

Incidencia de la carga inicial de pesticidas en fruta sobre los niveles residuales en aceites esenciales cítricos

Montti, María I.; Visciglió, Silvia B.; Raviol, Fabricio H.; Subovich, Gladys E.; Munitz, Martín S.

Resumen

En Argentina, la producción cítrica es muy importante. Para el control de enfermedades y plagas en las quintas y empaques son utilizados diferentes pesticidas. Los objetivos de este estudio fueron: optimizar diferentes metodologías analíticas para la determinación de residuos de pesticidas en fruta y aceite esencial, y determinar el efecto de la carga inicial sobre los aceites esenciales obtenidos durante el proceso industrial. La calibración se llevó a cabo con matriz adicionada debido al efecto matriz. Los métodos propuestos fueron selectivos, precisos, exactos y sensibles. La concentración de residuos encontrados en fruta fresca varió dependiendo del lote y pesticida. La persistencia en fruta postlavada, aceite pulido y descerado fue distinta para cada analito. Se observó una ligera reducción de los residuos en el aceite descerado debido probablemente a la partición de los mismos en la fase cerosa. Los resultados muestran que la carga inicial en la fruta es significativa.

Palabras clave: tecnología de alimentos, pesticidas, cítricos, aceites esenciales

Artículo derivado del PID UNER 8043, desarrollado en la Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos –UNER–; recibido en marzo 2013; admitido en setiembre 2013.

Autores: Laboratorio de Investigación de Residuos de Plaguicidas en Alimentos, Facultad de Ciencias de la Alimentación, UNER (Concordia, Argentina).

Contacto: monttim@fcal.uner.edu.ar

Incidence of the initial pesticides charge in fruits upon residual levels in citrus essential oils

Abstract

Citrus represent an important crop in Argentina. Pesticides are usually applied for disease control in orchard and packinghouses. The present study aimed to optimize different methods for pesticide residues analysis in citrus fruits and essential oils, and to determine the effect of the initial pesticide charge in fruits upon the essential oils obtained during the industrial process. The calibration was performed on spiked samples because of the occurrence of matrix effect. The suggested methods were found to be selective, precise, highly accurate and sensitive. The amount of residues observed in fresh fruit varied depending on the different lots and pesticides. The persistence in post washed fruit, polished and dewaxed oils were different for each pesticide. The partitioning in the wax phase may be the reason for the slight residue reduction observed in the dewaxed oils. Results showed that the initial pesticide charge in fruits is significant.

Keywords: food technology, pesticides, citrics, essential oils

Incidência da carga inicial de pesticidas em fruta nos níveis residuais em óleos essenciais cítricos

Resumo

Na Argentina, a produção de citros é muito importante. Para o controle de doenças e pragas nos pomares e embalagens são utilizados diferentes pesticidas. Os objetivos deste estudo foram otimizar diferentes metodologias analíticas para a determinação de resíduos de pesticidas em fruta e óleo essencial, e determinar o efeito da carga inicial nos óleos essenciais obtidos no processo industrial. A calibração foi realizada com matriz adicionada devido ao efeito de matriz. Os métodos propostos foram seletivos, precisos, exatos e sensíveis. A concentração de resíduos encontrados na fruta fresca variou dependendo do lote e pesticidas. A persistência em fruta após lavada, óleo polido e desparafinado foi diferente para cada analito. Foi observada uma ligeira redução dos resíduos no óleo desparafinado devido provavelmente à partição deles na fase de cera. Os resultados mostram que a carga inicial na fruta é significativa.

Palavras chave: tecnologia de alimentos, pesticidas, cítricos, óleos essenciais

I. Introducción

La actividad cítrica en Argentina se desarrolla principalmente en dos regiones bien definidas: la región del Noroeste Argentino (NOA) y la región del Nordeste (NEA). Esta última comprende las Provincias de Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Buenos Aires y sur de Santa Fe. Entre Ríos se sitúa como la principal provincia productora de naranja y mandarina, cuya producción se localiza sobre la costa del Río Uruguay en los Departamentos de Concordia, Federación y Norte de Colon.

Una parte importante de la producción nacional se exporta a distintos mercados internacionales bajo la forma de jugos concentrados, aceites esenciales, pellets, cáscara deshidratada, pulpa congelada, limoneno, etc. [1]. Argentina se encuentra entre los principales exportadores de aceites esenciales del mundo, fundamentalmente el aceite obtenido a partir de limón, siendo los principales mercados la industria de aromas y bebidas [2, 3]. Estos productos, de relevante impacto económico en la industria cítrica, definen su valor en el mercado externo en función de sus propiedades y características fisicoquímicas. En este sentido, uno de los factores de calidad de fundamental importancia a considerar, al momento de la comercialización, es el contenido de residuos de plaguicidas en el producto, el que se encuentra en estrecha relación con los niveles residuales en la fruta utilizada como materia prima [4].

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 al momento de la comercialización de los mismos [5].

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 todas las variedades de cítricos, se los encuentra contenidos en receptáculos o vesículas oleosas en el flavedo, y la cali-

dad y cantidad de estos aceites depende de la variedad y madurez de la fruta, como de la localización de la plantación. El aceite 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 [6].

La metodología de extracción es de fundamental importancia en la calidad de los aceites. El rendimiento de extracción por tonelada de fruta fresca es de aproximadamente un 0.4 % en limón, 0.2-0.4 % en naranjas y 0.2 % en pomelos. El método de obtención de los aceites esenciales contenidos en la cáscara de las frutas cítricas depende, en principio, del tipo de extractor de jugo utilizado en la línea de la industria. Dos son los tipos de extractores más conocidos: el tipo 1, que separa el aceite de la fruta simultáneamente durante el proceso de extracción de jugo y se usa en la mayoría de los países productores, y el tipo 2, con el cual la extracción de aceites esenciales es previa a la extracción de jugo.

En la industria, con sistema de extracción simultánea de jugo y aceite, el proceso se inicia cuando la fruta que ingresa en la línea es lavada y cepillada con agua, desinfectantes y detergentes específicos. Posteriormente es secada, seleccionada y clasificada por tamaño antes de ingresar a las extractoras. Durante la extracción, se produce la explosión de los sacos de aceites esenciales contenidos en el flavedo y el aceite liberado es arrastrado por una corriente de agua, formando una emulsión de 0,8-1 % la cual pasa por un *finisher* para separar los restos de flavedo. La emulsión filtrada es derivada a las centrífugas concentradoras de platos autolimpiantes, que separan tres fases: una liviana o aceitosa, una pesada o acuosa y una semisólida en las descargas de lodos. La fase pesada retorna como agua de extracción al sistema, evitando así pérdidas de aldehídos por dilución, mejorando la calidad de los efluentes.

Las centrífugas son alimentadas con la fase liviana o emulsión rica en aceite esencial, regulándose el agua de arrastre. El aceite obtenido de la centrífuga pulidora (aceite pulido) es envasado en tambores acondicionados a tal fin y colocados en forma inclinada durante no menos de 10 días, a fin de decantarlos, ya que estos aceites contienen un 0.5-1% de ceras.

La calidad de Aceite Descerado corresponde a los aceites que son sometidos a un posterior descerado a temperaturas de -18°C durante 15 a 30 días. Debe ser un producto brillante y no presentar ceras a temperatura ambiente.

Teniendo en cuenta que, en nuestro país, las prácticas agrícolas son, en su mayoría, las tradicionales, es decir que se utilizan plaguicidas para el control de plagas tanto en los cultivos como en postcosecha, es previsible la presencia de residuos en los frutos y/o en sus productos industriales, tal como puede observarse en las diferentes referencias [4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. Los plaguicidas para el control de diferentes plagas en los cultivos son, en su mayoría, de carácter sistémico, es decir que tienen la propiedad de penetrar en el tejido vegetal y su degradación es, por lo tanto, regularmente lenta. La acción sobre los patógenos es muy diversa y depende de fundamentalmente del tipo de plaguicida, del sustrato vegetal, de las dosis concentraciones y tipo de aplicación, condiciones ambientales y además de otros diversos y numerosos factores. La evolución y persistencia en los frutos al momento de cosecha es muy variable y pueden ser detectados niveles muy diferentes entre las mismas y/o diversas variedades de frutas cítricas. Además, a esto se le suman otros residuos provenientes del drenchado que se aplica en postcosecha para preservar la producción hasta su procesamiento [9, 12].

