



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química del Litoral-Departamento de Química Orgánica

Grupo de Análisis de Compuestos Traza (GACT)

“Dinámica de los residuos de pesticidas empleados en la cadena citrícola”

Trabajo de tesis para aspirar al título de Doctor en Química presentado por

Q.F. Natalia Besil

Directores de tesis: Profs. Dr. Horacio Heinzen–Dra. Verónica Cesio

2019, Paysandú, Uruguay

1.



Agradecimientos

Es un gusto utilizar estas páginas para agradecer a cada uno de los muchos que con sus aportes han hecho posible el desarrollo y culminación de esta tesis de doctorado.

Gratiás tibi Deus, gratiás tibi.

A mi esposo, *mi Coche*. Por su amor y su alegría eterna. Por ser mi amigo incondicional, siempre firme. A él y a Pina por el tiempo mío que les pertenece y lo cedieron para que pudiera culminar. Gracias.

De manera especial a mis tutores, los Dres. Verónica Cesio y Horacio Heinzen por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su confianza y apoyo constante en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un gran aporte, no solamente durante el doctorado, sino también en mi formación como investigadora y como persona. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del trabajo que hemos realizado en estos años. Gracias por ayudarme a aprender de mis errores y a buscarle explicación a los resultados. Les agradezco también por “las ideas locas” de Horacio, que al final siempre terminan siendo muy buenas ideas y a Verónica por sus correcciones, sus consejos y por estar pendiente de todos los detalles de la tesis y de la vida. A ambos, por estar SIEMPRE, gracias!

Al Dr. Amadeo R. Fernández-Alba, por brindarme la oportunidad de formarme en dos instancias en el Laboratorio Europeo de referencia para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas el cual dirige. Especialmente a Samanta Uclés, por su tiempo y paciencia al enseñarme a usar el GC-ToF, por aprender juntas y por el tiempo compartido. A María del Mar, Lucas, Noelia y Mili por todo lo aprendido. Gracias.

A los orígenes, Farmacognosia y Productos Naturales. A Nacho, Naty, Carlitos, Eduardo, Pilar, Álvaro. A Gabriel y Daniel por transmitirme y hacerme amiga de los equipos, por enseñarme y dejar tocar y mover y cambiar.

A todos y cada uno del GACT! Muy especialmente a Sil, Andrés, Marcos y Lu. A las más chiquitas, Sofi, Fiamma y Noel porque al enseñarles también aprendí con ellas. A Flor, Pauli, Agus, Rodrigo, Lucas. Gracias.

A todo el DQL y los Polos. Vivi, Guille, Andrés, Flor, Gualberto, Caro, Lucía,

Macarena, Kathy, Gastón, Juan, Ileana, Mauricio, Lía, Guzmán, Florencia, Ceci, Magui, Inés, Belén, Isabel, Melina. Gracias por el día a día. A Ricardo, por su tiempo y buen humor. Gracias.

Un gracias especial al Programa de Citricultura de INIA, a Tato, Pablo, Franco, Eleana y Pedro por todo el apoyo logístico, las aplicaciones, los muestreos. Por los buenos resultados y por los no tan buenos. Por todo el tiempo compartido, por las risas y el compañerismo.

Especialmente a Andrea de León, del laboratorio de Fisicoquímica de Superficie de Facultad de Química. Por los ensayos de fotocatalisis y por todos los conocimientos transmitidos. Gracias!

A Alexis y Cecilia, por el intercambio, por compartir experiencias. Gracias.

Gracias a mis padres, pilares fundamentales de mi vida, por educarme como persona, por inculcarme la importancia de estudiar, de querer aprender y crecer. Por acompañar y estar presentes siempre. Por ayudarme y quererme. Por cuidar a Pina en este tiempo especial de escritura.

A mis hermanos, Gonza y Flor, Caco, Nacho y Noe, German, María, Ito, Chevi y Fran, Diegui, Sofi y Paquico, los de sangre y los de ley, por estar. Por compartir y alegrar nuestras vidas. A mis suegros, por acompañar, preguntar, apoyar y entender que los Químicos somos los mejores...jaja. Gracias.

A Miriam y Cristina, por enseñarme a ver la importancia del trabajo bien hecho. Del lugar y oportunidad que ocupa en nuestras vidas. Gracias.

A Ionara, Mariela e Ignacio por haber aceptado ser parte del tribunal y contribuir a la mejora de la tesis. Gracias.

A todas las instituciones que hicieron posible este trabajo de tesis: a la Universidad de la República, a la Facultad de Química, al régimen de dedicación total, a la Comisión sectorial de Investigación Científica (CSIC), al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA), a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), por las distintas financiaciones y apoyos. Gracias.

Índice de contenidos

Agradecimientos	3
Índice de contenidos	5
Índice de Tablas.....	9
Índice de Figuras.....	11
Abreviaturas y acrónimos.....	14
RESUMEN.....	18
ABSTRACT	21
PRÓLOGO.....	24
1. INTRODUCCIÓN	26
1.1. Citricultura en Uruguay y el mundo	26
1.1.1. Producción mundial	26
1.1.2. Citricultura en Uruguay.....	27
1.1.2.1. Producción	28
1.1.2.1. Industrialización.....	29
1.1.2.1.1. Jugos concentrados.....	30
1.1.2.1.2. Aceites esenciales.....	32
1.2. La cadena citrícola y el uso de pesticidas	34
1.2.1. Precosecha	37
1.2.1.1 Proteccion del cultivo en chacra.....	37
1.2.2. Poscosecha.....	39
1.2.2.1. Protección de la fruta durante el almacenamiento.....	39
1.2.2.2. Poscosecha: industrialización de cítricos.....	43
1.3. Pesticidas comúnmente usados en la citricultura.....	44
1.3.1. Neonicotinoides	46
1.3.2. Avermectinas	47
1.3.3. Spinosines.....	48
1.3.4. Bencimidazoles.....	49
1.3.5. Azoles.....	50
1.3.6. Triazoles	50
1.3.7. Estrobirulinas.....	51

1.4.	Propiedades fisicoquímicas y su influencia en la distribución de pesticidas en fruta y productos industriales derivados de la producción	52
1.5.	Metodologías de análisis de residuos de pesticidas	55
1.5.1.	Procesamiento de muestra	56
1.5.2.	Preparación de muestra	57
1.5.3.	Análisis instrumental.....	62
1.5.1.	Resolución, poder resolutivo y exactitud de masas	63
1.5.1.2.	Triple cuadrupolo	66
1.5.1.3.	Tiempo de vuelo (ToF).....	67
1.5.1.4.	Fuentes de ionización e interfases	69
1.5.1.4.1.	Fuentes de GC-MS	69
1.5.1.4.1.	Fuentes de LC-MS	70
1.5.2.	Validación de metodologías analíticas	71
1.5.2.1.	Precisión	73
1.5.2.1.1.	Repetitividad.....	73
1.5.2.1.2.	Reproducibilidad	73
1.5.2.1.3.	Precisión intermedia	74
1.5.2.2.	Selectividad.....	74
1.5.2.3.	Especificidad.....	74
1.5.2.4.	Veracidad.....	74
1.5.2.5.	Límite de cuantificación	75
1.5.2.6.	Linealidad	75
1.5.2.7.	Robustez	75
1.5.2.8.	Exactitud.....	75
1.5.2.9.	Efecto matriz.....	75
1.5.3.	Criterios para la identificación de residuos de pesticidas	77
1.5.3.1.	Requisitos cromatográficos.....	77
1.5.3.2.	Requisitos en espectrometría de masas	77
1.5.4.	Incertidumbre asociada al análisis de pesticidas.....	79
1.5.5.	Metodologías de análisis de residuos de pesticidas en matrices cítricas	81
1.5.5.1.	Frutas cítricas.....	81
1.5.5.1.	Subproductos cítricos	84
1.5.5.1.	Efluentes	85
1.6.	Curvas de disipación.....	86
1.7.	Efluentes cítricos	88

1.7.1.	Generación de efluentes y reglamentación.....	88
1.7.2.	Fotocatálisis para la remediación de efluentes	90
2.	OBJETIVOS DE LA TESIS.....	92
2.1.	Objetivo general	92
2.2.	Objetivos específicos	92
3.	CAPÍTULO I: Validación de metodologías analíticas para el análisis de residuos de pesticidas en matrices cítricas.....	93
3.1.	Introducción	93
3.2.	Frutas: mandarina, naranja y limón	94
3.2.1.	Experimental.....	94
3.2.2.	Resultados y discusión	102
3.2.2.1.	<i>Análisis de imazalil y 2-fenilfenol en mandarina por GC-MS.....</i>	102
3.2.2.2.	<i>Análisis de pesticidas de chacra en mandarina, naranja y limón por LC-MS/MS. 103</i>	
3.2.2.3.	<i>Ampliación del alcance de la metodología para análisis de pesticidas en limón por LC-MS/MS.</i>	106
3.3.	Jugo concentrado	108
3.3.1.	Experimental.....	108
3.3.2.	Resultados y discusión	110
3.4.	Aceite esencial.....	113
3.4.1.	Experimental.....	113
3.4.2.	Resultados y discusión	114
3.5.	Conclusiones	116
4.	CAPÍTULO II: Utilización de sistemas instrumentales de masa exacta durante el análisis de pesticidas en frutas cítricas.	118
4.1.	Introducción	118
4.1.	<i>Análisis de residuos de pesticidas en naranja usando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa tiempo de vuelo de alta resolución.</i>	121
4.1.1.	Experimental.....	121
4.1.2.	Resultados y discusión	122
4.2.	<i>Estudio de los efectos de la matriz e interferencias de diferentes co-extractivos de frutos cítricos en cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.....</i>	134
4.2.1.	Experimental.....	135
4.2.2.	Resultados y discusión	137
4.3.	Conclusiones	158
5.	CAPÍTULO III: Estudios de disipación de pesticidas de pre y poscosecha usados en la	

producción cítrica.	160
5.1. Introducción	160
5.2. <i>Disipación de insecticidas y fungicidas seleccionados aplicados durante la pre cosecha en mandarinas y naranjas en Uruguay</i>	164
5.2.1. Experimental.....	164
5.2.2. Resultados y discusión	167
5.3. <i>Disipación de pesticidas de pre cosecha en mandarinas 'Clementina' después de la aplicación en campo abierto y su persistencia cuando se almacenan en condiciones industriales convencionales de poscosecha</i>	174
5.3.1. Experimental.....	174
5.3.2. Resultados y Discusión	178
5.4. <i>Disipación de pesticidas de poscosecha y su efectividad al ser aplicados con NaHCO₃</i> 185	
5.4.1. Experimental.....	185
5.4.2. Resultados y discusión	188
5.5. Conclusiones	194
6. CAPÍTULO IV: Pesticidas en efluentes de packings cítricos: determinación y degradación fotocatalítica.....	196
6.1. Introducción	196
6.2. <i>Caracterización de efluente en contenido de pesticidas</i>	196
6.2.1. Experimental.....	196
6.2.2. Resultados y discusión	197
6.3. <i>Degradación fotocatalítica de pesticidas habitualmente contenidos en efluentes de packings</i>	198
6.3.1. Experimental.....	198
6.3.2. Resultados y discusión	200
6.4. Conclusiones	201
7. Conclusiones y perspectivas	202
8. Referencias bibliográficas	206
ANEXO I: Analysis of pesticide residues in fruits and vegetables using gas chromatography-high resolution time-of-flight mass spectrometry	223
ANEXO II: Matrix effects and interferences of different citrus fruits coextractives in pesticide residue analysis using ultra highperformance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry	238
ANEXO III: Dissipation of selected insecticides and fungicides applied during preharvest on mandarin and orange trees in Uruguay	241
ANEXO IV: Dissipation of Pre-Harvest Pesticides on ‘Clementine’ Mandarins after Open Field Application, and Their Persistence When Stored under Conventional Postharvest Conditions	254

