la emulsión que va a la primera centrífuga tenga en torno a un 2-4% de sólidos que se pueden separar mediante centrifugación a 4500 r.p.m.

Acoplando dos centrífugas se recupera prácticamente la totalidad del aceite esencial contenida en la emulsión “ligera”

procedente del *finisher*, como aceite esencial puro. El paso por la primera centrífuga se conoce como concentración o desludado o *desludging*, y el paso por la segunda como refinado o *polishing* (figura 4). El último paso del proceso de recuperación del aceite en frutos cítricos es el refinado *polisher*, que consiste en pasar la emulsión enriquecida a través de una centrífuga de alta velocidad, que opera entre las 16000 y las 18000 r.p.m., con lo que se consigue separar el aceite esencial del agua sobrenadante, decantando al mismo tiempo las partículas sólidas presentes en la emulsión. Tras la centrifugación, el aceite esencial es recogido en un tanque de acero inoxidable, donde flocculan las ceras a bajas temperaturas. Se obtiene así el denominado *aceite descerado*, alcanzando temperaturas de -18°C durante 15 a 30 días (FMC, 1980). Si a estos mismos aceites se les vuelve a centrifugar, filtrar y/o seguir el tratamiento de descerado en frío, la calidad de estos aceites es de *aceite súper descerado*.

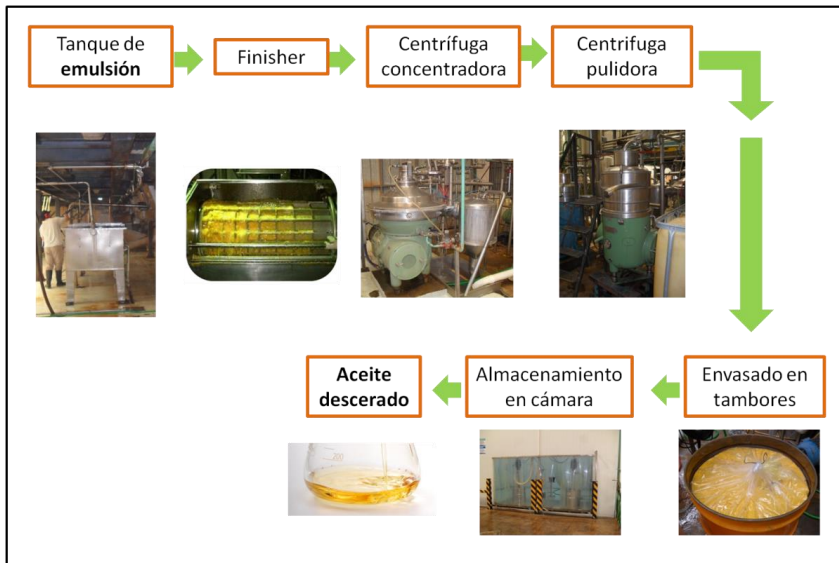


Figura 4. Diagrama del proceso de aceite descerado en línea

La calidad de los aceites obtenidos en las condiciones anteriormente mencionadas, corresponde para el *aceite descerado* a un producto brillante y sin presencia de ceras cuando se los expone a temperatura ambiente y para *aceite súper descerado*, cuando permanecen brillantes y no presentan cera al ser sometidos a temperatura de -10°C durante un periodo de tiempo no superior a 24 horas.

Estos productos definen su valor en el mercado externo en función de sus propiedades y características fisicoquímicas, siendo el nivel de residuos de agroquímicos uno de los factores de calidad de fundamental importancia a considerar, al momento de la comercialización. Para sostener las exportaciones, es necesario

cumplir con las rigurosas exigencias del mercado internacional, que incluyen también el control de estos residuos.

El contenido de residuos de agroquímicos en el producto, se encuentra al igual que en el jugo concentrado, en estrecha relación con los niveles residuales en la fruta utilizada como materia prima (Blasco, Font, Pico, 2002). Durante el proceso de limpieza del fruto, especialmente cuando se hace por lavado en agua con algún detergente específico y posterior cepillado con pulverización de agua, puede ocurrir una eliminación parcial de los residuos de plaguicidas que llevaba el fruto como consecuencia de los tratamientos pre y postcosechas. La proporción de residuos eliminados en este proceso de lavado depende, básicamente de tres factores, entre ellos, el tiempo transcurrido entre el tratamiento y el procedimiento de lavado, características del lavado y tipo de plaguicida y/o fungicida (Coscollá, 1993). Para aceites cítricos extraídos se han hallado valores que demuestran que los niveles iniciales de residuos en la fruta que ingresa a la industria es eliminada parcialmente en el proceso de lavado y cepillado, pero los residuos remanentes en la fruta post lavado logran persistir en los aceites esenciales, aunque tal persistencia presenta diferencias significativas para los diversos analitos en los aceites pulidos y descerados (Montti, 2013).

Diferentes estudios han demostrado que productos industriales pueden contener niveles elevados de plaguicidas, al derivar de frutas que han sido tratadas con fitosanitarios (García-Reyes et al., 2008). Por ello, es imprescindible el control de los

niveles de residuos en productos obtenidos a partir de frutas en general y cítricas en particular, para asegurar que los productos que resultan de la industrialización no comprometan la seguridad del mismo. Algunos de los plaguicidas hallados a niveles residuales son clorpirifos, procloraz y tiabendazol, entre otros, para aceites esenciales pulidos y descerados extraídos a partir de cítricos de la variedad naranja valencia (Montti et al., 2013)

I.3. Enfermedades y plagas en Citrus

Los principales factores que influyen en la producción de cítricos se encuentran fundamentalmente vinculados a la expansión de plagas y enfermedades. Entre los patógenos que se destacan por sus efectos devastadores se encuentran el virus de la tristeza, el cancro, la clorosis variegada y la muerte súbita, cuyo agente causal aún no se conoce, y otras. También hay que destacar la introducción y dispersión de diferentes plagas que en su mayoría son vectores de las enfermedades antes mencionadas. De acuerdo a los tratados de comercialización establecidos entre los diversos países, los citricultores se ven obligados a incrementar la producción por hectárea bajo estrictas normas ambientales, de inocuidad y calidad, al tiempo que deben competir en precios a nivel internacional. Dada la importancia económica de los cultivos cítricos en Argentina, se contempla desde el sector una mejora sustancial en la producción, mediante la certificación de semillas y de yemas que aseguren la ausencia de enfermedades y de patógenos en el cultivo, el fortalecimiento de las cadenas de producción-consumo, y la oferta de

diversos productos cítricos de calidad (Marcó, 2001; Huerga y San Juan, 2005; Palacios, 2005).

Según el informe fitopatológico realizado por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres en el año 2012, los cítricos padecen enfermedades, siendo algunas de ellas provocadas en el campo durante el periodo de crecimiento y maduración de los frutos y otras características del periodo de postcosecha (<http://www.eeaoc.org.ar/upload/publicaciones/archivos/29/20120207185614000000.pdf>) Algunas de las enfermedades que aparecen durante la producción del sector primario son las siguientes:

I.3.1. Cancrosis de los citrus:

Es causada por *Xanthomonas citri subsp. citri*, bacteria Gram negativa, no esporulada, con forma de bastón recto. Esta enfermedad se presenta como endémica en las principales regiones productoras de cítricos del mundo. La bacteria penetra en los diferentes órganos aéreos de la planta directamente a través de las aberturas naturales (estomas, lenticelas, hidatodos, etc) o heridas de tejidos susceptibles. Los frutos son susceptibles los primeros 90 días desde el cuaje, un período mucho mayor que el de las hojas. En frutos pequeños, los canchros pueden tener unos 2-5 mm de diámetro y pueden unirse unos a otros afectando áreas importantes de la epidermis. La apariencia de las lesiones también es suberificada y crateriforme, pero el halo suele ser menos definido, aunque siempre hay una zona de aspecto húmedo aceitoso en los márgenes de la lesión cuando éstas son recientes. El daño que produce en frutos se limita a la epidermis y en forma parcial

al albedo, no llegando a afectar la calidad ni cantidad de jugos, por eso se la denomina cosmética. Un ataque severo de la enfermedad produce defoliación, caída prematura de frutos y declinamiento general de la planta, aunque nunca se ha observado la muerte de la misma. El mayor inconveniente de esta enfermedad es que se trata de una enfermedad cuarentenaria para la Unión Europea y EE.UU (Graham y McGuire, 1987; Anderson et. al., 1996; Canteros, 2001, Brunings y Gabriel, 2003; Graham et al., 2004; Polek et. al., 2007; Tennant et al., 2009).

El minador de los citrus causada por *Phyllocnistis citrella* Sta, es una enfermedad relacionada con la cancrrosis. Provoca daño directo en hojas, ya que causa numerosas galerías lo que produce puertas de entrada para la bacteria que produce cancrrosis y disminuye la capacidad fotosintética de la planta. Las plantas de vivero y plantaciones jóvenes son las más susceptibles al ataque del minador por tener frecuentes brotaciones (Heppner, 1993; Amorós, 1994; Knapp, 1996; Rodríguez *et al.*, 1998).

I.3.2. Clorosis variegada de los cítricos (CVC):

Es causada por *Xylella fastidiosa subsp. pauca*, bacteria Gram negativa, circula por xilema y se cultiva en medios sintéticos. Esta enfermedad afecta la producción y comercialización de fruta fresca y la producción de jugo cítrico concentrado. Produce defoliación de ramas superiores de los árboles y muerte de ramas. Afecta a todas las variedades de naranjo dulce, siendo las más susceptibles Valencia y Hamlin. La enfermedad es más severa en

plantas jóvenes, hasta 10 años de edad. Se transmite por injerto o por insectos vectores. En los frutos se manifiesta por reducción del tamaño y endurecimiento de los mismos, además, aparece un color amarillo intenso que contrasta con los frutos normales (Anderson et. al., 1996; Tennant et al., 2009; Canteros, 2010; Ramírez Lluch y Cruz, 2011).

I.3.3. Virus de la tristeza de los cítricos o citrus tristeza virus (CTV):

El virus de la tristeza de los cítricos pertenece a los closterovirus (virus filamentoso), siendo el causante de la enfermedad viral más grave de los cítricos (Anderson et. al., 1996). El daño más evidente es el decaimiento y muerte de los árboles injertados sobre naranjo amargo y clorosis nervial y acanaladuras en la madera. El virus causa la muerte de las células del floema en el naranjo amargo, produciendo un bloqueo de los tubos conductores de savia elaborada a nivel de la línea de injerto. El decaimiento lento comienza con una clorosis progresiva de las hojas y seca de las ramillas en la parte exterior de la copa. Las nuevas brotaciones son cortas y tienen lugar en las ramas viejas dando lugar a una disminución progresiva del volumen de la copa. La producción de frutos es menor y éstos son de tamaño reducido y color más pálido que los frutos de árboles sanos. Otro síntoma es la formación de orificios visibles en la cara cambial de la corteza, en los que suele observarse una zona de color pardo debajo de la línea de injerto; este síntoma no suele ser apreciable en árboles recientemente infectados. La identificación de CTV por síntomas en campo no es segura, además la ausencia de síntomas no

implica que el virus no esté presente, ya que éste puede albergarse en plantas tolerantes (<http://www.infoagro.com/citricos/naranja2.htm>) (Anderson et. al., 1996; Cambra y Moreno, 2000; Cambra et al., 2000; Palacios, 2005; Tennant et al., 2009)

I.3.4. Sarna de los cítricos:

Existen diferentes tipos de sarna, causadas por hongos (Anderson et. al., 1996):

- Sarna del naranjo agrio (*Elsinoe fawcetti* - *Sphaceloma fawcetti*): afecta al limón, mandarina, pomelo y portainjertos.
- Sarna del naranjo dulce (*Elsinoe australis* – *Sphaceloma australis*): afecta a la naranja y mandarina.
- Sarna de Tryon (*Elsinoe fawcetti* var. *scabiosa* - *Sphaceloma fawcetti* var. *Scabiosa*): afecta al limonero rugoso.

Esta enfermedad produce daños en el aspecto externo de los frutos, disminuyendo su valor comercial. Además reduce la superficie activa de la epidermis del fruto, afectando su crecimiento, madurez y calidad industrial. El síntoma más característico es la aparición de protuberancias de aspecto corchoso sobre la superficie de los frutos. Cuando el fruto crece, las pústulas coalescen formando grandes áreas costrosas o escaldadas, que se resquebrajan en placas a medida que el fruto se expande (Palacios, 2005; Dewdney y Timmer, 2012).

I.3.5. Mancha negra de los cítricos:

Es causada por *Guignardia citricarpa* Kiely (fase asexual: *Phyllosticta citricarpa* McAlpine van der Aa). Es una enfermedad fúngica que afecta a la calidad comercial de los frutos cítricos en el campo y durante el transporte. Las ascosporas, cuando maduran son liberadas y dispersadas por el viento. Éstas infectan hojas jóvenes (brotes), frutos desde recién cuajados hasta los 4 ó 5 meses de edad, período durante el cual el fruto permanece susceptible. Provoca lesiones en la cáscara a nivel de flavedo y, en ataques severos, puede ocasionar la caída prematura de frutos en aquellos cultivares de maduración tardía (Anderson et. al., 1996; Kotze, 2000; Palacios, 2005; Canteros, 2010). El mayor inconveniente es que se trata de una enfermedad cuarentenaria para la Unión Europea y EE.UU. Provoca cuatro síntomas diferentes en los frutos, lo que hace difícil su diagnóstico en campo:

a- Mancha típica o mancha dura o hard spot: es el síntoma típico de esta enfermedad. Comienza a observarse cuando el fruto inicia el cambio de color, aunque puede ser observado en frutos verdes que han alcanzado su tamaño definitivo. Son lesiones circulares, normalmente de 2 a 5 mm de diámetro pudiendo llegar a 10 mm. Tienen un margen, que puede ser sobre elevado o no, de color castaño a negro que se diferencia claramente del centro de la lesión, el cual es de color grisáceo o castaño más claro y levemente deprimido. A menudo se puede observar un

halo rodeando a cada lesión de color amarillo cuando el fruto está verde, y verde cuando el fruto colorea. Algunas lesiones muestran, sobre el centro de las mismas, puntuaciones negras que corresponden a las fructificaciones asexuales (*picnidios de Phyllosticta citricarpa*) (Bazan, 2002; Spósito, 2004; Palacios, 2005; Stein, 2011).

b- Mancha pecosa o freckle spot: aparece cuando el fruto ha cambiado su color. Son puntuaciones deprimidas, de color rojizo, que van aumentando su tamaño a medida que avanza la madurez del fruto. Frutos que en la cosecha se muestran como aparentemente sanos, pueden manifestar este tipo de lesión en post-cosecha, cuando permanecen expuestos a la luz solar y altas temperaturas. Además, la mancha pecosa puede avanzar y formar lesiones virulentas (Anderson et. al., 1996; Kotze, 2000; Palacios, 2005; Stein, 2011).

c- Mancha virulenta o virulent spot: es observada en frutos maduros, sobre todo en plantaciones viejas, con ataques severos, o afectadas con virus. Son lesiones al principio circulares y luego irregulares, deprimidas, de color rojo ladrillo a castaño rojizo, pueden confluir formando grandes áreas necróticas y profundas. El borde de la lesión es rojizo y va oscureciéndose a medida que avanza la madurez del fruto. El centro puede ser rojizo o mantenerse

grisáceo, y normalmente desarrolla numerosos picnidios (Kotze, 2000; Palacios, 2005; Almeida, 2009, Stein, 2011)

d- Falsa melanosis o speckled blotch: en este caso el fruto manifiesta lesiones circulares, pequeñas, de color castaño a negro, rodeadas de puntuaciones menores. Suelen presentar un halo verdoso. A menudo se distribuyen en forma agrupada del lado expuesto al sol, aunque a veces se distribuyen en forma de lagrimeo. Se las observa desde frutos recién cuajados hasta frutos maduros. Son suaves al tacto y no se desprenden del tejido. No desarrolla picnidios.

Existen otras enfermedades fúngicas que presentan síntomas similares a la mancha negra, tales como, septoriosis, melanosis, mancha grasienta y antracnosis.

El grupo de enfermedades características del período de post-cosecha también provoca daños en los frutos. Entre ellas cabe mencionar las enfermedades provocadas por moho verde y moho azul, podredumbre amarga de los cítricos, podredumbre morena o marrón y podredumbres pedunculares.

I.3.6. Moho verde y Moho azul:

Las enfermedades provocadas por estos mohos son causados por *Penicillium digitatum* (moho verde) y *Penicillium italicum* (moho azul) provenientes del aire, suelo, líneas de empaque y otras fuentes de contaminación. Estas enfermedades frecuentemente causan

podrición en frutos cítricos, provocando importantes pérdidas económicas, manifestándose con la aparición de una zona blanda muy humedecida, que se cubre progresivamente de un moho blanco (parte vegetativa del hongo). Luego aparecen las esporas de color verde o azul. Ninguno de estos patógenos puede afectar a la fruta si no tiene heridas en su superficie. Pueden permanecer sobre la piel de los frutos varios meses y luego infectar a través de líquidos segregados de la corteza del fruto. Estos hongos completan su ciclo de reproducción entre 24 a 48 h a una temperatura media de 20 a 25 °C con alta humedad (Anderson et. al., 1996; Smilanick y Sorenson, 2001; Prusky et al., 2004; Smilanick y Mansour, 2007; Tennant et al., 2009).

I.3.7. Podredumbre amarga de los cítricos:

Esta enfermedad es causada por *Geotrichum citri aurantii*. Las esporas del hongo son hialinas, de olor característico a levadura. Este hongo está presente normalmente en el suelo y es dispersado por el viento o por gotas de agua. Las enzimas extracelulares producidas por el hongo degradan la cáscara, causando la desintegración del fruto en una masa acuosa (podredumbre blanda) con desprendimiento de líquido y olor ácido (Anderson et. al., 1996). Se presenta en todos los cultivares cítricos del mundo. Es una de las enfermedades de mayor incidencia en la exportación, considerando la dificultad de su control y la magnitud del daño. Los frutos más susceptibles al ataque de este patógeno son los maduros o sobremaduros cercanos al suelo y con algún tipo de lesión. Normalmente se encuentra asociado a

Penicillium digitatum y *Penicillium italicum* en infecciones mixtas (Villalba Buendía, 1997; Palacios, 2005).

I.3.8. Podredumbre morena o marrón:

Esta enfermedad es causada por un hongo denominado *Phytophthora* sp. Éste es de penetración directa, es decir, que no necesita heridas para infectar. La pudrición ocasionada por este patógeno, ocurre principalmente en épocas de lluvias y con temperaturas entre 14 y 24 °C. Comienza con una podredumbre dura de color marrón claro que se extiende desde un extremo de la fruta y avanza progresivamente causando la pudrición total de la misma. Los frutos afectados despiden un olor rancio característico a pasto fermentado (Erwin y Ribeiro, 1996; Tennant et al., 2009).

I.3.9. Podredumbres pedunculares:

Esta enfermedad es causada por *Diplodia natalensis* y *Phomopsis citri*. Provoca una pudrición firme de color marrón en la zona peduncular de escasa importancia, manifestándose en los frutos más débiles (Anderson et. al., 1996). Comienza en esta zona, luego se extiende a la parte interior del fruto presentando una coloración más oscura. El podrido se extiende en forma irregular a partir del pedúnculo. El grado de infección varía con la madurez del fruto y la humedad presente, y suele ser grave en frutos desverdizados. Las heladas, las altas temperaturas, exceso de humedad y ataques de insectos favorecen la infección

(<http://www.eeaoc.org.ar/upload/publicaciones/archivos/29/20120207185614000000.pdf>).

En materia de plagas que afectan a la citricultura podemos considerar las siguientes:

I.3.10. Mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*):

Ceratitis capitata, es la *mosca mediterránea de la fruta*, es un díptero tefrítido encontrado en más de 350 especies vegetales, entre ellas cítricos y frutales. Esta plaga produce daños por la picadura de la hembra en la oviposición. Se manifiesta por la producción de un pequeño orificio en la superficie del fruto que forma a su alrededor una mancha amarilla, en naranjas y mandarinas. Cuando la larva se alimenta de la pulpa favorece los procesos de oxidación y maduración prematura de la fruta, originando una pudrición del fruto que queda inservible para el mercado. Si se envasan frutos picados con larvas en fase inicial de desarrollo, se produce su evolución durante el transporte. Los principales daños se suelen producir sobre las variedades más precoces de mandarinas y naranjas (Thomas et al., 2001; Beitia et al., 2002; Palacios, 2005; Alonso- Muñoz y García-Marí, 2009)

I.3.11. Pulgones (*Aphis spiraecola*, *A. gossypii*, *A. citricola*, *Toxoptera aurantii*, *Myzus persicae*):

El daño que causan consiste en la sustracción de linfa, que comporta el debilitamiento de la planta, solo en caso de infecciones masivas que es cuando se produce una gran emisión de melaza,

acompañada del acartonamiento de las hojas. Su agresividad y su capacidad para transmitir ciertas virosis como el CTV, hacen que esta plaga sea potencialmente peligrosa. Su dependencia de factores ambientales y la presencia de enemigos naturales hacen que en algunos casos la incidencia sea menor. En cualquier caso, el comportamiento errático de la plaga en condiciones adversas (elevadas temperaturas y ambientes secos), hace muy difícil su predicción sobre la posible virulencia del ataque (Melia y Blasco, 1980; Palacios, 2005; Ripa y Larral, 2008).

I.3.12. Cócidos o cochinillas:

Los daños causados por las cochinillas consisten, esencialmente, en la sustracción de savia que provoca una depresión general en toda la planta. Además, la mayor parte de las especies producen melaza, un líquido azucarado responsable de las innumerables colonias de hormigas, comunes en las plantas infectadas por las cochinillas y pulgones. Por otra parte, la melaza también es el sustrato donde se desarrolla la fumagina. Las cochinillas viven en las hojas, las ramas y sus ramificaciones y, en menor número, en los frutos. Las numerosas generaciones que aparecen durante el año se caracterizan por su elevada prolificidad (<http://www.infoagro.com/citricos/naranja2.htm>).

Las plagas y enfermedades que afectan a los cítricos, desde una óptica productiva, difícilmente configuran, en la actualidad, un obstáculo insuperable para el desarrollo de la actividad. En la mayoría de los casos con tradición técnica del manejo integrado de los cultivos

se logra superar esta problemática. El uso de plaguicidas utilizados para el control de plagas puede provocar grandes efectos perjudiciales: intoxicaciones en el trabajador rural y en la población del campo, contaminación del ambiente rural, los recursos naturales y muy comúnmente presencia de niveles elevados en los alimentos, que pueden suponer un riesgo importante para la salud de los consumidores.

I.4. Plaguicidas

La agricultura tradicional demanda acciones tendentes a estudiar, desarrollar y valorar estrategias que aseguren e incrementen la producción agrícola con objeto de garantizar el suministro de alimentos de calidad a la creciente población mundial. En este sentido, la introducción de productos químicos de uso agrícola como los plaguicidas, revolucionó la agricultura, hasta tal punto que este tipo de compuestos ha llegado a ser indispensable para cultivar en áreas en las que sin el uso de los mismos no sería posible. Asimismo los fitosanitarios permiten extender el período de desarrollo de las plantas, incrementar su rendimiento y producción, así como mantener su calidad y aumentar su vida útil (Huerga y San Juan, 2005).

La necesidad de preservar los frutos cítricos destinados, tanto para la comercialización en fresco como para industria, hace necesario la utilización de plaguicidas. Estos frutos necesitan tratamientos específicos en la etapa de producción en campo para preservarlos de las plagas que atacan tanto a la planta como a los frutos. Además, en la etapa de post-cosecha son tratados para preservarlos de las

enfermedades fúngicas que puedan padecer durante el almacenamiento, transporte y comercialización.

Actualmente se utilizan centenares de plaguicidas de diferente naturaleza química mayoritariamente en agricultura, para eliminar malas hierbas, plagas y hongos de los cultivos. Pese a que los beneficios obtenidos a partir del uso de plaguicidas son numerosos, la utilización a escala mundial de grandes cantidades de estos compuestos ha dado origen a un conjunto de problemas que afectan al medio ambiente y a la salud humana. De hecho, el uso continuado e incontrolado de los plaguicidas, así como la elevada persistencia de muchos de ellos en el medio ambiente, ha provocado la aparición de problemas que inciden directamente sobre la salud humana y la supervivencia de numerosas especies. En este sentido, es posible encontrar residuos de plaguicidas en frutas, verduras, aguas, suelos, etc. como consecuencia de su utilización en actividades agrícolas, industriales y domésticas (OMS y PNUMA, 1992). En frutas se encuentran niveles de residuos, principalmente, como consecuencia de aplicaciones de plaguicidas de carácter sistémico y de mayor persistencia, en diferentes momentos de producción: en el campo, almacenamiento, en el drencher del empaque y/o fábrica. La entrada de frutas con residuos de plaguicidas en la línea de producción industrial, conlleva que los diferentes productos obtenidos a partir de ellas, como pueden ser jugos y aceites esenciales, entre otros, también presenten residuos de plaguicidas. Entre otros, en cítricos cabe destacar el tiabendazol, carbendazim, procloraz y clorpirifos.

Ante la problemática originada por el uso de plaguicidas de forma abusiva e incontrolada, en los últimos años se han ido desarrollando nuevos medios de protección de los cultivos de nulo o escaso impacto ambiental. El control biológico de plagas es el método que produce menos daños ecológicos; sin embargo, por su acción más lenta, menos efectiva y por la complejidad de los trabajos de investigación y desarrollo, no ha podido competir con la lucha química, de elevada toxicidad, pero de acción rápida y altamente efectiva. En general, el control biológico de plagas se basa en la utilización, por parte del hombre, de enemigos naturales (especies que se alimentan de los parásitos dañinos de las plantas), con objeto de reducir la población de la plaga a un nivel que no produzca daños económicos importantes. En lo que respecta a la lucha integrada, a diferencia de la lucha química tradicional donde el principal objetivo es la eliminación total de la plaga, el sistema integrado tiene como meta considerar el hábitat y la dinámica poblacional de las especies en cuestión, para así utilizar todas las técnicas y métodos apropiados de forma compatible, con objeto de mantener las plagas a niveles que no originen daños económicos, sin dañar el medioambiente ni poner en peligro la salud humana. Los sistemas integrados combinan la lucha química y biológica, con controles genéticos, etológicos, mecánicos y físicos e, incluso, el uso de plantas trampa.

La adopción de prácticas de control de plagas y enfermedades menos agresivas para la salud y el medio ambiente por parte de los productores argentinos, sin embargo, es muy baja. En su gran mayoría

han optado por las prácticas tradicionales, dado que el factor socioeconómico del productor es clave. Es primordial optimizar el uso de plaguicidas de forma que evite y/o minimice daños y enfermedades en las frutas, manteniendo los niveles de residuos al mínimo posible para lograr satisfacer las exigencias en el sector agroindustrial, el mercado interno y de exportación, preservar el medio ambiente y garantizar la salud de los consumidores de frutas y productos derivados. Para esto es necesario, no solo compatibilizar acciones tendentes a optimizar la producción citrícola regional, apuntando a tratamientos con menores dosis de plaguicidas, sino también dotar de medios y métodos analíticos de control acordes a las necesidades del sector (Huerga y San Juan, 2005).

Si bien el concepto de calidad alimentaria abarca muchos aspectos, la calidad higiénico-sanitaria es uno de los aspectos más importantes. Por ello, en los productos agrícolas, en especial para los cítricos, es necesario enfocar la calidad en relación a los niveles residuales de los plaguicidas, tanto en frutas como en sus productos industriales, como ya se ha comentado.

Resulta de vital importancia conocer los riesgos y la toxicidad de estos compuestos, así como asegurar su aplicación correcta (siguiendo las pautas de seguridad establecidas, aplicando las dosis adecuadas y respetando los tiempos de seguridad indicados), de manera que el alimento llegue al consumidor con mínimos riesgos para su salud. Sin embargo, no siempre se llevan a cabo estas indicaciones y, si no existe un control apropiado, los alimentos pueden

llegar al consumidor con niveles de plaguicidas más elevados de los que deberían contener. Como consecuencia, resulta necesario disponer de métodos adecuados para su análisis, especialmente en alimentos, con el fin de asegurar un consumo seguro.

I.4.1. Denominación y clasificación

Según el *Codex Alimentarius*, se define plaguicida como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga de los cultivos, incluidos los vectores de enfermedades humanas o de animales y las especies no deseadas en plantas o animales que causen perjuicio o interfieran de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, productos de la madera o alimentos para animales, o aquellos que puedan administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”*.