La fruta destinada a empaques es nuevamente tratada, fundamentalmente con diversos fungicidas que tienden a controlar las importantes pérdidas por pudriciones fúngicas que pueden ocurrir durante el transporte a los mercados internacionales. En nuestra región, los plaguicidas de precosecha son en su mayoría insecticidas, algunos herbicidas y diversos tipos de fungicidas. Entre los plaguicidas más comúnmente utilizados, podemos citar a: clorpirifos, cipermetrina, procloraz, bromopropilato, benomil, carbendazín, imazalil, 2,4-diclorofenoxiacético, orto-fenifenol, thiabendazole, carbendazín y otros fungicidas de más reciente aplicación, tales como los triazoles y estrobirulinas.

En nuestro país, la legislación (SENASA) establece para todos los plaguicidas los límites máximos de residuos permitidos (LMR) para

frutas; sin embargo, no existe legislación respecto de los niveles residuales para los aceites esenciales, y las exigencias son las impuestas por los mercados.

Los plaguicidas, a nivel mundial, constituyen una problemática compleja y polifacética, no sólo desde el punto de vista del sector agrícola e industrial, sino de todo el sistema ambiental y también económico. Asimismo, constituyen un problema para el hombre como consumidor de productos alimenticios tratados, dada la acumulación de residuos en los mismos, en especial los no biodegradables. Es por esto que se hace necesario el uso racional de los plaguicidas, el empleo de dosis mínimas capaces de efectuar el control de las enfermedades o plagas y de evitar la resistencia de los agentes patógenos a los mismos [14]. Aun así, la temática es de una alta complejidad y se requieren controles constantes de los residuos.

El incremento permanente de las exportaciones, asociado con las exigencias de los mercados en productos frescos y procesados, hace pensar en la importancia de determinar la variabilidad de los residuos en la línea de producción industrial, al momento de competir en calidad y precio. 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 de los fitosanitarios utilizados en los tratamientos, la forma en que se depositan, la penetración y persistencia en el tejido vegetal, niveles residuales en frutos y productos derivados, como así también tener en cuenta la factible disminución o eliminación de los residuos por causas diversas y/o durante los procesos tecnológicos a los que son sometidos los frutos, ya sea en quintas, empaques, industria u otros.

En investigaciones previas se han determinado, en frutos cítricos, la penetración y las curvas de disipación de estos fungicidas, la dinámica de estos procesos y los factores incidentes [9, 12]. En los productos cítricos en general, podemos suponer que existen dos factores predominantes que pueden incidir en los niveles residuales de plaguicidas, fundamentalmente en los aceites esenciales. Uno es el contenido residual de plaguicidas en las frutas utilizadas en la industria y otro son

los procesos o tecnologías de elaboración para la obtención de estos productos industriales.

El ingreso de fruta con diferentes niveles residuales en la línea de producción industrial tendrá incidencia fundamentalmente en los aceites esenciales, ya que la capa lipofílica y la importante densidad de glándulas o vesículas de aceites esenciales en la corteza de los cítricos favorecen el bloqueo de plaguicidas liposolubles, pues allí son relativamente estables, lo que contribuye notablemente a su mayor persistencia. Es predecible que la eliminación y/o degradación de estos residuos sea problemática. Sin embargo, la etapa de lavado y cepillado de la fruta es uno de los procesos tecnológicos que puede ser considerado como el más importante en la posible reducción de los niveles residuales; el sistema de extracción y el descerado, según la naturaleza del o los plaguicidas en cuestión, pueden también contribuir a la disminución o no, dada la mayor o menor afinidad de los mismos por la fase oleosa.

En el trabajo que aquí se expone se plantearon como objetivos: optimizar diferentes metodologías analíticas para la determinación de residuos de pesticidas en fruta y aceite esencial y evaluar los factores de incidencia en la eliminación y/o degradación de la carga inicial de residuos en la fruta sobre los aceites esenciales cítricos. En función de ello, se seleccionaron diferentes puntos de muestreo en la línea de producción a fin de determinar los niveles residuales de los plaguicidas detectados en las correspondientes muestras procesadas, tales como en frutas al ingreso y post lavado, aceite pulido y aceites esenciales descerados por frío.

II. Materiales y métodos

II.1. Equipamiento

Para las determinaciones analíticas en las diferentes matrices se utilizaron los siguientes equipos cromatográficos:

- Cromatógrafo gaseoso (GC) Hewlett Packard Modelo 6890. Inyector de Vaporización con Temperatura Programada (PTV), y puerto de inyección modo split/splitless. Liner de 0.75 mm de diámetro interno (para SPME). Muestreador automático HP 7683, columna capilar HP5

MS (30 m x 0,25 mm x 0,25u m). Detector Selectivo de Masa (MSD) HP 5973. ChemStation HP. Biblioteca NIST y RTL Pest.

- Cromatógrafo gaseoso (GC) Hewlett-Packard Modelo 6890, con inyector split-splitless, detector de micro captura de electrones (μ -ECD) y columna capilar HP-5S (30 m de largo x 0.25 mm de diámetro interno x 250 μ m de espesor de fase estacionaria). Inyector automático equipado con bandeja para 100 viales y muestreador automático y ChemStation HP.

- Cromatógrafo gaseoso (GC) Hewlett-Packard Modelo 5890 Serie II, inyección capilar split/splitless, Inyector automático Hewlett Packard Modelo 6890 y Chem station HP. Versión A.03.34 y Detector de Nitrógeno-Fósforo (NPD). Columna Agilent HP – 5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 μ m. Liner de 900 μ l – 78,5 x 6,5 mm, (para inyección directa y Liner de 0.75 mm de diámetro interno (para SPME).

- Cromatógrafo líquido (HPLC) Shimadzu LC-20A Prominence, equipado con un modelo LC-20AT de sistema de bombeo cuaternario de solvente y desgasificador DGU-20 A5, automuestreador automático de tipo inyección total para 105, horno Shimadzu CTO-20A con controlador automático de temperatura, columna VP ODS 250L x 4.6. PC con software CLASS-VP versión 6.14 SP1. Detectores de arreglo de diodos (DAD) y detector de Fluorescencia RF-10AXL

- Cromatógrafo Líquido (HPLC) Hewlett Packard Modelo 1050 con detector de longitud de onda variable Modelo 79856AX y columna cromatográfica HP C18 fase reversa, de acero inoxidable de 200 mm x 4,6 mm od con Hypersil ODS tamaño de partícula 5 μ . Inyector Rheodyne Mod.7125, loop de 100 μ l conectado a la columna. Método de inyección: llenado total del loop. Chem Station HP 3365 Series II.

II.2. Reactivos

Acetonitrilo grado GC y HPLC (J.T.Backer), Metanol grado pesticida (Merck), Hexano grado pesticida (Merck), Na_2SO_4 anhidro, MgSO_4 anhidro (Anedra), NaCl (J.T.Backer), C_{18} adsorbente Sigma Aldrich, estándares certificados de clorpirifos, cipermetrina, procloraz, bromopropilato, benomil, carbendazin, imazalil, 2,4-diclorofenoxiacético, orto-fenifenol, thiabendazole, metiltiofanato, cipermetrina (Accu Standard Inc), agua grado 1. Fibras de sílica fundida recubiertas con Polidimetilxilosano

(PDMS), Poliacrilato (PA) y Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB); marca Supelco de 100, 85 y 65 μm respectivamente.

II.3. Plan de muestreo

Los aspectos metodológicos del plan de muestreo y preparación de las muestras constituyen una etapa crítica en todo desarrollo o método de análisis, por lo que se debieron establecer ciertas consideraciones previas, en función de los objetivos a alcanzar y de la metodología analítica a aplicar.

Para estándares, blancos de muestra y muestras adicionadas, el plan sólo involucró la etapa de preparación de las muestras para el análisis en laboratorio, según las condiciones específicas para este tipo de muestras. Se tomaron como base para el muestreo y calidad del mismo, las normas establecidas por FAO/OMS y el *Codex Alimentarius*, teniendo en cuenta la homogeneidad de las muestras [15]. Se resumen, a continuación, las diferentes características del plan de muestreo para el muestreo de un lote: Identificación y propósito del plan, alcance o amplitud de cobertura, campo de aplicación (es decir qué y dónde será efectuado el muestreo), procedimientos de muestreo, tamaño y toma de las muestras, etiquetado, transporte y almacenamiento de las muestras.

Dado que las épocas de producción y tiempos de cosecha son relativamente cortos, se estableció como variedades a las de mayor volumen de producción en el periodo de cosecha. Las variedades cítricas fueron seleccionadas según la producción de cítricos en la región, por lo que se identificaron como muestras a evaluar, las frutas y los aceites esenciales obtenidos en la industria correspondientes a: *naranja Valencia* y *mandarinas*; respecto a las muestras de *mandarina*, ésta estuvo compuesta por diferentes variedades, ya que no se diferencian los aceites esenciales para cada una de ellas.