ANEXO V: Matrix effects minimization in LC-(ESI)-MS/MS in lemon fruits and by-products through dilution and its application to routine work.....	266
--	-----

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Exportaciones de fruta cítrica por año según especie y variedad (en toneladas). s/d: sin datos. Tomado de DIEA MGAP 2017.....	29
Tabla 1.2. Control químico para plagas y enfermedades de los cítricos en Uruguay. Elaborado a partir de la Guía Sata.com.	45
Tabla 1.3. Parámetros y criterios para la validación de una metodología analítica según la guía SANTE/11945/2015.	77
Tabla 1.4. Requisitos para la identificación de los compuestos según el sistema de detección de espectrometría de masas (DG-SANTE, 2015).....	79
Tabla 3.1. Pesticida, tiempo de retención (tR) e iones seleccionados para el análisis en GC-MS. IE: estándar interno.....	96
Tabla 3.2 Pesticida, familia química, límite máximo de residuo (LMR) establecido por <i>Codex Alimentarius</i> y Unión Europea [(m) mandarina, (n) naranja, ndef: no definido], tiempo de retención (tR), modo de ionización (* formación de aducto con NH ₄) ión precursor, ión producto, potencial de desintegración (DP) y energía de colisión (CE) para cada analito por LC y ion de cuantificación (Ion Cuant) y iones de referencia (Ion Ref) para pesticidas analizados por GC-MS (Shimadzu).	100
Tabla 3.3. Porcentajes de recuperación (% Rec), porcentaje de desviación estándar relativa (% DSR) y efecto matriz (EM) para el análisis de imazalil y OPP por GC-MS.....	103
Tabla 3.4. Porcentajes de recuperación (% Rec), porcentaje de desviación estándar relativa (% DSR) abamectina, difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad en mandarina, naranja y limón con el método AcOEt analizados por LC-MS/MS.....	105
Tabla 3.5. Valores de porcentajes de recuperación (Rec%) y desviación estándar relativa (RSD%) para cada nivel de concentración utilizado durante la validación del método QuEChERS AOAC en limón.	108
Tabla 3.6. Pesticida, porcentaje de recuperación (% Rec) y reproducibilidad (% RSD) para niveles de concentración de 10, 100 y 300 µg kg ⁻¹ ; límite de cuantificación (LOQ), rango lineal y porcentaje del efecto de la matriz (% de ME) para cada analito en jugo de limón concentrado usando 2,5 g de muestra.....	112
Tabla 3.7. Pesticida, repeatability (RSD %), límite de cuantificación (µg L ⁻¹), rango lineal (µg L ⁻¹), coeficiente de correlación (r ²) y porcentaje de efecto matriz (EM %) para cada analito en aceite esencial de limón.....	115
Tabla 4.1. Parámetros de identificación contenidos en la base de datos "desarrollada en el laboratorio": Pesticida, tiempo de retención (Rt), masa neutra exacta y fórmula molecular de cada fragmento.	125
Tabla 4.2. Rango lineal, límites de identificación (LOI) y efecto matriz para cada pesticida. (n.i. no identificado).....	132
Tabla 4.3. Pesticida, ion de cuantificación, tiempo de retención (tR-min) y porcentaje de efecto matriz (% EM) en cada variedad cítrica.	143
Tabla 4.4. Fórmula molecular, tiempo de retención Rt (min), masa neutra exacta y masa exacta de [M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺ y [A+H] ⁺ (A es la aglicona correspondiente). Para evitar problemas de saturación del detector por los diferentes productos naturales, se realizaron cálculos de masa	

exacta para el isómero que contiene uno o dos ^{13}C : fórmula molecular y ión ^{13}C exacto se presentan.	154
Tabla 4.5. Productos naturales identificados y pesticidas de co-elución con su efecto matriz en cada variedad de cítricos. En negro, el producto natural no está presente en esta matriz específica.	157
Tabla 5.1. Formulación, fabricante, dosis de principio activo, y volumen (Vol) utilizado cada 100 L. Límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la Unión Europea y el <i>Codex Alimentarius</i> para cada analito en mandarina/naranja. Definición de residuo: “suma de avermectina B1a, avermectina B1b y delta-8,9 isomero de avermectina B1a, expresado como avermectina B1a” ^A EU 2011/508, ^B EU 2015/2075, ^C EU 2018/1514. ^D Definición de residuo para plantas: “Avermectina B1a”. ^E Definición de residuo de spinosad en plantas: suma de espinosina A y espinosina D.	164
Tabla 5.2. Concentración de residuos iniciales y finales ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en mandarinas y naranja, para ambas áreas geográficas en tratamientos sin cobertura y cubiertos.	169
Tabla 5.3. Modelo de cinética de primer orden y vida media estimada ($t_{1/2}$) para cada combinación pesticida-matriz cítrica en.	173
Tabla 5.4. Transformaciones de linearización para la ecuación de regresión $y = bx + a$. RF: “factor raíz”	178
Tabla 5.5. Ecuaciones del modelo de disipación que describen la disipación de difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad en mandarina Clementina. En negrita: el modelo de mejor ajuste.	179
Tabla 5.6. Experimentos aplicados sobre mandarinas basados en un diseño 3k factorial, siendo $k=2$ *A pesar de no aplicarse fungicida, se detecto una concentración de $0,19 \text{ mg kg}^{-1}$ de imazalil en el blanco, debido a la contaminación de la línea de producción.	186
Tabla 6.1. Concentraciones de los principios activos en estudio en distintos efluentes de un packing cítrica y medidas de pH. Nota: <LR: concentración menor a límite de reporte.	198
Tabla 6.2. Pesticida, tiempo de retención (tR), ión precursor, ión producto, potencial de desintegración (DP) y energía de colisión (EC).	200

Índice de Figuras

Figura 1.1. Producción anual (t) para naranjas, mandarinas, limones y pomelos y área de plantación (ha) mundial de cítricos en el período 2012-2016. Incluye naranja, mandarinas, limones y pomelos.	27
Figura 1.2. Producción mundial de cítricos para naranjas, mandarinas, limones y pomelos por continente periodo 2012-2016. Incluye naranja, mandarinas, limones y pomelos.	27
Figura 1.3. Producción anual (toneladas) de cítricos por especie y por año (2012-2016) en Uruguay.	28
Figura 1.4. Esquemas de operación de extractores de jugo de tipo FMC (A) y Zumex (B). Adaptado de http://orangebook.tetrapak.com/chapter/fruit-processing (Tetra_Pak, 2004).	32
Figura 1.5. Esquema de extracción de aceite esencial por el método de raspadura. Adaptado de http://orangebook.tetrapak.com/chapter/fruit-processing (Tetra_Pak, 2004).	33
Figura 1.6. Esquema de obtención de aceite esencial a partir de la emulsión de aceite. Adaptado de http://orangebook.tetrapak.com/chapter/fruit-processing (Tetra_Pak, 2004)	33
Figura 1.7. Diagrama de flujo general de poscosecha. Las líneas punteadas indican vías opcionales en el procesamiento. Tomado de Pássaro <i>et al.</i> (Pássaro, 2012)	40
Figura 1.8. Esquema general de tratamiento de pesticidas en línea de packing en Uruguay. Adaptado de Besil <i>et al.</i> (Besil, et al., 2016).	42
Figura 1.9. Estructuras químicas de 2 neonicotinoides incluido el más utilizado en citricultura: imidacloprid.	47
Figura 1.10. Estructuras químicas de avermectina B1a y B1b.	48
Figura 1.11. Estructuras químicas espinosina A y D.	49
Figura 1.12. Estructuras químicas de los bencimidazoles tiabendazol y carbendazim usados en citricultura.	49
Figura 1.13. Estructuras químicas de imidazoles usados en citricultura.	50
Figura 1.14. Estructuras químicas de triazoles usados en citricultura.	51
Figura 1.15. Estructuras químicas de fungicidas estrobilurínicos.	52
Figura 1.16. Esquema de etapas de análisis.	56
Figura 1.17. Estructura general de las 3 versiones más empleadas de QuEChERS.	61
Figura 1.18. Estructura general método de Acetato de Etilo (AcOEt) sin clean up.	62
Figura 1.19. Esquema de un analizador de masas de tipo cuadrupolo.	65
Figura 1.20. Esquema de funcionamiento de un triple cuadrupolo operando en modo de monitoreo de reacción simple (SRM), elaborado en base a un LC-ESI-QqQ.	67
Figura 1.21. Esquema de funcionamiento de un analizador de tipo tiempo de vuelo (ToF).	69
Figura 1.22. Explosión Coulómbica en la interfase de electrospray (ESI) operando en modo positivo.	71
Figura 3.1. Superposición de m/z 215 escaneado en una muestra blanco de mandarina (trazo negro) y en una muestra fortificada (trazo azul) al nivel de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de fruta.	103
Figura 3.2. Efecto matriz (%) para abamectina, difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad en mandarina, naranja y limón con el método AcOEt en un LC-MS/MS.	106
Figura 3.3. Porcentaje de pesticidas con efecto matriz (%) menor y mayor a 20, usando 5 g (A) y 2,5 g (B) de jugo concentrado durante la extracción con el método QuEChERS acetato.	110
Figura 3.4. Identificación de procloraz en aceite esencial de limón por LC-MS/MS. Concentración en aceite de $112 \mu\text{g L}^{-1}$	116

Figura 4.1 Cromatograma de ion extraído para fluazifop p-butyl (m/z 282,0737) en naranja a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.	128
Figura 4.2. Espectro en <i>full scan</i> obtenido para cada punto definido en la Figura 4.1 para fluazifop p-butyl en naranja a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, con la exactitud de masa para el ion m/z 282,0737.	130
Figura 4.3. a) Porcentaje de compuestos agrupados según su efecto matriz (EM): positivo y negativo, sin EM, b) Porcentaje de efecto matriz para algunos analitos en las 3 especies de cítricos.	145
Figura 4.4. Ion extraído usando una ventana de extracción de ± 5 ppm para imidacloprid (m/z 256,0596) utilizando UHPLC-ToF-MS. A) Interferencia de la matriz presente en naranja (violeta), mandarina (verde) y limón (negro). B) Extracto de limón blanco (verde) superpuesto con un extracto fortificado con imidacloprid a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (azul).	148
Figura 4.5. Mapeo de co-extractivos de cítricos analizados por UHPLC-ToF-MS: limón (verde oliva), mandarina (verde oscuro), naranja (rosado) y pesticidas estudiados (azul).	150
Figura 4.6. Análisis de Componentes Principales (PCA) incluyendo todos los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo de las variedades cítricas en estudio. Cada eje está compuesto por un porcentaje de cada componente.	151
Figura 4.7. Patrón de fragmentación de hesperidina durante la etapa de ionización empleando un UHPLC-ESI-ToF.	152
Figura 5.1. Frutas sin cobertura (SC) y cubiertas (C) durante los ensayos.	166
Figura 5.2. Curvas de difenoconazol en los tratamientos cubierto (A) y sin cobertura (B) en mandarinas de la zona sur. Curvas de difenoconazol en los tratamientos cubierto (C) y sin cobertura (D) en naranja de la zona norte.	172
Figura 5.3. Temperatura máxima, media y mínima diaria (A), precipitaciones (B), humedad relativa (C) y radiación solar x relativa Heliofania (D).	176
Figura 5.4. Esquema de aplicación de tratamiento en la línea de empaque.	176
Figura 5.5. Curva de disipación para difenoconazol (A), imidacloprid (B), piraclostrobina (C) y spinosad (D) en mandarina Clementina. - \diamond - Indica datos experimentales. --- Indica la curva de disipación transformada (adaptada al mejor modelo matemático: ecuación de primer orden para A y D, ecuación de primer orden RF para B y segundo orden para C).	181
Figura 5.6. Residuos de difenoconazol, imidacloprid y piraclostrobina en Clementinas en el momento de la cosecha, después de la línea de empaque y después de 32 días de almacenamiento en frío. Para difenoconazol y piraclostrobina no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de pesticidas. Para el imidacloprid, la concentración de residuos al final del período posterior a la cosecha difirió significativamente del nivel de residuos determinado en el momento de la cosecha (t de estudiante, $\alpha = 0,05$).	183
Figura 5.7. Esquema de aplicación tratamiento de pesticidas en línea de packing.	186
Figura 5.8. Gráfico de comportamiento de la concentración de imazalil respecto al tiempo de almacenamiento en el tratamiento 2 (imazalil a 500 mg L^{-1}).	189
Figura 5.9. Gráfico de comportamiento de la concentración de imazalil respecto al tiempo de almacenamiento en el tratamiento 6 (imazalil a 1000 mg L^{-1} + 1 % NaHCO_3).	189
Figura 5.10. Gráfico de comportamiento de la concentración de imazalil respecto al tiempo de almacenamiento en el tratamiento 9 (imazalil a 1000 mg L^{-1} + 3 % NaHCO_3).	190
Figuras 5.11. Porcentajes de esporulación y daño de <i>P. digitatum</i> sobre mandarina Afourer inoculada con una cepa sensible al imazalil, para los distintos tratamientos realizados con SOPP/ sin PCZ (<i>Afourer I</i>).	190
Figuras 5.12. Porcentajes de esporulación y daño de <i>P. digitatum</i> sobre mandarina Afourer inoculada con una cepa resistente al imazalil, para los distintos tratamientos realizados con	