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son su toxicidad, su estructura química, plaga que controlan y modo de acción. En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda (tabla 1), definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, División Salud y Ambiente. *Plaguicidas y salud en las Américas*, 1993),

(http://www.sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2014-05-01_11-59-0899004.pdf).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad.
Fuente. Ramírez y Lacasaña (2001)

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligroso	Paratión, Dieldrín
Clase IB	Altamente peligroso	Eldrín, Diclorvos
Clase II	Moderadamente peligroso	DDT, Clordano
Clase III	Ligeramente peligroso	Malatión

La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL_{50}) o de la concentración letal media (CL_{50}), siendo la DL_{50} , la cantidad mínima de una sustancia, generalmente expresada en mg de sustancia/Kg de peso del animal, capaz de provocar la muerte de un 50% de animales de prueba (generalmente ratas). Cuando la exposición a la sustancia tóxica es a través del aire o del agua se le llama CL_{50} y se expresa en mg/L. Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores, como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica o respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc. Los resultados de DL_{50} obtenidos, proporcionan una orientación sobre la toxicidad aguda del producto en su utilización y, al basarse en la observación de especies animales, es importante señalar que estos indicadores no proporcionan información en humanos sobre los efectos crónicos ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto. En base a los valores de DL_{50} , la OMS realiza una clasificación de los

plaguicidas en función de su toxicidad, vía de contacto (oral y tópica) y formulación del producto (sólido o líquido) (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas recomendada por la OMS (OMS, 2004)

Fuente. <ftp://tesis.bbt.ull.es/ccppytec/cp582.pdf>

Clasificación	DL ₅₀ en ratas (mg/kg de peso del animal)			
	Vía oral		Vía tópica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Extremadamente tóxicos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Altamente tóxicos	5-50	20-200	10-100	40-400
Moderadamente tóxicos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Ligeramente tóxicos	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

Según su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, 1990) (tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su vida media
Fuente. Ramírez y Lacasaña (2001)
<http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>

Persistencia^a	Vida media^b	Ejemplos
No persistentes	De días hasta 12 semanas	Malatión, Carbarilo, Paratión, etc
Moderadamente persistentes	De 1 a 18 meses	Paratión, Lannate, etc
Persistentes	De varios meses a 20 años	DDT, Aldrín, Dieldrín, etc
Permanentes	Indefinidamente	Productos obtenidos a partir de mercurio, plomo, arsénico

^a Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

^b Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada.

De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen desde los compuestos organoclorados y organofosforados hasta compuestos inorgánicos (tabla 4). En este trabajo nos referiremos solamente a algunas familias de plaguicidas relevantes por el daño que causan a la salud y por su gran uso.

Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas, según la familia química
 Fuente. Ramírez y Lacasaña (2001)
<http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>

Familia Química	Ejemplo
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromofos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbaril, metomilo, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cipermetrina, fenvalerato, permetrín
Derivados bipiridilo	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, piclram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazina, ametrina, desmetrina, simazina
Compuestos orgánicos del estaño	Cihexatina, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

De acuerdo al ámbito de aplicación al que están destinados, los plaguicidas se pueden clasificar en: acaricidas, alguicidas, avicidas, bactericidas, defoliantes, fumigantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas, larvicidas, molusquicidas, nematicidas, ovicidas, repelentes y roenticidas (<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>).

Las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas utilizados y la naturaleza del tejido vegetal son, entre otros, los factores de mayor importancia a considerar. En este sentido, cobra especial interés disponer de la información correcta respecto al grupo de clasificación al cual pertenecen los fitosanitarios utilizados en los tratamientos, ámbito de aplicación y la forma en que se depositan, la penetración y persistencia en el tejido vegetal, entre otros aspectos. También es interesante conocer si es posible la disminución o eliminación de los residuos por causas diversas y/o durante los procesos tecnológicos a los que son sometidos los frutos, tanto en quintas, empaques, industria, etc.

Se define “residuos de plaguicidas” como la cantidad (mg/kg) del producto, o de sustancias derivadas de su degradación, que quedan sobre el producto cosechado y que pueden afectar al consumidor. Se relaciona con la toxicidad, tanto aguda como crónica (<http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/C-QUIMICO.pdf>). La denominación de residuo de plaguicida se refiere a cualquier sustancia presente en el medio (suelos, corrientes de agua), en los productos agrícolas o en los alimentos destinados al consumo humano o animal como consecuencia del empleo de un plaguicida. Esta definición no se limita al compuesto activo original, sino que también incluye todas las moléculas derivadas del mismo por acción de los factores ambientales o biológicos (metabolitos secundarios, productos de conversión, de degradación) con propiedades tóxicas (Coscollá, 1993; González-Rumayor et al., 2005).

Los residuos de plaguicidas se han convertido en uno de los problemas ambientales y sanitarios que más interés despierta entre los consumidores de todo el mundo, recibiendo actualmente un gran esfuerzo investigador en todos los campos. La importancia que se asigna en la actualidad a los residuos de plaguicidas en productos frescos y procesados hace necesario el control de la presencia y evolución de los mismos (Milán y Celma, 1984).

El *Codex Alimentarius* define el límite máximo de residuos (LMR) como “la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/Kg) para que se permita legalmente su uso en la superficie o en la parte interna de los productos alimenticios para consumo humano y de piensos”. Los LMRs se basan en datos de buenas prácticas agrícolas (BPA) en el uso de plaguicidas y en datos de toxicidad. En definitiva, estos valores permiten controlar el uso de plaguicidas, facilitar el comercio y proteger al consumidor.

Los organismos oficiales internacionales regulan los LMRs admisibles de plaguicidas en los productos agroalimentarios y también en las aguas, especialmente en las superficiales y subterráneas, puesto que son las que más se utilizan para el consumo humano. Por tanto, los residuos de plaguicidas presentes en vegetales y productos derivados, tienen una notable influencia en las transacciones comerciales, ya que su presencia constituye una barrera que limita la comercialización de productos en los mercados internacionales. Los permanentes cambios a los que están sometidas las normativas internacionales deben ser analizados por todos los actores vinculados

al sector productivo, para conocer el impacto de las reformas y establecer las estrategias de control fitosanitario más adecuadas (Coscollá, 1998).

Por todo ello, es necesario llevar a cabo controles periódicos con implementación de programas de monitorización del contenido de plaguicidas y sus residuos de los productos agroalimentarios y de las aguas naturales destinadas al consumo humano y animal, con la finalidad de verificar que estén exentos de los mismos o bien que la concentración de estos compuestos sea inferior al LMR establecido por las distintas legislaciones, con objeto de incrementar la seguridad alimentaria.

En la industria de cítricos la fruta que llega puede tener diferentes procedencias y, por tanto, cobra especial relevancia la trazabilidad de la misma. Cabe destacar que en la industria de aceites esenciales, la corteza de los cítricos presenta una capa lipofílica y una importante densidad de glándulas o vesículas de aceites esenciales, que favorecen el bloqueo de plaguicidas liposolubles, ofreciendo allí un medio donde son relativamente estables, lo que contribuye notablemente a su mayor persistencia. Es predecible que la eliminación de estos residuos será problemática, incluso durante las distintas etapas que conforman los procesos de industrialización de las frutas a la entrada en la línea de extracción, por lo que también es necesario evaluar los niveles residuales en los aceites esenciales obtenidos.

I.4.2. Características de plaguicidas utilizados en la citricultura

En este apartado se describirán solo las características de los plaguicidas abordados para el análisis del presente trabajo. El criterio de selección de los mismos está en relación al uso de agroquímicos más frecuentes por el sector empresarial de la citricultura y, entre ellos, se seleccionaron solo aquellos que suelen presentar más a menudo dificultades de comercialización por causa de que sus niveles residuales sobrepasan los LMR en los productos considerados, entre ellos los aceites esenciales.

Entre el grupo de plaguicidas seleccionados, se puede diferenciar dos categorías o clasificación de los mismos, según su acción: insecticidas y fungicidas, y según sus estructuras químicas: benzimidazoles y organofosforados.

Los plaguicidas se dividen en dos grandes grupos: de *contacto o no sistémicos* y *sistémicos*.

Los fungicidas fueron diseñados para prevenir el desarrollo de las esporas fúngicas en plantas y frutos. Los primeros fungicidas desarrollados fueron de carácter *no sistémico o de contacto*. Éstos no penetran notablemente en los tejidos del sistema vascular de la planta, siendo una de sus desventajas la imposibilidad de resistir las inclemencias del clima (viento, lluvia y sol) durante mucho tiempo y, la otra, que al crecer la planta, las partes nuevas quedan desprotegidas y, por lo tanto, expuestas al ataque de los hongos. La ventaja de los *no sistémicos* es que no presentan tantos problemas de toxicidad como en el caso de los fungicidas sistémicos. En estos últimos, el producto químico entra en contacto íntimo con los tejidos de la planta huésped,

por lo que debe ser altamente selectivo para el hongo, porque de lo contrario se corre el riesgo de que dañe a la planta huésped. Los fungicidas sistémicos son denominados quimioterapéuticos vegetales, ya que no solo protegen a la planta contra un ataque fúngico, sino que también “curan” o inhiben una infección establecida. Son poco afectados por el clima y confieren inmunidad a los brotes nuevos que crecen en la planta (Cremlyn, 1995).

Los insecticidas fueron diseñados para combatir los insectos y otros artrópodos que afectan a los vegetales y animales. Al igual que los fungicidas, estos pueden ser *no sistémicos o de contacto* y *sistémicos*. En citrus se les utiliza para combatir las “moscas de los frutos”, siendo ésta uno de los problemas más graves de la citricultura del NEA. Principalmente se usan contra la “mosca del Mediterráneo”, y en segundo lugar contra la “mosca Sudamericana”. La importancia de las moscas de las frutas radica, no solamente en el daño directo que producen (destrucción de los frutos), sino también en los problemas que ocasionan en la comercialización, por tratarse de plagas cuarentenarias (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2012).

1.4.2.1. Benzimidazoles

De acuerdo a la composición química de los benzimidazoles son hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos, que se caracterizan por la fusión del benceno con un imidazol que contiene dos átomos de nitrógeno ácidos y básicos (Danaher et al., 2007) (figura 5).

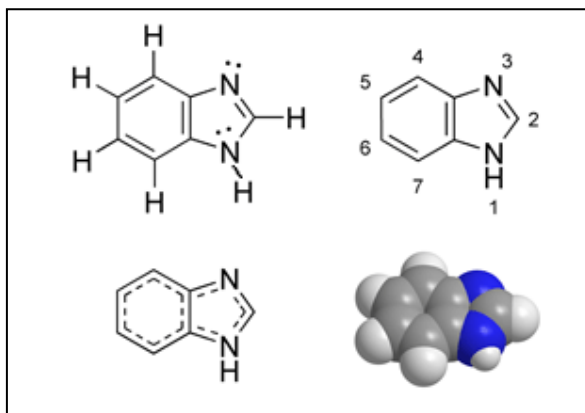


Figura 5. Estructura química del benzimidazol

Estas estructuras químicas adquieren propiedades específicas de acción antifúngica, lo que han permitido el desarrollo de diversos fungicidas sistémicos derivados del benzimidazol desde mediados de la década de los sesenta. El tiabendazol cobra gran importancia dentro de este grupo dado que es uno de los más utilizados.

En función de su constitución química, pueden diferenciarse claramente dos grupos derivados de los benzimidazoles (Veneziano et al., 2004):

- 1- Derivados tipo tiabendazol, que comprende a éste y al fuberidazol.
- 2- Derivados tipo benomil o benomilo, que incluye a este fungicida y al carbendazim, al metil y etil tiofanato, etc.

Los fungicidas benzimidazoles se utilizan para la prevención y tratamiento de infecciones en la agricultura y la acuicultura, ya que inhiben el desarrollo de una amplia variedad de hongos a bajas dosis de aplicación. Se aplican ya sea directamente sobre el suelo, o pulverizándose sobre los campos de cultivo (Wu et al., 2009). La

mayoría de estos compuestos persisten en el medio ambiente después de su aplicación, algunos incluso durante muchos años, debido a que el anillo benzimidazólico es difícil de romper y su degradación bacteriana es lenta (Barberá, 1989; Pattanasupong et al., 2004). Algunos de ellos también han encontrado aplicaciones como fungicidas pre o post-cosecha para el control de una amplia gama de patógenos.

Los benzimidazoles inhiben la elongación del micelio a bajas concentraciones y actúan sobre la germinación de las esporas a altas concentraciones. Su acción sobre la inhibición de la formación de microtúbulos conlleva la ausencia de la división celular, produciéndose además una desorganización citoplasmática de tipo general (Danaher et al., 2007).

A continuación se detallan los dos plaguicidas que se han estudiado en este trabajo y que pertenecen al grupo de benzimidazoles.

I.4.2.1.1. Tiabendazol

Nomenclatura química: 2-(4-tiazolil)-benzimidazol

CAS N°: 148-79-8

Fórmula química: $C_{10}H_7N_3S$ (figura 6)

Clasificación química: benzimidazol

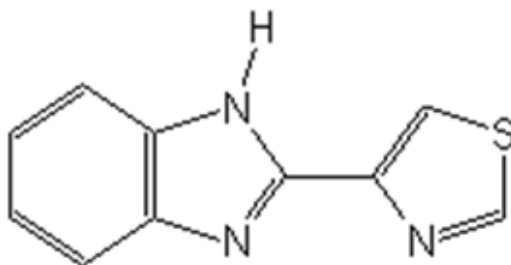


Figura 6. Estructura química del tiabendazol

Propiedades fisicoquímicas: Sólido cristalino, estable a la hidrólisis, luz y calor. Peso Molecular: 201,26. Su solubilidad en agua es igual a 50 mg/L a 25 °C. Solubilidad en diclorometano: 10 mg/mL. Solubilidad en etilacetato: 15 mg/mL. Solubilidad en metanol: 80 mg/mL. P.E.: 304 - 305 °C. Acción: sistémica y de contacto. Uso: fungicida.

Este fungicida tiene la facultad de circular por dentro de las plantas, pero su difusión a través de la epidermis de los frutos es considerada reducida. Su espectro de actividad es muy amplio (*Ascochyta*, *Aspergillus*, *Cercospor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Septoria*, *Ustilago*, *Rhizoctomia*, *Glousporium*, etc.). Actúa en forma preventiva y curativa.

En citrus actúa sobre la melanosis, moho azul, moho verde y podredumbre peduncular.

Posee la particularidad de combatir a bajas dosis el *Penicillium*, por lo que tiene una importante aplicación en el tratamiento post-cosecha de cítricos, manzanas, pera y plátanos. Además de estas acciones, tiene un efecto polivalente, lo que hace que se emplee también en tratamientos de semillas y de suelos aparte de

una serie de aplicaciones foliares, solo o combinado con otros fungicidas (Ito et al., 1998).

Se ha determinado una ingesta diaria admisible (ADI) de 0,1 mg/kg peso, un nivel de exposición aceptable para el operario (AOEL) de 0,070 mg/Kg peso al día y una dosis aguda de referencia (ARfD) de 0,10 mg/Kg peso (European Commission, 2015).

Riesgos ambientales: Este producto no presenta riesgo significativo para los peces y fauna silvestre.

Límite Máximo de Residuos en Argentina para fruta cítrica entera 10 ppm (mg/Kg) (SENASA, 2015), mientras que en la Unión Europea es de 5 mg/Kg (European Commission, 2015).

I.4.2.1.2. Carbendazim

Nomenclatura química: metil benzimidazol-2-ilcarbamato.

CAS N°: 10605-21-7

Fórmula Química: $C_9H_9N_3O_2$ (figura 7)

Clasificación química: benzimidazol

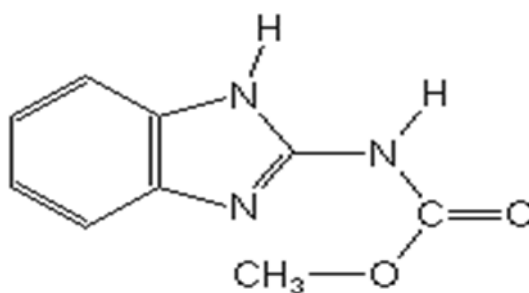


Figura 7. Estructura química del carbendazim

Propiedades fisicoquímicas: Sólido cristalino grisáceo. P.F.: 302 – 307 °C. Peso Molecular: 191 Solubilidad en agua: 5,8 mg/Kg. Soluble en dimetilformamida. Poco soluble en disolventes orgánicos. Se descompone por álcalis y forma sales con ácidos. Acción: sistémica, preventiva y curativa. Uso: fungicida.

Información general: Fungicida polivalente y sistémico, que se absorbe por los órganos verdes y las raíces de los vegetales, siendo su persistencia de acción de 2 a 3 semanas.

Aplicaciones principales: se emplea para el tratamiento contra *Venturia*, *Monilla*, *Botrytis*, *Oidium*, *Gloesporium*, *Sphaeropsis*, *Cocomyces*, *Phoma*, *Colletotrichum*, etc.

Su acción en citrus: combate la mancha grasienta, melanosis, moho azul y verde, podredumbre peduncular y de los frutos, sarna del naranjo agrio, etc. Se ha utilizado también en tratamiento en suelo y semillas.

Se ha establecido una ADI de 0,02 mg/Kg peso, un AOEL de 0,02 mg/Kg peso al día y una ARfD de 0,02 mg/Kg peso (European Commission, 2015).

Riesgos ambientales: no tóxico para abejas, moderadamente tóxico para peces y no tóxico para fauna silvestre.

En Argentina, la legislación (SENASA, 2015) establece como LMR para frutas un valor de 5 mg/Kg, mientras que en la UE se establecen valores de 0,2 y 0,7 mg/Kg para naranjas y mandarinas, respectivamente (European Commission, 2015).

1.4.2.2. Organofosforados

Los compuestos organofosforados son ésteres del ácido fosfórico (unión de un ácido y un alcohol) y una variedad de alcoholes, generalmente liposolubles. Su estructura básica se puede observar en la figura 6, en donde R_1 y R_2 pueden ser alquilo, alcoxi, ariloxi, amido u otros, y X puede ser un grupo haluro, fenoxi, tiofenoxi, fosfato, carboxilato, etc.

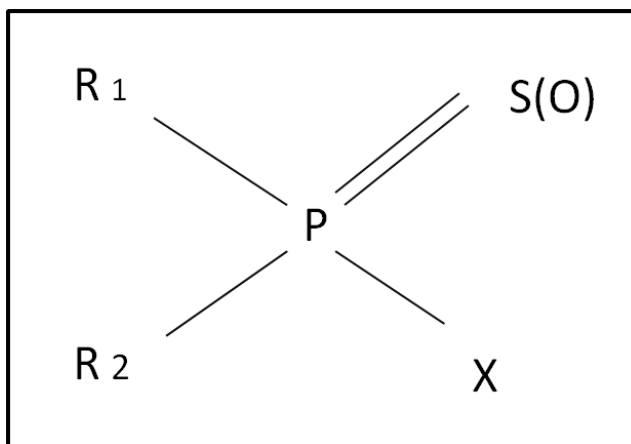


Figura 8. Estructura química general de compuestos organofosforados.

Cuando el átomo que se une al fósforo con el doble enlace es el oxígeno, el compuesto se denomina *oxon* (figura 9), y es un potente inhibidor de la enzima colinesterasa y de otras esterasas. Sin embargo, con el oxígeno en esta posición, también se favorece la hidrólisis del compuesto, especialmente bajo condiciones alcalinas. Para hacer estos compuestos más resistentes a la hidrólisis y, por consiguiente, prolongar su vida media en el ambiente, muchos organofosforados

presentan un átomo de azufre en vez del átomo de oxígeno. Estos organofosforados se denominan *tiones* (figura 9), son inhibidores pobres de la colinesterasa, pero penetran en las membranas biológicas más rápidamente que los oxones. En el ambiente, los tiones se convierten en oxones por acción del oxígeno y la luz solar y, en el organismo, por acción de las enzimas microsomales del hígado. Por ello, los tiones son sustancias altamente tóxicas, debido a su habilidad de atravesar las barreras biológicas y su facilidad de convertirse en oxones dentro del organismo.

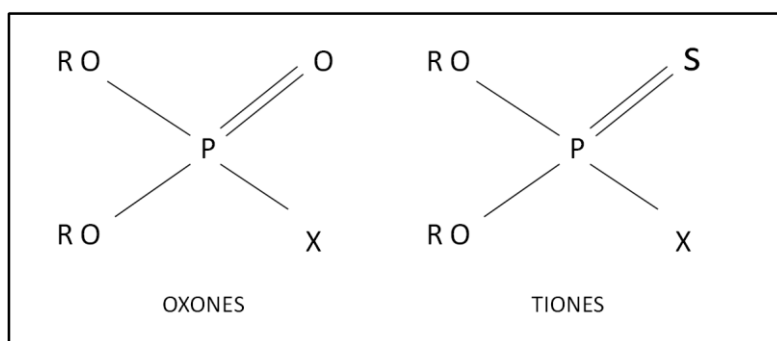


Figura 9. Estructura química general de plaguicidas organofosforados

Durante la Segunda Guerra Mundial comenzaron a llevarse a cabo numerosas investigaciones acerca de la síntesis de compuestos organofosforados tóxicos como gases de guerra potenciales, dando lugar a los primeros avances en el diseño de plaguicidas organofosforados (Katagi, 1990). Desde entonces, se consideran a estos compuestos como insecticidas muy potentes, pero debido a su

alta toxicidad para los mamíferos, su uso como insecticidas ha sido limitado (Cremlyn, 1995).

Es de destacar, en diseño de plaguicidas organofosforados, los trabajos de Schrader, quien desarrolló el paratión en el año 1946, uno de los organofosforados más masivamente usado como plaguicida en las décadas siguientes. Marcando hitos se sintetizaron luego el malatión (1952), el diazinón (1953) y el clorpirifos en 1965, año que marcó el máximo en términos de aparición de nuevos productos organofosforados (Casida, 1998).

En la actualidad hay más de 200 sustancias químicas incluidas en este grupo de compuestos, que se emplean principalmente como insecticidas y nematocidas; sin embargo, algunas de ellas se utilizan también como herbicidas, fungicidas, plastificantes y fluidos hidráulicos en la industria.

Los compuestos organofosforados ejercen su efecto tóxico a través de un mecanismo que provoca la inhibición de la acetilcolinesterasa (ACh), la enzima responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina (AC). Con la acumulación de la AC se altera el funcionamiento normal del impulso nervioso.

En el caso de algunos organofosforados, inhiben también la esterasa neuropática (NTE) y esta inhibición, junto con el incremento del Ca^{2+} intracelular por alteración de la enzima calcio-calmodulina-quinasa II, parece constituir el mecanismo de producción de la neuropatía retardada.

Los compuestos de uso agrícola, a diferencia de los de uso doméstico, están formulados a altas concentraciones que varían desde 20%-70% del principio activo. Los más usados son los de tipo no sistémico, como el clorpirifos.

I.4.2.2.1. Clorpirifos

Nomenclatura química: O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridinyl phosphorothioate.

CAS N°: 2921-88-2

Formula química: $C_7H_7Cl_3NO_3PS$ (figura 10)

Clasificación química: organofosforado

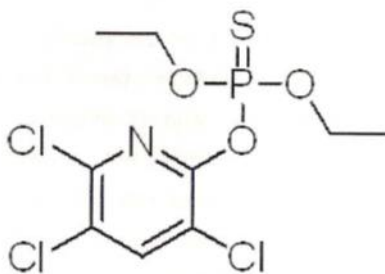


Figura 10. Estructura química del clorpirifos

El clorpirifos es un plaguicida orgánico de tipo sistémico, derivado fosfórico. Se comenzó a utilizar en 1965, siendo en la actualidad uno de los más utilizados. Actúa por contacto sobre diversas plagas de la fruta y se clasifica como tóxico.

Propiedades fisicoquímicas: Sólido cristalino de color blanco con leve olor a azufre. Peso molecular: 350,62. Solubilidad en agua: 0,4 mg/L a 23°C. Solubilidad en otros disolventes: benceno, acetona,

cloroformo, disulfuro de carbono, éter dietílico, xileno, cloruro de metileno, metanol. Punto de Fusión: 41,5- 44°C.

En citrus se utiliza para combatir ácaros de la yema y del tostado en época de prefloración, y para cochinilla blanda y pulgón del citrus al nacimiento de las ninfas.

Se ha establecido una ADI de 0,001 mg/Kg peso, un AOEL de 0,001 mg/Kg peso al día y una ARfD de 0,005 mg/Kg peso (European Commission, 2015).

En Argentina, la legislación (SENASA, 2015) establece como LMR para frutas un valor de 0,3 mg/Kg, mientras que en la UE se establecen valores de 0,3 y 2 mg/Kg para naranjas y mandarinas, respectivamente (European Commission, 2015).

I.4.2.2.2. Imidazoles: Procloraz

Nomenclatura química: N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]-1H-imidazol-1 carboxamida

CAS N°: 67747-09-5

Formula química: $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ (figura 11)

Clasificación química: imidazol

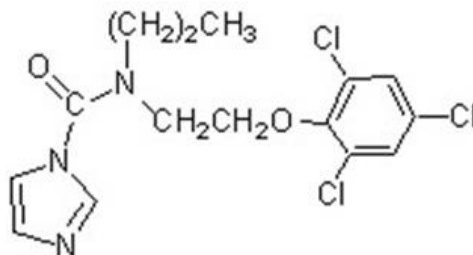


Figura 11. Estructura química del procloraz

Propiedades fisicoquímicas: Sólido cristalino incoloro e inodoro. Su punto de fusión se encuentra entre los 46,5 y 49,3 °C y su punto de ebullición es de 210 °C. Tiene una presión de vapor igual a $1,5 \times 10^{-1}$ mPa a 25 °C. Su solubilidad en agua es de 34,4 g/L a 20 °C. Es soluble en keroseno, cloroformo, xileno, dietil éter, tolueno y acetona. Esta sustancia se descompone durante el calentamiento prolongado a temperaturas mayores a 200 °C.

El procloraz se utiliza como fungicida protector y erradicante, capaz de prevenir con eficacia una amplia gama de enfermedades que afectan cosechas, frutas, césped y verduras. Tiene buena actividad contra las enfermedades de almacenamiento y tránsito en cítricos y frutas tropicales cuando se aplica como un tratamiento de inmersión (0,5-0,7 g/L).

En Argentina, la legislación (SENASA) establece como LMR para frutas un valor de 5 mg/Kg, mientras que en la UE se establecen valores para la suma de procloraz y de sus metabolitos que contengan

la fracción 2,4,6-triclorofenólica, expresados en procloraz de 10 mg/Kg para cítricos (European Commission, 2015).

I.5. Métodos de determinación de plaguicidas

Dada la importancia que reviste el control de plaguicidas a niveles traza en alimentos, es de especial relevancia la selección de técnicas de análisis adecuadas que proporcionen información cualitativa y cuantitativa fiable. Los métodos de análisis utilizados para dicho control deben presentar una serie de características, tales como permitir la determinación simultánea de un gran número de plaguicidas, es decir métodos multiresiduos (MMR), presentar elevada sensibilidad y selectividad, ofrecer confirmación de la identidad, permitir la cuantificación de cualquier residuo detectado de forma exacta y precisa, así como proporcionar la información analítica en el menor tiempo posible (Garrido-Frenich, 2014).

Los métodos cromatográficos responden a las rigurosas exigencias de los controles, lo que significa poder contar con técnicas apropiadas para la determinación de niveles trazas de plaguicidas. Sin duda, en las últimas décadas se ha producido un gran avance en el desarrollo y mejora de la instrumentación analítica (fases estacionarias, cromatógrafos, detectores, etc.), así como en las técnicas de preparación de muestra (Garrido-Frenich, 2014). Estas significativas innovaciones de la tecnología en equipamiento cromatográfico, han permitido el desarrollo de metodologías analíticas selectivas para la cuantificación de plaguicidas, con importantes mejoras en los sistemas de detección, como es el caso de los

detectores de espectrometría de masas, que son irremplazables en la identificación de analitos y cuantificación a niveles traza.

La optimización de métodos adecuados de extracción, identificación y cuantificación de plaguicidas en distintas matrices, permiten tener un control de los productos fitosanitarios, para asegurar que los alimentos que se comercializan en el mercado cumplen con la legislación y son inocuos para los consumidores.

Después de la extracción de los analitos de interés, limpieza de la muestra y/o concentración, la correcta separación de los compuestos es crítica, por eso las técnicas cromatográficas han sido ampliamente utilizadas con la finalidad de resolver muestras complejas (Gilbert-López *et al.*, 2009). Las técnicas de cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a distintos tipos de detectores son las más usadas en matrices complejas para la determinación de niveles residuales de plaguicidas (Cortés-Aguado *et al.*, 2008; Koesukwiwat *et al.*, 2010; Rouvière *et al.*, 2012).

La cromatografía de gases ha sido la técnica más empleada para la separación de compuestos no-polares y/o volátiles, mientras que la cromatografía líquida ha sido la técnica elegida para la separación de compuestos polares y/o no volátiles, y/o termolábiles.

En general, para que el análisis de un determinado compuesto sea compatible con cromatografía gaseosa, no sólo debe mostrar elevada volatilidad a temperaturas por debajo de 350-400°C, sino que también debe ser resistente a la degradación o a la reacción con otros compuestos a dichas temperaturas (Hajšlová *et al.*, 2007). Hay que

destacar que en los últimos años se ha experimentado una creciente tendencia al desarrollo de nuevos plaguicidas con estructuras más complejas y de mayor polaridad, que proporcionan una mejor respuesta mediante cromatografía líquida (Hernández et al., 2006).

I.5.1. Metodología de preparación de la muestra

La etapa de preparación de la muestra es de vital importancia, ya que ésta puede constituir una fuente de error muy importante, especialmente en la determinación de plaguicidas que se encuentran a nivel de trazas. Si no se selecciona la técnica adecuada o si la preparación de muestras no se lleva a cabo de forma cuidadosa, se pueden dar pérdidas de analito en las diferentes etapas, tales como la extracción, el “clean up”, etc., o contaminaciones que interfieren en los resultados de los análisis.

Los métodos de extracción y de limpieza han tenido que hacer frente al reto de responder al creciente número de analitos y de familias de compuestos con diferentes características físico-químicas, así como a la ampliación en el número de matrices bajo control (European Commission, 2013). En consecuencia, se trabaja con métodos extractivos y de limpieza de carácter más genérico, a fin de cubrir una amplia gama de compuestos y matrices, experimentando una evolución hacia la automatización y la miniaturización, con el objetivo de disminuir el consumo de disolventes orgánicos, la reducción de costes y el tiempo de manipulación de la muestra (Garrido-Frenich, 2014).

Es necesario realizar un proceso de toma de muestra adecuado, con una cuidadosa homogeneización de la muestra previa a la extracción de los residuos para el análisis.