En cada temporada de producción se evaluaron los residuos de 10 lotes de cada variedad, efectuándose 5 muestreos por lote.

Teniendo en cuenta las diferentes etapas del proceso, se establecieron los puntos de muestreo, identificándose las muestras según los mismos: *frutas ingreso* (al ingreso de la línea), *frutas post lavado* (antes de su ingreso a la extractora), *aceite esencial pulido* (a la salida de la

centrífuga pulidora) y *aceite esencial descerado* (del tambor del lote correspondiente a aceite descerado a temperaturas de -18°C durante 15 a 30 días).

El intervalo de muestreo en la línea de producción para las muestras de frutas fue de 120 minutos por cada turno laboral. Una vez puesto el sistema en régimen, se efectuaron los muestreos de las restantes matrices, quedando los tiempos condicionados al proceso de obtención de los aceites esenciales, por lo que el muestreo efectuado en las tres temporadas de producción puede resumirse de la siguiente manera:

- *Número Total de lotes Naranja Valencia: 30*
- *Número Total de lotes Mandarina: 30*
- *Número de muestreo por lote: 5*
- *Número total de muestras: 300*
- *Puntos de muestreos: ingreso a la línea, post lavado, a la salida de la centrífuga - pulidora y tambores de aceite descerado*
- *Frecuencia de muestreo en la línea de producción para muestras de frutas y aceite pulido: cada 120 minutos por cada turno laboral.*

El tamaño muestral fue:

a) *Frutas cítricas: 10 unidades al azar (cada 120 minutos por turno laboral).*

b) *Aceite pulido: 50 mililitros en cada intervalo de muestreo.*

c) *Aceite descerado: 100 mililitros de cada tambor del lote.*

Todas las muestras fueron perfectamente identificadas y rotuladas: Fecha y hora de muestreo, variedad cítrica y N° de lote, punto de muestreo y responsable técnico del muestreo. Las muestras de frutas fueron conservadas en bolsas de red, en cámaras, en tanto que los aceites pulido y descerado, en frascos de vidrio color caramelo con tapa y contratapa de teflón o aluminio.

De similar manera, se obtuvieron las muestras de frutas y aceites correspondientes, libres de plaguicidas, a fin de ser identificadas como blanco de muestras y muestras adicionadas.

La hoja de ruta contaba con los siguientes datos: Origen o Proveedor/es identificado/s como: fruta proveniente de quinta y/o empaque. Información de los plaguicidas utilizados en el drencher y/o empaque; Fecha de inicio y finalización del proceso; tonelada de fruta procesada;

cantidad de aceite esencial obtenido durante el proceso del lote; N° de Lote de procedencia, proceso y tiempo de descerado para el caso de los aceites y responsable técnico del muestreo.

II.4. Submuestreo. Preparación de las muestras para el análisis en laboratorio

El método de submuestreo adoptado fue el de preparación de una muestra de laboratorio compuesta, tanto para fruta como para aceite.

Frutas Cítricas: la muestra compuesta se obtuvo a partir de los elementos o unidades correspondientes al lote muestreado, en el momento de recepción de las mismas. Se tomaron, al momento del análisis, porciones de la muestra compuesta, efectuándose la reconstitución y homogenización previa.

Muestras de aceite pulido: se prepararon a partir de las diferentes fracciones obtenidas a la salida de la centrífuga pulidora, durante el proceso en la línea.

Muestras compuestas de los aceites descerados: se prepararon mezclando las diferentes fracciones obtenidas de los tambores, pos almacenamiento en cámara, representativas del lote correspondiente.

II.5. Preparación de estándares y muestras adicionadas

Se prepararon soluciones de estándares de clorpirifos, cipermetrina, procloraz, bromopropilato, benomil, carbendazin, imazalil, 2,4-dicloro-fenoxiacético, orto-fenifenol, thiabendazole, metiltiofanato, cipermetrina en diferentes solventes y concentraciones, en función de la metodología analítica a aplicar, los límites máximos de residuos permitidos y/o la concentración esperada de este analito en las muestras.

A partir de muestras de frutas y aceites, cuya trazabilidad y control analítico permitía considerarlos como blancos de muestra, se prepararon las muestras adicionadas a diferentes concentraciones a fin de evaluar el efecto matriz y determinar el método de calibración a adoptar [15, 16, 17].

II.6. Tratamiento previo de las muestras

II.6.1. Frutas Cítricas

Para la determinación de los residuos en las diversas matrices cítricas, el tratamiento previo de las muestras se efectuó teniendo en cuenta la naturaleza del o los analitos a evaluar y el sistema cromatográfico a adoptar. Esto involucró la aplicación y optimización de diferentes técnicas extractivas tales como las que utilizan adsorbentes (Extracción en Fase Sólida –SPE–), polímeros selectivos (Microextracción en Fase Sólida –SPME–) y el método denominado por las siglas QuEChERS (acrónimo inglés de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* y *Safe* [rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro]), en el que se tratan previamente las muestras con NaCl y $MgSO_4$ ó Na_2SO_4 , con posterior extracción mediante acetonitrilo, eliminación de interferencia y concentración por SPE [8, 10, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24].

Se detallan a continuación, para las muestras compuestas de frutas cítricas homogeneizadas, los procesos extractivos aplicados:

a) *Método extractivo QuEChERS modificado para muestras de frutas y posterior determinación de los analitos por GC y HPLC*: En tubo de centrífuga de 25 ml, la fruta es exactamente pesada, aproximadamente 10 g, se adicionan 5 g de Na_2SO_4 , 1g de NaCl y 10 ml de acetonitrilo. Se agita en Vortex durante 3 a 5 minutos y luego se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm. Se llevan las muestras al freezer hasta congelación de la fase acuosa y se extrae la fase orgánica sobrenadante. Los diferentes extractos son mezclados y filtrados con Na_2SO_4 a través de papel de filtro Whatman N° 90, hasta un volumen final de muestra de 25 ml. Para algunos analitos y/o para su identificación por GC-MSD, se utilizaron cartuchos de SPE rellenos con 0.5 g de un adsorbente específico, el cual es activado con 2 ml de metanol; el extracto es transferido al cartucho, se lleva a sequedad y posteriormente se eluyen los analitos con el adecuado solvente hasta un volumen final de 5 ml.

b) *Método por microextracción en fase sólida (SPME)*: En tubo de centrífuga de 25 ml, la fruta es exactamente pesada, aproximadamente 10 g, se adicionan 1g de NaCl y 10 ml de agua grado 1 y se agita en Vortex durante 3 a 5 minutos y luego se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm a fin de extraer la fase sobrenadante. Los diferentes extractos acuosos

son mezclados y filtrados a través de papel de filtro Whatman Nº 90. La muestra acuosa es posteriormente llevada a neutralidad con NaOH y a un volumen final de 25 ml. Para algunos analitos el pH se ajusta a un valor de 5 o 6, generalmente el que tiene la muestra acuosa original.

La optimización de esta metodología involucra posteriormente la selección del polímero de recubrimiento, tiempo de inmersión de la fibra, tipo y tiempo de agitación, volumen mínimo de muestra, temperatura y tiempo de desorción en el puerto de inyección. Se utilizaron diferentes polímeros selectivos a fin de lograr la mayor efectividad del proceso. Los mismos variaron en virtud de los analitos a determinar, y los tiempos de inmersión oscilaron entre 10 y 15 minutos; las muestras se mantienen a temperatura de ambiente climatizado a 23 °C aproximadamente, aplicando agitación magnética a 2000 rpm y tiempos de desorción de 3 a 5 minutos.

II.6.2. Aceites esenciales

En tubo de centrífuga de 10 ml, el aceite es exactamente pesado; a alrededor de 1g, se le adiciona 1ml de acetonitrilo y se agita vigorosamente durante unos minutos. La mezcla es llevada a baja temperatura por 10 minutos. La fase sobrenadante es extraída, repitiéndose el proceso. Se mezclan las extracciones, se filtran a través de membranas de 0,45 µ con Na₂SO₄ y se llevan a un volumen final de 8 ml con acetonitrilo.

Para algunos analitos, la metodología de preparación de las muestras fue una adaptación de la ASTM D4059 - 2000, para compuestos bifenilos policlorinados en aceites de transformadores, en la que se utiliza hexano. El proceso consistió en una simple dilución de las muestras, seguida de un *clean up* con florisil. Este adsorbente permite retener y, por consecuencia, limpiar la muestra de componentes polares presentes en la matriz, minimizando así las interferencias, a fin de lograr cromatogramas más limpios.