SOPP/ sin PCZ (<i>Afourer I</i>).....	191
Figura 5.13 y 5.14 . Porcentajes de esporulación y daño de <i>P. digitatum</i> sobre mandarina Afourer inoculada con una cepa sensible y resistente al imazalil, para los distintos tratamientos realizados sin SOPP/ con PCZ (<i>Afourer II</i>).....	192
Figuras 5.15 y 5.16. Se muestran los porcentajes de esporulación y daño de <i>P. digitatum</i> sobre mandarina Owari inoculada con una cepa sensible y resistente al imazalil, para los distintos tratamientos realizados con SOPP/ sin PCZ (<i>Owari I</i>)	193
Figura 5.17 y 5.18 . Se muestran los porcentajes de esporulación y daño de <i>P. digitatum</i> sobre mandarina Owari inoculada con una cepa sensible y resistente al imazalil, para los distintos tratamientos realizados sin SOPP/ con PCZ (<i>Owari II</i>).....	193
Figura 6.1. Esquema de foto-reactor utilizado.....	199
Figura 6.2. Patrón de degradación fotocatalítica de imazalil (IMZ), pirimetanil (PYR), procloraz (PCZ) y propiconazol (PROP) a escala de laboratorio.....	200

Abreviaturas y acrónimos

AE	Aceite esencial
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
BCC	Back-calculated concentration
BPAs	Buenas Prácticas Agrícolas
CCD	Colony Collapse Disorder
CE	Collision energy: Energía de colisión
CEN	European Committee for Standardization
CI	Ionización química
CID	Disociación inducida por colisión
DCC	Diseño central compuesto
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DG-SANTE	Dirección General de Sanidad y Seguridad Alimentaria
DIEA	Oficina de estadísticas agropecuarias
DLLME	Dispersive Liquid Liquid Microextraction, Microextracción dispersive liquid-líquido
DP	Voltaje de fragmentación, del inglés, Declustering Potential
DRfA	Dosis de referencia aguda
d-SPE	Extracción dispersiva en fase sólida
ECD	Detector de captura electrónica
EEUU	Estados Unidos de América
EM	Efecto matriz
EN	European Standard
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente
ESI	Electrospray Ionization: Ionización por electrospray
FAO	Food Agricultural Organization
FAO ONU	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FLU	Fludioxonil
FMC	Extractor de Food Machinery Company
FPD	Detector fotométrico de llama
FT-ICR-MS	Fourier-Transform Ion-Cyclotron-Resonance Mass Spectrometry
FWHM	Full Width at Half Maximum: Anchura a media altura
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GC	Gas chromatography: Cromatografía gaseosa
GCB	Carbón grafitizado
GC-ECD	Cromatografía gaseosa acoplada a detector de captura electrónica

GC-EI-MS	Cromatografía gaseosa-impacto electrónico-espectrometría de masas
GC-EI-Q	Cromatografía gaseosa-impacto electrónico-cuadrupolo
GC-HR-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
GC-MS/MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas en tándem
GC-NPD	Cromatografía gaseosa acoplada a detector de nitrógeno y fósforo
GC-ToF-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alto desempeño acoplada a espectrometría de masas en tándem
HR	Alta resolución
HRAMS	Espectrometría de masa exacta de alta resolución
HR-MS	Espectrometría de masa de alta resolución
IDA	Ingesta diaria admisible
IDM	Inhibidores de la demetilación
IE	Impacto electrónico
IMZ	Imazalil
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
ISO	International Standardization Organisation
IT	Trampa de iones
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kow	Coefficiente de partición octanol-agua
LC	Cromatografía líquida
LC-DAD	Cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos
LC-ESI-QqQ	Cromatografía líquida-electrospray- acoplada a triplecuadrupolo
LCL	Nivel más bajo de calibración, del inglés, Low Calibration Level
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem.
LC-ToF-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo
LLE	Extracción Líquido Líquido
LMR	Límite Máximo de Residuos
LOQ	Límite de cuantificación
MFE	Molecular
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MRM	Métodos multirresiduos
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de Masas
MS/MS	Masas en tándem
MSD	Detector de espectrometría de masas
MSP	Ministerio de Salud Pública
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida
nAChR	Receptores de acetilcolina de tipo nicotínico

NPD	Detector de Nitrógeno y Fósforo
OC	Organoclorados
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OP	Organofosforado
OPP	Orto-fenilfenol
POA	Procesos de oxidación avanzada
PCA	Análisis de componentes principales
PCZ	Procloraz
PFTBA	Perfluorotributilamina
PHI	Tiempo de espera precosecha, del inglés, Pre Harvest Interval
PIC	Producción Integrada de Cítricos
PROP	Propiconazol
PSA	Amina Primaria y Secundaria
PYR	Pirimetanil
QqQ	Triplecuadrupolo
QToF	Cuadrupolo-Tiempo de vuelo
Q-TRAP	Cuadrupolo-Trampa de iones lineal
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe: Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro por sus siglas en inglés
RF	Factor raíz
RP-C18	Fase reversa-C18
SATA	Guía Uruguaya para la protección y nutrición vegetal
SC	Sin cobertura
SIM	Monitoreo de iones simples
SOPP	Orto-fenilfenol de sodio
SPE	Extracción en fase sólida
SQ	Cuadrupolo simple
SRM	Método monoresiduo
TBZ	Tiabendazol
TFC	Tecnología de flujo capilar
ToF	Tiempo de vuelo
TPP	Trifenilfosfato
UE	Unión Europea
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alto desempeño
UHPLC- (ESI) -HR- ToF	Cromatografía Líquida de ultra alta desempeño-electrospray-acoplado a espectrometría de masas de alta resolución
UHPLC-HR- AMS-ToF	Cromatografía líquida de ultra alto desempeño acoplada a un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo
UHPLC- MS/MS	Cromatografía líquida de ultra alto performance acoplada a espectrometría de masas en tándem
UHPLC- QToF-MS	Cromatografía líquida de ultra alto desempeño acoplada a un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo

UHPLC-ToF-MS	Cromatografía líquida de ultra alto desempeño acoplada a un espectrómetro de masas de tipo tiempo de vuelo
UNBR	Regulación Bromatológica Nacional Uruguay
UV	Ultravioleta
DSR	Desviación Estándar Relativa

RESUMEN

La agricultura posee un rol preponderante en el desarrollo humano, resultando de importancia sustancial la investigación que promueva su desarrollo y comprenda en su campo de acción el control de enfermedades que puedan afectar su rendimiento y productividad o amenazar la salud humana como por ejemplo, la contaminación microbiana o la presencia de micotoxinas. En este sentido, la industria cítrica cumple con estrictas prácticas de sanitización durante el cultivo y packing de las frutas frescas de forma de prevenir y controlar la contaminación microbiana que puede causar el deterioro de la fruta. Sumado al deterioro de la calidad de los frutos que son afectados por pestes en el campo, las pérdidas durante el almacenamiento y transporte de los frutos cítricos, provocadas directamente por ataques de hongos patógenos en postcosecha, han sido estimadas en un 90 %, en aquellos casos en que no se aplican fungicidas. Es por ello, que los productos químicos utilizados en la producción se han convertido en una herramienta que permite la obtención de niveles de rendimiento y calidad. El estudio de la dinámica de los residuos de pesticidas resultantes en las distintas etapas de la cadena productiva, su distribución en los productos procesados y en los compartimentos ambientales es crítica para comprobar el cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas, la sustentabilidad del sistema productivo global y la inocuidad de los alimentos y sub-productos que resulten. Para realizar este estudio, la instrumentación de alta sensibilidad junto a modernos tratamientos de muestra, permiten trabajar con metodologías analíticas con límites de cuantificación a nivel de trazas. El objetivo de esta tesis fue estudiar la dinámica de los residuos de pesticidas en la cadena cítrica. Los objetivos específicos, contemplando la cadena globalmente fueron:

- 1) Desarrollo de metodologías analíticas y estudio de los factores que influyen en la eficiencia de las determinaciones como ser el Efecto Matriz;
 - 2) Estudio de la disipación de pesticidas de precosecha en el campo;
 - 3) Adecuación de los tratamientos de pre y poscosecha en las condiciones de producción para cumplir con las disposiciones vigentes y asegurar la inocuidad de los productos;
 - 4) Estudio de la eficacia de nuevas alternativas para la disminución del uso de
-

fungicidas de poscosecha;

5) Caracterización de los niveles de residuos de pesticidas en los efluentes de los packings nacionales y estudio de posibles vías para su remediación empleando procesos de oxidación avanzada.

Durante todo el período de trabajo en estos estudios de posgrado

1. Se desarrollaron y validaron metodologías analíticas para la determinación de residuos de pesticidas en fruta fresca (naranja, mandarina y limón), en aceites esenciales y en jugo concentrado de limón. Estas metodologías permiten determinar la mayoría de los pesticidas seleccionados a niveles adecuados para cada matriz estudiada, lográndose en todos los casos, límites de cuantificación menores que los límites máximos de residuos establecidos para cada matriz. Las metodologías desarrolladas se emplearon para el análisis de muestras reales así como también para determinar el residuo remanente sobre muestras de ensayos realizados a campo y en poscosecha.

2. Se desarrolló una base de datos de alta resolución para el monitoreo de residuos de pesticidas en naranja con un sistema instrumental de alta resolución GC-ToF.

Por otro lado, uno de los aspectos que influyen en la determinación analítica de residuos de pesticidas con espectrometría de masas utilizando ionización por electrospray es el Efecto Matriz, esto es la influencia de los coextractivos de la matriz en estudio sobre la determinación. El Efecto Matriz se estudió durante el análisis de pesticidas utilizando una metodología acetato de etilo desarrollada (que fuera previamente validada) y trabajando con un sistema instrumental de alta resolución LC-ToF. Los resultados obtenidos indican que para una correcta cuantificación de residuos de pesticidas, es necesario trabajar con curvas de calibración preparadas en la misma matriz que la muestra o en su defecto, utilizando una variedad de la misma especie. Se pudo determinar que la coelución de analitos y metabolitos coextraídos de la matriz, es una de las causas más importantes del Efecto Matriz y que este efecto de la coelución puede minimizarse al trabajar con masas exactas de alta resolución.