Por otra parte, dada la complejidad de la matriz que suponen los alimentos, donde se encuentran presentes contenidos importantes de proteínas, lípidos, hidratos de carbono, agua y otros componentes minoritarios, la muestra requiere generalmente una purificación de los extractos, para eliminar las sustancias interferentes antes de realizar la medida analítica. A menudo, los componentes de interés se encuentran a concentraciones muy bajas, a nivel de trazas, como ya se ha comentado, siendo necesario procedimientos de concentración del extracto para poder detectarlos. Es decir, la muestra antes de ser sometida al análisis cromatográfico debe inevitablemente adecuarse en la etapa de “preparación de la muestra” que, tal como ya se ha descrito, conforma uno de los pasos más importantes en toda cadena analítica y que puede tener como objetivos, principalmente:

- Extraer los analitos de la matriz
- Eliminar interferentes
- Concentrar analitos

La etapa de preparación de la muestra puede llegar a constituir entre el 60 y el 85% del tiempo total de análisis. Del éxito de esta etapa dependerán parámetros analíticos tan importantes como la eficiencia de recuperación de analitos, la reproducibilidad y la robustez de la técnica, afectando también a la sensibilidad y selectividad del método en su conjunto, el tiempo requerido para el análisis, su coste, etc. (Stashenko y Martínez, 2011).

A continuación se detallan algunas de las metodologías más empleadas en la preparación de muestras en alimentos para el análisis de residuos de plaguicidas en diferentes matrices (Ridgway *et al.*, 2009):

1.5.1.1. Extracción con solventes:

Es una técnica muy empleada en la extracción de plaguicidas. Se han usado diferentes disolventes orgánicos como el acetonitrilo, acetato de etilo, metanol, acetona o éter de petróleo, entre otros. Dentro de este apartado cabe destacar la extracción sólido-líquido llevada a cabo de forma tradicional mediante el método Soxhlet. Por otra parte, también se incluye aquí la extracción líquido-líquido (LLE), que ha sido y continúa siendo ampliamente utilizada en la preparación de muestras para análisis de plaguicidas. El principal inconveniente de estas técnicas de análisis, consideradas como técnicas clásicas es que requieren bastante tiempo, son tediosas y se emplean cantidades importantes de disolventes orgánicos que pueden aportar impurezas y que son tóxicos (Farajzadeh *et al.*, 2016).

Para evitar estos inconvenientes, dentro de la extracción con solventes, se han desarrollado otros sistemas de extracción, que presentan importantes ventajas frente a estas técnicas clásicas, como son:

- Extracción asistida por microondas (Microwave-Assisted Extraction, MAE), en donde se emplean equipos diseñados especialmente para ello. Se introduce la muestra sólida o semisólida en las celadas de

extracción del equipo, se añade el disolvente y se somete a radiación microondas, calentando a temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente y aumentando la presión en el interior de la celda. Posteriormente se enfría y se separa el extracto. Tiene la ventaja de ser una técnica muy rápida, se pueden extraer varias muestras a la vez y emplea menos disolventes que las técnicas tradicionales. Además se trata de una técnica robusta. Uno de los inconvenientes es que requiere una inversión en el equipo.

- Extracción acelerada con disolventes (Accelerated Solvent Extraction, ASE), en donde también se emplean equipos diseñados especialmente para ello. Se introduce la muestra sólida o semisólida en la celda de extracción, se añade el disolvente y se calienta a una temperatura superior al punto de ebullición del disolvente, conllevando un aumento de presión en la celda. Finalmente se recoge el extracto en un vial. Este sistema hace que aumente la solubilidad del analito en el disolvente y se consigue una mayor difusión del analito desde la matriz al disolvente. Las extracciones en este caso, también son rápidas y efectivas, y requieren menos disolvente. Al igual que en el caso anterior, se requiere una inversión en el equipo. Una variante de ésta es la extracción con agua a altas temperaturas (Super-Heated

Water Extraction, SHWE), que permite la eliminación del uso de disolventes orgánicos.

- Extracción con fluidos supercríticos (Supercritical-Fluid Extraction, SFE). En esta técnica se hace una extracción de la muestra con un fluido supercrítico, que normalmente suele ser el CO₂. Las ventajas que presenta es que el CO₂ no es tóxico, se trabaja a temperaturas moderadas y las extracciones son rápidas y eficaces. El inconveniente es el alto coste del sistema y que requiere personal altamente cualificado para la puesta en marcha y funcionamiento del mismo.
- Extracción líquido-líquido homogénea (Homogeneous Liquid-Liquid Extraction, HLLLE), utiliza el fenómeno de separación de fases en una solución homogénea. Una versión de HLLLE es “Salting-out Homogeneous Liquid-Liquid Extraction” (SHLLLE), que emplea el fenómeno de separación de fases inducido por sal, en el que la fase orgánica se separa de la solución homogénea y los analitos son extraídos simultáneamente en la fase orgánica separada (Farajzadeh et al., 2016).
- Microextracción líquido-líquido dispersiva (Rezaee et al., 2006) desarrollaron esta técnica novedosa basada en un sistema ternario de disolventes, en el que una solución de un disolvente de extracción en un solvente disperso es inyectado rápidamente en una muestra acuosa con una jeringa. El solvente dispersante debe ser totalmente

miscible con la muestra acuosa y con el solvente de extracción, mientras que el solvente de extracción debe ser insoluble en agua y tener una densidad diferente de la muestra acuosa. Esta técnica es simple, barata y rápida. Su principal inconveniente es que el disolvente de extracción suele ser un disolvente halogenado, que son altamente tóxicos y difíciles de manipular en el laboratorio (Farajzadeh et al., 2016).

1.5.1.2. Extracción mediante adsorción en superficies sólidas

La aplicación de este principio generó novedosas técnicas de extracción y clean-up que permitió, en muchos casos, mejorar los límites de detección establecidos para plaguicidas y sus metabolitos, en muestras de alimentos (Lambropoulou y Albanis, 2007). Se distinguen la extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE), la micro- extracción en fase sólida (Solid-Phase Microextraction, SPME), extracción con barra agitadora con capacidad de adsorción (Stir-Bar Sorptive Extraction, SBSE) y la extracción mediante dispersión de la matriz en la fase sólida (Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD).

Extracción en fase sólida (SPE)

Este tipo de extracción es una de las técnicas más empleadas en el tratamiento y concentración de muestras antes de su análisis por cromatografía, tanto líquida como de gases. Esta técnica permite realizar la extracción, el clean-up y la reconcentración de los analitos de las matrices. El principio de esta metodología es la retención

(adsorción) de los solutos sobre un lecho de adsorbente adecuado y posterior elución de los mismos con un reducido volumen de disolvente. De esta manera se reduce significativamente el tiempo de análisis, los costes y el consumo de disolventes orgánicos (Fritz, 1999).

En el procedimiento de SPE podemos distinguir distintas etapas, como muestra la figura 12.

- 1- *Etapas de acondicionamiento*: En primer lugar se ha de llevar a cabo la activación del adsorbente y de los grupos funcionales. Esto se consigue pasando un volumen de disolvente o mezcla de solventes apropiados a través del cartucho. Se suele utilizar metanol o acetonitrilo para activar adsorbentes hidrofóbicos, mientras que para los hidrofílicos se usa hexano o cloruro de metileno. Se recomienda usar de 2 a 4 volúmenes de lecho.
- 2- *Etapas de carga de la muestra*: Se deposita la muestra (liquida o en disolución) en la parte superior del lecho de adsorbente. Algunos interferentes pueden pasar por la columna sin ser retenidos; mientras que otros componentes de la matriz pueden retenerse más o menos fuertemente en la superficie del adsorbente. Para obtener la máxima eficacia se debe controlar el caudal de solvente, logrando con ello establecer tiempos óptimos de extracción e interacción entre el adsorbente y el extracto.
- 3- *Etapas de lavado*: El lavado permite la eliminación de cualquier interferente que haya quedado en el cartucho retenido, manteniendo los analitos en el lecho de adsorbente. Se pueden

usar solventes o mezcla de solventes de diferente tipo para mejorar la eficacia del lavado.

- 4- *Etapa de elución:* Se pasa un solvente adecuado por el cartucho para eliminar la interacción analito adsorbente y eluir el 100% de los analitos. El solvente adecuado ha de tener la máxima interacción con el analito y una interacción mínima con las demás impurezas, si aún quedaran, dejándolas en el lecho de adsorbente. El volumen de elución ha de ser el menor posible para mantener alto el factor de concentración.
- 5- *Etapa de concentración:* Los compuestos de interés se concentran evaporando una parte del solvente. A veces es necesario secar el eluato con sulfato de sodio para eliminar posibles trazas de agua. La muestra concentrada ya está lista para el análisis cromatográfico.

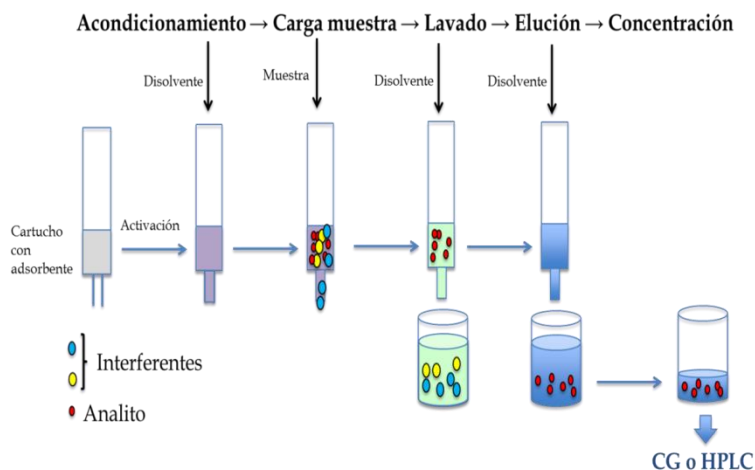


Figura 12. Etapas de la metodología de Extracción en Fase Sólida (SPE)

El gran desarrollo que ha experimentado esta técnica en los últimos años, ha conllevado al diseño de distintos formatos para la extracción, como cartuchos de volumen variable, puntas de pipetas, pocillos, etc. que permiten introducir cantidades variables de relleno. Asimismo se dispone de un gran número de materiales de relleno de naturaleza muy diversa que comprenden desde adsorbentes muy polares (diol, ciano, hidroxilo o Florisil), hasta muy poco polares (fases octadecilsilano (C18), octilsilano (C8)), pasando también por materiales de intercambio iónico, que permiten extraer de forma efectiva, rápida y sencilla, un gran número de compuestos, lo que hace que esta técnica tenga un gran número de aplicaciones.

Para la determinación de plaguicidas de diferentes características químicas las más utilizadas son las de tipo C₈ y C₁₈.

En general, la capacidad de retención de solutos de una columna de SPE depende del tipo de material de relleno, del tamaño de la columna, del tipo de analito y de las condiciones de extracción.

Extracción en fase sólida dispersiva (dSPE)

Dentro de la extracción en fase sólida, cabe destacar una variante de la misma que fue desarrollada en el año 2003 por Anastassiades et al. (2003) para el análisis de residuos de plaguicidas en material vegetal, denominada QuEChERS. Su nombre hace referencia a las ventajas que presenta el método (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*). Este método también es llamado extracción en fase sólida dispersiva y puede, ser utilizado en el análisis de plaguicidas en alimentos y productos agrarios, proporcionando

recuperaciones aceptables para los plaguicidas en matrices ácidas, neutras y básicas, como las frutas y verduras (Anastassiades et al., 2003; Aysal et al., 2007). En resumen, es un método que ofrece las ventajas de altas recuperaciones, resultados precisos, rapidez de tratamiento, poco uso de solvente y material de vidrio y además requiere poco espacio de laboratorio y pocos reactivos. Este método ha sido aprobado por la AOAC (Método 2007.01) y en Europa bajo prEN-15662 (http://www.cromlab.es/EFS_HS_QUECHERS.htm).

El método QuEChERS consta de dos etapas, una primera etapa de *extracción* y una segunda etapa de *clean-up* que es la fase dispersiva.

1. *Etapa de extracción* una mezcla de sales de $MgSO_4$ y $NaCl$ para reducir el contenido de agua en la muestra. Los productos para la etapa de extracción se suministran en tubos de polipropileno para centrífuga de 50 mL para facilitar la extracción. En la primera etapa, se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son el sulfato de magnesio, el cloruro sódico, el citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato. La función de cada una de estas sales en la etapa de extracción es diferente:

Sulfato de magnesio ($MgSO_4$): mejora la recuperación del analito al facilitar la partición de los

plaguicidas en la fase orgánica (acetonitrilo) gracias a que retiene agua.

Cloruro sódico (NaCl): ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de fases entre el contenido de agua y la orgánica.

Acetato de sodio: ayudan a la regulación del pH.

Sales de citrato: se emplean para ajustar del pH a valores de 5,5 donde se extraen la mayoría de los componentes ácidos y básicos de la muestra.

La selección de las sales a emplear va a depender de los compuestos que se desean analizar y el tipo de protocolo de análisis a utilizar:

Método original “QuEChERS”: sulfato de magnesio y cloruro sódico

Método AOAC (AOAC 2007.01): sulfato de magnesio y acetato de sodio

Método EN 15662: sulfato de magnesio, cloruro sódico, citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato.

2. *Etapa de clean-up*: en esta etapa se realiza la limpieza del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva. Este paso facilita la eliminación del agua residual y de los compuestos presentes en la matriz del alimento que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos

y pigmentos. Se usa PSA (amina primaria/secundaria) para la eliminación de ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos de antocianina, y sulfato de magnesio ($MgSO_4$) para eliminar el exceso de agua residual. Se puede emplear un sorbente C18 para eliminar grasas, esteroides y otras interferencias no polares de la muestra y carbón negro grafitado (GCB) que elimina pigmentos de la muestra como clorofilas y carotenoides.

La selección de la fase sólida dispersiva va a depender, por tanto, del tipo de alimento que es analizado, así existen diferentes protocolos de “clean-up” para:

- Frutas y verduras en general.
- Frutas y verduras con grasas y ceras.
- Frutas y verduras pigmentadas (vegetales verdes, zanahorias, vino, etc)
- Frutas y verduras altamente pigmentadas.
- Frutas y verduras con pigmentos y grasas (estos también pueden emplearse para el análisis de leche, carne y pescado).

Después del proceso de limpieza, se lleva a cabo una centrifugación y el extracto está listo para ser directamente analizado o sometido a evaporación y recomposición en el disolvente apropiado para su análisis.

En la figura 13 se muestran las distintas etapas de preparación de muestra mediante este método.

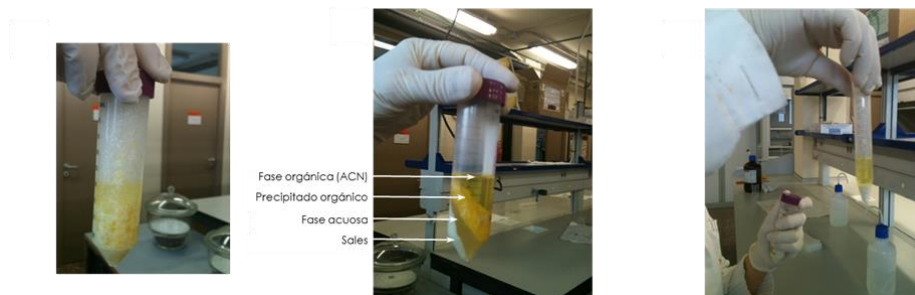


Figura 13. Ejemplo de distintos pasos en la preparación de una muestra de naranja siguiendo el método QuEChERS. (Fuente: Fuentes et al. (2015))

I.5.2. Técnicas cromatográficas de análisis

Antecedentes históricos

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre ambas fases. La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y en que concentración; y preparativa, utilizada para purificar grandes cantidades de químicos.

El origen de esta técnica se remonta a principios del siglo XX. En el año 1906, el botánico ruso Mikhail Seménovich Tsweet

(1872-1919) realizó la primera experiencia cromatográfica en columna, empleando carbono cálcico y alumina para separar pigmentos vegetales.

Tsweet empacó una columna de vidrio con el material adsorbente. A continuación depositó una mezcla de pigmentos vegetales extraídos de las hojas molidas de una planta y añadió éter de petróleo, observando al cabo de un tiempo que el material empacado en la columna había adquirido una coloración diferente por segmentos. Es decir, había logrado la separación de los pigmentos naturales de la planta (figura 14).

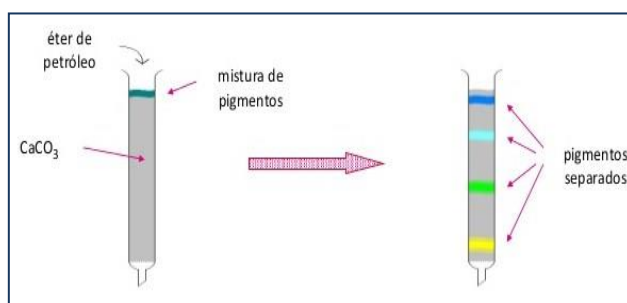


Figura 14. Esquema de la separación de pigmentos en una columna cromatográfica de Tsweet.

Fuente: <http://pt.slideshare.net/marcelborgesb/cromatografia-líquida-moderna>

Tras su descubrimiento la cromatografía quedó prácticamente olvidada hasta 1930, año en que Richard Khum y Lereeder, la utilizaron para la separación de carotenoides. A partir de ese momento, el uso de esta técnica se fue extendiendo cada vez más, al tiempo que se desarrollaban diferentes versiones de la misma.

Hay que destacar que, siendo la cromatografía en sus orígenes una técnica exclusivamente de separación se han ido

desarrollando y/o acoplando dispositivos para monitorizar las especies químicas que se iban separando, transformándose así de forma paulatina en una valiosa técnica de análisis. Con el paso de los años, el desarrollo de las técnicas cromatográficas ha sido espectacular, siendo hoy en día una de las metodologías analíticas más potentes para la identificación y cuantificación de compuestos en un amplio rango de concentraciones y en cualquier tipo de matriz.

Mecanismo básico de la cromatografía

Como ya se ha comentado, en cromatografía los solutos se separan en función de las diferentes velocidades de desplazamiento, cuando son arrastrados por una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que contiene una fase estacionaria.

Los analitos que son retenidos fuertemente por la fase estacionaria se mueven más lentamente con el flujo de la fase móvil, en comparación con aquellos que los retiene débilmente y que avanzan más rápidamente (figura 15). Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra.

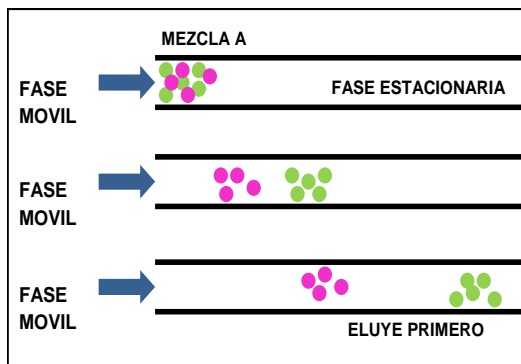


Figura 15. Esquema del proceso de separación cromatográfica

La cromatografía se puede clasificar en función de distintos parámetros, pero la clasificación más importante es la que se hace atendiendo a la naturaleza de la fase móvil, así podemos diferenciar dos tipos de métodos cromatográficos: *cromatografía de gases* (la fase móvil es un gas) y *cromatografía líquida* (la fase móvil es un líquido).

1.5.2.1. Cromatografía de gases (GC)

En este tipo de cromatografía la fase móvil es un gas y la fase estacionaria puede ser líquida o sólida. Básicamente, la instrumentación en CG consta de las siguientes partes:

- Gas portador (fase móvil): Se utiliza un gas inerte, ya que no ha de interactuar con los analitos ni con la fase estacionaria. Los gases más empleados en CG son el hidrógeno, nitrógeno y helio, especialmente estos dos últimos. Han de ser de elevada pureza, siendo recomendable el uso de filtros antes de la entrada al

cromatógrafo, para eliminar impurezas de hidrocarburos, O₂ o H₂O.

- Inyector: Los inyectores más comunes son el inyector *split/splitless* y el inyector *on-column*. El primero de ellos permite trabajar de 2 modos, en modo *split* (o con división), donde la muestra es depositada en el liner (tubo de evaporación), que está a temperatura elevada (normalmente entre 200-300 °C), se mezcla con el gas portador que arrastra una parte determinada hacia la columna, mientras que otra parte de la muestra y del gas portador, sale al exterior por la válvula de *split*; es decir, que solo una parte de la muestra que se inyecta entra en la columna. Cuando se trabaja en modo *splitless* (o sin división), el proceso es el mismo que se acaba de describir, pero la válvula de *split* permanece cerrada durante la inyección, de forma que toda la muestra inyectada entraría a la columna. Se suele trabajar en *split* cuando se tienen muestras concentradas, mientras que se trabaja en *splitless* cuando se trata de análisis de trazas. Por otra parte, la inyección *on-column*, se basa en introducir la muestra directamente en la base de la columna, es decir, en este caso no hay *liner* o tubo de evaporación.
- Columna: La columna está dentro de un horno, ya que en este tipo de cromatografía la temperatura de la columna es un parámetro esencial para optimizar la separación. La

columna contiene la fase estacionaria y es, por tanto, donde se produce la separación. Las columnas más empleadas son las columnas capilares de sílice fundida en cuyo interior está la fase estacionaria, recubiertas por un polímero de poliimida que les confiere resistencia y flexibilidad. Hay diferentes tipos de fases estacionarias que varían en un amplio rango de polaridad. En el análisis de plaguicidas, las fases estacionarias más empleadas suelen ser las que constan de un esqueleto de polisiloxano en donde, dependiendo de la proporción y tipo de radicales que lleve unidos, se van obteniendo columnas de diferente polaridad. Por ejemplo, la columna más apolar de este tipo es la 100% metilpolisiloxano; otra columna también muy empleada en análisis de plaguicidas es la 5% fenil 95% metilpolisiloxano. También se pueden encontrar grupos cianopropil o trifluoropropil en las columnas de polisiloxano.

- Detector: A la salida de la columna hay un detector por donde pasan los analitos ya separados, que emite una señal proporcional a la cantidad de analito que pasa por él. Más adelante se comentarán los detectores más empleados en análisis de plaguicidas.

I.5.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En cromatografía líquida la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria puede ser líquida o sólida.

La cromatografía líquida, a su vez, se puede clasificar en función del mecanismo de separación de los componentes entre las fases. Así, se puede hablar de cromatografía de *adsorción*, *partición*, *intercambio iónico*, *exclusión molecular* y *afinidad* (Quattrocchi, 1992; Romero-García, 2002; Lamarque et al., 2008):

a) Cromatografía de adsorción: La fase estacionaria es un sólido en el que los componentes de la muestra son adsorbidos. La adsorción ocurre en la superficie de la partícula de la fase estacionaria y es debida a la atracción entre el soluto y el adsorbente por interacciones dipolo-dipolo, formación de puentes de hidrogeno, etc. (FAO, 2003; Lamarque *et al.*, 2008; Iñon, 2010). La separación de los analitos se basa en diferencias en las propiedades de adsorción sobre la fase estacionaria y en diferencias de solubilidad en la fase móvil. Las fases estacionarias más empleadas suelen ser de sílice o alúmina, mientras que las fases móviles que se utilizan en esta modalidad suelen ser disolventes orgánicos de polaridad baja o media, como hexano, iso-octano, etc. En general, cuanto más polar es un compuesto más fácilmente será adsorbido y mayor retención presentará.

Este tipo de cromatografía está particularmente bien adaptada para la separación de compuestos de polaridad baja y media, solubles en disolventes apolares. La separación de compuestos muy polares mediante cromatografía de adsorción requiere, debido a la gran retención que ofrecen, la utilización de adsorbentes muy pocos

activos, o bien, tratamientos químicos previos para la preparación de la muestra a fin de reducir su polaridad.

b) Cromatografía de partición: En este caso, la fase estacionaria es un líquido soportado en un sólido inerte. La separación de los analitos se basa en diferencias de solubilidad en la fase estacionaria líquida y la fase móvil también líquida (ambas fases inmiscibles entre sí). Dependiendo de la polaridad de las fases estacionaria y móvil, se distingue la cromatografía en *fase normal* y la cromatografía en *fase reversa* (Valcárcel y Gómez Hens, 1988). En fase normal, se emplean fases móviles apolares (como hexano, diclorometano, etc) y fases estacionarias polares, mientras que en fase reversa se emplean fases móviles polares (agua, acetonitrilo, metanol, etc) y fases estacionarias apolares (octadecilo o C18, octilo o C8, C4, etc). Recientemente se ha desarrollado una variante de la fase normal, que es la modalidad “*Hilic*” o de *interacción hidrofílica*, en donde ambas fases son polares. Es importante destacar que la fase reversa es de las modalidades más empleadas. Mediante esta técnica se pueden analizar compuestos de un amplio rango de polaridades, ácidos y bases débiles, etc.

c) Cromatografía de intercambio iónico: Las fases estacionarias son rellenos cargados iónicamente. La separación en la cromatografía de intercambio iónico depende la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas, a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. El mecanismo de separación se basa en un equilibrio de intercambio iónico. Los analitos presentan diferentes grados de interacción con el intercambiador iónico, debido a diferencias en sus

cargas, densidades de carga y distribuciones de carga en su superficie. Estas interacciones pueden ser controladas variando condiciones como la fuerza iónica y el pH.

Los analitos que se pueden analizar por esta técnica son aniones y cationes inorgánicos (nitratos y nitritos, sodio, potasio, etc.), y también compuestos orgánicos (aminoácidos, azúcares, etc.).

d) Cromatografía de exclusión por tamaño: En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un sólido de porosidad controlada. En la separación no interviene ninguna interacción química, solamente se basa en diferencias en el tamaño molecular de los analitos en disolución.

Esta técnica es poco empleada en análisis cuantitativo. Se usa comúnmente para las separaciones preparativas de macromoléculas de origen biológico, así como para la purificación de polímeros orgánicos sintéticos.

e) Cromatografía de afinidad: La fase estacionaria es un sólido con propiedades de retención bioespecífica, como un enzima o un antígeno. Este tipo de cromatografía utiliza interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y una segunda molécula unida covalentemente (inmovilizada) a la fase estacionaria. La fase móvil ha de contener un sustrato capaz de competir por el soluto con la fase estacionaria.

De todas las modalidades comentadas, la más empleada en análisis de plaguicidas es la cromatografía de partición.

Básicamente, la instrumentación en HPLC consta de las siguientes partes:

- Depósitos de fase móvil: La fase móvil es un disolvente o mezcla de varios disolventes. Al contrario de lo que sucedía en CG, aquí la fase móvil interviene de manera decisiva en la separación de analitos, por lo que la elección de la composición de la fase móvil y del modo de trabajo (isocrático o composición constante durante el análisis, o en gradiente que conlleva variación de la composición), es primordial en la optimización del método. La naturaleza de los disolventes empleados, depende del tipo de cromatografía líquida en el que se esté trabajando.
- Bomba a alta presión: En cromatografía líquida de alta resolución se trabaja a altas presiones, por lo que las bombas han de poder trabajar en un amplio rango de presiones (entre 500 a 6000 psi).
- Inyector: Es es por donde se introduce la muestra y se mezcla con la fase móvil para ser conducida a la columna.
- Columna: Al igual que en CG, es donde se encuentra la fase estacionaria y, por tanto, donde tiene lugar la separación. También en HPLC, se dispone de una gran variedad de fases estacionarias. Las columnas son tubos de acero de longitud variable en cuyo interior se encuentra la fase estacionaria. A menor tamaño de partícula, mayor es la eficacia, pero la principal limitación es que a menor tamaño de partícula, mayor es la presión de trabajo. Los tamaños de partícula con los que normalmente se trabaja

en HPLC son superiores a 3,5 μm , y las longitudes de columna normales de 15 a 30 cm. Para poder aumentar la eficacia disminuyendo el tamaño de partícula, se han diseñado equipos que soportan presiones de trabajos mayores, permitiendo así disminuir el tamaño de partícula por debajo de 2 μm ; estos equipos son los llamados UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*). Al disminuir el tamaño de partícula, aumenta la eficacia espectacularmente, pudiéndose disminuir la longitud de la columna, lo que permite acortar considerablemente los tiempos de análisis (hasta 10 veces) y el consumo de eluyente (hasta en un 90%) sin comprometer los resultados analíticos (Perkin Elmer, 2009).

- Detector: A la salida de la columna hay un detector por donde pasan los analitos ya separados, que emite una señal proporcional a la cantidad de analito que pasa por él y que se comenta a continuación.

1.5.2.3. Tipos de detectores en cromatografía

Hay distintos tipos de detectores empleados en CG y HPLC, destacando entre todos ellos el acoplamiento de la cromatografía de gases y líquida a la espectrometría de masas. Este acoplamiento permite combinar la gran versatilidad de estas dos técnicas de separación, con la elevada sensibilidad y especificidad de la espectrometría de masas.

Se emplean distintos tipos de espectrómetros de masas como el simple cuadrupolo, triple cuadrupolo, trampa iónica, tiempo de vuelo o el orbitrap. Se pueden emplear diferentes técnicas de ionización como el impacto electrónico (EI), ionización química (CI), ionización química a presión atmosférica (APCI) o ionización por electrospray (ESI).

A su vez, se pueden utilizar diferentes modos de adquisición, como el llamado full-scan (o modo de barrido completo), el modo SIM (selected ion monitoring), modo SRM (selected reaction monitoring) o modo MRM (multiple reaction monitoring). La combinación de diferentes tipos y modos de operación en los detectores de espectrometría de masas dan lugar a diferentes grados de selectividad y especificidad (European Commission, 2013).