En tubo de centrífuga de 25 ml, la muestra fue exactamente pesada, aproximadamente 0,5 g, se adicionó hexano hasta un volumen final de 10 ml; posteriormente se agregan aproximadamente 1,5 a 2 g de florisil y se agitó en Vortex durante 3 a 5 min. Las muestras fueron filtradas a través de filtros de 0,45 µ con Na₂SO₄.

II.7. Tratamiento estadístico de los datos

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa Statgraphics Centurion XV Corporate (2007). Las determinaciones hechas fueron: análisis unidimensional de los datos, desviación estándar y coeficiente de variación relativo, independencia y normalidad de los residuos, linealidad, intervalo de confianza, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación del método. La linealidad se determinó a partir de las respuestas cromatográficas de soluciones de estándares y muestras adicionadas a las diferentes concentraciones, según lo explicado en ítemes previos. Se determinaron los parámetros estadísticos correspondientes, que incluyen las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y de forma, los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados. En todos los casos, los valores de estos coeficientes indicaron que las muestras procedían de una distribución normal.

De la comparación de rectas de regresión para estándares y muestras adicionadas, el análisis estadístico indicó (p-valor para las pendientes y el punto de corte inferior a 0,01) diferencias estadísticamente significativas para los diferentes valores de soluciones de estándares y las muestras adicionadas, al 99% de nivel de confianza. Las diferencias significativas en los puntos de cortes y en las pendientes correspondientes indican efecto matriz, por lo que la linealidad del método se determinó a partir de muestras adicionadas a las concentraciones antes mencionadas.

Los resultados obtenidos para frutas y aceites esenciales de naranja y mandarina han sido calculados considerando que en la línea de producción por cada tonelada de fruta se obtienen 0,2 a 0,4 % de aceite esencial, tomándose a tal fin un valor medio de 0,3 %. Se determinó la persistencia de los residuos en aceite pulido y aceite descerado respecto a la carga inicial de residuos en fruta al ingreso de la línea y respecto al contenido residual de la fruta *post lavado*.

Las técnicas analíticas aplicadas y optimizadas para la determinación y cuantificación de los diversos plaguicidas por cromatografía gaseosa y líquida variaron en función de la naturaleza de las matrices y características fisicoquímicas de los analitos.

Se presentan a continuación los resultados correspondientes a naranja y mandarina, en forma independiente.

III. Resultados y conclusiones

Es relevante destacar que la procedencia de la fruta que ingresa a la industria es muy variada, ya que la aplicación de plaguicidas en los cultivos no es la misma, como tampoco lo son los plaguicidas utilizados por los productores. Por otro lado, en el drenchado de la fruta (aplicación por aspersión de una mezcla de plaguicidas a bajas concentraciones para preservar la fruta hasta su procesamiento final), la concentración y tipo de fungicidas no son uniformes en todos los establecimientos, lo que es un factor más de incidencia en la variabilidad y naturaleza de los residuos, al igual que las aplicaciones en empaques, en los que, además, se suma la incorporación de ceras.

Si bien la trazabilidad de las frutas debería dar información fidedigna al respecto, la realidad es más compleja, y sólo el control de los lotes que ingresan a la industria nos ha permitido establecer los valores medios de residuos presentes en las mismas. Por otro lado, se ha observado una gran variabilidad aun para una misma variedad cítrica y tipo de plaguicida. Algo similar fue observado para los aceites esenciales, pero, en algunos casos, los residuos en los mismos no habían sido detectados en las frutas, aunque esto puede ser debido a causas tales como que los niveles en fruta hayan estado por debajo de los límites de detección del método y, siendo el porcentaje de aceite que se obtiene por tonelada de fruta del 0,3%, no se detecten en aceite. Otro factor sería la posible contaminación por el procesamiento de lotes mezclados. Todo esto indicaría que los controles efectivos en la línea de producción deben efectuarse como un parámetro más de calidad de los mismos.

III.1. Fruta y aceites esenciales de Naranja Valencia

Los resultados obtenidos en los diferentes muestreos, en las tres temporadas de producción, indicaron la presencia de diversos plaguicidas tales como: procloraz, bromopropilato, O-fenilfenol, imazalil, clorpirifos, cipermetrina, carbendazin y thiabendazole.

Sólo 4 lotes fueron indicativos de la presencia de procloraz en frutas al ingreso de la línea; se registró 1 lote con captan, y sólo en 4 lotes de aceite esenciales se detectaron residuos de bromopropilato. En la

Tabla 1 se detallan los valores medios de los niveles residuales expresados en mg/kg; para orto-fenilfenol, clorpirifos, imazalil, procloraz y bromopropilato en fruta y aceites de Naranja Valencia y correspondientes a los 30 lotes muestreos efectuados en las 3 temporadas de producción industrial de aceites esenciales.

Los coeficientes de variación relativa para O-fenilfenol en fruta al ingreso, fruta post lavado, aceite pulido y aceite descerado, oscilaron aproximadamente entre: 6-10; 4-10; 1-2 y 0,9-1,9 %; clorpirifos en: 5-13; 7-17; 0,9-4 y 2-6 %; imazalil en: 1-5; 2-10; 3-8 y 2-6 %; procloraz en: 8-14; 4-12; 6-12 y 6-13 %. Para bromopropilato, en las muestras de aceite pulido y descerado fueron de 4-17 y 8-23 %, respectivamente. Para todos los casos, los valores observados están en el rango de aceptabilidad para este tipo de muestras.

Los niveles medios observados en frutas post lavado indican que dicho proceso logra la disminución de los residuos en un alto porcentaje. Sin embargo, la persistencia relativa respecto a la carga inicial de residuos en fruta presenta diferencias significativas para los distintos plaguicidas, posiblemente debido a numerosos factores, en especial la naturaleza misma del analito y/o su interacción con la matriz.

Los valores medios de persistencia relativa de residuos en los aceites esenciales se determinaron considerando los niveles presentes en la fruta lavada y teniendo en cuenta la cantidad de aceite obtenido en el proceso por cada tonelada de fruta; los mismos se detallan en la **Tabla 2**.

Los valores de los niveles de residuos observados en fruta post lavado indicaron que el lavado y cepillado en la línea logran disminuir mayormente los residuos de Imazalil y, en menor porcentaje, los de procloraz, siendo los mismos aproximadamente del 50 y 34%. Para O-fenilfenol y clorpirifos, los valores medios fueron de 45 y 46% respectivamente.

TABLA 1. Valores medios de niveles residuales expresados en mg/kg correspondientes a 30 lotes de Naranja Valencia. Temporada 2008- 2009 y 2010 (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| FRUTA INGRESO | FRUTA POST LAVADO | ACEITE PULIDO | ACEITE DESCERADO |
|------------------------------|-------------------|---------------|------------------|
| O- FENILFENOL (mg/kg) | | | |
| 0,37 ± 0,05 | 0,20 ± 0,03 | 9,20 ± 0,17 | 9,98 ± 0,21 |
| 0,47 ± 0,06 | 0,26 ± 0,03 | 10,18 ± 0,21 | 11,21 ± 0,21 |
| 1,13 ± 0,08 | 0,66 ± 0,04 | 27,36 ± 0,32 | 30,78 ± 0,35 |
| 0,83 ± 0,09 | 0,41 ± 0,04 | 15,93 ± 0,28 | 16,98 ± 0,19 |
| 0,59 ± 0,07 | 0,33 ± 0,03 | 11,68 ± 0,25 | 11,87 ± 0,25 |
| 0,75 ± 0,08 | 0,38 ± 0,03 | 16,40 ± 0,37 | 18,50 ± 0,27 |
| 0,40 ± 0,05 | 0,23 ± 0,03 | 10,27 ± 0,22 | 10,98 ± 0,25 |
| CLORPIRIFOS (mg/kg) | | | |
| 0,040 ± 0,006 | 0,021 ± 0,024 | 0,68 ± 0,02 | 0,62 ± 0,05 |
| 0,071 ± 0,010 | 0,040 ± 0,004 | 0,8 ± 0,03 | 0,68 ± 0,03 |
| 0,334 ± 0,043 | 0,18 ± 0,023 | 4,84 ± 0,05 | 4,04 ± 0,14 |
| 0,199 ± 0,022 | 0,11 ± 0,018 | 2,21 ± 0,07 | 1,98 ± 0,13 |
| 0,281 ± 0,033 | 0,17 ± 0,020 | 4,04 ± 0,16 | 3,87 ± 0,21 |
| 0,235 ± 0,036 | 0,14 ± 0,018 | 4,64 ± 0,06 | 3,60 ± 0,13 |
| 0,156 ± 0,026 | 0,09 ± 0,022 | 3,85 ± 0,19 | 3,30 ± 0,15 |
| 0,513 ± 0,034 | 0,27 ± 0,028 | 4,95 ± 0,13 | 4,88 ± 0,12 |
| 0,369 ± 0,030 | 0,19 ± 0,016 | 4,26 ± 0,15 | 4,06 ± 0,15 |
| IMAZALIL (mg/kg) | | | |
| 0,47 ± 0,03 | 0,21 ± 0,04 | 0,65 ± 0,04 | 0,70 ± 0,05 |
| 0,87 ± 0,03 | 0,41 ± 0,05 | 0,97 ± 0,10 | 1,08 ± 0,08 |
| 2,75 ± 0,09 | 1,31 ± 0,03 | 1,58 ± 0,05 | 1,94 ± 0,11 |
| 1,28 ± 0,05 | 0,68 ± 0,03 | 1,18 ± 0,09 | 1,37 ± 0,07 |
| 5,25 ± 0,10 | 2,98 ± 0,11 | 3,18 ± 0,13 | 3,97 ± 0,12 |
| 2,95 ± 0,08 | 1,38 ± 0,03 | 1,98 ± 0,11 | 2,33 ± 0,12 |
| 0,524 ± 0,03 | 0,27 ± 0,03 | 0,78 ± 0,06 | 0,81 ± 0,04 |