2. Se desarrollaron experimentos a campo sobre variedades de mandarinas y naranja para establecer las curvas de disipación de 5 pesticidas utilizados habitualmente en instancias de precosecha y para los mismos se establecieron los tiempos de vida media bajo las condiciones del estudio. Los resultados mostraron que abamectina, spinosad, piraclostrobina, difenoconazol e imidacloprid se disipan en las condiciones de la producción nacional, alcanzando concentraciones menores que sus respectivos LMR al

momento de la cosecha. Se evaluó también cómo influye el almacenamiento en frío de la fruta durante la poscosecha de mandarinas Clementinas, sobre el nivel de residuos de pesticidas que fueron aplicados a nivel de campo. El nivel de residuo luego de 30 días de almacenamiento en frío no fue significativamente diferente para los activos estudiados en dicha variedad.

4. Se evaluó la utilización de NaHCO_3 conjuntamente con imazalil como tratamiento de poscosecha en la línea de empaque buscando disminuir la carga de pesticida a ser utilizado y de esta forma influir sobre la generación de resistencia y disminución de su impacto ambiental. La incorporación de la sal no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ni en el nivel de residuo de imazalil obtenido sobre la fruta.

5. Se ajustó la determinación de pesticidas de poscosecha en efluentes de packings y se analizaron muestras reales. En base a los compuestos detectados, se evaluó a escala de laboratorio la utilización de fotocatalisis heterogena utilizando TiO_2 como catalizador como herramienta para remediar efluentes. Los resultados obtenidos muestran una degradación de más del 97 % de cada pesticida trabajando con el estándar puro a una concentración de 10 mg L^{-1} .

Los aportes de este trabajo sirven, por un lado para comprender mejor aspectos de la dinámica de pesticidas en el marco de las actividades productivas y tecnologías que la industria citrica realiza, que llevan a obtener los niveles de residuos observados. Se corrobora en estas condiciones, el cumplimiento de los límites máximos de residuos y por lo tanto, la inocuidad de la fruta producida. Por otro lado, se plantean estrategias de remediación de los residuos de pesticidas generados en los packing cítricos para disminuir el impacto ambiental de la producción citrícola sobre el ambiente acuatico.

ABSTRACT

Agriculture has a very important role in human development. For that reason it is of paramount importance for all the investigations promoting the evolution around this topic to better understand how to control pests that can affect the yield and productivity of the production chain. Those problems can also affect human being, through microbial contamination or micotoxins presence in the fruits. Because of that, the citrus industry complies with strict sanitation practices during the cultivation and packing of fresh fruits in order to prevent and control the microbial contamination that can cause the deterioration of the fruits. In addition to the deterioration in the quality of the fruits that are affected by pests in the field, the losses during the storage and transport of the citrus fruits, caused directly by attacks of pathogenic fungi in postharvest when fungicides are not applied, is estimated in 90 %. For that reason, the chemical products used in production have become a tool that allows obtaining levels of performance and quality.

The study of the dynamics of pesticide residues in the different stages of the production chain, its distribution in processed products and in environmental compartments is critical to comply with good agricultural practices, the sustainability of the global productive system and the safety of the resulting foods and by-products.

The new high sensitivity instrumentation coupled to modern sample treatments, allow to develop analytical methodologies with limits of quantification at trace level. The main objective of this thesis was to study the dynamics of pesticide residues in the citrus chain.

The specific objectives, considering the global citrus chain were:

- 1) Development of analytical methodologies and study of the different parameters with any influence in the efficiency of determinations such as the Matrix Effect,
 - 2) Study of the dissipation of pre-harvest pesticides in the field.
 - 3) Fitness of pre and post harvest treatments in the production conditions to comply with current regulations and ensure the safety of the products.
 - 4) Study of new alternatives for reducing the use of post-harvest fungicides
 - 5) Characterization of the levels of pesticide residues in effluents from national packings and study of possible ways for their remediation using advanced oxidation
-

processes.

During this period, the tasks undertaken and outputs accomplished were:

1 Analytical methodologies were developed and validated for the determination of pesticide residues in fresh fruit (orange, mandarins and lemon), in essential oils and in concentrated lemon juice. These methodologies make it possible to determine the majority of the selected pesticides at appropriate levels for each matrix studied. In all cases, limits of quantification lower than the maximum residue limits established for each matrix were achieved. The developed methodologies were used for the analysis of real samples as well as to determine the remaining residue on samples of field and post-harvest tests carried out.

2. A high-resolution database was developed, aiming to monitor pesticide residues in orange with a high-resolution instrument system GC-ToF.

On the other hand, one of the aspects that influence the analytical determination of residues by mass spectrometry with electrospray ionization is the Matrix Effect, this is the influence of the coextractives of the matrix under study on the determination. The Matrix Effect was studied during the analysis of pesticides using a developed ethyl acetate methodology (which was previously validated) using a high-resolution LC-ToF instrument system. The results obtained indicate that for a correct quantification of pesticide residues, it is necessary to work with matrix matched calibration curves or almost using a variety of the same species. It was determined that the coelution of coextracted analytes and metabolites of the matrix is one of the most important causes of the Matrix Effect and that this effect can be minimized working with high resolution systems.

3. Field experiments on mandarins and orange varieties were developed to establish the dissipation curves of 5 pesticides commonly used in pre-harvest instances and their half-lives were established under the study conditions. The results showed that abamectin, spinosad, pyraclostrobin, difenoconazole and imidacloprid dissipated under the national production conditions, reaching lower concentrations than their respective MRLs at the time of harvest. The influence of the cold storage of the fruit during the post-harvest of Clementine mandarins, on the level of pesticide residues that were applied at the field level, was also evaluated. The level of residue after 30 days of cold storage has no significative difference for the studied analytes.

4. The use of NaHCO₃ together with imazalil was evaluated as post-harvest treatment

in the packaging line, seeking to reduce the pesticide load and reduce the generation of resistance and decrease in its environmental impact. The incorporation of the salt did not show significant differences between the treatments nor in the level of imazalil residue on the fruit as well as in the protection level achieved.

5. The determination of postharvest pesticides in packings effluents was adjusted and real samples were analyzed. Based on the detected compounds, the use of heterogeneous photocatalysis using TiO_2 as a catalyst to mitigate effluents was evaluated at a laboratory scale. The results obtained showed more than 97 % degradation of each pesticide working with pure standards at a concentration of 10 mg L^{-1} .

The contributions of this work are relevant as they would help in one hand to better understand aspects of the dynamics of pesticides in the framework of productive activities and technologies of the citrus chain. It was corroborated under these conditions, compliance with the maximum residue limits and, therefore, the safety of the fruit produced. On the other hand, strategies for the remediation of pesticide residues generated in citrus packing are proposed to reduce the environmental impact of citrus production on the aquatic environment.

PRÓLOGO

Este trabajo de tesis doctoral titulado “Dinámica de los residuos de pesticidas empleados en la cadena citrícola” presenta estudios realizados en las distintas matrices citrícolas, en lo que respecta a la dinámica de residuos de pesticidas durante la producción de fruta fresca y sub-productos citrícolas. La ejecución del trabajo experimental se realizó entre 2012 y 2017. La redacción de la tesis y preparación de manuscritos presentados en revistas internacionales arbitradas fue realizada mayormente entre los años 2017 y 2018. Este trabajo ha sido escrito como requerimiento para obtener el título de Doctor en Química, otorgado por la Facultad de Química de la Universidad de la República.

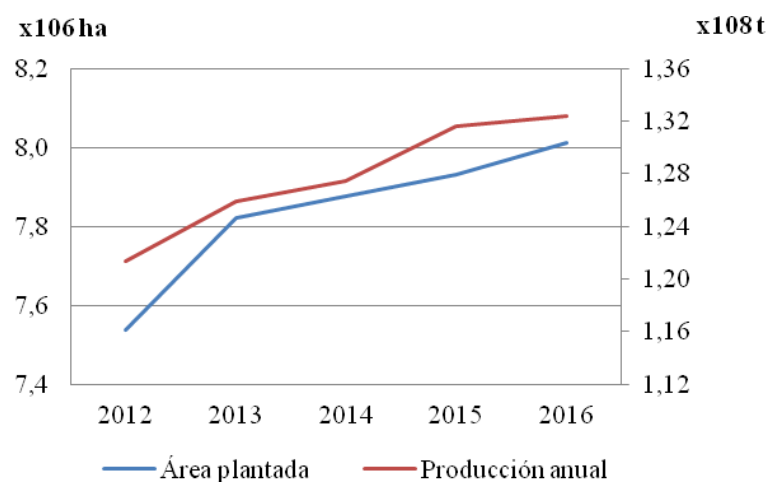
El trabajo presenta una introducción general y posteriormente se ordena en 4 capítulos en donde el Capítulo I aborda la validación de metodologías analíticas para la determinación de residuos de pesticidas en fruta fresca (mandarina, naranja y limón), en jugo concentrado y en aceites esenciales. Posteriormente, el Capítulo II se focaliza en la utilización de sistemas instrumentales de masas exactas para el análisis de pesticidas en fruta, estudiando por un lado la influencia de la variedad cítrica en el efecto matriz, y por otro, el empleo de una base de datos automática para monitorear la presencia de pesticidas en naranja. El Capítulo III hace especial énfasis en los estudios de disipación de los pesticidas en etapas de cosecha y la influencia del almacenamiento poscosecha en los residuos remanentes. El capítulo IV se centra en el análisis de efluentes de packings citrícolas y la búsqueda de remoción de los pesticidas en ellos contenidos, mediante el uso de fotocatalisis. Finalmente, se presentan las conclusiones del trabajo de investigación y algunas perspectivas que hacen a la continuidad de la línea de investigación. El orden de escritura se estableció buscando plantear un hilo conductor lógico para el lector y considerando que se utilizaron más de 5 sistemas instrumentales con distintos principios de funcionamiento y utilizados específicamente en cada matriz/ensayo.



INTRODUCCIÓN Citricultura en Uruguay y el mundo

1.1.1. Producción mundial

Tradicionalmente, los cítricos son cultivos significativamente rentables y se encuentran entre las frutas más ampliamente producidas y populares en el mundo (Dugo & Di Giacomo, 2002; Liu, Heying, & Tanumihardjo, 2012). El género *Citrus* pertenece a la familia de las Rutaceae e incluye un número incierto de especies. Su taxonomía sigue siendo una cuestión abierta debido a la gran cantidad de híbridos naturales y artificiales derivados de la alta compatibilidad sexual entre las distintas especies. Algunos estudios filogenéticos señalan la existencia de tres especies verdaderas de *Citrus*: *Citrus reticulata*, *Citrus medica* y *Citrus maxima*, siendo los híbridos combinaciones de las anteriores; sin embargo, algunos autores plantean la hipótesis de que existían otras especies verdaderas como *Citrus micrantha* (Páscoa, Moreira, Lopes, & Sousa, 2018). Las naranjas (*Citrus x sinensis*), mandarinas (*Citrus reticulata*; *Citrus nobilis*;) y limones (*Citrus x limón*) son los cítricos más conocidos y consumidos en el mundo. Según el reporte de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO ONU), el área mundial de cultivo de cítricos fue de 8 millones de hectáreas en 2016, con más de 132 millones de toneladas de producción (FAO, 2018b). En los últimos años, según reportes de FOASTAT, la producción mundial va acompañada con el área plantada (Figura 1.1).