Aparte de los espectrómetros de masas, se pueden emplear otros detectores. En cromatografía de gases hay detectores selectivos como el de captura electrónica (ECD) o el detector termoiónico (NPD), que presentan alta sensibilidad y selectividad frente a grupos químicos presentes en distintos grupos de plaguicidas. También en cromatografía líquida se pueden emplear detectores como el de red de diodos (DAD) o el detector de fluorescencia. Sin embargo, todos estos detectores son menos empleados que los espectrómetros de masas en el análisis de plaguicidas debido a su limitada especificidad (European Commission, 2013).

I.5.3. Validación de métodos

La validación de un método analítico consiste en establecer mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (Organización Panamericana de la Salud, 2002).

Los métodos de análisis requieren confiabilidad, siendo éste un término general que incluye el grado de cumplimiento satisfactorio de un método analítico en términos de sus distintos atributos técnicos (aplicabilidad, exactitud, precisión, sensibilidad y detectabilidad) (AOAC, 1990; Masson, 2007). Los nuevos métodos analíticos deben validarse para demostrar su idoneidad. La validación consiste, por tanto, en confirmar y documentar que los resultados derivados de la aplicación de un método de análisis son confiables.

Para la validación de un método, deben considerarse parámetros como la linealidad, especificidad y selectividad, precisión, exactitud, sensibilidad y límites de detección y cuantificación, entre otros (European Commission, 2013; Vinagre, 2007; Quattrocchi, 1992). A continuación se describen estos parámetros.

Linealidad

La linealidad de un método analítico es su capacidad para obtener resultados que sean proporcionales, bien directamente o bien mediante una transformación matemática, a la concentración de analito en muestras en un intervalo determinado (Organización Panamericana de la Salud, 2002). El rango lineal, que también se

determina, es el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método es lineal.

Especificidad y selectividad

La especificidad básicamente se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes en la matriz de la muestra.

Según la Guía de procedimientos de validación para análisis de residuos de plaguicidas de la Comisión Europea (European Commission, 2013), la especificidad es la habilidad del detector (apoyada por la selectividad del proceso de extracción, clean-up, derivatización o separación, si fuese necesario) para dar señales que identifiquen de forma efectiva al analito, mientras que la selectividad es la habilidad de los procesos de extracción, clean-up, derivatización, sistema de separación y, especialmente del detector para discriminar entre el analito y otros compuestos. Por ejemplo, la cromatografía de gases con detector de captura electrónica (CG-ECD) es un sistema de determinación selectiva que no aporta especificidad.

Precisión

Se puede definir como el grado de coincidencia entre los resultados de distintos análisis sobre muestras individuales de una muestra homogénea. La precisión de un método ha de incluir todas las fuentes de variación en todas las etapas del procedimiento analítico.

La medida de precisión normalmente se expresa en términos de imprecisión, la medida de la precisión (o imprecisión) es la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Este parámetro se determina haciendo ensayos repetitivos de una misma muestra analítica o de cada conjunto de muestras analíticas, y luego se calcula la desviación estándar, siendo muy importante en este caso la homogeneidad del sustrato.

Se pueden considerar distintos niveles de precisión:

- Repetibilidad, que hace referencia al grado de coincidencia entre resultados de varios análisis realizados por un mismo analista, en un periodo corto de tiempo y empleando la misma instrumentación.
- Precisión intermedia, que es la coincidencia entre los resultados de análisis llevados a cabo en el mismo laboratorio, pero en días diferentes, con analistas diferentes.
- Reproducibilidad, que es la coincidencia entre los resultados realizados por distintos laboratorios, con diferentes analistas y equipos (como en los ejercicios de comparación interlaboratorio).

Exactitud

Es la cercanía o proximidad del valor analítico al valor verdadero. Es la concordancia entre la mejor estimación de una cantidad y su valor real. La inexactitud es la diferencia numérica entre

el valor promedio de un conjunto de repeticiones y el valor verdadero. La exactitud se puede calcular como el porcentaje de analito recuperado o por la diferencia entre el valor obtenido y el valor real, evaluado estadísticamente.

La exactitud o mejor dicho la inexactitud debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia, o sea, la recuperación debe acercarse al 100%. Según la Guía de procedimientos de validación para análisis de residuos de plaguicidas de la Comisión Europea (European Commission, 2013), en un método analítico cuantitativo se consideran recuperaciones medias aceptables las que está entre 70 y 120%, con una repetibilidad asociada RSDr (desviación estándar relativa) $\leq 20\%$.

Sensibilidad

Es la pendiente de la recta resultante de representar la respuesta frente a la concentración, o el cambio de respuesta por unidad de concentración. A mayor pendiente mayor sensibilidad del método y viceversa.

Límites de detección y cuantificación

El límite de detección es la menor cantidad de analito que puede ser detectada en una muestra, aunque no necesariamente cuantificada. Cuando hay ruido de fondo, como es el caso de la cromatografía, en los que los cromatogramas presentan una línea base, correspondiente al ruido de fondo, el cálculo de los límites de

detección puede realizarse con un valor con el cual la relación entre señal/ruido (S/R) es 2:1 ó 3:1. Esta última relación es la que suele emplearse en cromatografía.

El límite de cuantificación (LC o LOQ) es la menor cantidad de un analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente, con precisión y exactitud aceptables.

En la figura 16 se muestran algunos de los parámetros que acaban de definirse.

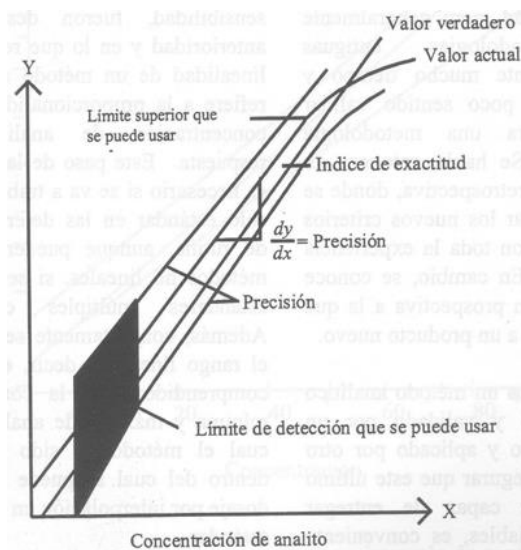


Figura 16. Respuesta en función de la concentración del analito. Atributos de los métodos

Fuente: Vinagre, J. (2007) <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ah833s/AH833S07.pdf>

El hecho de que un método en particular empleado sobre un alimento haya dado un buen cumplimiento con todos los atributos de calidad, indica que el método es adecuado para esa matriz. Esto no

significa que también sea adecuado cuando se aplique a un alimento diferente, sino que, por el contrario, se debe asumir la posición opuesta hasta comprobarlo. Por tanto, la validación de un método ha de hacerse en todas las matrices a las que se quiera aplicar, especialmente cuando se trata de alimentos de composición muy diferente, como sería el caso de la fruta fresca y de los aceites esenciales.

La validación de metodologías analíticas para la determinación de diversos plaguicidas en frutos cítricos y sus aceites esenciales, permiten garantizar la aplicación de una metodología adecuada para evaluar la probable correlación entre los niveles de los analitos hallados entre ambas matrices.

CAPITULO II
OBJETIVOS Y
PLAN DE TRABAJO

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.1. Objetivos

II.1.1. Objetivos generales

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue determinar los contenidos de distintos plaguicidas en fruta a la entrada de la línea de producción y en los aceites esenciales obtenidos a partir de las mismas, para evaluar la probable correlación entre los niveles de los analitos en los productos y materia prima de las cuales provienen. Para ello se estableció también como objetivo general, validar metodologías analíticas para la determinación de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol, por cromatografía de gases y líquida, en diferentes matrices cítricas, tales como frutas y aceite pulido y descerado.

El cumplimiento de estos objetivos contribuirá a la mejora de la calidad de los productos cítricos de la región Noreste Argentino (NEA), gracias a la transferencia de los resultados obtenidos, con el fin de dar respuesta a las demandas de los sectores involucrados. Mediante la validación de una metodología analítica de adecuada sensibilidad, pretende dotar al sector industrial de una herramienta adecuada para llevar a cabo controles de calidad que permitan garantizar la seguridad alimentaria en materia de residuos de plaguicidas, a la vez que establecer estrategias adecuadas de comercialización, teniendo en cuenta los Límites Máximos de Residuos establecidos en la legislación de los distintos mercados.

II.1.2. Objetivos Específicos

Los objetivos generales del presente trabajo se pueden desglosar en los siguientes objetivos específicos:

- Establecer y desarrollar el plan de muestreo: determinar los puntos de muestreo, frecuencia y tamaño de la muestra.

- Validar métodos analíticos para la determinación de residuos de clorpirifos y tiabendazol en frutas cítricas, mediante la aplicación cromatografía de gases y cromatografía líquida.

- Validar métodos analíticos para la determinación de residuos de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol en aceites esenciales extraídos de frutas cítricas, mediante la aplicación cromatografía de gases y cromatografía líquida.

- Evaluar los niveles de los residuos de dichos plaguicidas en las frutas y su incidencia en aceites esenciales.

- Determinar la probable correlación entre los niveles de los analitos en los productos y materia prima de la cual provienen.

II.2. Plan de trabajo

El plan de actividades propuestas y llevado a cabo para lograr los objetivos anteriormente mencionados se detalla a continuación:

- Identificación de los plaguicidas a determinar en función de la importancia e impacto que revisten por su aplicación en los productos obtenidos en la industria de la región del Noreste Argentino (NEA).

- Selección de las matrices a evaluar en función de las problemáticas que se manifiestan durante la comercialización en los mercados nacionales e internacionales.

- Diseño y ejecución del plan de muestreo para las diferentes matrices de acuerdo a los objetivos propuestos en la industria.

- Estudio de las condiciones óptimas de las técnicas cromatográficas acopladas a la espectrometría de masas para la determinación de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol por GC-MS; LC- MS/MS y GC- MS/MS.

- Validación de los métodos para la determinación de clorpirifos y tiabendazol en frutas, así como de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol aceites esenciales por GC-MS; LC- MS/MS y GC- MS/MS: determinación de la linealidad, precisión, recuperación o exactitud, límites de detección y cuantificación del método.

- Aplicación de las metodologías validadas para la determinación de los niveles de residuos en frutas y aceites esenciales, en condiciones controladas en la entrada y salida de la línea de producción, respectivamente.

- Evaluación de la correlación entre los niveles de residuos en fruta y los que presentan los aceites esenciales obtenidos a partir de la misma.

- Tratamiento de datos y discusión de resultados.

- Elaboración del informe final.

CAPITULO III
MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se llevó a cabo el desarrollo de métodos de análisis cromatográfico y validación de los mismos, para la determinación de clorpirifos y tiabendazol en muestras de naranja de la variedad Valencia, y de los aceites esenciales descerados obtenidos a partir de las mismas. Asimismo, se desarrollaron y validaron métodos de análisis de procloraz y carbendazim en estos mismos aceites esenciales.

Una vez validados los métodos de análisis, se realizaron determinaciones de clorpirifos y tiabendazol en muestras de naranjas y en los aceites esenciales descerados obtenidos. Se determinó la persistencia de dichos plaguicidas en los aceites, además de llevar a cabo un estudio de correlación entre los niveles de ambos plaguicidas presentes en la fruta y los niveles residuales en los aceites esenciales. Asimismo, se realizaron análisis de procloraz y carbendazim en estos mismos aceites esenciales. Para poder estudiar la persistencia en los aceites y la correlación entre niveles en fruta y en aceites, se tomaron datos de concentraciones de procloraz y carbendazim, que habían sido determinados en las materias primas con las que se elaboraban los aceites, por Martínez (2016) en un trabajo llevado a cabo en paralelo con el presente estudio.

A continuación se describen los reactivos, materiales y equipamiento empleado, así como las metodologías de muestreo, tratamiento de muestras, análisis y tratamiento de datos.

III.1. Reactivos y Equipamiento

Se detallan a continuación los reactivos y equipamiento utilizados en el desarrollo de la presente tesis:

III.1.1. Reactivos

- Acetato de etilo grado plaguicida (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acetonitrilo grado GC y HPLC (J.T.Backer)
- Estándares certificados de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol (Accu Standard Inc.)
- Agua grado 1 (agua calidad cromatográfica ultra pura).
- Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, sulfato de magnesio y sulfato de sodio calidad p.a. (Merck).
- Metanol calidad cromatográfica (Merck)
- Hexano calidad cromatográfica (Merck)
- Acetona calidad cromatográfica (Merck)
- Soluciones estándar stock de 1000 ppm en metanol de los diferentes analitos.
- PSA (cartuchos para extracción)

III.1.2. Equipamiento

- Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas tipo simple cuadrupolo (CG-MSD), marca Agilent Technologies, modelo GC 6850 y MSD 5973 Network. Columna ZB-5MS Guardian (5% polysilarylene-95% polydimetilsiloxano) de 30m x 0,25 mm (di) x 0,25 µm de

espesor de film, con precolumna de 5 m. Helio como gas portador.

- Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A con doble detector de espectrometría de masas, tipo triple cuadrupolo modelo 7000 con software QQQ Quantitative Analysis Mass Hunter. Columna ZB-5MS Guardian (5% polysilarylene-95% polydimetilsiloxano) de 30m x 0,25 mm (di) x 0,25 μ m de espesor de film, con precolumna de 5 m. Helio como gas portador.
- Cromatógrafo líquido con doble detector de masas triple cuadrupolo, marca Shimadzu, modelo Nexera con detector AB SCIEX triple cuadrupolo modelo 5500. Columna marca Phenomenex modelo Sinergi 4u Fusión RP-80 de 100 mm de longitud y 2 mm de diámetro interno, con relleno de fase reversa C18.
- Agitador magnético Mistral Large Magnestir II - Lab Line Mod 1170-1, con sistema aislante, para mantener la temperatura constante.
- Baño de ultrasonido NEY-Dental International con controles ajustables.
- Balanza analítica Ohaus
- Congelador Electrolux
- Centrífugas Gelec 130-D y Gelec G-142-D de 13.000 y 5.000 rpm.
- Procesadora semi-industrial Ultracomb.
- Miniprocetadora de uso doméstico Philip con refrigeración.

- “Vacuum Manifold” marca Alltech, bomba de vacío regulable, con capacidad para 16 columnas o cartuchos. Cartuchos de 6 y 25 mL, provistos de filtros de teflón de 0,45 m marca Alltech.
- Cámara de frío para conservación. Temperatura 5°C y 90% HRE.

III.2. Plan de muestreo

El muestreo constituye una etapa crítica en el desarrollo de un método analítico; ya que puede constituir una fuente de error importante. Su objetivo es obtener una muestra representativa de todos lotes sobre los cuales se pretende determinar el nivel de residuos de plaguicidas.

Para el diseño de los planes de muestreo de las diferentes matrices cítricas se consideraron las normas establecidas por la FAO/OMS, con el fin de garantizar la calidad y representatividad de las muestras, tanto para materia prima como productos obtenidos (http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/117409/mod_resource/content/1/Guia_para_muestreo_de_alimentos_FAO.pdf).

En el presente trabajo, las muestras de fruta fresca estudiadas fueron naranjas de la variedad Valencia. Asimismo, se evaluaron, muestras de aceites esenciales descerados obtenidos a partir de dichas frutas. Las muestras empleadas en este trabajo fueron facilitadas por la industria de jugos y aceites cítricos de la zona, ECA y Litoral Citrus S.A. (Concordia, Entre Ríos, Argentina), quienes disponen de un sistema de extracción del tipo FMC y, por lo tanto, el proceso de

obtención de aceites esenciales fue el descrito para dicha tecnología en el capítulo de Introducción.

La recolección y manejo de las muestras se efectuó en la propia industria con la colaboración de profesionales de la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Concordia, junto con las empresas locales de empaque de fruta fresca y de industria de extracción de jugo, citadas anteriormente.

El período de muestreo corresponde a tres temporadas consecutivas de producción comprendidas entre los años 2012 y 2014, durante un mes de producción, a intervalos de 1 semana, de forma que cada año se hacían 4 muestreos. Se seleccionó el mes de octubre ya que se corresponde con en el período de mayor volumen de producción de la variedad seleccionada.

Se diseñó un plan de muestreo para los lotes de fruta entera que llegan a la industria de aceites, así como para los aceites esenciales descerados obtenidos a partir de las mismas.

Se seleccionaron los puntos de muestreo inicial y final del proceso de obtención de aceite esencial descerado en la industria, que muestra la figura 17. Así, las muestras fueron identificadas de la siguiente manera:

- *Frutas de ingreso* (a la entrada de la línea)
- *Aceite esencial descerado* (a la salida de la centrífuga concentradora)

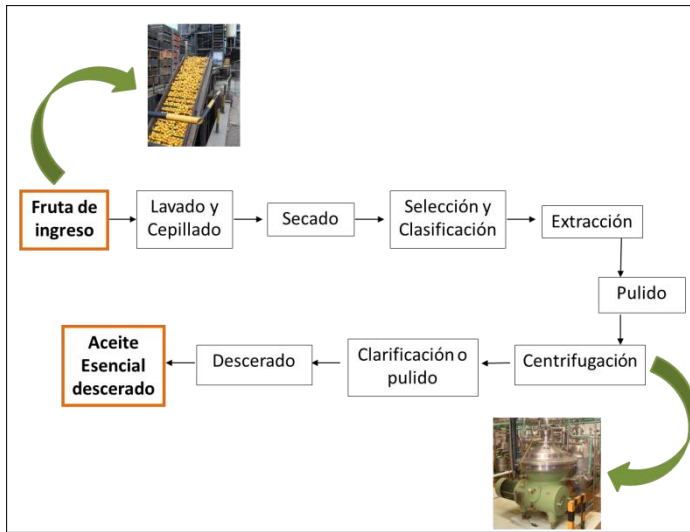


Figura 17. Diagrama del proceso de obtención de aceite esencial descerado

Dada la complejidad del proceso de extracción, los puntos de toma de muestra de las diferentes matrices cítricas determinan, para cada una de ellas, una modalidad de muestreo diferente a considerar:

Para *fruta de ingreso*, se tomaron muestras de frutas enteras a granel, procedentes de cada uno de los camiones que llegan a la industria, constituyendo los lotes a procesar los camiones que llegan en un turno laboral de 8 horas.

Se procedió con un plan de muestreo simple tomando un tamaño total de la muestra del 1% del total de frutas que llegó en cada camión, representado como n (figura 18 (a)). Para llevar a cabo la toma de muestra, se realizó un muestreo geométrico en cada uno de los camiones, para lo cual se tomaron $1/3$ de n frutas de la parte superior del contenedor, $1/3$ de la parte central y $1/3$ de la parte inferior, teniendo en cuenta las zonas extremas y centrales de cada uno de los planos considerados.

Una vez obtenidas las porciones del total del lote a muestrear, se procedió al cuarteo de la misma, hasta alcanzar una cantidad n' de frutas, que correspondía al 10% de n , como se observa en la figura 18 (b).

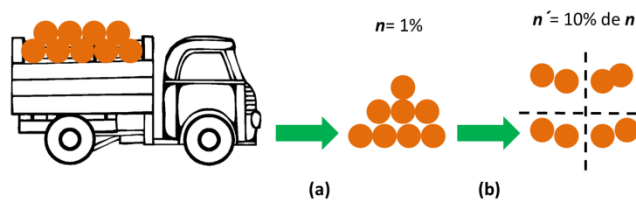


Figura 18. Esquema del plan de muestreo para frutas de ingreso

En la figura 19 se puede observar el momento de la toma de muestra de la fruta. El muestreo al ingreso de la fruta en la industria para cada uno de los diferentes camiones, previamente identificados, se puede resumir de la siguiente forma:

- 1% de 20 toneladas / camión = 0,2 toneladas/camión = 200 Kg/camión
- 200 Kg x 6 frutos/ Kg = 1200 frutos = n
- 10 % de 1200 frutos = 120 frutos totales = n' (constituye muestra representativa del lote)

Para cada día de muestreo, se obtuvieron 10 muestras representativas, habiéndose realizado un total de 12 días de muestreo durante el desarrollo total del plan de muestreo, se obtuvo un total de 120 muestras.



Figura 19. Recolección de muestras de frutas enteras

Para *aceites esenciales descerados* el plan de muestreo se realizó en la modalidad de producción-tiempo, ya que se tomaron directamente sobre la línea de producción a intervalos de tiempos iguales, correspondientes al tiempo de procesado de la fruta de cada camión volcado, este tiempo fué de aproximadamente 45 minutos. Para preparar cada una de las muestras, a la salida de la centrífuga concentradora se toma un volumen de 500 mL de emulsión rica en aceite. Las muestras así obtenidas se sometieron a un proceso de centrifugado en laboratorio de la misma industria, con un posterior tratamiento a temperaturas de -18°C para realizar el pulido y descerado de las mismas. Se tomaron 50 mL de cada una de las muestras así procesadas (figura 20). Se tomaron un total de 120 muestras.

Todas las muestras fueron perfectamente identificadas y rotuladas, declarando la fecha y hora de muestreo, variedad cítrica, n° de lote, punto de muestreo y responsable técnico del mismo. Para su conservación, hasta el momento de envío al laboratorio, las muestras

de frutas enteras fueron conservadas en bolsas plásticas, en cámaras de frío a una temperatura de 5°C y 90% HR, con circulación y recambio de aire. Los aceites fueron conservados en frascos de vidrio color caramelo con tapa y contratapa de teflón o aluminio a temperaturas de congelación.



Figura 20. Toma de muestra y acondicionamiento de muestras de aceites esenciales descerados

Los blancos de muestra para ambas matrices (fruta y aceite esencial) se obtuvieron y conservaron de igual manera, a partir de frutas libres de plaguicidas, provenientes de una producción orgánica perteneciente a la misma empresa.

III.3. Preparación de las muestras para el análisis en laboratorio

III.3.1. Submuestreo

El método de submuestreo adoptado para frutas enteras fue el de preparación de una muestra de laboratorio compuesta; es decir, que las unidades individuales correspondientes a cada uno de los lotes muestreados se combinaron para formar una mezcla homogénea. Para ello, las frutas enteras fueron cortadas en pequeños trozos y homogeneizadas en procesadora industrial de acero inoxidable. Se conservaron en congelación y luego se procedió a tomar porciones de la muestra compuesta para la reconstitución y homogenización previa al análisis de laboratorio. Esta última homogenización se realizó en miniprosesadora de uso doméstico con refrigeración (figura 26).



Figura 21. Preparación de muestras de frutas enteras
(a) Homogeneizado (b) Envasado (c) Rotulado

Para las muestras de aceites esenciales descerados no se realizaron tratamientos previos de las muestras, ya que las mismas fueron enviadas al laboratorio para su análisis en las condiciones en que fueron tomadas en la industria.

Todas las muestras fueron preparadas y conservadas en el Laboratorio del Área de Química de la Facultad de Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Entre Ríos y luego son remitidas al Laboratorio de Análisis de Plaguicidas de la Sección Química de la Estación Experimental Agroindustrial “Obispo Colombes” (EEAOC), en la ciudad de San Miguel de Tucumán. En un trabajo compartido con personal de dicho laboratorio se procedió a la optimización de los métodos de extracción de los residuos de plaguicidas objeto de estudio (tiabendazol, clorpirifos, carbendazim y procloraz) y métodos de análisis de los mismos.

III.3.2. Procedimiento de extracción de plaguicidas en fruta entera

Las metodologías de extracción adoptadas para el procedimiento de preparación previa de las muestras fueron *extracción con disolvente*, y método QuEChERS o *extracción en fase sólida dispersiva*.

Para clorpirifos, se pesaron 10 g de la muestra homogeneizada, se agregaron alícuotas de solución de NaOH hasta alcanzar un pH final comprendido entre 8 y 9. Se adicionaron 10 mL de acetato de etilo grado plaguicida, luego se agitó 1 min y posteriormente se adicionaron una mezcla de sulfato de magnesio y acetato de sodio. Se agitó vigorosamente durante 1 min para lograr la homogeneización total de los reactivos y la muestra. Se centrifugó durante 5 min a 4500 r.p.m. y posteriormente, se recogió el sobrenadante para su posterior análisis.

Para la extracción de tiabendazol en esta matriz, se utilizó la variante del método QuEChERS con buffer acetato, considerado método oficial (AOAC 2007). Se pesaron 10 g de muestra en los cuales se extrajeron los analitos con una mezcla de ácido acético al 1% v/v en acetonitrilo. Posteriormente se adicionaron sulfato de magnesio para favorecer la separación de fases entre el contenido de agua de la muestra y la capa de acetonitrilo, y acetato de sodio para regular el pH. Se agitó intensamente durante 1 min la dispersión y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 4000 r.p.m. Para la limpieza del extracto orgánico se empleó una amina primaria y secundaria (PSA) y C18. El eluato así obtenido se utilizó para su posterior análisis.

III.3.3. Procedimiento de extracción de plaguicidas en aceites esenciales

El procedimiento de extracción para todos los analitos se unificó de la siguiente manera: se pesaron 5 g de muestra a la que se adicionaron 10 mL agua y 15 mL de acetonitrilo, luego se agitó 1 min y posteriormente se agregaron sulfato de magnesio y cloruro de sodio. Se agitó vigorosamente durante 1 min para la homogenización total de los reactivos y la muestra. A continuación se centrifugó durante 5 min a 5000 r.p.m. Se realizó la limpieza de 1 mL del extracto por adición de sulfato de magnesio, carbono grafitado, PSA y C₁₈, agitando durante 2 min en forma manual. Finalmente se centrifugó durante 5 min a 5000 r.p.m. y se tomó el sobrenadante para su posterior análisis.

III.3.4. Preparación de estándares

Se prepararon disoluciones patrones en acetonitrilo por triplicado para los diferentes analitos, teniéndose en cuenta la concentración esperada de éstos en las muestras. Las concentraciones a las que se prepararon los patrones para fruta entera fueron las siguientes:

- Clorpirifos: 0,025; 0,030; 0,035; 0,040; 0,045 y 0,050 mg/L
- Tiabendazol: 0,005; 0,006; 0,007; 0,008; 0,009 y 0,010 mg/L

Para aceites se prepararon en las siguientes concentraciones:

- Clorpirifos: 0,025; 0,030; 0,035; 0,040 y 0,050 mg/L
- Tiabendazol y carbendazim: 0,005; 0,006; 0,007; 0,008; 0,009 y 0,010 mg/L
- Procloraz: 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 y 0,10 mg/L

III.3.5. Preparación de muestras adicionadas

A partir de las muestras de frutas enteras y aceites esenciales, cuya trazabilidad y control analítico permitía considerarlos como blancos de muestra, se prepararon las muestras adicionadas por triplicado a diferentes concentraciones de clorpirifos y tiabendazol.

Se llamó *fruta pre-adicionada*, a las muestras en las cuales la adición de los analitos fue previa al proceso de extracción aplicado. Las concentraciones correspondientes fueron:

- Clorpirifos: 0,040; 0,045; 0,050; 0,075; 0,090 y 0,100 mg/Kg.
- Tiabendazol: 0,007; 0,008; 0,009; 0,010; 0,020 y 0,050 mg/Kg.

Las muestras de *fruta post-adicionada* corresponden a aquellas en las que, la adición de los analitos se efectuó al extracto obtenido al final del proceso extractivo, siendo las mismas de:

- Clorpirifos: 0,025; 0,030; 0,035; 0,040; 0,045 y 0,050 mg/Kg.
- Tiabendazol: 0,005; 0,006; 0,007; 0,008; 0,009 y 0,010 mg/Kg.

Las *muestras adicionadas de aceites esenciales* fueron adicionadas previamente al proceso de extracción, a las siguientes concentraciones:

- Clorpirifos: 0,035; 0,040; 0,050; 0,075 y 0,100 mg/Kg.
- Carbendazim, procloraz y tiabendazol: 0,007; 0,008; 0,009; 0,010; 0,020 y 0,050 mg/Kg.

III.4. Condiciones cromatográficas para la identificación de los plaguicidas

A fin de establecer una metodología adecuada para el análisis cromatográfico, se llevaron a cabo numerosas pruebas con el objeto de lograr las condiciones óptimas de análisis.

Las modificaciones en las distintas pruebas realizadas se basaron fundamentalmente en las temperaturas del inyector y rampas de temperaturas del horno, en cromatografía de gases, y en el flujo, composición y gradiente de fase móvil en HPLC, a fin de lograr la mejor separación de los analitos y adecuadas respuestas del detector.

Establecidas las condiciones cromatográficas, el desarrollo metodológico implicó la determinación de la curva de regresión lineal, intervalos de confianza, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación.

III.4.1. Determinación de clorpirifos en fruta por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas tipo simple cuadrupolo (CG-MS)

Teniendo en cuenta las características propias de las técnicas combinadas de GC-MS y las características fisicoquímicas de los compuestos en estudio, se seleccionó esta técnica para la separación y cuantificación de clorpirifos en la matriz fruta entera.