La tabla continúa en página siguiente >>>

| PROCLORAZ (mg/kg) | | | |
|-------------------------------|-------------|---------------|---------------|
| 0,51 ± 0,05 | 0,34 ± 0,06 | 0,99 ± 0,16 | 0,84 ± 0,07 |
| 2,21 ± 0,23 | 1,48 ± 0,08 | 3,22 ± 0,25 | 2,98 ± 0,21 |
| 1,32 ± 0,17 | 0,88 ± 0,13 | 2,2 1± 0,26 | 2,09 ± 0,20 |
| 1,05 ± 0,19 | 0,69 ± 0,06 | 2,20 ± 0,27 | 1,51± 0,25 |
| BROMOPROPILATO (mg/kg) | | | |
| - | - | 0,046 ± 0,007 | 0,042 ± 0,006 |
| - | - | 0,124 ± 0,015 | 0,109 ± 0,014 |
| - | - | 0,078 ± 0,005 | 0,073 ± 0,008 |
| - | - | 0,027 ± 0,006 | 0,025 ± 0,007 |

En cuanto a los porcentajes de persistencia de los residuos en los aceites esenciales de Naranja Valencia, podemos concluir que éstos difieren significativamente, tanto para los diferentes analitos como entre el aceite pulido y el descerado. Si bien los factores son diversos, pueden considerarse como de mayor incidencia sobre la variabilidad de la persistencia de los residuos a: los procesos de obtención, la partición o afinidad de los plaguicidas en las diferentes fases (acuosa y cerosa), la temperatura, la simple concentración (por eliminación de las ceras) y la degradación química, entre otros.

Los más altos valores de niveles residuales, como así también los porcentajes de persistencia en los aceites pulido y descerado de Naranja Valencia, fueron los correspondientes a O-fenilfenol, siendo la persistencia promedio del 12,4 y 13,4%, respectivamente. El ligero incremento en los aceites descerados puede ser debido a una simple concentración por reducción de volumen al eliminar por frío las ceras y/o a la mayor partición del analito en la fase oleosa.

TABLA 2. Valores medios de persistencia relativa de residuos de plaguicidas en fruta y aceites esenciales de Naranja Valencia. Temporada 2008- 2009 y 2010. (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| % DE PERSISTENCIA DE O-FENILFENOL | | |
|--|---------------|------------------|
| Fruta Post Lavado | Aceite Pulido | Aceite Descerado |
| 54,05 | 13,80 | 14,97 |
| 55,32 | 11,75 | 12,93 |
| 58,41 | 12,44 | 13,99 |
| 49,40 | 11,66 | 12,42 |
| 55,93 | 10,62 | 10,79 |
| 50,67 | 12,95 | 14,61 |
| 57,50 | 13,40 | 14,32 |
| % DE PERSISTENCIA DE CLORPIRIFOS | | |
| Fruta Post Lavado | Aceite Pulido | Aceite Descerado |
| 52,50 | 9,71 | 8,86 |
| 57,14 | 6,00 | 5,10 |
| 54,55 | 8,07 | 6,73 |
| 57,89 | 6,03 | 5,40 |
| 60,71 | 7,13 | 6,84 |
| 59,57 | 9,94 | 7,71 |
| 57,69 | 12,83 | 11,00 |
| 52,63 | 5,50 | 5,42 |
| 52,78 | 6,73 | 6,41 |
| % DE PERSISTENCIA DE IMAZALIL | | |
| Fruta Post Lavado | Aceite Pulido | Aceite Descerado |
| 44,68 | 0,93 | 1,00 |
| 47,13 | 0,71 | 0,79 |
| 47,64 | 0,36 | 0,44 |
| 53,13 | 0,52 | 0,60 |
| 56,76 | 0,32 | 0,40 |
| 46,78 | 0,43 | 0,51 |
| 51,53 | 0,87 | 0,90 |

La tabla continúa en página siguiente >>>

| % DE PERSISTENCIA DE PROCLORAZ | | |
|--------------------------------|---------------|------------------|
| Fruta Post Lavado | Aceite Pulido | Aceite Descerado |
| 66,67 | 0,87 | 0,74 |
| 66,97 | 0,65 | 0,60 |
| 66,67 | 0,75 | 0,71 |
| 65,71 | 0,96 | 0,65 |

Para clorpirifos, los valores medios de persistencia en los aceites fueron algo menores, del orden de 7,9 y 7,1 % respectivamente, siendo en este caso, menor el porcentaje para los descerados. La fundamentación de estos resultados se invierte, ya que ahora la concentración del analito disminuye por efecto de una mayor partición de éste en la fase cerosa.

Los residuos de imazalil y procloraz presentan una persistencia mucho menor a los anteriores y no superan el 1 %. Tienen valores similares; sin embargo, presentan diferencias en la tendencia entre el pulido y el descerado, con valores medios de persistencia para dichos analitos de: 0.59 y 0.66% y de 0.81 0.68%, respectivamente.

Dado que sólo se detectaron en los aceites niveles residuales de bromopropilato, la persistencia en el aceite descerado se evaluó respecto al contenido en el pulido. Para todas las muestras se observaron valores medios de persistencia menores; los resultados se presentan en la **Tabla 3**.

TABLA 3. Persistencia de los residuos de Bromopropilato en aceite descerado respecto a los niveles residuales en aceite pulido de naranja

| BROMOPROPILATO | | | | |
|----------------|----------|---------------------|--------|------------------------|
| % Persistencia | Promedio | Desviación Estándar | RSD | Intervalo de confianza |
| 91,30 | 91,35 | 2,48 | % 2,71 | ± 3,44 |
| 87,90 | | | | |
| 93,59 | | | | |
| 92,59 | | | | |

En los muestreos de la temporada 2008 y 2009, se observaron residuos de thiabendazole con valores medios en fruta muy diferentes, posible-

mente debido a los distintos tratamientos de las frutas, tales como el *drencheado*. Sin embargo, en los empaques los tratamientos post cosecha utilizan mayores concentraciones de dicho fungicida y ceras para preservar y dar brillo a los frutos, por lo que dichos tratamientos hacen factibles que los residuos presentes en los frutos sean diferentes. La utilización de estos lotes en la industrialización de los aceites genera diferencias en los niveles de thiabendazole en los mismos.

En las **Tablas 4-5** y **6-7** pueden observarse los resultados obtenidos para thiabendazole correspondientes a: lotes tratados con drencher y lotes provenientes de empaques, identificados como Lotes D y Lotes E respectivamente. El proceso de lavado y cepillado de las frutas en la línea logra eliminar más del 40% de los residuos de thiabendazole; su persistencia en los aceites es bastante elevada respecto de otros analitos evaluados.

El análisis estadístico de comparación de medias correspondientes a los resultados de persistencia obtenidos para los aceites esenciales pulidos y descerados, respecto a los dos lotes (E y D), indicó que existen diferencias significativas entre las muestras, siendo esta diferencia factiblemente debida a la incorporación de ceras en el tratamiento en los empaques, las cuales lograrían bloquear al fungicida e incrementar la persistencia del mismo en el aceite pulido. Se observó que, al efectuarse el descerado en cámara, se produce una importante disminución en los residuos y, consecuentemente, en la persistencia de thiabendazole en los aceites esenciales.