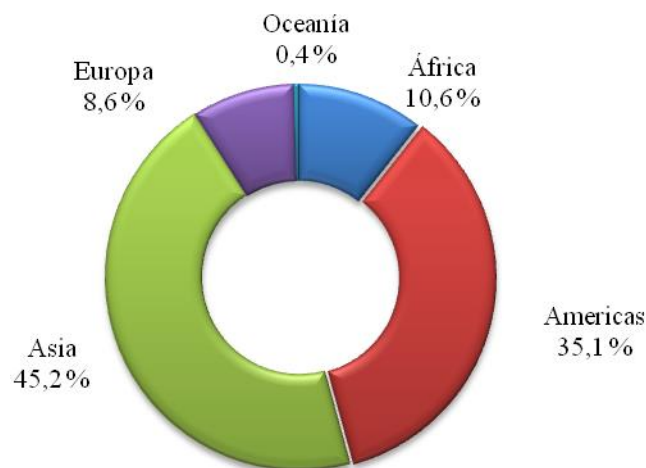


Fuente: elaborado en base a FAOSTAT (Sept, 2018)

Figura 1.1. Producción anual (t) para naranjas, mandarinas, limones y pomelos y área de plantación (ha) mundial de cítricos en el período 2012-2016. Incluye naranja, mandarinas, limones y pomelos.

Aunque los cítricos se cultivan en más de 140 países en diferentes regiones del mundo, la mayor parte del cultivo crece a ambos lados de un cinturón alrededor del Ecuador que cubre las zonas tropicales y subtropicales del globo terráqueo, 35° N y 35° S de latitud (Liu, et al., 2012). Las latitudes extremas son relativamente menos productivas, no obstante, el frío provoca mejoras en la calidad externa e interna de los frutos. Los cítricos cultivados en las zonas sub-tropicales presentan en general una producción anual que se concentra en invierno a pesar de que la estacionalidad de la producción ha sido objeto de selección varietal, intentando ampliar el ciclo de producción global. Estas características determinan en gran medida la orientación de la producción en las distintas regiones del mundo. La calidad, en lo que a sabor y color respecta de las naranjas y mandarinas producidas en las regiones sub-tropicales cumplen las más altas exigencias del mercado de consumo en fresco (DIEA, 2003). El 80 % de la producción mundial corresponde a África y las Américas. En el periodo 2012-2016 China, Brasil, EEUU, Sudáfrica, España han sido los principales países productores de cítricos del mundo (FAO, 2018b).

Producción mundial de cítricos 2012-2016



Fuente: elaborado en base a FAOSTAT (Sept, 2018)

Figura 1.2. Producción mundial de cítricos para naranjas, mandarinas, limones y pomelos por continente periodo 2012-2016. Incluye naranja, mandarinas, limones y pomelos.

1.1.2. Citricultura en Uruguay

1.1.2.1. Producción

En nuestro país, existen dos grandes zonas en donde se concentra la producción cítrica con características diferentes en lo relativo a importancia del rubro, estructura de la producción y clima: Litoral Norte y Sur. La zona Norte, que es la más extensa, abarca a los departamentos de Paysandú y Salto en los cuales la citricultura constituye un rubro de gran importancia económica y social. Hay diferencias climáticas marcadas entre el Norte y el Sur. En el litoral Norte la variación climática es más marcada, mayores temperaturas en verano e inviernos más fríos que determinan diferencias en la época de maduración y en la calidad de la fruta. En todas las variedades de naranja y mandarina se comprueba que la maduración en el Norte es más temprana y que la fruta tiene mejor color. En el Norte predomina la producción de naranja seguida por la mandarina. La zona Sur que incluye la faja costera del departamento de San José, parte de Canelones, Montevideo y en menor medida Maldonado y Colonia, la producción es predominantemente de limones (DIEA, 2003).

Existen actualmente en el país 423 empresas cítricas con una superficie efectiva de 14.846 ha. En el periodo 2012-2016, el orden en la producción de frutos cítricos fue: naranja > mandarina > limón > pomelo (ver Figura 1.3). En 2016 la producción total fue de 271.115 toneladas. Del total, 38 % se exportó como fruta fresca, 27 % se destinó a la industria y un 35 % correspondió al consumo del mercado interno más las pérdidas normales de la producción.

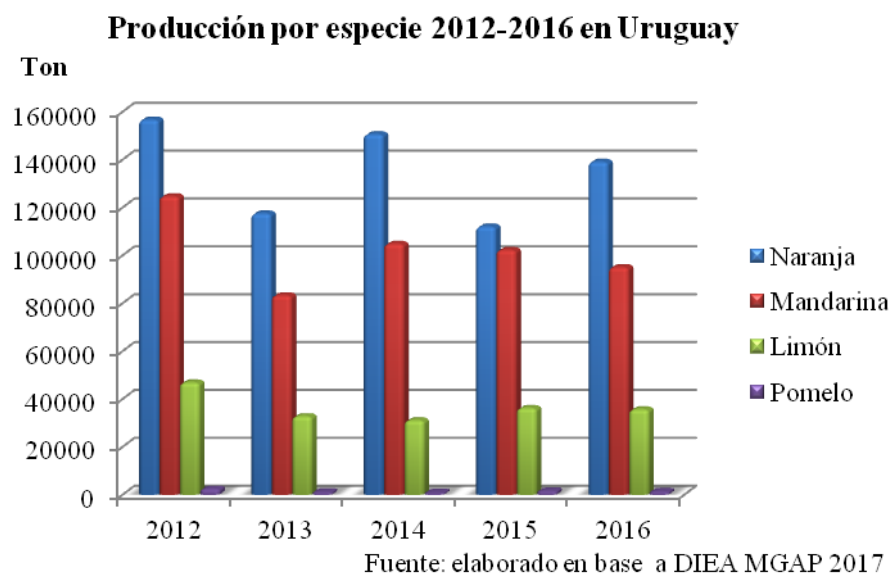


Figura 1.3. Producción anual (toneladas) de cítricos por especie y por año (2012-2016)

en Uruguay.

En Uruguay, los cítricos son la principal fruta de exportación, seguidos por las manzanas y peras (DIEA, 2017). En la Tabla 1 se presentan las toneladas exportadas de cada especie y cada variedad cítrica en el periodo 2012-2016. En promedio, del total de exportaciones, un 54,6 y 32,5 % corresponden a naranjas y mandarina respectivamente, mientras que un 12,9 % corresponde a limones siendo la exportación de pomelo prácticamente insignificante (menos de 0,01 %).

Especie	Variedad	Total	2012	2013	2014	2015	2016
			95735	113026	122780	98024	109492
		<i>Subtotal</i>	45788	61330	60915	98024	57305
Naranja	Valencia		24170	37761	36047	44745	33564
	Navel		15082	15468	17876	27393	14350
	Salustiana		6521	8101	6992	10329	9391
	Otras		16	0	0	0	0
		<i>Subtotal</i>	35387	39073	44067	36973	36831
Mandarina	Clementina		8185	5903	7406	18771	7178
	Ortanique		3880	5514	4498	2004	4559
	Satsuma		7746	7997	9227	7159	4497
	Ellendale		1987	2499	1464	1594	1144
	Otras		13590	1716	21472	7445	19453
Limón		<i>Subtotal</i>	14500	12508	17727	16110	15340
Pomelo		<i>Subtotal</i>	60	115	71	196	16
	Star Ruby		s/d	2	71	196	16
	Ruby red		s/d	0	0	0	0
	Marsh		s/d	113	0	0	0

Tabla 1.1. Exportaciones de fruta cítrica por año según especie y variedad (en toneladas). s/d: sin datos. Tomado de DIEA MGAP 2017

Dentro de los principales países de exportación se encuentran Rusia, EEUU, Holanda, España, Arabia Saudita, entre otros. En el año 2016, más del 40 % de las exportaciones fueron a la Unión Europea, y alrededor de un 31 % del total al resto de América. En particular, el mercado con los Estados Unidos de América se abrió en el año 2013 y actualmente representa casi un 15 % del total de las exportaciones del país (DIEA, 2017).

1.1.2.1. Industrialización

Aunque muchos cítricos, como naranjas, mandarinas y pomelos se pueden consumir frescos, alrededor de un tercio de los cítricos en todo el mundo se utilizan después del

procesamiento, y la producción de jugo de naranja representa aproximadamente el 85 % del consumo total de los productos cítricos procesados (Liu, et al., 2012). En Uruguay, alrededor del 27 % de la producción es industrializada. Debido a ello, la cadena citrícola nacional no solo involucra la exportación de fruta fresca, sino que también sus subproductos como los jugos concentrados, aceites esenciales que son los que poseen mayor valor agregado y se comercializan para uso humano sabiendo también que existen otros subproductos de uso animal, como ración. Según el último reporte de la DIEA MGAP, se exportaron 3.900 toneladas de jugos concentrados, 544 toneladas de pellets y 118 toneladas de aceites esenciales en el 2016, lo que hace un total de ganancias, debido a éstas exportaciones, de 10264 millones de dólares (DIEA, 2017). En general, la industrialización de los cítricos es una buena alternativa para aquellas cosechas que no pueden comercializarse por determinadas circunstancias, como por ejemplo, para aquellas frutas no cumplen con el calibre de exportación. Los principales subproductos obtenidos son los jugos concentrados, los aceites esenciales, y los pellets, entre otros.

1.1.2.1.1. Jugos concentrados

La base para la producción de jugo concentrado es aumentar el contenido de materia seca y disminuir el contenido de agua de los jugos, a fin de extender la vida útil y facilitar el transporte y almacenamiento (Horváth-Kerkai & Stéger-Máté, 2012). Los jugos concentrados están definidos por la Regulación Bromatológica Nacional Uruguay (UNBR) como "... productos obtenidos por concentración de jugos vegetales que tienen una proporción de volumen mínimo con el jugo original de 50 % (1 a 2), a excepción de los cítricos, que serán 33 % (1 a 3) y que cumplen con los requisitos de esta regulación ... " (MSP, 1994). Los jugos, al igual que la fruta, contienen flavonoides, carotenoides, ácidos grasos, vitaminas entre otros metabolitos (Uçan, Ağçam, & Akyildiz, 2016) que le dan un valor agregado

En lo que a la obtención de jugo se refiere, básicamente son dos las técnicas utilizadas: la FMC, que debe su nombre a la empresa norteamericana Food Machinery Company que la desarrolló, y la Zumex, desarrollada por la empresa española Máquinas y Elementos S. A.

El FMC, es el tipo de extractor más utilizado a escala industrial en la extracción de jugos para la elaboración de concentrados. El principio de funcionamiento se basa en la

separación instantánea de los elementos constituyentes del fruto. Una cuchilla de acero inoxidable corta un círculo de corteza en la parte superior del cítrico, para permitir la separación de la corteza de las porciones interiores de la fruta. En la parte inferior otra cuchilla corta una porción de corteza para permitir el acceso del cilindro de tamizado (prefinisher tube) al interior del fruto. La copa superior y la copa inferior sujetan el fruto durante todo el proceso de exprimido para evitar su rotura. El cilindro de pretamizado separa los elementos internos del fruto en función de su tamaño; el jugo y la pulpa pasarán a través de los orificios del pretamizador y se almacena en el colector de jugo mientras que las membranas y semillas se descargarán por el tubo inferior. Un esquema del FMC es presentado en la Figura 1.4.