Las condiciones cromatográficas que se establecieron para la determinación de clorpirifos fueron las siguientes: temperatura del inyector 280°C en modo splitless, volumen de inyección 1,00 µL, gas portador He a 1,0 mL/min. El programa de temperaturas del horno de la columna fue el siguiente:

- T₁ = 70°C t₁ = 2 min R₁ = 25°C/min
- T₂ = 150°C t₂ = 0 min R₂ = 3°C/min
- T₃ = 200°C t₃ = 0 min R₃ = 8°C/min
- T₄ = 280°C t₄ = 10 min

III.4.2. Determinación de clorpirifos en aceites esenciales por cromatografía de gases con doble detector de masas/masas tipo triple cuadrupolo (GC-MS/MS)

Se seleccionó esta técnica para la separación y cuantificación de clorpirifos en las muestras de aceites esenciales. Para ello se establecieron las siguientes condiciones: temperatura del inyector 280°C, en modo splitless, volumen de inyección 1,00 µL, gas portador He 1,0 mL/min. El programa de temperaturas del horno fue el siguiente:

- $T_1 = 60^\circ\text{C}$ $t_1 = 1,05 \text{ min}$ $R_1 = 40^\circ\text{C/min}$
- $T_2 = 150^\circ\text{C}$ $t_2 = 0 \text{ min}$ $R_2 = 3^\circ\text{C/min}$
- $T_3 = 200^\circ\text{C}$ $t_3 = 0 \text{ min}$ $R_3 = 7^\circ\text{C/min}$
- $T_4 = 280^\circ\text{C}$ $t_4 = 10 \text{ min}$

III.4.3. Determinación de procloraz, carbendazim y tiabendazol por cromatografía líquida con doble detector de masas/masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS)

Se seleccionó esta técnica para la separación y cuantificación de procloraz, carbendazim y tiabendazol en las muestras de aceites esenciales, y tiabendazol en fruta entera. Para ello se establecieron las siguientes condiciones: Temperatura de columna = 40°C , composición de la fase móvil A: agua/metanol (90:10) + 5mM formiato de amonio y composición de la fase móvil B: metanol/agua (90:10) + 5mM formiato de amonio. Flujo de la fase móvil: 0,4 mL/min. La tabla 5 muestra el gradiente de elución empleado.

Tabla 5. Gradiente de elución

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0.01	100	0
1.00	100	0
15.00	0	100
18.00	0	100
18.05	100	0
20.00	100	0
20.01	Stop	

III.5. Análisis estadísticos de los resultados

Los datos obtenidos de los análisis cromatográficos para las diferentes matrices fueron sometidos a un tratamiento estadístico mediante el software Statgraphics Centurión XV, versión 15.2.06. Se llevó a cabo un análisis unidimensional de los datos, se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación relativo, la linealidad, intervalo de confianza, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación del método, independencia y normalidad de los residuos.

Para evaluar la linealidad se prepararon disoluciones patrón para calibración a 6 niveles de concentración por triplicado, como se ha detallado anteriormente. Estas disoluciones fueron analizadas por GC/MS, GC/MS/MS y por LC/MS/MS, haciendo 7 inyecciones de cada una de las disoluciones preparadas. Los intervalos de concentración empleados se basaron en las concentraciones estimadas en muestras reales, teniendo en cuenta la bibliografía consultada. De los cromatogramas obtenidos para cada uno de los estándares de las diferentes concentraciones, se sacaron las áreas correspondientes.

Se llevó a cabo un análisis de regresión lineal y se determinó la independencia y normalidad de los residuos, a partir de los estadísticos de Durbin Watson y Kolmogorov, para un nivel de confianza del 95%. Se estableció la ecuación de la recta y el estadístico R^2 que indica la relación entre las variables.

Del análisis de los factores de respuestas obtenidos para cada uno de los puntos de la gráfica de calibración, se calculó la desviación estándar relativa (RSD) de los mismos para cada nivel de

concentración. El criterio de aceptación adoptado para el valor de la RSD es que éste debe ser inferior o igual al 20% (European Commission, 2013). Además, se obtuvo la ecuación de la recta de calibración para cada analito y los coeficientes de correlación y determinación, R y R^2 respectivamente, adoptando como criterio de aceptación que R sea mayor o igual que el valor 0,995 y R^2 sea mayor o igual que 0,990. Para evaluar el valor residual individual se realiza un cálculo de la diferencia que existe entre el residuo y el predicho para cada uno de los datos obtenidos para cada nivel de concentración, adoptando como criterio de aceptación en linealidad un valor de $\pm 20\%$ (European Commission, 2013).

De igual modo se procedió con muestras de fruta entera y aceites esenciales adicionadas.

Los procesos adoptados para determinar precisión y límites de detección y cuantificación, se resumen a continuación:

Para el cálculo de la *precisión* se emplearon disoluciones patrón y disoluciones de muestras adicionadas. Todas las repeticiones de los análisis fueron realizadas por un solo analista, el mismo día y en idénticas condiciones cromatográficas. La precisión se evaluó con el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD), obtenido a partir de la desviación estándar (σ), estimada analíticamente por s .

El estimador s de la desviación estándar se calcula como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde n es el número de medidas, x_i es el valor medido en el ensayo i , y \bar{x} el estimador de la media poblacional μ , calculado como:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$\text{RSD} = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

Ambos estimadores, desviación estándar y desviación estándar relativa, permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida, es decir, el error aleatorio correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media. Para el estudio de la precisión del sistema se evaluó la dispersión de 7 inyecciones de una de las disoluciones patrón y de un nivel de concentración en muestras adicionadas, realizándose por triplicado. Se obtuvieron también los valores del sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada para evaluar si los datos provienen de una distribución normal. Los valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indicarían desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar.

Los *límites de detección y de cuantificación*, se estimaron a partir de la curva de regresión, para bajas concentraciones de los analitos, para $n=21$ determinaciones individuales y $\alpha=0,05$. De dicha curva se determinó la pendiente y por extrapolación a concentración cero, se obtuvo un estimado de la respuesta del blanco (Y_{bl}). A partir de la desviación estándar a cada concentración, se determinó la recta

correspondiente y por extrapolación se estimó la desviación estándar del blanco (S_{bl}).

Para evaluar los límites de detección se usaron los datos obtenidos de las curvas de calibración. Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las ecuaciones que se detallan a continuación y en las que se considera 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco respectivamente, para n determinaciones individuales.

$$\text{Límite de detección} \quad \frac{y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} \quad \frac{y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} * \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Donde:

Y_{bl} : señal del blanco

S_{bl} : desviación estándar del blanco

b : pendiente de la curva de regresión lineal

n : número de veces que se repite la medida

Para determinar la *exactitud* se trabajó con muestras adicionadas a diferentes niveles de concentración y se calcularon los porcentajes de recuperación y sus desviaciones estándar relativas. La exactitud se determinó para el promedio de recuperaciones de todas las concentraciones, adoptando como criterios de aceptación los siguientes parámetros: recuperaciones del 70 a 120% y desviaciones estándares relativas menores que 20% (European Commission, 2013).

Con los datos obtenidos en la determinación de clorpirifos y tiabendazol en las muestras de naranja se llevó a cabo un ANOVA

simple, para determinar si había diferencias significativas entre los 4 lotes evaluados cada año, tomando como variables los niveles de plaguicidas y como factor el lote para cada año. Se llevó a cabo otro ANOVA simple para determinar si había diferencias entre los 3 años evaluados, siendo las variables los niveles de plaguicidas y el factor el año. Estos mismos análisis se realizaron con los niveles de clorpirifos, tiabendazol, procloraz y carbendazim en las muestras de aceites esenciales. Se utilizó el procedimiento LSD (least significant difference) para comprobar las diferencias a un nivel de significación del 5%.

III.6. Estudio de la correlación de los niveles residuales de plaguicidas entre fruta cítrica entera y aceites esenciales.

Se llevó a cabo un estudio de la correlación de los datos obtenidos en los diferentes ensayos experimentales en la determinación de niveles residuales de plaguicidas en muestras reales de frutas cítricas enteras que llegan a la industria y los aceites esenciales obtenidos a partir de ellas. Dado que en este trabajo las concentraciones de procloraz y carbendazim solamente se habían determinado en aceites esenciales, se tomaron los datos de concentraciones de la materia prima de un trabajo que había sido llevado a cabo en paralelo a este estudio (Martínez, 2016), tal y como se ha comentado anteriormente.

La correlación estadística determina la relación o dependencia que existe entre las dos variables que intervienen en una distribución bidimensional. Es decir, determinan si los cambios en una

de las variables influyen en los cambios de la otra. En caso de que esto suceda, se puede decir que las variables están correlacionadas o que hay correlación entre ellas.

Para el estudio de la correlación estadística de los resultados, se establecieron dos series simples para cada lote muestreado, cada una de las series corresponde a los niveles residuales de plaguicidas hallados en la fruta que ingresa a la industria y en aceites descerados, respectivamente. Después de establecer las series, se estudió si existía alguna correlación entre los pares de variables de igual índice para cada lote, como puede observarse en la tabla 6.

Tabla 6. Serie de pares de las variables en cada lote

Nivel residual en muestras de fruta entera para el lote N, (R_{fN})	R_{f1}	R_{f2}	R_{f3}	R_{fN}
Nivel residual en muestras de aceites descerados para el lote N, (R_{aN})	R_{a1}	R_{a2}	R_{a3}	R_{aN}

Cada una de las series fue sometida a un tratamiento estadístico en donde se determinaron las correlaciones de momento producto de Pearson, entre cada par de variables y la significación estadística de las correlaciones estimadas.

El cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (r) se basa en la relación que existe entre la distribución de los datos y se calcula mediante la siguiente expresión:

$$r = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}}$$

Donde:

x : variable de población x

y : variable de población y

n : número de mediciones

El coeficiente de correlación de Pearson, pensado para variables cuantitativas, es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente. Esto significa que puede haber variables fuertemente relacionadas, pero no de forma lineal; en estos últimos casos no se puede proceder a aplicar la correlación de Pearson.

El coeficiente de correlación de Pearson es un índice y sus valores absolutos oscilan entre 0 y 1. Esto es, si tenemos dos variables X e Y , y definimos el coeficiente de correlación de Pearson entre estas dos variables como r_{xy} entonces:

$$0 \leq r_{xy} \leq 1$$

El coeficiente se ha definido en términos de "valores absolutos" ya que en realidad si se contempla el signo el coeficiente de correlación de Pearson, éste oscila entre -1 y $+1$. Para cada caso indica una fuerte relación, en el caso de $+1$ la relación es perfecta positiva y en el caso de -1 es perfecta negativa, consecuentemente será menor cuanto más cerca de cero sea su valor absoluto.

La significación estadística de las correlaciones estimadas se halló mediante el P-valor. Un P-valor menor a 0,05 indica que existen correlaciones significativas, con un nivel de confianza del 95,0%.

CAPITULO IV
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Desarrollo y validación de los métodos de determinación de clorpirifos en fruta entera por Cromatografía de Gases con detector de Espectrometría de masas tipo simple cuadrupolo (CG-MS).

Una vez llevados a cabo los análisis cromatográficos con las condiciones establecidas se identificó el analito.

- Clorpirifos: monitorea desde los 18 min, los iones de m/z 197, 199, 258, 288, 314. Se cuantificó con el ión de m/z 314, que presentó un tiempo de retención (t_r) de 20,50 minutos (figura 22).

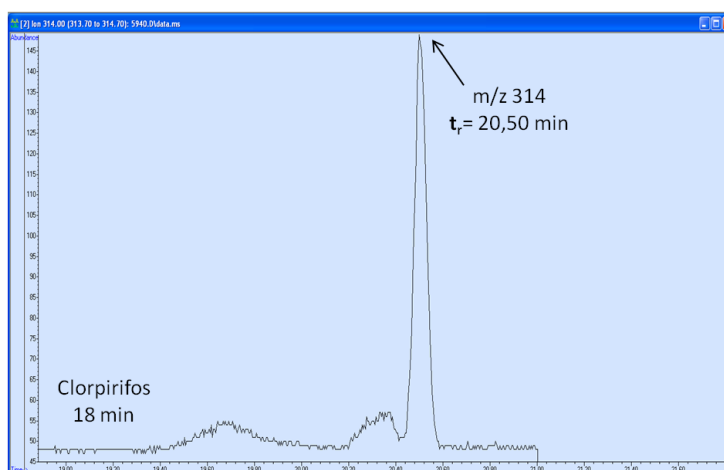


Figura 22. Cromatograma de clorpirifos obtenido por GC-MS

IV.1.1. Clorpirifos

IV.1.1.1. Análisis unidimensional.

Los resultados del análisis unidimensional para las disoluciones patrón y de muestras de frutas pre y post-adicionadas de clorpirifos a 6 niveles de concentración, que se realizaron por triplicado, con un total de 7 réplicas (7 pinchazos de una misma disolución), se detallan en las tablas 7, 8 y 9, respectivamente.

Tabla 7. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones patrón de clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)

Patrón (mg/Kg)	0,025	0,030	0,035	0,040	0,045	0,050
Área Media	409	766	1124	1485	1844	2203
Desviación típica	1,41	3,26	3,56	3,74	3,74	1,41
Mínimo	407	760	1121	1480	1840	2201
Máximo	411	769	1129	1489	1849	2205
Rango	4	9	8	9	9	4
Coef. de variación	0,34%	0,43%	0,32%	0,25%	0,20%	0,06%

Tabla 8. Análisis estadístico unidimensional. Fruta pre-adicionada con clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)

Adiciones (mg/Kg)	0,040	0,045	0,050	0,075	0,090	0,100
Área Media	2085	2343	3054	4738	6094	6718
Desviación típica	8,56	5,32	9,71	7,33	8,84	11,46
Mínimo	2075	2335	3038	4728	6078	6700
Máximo	2097	2350	3061	4746	6101	6730
Rango	22	15	23	18	23	30
Coef. de variación	0,41%	0,23%	0,32%	0,15%	0,14%	0,17%

Tabla 9. Análisis estadístico unidimensional. Fruta post-adicionada con clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)

Adiciones (mg/Kg)	0,025	0,030	0,035	0,040	0,045	0,050
Área Media	521	1017	1540	2014	2610	3154
Desviación típica	38,13	10,70	17,28	7,09	3,33	9,71
Mínimo	490	1005	1510	2005	2605	3138
Máximo	595	1035	1555	2025	2615	3161
Rango	105	30	45	20	10	23
Coef. de variación	7,32%	1,05%	1,12%	0,35%	0,13%	0,31%

El análisis unidimensional de los datos indicó para todas las concentraciones de los analitos en todas las muestras una distribución normal. Como era de esperar el área aumentó al aumentar la concentración de clorpirifos en los 3 casos (patrones y muestras adicionadas).

Se puede observar que el coeficiente de variación fue mayor a medida que disminuía la concentración, tanto en los patrones, como en las muestras pre- y post adicionadas (tablas 7 a 9), lo que indica una mayor variabilidad en los resultados del análisis a bajas concentraciones.

IV.1.1.2. Linealidad

En la figura 23 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en disoluciones patrón de clorpirifos.

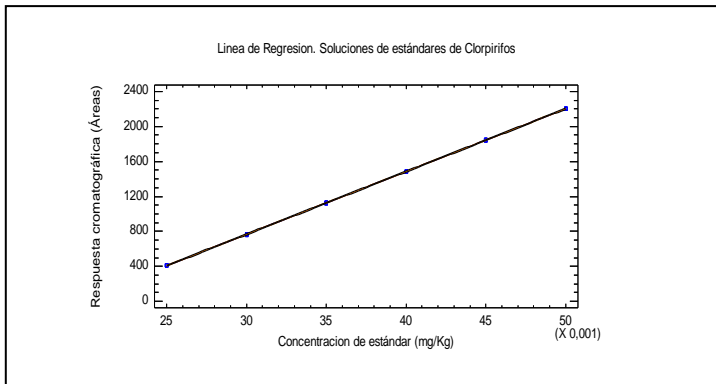


Figura 23. Regresión lineal con disoluciones patrón de clorpirifos

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la siguiente:

$$y = -1386,87 + 71791,4 * \text{concentración disoluciones patrón (mg/Kg)}$$

(ec. 1)

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9978% de la variabilidad de la respuesta cromatográfica expresada en área de picos. El coeficiente de correlación fue de 0,999989, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que fue de 2,95777.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno, se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos, habiéndose hallado

un valor mínimo de $-0,89\%$ y un máximo de $0,76\%$, siendo el criterio de aceptación establecido de $\pm 20\%$ (European Commission, 2013).

En la figura 24 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de frutas pre-adicionadas con clorpirifos.

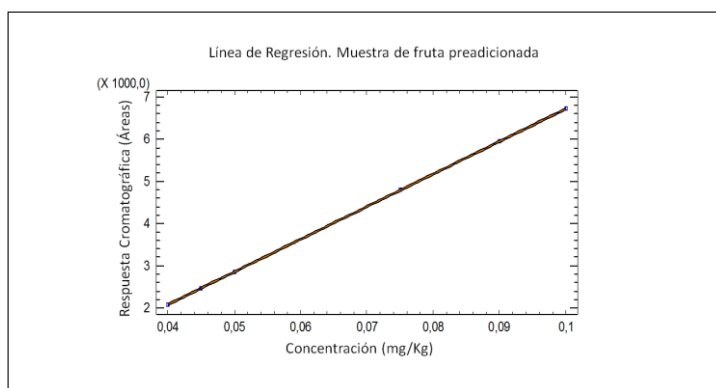


Figura 24. Regresión lineal en muestras de fruta entera pre-adicionada con clorpirifos

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la siguiente:

$$y = -1015,68 + 77392,7 * \text{concentración muestra de fruta pre-adicionada (mg/Kg)} \quad (\text{ec. 2})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9987% de la variabilidad en área de picos. El coeficiente de correlación fue de 0,999994, indicando una relación fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos fue de 7,85274.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes, el porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno, al igual que para las disoluciones patrón, se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos para estos valores, habiéndose hallado un valor mínimo de $-0,59\%$ y un máximo de $0,66\%$.

Finalmente, en la figura 25 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de frutas post-adicionadas con clorpirifos.

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la siguiente:

$$y = -2109,29 + 105234 * \text{concentración muestra de fruta post-adicionada (mg/Kg)} \quad (\text{ec. 3})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un $99,9998\%$ de la variabilidad del área de los picos. El coeficiente de correlación fue igual a $0,999999$, indicando una relación fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que fue de $1,69453$.

Al igual que en los dos casos anteriores, para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de

aceptación establecidos, habiendo hallado un valor mínimo de $-3,25\%$ y un máximo de $2,06\%$.

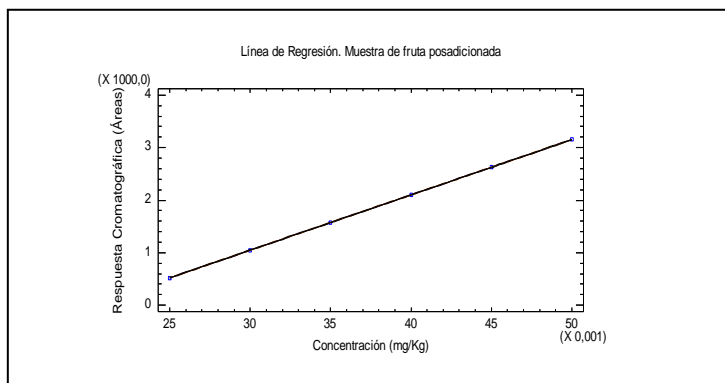


Figura 25. Regresión lineal en muestras de fruta entera post-adicionada con clorpirifos.

En los tres casos (patrones, muestras pre- y post-adicionadas) los estadísticos Durbin Watson y Kolmogorov permitieron establecer la independencia de los residuos y una distribución normal de los mismos para un nivel de confianza del 95%.

De los resultados obtenidos para los 3 casos, se puede concluir que el método de determinación de clorpirifos en muestras de naranja es lineal.

Comparación de líneas de regresión

Con el fin de evaluar si el efecto matriz era significativo para la adopción de la curva de calibración, se procedió a realizar el estudio comparativo entre las curvas de regresión lineal obtenidas para disoluciones patrón y para muestras de frutas adicionadas.

Las figuras 26 y 27 muestran la comparación de las curvas de regresión obtenidas para las disoluciones patrón con las obtenidas para las muestras de frutas pre-adicionadas (figura 26) y post- adicionadas (figura 27).

Las ecuaciones 1 y 2 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 26.

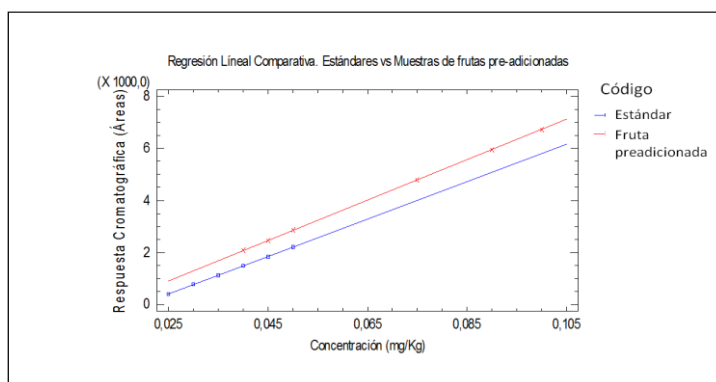


Figura 26. Rectas de regresión de clorpirifos de las disoluciones patrón y de las muestras de fruta pre-adicionadas.

El estadístico R-cuadrado se utilizó para comparar los modelos ajustados en el cálculo de regresión de las disoluciones patrón y muestras de fruta pre-adicionada, en los que han resultado con diferente número de coeficientes. El valor de este estadístico explica el 99,9994% de la variabilidad en área de picos. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes fue 99,9992%. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 5,61244.

El P-valor en el test ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

El hecho de que el P-valor para las pendientes y para los interceptos fuera inferior a 0,01, estaría indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de disoluciones patrón y muestras de frutas pre-adicionadas, con un nivel de confianza del 99%.

Las ecuaciones 1 y 3 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 27.

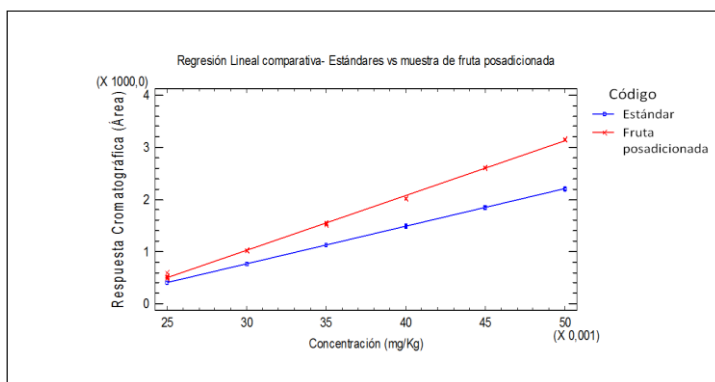


Figura 27. Rectas de regresión de clorpirifos de las disoluciones patrón y de las muestras de frutas post adicionadas.

El estadístico R-cuadrado se utilizó para comparar los modelos ajustados en el cálculo de regresión de las disoluciones patrón y muestras de fruta post-adicionada, en los que han resultado con diferente número de coeficientes. El valor de este estadístico explica el 99,9129% de la variabilidad del área. El estadístico R-

cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes fue 99,9091%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos fue 24,5906.

Al igual que en muestras de fruta pre-adicionada, en este caso el P-valor en el test ANOVA fue inferior a 0,05, demostrando que hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el P-valor para las pendientes y para los interceptos fue inferior a 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos, para los distintos valores de disoluciones patrón y muestras de frutas post-adicionadas con un nivel de confianza del 99%.

Por todo ello, se puede concluir que el efecto matriz es significativo, lo que implica que, en la determinación de clorpirifos en muestras reales de frutas, es necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas para establecer la curva de linealidad correspondiente. De esta forma se obtendrían rectas de calibrado adecuadas para la cuantificación del analito en las muestras.

IV.1.1.3. Precisión y exactitud

La precisión se determinó para disoluciones patrón, muestras de fruta pre-adicionadas y post-adicionadas.

La exactitud, calculada en términos de recuperación, se determinó en muestras pre-adicionadas y post-adicionadas, calculando

la media de las recuperaciones obtenidas a las distintas concentraciones ensayadas en ambos tipos de muestra.

Las recuperaciones obtenidas para las muestras pre-adicionadas con clorpirifos a 0,040; 0,045; 0,050; 0,075; 0,090 y 0,100 mg/kg, fueron de 112%, 112%, 113%, 114%, 116% y 116%; respectivamente. En el caso de muestras post-adicionadas a 0,025; 0,030; 0,035; 0,040; 0,045 y 0,050 mg/Kg, los valores de recuperación obtenidos fueron de 113%, 113%, 114%, 115%, 116% y 117%, respectivamente. El valor medio de recuperación, considerando los datos obtenidos en muestras pre- y post-adicionadas, fue del 114%, que está dentro del rango de 70-120%, considerado como una recuperación media aceptable por la Comisión Europea (European Commission, 2013). Estos resultados demuestran que el método de determinación de clorpirifos desarrollado en el presente trabajo es exacto.

En la tabla 10 se muestran los valores de los distintos parámetros que se calcularon para determinar la precisión.

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal (en el rango de ± 2). El coeficiente de variación resultó en todos los casos ser menor del 20%, lo que indica que el método de determinación de clorpirifos desarrollado en este estudio es preciso (European Commission, 2013).

Table 10. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de clorpirifos en fruta (n=21, $\alpha=0,05$)

	Disolución patrón de clorpirifos 0,03 mg/Kg	Muestra de fruta pre- adicionada 0,10 mg/Kg	Muestra de fruta post- adicionada 0,05 mg/Kg
Área Media	766	6718	3154
Coefficiente de variación	0,43%	0,17%	0,31%
Sesgo Estandarizado	-1,09563	-0,526966	1,13383
Curtosis Estandarizada	-0,106291	-0,452676	0,464889

IV.1.1.4. Límites de detección y cuantificación

A partir de las curvas de regresión para frutas adicionadas a bajas concentraciones, se determinaron los límites de detección y cuantificación, tal como ha sido descrito en el capítulo de Material y Métodos. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para clorpirifos fueron de 0,025 y 0,050 mg/Kg respectivamente. Teniendo en cuenta que los LMR establecidos en la legislación son del orden de 0,3 mg/Kg para naranjas en la Unión Europea (European Commission, 2015) y en Argentina (SENASA, 2015), se podría concluir que ambos límites son adecuados, por ser considerablemente menores a LMR.

Del análisis estadístico de los resultados antes detallados, podemos concluir que el método es adecuado para determinar el nivel de residuos de clorpirifos en naranjas que llegan a la línea de producción de forma confiable.

IV.2. Desarrollo y validación del método de determinación de clorpirifos en aceites esenciales de naranja por Cromatografía de Gases con doble detector de Espectrometría de masas tipo triple cuadrupolo (CG-MS/MS).

Establecidas las condiciones cromatográficas el clorpirifos se identificó con las características, según se detalla en tabla 11.

Tabla 11. Características de identificación para clorpirifos por GC-MS/MS

Compuesto	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Tiempo (min)	Energía de Colisión (V)
Clorpirifos	313,9	257,9	18,60	14
	313,9	165,9		43

IV.2.1. Clorpirifos

IV.2.1.1. Análisis unidimensional.

Los resultados del análisis unidimensional para las disoluciones patrón y de muestras de aceites adicionadas con clorpirifos a 5 niveles de concentración, realizadas por triplicado y con un total de 7 réplicas (7 pinchazos de una misma disolución), se detallan en las tablas 12 y 13, respectivamente.

El análisis unidimensional de los datos indicó para todas las concentraciones de las muestras una distribución normal.

Si se comparan los coeficientes de variación en las disoluciones patrón obtenidas mediante esta metodología, con los obtenidos mediante CG con detector de espectrometría de masas tipo simple cuadrupolo (CG-MS) (tabla 7), se puede observar, en general,

menores coeficientes de variación en el caso de CG-MS, que indicarían una menor variabilidad de las medidas.

Tabla 12. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones de patrón de clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)

Patrón (mg/Kg)	0,025	0,030	0,035	0,040	0,050
Área Media	5588	13532	24651	55724	108416
Desviación típica	4,95	408,25	404,91	258,19	258,19
Mínimo	5579	12866	23977	55391	108250
Máximo	5592	13866	24977	55891	108750
Rango	13	1000	1000	500	500
Coef. de variación	0,22%	3,02%	1,64%	0,46%	0,23%

Tabla 13. Análisis estadístico unidimensional. Muestras de aceite adicionadas con clorpirifos (n=21 y $\alpha=0,05$)

Adiciones (mg/Kg)	0,035	0,040	0,050	0,075	0,100
Área Media	28179	70424	140453	210649	281822
Desviación típica	63,49	34,58	64,82	34,81	18,70
Mínimo	28091	70395	140400	210602	281800
Máximo	28244	70482	140571	210682	281850
Rango	153	87	171	80	50
Coef. de variación	0,22%	0,05%	0,05%	0,02%	0,01%

IV.2.1.2. Linealidad

En la figura 28 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en disoluciones de patrón de clorpirifos.

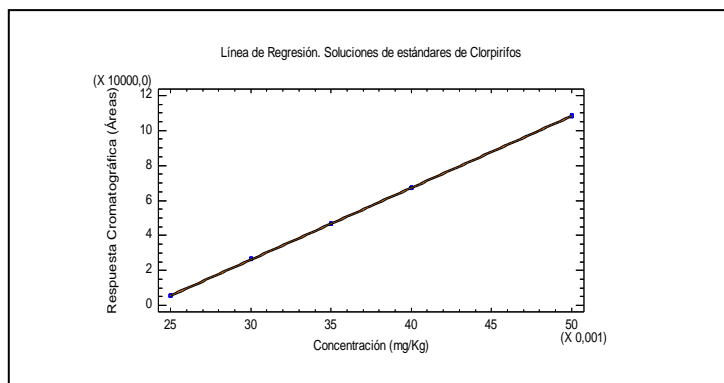


Figura 28. Regresión lineal con disoluciones patrón de clorpirifos

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la siguiente:

$$y = -96979,5 + 4,10502E6 * \text{concentración de disolución patrón} \\ (\text{mg/Kg}) \quad (\text{ec. 4})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9956% de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación fue 0,999978, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que es 242,999.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos, fue de un valor mínimo de -8,65 % y un máximo de 3,82%.

En la figura 29 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de aceite adicionadas con clorpirifos.