La tercera temporada de producción, se comenzaron a detectar niveles residuales de cipermetrina en frutas al ingreso de la línea de producción, debido fundamentalmente al incremento de su uso en los cultivos como reemplazante del malathion, ya que los mercados internacionales no aceptan residuos de este plaguicida en las frutas. Se aplicó y optimizó un proceso multiresiduo, es decir que, en la misma metodología analítica, se logró evaluar diferentes analitos en las correspondientes matrices. Aunque en algunos casos se efectuaron variaciones en los sistemas y condiciones cromatográficas, el ahorro de costos y tiempos de análisis fue importante.

TABLA 4. Valores medios de residuos de Thiabendazole en fruta. Persistencia relativa. Naranja Valencia -Temporada 2008-2009- Lotes (D) - (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| FRUTA INGRESO mg/kg | FRUTA POST LAVADO mg/kg | PERSISTENCIA POST LAVADO % |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 0,38 ± 0,03 | 0,21 ± 0,05 | 56,00 |
| 0,28 ± 0,06 | 0,15 ± 0,07 | 54,60 |
| 0,40 ± 0,05 | 0,23 ± 0,05 | 56,50 |
| 0,45 ± 0,06 | 0,26 ± 0,06 | 57,00 |
| 0,19 ± 0,06 | 0,11 ± 0,07 | 55,60 |

TABLA 5. Valores medios de residuos de Thiabendazole en fruta y aceites esenciales de Naranja Valencia Persistencia relativa -Temporada 2008-2009- Lotes (D) (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| LOTE | FRUTA POST LAVADO | ACEITE PULIDO | | ACEITE DESCERADO | |
|------|-------------------|---------------|----------------|------------------|----------------|
| | mg/kg | mg/kg | Persistencia % | mg/kg | Persistencia % |
| 1 | 0,21 ± 0,05 | 9,51 | 13,59 | 8,42 | 12,03 |
| 2 | 0,15 ± 0,07 | 6,58 | 13,16 | 5,88 | 11,76 |
| 3 | 0,23 ± 0,05 | 9,65 | 12,59 | 9,33 | 12,17 |
| 4 | 0,26 ± 0,06 | 12,23 | 14,11 | 10,98 | 12,67 |
| 5 | 0,11 ± 0,07 | 5,25 | 14,32 | 4,24 | 11,56 |

TABLA 6. Valores medios de residuos de Thiabendazole en fruta. Persistencia relativa. Naranja Valencia -Temporada 2008-2009- Lotes (E) - (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| FRUTA INGRESO mg/kg | FRUTA POST LAVADO mg/kg | PERSISTENCIA POST LAVADO % |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 2,48 ± 0,17 | 1,39 | 56,00 |
| 3,51 ± 0,18 | 2,01 | 57,20 |
| 3,83 ± 0,13 | 2,09 | 54,50 |
| 4,08 ± 0,22 | 2,24 | 55,00 |
| 2,86 ± 0,25 | 1,56 | 54,60 |

TABLA 7. Valores medios de residuos de Thiabendazole en fruta y aceites esenciales de Naranja Valencia Persistencia relativa -Temporada 2008-2009- Lotes (E) (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| LOTE | FRUTA POST LAVADO | ACEITE PULIDO | | ACEITE DESCERADO | |
|------|-------------------|---------------|----------------|------------------|----------------|
| | mg/kg | mg/kg | Persistencia % | mg/kg | Persistencia % |
| 1 | 1,39 | 59,75 | 12,90 | 42,42 | 9,16 |
| 2 | 2,01 | 90,58 | 13,52 | 56,88 | 8,49 |
| 3 | 2,09 | 92,65 | 13,30 | 60,33 | 8,66 |
| 4 | 2,24 | 99,23 | 13,29 | 88,98 | 6,54 |
| 5 | 1,56 | 66,85 | 12,86 | 45,94 | 8,83 |

A partir de los resultados de las respuestas cromatográficas correspondientes a soluciones estándares de cipermetrina y muestras adicionadas a diferentes concentraciones, se efectuó el análisis unidimensional de los datos, y se determinaron los siguientes parámetros estadísticos: desviación estándar y coeficiente de variación relativo, intervalo de confianza, independencia y normalidad de los residuos, linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación del método.

Del análisis estadístico de la comparación de rectas de regresión para estándares, frutas y aceites adicionados, se pudo establecer que existen diferencias significativas en los puntos de corte y pendientes en ambos casos. Dado que existe efecto matriz, el método de calibración adoptado es a partir de muestras adicionadas.

La precisión fue determinada a partir de muestras adicionadas a 0,01, 0,05 y 0,5 mg/kg para (n=10 y $\alpha = 0,05$), siendo los valores de RSD de 0.15, 0.1-0.03% para fruta y de 0,65-0,5 para los aceites, por lo que podemos concluir que es adecuada. Los valores medios de recuperación para frutas y aceites esenciales fueron del $98,02 \pm 0,34$ y $94,33 \pm 0,45\%$, respectivamente. El método tiene adecuada sensibilidad para ambas matrices, siendo los límites de detección y cuantificación de 1,37 y 1,45; y de 1,56 y 1,98 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

Fueron evaluados cinco muestreos de 5 lotes de Naranja Valencia, cuya trazabilidad indicaba tratamientos con este plaguicida, y los resultados de los valores medios de los niveles residuales expresados en mg/kg y

fueron determinados los porcentajes de persistencia relativa, correspondientes a las diferentes matrices en la línea de producción. En la **Tabla 8** se puede observar que, en dos de los lotes, no se detectaron residuos de cipermetrina en frutas al ingreso de línea, y sólo en uno de ellos se detectaron residuos en aceite pulido y descerado, por lo que, en este último caso, la persistencia relativa de los residuos en aceite descerado se determinó a partir del valor en aceite pulido, según podemos observar para el Lote N° 3, siendo del 76,92%. Los valores de persistencia relativa para la fruta post lavado en estos lotes oscilaron entre 54,20 y 58,72 %.

TABLA 8. Valores medios de residuos de Cipermetrina en fruta y Persistencia relativa en aceites esenciales Naranja Valencia. Temporada 2008- 2009 y 2010 (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| LOTE | FRUTA | ACEITE PULIDO | | ACEITE DESCERADO | |
|------|--------------|---------------|----------------|------------------|----------------|
| | POSTLAVADO | mg/kg | Persistencia % | mg/kg | Persistencia % |
| 1 | 0,117 ± 0,03 | 2,12 ± 0,14 | 5,44 | 1,85 ± 0,18 | 4,74 |
| 2 | 0,156 ± 0,02 | 3,15 ± 0,30 | 6,06 | 3,01 ± 0,26 | 5,79 |
| 3 | N.D | 0,13 ± 0,02 | - | 0.10 ± 0,007 | <u>76,92</u> |
| 4 | 0,43 ± 0,09 | 8,93 ± 0,36 | 6,23 | 7,98 ± 0,31 | 5,57 |
| 5 | N.D. | N.D | | N.D. | |

En muestreos posteriores, durante la temporada correspondiente al 2010, se observaron valores diferentes tanto en los niveles residuales de cipermetrina en las frutas, como en el porcentaje de persistencia en el post lavado. Si bien los valores medios de residuos en fruta son más altos respecto de años anteriores, los de persistencia post lavado fueron en algunos muestreos similares, en tanto que en otros presentaron diferencias significativas del orden del 10 %, tal como puede observarse en las **Tablas 9 y 10**.

El incremento en los niveles residuales de cipermetrina en los frutos puede deberse a diversos factores, tales como: un aumento de la concentración del producto activo en las soluciones de aplicación y/o un mayor número de aplicaciones en el campo, ya que el ataque de la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) ocurre fundamentalmente

cuando la fruta comienza a madurar y las aplicaciones son más frecuentes en esta instancia. Otros factores a considerar son el tiempo transcurrido desde última aplicación hasta la cosecha y el grado de penetración en el sustrato vegetal. Ambos inciden de manera diferente ya que, sin bien se ha incrementado el depósito de residuos sobre el fruto, es factible que los residuos queden circunscriptos a la superficie del mismo y el grado de penetración del plaguicida en el sustrato vegetal sea menor, lo que explicaría en parte la mayor eliminación de los residuos superficiales y, consecuentemente, reduciría los porcentajes de persistencia post lavado, según pudo observarse en los resultados de la **Tabla 10**. Sin embargo, se ha observado en todos los lotes que los porcentajes de persistencia en los aceites son similares y el proceso de descerado reduce la de cipermetrina en los mismos.