El extractor de tipo Zumex (ver Figura 1.4) se basa en el mismo principio que un exprimidor manual típico de cocina utilizado para hacer jugo de naranja. Se utilizan principalmente para la obtención de jugo fresco a pequeña y mediana escala. La fruta se introduce en la rueda de alimentación y se corta por la mitad. Las mitades están orientadas y recogidas en vasos de goma sintética montados en un sistema de correa continua. Una serie de bolas de exprimido (inserciones en forma de cono que tienen bordes moldeados en la forma desde la punta hasta la base del escariador) entran en cada mitad de la fruta y giran a medida que los penetran. La velocidad de rotación varía a medida que penetra en la fruta, siendo más lento hacia el final de la operación. El jugo, la pulpa, y las semillas pasan a través de una salida, y la cáscara restante pasa a través del conducto de la cáscara (Tetra_Pak, 2004). Su gran peculiaridad reside en que en ningún momento las bolas de exprimido están en contacto con la corteza de la fruta, sino solo con la pulpa, para evitar el sabor amargo y obtener, por tanto, un zumo de alta calidad (Pássaro, 2012).

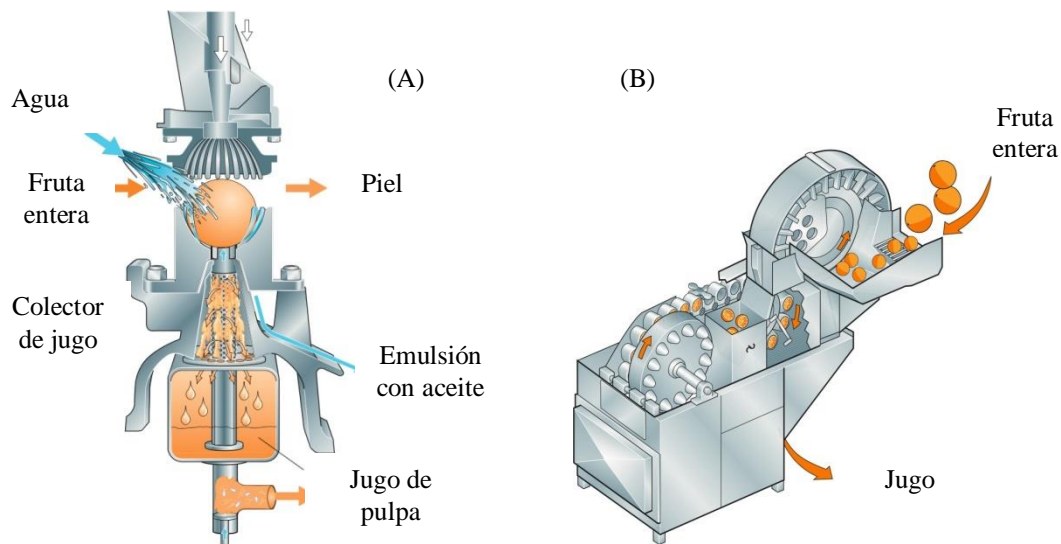


Figura 1.4. Esquemas de operación de extractores de jugo de tipo FMC (A) y Zumex (B). Adaptado de <http://orangebook.tetrapak.com/chapter/fruit-processing> (Tetra_Pak, 2004)

1.1.2.1.2. Aceites esenciales

Para la obtención del aceite esencial de cítricos los procesos utilizados son: extracción, extracción con disolventes volátiles, desterpenación y destilación al vacío. A escala industrial, los aceites esenciales se obtienen como un subproducto de la producción de jugo de fruta (Arce & Soto, 2008). En lo que refiere a extracción, los métodos empleados están ligados de una forma u otra a la de extracción de jugo: método de raspadura y método de sfumadura (por “sfumatura”, en italiano). El primer método se considera idóneo para la transformación en continuo de grandes cantidades de fruto, mientras el proceso de “sfumatura” se prefiere en empresas de tipo medio o artesanales especializadas en producir aceites esenciales de una calidad extraordinaria (Dugo & Di Giacomo, 2002). En el caso de realizar la extracción por raspadura, los frutos son raspados liberándose el aceite esencial de las glándulas, junto con restos de corteza. El aceite y demás son arrastrados por una fina lluvia hacia una refinadora que filtra y separa la emulsión oleosa de las partículas en suspensión; mediante la centrifugación se obtiene de dicha emulsión una fase acuosa que se somete a recirculación, otra emulsión que se somete a destilación y una fase oleosa que tras una nueva centrifugación produce un efluente acuoso que es enviado a destilación, y el aceite esencial (Pássaro, 2012).

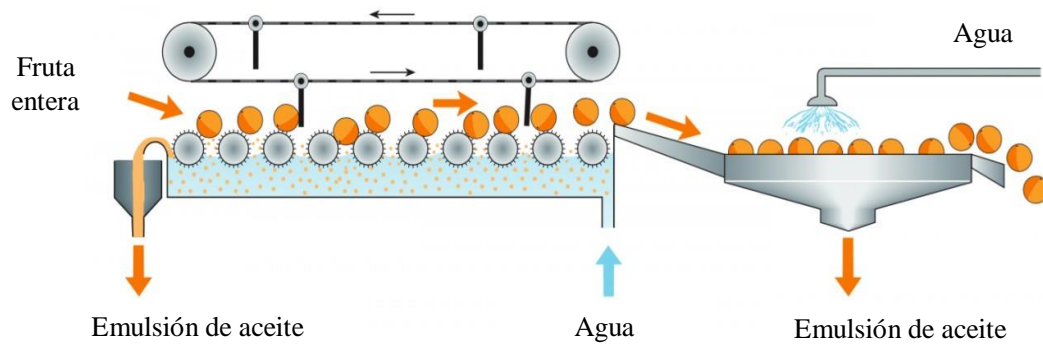


Figura 1.5. Esquema de extracción de aceite esencial por el método de raspadura.

Adaptado de <http://orangebook.tetrapak.com/chapter/fruit-processing> (Tetra_Pak, 2004)

En el método de esfumatura, actúa sobre la corteza una vez se ha extraído el zumo, presionándola y comprimiéndola repetidamente para lograr la salida del aceite esencial de las glándulas que es arrastrado por una fina lluvia de agua. La fase líquida se filtra para separarla de los restos de corteza y se somete a una primera centrifugación en la que se obtiene una emulsión enriquecida en aceite esencial, cerca de un 80 %, y una fase acuosa que se recircula tras decantación. La fase oleosa sometida a una segunda centrifugación permite obtener el aceite esencial y una fracción acuosa con un elevado contenido en ceras.

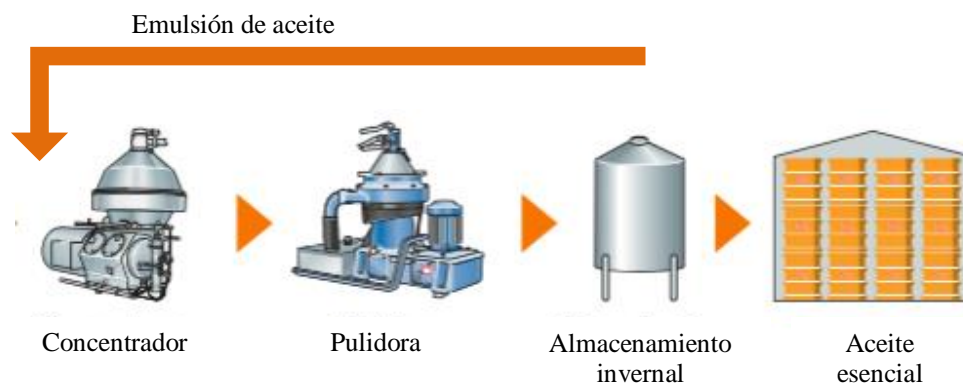


Figura 1.6. Esquema de obtención de aceite esencial a partir de la emulsión de aceite.

Adaptado de <http://orangebook.tetrapak.com/chapter/fruit-processing> (Tetra_Pak, 2004)

El aceite esencial cítrico (AE) que se obtiene es una mezcla compleja de aproximadamente 400 compuestos y su contenido, así como su composición, depende de: (a) las especies, variedad y cultivar, (b) el cultivo, (c) la extracción y (d) los métodos de separación (Nannapaneni, et al., 2009). Los AE cítricos contienen de 85 a 99 % de

componentes volátiles y de 1 a 15 % de componentes no volátiles (K. Fisher & Phillips, 2008). Los constituyentes volátiles son una mezcla de monoterpenos (como el limoneno) e hidrocarburos sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados, incluidos aldehídos, cetonas, ácidos, alcoholes y ésteres. La fracción no volátil incluye hidrocarburos de cadena larga, ácidos grasos, esteroides, carotenoides y compuestos heterocíclicos oxigenados (Flamini, Tebano, & Cioni, 2007).

1.2. La cadena citrícola y el uso de pesticidas

La cadena citrícola se puede dividir en dos grandes bloques: la precosecha y la poscosecha. En ambas etapas de la cadena productiva, el cultivo es susceptible al ataque por plagas: insectos, hongos y malezas y en consecuencia se hace indispensable suministrar pesticidas y/u otras alternativas de manejo de plagas.

Un pesticida, según lo define el Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Pesticidas de la FAO (FAO, 2002), es “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte”. La definición no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales.

En Uruguay al igual que en el resto del mundo, el cultivo recibe diversas aplicaciones de pesticidas para protegerlo de insectos, hongos y malezas como se explicará más adelante en esta sección. Como consecuencia del uso de estos agroquímicos, residuos de pesticidas permanecen sobre los alimentos y en el ambiente. Los residuos se definen como “cualquier sustancia específica presente en o sobre los alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un pesticida. El

término incluye cualquier derivado de un pesticida, como productos de conversión, metabolitos, productos de reacción, e impurezas consideradas de importancia toxicológica. El término “residuo de pesticida” incluye tanto los residuos de procedencia desconocidas o inevitables (por ejemplo, ambientales), los generados por usos conocidos de la sustancia química y los metabolitos de los principios activos de significancia toxicológica” (FAO, 2002).

Actualmente los residuos de pesticidas se encuentran regulados por diferentes organismos en todo el mundo, como la Unión Europea y el *Codex Alimentarius*, quienes establecen Límites Máximos de Residuos (LMRs) para la mayoría de los pesticidas buscando proteger la salud de los consumidores y asegurar las buenas prácticas agrícolas e industriales. La UE, a través de la Directiva 1107/2009/CE ha armonizado los LMRs para todos los alimentos destinados al consumo animal o humano y posteriores actualizaciones incluyen nuevos pesticidas y matrices alimentarias (European_Commission, 2005, 2013). También establece, un límite máximo de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ aplicable por defecto para aquellos productos y/o pesticidas en los que no se ha establecido un LMR. Por otro lado, los LMRs establecidos por el *Codex Alimentarius* se aplican principalmente a productos que circulan en el comercio internacional (Codex_Alimentarius, 2003). En ambos casos, los LMRs están establecidos para asegurar que la cantidad total de residuos de pesticidas absorbidos a través del consumo de alimentos no exceda la cantidad aceptable de ingesta diaria (cantidad de un pesticida que los humanos pueden ingerir en un día sin ningún efecto perjudicial) para un pesticida, cualquiera que sea.