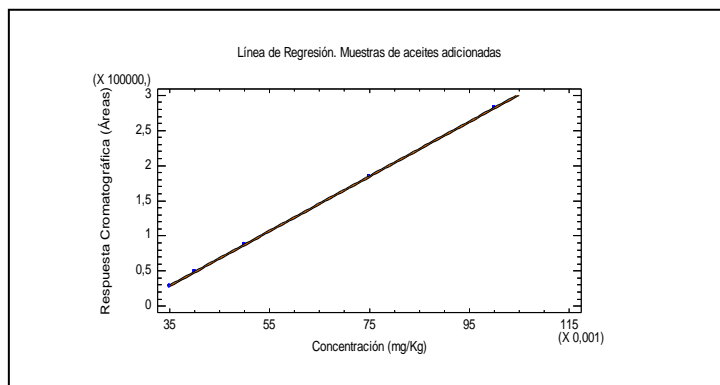


Figura 29. Regresión lineal en muestras de aceite esencial adicionadas con clorpirifos

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la siguiente:

$$y = -107056 + 3,88761E6 * \text{concentración muestra de aceite adicionada (mg/Kg)} \quad (\text{ec. 5})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9961% de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación fue 0,999981, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que fue 609,347.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo

ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos (valor mínimo de -0,21 % y máximo de 0,67%).

En ambos casos (patrones, muestras adicionadas) los estadísticos Durbin Watson y Kolmogorov permitieron establecer la independencia de los residuos y una distribución normal de los mismos para un nivel de confianza del 95%.

De los resultados obtenidos, se puede concluir que el método de determinación de clorpirifos en aceites esenciales descerados de naranja es lineal.

Comparación de líneas de regresión

La figura 30 muestra la comparación de las curvas de regresión obtenidas para las disoluciones patrón con las obtenidas para las muestras de aceites esenciales adicionadas.

Las ecuaciones 4 y 5 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 30.

El estadístico R-cuadrado explica el 99,915% de la variabilidad de las áreas y el R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, como ya se ha comentado, es 99,9105%. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuos fue 2921,67.

El P-valor en el test ANOVA fue inferior a 0,05, lo que nuevamente demostró la relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

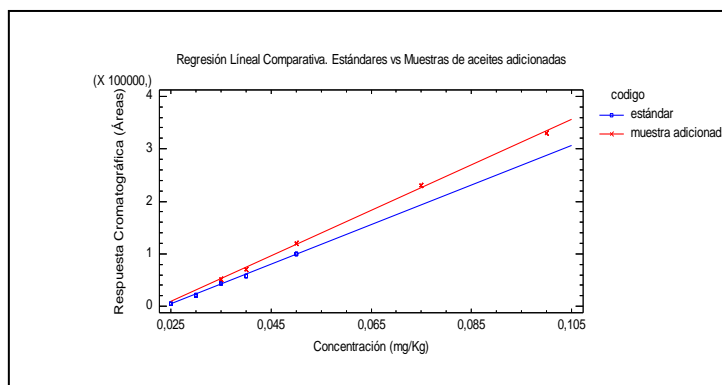


Figura 30. Rectas de regresión de clorpirifos de las disoluciones patrón y de las muestras de aceite esencial adicionadas.

Debido a que el P-valor para las pendientes y para los interceptos fue menor que 0,01, en este caso también se demostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos, para los distintos valores de disoluciones patrón y muestras de aceites adicionadas, con un nivel de confianza del 99%.

Por todo ello, se puede concluir que el efecto matriz es significativo, lo que implica que, en la determinación de clorpirifos en muestras reales de aceites esenciales descerados, es necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas para establecer la curva de linealidad correspondiente. De esta forma se obtendrían rectas de

calibrado adecuadas para la cuantificación del analito en las muestras de aceites esenciales.

IV.2.1.3. Precisión y exactitud

La precisión se determinó para disoluciones patrones y muestras de aceites adicionadas.

La exactitud se determinó calculando la media de las recuperaciones obtenidas en muestras de aceites adicionadas con clorpirifos a distintas concentraciones. Las recuperaciones obtenidas para las muestras adicionadas a 0,035; 0,040; 0,050; 0,075 y 0,100 mg/Kg, fueron de 91%, 93%, 95%, 97% y 99%, respectivamente. En este caso la exactitud medida en términos de recuperación fue del 95%, valor que pone de manifiesto la adecuada exactitud de este método, según la Comisión Europea (European Commission, 2013). En la tabla 14 se muestran los valores de los distintos parámetros que se calcularon para determinar la precisión.

Tabla 14. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de clorpirifos en aceites esenciales (n=21, $\alpha=0,05$)

	Disolución patrón de clorpirifos 0,030 mg/Kg	Muestra de aceite adicionada 0,050 mg/Kg
Área Media	13532	140453
Coefficiente de variación	3,02%	0,05%
Sesgo	-0,00607494	1,44548
Estandarizado Curtosis	-1,504	1,61738
Estandarizada		

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. Los coeficientes de variación fueron $< 20\%$, lo que indica que el método de determinación de clorpirifos en aceites esenciales descerados de naranja es preciso (European Commission, 2013).

IV.2.1.4. Límites de detección y cuantificación

A partir de las curvas de regresión para muestras de aceite adicionadas a bajas concentraciones, se determinaron los límites de detección y cuantificación. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para clorpirifos fueron de 0,015 y 0,050 mg/Kg respectivamente. Teniendo en cuenta que para aceites esenciales no están establecidos los LMRs ni en la legislación de la Unión Europea ni en la legislación de Argentina, no se puede comparar con los LMRs, pero se podrían considerar adecuados al observar los límites en la fruta de la cual proceden.

De estos resultados se puede concluir que el método es adecuado para determinar el nivel de residuos de clorpirifos en aceite esencial descerado de naranja obtenido en la línea de producción, con un buen nivel de exactitud y precisión.

IV.3. Desarrollo y validación de los métodos de determinación de carbendazim, procloraz y tiabendazol por Cromatografía Líquida con doble detector de Espectrometría de masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS)

Después de optimizar las condiciones cromatográficas, se llevaron a cabo las determinaciones y los analitos se identificaron según detalla en tabla 15 (figura 31).

Tabla 15. Características de identificación para procloraz, carbendazim y tiabendazol por LC-MS/MS.

Compuesto	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Tiempo (min)	Parámetro	Valor
Carbendazim1	192,2	160,2	5,7	DP	76
				EP	4,5
				CE	27
				CXP	4
Carbendazim2	192,2	132,1	5,7	DP	76
				EP	4,5
				CE	41
				CXP	4
Procloraz1	376	308,1	12,3	DP	64
				EP	7,5
				CE	17
				CXP	6
Procloraz2	376	69,9	12,3	DP	64
				EP	7,5
				CE	43
				CXP	4
Tiabendazol1	202	131,1	6,9	DP	79
				EP	5
				CE	43
				CXP	4
Tiabendazol1	202	131,1	6,9	DP	79
				EP	5
				CE	35
				CXP	4

DP: Declustering Potential- EP: Entrance Potential- CE: Collision Energy-CXP: Collision Cell Exit Potential

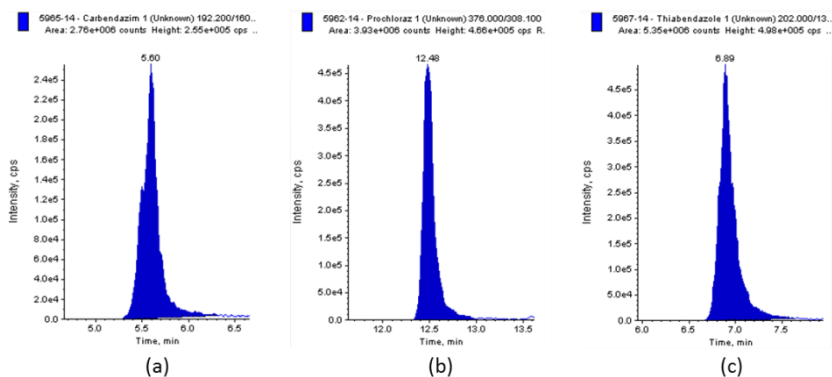


Figura 31. Cromatogramas obtenidos por LC-MS/MS: (a) Carbendazim, (b) Prochloraz, (c) Tiabendazol

IV.3.1. Validación del método de determinación de tiabendazol en fruta entera

IV.3.1.1. Análisis unidimensional

Los resultados del análisis unidimensional para disoluciones patrón y de muestras de frutas preadicionadas y post-adicionadas de tiabendazol a 6 niveles de concentración que se realizaron por triplicado, con un total de 7 réplicas (7 pinchazos de una misma disolución), se detallan en las tablas 16, 17 y 18, respectivamente.

El análisis unidimensional de los datos indicó para todas las concentraciones de las muestras una distribución normal.

Se puede observar que a bajas concentraciones, el coeficiente de variación fue mayor en las muestras pre-adicionadas, en comparación con las disoluciones patrón y las muestras post-adicionadas, lo que indicaría que la etapa de extracción de analitos, estaría influyendo en la variabilidad de los resultados.

Tabla 16. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones patrón de tiabendazol (n=21 y $\alpha=0,05$)

Patrón (mg/Kg)	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,010
Área Media	220131	264130	308198	352230	396207	440287
Desviación típica	72,00	38,99	48,34	66,63	79,16	28,05
Mínimo	220050	264100	308110	352100	396070	440250
Máximo	220250	264180	308250	352280	396280	440320
Rango	200	80	140	180	210	70
Coef. de variación	0,03 %	0,014 %	0,016 %	0,019 %	0,019 %	0,006 %

Tabla 17. Análisis estadístico unidimensional. Fruta pre-adicionada con tiabendazol (n=21 y $\alpha=0,05$)

Adiciones (mg/Kg)	0,007	0,008	0,009	0,010	0,020	0,050
Área Media	443918	501787	567986	626432	1249219	3073018
Desviación típica	2580,05	2572,50	2568,31	2594,14	24,66	13,41
Mínimo	442225	500109	564668	624743	1249198	3073006
Máximo	447277	505111	569651	629786	1249265	3073041
Rango	5052	5002	4983	5043	67	35
Coef. de variación	0,58 %	0,51 %	0,45 %	0,41 %	0,002 %	0,0004 %

Tabla 18. Análisis estadístico unidimensional. Fruta post-adicionada con tiabendazol (n=21 y $\alpha=0,05$)

Adiciones (mg/Kg)	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,010
Área Media	275754	332849	389466	440373	501157	549596
Desviación típica	229,54	142,98	173,60	247,37	282,77	270,91
Mínimo	275495	332728	389184	440097	500764	549224
Máximo	276120	333088	389664	440704	501556	549918
Rango	625	360	480	606	792	693
Coef. de variación	0,08 %	0,04 %	0,04 %	0,05 %	0,05 %	0,04 %

IV.3.1.2. Linealidad

En la figura 32 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en disoluciones patrón de tiabendazol.

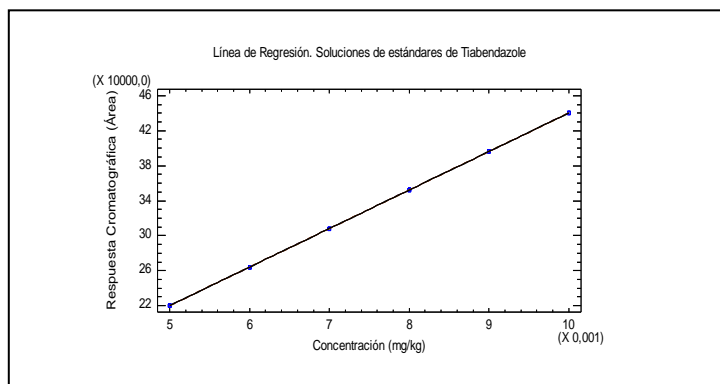


Figura 32. Regresión lineal con disoluciones patrón de tiabendazol

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue:

$$y = -26,2222 + 4,40298E7 * \text{concentración disoluciones patrón} \\ (\text{mg/Kg}) \quad (\text{ec. 6})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9999 % de la variabilidad de la respuesta cromatográfica (área de picos). El coeficiente de correlación fue 1,0, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que fue 59,0252.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos, hallándose un valor mínimo de $-0,0043\%$ y un máximo de $0,057\%$.

En la figura 33 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de frutas pre-adicionadas con tiabendazol.

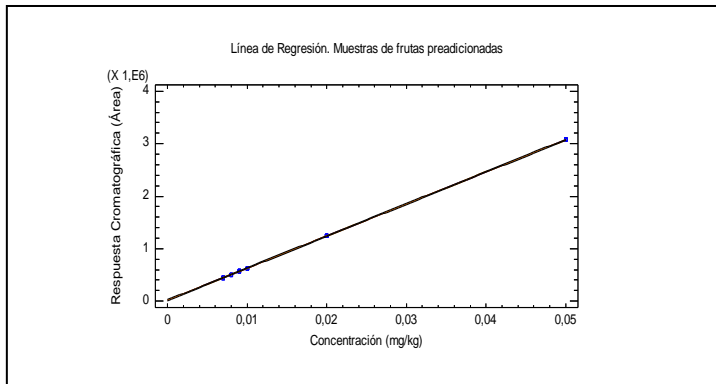


Figura 33. Regresión lineal en muestra de fruta entera pre-adicionada con tiabendazol

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue:

$$y = 16642,1 + 6,1178E7 * \text{concentración muestra de fruta pre-adicionada (mg/Kg)} \quad (\text{ec. 7})$$

Dónde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9974 % de la variabilidad del área de los picos. El coeficiente de correlación fue 0,999987, indicando una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que fue 4855,79.

Nuevamente para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje

del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos, habiéndose hallado un valor mínimo de $-1,17\%$ y un máximo de $0,73\%$.

En la figura 34 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de frutas post-adicionadas con tiabendazol.

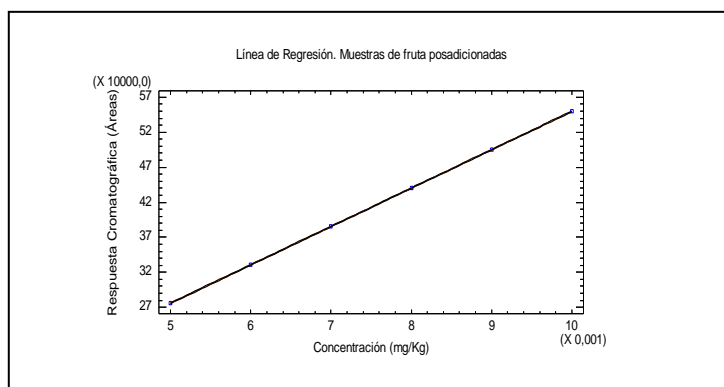


Figura 34. Regresión lineal en muestras de fruta entera post-adicionada con tiabendazol

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la que se muestra a continuación:

$$y = 1891,14 + 5,47809E7 * \text{concentración muestra de fruta post-adicionada (mg/Kg)} \quad (\text{ec. 8})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9997% de la variabilidad en área de picos. El coeficiente de

correlación fue 0,999998, indicando una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que fue 199,746.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos (valor mínimo de $-0,67\%$ y un máximo de $0,84\%$).

En los tres casos (patrones, muestras pre- y post-adicionadas) los estadísticos Durbin Watson y Kolmogorov permitieron establecer la independencia de los residuos y una distribución normal de los mismos para un nivel de confianza del 95% .

Estos resultados demuestran que el método desarrollado para la determinación de residuos de tiabendazol en naranjas es lineal.

Comparación de líneas de regresión

Para evaluar el efecto matriz, se procedió a realizar el estudio comparativo entre las curvas de regresión lineal obtenidas para disoluciones patrón y muestras de frutas adicionadas.

Las figuras 35 y 36 muestran la comparación de las curvas de regresión obtenidas para las disoluciones patrón con las obtenidas para las muestras de frutas pre-adicionadas (figura 35) y post- adicionadas (figura 36).

Las ecuaciones 6 y 7 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 35.

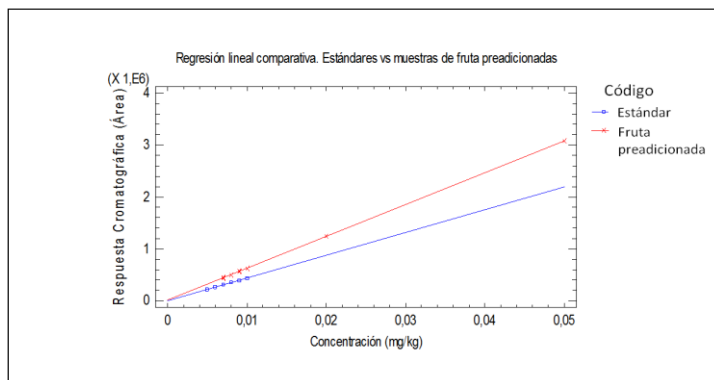


Figura 35. Rectas de regresión de tiabendazol de las disoluciones patrón y de las muestras de frutas pre-adicionadas

El estadístico R-cuadrado fue empleado para comparar los modelos ajustados en el cálculo de regresión de las disoluciones patrón y muestras de fruta pre-adicionada, en los que han resultado con diferente número de coeficientes. El valor de este estadístico explica el 99,9981% de la variabilidad de las áreas. El estadístico R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes fue 99,998%. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuos fue 3433,81.

Dado que el P-valor en el test ANOVA fue inferior a 0,05, se puede afirmar que hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

El P-valor para las pendientes y para los interceptos fue menor que 0,01, lo que demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos, para los distintos valores de disoluciones patrón y muestras de frutas pre-adicionadas con un nivel de confianza del 99%.

Las ecuaciones 6 y 8 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 36.

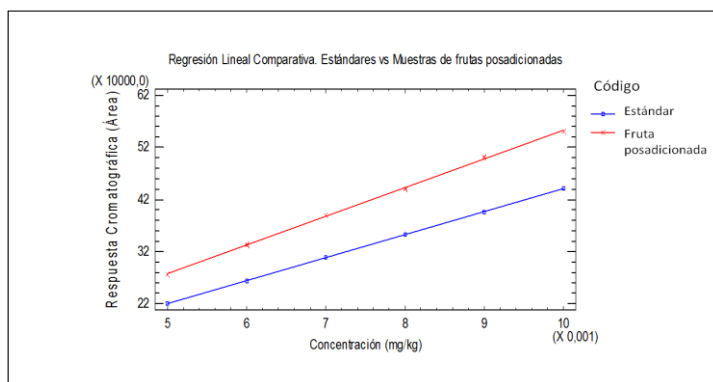


Figura 36. Rectas de regresión de tiabendazol de las disoluciones patrón y de las muestras de frutas post-adicionadas.

El estadístico R-cuadrado explica el 99,9691% de la variabilidad en áreas y el R-cuadrado ajustado, fue 99,9677%. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuos fue 1720,31.

En este caso, también el P-valor en el test ANOVA fue inferior a 0,05, demostrando la relación estadísticamente significativa existente entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el P-valor para las pendientes y para los interceptos también fue menor que 0,01, se estableció que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos, para los distintos valores de disoluciones patrón y muestras de frutas post-adicionadas, con un nivel de confianza del 99%.

Por todo ello, se puede concluir que el efecto matriz es significativo, lo que implica que, en la determinación de tiabendazol en muestras de naranja, es necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas para establecer la curva de linealidad correspondiente. De esta forma se obtendrían rectas de calibrado adecuadas para la cuantificación de este analito.

IV.3.1.3. Precisión y exactitud

La precisión se determinó para disoluciones patrón, muestras de fruta pre-adicionadas y post-adicionadas.

La exactitud se determinó para muestras pre-adicionadas con tiabendazol en los siguientes niveles de concentración: 0,007; 0,008; 0,009; 0,010; 0,020 y 0,050 mg/Kg, obteniendo recuperaciones del 89%, 91%, 91%, 93%, 93% y 95%, respectivamente. Para muestras post-adicionadas en los niveles de concentración siguientes: 0,005; 0,006; 0,007; 0,009 y 0,010 mg/Kg, las recuperaciones obtenidas fueron del 90%, 90%, 92%, 92%, 93% y 95%, respectivamente. El valor promedio de las recuperaciones halladas en todas las concentraciones, fue del 92%, lo que indica una adecuada exactitud (European Commission, 2013).

En la tabla 19 se muestran los valores de los distintos parámetros que se calcularon para determinar la precisión.

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. Los coeficientes de variación, en todos los casos fueron muy bajos, estando siempre por debajo del

límite del 20%, lo que indica que el método de determinación de residuos de tiabendazol en muestras de naranja es preciso.

Tabla 19. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de tiabendazol en fruta (n=21, $\alpha=0,05$)

	Disolución patrón de tiabendazol 0,006 mg/Kg	Muestra de fruta pre-adicionada 0,010 mg/Kg	Muestra de fruta post-adicionada 0,006 mg/Kg
Área Media	264130	626432	332849
Coefficiente de variación	0,014%	0,41 %	0,04 %
Sesgo Estandarizado	-0,315236	-0,113578	-0,233042
Curtosis Estandarizada	-0,845743	-0,957037	-1,26278

IV.3.1.3. Límites de detección y cuantificación

A partir de las curvas de regresión para frutas adicionadas a bajas concentraciones, se determinaron los límites de detección y cuantificación. Los límites de detección y cuantificación obtenidos para tianbendazol fueron de 0,005 y 0,010 mg/Kg respectivamente. Teniendo en cuenta que los LMRs establecidos en la legislación son 5 mg/Kg para naranjas en la Unión Europea (European Commission, 2015) y 10 mg/Kg en Argentina (SENASA, 2015), se podría concluir que ambos límites son adecuados, por ser considerablemente menores a los LMRs.

Del análisis estadístico de los resultados, se puede afirmar que el método de determinación de tiabendazol desarrollado en este trabajo es adecuado para ser aplicado a muestras de naranja, para

determinar el nivel de residuos de tiabendazol en la fruta que llega a la línea de producción, ya que se trata de un método exacto, preciso, de linealidad y límites de detección y cuantificación adecuados a este tipo de análisis.

IV.3.2. Validación de los métodos de determinación de procloraz, carbendazim y tiabendazol en aceites esenciales descerados de naranja.

IV.3.2.1. Procloraz

IV.3.2.1.1. Análisis unidimensional

Los resultados del análisis unidimensional para disoluciones patrón y de muestras de aceites adicionadas con procloraz a 6 niveles de concentración, realizados por triplicado y con un total de 7 réplicas, se detallan en las tablas 20 y 21, respectivamente.

El análisis unidimensional de los datos indicó para todas las concentraciones de las muestras una distribución normal.

Se puede observar que el coeficiente de variación fue mayor a medida que disminuía la concentración, en los 2 casos, lo que indicaría una mayor variabilidad para las concentraciones más bajas.

Tabla 20. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones patrón de procloraz (n=21 y $\alpha=0,05$)

Patrón (mg/Kg)	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,010
Área Media	3050	3774	4376	5052	5464	6118
Desviación típica	255,49	117,92	75,04	84,16	45,99	11,07
Mínimo	2666	3688	4276	4915	5411	6103
Máximo	3301	3950	4471	5145	5541	6133
Rango	635	262	195	230	130	30
Coef. de variación	8,37%	3,12%	1,71%	1,66%	0,84%	0,18%

Tabla 21. Análisis estadístico unidimensional. Muestras de aceite adicionadas con procloraz (n=21 y $\alpha=0,05$)

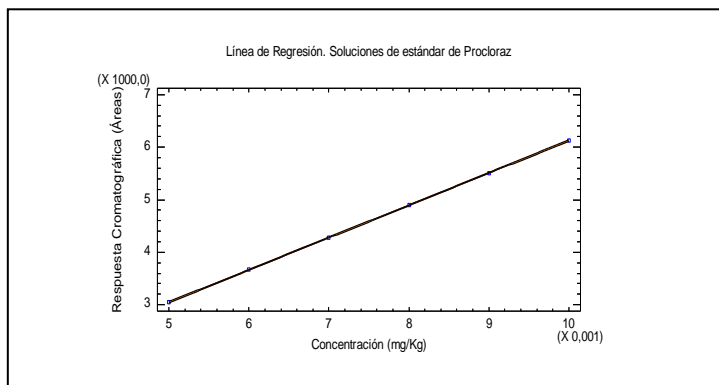
Adiciones (mg/Kg)	0,007	0,008	0,009	0,010	0,015	0,020
Área Media	5013	5798	6416	7199	10670	14233
Desviación típica	54,58	56,56	61,08	52,58	18,25	17,16
Mínimo	4922	5720	6325	7120	10644	14212
Máximo	5077	5870	6488	7266	10692	14261
Rango	155	150	163	146	48	49
Coef. de variación	1,08%	0,97%	0,95%	0,73%	0,17%	0,12%

El análisis unidimensional de los datos indicó para todas las concentraciones de las muestras una distribución normal.

Se puede observar que el coeficiente de variación fue mayor a medida que disminuía la concentración, en los 2 casos, lo que indicaría una mayor variabilidad para las concentraciones más bajas.

IV.3.2.1.2. Linealidad

En la figura 37 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en disoluciones de patrón de procloraz.

**Figura 37.** Regresión lineal con disoluciones patrón de procloraz

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la siguiente:

$$y = -28,1429 + 615286 * \text{concentración disolución patrón (mg/Kg)}$$

(ec. 9)

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9994% de la variabilidad del área de los picos. El coeficiente de correlación fue 0,999997, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que fue 3,1053.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos (valor mínimo de - 1,09 % y máximo de 1,21%)

En la figura 38 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de aceite adicionadas con procloraz.

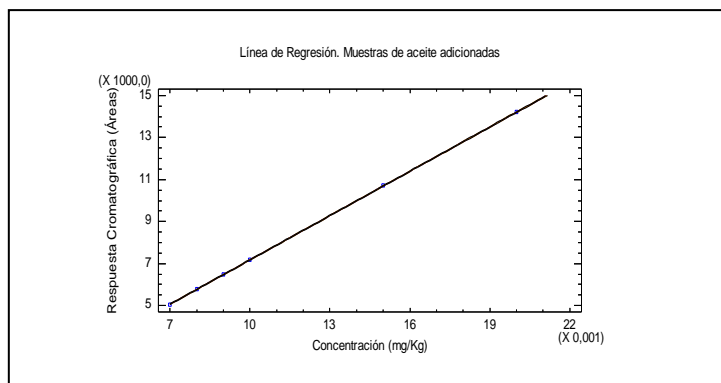


Figura 38. Regresión lineal en muestras de aceite esencial adicionada con procloraz

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la siguiente:

$$y = 141,343 + 703231 * \text{concentración muestras de aceite adicionada} \\ (\text{mg/Kg}) \quad (\text{ec. 10})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9998% de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de picos. El coeficiente de correlación fue 0,999999, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que fue 6,027.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos, habiéndose hallado un valor mínimo de $-2,41\%$ y un máximo de $2,08\%$.

En ambos casos, los estadísticos Durbin Watson y Kolmogorov permitieron establecer la independencia de los residuos y una distribución normal de los mismos para un nivel de confianza del 95 %.

Estos resultados demuestran que el método de determinación de procloraz en aceites esenciales descerados de naranja empleado en este estudio es lineal.

Comparación de líneas de regresión

Para evaluar el efecto matriz nuevamente se realizó un estudio comparativo entre las curvas de regresión lineal obtenidas para disoluciones patrón y muestras de aceites adicionadas.

La figura 39 muestra las curvas de regresión determinadas para disoluciones patrón y muestras de aceite adicionadas.

Las ecuaciones 9 y 10 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 39.

El estadístico R-cuadrado explica el 99,9958% de la variabilidad de las áreas y el estadístico R-cuadrado ajustado fue 99,9942%. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuos fue 25,5779.

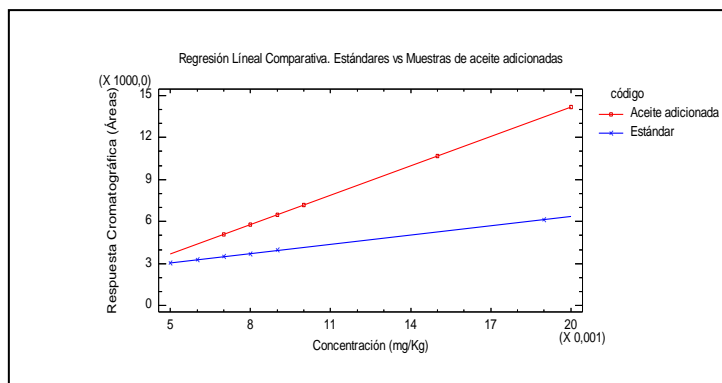


Figura 39. Rectas de regresión de procloraz de las disoluciones patrón y de las muestras de aceite esencial adicionadas.

El P-valor en el test ANOVA fue inferior a 0,05, por lo que se deduce que hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el P-valor para las pendientes y para los interceptos fue menor que 0,01, se puede afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de disoluciones patrón y muestras de aceites esenciales adicionadas, con un nivel de confianza del 99%.

Se puede concluir, por tanto, que el efecto matriz es significativo, lo que implica que, en la determinación de procloraz en muestras de aceites esenciales desecados, es necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas, para establecer la curva de linealidad correspondiente. De esta forma se obtendrían rectas de calibrado adecuadas para la cuantificación del analito en las muestras.

IV.3.2.1.3. Precisión y exactitud

La precisión se determinó para disoluciones patrones y muestras de aceites adicionadas.

La exactitud se determinó para muestras de aceites adicionadas con procloraz en los siguientes niveles de concentración: 0,007; 0,008; 0,009; 0,010 y 0,020 mg/Kg, obteniendo recuperaciones del 94%, 95%, 95%, 96%, 97% y 99%, respectivamente. La exactitud medida en términos de recuperación media fue del 96%, valor que está dentro del rango de 70-120% y, por tanto, indica que el método cumple el criterio de exactitud considerado en la Unión Europea (European Commission, 2013).