TABLA 9. Valores medios de residuos de Cipermetrina en Naranja Valencia - Persistencia relativa de los residuos en fruta post lavado. Temporada 2010 (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| LOTE | FRUTA INGRESO mg/kg | FRUTA POST LAVADO mg/kg | PERSISTENCIA % |
|------|------------------------|----------------------------|-------------------|
| 1 | 0,97 ± 0,07 | 0,52 ± 0,06 | 53,61 |
| 2 | 0,48 ± 0,05 | 0,28 ± 0,03 | 58,33 |
| 3 | 0,76 ± 0,06 | 0,43 ± 0,06 | 56,58 |
| 4 | 0,68 ± 0,05 | 0,39 ± 0,02 | 57,35 |
| 5 | 0,55 ± 0,06 | 0,32 ± 0,04 | 58,18 |

TABLA 10. Valores medios de residuos de Cipermetrina en Naranja Valencia - Persistencia relativa de los residuos en fruta post lavado. Temporada 2010 (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| LOTE | FRUTA INGRESO mg/kg | FRUTA POST LAVADO mg/kg | PERSISTENCIA % |
|------|------------------------|----------------------------|-------------------|
| 1 | 0,85 ± 0,07 | 0,42 ± 0,04 | 49,41 |
| 2 | 0,58 ± 0,08 | 0,26 ± 0,05 | 44,83 |
| 3 | 0,60 ± 0,04 | 0,28 ± 0,04 | 46,67 |
| 4 | 0,68 ± 0,05 | 0,33 ± 0,05 | 48,53 |
| 5 | 0,75 ± 0,05 | 0,36 ± 0,04 | 48,00 |

En función de los resultados obtenidos, y con un enfoque global, podemos concluir que la carga inicial 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 desce-
rados. En la **Tabla 11** se presentan los resultados medios comparativos de persistencia para todos los analitos evaluados.

En el proceso de industrialización de frutas cítricas y obtención de jugos y aceites esenciales existen numerosos factores que pueden modificar el contenido de residuos de estos plaguicidas, siendo los más relevantes aquéllos en los que los analitos se eliminan y/o degradan. La mayor eliminación se produce en el lavado y, en menor grado, por efecto de la separación de las fases: acuosa y oleosa en la centrifuga pulidora, y oleosa y cerosa por decantación a bajas temperaturas en las cámaras.

Del análisis de los resultados, podemos observar que los mayores y los más bajos valores medios de persistencia en fruta corresponden a procloraz e imazalil respectivamente. Respecto a la persistencia en los aceites, los residuos de O-fenilfenol y thiabendazoles son los más persistentes, y los menores valores observados son los de imazalil y procloraz. La variación de la persistencia en los aceites desce-
rados presenta, respecto de la carga residual en fruta post lavado, similitud con los valores altos o bajos anteriormente analizados para los aceites pulidos; sin embargo, en este proceso se introduce otra variable, que sería la factible partición de algunos analitos en la fase cerosa, la cual modifica los porcentajes de persistencia.

TABLA 11. Valores medios de persistencia relativa de residuos de plaguicidas en fruta y aceites esenciales de Naranja Valencia Temporada 2008-2009 y 2010 ($n = 5$ y $\alpha = 0,05$)

| PERSISTENCIA RELATIVA | | | |
|-----------------------|----------------------|---------------|------------------|
| PLAGUICIDA | FRUTA POST LAVADO | ACEITE PULIDO | ACEITE DESCERADO |
| O-FENILFENOL | 54,47 | 12,37 | 13,43 |
| CLOPPIRIFOS | 56,16 | 7,99 | 7,05 |
| IMAZALIL | 49,66 | 0,59 | 0,66 |
| PROCLORAZ | 66,51 | 0,81 | 0,68 |
| THIABENDAZOLE | 55,9 - 55,5 | 13,6 - 13,2 | 12,1 - 8,3 |
| CIPERMETRINA | 47,5 - 56,8 | 5,91 | 5,55 |

En el caso de los residuos de thiabendazole, cuando éste ha sido aplicado con ceras en los empaques, se ha observado que la disminución de los residuos en el descerado es mayor y la persistencia es relativamente mucho menor en comparación con otras.

En los diferentes muestreos de fruta y aceites esenciales de mandarina fueron detectados niveles residuales de plaguicidas similares a los encontrados para naranja, aunque no en el mismo número de muestras. Los resultados de los valores medios de residuos correspondientes a los 30 lotes de mandarina muestreados se presentan en la **Tabla 12**, donde puede observarse la gran variabilidad de los mismos, que está relacionada con los tipos de plaguicidas utilizados, dosis y concentración, tiempos y modo de aplicación, etc.

A diferencia de las muestras de naranja, se han detectado residuos de carbendazin, para lo cual se optimizó y validó la técnica analítica por cromatografía líquida con detección de fluorescencia.

TABLA 12. Valores medios residuales expresados en mg/kg. Fruta y aceites esenciales correspondientes a 30 lotes de Mandarina. Temporada 2008- 2009 y 2010 (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| ANALITO | FRUTA INGRESO | FRUTA POST LAVADO | ACEITE PULIDO | ACEITE DESCERADO |
|----------------|---------------|-------------------|---------------|------------------|
| O- FENIL-FENOL | 0,72 | 0,37 | 14,5 | 15,82 |
| | 1,9 | 0,98 | 36,27 | 38,8 |
| | 0,88 | 0,47 | 22,84 | 20,66 |
| | 1,22 | 0,67 | 29,33 | 27,12 |
| CLORPIRIFOS | 0,50 | 0,300 | 7,52 | 7,12 |
| | 0,09 | 0,052 | 1,06 | 1,03 |
| | 0,03 | 0,018 | 0,35 | 0,29 |
| | 0,22 | 0,120 | 3,86 | 3,32 |
| | 0,04 | 0,022 | 0,58 | 0,49 |
| IMAZALIL | 1,84 | 1,02 | 0,98 | 1,28 |
| | 3,50 | 1,89 | 1,68 | 1,78 |
| | 2,72 | 1,59 | 1,36 | 1,49 |
| | 0,76 | 0,42 | 0,37 | 0,48 |
| | 2,25 | 1,28 | 1,18 | 1,37 |
| CARBEN-DAZIN | 3,19 | 1,85 | 5,82 | 5,4 |
| | 5,08 | 2,97 | 9,92 | 9,87 |
| | 0,66 | 0,4 | 1,2 | 1,05 |
| | 1,58 | 0,92 | 2,31 | 2,01 |

Los plaguicidas detectados en estas matrices fueron: O-fenilfenol, clorpirifos, imazalil, cipermetrina y carbendazin. Los valores medios observados de la carga inicial y los residuos en aceites son diferentes respecto de los de naranja, aunque las tendencias generales son similares en ambas variedades cítricas y en los aceites respectivos.

La persistencia de los residuos en fruta post lavado y aceites esenciales se detallan en la **Tabla 13**. En este caso, se han calculado los porcentajes de persistencia en los aceites en función de la carga inicial de residuos en frutas al ingreso de la línea y respecto a la fruta post lavado a fin de evaluar ambas situaciones, ya que, si sólo se efectúan en la industria controles de los lotes de materia prima, estos valores

pueden tener importancia para estimar aproximadamente los contenidos residuales en los aceites descerados.