El proceso para establecer los LMRs consta de 4 etapas: 1) *Identificación del factor de peligro*. Información acerca de la estructura química y propiedades de la sustancia química. Conlleva también la definición del residuo marcador que será analizado por los laboratorios. 2) *Caracterización del factor de peligro*. Los ensayos toxicológicos de la sustancia activa en cuestión permiten fijar ciertos parámetros como la Ingesta Diaria Admisible (IDA) y, en su caso, la Dosis de referencia aguda (DRfA). 3) *Determinación de la exposición*. Resulta de la combinación de la información de los ensayos de residuos supervisados que revelan la concentración de residuos que puede aparecer en un cultivo tratado con un pesticida bajo determinadas condiciones de uso (Buenas Prácticas Agrícolas), con la utilización de modelos de dieta apropiados que determinan la ingesta diaria estimada del residuo fitosanitario de la población, incluyendo

información extraída de encuestas alimentarias de consumidores extremos o especialmente vulnerables (por ejemplo, niños). En resumen, sería ¿Qué concentración de residuos permanece en el alimento como consecuencia de la aplicación? multiplicado por ¿Qué cantidad ingerimos ese alimento? Como paso final de la fijación de los LMRs (4) se encuentra la *Caracterización del riesgo*. Consiste en cruzar los niveles de residuos resultantes de la aplicación solicitada con los parámetros toxicológicos de la sustancia activa, de manera que si no se supera la IDA (Ingesta Diaria Admisible), de acuerdo a la participación del alimento en la dieta de la población ni la DRfA (Dosis de Referencia Aguda), se podría admitir ese valor como LMR, una vez dividido por un factor de seguridad (generalmente 10 o 100) para obtener un valor que brinde confiabilidad en la inocuidad del residuo del producto en el alimento (AECOSAN, 2018).

Los Límites Máximos de Residuos (LMRs) para frutas y verduras en nuestro país, son los establecidos por el *Codex Alimentarius* (FAO, 2018a). En los casos para los que no está definido el LMR por el *Codex*, los LMRs son los establecidos por la Comunidad Europea o el organismo competente de los Estados Unidos de América (MGAP, 2018; MSP, 1994, 2009). Cada LMR está definido para la combinación matriz-pesticida, por ejemplo el LMR establecido por la UE para imazalil en naranja es de 5 mg kg⁻¹ mientras que para el mismo pesticida en durazno es de 0,05 mg kg⁻¹. Además, es importante tener en cuenta que cuando un LMR no está definido en la UE, dicha legislación define un valor por defecto de 0,01 mg kg⁻¹.

Teniendo en cuenta las políticas sanitarias, países productores y exportadores como el nuestro deben contar con herramientas que le permitan evaluar los residuos de los pesticidas según dichos requerimientos y a su vez poder establecer los compases de espera de la fruta luego del tratamiento con los agroquímicos. Una de las herramientas fundamentales es el poseer protocolos analíticos validados que permitan a los exportadores conocer la concentración de pesticidas a lo largo de toda la cadena productiva.

Así mismo, para la producción cítrica del país es importante no superar los LMRs para el mercado interno así como las exigencias de los distintos mercados internacionales, ya que es una industria fundamentalmente exportadora.

Debido a las características inherentes de los productos cítricos, este impacto es muy distinto al que se produce por el uso de pesticidas en otros cultivos. Por lo tanto, resulta

necesario estudiar los distintos compartimentos del proceso que están posiblemente afectados: fruta en chacra y fruta en poscosecha, aceites esenciales y jugos concentrados así como también efluentes de la producción por separado. Las frutas cítricas se caracterizan por la presencia de aceites esenciales y cera en su piel. La capa natural de cera de una naranja durante su crecimiento es secretada a una velocidad que es suficiente para contrarrestar el crecimiento en la superficie de la fruta. Sin embargo, cuando el crecimiento de la fruta disminuye, la acumulación de cera aparentemente no se ve afectada y la cobertura de la cera se vuelve más gruesa y evita la pérdida de peso durante el almacenamiento (Schulman & Monselise, 1970). Dado que la mayoría de los pesticidas orgánicos no iónicos son solubles en aceites y ceras vegetales, pueden penetrar hasta cierto punto en los tejidos cuticulares y subcuticulares de las partes tratadas de las plantas, incluso si no son verdaderamente sistémicos (Edwards, 1975). El Kow del pesticida estudiado como medida lipofílica puede inferir su persistencia en la fruta.

1.2.1. Precosecha

1.2.1.1 Protección del cultivo en chacra

Dada la importancia de los problemas ocasionados por las plagas y la amplia distribución del cultivo de cítricos a nivel mundial, se puede comprender fácilmente el gran número de productos que se aplican actualmente de manera de disminuir las pérdidas en la producción. La necesidad de un control estricto y efectivo de las plagas de los cítricos se relaciona con muchos factores, todos los cuales ayudan a explicar por qué el uso de pesticidas es tan frecuente y por qué los métodos de uso deben regularse cuidadosamente. Son numerosos los artrópodos que viven a expensas de los cultivos cítricos y su presencia afecta tanto a la producción como a la calidad (Agustí, 2012). Estas pérdidas pueden ser muy variables puesto que dependen de factores como la especie y la variedad, la climatología y el manejo del cultivo. Por ejemplo, durante las épocas lluviosas se incrementan las poblaciones de plagas como el picudo de los cítricos, los minadores y los ácaros. En cuanto a las enfermedades, se incrementa la incidencia de antracnosis, gomosis, bacteriosis y virosis (ICA, 2012).

Por lo tanto, todas las especies de cítricos son vulnerables al ataque por parte de insectos, hongos, bacterias y virus. En lo que refiere a enfermedades, *Phytophthora spp.* (Gomosis), *Colletotrichum* (Antracnosis), *Xanthomonas axonopodis* (Cancro),

Alternaria spp. y *Phyllosticta citricarpa* (mancha negra de los cítricos), *Micosphaerella citri* (mancha grasienta), y *Elsinoe fawcetti* (sarna de los cítricos) se destacan en el cultivo (Scattolini, 2003). En cuando a plagas animales, *Phyllocnistis citrella* (minador de hojas de cítricos), *Dhiaphorina citri* (psilido), *Compsus spp.* (picudo de los cítricos) entre otros (Rodríguez, Avanza, Mazza, & Giménez, 2010; Shinde, et al., 2017; Timmer, Peever, Solel, & Akimitsu, 2003)

Dadas las diferentes amenazas para el cultivo a campo, éstas deben controlarse para asegurar la rentabilidad de la producción. En España, se estima que el control de plagas representa entre un 30-35 % del costo del cultivo (Agustí, 2012). Desde los primeros problemas con el control de plagas, los controles más utilizados y exitosos disponibles para los técnicos han sido los agentes de control químico.

El uso de productos químicos en aerosoles, polvo o fumigantes para controlar plagas de insectos y ácaros en árboles de cítricos es una práctica de larga data entre los productores de cítricos en la mayoría de las áreas productoras. En Uruguay se utilizan distintos activos a nivel de campo para el control de las pestes nombradas anteriormente, entre ellos se encuentran activos como clorpirifos, captan, imidacloprid, difenoconazol así como otros más recientes y de origen natural como las avermectinas y espinosines. El uso de éstos productos puede influir negativamente en el desarrollo de los árboles y la calidad de los frutos afectando la recolección y las posibilidades de comercialización de los productos. Por lo tanto, dado el incremento significativo de los costos de producción su uso se ha limitado a problemas para los cuales el productor no tiene otras alternativas (Carman, 1989). En la mayoría de los casos, el impacto de las sustancias químicas se puede atribuir a una interferencia directa o indirecta con el proceso metabólico normal del organismo de la plaga inducido por las propiedades físicas de la sustancia química, o a una reactividad química del material, o a ambos (Carman, 1989).

El abordaje de la problemática sanitaria en el cultivo con el fin de definir estrategias de control, solamente se alcanza conociendo al cultivo mismo, su manejo y los estadíos de los patógenos que lo afectan así como la interacción con el ambiente (Scattolini, 2003). Por otra parte, teniendo en consideración el medioambiente, la salud de los agricultores y de la población en general, conceptos que se incluyen en las buenas prácticas agrícolas, se debe compatibilizar con la obtención de fruta de alta calidad y que su

consumo no implique un riesgo a la salud de la población. En particular, con el fin de minimizar el uso de agroquímicos y volver la producción sustentable, ha surgido la Producción Integrada de Cítricos (PIC) basándose en el concepto de control integrado de plagas, definido por la FAO como “la consideración cuidadosa de todas las técnicas de control de plagas disponibles y la subsiguiente integración de medidas apropiadas que desalientan el desarrollo de poblaciones de plagas y mantienen los pesticidas y otras intervenciones en niveles que están económicamente justificados y reducen o minimizan los riesgos para la salud humana y el medio ambiente” (FAO, 2018c). Este es un tipo de manejo que contempla el control de enfermedades, plantación, manejo del suelo y control de malas hierbas así como utilización de fitorreguladores, entre otros aspectos productivos sin basarse exclusivamente en el uso de agroquímicos. La PIC incluye como herramienta complementaria aspectos de control biológico en combinación con el químico para un efectivo y ambientalmente más amigable control integrado de plagas. En lo que respecta al negocio principal de la citricultura, las afecciones a los cítricos pueden clasificarse, obteniéndose distintos resultados según el criterio. Por ejemplo, el Cancro, la Sarna o la Botrytis serían prioritarios pensando en la exportación de la fruta; Si, por otro lado, se considera el compromiso que ejercen sobre la vida y la productividad de la planta, estarían en primer plano las virosis y la gomosis. En cambio si el criterio es en base a la intensidad de tratamiento químico que se necesita, se debería hablar de la sarna (Scattolini, 2003).

1.2.2. Poscosecha.

1.2.2.1. Protección de la fruta durante el almacenamiento

La etapa de poscosecha de frutas tiene como objetivo conservar las cualidades de los productos desde que son cosechados hasta que llegan al consumidor. En el proceso se busca garantizar la calidad del producto en lo que refiere a aspectos organolépticos, nutritivos así como microbiológicos. El esquema general de manipulación de frutas cítricas para su consumo fresco en poscosecha se resume en la Figura 1.7.

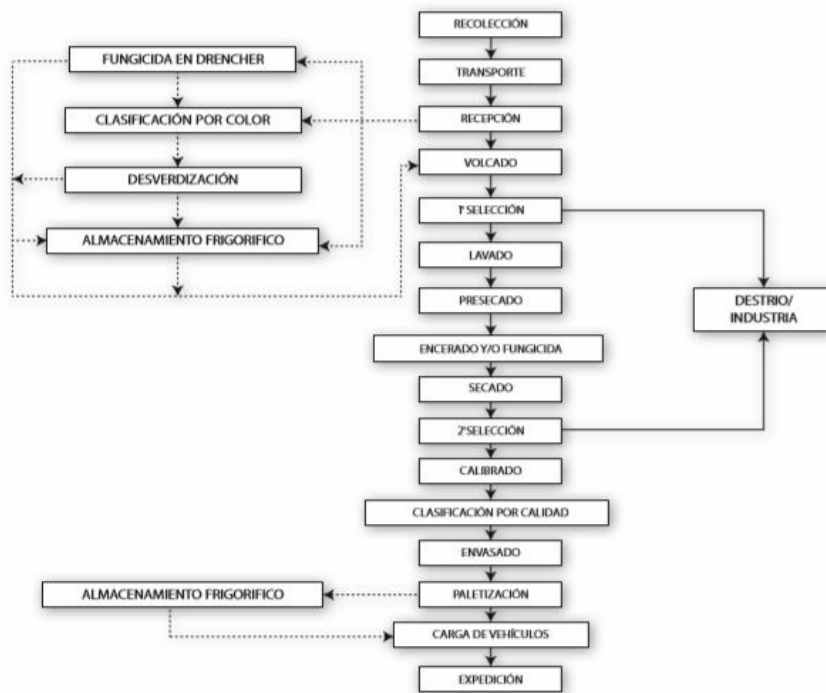


Figura 1.7. Diagrama de flujo general de poscosecha. Las líneas punteadas indican vías opcionales en el procesamiento. Tomado de Pássaro *et al.* (Pássaro, 2012)

Es de tener en cuenta que en cuanto a los aspectos microbiológicos, las enfermedades causadas por hongos contribuyen significativamente a las pérdidas en poscosecha de frutas cítricas, especialmente en áreas de producción subtropical y tropical (Kanetis, Förster, & Adaskaveg, 2008; Pérez, Blanco, Berreta, Dol, & Lado, 2011). Las pérdidas durante el almacenamiento y transporte de las frutas cítricas, provocadas directamente por ataques de hongos patógenos en poscosecha, han sido estimadas en un 90 %, en aquellos casos en que no se aplican fungicidas (Kanetis, et al., 2008) siendo los patógenos más comunes e importantes en este cultivo, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* (Altieri, Di Renzo, Genovese, Calandra, & Strano, 2013; J. Lado, et al., 2010; Pérez, et al., 2011). Por lo tanto, constituyen el objetivo básico de cualquier estrategia de control de enfermedades en poscosecha de cítricos. A nivel nacional, la industria cítrica cumple con estrictas prácticas de sanitización durante el manejo y packing de las frutas frescas de forma de prevenir la contaminación microbiana que puede causar el deterioro de la fruta. Las infecciones de estos patógenos se producen durante la cosecha, el transporte y el proceso de empaque, ingresando sus esporas a las frutas a través de heridas en su superficie. Es por ello, que los productos químicos utilizados en la producción se han convertido en una herramienta que permite la

obtención de niveles de rendimiento y calidad adecuados para satisfacer la demanda mundial. Otra podredumbre que ocasionalmente puede ser importante es la ácida, causada por *Geotrichum citri-aurantii*. Eventualmente, se observan otras podredumbres de poscosecha que son causadas por patógenos que infectan el fruto en precosecha pero que, permanecen latentes o inactivos, hasta después de la recolección (Pássaro, 2012).