En la tabla 22 se muestran los valores de los distintos parámetros que se calcularon para determinar la precisión.

Tabla 22. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de procloraz en aceites esenciales (n=21, $\alpha=0,05$)

	Disolución patrón de procloraz 0,006 mg/Kg	Muestra de aceite adicionada 0,008 mg/Kg
Área Media	3774	5798
Coefficiente de variación	3,12%	0,97%
Sesgo Estandarizado	0,668866	-0,143253
Curtosis Estandarizada	-0,157622	-0,870066

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos

provenientes una distribución normal. Los coeficientes de variación fueron inferiores al 20%, lo que indica que el método es preciso (European Commission, 2013).

IV.3.2.1.4. Límites de detección y cuantificación

A partir de las curvas de regresión para muestras de aceite adicionadas a bajas concentraciones, se determinaron los límites de detección y cuantificación. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron de 0,005 y 0,010 mg/Kg respectivamente. Teniendo en cuenta que para aceites esenciales no están establecidos los LMRs ni en la legislación de la Unión Europea ni en la legislación de Argentina, no se puede comparar con los LMRs, pero se podrían considerar adecuados al observar los límites en la fruta de la cual proceden.

Del análisis estadístico de estos resultados, se puede concluir que el método es adecuado para determinar el nivel de residuos de procloraz en aceite esencial descerado de naranja obtenido en la línea de producción, con un buen nivel de exactitud y precisión.

IV.3.2.2. Carbendazim

IV.3.2.2.1. Análisis unidimensional

Los resultados del análisis unidimensional para disoluciones patrón y de muestras de aceites adicionadas con carbendazim a 6 niveles de concentración, realizadas por triplicado y con un total de 7 réplicas, se detallan en las tablas 23 y 24, respectivamente.

Tabla 23. Análisis estadístico unidimensional. Disoluciones patrón de carbendazim (n=21 y $\alpha=0,05$)

Patrón (mg/Kg)	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,010
Área Media	1236309	1485869	1725579	1957991	2215779	2489083
Desviación típica	8217,68	9858,12	4056,66	3805,77	4129,49	4082,49
Mínimo	1226750	1467509	1723802	1950255	2214010	2480750
Máximo	1248788	1497610	1733855	1959978	2224208	2490810
Rango	22038	30101	10053	9723	10198	10060
Coef. de variación	0,66%	0,66%	0,23%	0,19%	0,18%	0,16%

Tabla 24. Análisis estadístico unidimensional. Muestras de aceite adicionadas con carbendazim (n=21 y $\alpha=0,05$)

Adiciones (mg/Kg)	0,007	0,008	0,009	0,010	0,020	0,050
Área Media	2026416	2365104	2593077	2895096	5710214	14275928
Desviación típica	25622,0	26077,8	26104,8	26076,8	72,91	238,06
Mínimo	1988075	2325111	2553054	2855099	5710152	14275495
Máximo	2058044	2395120	2623120	2925105	5710357	14276102
Rango	69969	70009	70066	70006	205	607
Coef. de variación	1,26%	1,10%	1,00%	0,90%	0,001%	0,001%

El análisis unidimensional de los datos indicó para todas las concentraciones de las muestras una distribución normal. Los mayores coeficientes de variación se obtuvieron para las menores concentraciones. Estos valores también fueron mayores en las muestras de aceites esenciales, en comparación con los patrones, lo que pondría de manifiesto el efecto matriz en la variabilidad de los resultados.

IV.3.2.2.2. Linealidad

En la figura 40 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en disoluciones patrón de carbendazim.

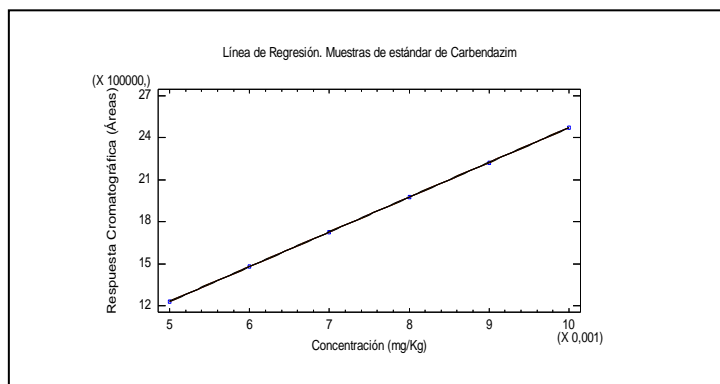


Figura 40. Regresión lineal con disoluciones patrón de carbendazim

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la que se muestra a continuación:

$$y = -9135,57 + 2,48101E8 * \text{concentración disoluciones patrón} \\ (\text{mg/Kg}) \quad (\text{ec. 11})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9999% de la variabilidad de la respuesta cromatográfica. El coeficiente de correlación fue 1,0, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que fue 444,114.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro

de los criterios de aceptación establecidos, hallándose un valor mínimo de - 1,29 % y un máximo de 1,41%.

En la figura 41 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de aceite adicionadas con carbendazim.

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la siguiente:

$$y = 38412,4 + 2,84773E8 * \text{concentración muestras de aceite adicionada (mg/Kg)} \quad (\text{ec. 12})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9999% de la variabilidad del área de los picos. El coeficiente de correlación fue 0,999999, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que es 5906,03.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes, el porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro de los criterios de aceptación establecidos (valor mínimo de - 2,48 % y máximo de 3,10%).

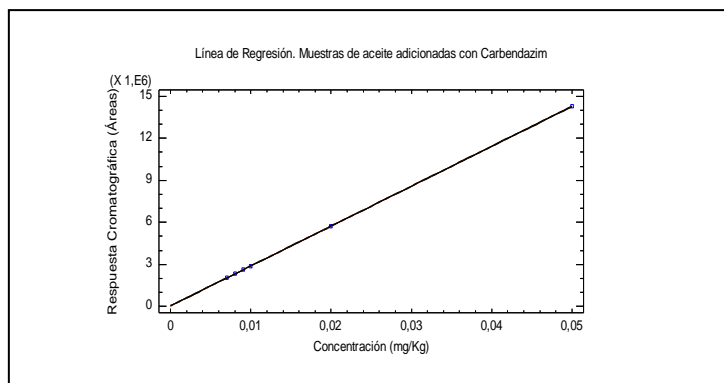


Figura 41. Regresión lineal en muestras de aceite esencial adicionada con carbendazim

En ambos casos, los estadísticos Durbin Watson y Kolmogorov permitieron establecer la independencia de los residuos y una distribución normal de los mismos para un nivel de confianza del 95 %.

De estos resultados se concluye que el método de determinación de carbendazim en aceites esenciales descerados de naranja es lineal.

Comparación de líneas de regresión

Se estudió el efecto matriz a través de un estudio comparativo entre las curvas de regresión lineal obtenidas para disoluciones patrón y muestras de aceite adicionadas.

La figura 42 muestra la comparación de las curvas de regresión obtenidas para las disoluciones patrón con las obtenidas para las muestras de aceites esenciales adicionadas

Las ecuaciones 11 y 12 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 42.

El estadístico R-cuadrado nuevamente fue empleado para comparar los modelos ajustados en el cálculo de regresión de las disoluciones patrón y muestras de aceite adicionadas, en los que han resultado con diferente número de coeficientes. El valor de este estadístico explica el 99,9999% de la variabilidad en áreas. El estadístico R-cuadrado ajustado fue del 99,9999%. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuos fue 4187,98.

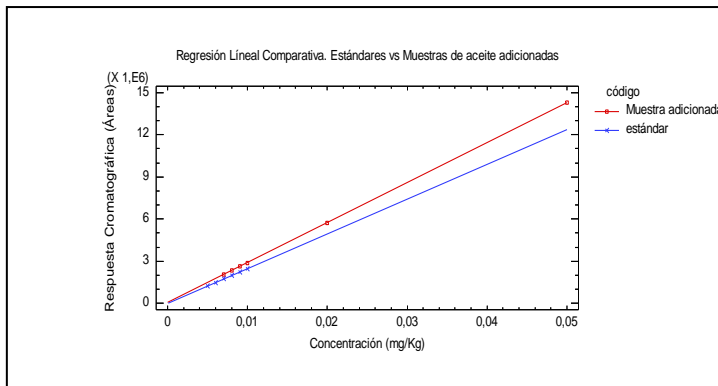


Figura 42. Rectas de regresión de carbendazim de las disoluciones patrón y de las muestras de aceite esencial adicionadas.

Dado que el P-valor en el test ANOVA fue inferior a 0,05, se puede concluir que hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

El P-valor para las pendientes y para los interceptos fue menor que 0,01, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de disoluciones patrón y muestras de aceites adicionadas con un nivel de confianza del 99%.

Se puede concluir que el efecto matriz es significativo, lo que implica que, en la determinación de carbendazim en muestras de aceites esenciales descerados, es necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas para establecer la curva de linealidad correspondiente. De esta forma se obtendrían rectas de calibrado adecuadas para la cuantificación del analito en las muestras de aceites esenciales.

IV.3.2.2.3. Precisión y exactitud

La precisión se determinó para disoluciones patrón y muestras de aceites adicionadas.

La exactitud del método se determinó para muestras de aceites adicionadas con carbendazim en los siguientes niveles de concentración: 0,007; 0,008; 0,009; 0,010; 0,020 y 0,050 mg/Kg, obteniendo valores de recuperación del 87%, 88%, 92%, 93%, 96% y 96%, respectivamente. En este caso la exactitud medida en términos de recuperación fue de 92% (European Commission, 2013).

En la tabla 25 se muestran los valores de los distintos parámetros que se calcularon para determinar la precisión.

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El coeficiente de variación en todos los casos fue muy bajo, cumpliendo el criterio establecido para el parámetro (20%), lo que indica que el método es preciso (European Commission, 2013).

Tabla 25. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de carbendazim en aceites esenciales (n=21, $\alpha=0,05$)

	Disolución patrón de carbendazim 0,006 mg/Kg	Muestra de aceite adicionada 0,010 mg/Kg
Área Media	1485869	2895096
Coefficiente de variación	0,66%	0,90%
Sesgo	-0,279685	0,758678
Estandarizado Curtosis	-0,739555	-0,984858
Estandarizada		

IV.3.2.2.4. Límites de detección y cuantificación

A partir de las curvas de regresión para muestras de aceite adicionadas a bajas concentraciones, se determinaron los límites de detección y cuantificación, siendo 0,005 y 0,010 mg/Kg, respectivamente. Teniendo en cuenta que para aceites esenciales no están establecidos los LMRs ni en la legislación de la Unión Europea ni en la legislación de Argentina, no se puede comparar con los LMRs, pero se podrían considerar adecuados al observar los límites en la fruta de la cual proceden.

Del análisis estadístico de los resultados, se puede concluir que el método desarrollado en este estudio, es adecuado para determinar el nivel de residuos de carbendazim en aceite esencial descerado de naranja obtenido en la línea de producción, con un buen nivel de exactitud y precisión.

IV.3.2.3. Tiabendazol

IV.3.2.3.1. Análisis unidimensional

Los resultados del análisis unidimensional para disoluciones patrón y de muestras de aceites adicionadas con tiabendazol en 6 niveles de concentración y con un total de 7 réplicas, se detallan en las tablas 16 y 26, respectivamente.

Tabla 26. Análisis estadístico unidimensional. Muestras de aceite adicionadas con tiabendazol (n=21 y $\alpha=0,05$)

Adiciones (mg/Kg)	0,007	0,008	0,009	0,010	0,020	0,050
Área Media	433361	494893	558134	616124	1238193	3095411
Desviación típica	2572,32	2585,74	1295,58	1556,26	37,50	105,74
Mínimo	430007	493220	556112	614815	1238150	3095280
Máximo	435054	498235	559362	619098	1238238	3095556
Rango	5047	5015	3250	4283	88	276
Coef. de variación	0,59%	0,52%	0,23%	0,25%	0,003%	0,003%

El análisis unidimensional de los datos indicó para todas las concentraciones de las muestras una distribución normal.

Se puede observar que el coeficiente de variación fue mayor a medida que disminuía la concentración, en ambos casos, lo que demuestra una mayor variabilidad a concentraciones mas bajas.

IV.3.2.3.2. Linealidad

En la figura 32 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en disoluciones patrón de tiabendazol y la ecuación (6) es la correspondiente ecuación del modelo ajustado.

En la figura 43 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de aceite adicionadas con tiabendazol.

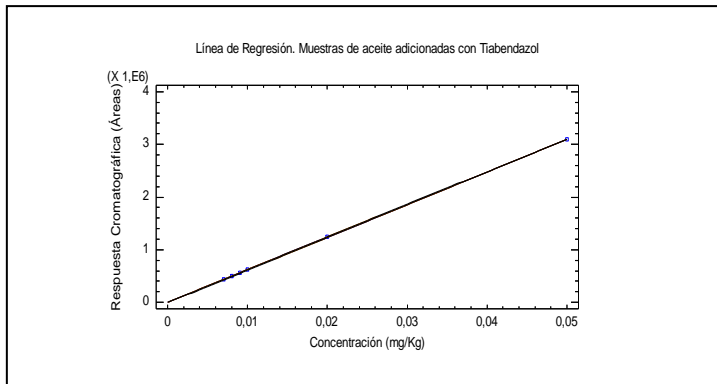


Figura 43. Regresión lineal en muestras de aceite esenciales adicionadas con tiabendazol

La ecuación del modelo ajustado correspondiente fue la que se muestra a continuación:

$$y = -604,253 + 6,19206E7 * \text{concentración muestras de aceite adicionada (mg/Kg)} \quad (\text{ec. 13})$$

Donde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9998% de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación fue 0,999999, lo que indica una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra la desviación típica de los residuos que fue 1473,74.

Para todos los niveles de concentración se establecieron los valores predichos de las respuestas cromatográficas para el modelo ajustado y los residuos correspondientes. El porcentaje del valor residual respecto del valor predicho para cada uno se encuentra dentro

de los criterios de aceptación establecidos (valor mínimo de $-0,65\%$ y máximo de $0,70\%$).

En ambos casos, los estadísticos Durbin Watson y Kolmogorov permitieron establecer la independencia de los residuos y una distribución normal de los mismos para un nivel de confianza del 95% .

De los resultados obtenidos, se puede concluir que el método de determinación de tiabendazol en aceites esenciales descerados de naranja es lineal.

Comparación de líneas de regresión

La figura 44 muestra la comparación de las curvas de regresión obtenidas para las disoluciones patrón con las obtenidas para las muestras de aceites esenciales adicionadas.

Las ecuaciones 6 y 13 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 44.

El estadístico R-cuadrado explica el $99,9999\%$ de la variabilidad de las áreas y el R-cuadrado ajustado fue del $99,9998\%$. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuos fue $1080,6$.

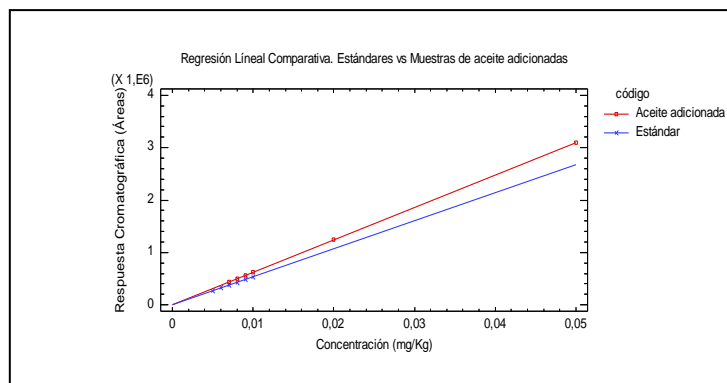


Figura 44. Rectas de regresión de tiabendazol de las disoluciones patrón y de las muestras de aceite esencial adicionadas

El P-valor en el test ANOVA fue inferior a 0,05, demostrando que hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el P-valor para las pendientes y para los interceptos fue menor que 0,01, se puede afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de disoluciones patrón y muestras de aceites esenciales adicionadas con un nivel de confianza del 99%.

Se puede concluir que el efecto matriz es significativo, lo que implica que, en la determinación de tiabendazol en muestras de aceites esenciales descerados, es necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas para establecer la curva de linealidad correspondiente. De esta forma se obtendrían rectas de calibrado adecuadas para la cuantificación del analito en la muestra.

IV.3.2.3.3. Precisión y exactitud

La precisión se determinó para disoluciones patrón y muestras de aceites adicionadas.

La exactitud se determinó para muestras adicionadas en los siguientes niveles de concentración: 0,007; 0,008; 0,009; 0,010; 0,020 y 0,050 mg/Kg, obteniendo recuperaciones del 84%, 84%, 85%, 87%, 89% y 91%, respectivamente. La exactitud medida en términos de recuperación media fue del 87%, lo que está dentro del rango considerado como una recuperación media aceptable por la Comisión Europea (European Commission, 2013). Por lo tanto, se puede afirmar que el método de determinación de tiabendazol en muestras de aceite esencial descrito es exacto.

En la tabla 27 se muestran los valores de los distintos parámetros que se calcularon para determinar la precisión.

Tabla 27. Resultados de los parámetros calculados para la determinación de la precisión del método de determinación de tiabendazol en aceites esenciales (n=21, $\alpha=0,05$)

	Disolución patrón de tiabendazol 0,006 mg/Kg	Muestra de aceite adicionada 0,010 mg/Kg
Área Media	321307	616124
Desviación típica	4411,67	1923,14
Coefficiente de variación	1,63%	0,25%
Sesgo	0,164338	-0,210968
Estandarizado Curtosis	-1,02481	-1,43505
Estandarizada		

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. Los coeficientes de variación fueron $< 20\%$, lo que indica que el método de determinación de tiabendazol en aceites esenciales descerados de naranja es preciso (European Commission, 2013).

IV.3.2.3.4. Límites de detección y cuantificación

A partir de las curvas de regresión para muestras de aceite adicionadas a bajas concentraciones, se determinaron los límites de detección y cuantificación, siendo éstos de 0,005 y 0,010 mg/Kg, respectivamente. Teniendo en cuenta que para aceites esenciales no están establecidos los LMRs ni en la legislación de la Unión Europea ni en la legislación de Argentina, no se puede comparar con los LMRs, pero se podrían considerar adecuados al observar los límites en la fruta de la cual proceden.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que el método desarrollado en este estudio, es adecuado para determinar el nivel de residuos de tiabendazol en aceite esencial descerado de naranja obtenido en la línea de producción, con un buen nivel de exactitud y precisión.

IV.4. Estudio de la presencia de residuos de plaguicidas en frutas enteras y en aceites esenciales y determinación de su correlación.

IV.4.1. Presencia de residuos de plaguicidas en frutas y aceites esenciales descerados

En la tabla 28 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol, durante las 3 temporadas de producción evaluadas. Así mismo, se muestran los datos de persistencia relativa de los plaguicidas en los aceites esenciales. Para el cálculo de la persistencia relativa de los residuos en aceites esenciales descerados, se consideró que en la línea de producción, por cada tonelada de fruta que entra en la línea de producción se obtienen 0,2 a 0,4% de aceite esencial, considerándose un valor medio de 0,3%.

Se puede observar que, tanto en las muestras de naranja como en los aceites esenciales, se cuantificaron residuos de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol. Del total de los 12 lotes muestreados, solo uno de ellos (el lote J) estuvo exento de plaguicidas. Para clorpirifos solo 3 lotes no indicaron presencia residual del mismo, para carbendazim y procloraz solo cuatro lotes. Para todos estos lotes mencionados no se procedió al análisis de la persistencia relativa, como tampoco al análisis de correlación correspondiente.

Tabla 28. Valores medios de niveles residuales de plaguicidas expresados en mg/Kg y desviación estándar (valores entre paréntesis) (n=9, $\alpha=0,05$). Temporada 2012, 2013 y 2014

PROCLORAZ				
AÑO	Nº DE LOTE	FRUTA DE INGRESO	ACEITE DESCERADO	% DE PERSISTENCIA
2012	A	1,460(0,189)*	3,270(2,839)	0,67
	B	1,420(0,247)*	2,550(0,620)	0,57
	C	ND*
	D	0,560(0,057)*	0,970(0,114)	0,52
2013	E	ND*
	F	0,130(0,040)*	0,280(0,033)	0,65
	G	ND*
	H	0,600(0,284)*	2,000(0,989)	0,99
2014	I	0,980(0,098)*	3,130(0,236)	0,95
	J	ND*
	K	0,270(0,032)*	0,820(0,09)	0,90
	L	0,172(0,287)*	0,440(0,545)	0,76
CLORPIRIFOS				
AÑO	Nº DE LOTE	FRUTA DE INGRESO	ACEITE DESCERADO	% DE PERSISTENCIA
2012	A	ND	ND
	B	0,045(0,002)	0,250(0,028)	1,66
	C	0,055(0,013)	0,210(0,025)	1,26
	D	0,076(0,004)	0,450(0,062)	1,79
2013	E	0,071(0,004)	0,410(0,021)	1,71
	F	0,025(0,009)	0,140(0,034)	1,68
	G	0,065(0,012)	0,310(0,037)	1,44
	H	0,050(0,005)	0,280(0,029)	1,71
2014	I	0,061(0,003)	0,240(0,033)	1,20
	J	ND	ND
	K	0,034(0,002)	0,190(0,011)	1,64
	L	ND	ND
CARBENDAZIM				
AÑO	Nº DE LOTE	FRUTA DE INGRESO	ACEITE DESCERADO	% DE PERSISTENCIA
2012	A	ND*	ND
	B	ND*	ND
	C	ND*	ND
	D	0,036(0,002)*	0,030(0,002)	0,25
2013	E	0,100(0,012)*	0,081(0,009)	0,24
	F	0,006(0,0004)*	ND
	G	0,060(0,012)*	0,049(0,009)	0,24
	H	0,038(0,009)*	0,031(0,007)	0,25
2014	I	0,024(0,003)*	0,027(0,004)	0,34
	J	ND*	ND
	K	0,015(0,004)*	0,040(0,012)	0,83
	L	0,098(0,008)*	0,082(0,008)	0,25

TIABENDAZOL				
ANO	Nº DE LOTE	FRUTA DE INGRESO	ACEITE DESCERADO	% DE PERSISTENCIA
2012	A	0,082(0,015)	0,950(0,178)	3,47
	B	0,012(0,009)	0,220(0,193)	5,45
	C	0,005(0,001)	0,080(0,032)	4,80
	D	0,006(0,013)	0,090(0,058)	4,15
2013	E	0,030(0,008)	0,472(0,116)	4,61
	F	0,095(0,017)	1,080(0,209)	3,38
	G	0,026(0,007)	0,416(0,110)	4,76
	H	0,297(0,044)	4,130(0,646)	4,17
2014	I	0,007(0,001)	0,115(0,020)	4,93
	J	ND	ND
	K	0,014(0,005)	0,175(0,057)	3,57
	L	ND

* Datos obtenidos por Martínez, H.J. (2016)

Los máximos valores medios de niveles residuales hallados en fruta al ingreso a la industria y aceites descerados fueron respectivamente: 1,46 mg/Kg (Martínez, 2016) y 3,27 mg/Kg para procloraz, 0,076 mg/Kg y 0,45 mg/Kg para clorpirifos, 0,1 mg/Kg (Martínez, 2016) y 0,082 mg/Kg para carbendazim, 0,29 mg/Kg y 4,13 mg/Kg para tiabendazol. Los valores máximos de persistencia relativa obtenidos fueron 0,99% para procloraz, 1,79% para clorpirifos, 0,83% para carbendazim y 5,45% para tiabendazol.

Los mínimos valores medios de niveles residuales hallados en fruta a la entrada en la línea de producción y en aceites descerados fueron respectivamente: 0,13 mg/Kg (Martínez, 2016) y 0,28 mg/Kg para procloraz, 0,025 mg/Kg y 0,14 mg/Kg para clorpirifos, 0,006 mg/Kg (Martínez, 2016) y 0,027 mg/Kg para carbendazim, 0,005 mg/Kg y 0,08 mg/Kg para tiabendazol. Los valores mínimos de persistencia relativa obtenidos fueron 0,52% para procloraz, 1,2% para clorpirifos, 0,24% para carbendazim y 3,38% para tiabendazol.

En cuanto al año de muestreo, considerando los valores medios obtenidos para los 4 lotes de naranja en cada año, para procloraz y clorpirifos (tabla 28), se obtuvieron valores similares en los 3 años. Sin embargo, para carbendazim, en el año 2012 el valor medio fue inferior a las dos anualidades siguientes, dado que solo se detectó en uno de los lotes. En el caso de tiabendazol, el promedio obtenido en 2014 fue considerablemente inferior al resto.

En el ANOVA realizado tomando como factor el lote, dentro de cada año, se obtuvieron diferencias significativas (P-valor < 0,05) para los 4 plaguicidas, tanto en frutas como en aceites, en los 3 años evaluados. Estas diferencias significativas entre lotes demuestran la variabilidad que hay en los residuos de plaguicidas, entre las diferentes partidas de fruta que entran a la industria. De igual forma, se observaron diferencias significativas entre los años evaluados en todos los plaguicidas (datos no mostrados).

De los valores hallados para clorpirifos en fruta entera se encuentran, en general, por debajo de los niveles obtenidos en diversos trabajos (Gerard et al., 2000; Coscollá, 2003; INTA, 2011; Kulczycki et al., 2012; Montti et al., 2013). Esto podría deberse a que en los trabajos de los autores mencionados, los estudios fueron realizados en fruta entera de empaque, lo que implica un menor período para la degradación del plaguicida en fruta, en comparación con fruta que llega a la industria.

Para los plaguicidas pertenecientes al grupo de los benzimidazoles, tales como carbendazim, procloraz y tiabendazol, los niveles encontrados en naranja se encuentran, en general, en los

rangos publicados en diversos trabajos (Papadopoulou, 1991; Montti et al., 1998; Di Muccio et al., 1999; Chaulet et al., 2000; Gerard et al., 2000; Nakamura et al., 2010; Visciglio, 2011; Montti et al., 2013).

IV.4.2. Determinación de la correlación entre los niveles residuales de plaguicidas en aceites esenciales y la fruta de la cual provienen

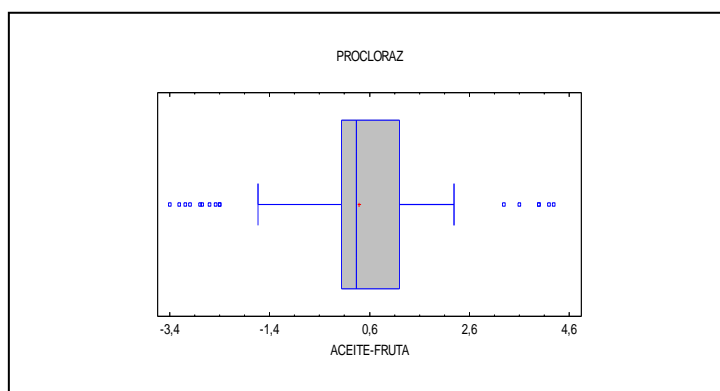
A partir de los resultados obtenidos para un total de 12 lotes muestreados, correspondientes a las 3 temporadas de producción ya comentadas, se realizó un análisis de comparación de 2 muestras pareadas, con el fin de evaluar las diferencias significativas entre los niveles residuales de plaguicidas obtenidos en frutas enteras y el nivel de residuos obtenido en el aceite esencial colectado como su pareja.

El resumen estadístico para cada una de las muestras pareadas incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma. Los valores obtenidos del sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, nuevamente fueron utilizados para determinar si la muestra provenía de una distribución normal. Como ya se ha comentado anteriormente, valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indicarían desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar.

Para el análisis de muestras pareadas de fruta entera y aceite esencial en la determinación de residuos de procloraz, se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 29. Los valores del sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

Tabla 29. Resumen estadístico para los niveles de residuos de procloraz, para el par aceite-fruta.

Recuento	110
Promedio	0,387614
Desviación Estándar	1,56594
Coefficiente de Variación	403,995%
Mínimo	-3,4
Máximo	4,29
Rango	7,69
Sesgo Estandarizado	-0,338507
Curtosis Estandarizada	1,34916

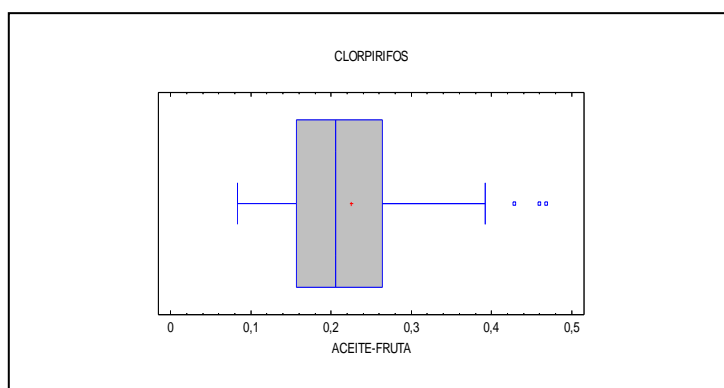
**Figura 45.** Diagrama de cajas y bigotes para procloraz en el par muestral aceite-fruta

Para el análisis de muestras pareadas en relación a los niveles residuales de procloraz, los valores del sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

Para el análisis de muestras pareadas de fruta entera y aceite esencial en el análisis residual de clorpirifos, se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 30.