TABLA 13. Valores medios de persistencia relativa de residuos de plaguicidas en fruta y aceites esenciales de Mandarina. Temporada 2008- 2009 y 2010. (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| O-FENILFENOL | | | |
|---|---------------|------------------|---|
| % Persistencia respecto a carga inicial de residuos en Fruta ingreso a la línea | | | % Persistencia respecto a los residuos en Fruta post lavado |
| Fruta Post Lavado | Aceite Pulido | Aceite Descerado | Aceite Descerado |
| 51,39 | 6,04 | 6,59 | 12,83 |
| 51,58 | 5,73 | 6,13 | 11,88 |
| 53,41 | 7,79 | 7,04 | 13,19 |
| 54,92 | 7,21 | 6,67 | 12,14 |
| CLORPIRIFOS | | | |
| % Persistencia respecto a carga inicial de residuos en Fruta ingreso a la línea | | | % Persistencia respecto a los residuos en Fruta post lavado |
| Fruta Post Lavado | Aceite Pulido | Aceite Descerado | Aceite Descerado |
| 60,00 | 4,51 | 4,27 | 7,12 |
| 57,78 | 3,53 | 3,43 | 5,94 |
| 60,00 | 3,50 | 2,90 | 4,83 |
| 54,55 | 5,26 | 4,53 | 8,30 |
| 55,00 | 4,35 | 3,68 | 6,68 |
| IMAZALIL | | | |
| % Persistencia respecto a carga inicial de residuos en Fruta ingreso a la línea | | | % Persistencia respecto a los residuos en Fruta post lavado |
| Fruta Post Lavado | Aceite Pulido | Aceite Descerado | Aceite Descerado |
| 55,43 | 0,16 | 0,21 | 0,38 |
| 54,00 | 0,14 | 0,15 | 0,28 |
| 58,46 | 0,15 | 0,16 | 0,28 |
| 55,26 | 0,15 | 0,19 | 0,34 |
| 56,89 | 0,16 | 0,18 | 0,32 |

La tabla continúa en página siguiente >>>

| CARBENDAZIN | | | |
|---|---------------|------------------|---|
| % Persistencia respecto a carga inicial de residuos en Fruta ingreso a la línea | | | % Persistencia respecto a los residuos en Fruta post lavado |
| Fruta Post Lavado | Aceite Pulido | Aceite Descerado | Aceite Descerado |
| 57,99 | 0,55 | 0,51 | 0,88 |
| 58,46 | 0,59 | 0,58 | 1,00 |
| 60,61 | 0,55 | 0,48 | 0,79 |
| 58,23 | 0,44 | 0,38 | 0,66 |

Es de destacar que, además de los plaguicidas detallados en las diversas tablas, se han detectados otros en frutas al ingreso de la línea, pero con niveles muy bajos de residuos, los cuales han sido posiblemente eliminados de la superficie de los frutos en el lavado y consecuentemente no fueron detectados luego en los productos industriales. Asimismo, se han determinado residuos muy bajos de otros plaguicidas en aceites, los cuales no estaban presentes en las frutas al inicio del proceso. Esto puede deberse a diversas causas tales como la mezcla de lotes de fruta o de aceite en la línea, errores en el muestreo y otros.

En la **Tabla 14** se presentan los valores medios de persistencia relativa de los residuos evaluados en las muestras de fruta post lavado y aceites esenciales descerados de mandarina correspondientes a los diferentes muestreos efectuados. La persistencia de los residuos de O-fenilfenol y clorpirifos en fruta post lavado y en aceite descerados de mandarina es similar a los porcentajes determinados para naranja, pero en cambio existen diferencias significativas para imazalil, siendo menor la persistencia de estos residuos a la observada para naranja, lo que puede encontrarse relacionado con las diferencias en la naturaleza del sustrato vegetal y su interacción con el plaguicida u otros factores no determinados.

TABLA 14. Valores medios de persistencia relativa de residuos de plaguicidas en fruta y aceites esenciales de Mandarina Temporada 2008-2009 y 2010 (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

| PLAGUICIDA | PERSISTENCIA RELATIVA | |
|--------------|-----------------------|------------------|
| | FRUTA POST LAVADO | ACEITE DESCERADO |
| O-fenilfenol | 52,83 | 12,51 |
| Clorpirifos | 57,84 | 6,57 |
| Imazalil | 56,01 | 0,32 |
| Cabendazin | 58,82 | 0,89 |

En virtud de lo expuesto, podemos concluir que, cuando la fruta que ingresa para ser procesada en la industria presenta una carga de residuos de plaguicidas, aplicados en alguna instancia en los cultivos y/o post cosecha, estos residuos pueden persistir en los productos industriales, por lo que se considera de importancia efectuar los controles necesarios en la línea de producción como un parámetro más de calidad, ya que es posible lograr disminuir los niveles de residuos efectuando mezclas con lotes libres de plaguicidas, y lograr así preservar la salud del consumidor y mantener la competitividad en los mercados.

Referencias bibliográficas

- [1] FEDERACION ARGENTINA DEL CITRUS (FEDERCITRUS). Actividad cítrica Argentina. 2010. Disponible en: <<http://www.federcitrus.org/actividad-citricola-2010.pdf>> [Agosto, 2010].
- [2] COHN, R., COHN, A. L. The by-products of fruit processing. En: ARTHEY, D., ASHURST, P. R. (eds). *Fruit Processing*. London: Chapman & Hall. 1996.
- [3] RETAMAR, J. A. *Aceites esenciales de especies vegetales diversas: sus posibilidades químicas*. Santa Fe: IPNAYS. 1982.
- [4] BLASCO, C; FONT ,G; PICO, Y. Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia. *Food Control*. 2006; 17(11): 841-846.
- [5] KIMBALL, D.A. *Citrus Processing*. 2° Ed. Aspen. 1999.
- [6] MAZZUZ, C.F. *Calidad de frutos cítricos. Manual para su gestión desde la recolección hasta la expedición*. Barcelona: Edición de Horticultura. 1996.
- [7] BARBERÁ, C. *Pesticidas Agrícolas*. 4° Edic. Barcelona: Omega. 1989.
- [8] CORTÉS-AGUADO, S.; N. SÁNCHEZ-MORITO *et al*. Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2008; 107(3): 1314-25.
- [9] CHAULET, M. R.; MONTTI, M. T.; GERARD, J. A.; RAVIOL, F.; SUBOVICH G. Determinación de Thiabendazole en Aceite Esencial de

- Naranja Valencia. (pp. 115-124). En: *Series de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Investigación del Postgrado del IAD-DTA*. Valencia: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Vol. II. 2000
- [10] GILBERT-LÓPEZ B.; GARCÍA-REYES J. F.; MEZCUA M.; RAMOS-MARTOS N.; FERNÁNDEZ-ALBA A. R.; MOLINA-DÍAZ A. Multi-residue determination of pesticides in fruit-based soft drinks by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*. 2010; 81: 1310-21.
- [11] GUO B.; HUANG Z.; WANG M.; WANG X.; ZHANG Y.; CHEN B.; LI Y.; YAN H.; YAO S. Simultaneous direct analysis of benzimidazole fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunctional dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217: 4796-4807.
- [12] MONTTI M.T.; GERARD J.; CHAULET M. (1998). Penetración y Persistencia del Thiabendazole en Naranja Valencia y Jugos Concentrados. *Estratto da Essenze - Derivati Agrumari*. 1998. 48 (2): 124-9.
- [13] SANNINO A. Investigation into contamination of processed fruit products by carbendazim, methyl thiophanate and thiabendazole. *Food Chemistry*. 1995; 52: 57-61.
- [14] KINAY P.; MANSOUR M. F.; GÄBLER F. M.; MARGOSAN D. A.; SMILANICK J. L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*. 2007; 26 (4): 647-56.
- [15] PAWLISZYN, J. *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*. Canadá: Ed. Wiley-VCH. 1997.
- [16] RADIŠIĆ, M.; GRUJIC, S.; VASILJEVIĆ, T.; LAUŠEVIĆ, M. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2009; 113: 712-9.
- [17] XIANGYANG Q. Development of a matrix solid-phase dispersion-sonication extraction method for the determination of fungicide residues in ginseng extract. *Food Chemistry*. 2010; 121(3): 758-62.
- [18] ARTHUR, C.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem*. 1990; 62: 2145-8.
- [19] BARAHONA, F.; GJELSTADB, A.; PEDERSEN-BJERGAARDB, S.; RASMUSSEN, K.E. Hollow fiber-liquid-phase microextraction of fungicides from orange juices. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217(13): 1989-1994.
- [20] BELTRAN, J.; LÓPEZ, F.J.; HERNÁNDEZ, F. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*. 2000; 885: 389-404.
- [21] DE SOUZA PINHEIRO, A.; DE ANDRADE, J.B. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multi-residue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Talanta*. 2009; 79(5): 1354-1359.
- [22] DREASSI E.; ZANFINI A.; ZIZZARI A. T.; LA ROSA C.; BOTTA M.; CORBINI G. Lc/Esi/Ms/Ms determination of postharvest fungicide residues in citrus juices. *LWT - Food Science and Technology*. 2010 ; 43: 1301-6.
- [23] FRITZ, S.J. *Analytical Solid-Phase Extraction*. New York: Wiley-VCH. 1999.
- [24] YOSHIOKA, N.; AKIYAMA, Y.; MATSUOKA, T.; MITSUHASHI, T. Rapid determination of five post-harvest fungicides and metabolite in citrus fruits by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization. *Food Control*. 2010; 21: 212-6.