Table 30. Resumen estadístico para los niveles de residuos de clorpirifos, para el par aceite-fruta

Recuento	90
Promedio	0,2253
Desviación Estándar	0,0879725
Coefficiente de Variación	39,0468%
Mínimo	0,083
Máximo	0,468
Rango	0,385
Sesgo Estandarizado	2,94151
Curtosis Estandarizada	-0,0814761

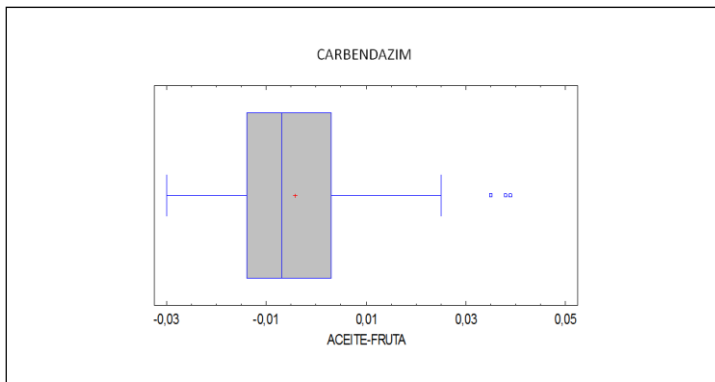
**Figura 46.** Diagrama de cajas y bigotes para clorpirifos en el par muestral aceite-fruta

En este caso, los valores del sesgo estandarizado no se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

Para el análisis de muestras pareadas de fruta entera y aceite esencial en el análisis residual de carbendazim, se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Resumen estadístico para los niveles de residuos de carbendazim, para el par aceite-fruta

Recuento	74
Promedio	-0,00421351
Desviación Estándar	0,0147346
Coefficiente de Variación	-349,699%
Mínimo	-0,03
Máximo	0,039
Rango	0,069
Sesgo Estandarizado	3,85211
Curtosis Estandarizada	2,06158

**Figura 47.** Diagrama de cajas y bigotes para carbendazim en el par muestral aceite-fruta

Para el análisis de muestras pareadas en relación a los niveles residuales de carbendazim, los valores del sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada no se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

Para el análisis de muestras pareadas de fruta entera y aceite esencial en el análisis residual de tiabendazole, se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 32.

Para el análisis de muestras pareadas en relación a los niveles de residuos de tiabendazole, los valores del sesgo estandarizado y de

curtosis estandarizada no se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal.

Tabla 32. Resumen estadístico para los niveles de residuos de tiabendazol, para el par aceite-fruta

Recuento	110
Promedio	0,181995
Desviación Estándar	0,299866
Coefficiente de Variación	164,767%
Mínimo	-0,31
Máximo	1,007
Rango	1,317
Sesgo Estandarizado	4,40478
Curtosis Estandarizada	2,12794

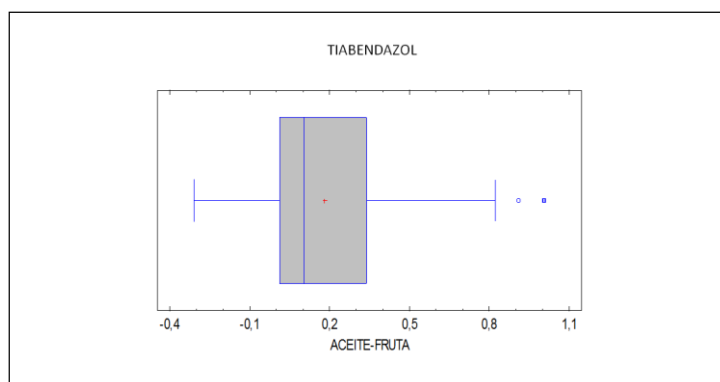


Figura 48. Diagrama de cajas y bigotes para tiabendazol en el par muestral aceite-fruta

De acuerdo al análisis realizado anteriormente para cada uno de los plaguicidas, se observa que los niveles de residuos de plaguicidas presentaron una variabilidad considerable entre los diferentes lotes muestreados, por lo que se procedió a determinar el coeficiente de correlación para cada uno de los lotes por separado y para cada uno de los plaguicidas.

Aquellos lotes que no indicaron presencia de niveles residuales de plaguicidas fueron desestimados para la determinación del coeficiente de correlación, sólo se consideraron aquellos que manifestaron presencia de residuos en fruta entera y aceite esencial, pudiéndose así conformar el par muestral para que sea factible la correlación.

Los coeficientes de correlación obtenidos para cada caso se detallan en la tabla 33.

Tabla 33. Coeficientes de correlación hallados entre los niveles de residuos de plaguicidas de la fruta entera y los aceites esenciales de naranja Valencia. Temporadas 2012, 2013 y 2014.

AÑO	Nº DE LOTE	PROCLORAZ	CLORPIRIFOS	CARBENDAZIM	TIABENDAZOL
		CORRELACION	CORRELACION	CORRELACION	CORRELACION
2012	A	0,7582	-----	-----	0,9874
	B	0,9118	0,9573	-----	0,9461
	C	0,7977	0,9861	-----	0,8432
	D	0,8891	0,9549	0,9437	0,7523
	E	0,9929	0,8131	0,9973	0,9221
2013	F	0,8648	0,7376	0,8040	0,9547
	G	0,9995	0,9727	0,9998	0,9899
	H	0,9522	0,9987	0,9819	0,9555
	I	0,9216	1,0000	0,9969	-0,2379
2014	J	-----	-----	-----	-----
	K	0,9728	0,9343	0,9777	0,9972
	L	0,9001	-----	0,3932	-----

En aquellos lotes que se determinó el coeficiente de correlación, se puede observar que para todos los casos existe una correlación altamente significativa. Para procloraz el índice de valor medio del coeficiente de correlación es del orden de 0,90, para clorpirifos de 0,93, para carbendazim de 0,88 y para tiabendazol de

0,81. El clorpirifos fue el plaguicida que mayor correlación presentó entre los niveles residuales de fruta y aceite, mientras que el tiabendazol fue el de menor.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

En la determinación de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol, tanto en naranjas como en aceites esenciales descerados, es necesario emplear blancos de muestra fortificados para hacer la calibración, dado que presentan efecto matriz.

Todos los métodos evaluados son lineales en el rango de concentraciones estudiadas en las distintas matrices.

La exactitud medida en términos de recuperación presenta valores comprendidos entre el 87% (tiabendazol en aceites esenciales) y el 114% (clorpirifos en naranjas), lo que indica que todos los métodos desarrollados son exactos. Asimismo, se ha demostrado que los métodos son precisos, ya que los coeficientes de variación han sido inferiores al 20% en todos los casos.

Los límites de cuantificación fueron 0,050 mg/Kg para clorpirifos y 0,01 mg/Kg para tiabendazol, en naranjas; en aceites esenciales, 0,01 mg/kg para procloraz, carbendazim y tiabendazol, y 0,05 mg/kg para clorpirifos. Los límites de detección y cuantificación obtenidos son adecuados, teniendo en cuenta los límites máximos de residuos (LMRs) establecidos en la legislación argentina y europea, para naranjas.

Los residuos de los 2 plaguicidas evaluados en las muestras de naranja que llegan a la industria presentaron valores máximos inferiores a los LMRs establecidos en la legislación de Argentina y de la Unión Europea.

Se ha demostrado la persistencia de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol, en los aceites esenciales descerados obtenidos a partir de naranja, que está comprendida entre un 0,24% y un 5,45%. Para los 4 plaguicidas evaluados se ha podido establecer una correlación positiva entre los niveles presentes en la fruta y los valores residuales obtenidos en los aceites esenciales.

El desarrollo y validación de los métodos de análisis de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazol, en muestras de naranjas y aceites esenciales descerados, llevado a cabo en este estudio, permite ofrecer una valiosa herramienta al sector industrial, con la que determinar de forma exacta y precisa los niveles de plaguicidas de los productos que adquieren, elaboran y/o comercializan. Esto ayudará a la mejora de los procesos de control de calidad, permitiendo seleccionar solo materias primas que cumplan con los criterios exigidos por la legislación en materia de residuos, a la vez que establecer estrategias apropiadas de comercialización, teniendo en cuenta las diferencias de los LMRs existentes entre los distintos mercados.

CAPITULO VI
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC International. Official method 2007.01: pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate. AOAC International; 2007.

Almeida, T. F. de. (2009). Mancha preta dos citros: expressão dos sintomas em frutos pela inoculação com conídios e controle do agente causal (*Guignardia citricarpa*). 2009. xii, 66 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009. Disponible en: <<http://hdl.handle.net/11449/105216>>.

Alonso Muñoz, A.; García Marí, F. (2009). Daños causados por *Ceratitidis capitata* (Diptera, Tephritidae) en parcelas de cítricos: Comparación del ataque a frutos del árbol y a frutos en el suelo. Bol. San. Veg. Plagas, 35:543-557.

Amorós, J. y J. Gonell. 1994. Una nueva plaga de la citricultura: el denominado "minador de los cítricos" (*Phyllocnistis citrella*, Stainton). Levante Agrícola. España. 33(326:77-79).

Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck F. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J AOAC Int.; 86:412-431.

Anderson, A. 1984. Analytical Official Methods. FNA, Uppsala. Suecia.

Anderson, C. M.; Banfi, G.; Beñatena, H.N.; Casafus, C. M.; Costa, N. B.; Danos, E.; Fabiani, A.; Garran, S. M.; Larocca, L.; Marco, G.; Messina, M.; Mika, R.; Mousques, J.; Plata, M.I.; Ragone, M.; Rivas, R.; Vaccaro, N.C.; Vazquez, D. (1996). Manual para productores de naranja y mandarina de la Region del Río Uruguay. Capítulo XII. ISBN: 950-9853-72-0

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Edited by Kenneth Helrich. 15th Edition. Volumen one.

Aysal P, Ambrus Á, Lehotay SJ, Cannavan A. (2007). Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and

vegetables using ethyl acetate for extraction. *J Environ Sci Health, Part B.*; 42:481–490.

Barberá, C. (1989). *Pesticidas Agrícolas*. 4º Edic. Editorial Omega. Barcelona.

Bazan, J. G. (2002). Fichas técnicas plagas de los vegetales en los países miembros de la Comunidad Andina. Comunidad Andina, Lima-Perú.

Beitia, F; Hermoso de Mendoza, M; Falcó, JV. 2002. “Posibilidad de control biológico de la mosca de fruta, *Ceratitis capitata* (díptera, Tephritidae), por medio de parasitoides exóticos” *Phytoma*. 140: 13-17.

Blasco, C.; Font, G. & Picó, Y. (2002). Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 970, 201-212.

Blasco, C; Font ,G; Pico, Y. (2006). Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia. *Food Control.*; 17(11):841-846.

Brunings, A.M.; Gabriel, D.W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* 4, 141-157

Cambra, M.; Moreno, P. (2000). *Enfermedades de los cítricos*. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa. 213 p. (vol. 2).

Cambra, M.; Olmos, A.; Gorris, M. T.; Marroquin, C.; Esteban, O.; Garnsey, S. M.; Llauger, R.; Batista, L.; Peña, I.; Hermoso de Mendoza, A. (2000). Detection of citrus tristeza virus by print capture and squash capture-PCR in plant tissues and single aphids. Riverside, International Organization Citrus Virology. Proceedings of the 14th Conference of IOCV. pp 42 – 48.

Canteros, B.I. (2001). Cancrosis de los citrus. *Revista IDIA XXI*: N°1 Nov./2011.Pag. 23-25.

Canteros, B. I. (2010). *Guía para la identificación y el manejo de las enfermedades fúngicas bacterianas de citrus*. Primera Edición. INTA. ISBN 978-987-05-6059-3

Casida, J.E. and Quistad, G.B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu.Rev.Entomol.* 43:1-16 (1998).

Tesis doctoral: “Evolución de los residuos de plaguicidas en frutas cítricas frescas. Incidencia sobre los aceites esenciales” – Prof. Hilda Rousserie

Catarina Pedro Pássaro Carvalho, Julián Londoño-Londoño
[http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/559/1/CAPITU
LO%2011.pdf](http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/559/1/CAPITU%20LO%202011.pdf)

Codex Alimentarius. (2000). FAO-OMS.2B.

Codex Alimentarius (2010). Manual de Procedimiento. Publicado por la Secretaria del Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO. Decimonovena Edición. Roma, Italia.

Cohn, R., Cohn, A. L. (1996). The by-products of fruit processing. En: ARTHEY, D., ASHURST, P. R. (eds). *Fruit Processing*. London: Chapman & Hall.

Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas (CCPR). 2003. Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas. CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Enmienda 2010. [En línea]. Disponible en http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10185/cxg_056s.pdf

Cortés-Aguado, S.; Sánchez-Morito, N.; Arrebola, F.J.; Frenich, A. G. & Vidal, J. L. M. (2008). Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 107, 1314–1325

Coscollá, R. (1993). Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Coscollá, R. (1998). Control de residuos de productos fitosanitarios en los alimentos. En: Los productos fitosanitarios en el marco del registro único europeo. Ed. JM García-Baudín. Min. Agric., Pesca y Alim. Madrid. Pp 33-44.

Coscollá, R. (2003). Problemas y soluciones de los residuos de plaguicidas en cítricos. Dossier Cítricos. Vida Rural. Pág. 28-32.

Cremlyn, R. (1995). Plaguicidas modernos y su acción bioquímica.

Chaulet, M. R.; Montti, M. T.; Gerard, J. A.; Raviol, F.; Subovich G. (2000). Determinación de Thiabendazole en Aceite Esencial de Naranja Valencia. Series de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Investigación El

Postgrado del IAD-DTA. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. Vol. II – I.S.B.N. N° 84-9705-013-4 – p.p. 115-124.

Danaher, M.; O’Keeffe, M.; Glennon, J.D. (2003). Development and optimisation of a method for the extraction of benzimidazoles from animal liver using supercritical carbón dioxide. *Analytica Chimica Acta*, 483, 313–324.

Danaher, M.; De Ruyck, H.; Crooks, S.R.H.; Dowling G.; O’Keeffe, M. (2007). Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 845, 1–37.

Dejaegher, B. & Vander Heyden, Y. (2007). Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, 1158, 138-157.

Dewdney M. M. and L.W. Timmer 2012. Florida Citrus Pest Management Guide: Citrus Scab. University of Florida. Factsheet PP146.

Erwin, D.C.; Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*, American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 562 pp

European Commission (2013). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/12571/2013. DG SANCO, Brussels, Belgium.

European Commission (2007). Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/2007/3131. DG SANCO, Brussels, Belgium.

European Commission (2015). Pesticides database. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database-redirect/index_en.htm

Farajzadeh, M.A.; Feriduni, B.; Afshar-Mogaddam, M.R. (2016). Development of a new extraction method based on counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction: Application for the extraction and preconcentration of widely used pesticides from fruit juices. *Talanta*, 146, 772-779.

FAO. (2003). <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S05.htm>

FEDERCITRUS (2012) La actividad cítrica Argentina. http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/La_Actividad_Citricola_2012.pdf

FEDERCITRUS (2015) La actividad cítrica Argentina. http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/La_Actividad_Citricola_2015.pdf

FMC. The FMC oil recovery system. Tech. Bull. 1980

Fritz, J.S. (1999). Analytical Solid-Phase Extraction. Wiley-VCH, New York.

Fuentes, A.; García-Martínez, E.; Fernández-Segovia, I. (2015). Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas. <http://hdl.handle.net/10251/51363>

García-Reyes, J.F.; Ferrer, C.; Gómez-Ramos M. J.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2008). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. Trends in *Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 3.

Garrido Frenich, A.; Romero-González, R.; Plaza-Bolaños, P.; Martínez-Vidal, J. L. (2014) Veinte años de análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas. Boletín GRASEQA Seguridad Alimentaria. Vol. Nº7, pág. 3 http://www.seqa.es/graseqa2012/boletin_graseqa_7_2014.pdf

Gerard, J.; Montti, M.; Chaulet, M.; Raviol, F.; Garavello, F.; Subovich, G. (2000). Penetración y Persistencia del Thiabendazole en Naranja Valencia. Series de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Investigación El Postgrado del IADDTA. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. Vol. II – I.S.B.N. Nº 84-9705-013 -4 – p.p. 241-252.

Gilbert-López, B.; García-Reyes, J.F. ; Molina-Díaz, A. (2009). Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review, *Talanta* 79. 109-128.

González Rumayor, V.; Ruiz Galán, O.; García Iglesias, E.; Vega García, M. (2005). Aplicaciones de la Biotecnología en Seguridad Alimentaria. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Pág. 13

Graham, J.H. y McGuire, R.G. (1987). Survival of *Xanthomonas campestris* pv. citri in Citrus Plant Debris and Soil in Florida and Argentina. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series N° 8053. Plant Disease/Vol. 71 N° 12

Graham, J.H.; Gottwald, T.R.; Cubero, J.; Achor, D. (2004). *Xanthomonas axonopodis* pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. Molecular Plant Pathology 5,1-15

Hajslová J, Holadova K, Kocourek V, Poustka J, Godula M, Cuhra P, Kempn, M. (1998). Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. J Chromatogr A 800: 283-295.

Hajšlová, J.; Cajka T., en: Y. Picó (2007). Food Toxicants Analysis. Techniques, Strategies and Developments, Elsevier B.V., Amsterdam (The Netherlands), p. 419.

Heppner, J. B. (1993). Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, in Florida (Lepidoptera: Gracillariidae: Phyllocnistinae). Tropical Lepidoptera 4: 49-64.

Hernández, F.; Pozo, O.J.; Sancho, J.V.; Bijlsma, L.; Barreda, M.; Pitarch, E. (2006) Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography---amenable pesticides and metabolites in different food commodities. J. Chromatogr. A 1109, 242-252.

Huerga M.; San Juan, S. (2005). El control de las plagas en la Agricultura Argentina. Estudio Sectorial Agrícola Rural. Banco Mundial/Centro de Inversiones FAO. Página 14.

(<http://siteresources.worldbank.org/INTARGENTINAINSPANISH/Resources/InformeDEF14.pdf>).

Informe Provincia de Entre Ríos, 2011
(<http://www.fecier.org.ar/down/InformeCitricolaEntreRios-2011.pdf>)

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), (2011). <http://www.afinoa.com.ar/noticia.asp?tabla=noticias&id=883>

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, (2012). Manual para productores de naranja y mandarina de la Región del Río Uruguay. Capítulo XI. Sitio internet: <http://inta.gob.ar/documentos/manual-para-productores-de-naranja-y-mandarina-de-la-region-del-rio-uruguay/>

Iñón, F.; Napolitano, H.; Bak, S. (2010). Introducción a la Cromatografía de Gases. Jenk s.a. Versión 2.2

Ito, Yuko; Ikai, Yoshitomo; Oka, Hisao; Hayakawa, Junko; Kagami, Tadaaki. (1998). Application of ion-exchange cartridge cleanup in food analysis I. Simultaneous determination of thiabendazole and imazalil in citrus fruit and banana using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 810, 81–87.

Kamiya, N., Lacina M., Tolosa D., Contreras C., Lagoria S., Ruiz R. M. (2010). Desarrollo y validación de una metodología para la determinación de residuos de orto-fenilfenol en aceites esenciales de frutas cítricas en Tucuman, R. Argentina. *Revista Industrial Agrícola Tucuman*. Volumen 87, n° 2.

Katagi, T. Ab initio structures of trimethyl and dimethyl phenyl phosphorothioates. *Theochem*. 68, 61-67 (1990).

Kimball, D.A. (1999). *Citrus Processing*. 2° Ed. Aspen.

Knezevic, Z Y Serdar, M (2009). Screening of fresh fruit and vegetables for pesticides residues on Croatian market *Food Control*, 20:419-422

Koesukwiwat U, Lehotay SJ, Miao S, Leepipatpiboon N. (2010). High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas chromatography- time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1217:6692–6703.

Kotze, J. M. (2000). Black spot. Pag. 23-25. En: *Compendium of Citrus Disease*. APS Press.

Kulczycki, C., Navarro, R., Turaglio E., Becerra, V., Sosa, A.(2012). Cinética de degradación y persistencia de clorpirifós en mandarinas y naranjas del Noreste argentino (NEA). *RIA/ Vol. 38. N. ° 3. Pag. 282-288*.

Lamarque, A.; Zygadlo, J.; Labuckas, D.; Lopez, L.; Torres, M.; Maestri, D. (2008). Fundamentos Teóricos-Prácticos de Química Orgánica. Encuentro Grupo Editor. Primera edición, pág. 55

Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A. (2007). Methods of sample preparation for determination of pesticide residue in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review Anal. Bioanal. Chem.; 389: 1663-1683.

Lorente, J.; Valero, M.; Ancos, B.; Marti, N.; García, S.; López, N.; Ramos, S.; Esturo, A. (2011). Aspectos industriales. Editorial Agrícola Española. Capítulo 5, pág. 80-83

Sitio internet:
http://digital.csic.es/bitstream/10261/89988/4/Aspectos_industriales.pdf

Marcó, G. (2001) Cítricos argentinos con calidad asegurada- INTA- IDIA XXI

Martínez, H.J. (2016). Evolución de los residuos de plaguicidas en frutas cítricas frescas. Incidencia sobre los jugos cítricos concentrados. Tesis Doctoral. Ed. Universitat Politècnica de València.

Masson, P. (2007). Quality control techniques for routine analysis with liquid chromatography in laboratories. Journal of Chromtography A, 1158, 168-173.

Mazzuz, C.F. (1996). Calidad de frutos cítricos. Manual para su gestión desde la recolección hasta la expedición. Barcelona: Edición de Horticultura.

Melia, A.; Blasco J. (1980). Los pulgones de los cítricos. Resultados de varios ensayos de productos para determinar la eficacia sobre las diferentes especies. Bol. Serv. Plagas, 6: 67-73.

Milan, R.; Celma, E. (1984). Regulación de los residuos de plaguicidas en productos agrarios . I Sympouim Nacional de Agroquímicos. Sevilla

Monti M., Gerard J., Chaulet M., (1998). "Penetración y Persistencia del Thiabendazole en Naranja Valencia y Jugos Concentrados. Estratto da Essenze - Derivati Agrumari - Anno LXVIII n.2, 124-139.

Montti, M.I., Visciglio, S.B., Raviol, F.H., Subovich, G.E., Munitz, S. (2013). Incidencia de la carga inicial de pesticidas en fruta sobre los niveles residuales en aceites esenciales cítricos. *Ciencia, Docencia y Tecnología*. Universidad Nacional de Entre Ríos. Vol. XXIV, núm. 47, pp. 187-218.

Nakamura, M., Furumi Y., Watanabe F., Mizukoshi K., Taniguchi, M., Nemoto, S. (2010). Determination of Carbendazim, Thiophanate, Thiophanate-methyl and Benomyl Residues in Agricultural Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Hyg. Saf. Sci.* Vol. 52, No. 3.

OMS, 1992. Organización Mundial de la Salud y Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Ginebra. Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Guía para Muestreo de Alimentos. <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/mod/resource/view.php?id=9724>

Organización Panamericana de la Salud. (2002). Validación de Métodos Analíticos. http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_d_e_Metodos_Fisicoqcos.pdf.

Palacios, J. (2005). Citricultura: Capítulo XV. Talleres Gráficos “Alfa Beta S.A.C.I.F. y S.” 518 pp - Buenos Aires.

Papadopoulou-Mourkidou, E. (1991). Agroquímicos postcosecha aplicados y sus residuos en las frutas y verduras frescas. *J Assoc Off Anal Chem* 1.991 mil Sep-Oct; 74 (5): 745-65.

Pássaro Carvalho C. P. y Londoño-Londoño J. (2012). Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización. Industrialización de cítricos y valor agregado. Capítulo 11, pág. 328 Serie Lasallista Investigación y Ciencia. Corporacion Universitaria Lasallista

Pattanasupong, A.; Nagase, H.; Sugimoto, E.; Hori, Y.; Hirata, K.; Tani, K.; Nasu, M. & Miyamoto, K. (2004). Degradation of Carbendazim and 2,4-Diclorophenoxyacetic Acid by Immobilized Consortium on Loofa Sponge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 98, N° 1, 28-33.

Perkin Elmer (2009). Migración de métodos de HPLC a UHPLC: aplicación en el campo alimentario. Interempresas. <http://www.interempresas.net/Laboratorios/Articulos/35270-Migracion-de-metodos-de-HPLC-a-UHPLC-aplicacion-en-el-campo-alimentario.html>

Perry, J. A. (1981). Introduction to Analytical Gas Chromatography: History, Principles and Practice. Vol. 14. Chromatographic Science Series. Marcel Dekker.

Polek, M.; Vidalakis, G.; Godfrey, K. (2007). Citrus bacterial canker disease and huanglongbing (citrus greening). The introduction of citrus canker into California.

Prusky, D.; McEvoy, J.L.; Saftner, R.; Conway, W.S.; Jones, R. (2004). Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium spp.* on apple and citrus fruit. *Phytopathology* **94**, 44-51

Quattrochi, A.O.; Andrizzi, S.A.; Laba, R. F. (1992). Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. ISBN 950-43-4181-0. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires.

Ramírez Lluch, A.E.; Cruz, S. (2011). Clorosis Variegada de los Cítricos (Citrus variegated chlorosis)/ (bacteria). Programa CAPS Boletín CAPS: 002- 2011 Page 4

Retamar, J. A. (1982). Aceites esenciales de especies vegetales diversas: sus posibilidades químicas. Santa Fe: IPNAYS.

Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M.R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 1-9

Ridgway, K.; Lalljie, S.P.D.; Smith, R.M. (2009). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods *J. Chromatogr. A*; 1153: 36-53.

Ripa, R.; Larral, P. (2008). Manejo de Plagas en paltos y cítricos. Colección Libros INIAS N°23, 123-132.

Rodríguez, J. C. V.; V. Rossetti; M. Machado; T. Sobrino e N. L. Nogueira. 1998. Lagarta minadora dos citros: um fator do aumento de pragas e cancro cítrico. *Laranja* 19: 49-60.

Romero García, A. S. (2002). Cromatografía. Curso de Métodos. Instituto de Biotecnología, UNAM.

Rouvière, F., Buleté, A., Cren-Olivé, C., y Arnaudguilhem, C. 2012. «Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction». En: *Talanta*, 93, pp. 336-344.

SENASA, (2015). (www.senasa.gov.ar)

Smilanick, J.L.; Sorenson, D. (2001). Control postharvest decay of citrus fruit with calcium polysulfide. *Postharvest Biology and Technology* 21, 157-168

Smilanick, J.L; Mansour, M.F. (2007). Influence of temperature and humidity on survival of *Penicilium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*. *Plant Disease* 91, 990-996

Smilanick, J. L.; Mansour, M. F.; Gabler, F. M.; Sorenson, D. (2008). Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology* 47, 226–238.

Spósito, M.B.; Amorim, L.; Belasque Junior, J.; Bassanezi, R.B.; Aquino, R. (2004). Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. *Fitopatol. bras.* vol.29 no.1 Brasília Jan./Feb. 2004.

Stashenko, E. E.; Martínez, J. R. (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica* 2011; 3(1):25-49

Stajnbaher, D. & Zupancic-Kralj, L. (2003) Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015, 185-198.

Stein, B. (2011). Estrategias de manejo y prevención de enfermedades fúngicas para la producción de fruta fresca de exportación. 2° Taller Internacional sobre Plagas Cuarentenarias de los Cítricos Manzanillo, Colima, México.
(file:///C:/Users/hildarouserie/Downloads/07%20Beatriz%20Stein.pdf)

Tennant, P.F.; Robinson, D.; Fisher, L.; Bennett, S.M.; Hutton, D.; Coates-Beckford, P.; McLaughlin, W. (2009). Diseases and Pests of Citrus (Citrus spp.). Tree and Forestry Science and Biotechnology. Global Science Books

Thomas, M. C.; Heppner, J. B.; Woodruff, R. E.; Weems, H. V.; Steck, G. J.; Fasulo, T. R. (2001). Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae). IFAS Extension, University of Florida. EENY-214.

Valcárcel Cases, M.; Gómez Hens, A. (1988) Técnicas analíticas de separación Editorial Reverte. Pág. 508-509

Veneziano, A.; Vacca, G.; Arana, S.; De Simone, F. & Rastrelli, L. (2004). Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) samples imported to Italy. *Food Chemistry*, 87, 383-386.

Villalba Buendía, D. (1997). Enfermedades producidas por hongos en los cítricos. *Vida Rural*, N°48, 44-41.

Visciglio, S. (2011). Tesis Doctoral: “Desarrollo de metodologías alternativas para el análisis de fungicidas benzimidazólicos en matrices cítricas”. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos.

Wu, Q .; Li, Y .; Wang, C .; Liu, Z .; Zang, X .; Zhou, X. y Wang, Z. (2009). Dispersiva de liquidez microextracción líquido combinada con cromatografía de líquido de alto rendimiento detección de fluorescencia para la determinación de carbendazim y tiabendazol en muestras ambientales. *Analytica Chimica Acta*, 638 (2), 139-145, ISSN 0003 a 2.670 <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/12392.pdf>

Páginas de internet consultadas

Tesis doctoral: “Evolución de los residuos de plaguicidas en frutas cítricas frescas. Incidencia sobre los aceites esenciales” – Prof. Hilda Rousserie

-
- <http://www.cecnea.com/es/exportacion/default.htm>
- <http://www.eeaoc.org.ar/upload/publicaciones/archivos/29/20120207185614000000.pdf>
- <http://www.infoagro.com/citricos/naranja2.htm>
- <ftp://tesis.bbt.ull.es/ccppytec/cp582.pdf>
- <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>
- <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>
- <http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/C-QUIMICO.pdf>
- http://www.infoagro.com/abonos/lmr_materia.asp?id=347
- http://www.cromlab.es/EFS_Principal.htm
- http://www.cromlab.es/EFS_HS_QUECHERS.htm
- <http://www.sepscience.com/Techniques/Sample-Prep/Articles/865-QuEChERS>
- <http://pt.slideshare.net/marcelborgesb/cromatografia-líquida-moderna>
- <https://ztfnews.wordpress.com/2014/08/18/richard-l-m-synge-1914-1994/>
- <http://www.bvsde.paho.org/cursode/e/modulo3-2.php>
- http://www.sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2014-05-01_11-59-0899004.pdf