Para lograr un manejo adecuado de estos patógenos en poscosecha, son fundamentales la higiene de las plantas de empaque y los distintos tratamientos con funguicidas que minimizan la incidencia y la presencia de inóculo sobre la fruta atacada. Dentro de este grupo se encuentran el imazalil (IMZ), orto-fenil-fenoato de sodio (SOPP), tiabendazol (TBZ) y procloraz (PCZ), siendo estos los más utilizados (Besil, et al., 2016). Sin embargo, la aplicación continua durante años de los mismos principios activos (tiabendazol, imazalil, SOPP) ha tenido como consecuencia la aparición de cepas resistentes a dichos productos a nivel nacional e internacional (Holmes & Eckert, 1999; Kinay, Mansour, Mlikota Gabler, Margosan, & Smilanick, 2007), generando la necesidad de aumentar la dosis aplicada para lograr un control adecuado. Esto puede llevar a que los niveles de residuos de pesticidas sobre la fruta tratada sean mayores a los LMRs permitidos y comprometer así la colocación de productos en los mercados internacionales, donde los niveles de residuos de pesticidas son sumamente exigentes y son utilizados como requerimientos de ingreso. Debido a ello nuevos principios activos comienzan a ser utilizados, entre los productos registrados recientemente en algunas áreas productoras para el uso en poscosecha de cítricos se destacan el pirimetanil, el miclobutanil, el metil-tiofanato, el fludioxonil, el azoxistrobin y el trifloxistrobin (Pássaro, 2012). En Italia, Schirra *et al.* han trabajado evaluando los niveles de residuos y la persistencia de pirimetanil, azoxistrobin y fludioxonil cuando son aplicados en combinación con imazalil sobre naranjas para el control de *P. digitatum* (Schirra, et al., 2010).

Al mismo tiempo, el grupo Erasmus, en Sudáfrica ha investigado como se ve afectada la carga remanente de imazalil sobre la fruta dependiendo de la formulación del pesticida, del pH, y del tiempo de exposición (Erasmus, et al., 2011).

Estos aspectos estrictamente reglamentario-económicos, las llamadas barreras no arancelarias y el concepto de trazabilidad del producto, están en la actualidad marcadas por el avance en la instrumentación analítica y el desarrollo de nuevas metodologías asociadas, que han logrado niveles de detección y confirmación de estos contaminantes

que eran insospechados hace unos pocos años atrás.

Conjuntamente, la aplicación masiva y continuada de fungicidas como TBZ, IMZ, SOPP o distintas mezclas ha generado preocupación en la opinión pública por la generación de un exceso de residuos químicos y también problemas a la industria como el tratamiento de efluentes residuales o la generación de cepas patogénicas resistentes, especialmente del género *Penicillium*, que reduce o anula la eficacia de los tratamientos (Pássaro, 2012).

La aplicación de los activos durante la poscosecha, puede realizarse con la utilización de drencher como se indica en la Figura 1.7 o directamente en la línea de packing. La utilización de fungicidas en drencher se realiza principalmente cuando la fruta necesita una etapa de desverdizado o la misma será almacenada en frío (por cuestiones operativas) previa a su pasaje por la línea de packing.

En la Figura 1.8 se muestra el esquema de aplicación de pesticidas de algunos packings en Uruguay. La elección de los activos está condicionada por los destinos de exportación. Por ejemplo, en Estados Unidos no está registrado para su uso el fungicida procloraz (Paranjape, Gowariker, Krishnamurthy, & Gowariker, 2014), por lo que la fruta que es exportada a ese destino debe recibir tratamientos alternativos que aseguren la calidad de la fruta pero la ausencia de dicho principio activo.

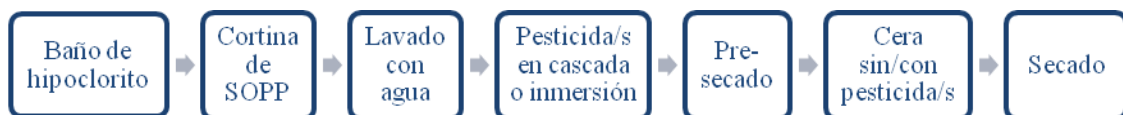


Figura 1.8. Esquema general de tratamiento de pesticidas en línea de packing en Uruguay. Adaptado de Besil *et al.* (Besil, et al., 2016).

Con el fin de disminuir la cantidad de residuos de pesticidas remanente en la fruta y evitar la generación de resistencia, es decir, el desarrollo de la habilidad para tolerar dosis altas de tóxicos, los cuales resultarían letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie (Badii & Garza, 2007), actualmente, a nivel mundial se están evaluando la aplicación en conjunto de pesticidas y sales. La utilización de sales con efecto fungistático sobre *Penicillium spp.*, es una de las alternativas más promisorias para potenciar el control de biotipos de patógenos resistentes a los fungicidas. Estudios han demostrado que la efectividad de TBZ contra

P. digitatum aumentó notablemente en mezclas del fungicida en caldos calientes (41 °C) con 3 % (m/v) bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y que la combinación de TBZ y NaHCO₃ fue efectivo incluso con frutas inoculadas con cepas resistente a la TBZ (Smilanick, Mansour, & Sorenson, 2006). Se observó una sinergia similar con IMZ y NaHCO₃ (Smilanick, Mansour, Margosan, Mlikota Gabler, & Goodwine, 2005). Otro estudio realizado con TBZ y con fludioxonil (FLU) y NaHCO₃, reportó que el uso de 1 % de la sal tenía actividad débil contra cepas de *P. digitatum* sensibles y resistentes a TBZ. Sin embargo, tanto TBZ como FLU fueron muy efectivos en todas las dosis utilizadas, y su actividad aumentó notablemente cuando se combinaron con NaHCO₃, incluso en concentraciones de 50-150 mg L⁻¹. Si bien no se detectó daño de la fruta tratada solamente con NaHCO₃ o con la combinación de éste con TBZ o FLU si se pudo observar que la pérdida de peso de la fruta fue mayor (D'Aquino, Palma, Angioni, & Schirra, 2013).

Es así que el carbonato de sodio, el bicarbonato de sodio y el sorbato de potasio han surgido como alternativas para ser aplicadas solas o en conjunto con fungicidas (Smilanick, Mansour, Gabler, & Sorenson, 2008). Su acción fungistática enlentece el crecimiento del patógeno, afectando la fisiología celular y por lo tanto, la germinación de esporas y producción de enzimas (Obagwu & Korsten, 2003; Smilanick, et al., 2005). El uso de estas sales, que son compuestos que no son nocivos para el ambiente y que combinadas con los fungicidas tradicionales tienen el mismo efecto permiten entonces que el manejo sea en definitiva un manejo con concentraciones menores de los agroquímicos en cuestión, otorgando así al tratamiento un valor agregado de suma importancia

1.2.2.2. Poscosecha: industrialización de cítricos

Si bien durante la etapa de industrialización no se utilizan pesticidas, la presencia de los mismos en los productos finales se debe a su utilización en instancias de pre y poscosecha. Es interesante evaluar los procesos involucrados en la elaboración de los subproductos, en lo que respecta a la posible presencia de dichos agroquímicos ya que los mismos pueden no ser eliminados/degradados bajo las condiciones propias del proceso de elaboración. Existe la posibilidad de que residuos de pesticidas queden retenidos en estos productos, entonces se plantea la necesidad de contar con metodologías para su determinación y monitoreo en la industria local. Por ejemplo,

durante la obtención de los jugos concentrados, luego de extraído el jugo, éste es concentrado mediante la eliminación de parte del agua. En esta etapa, además de enriquecer al jugo en los componentes propios de la fruta, también se puede dar la concentración de los pesticidas presentes en él.

1.3. Pesticidas comúnmente usados en la citricultura

Entre los agentes protectores de cultivos empleados en la producción de cítricos de manera habitual e intensiva se encuentran, los insecticidas imidacloprid y spinosad, así como los fungicidas; piraclostrobin y difenoconazol, que son fungicidas de amplio espectro para el control de la mancha parda y el control de la mancha negra de los cítricos (Miles, Willingham, & Cooke, 2004; Vicent, Armengol, & García-Jiménez, 2007). El spinosad y el imidacloprid se usan comúnmente para el control de los minadores de hojas de los cítricos (Shinde, et al., 2017). Un listado detallado de los pesticidas recomendados para el control de plagas y enfermedades de los cítricos en Uruguay, se presenta en la Tabla 1.2. elaborado a partir de la Guía Sata (Guía_SATA, 2016-2017).

Plaga o enfermedad	Control químico	
Minador de las hojas de los cítricos <i>Phyllocnistis citrella</i>	Abamectina Acefato Acetamiprid Azadirachtín Bifentrin + Novaluron Carbosulfan Diflubenzuron	Dimetoato Imidacloprid Lufenuron Novaluron Piriproxifen Tau-fluvalinato Tiametoxan
Psilido asiático de los cítricos <i>Diaphorina citri</i>	Aceite de soja Bifentrin Piriproxifen	
Mancha negra <i>Phyllosticta citricarpa</i>	Azoxistrobin Kresoxim-metil Mancozeb Oxido cuproso Piraclostrobin	

Plaga o enfermedad	Control químico
Alternaria	Azoxistrobin Azoxistrobin + Ciproconazol metil Boscalid Carboxin + Tiram Kresoxim-metil Clorotalonil Tiram + Fipronil + Azoxistrobin Carbendazim + +Metalaxil M + Iprodione Fludioxonil Triticonazol Fludioxonil + Metalaxil
Gomosis <i>Phytophthora citrophthora</i>	Fosetil-Al Hidróxido de cobre Oxicloruro de cobre Oxido cuproso Sulfato de Cobre neutralizado
Mancha grasienta <i>Micosphaerella citri</i>	Folpet
Cancro <i>Xanthomonas axonopodes</i>	Oxido cuproso
Sarna <i>Elsinoe australis</i>	Carbendazim Metil tiofanato Clorotalonil Oxicloruro de cobre Difenconazol Oxido cuproso Ditianon Piraclostrobin Folpet Piraclostrobin + Folpet + Procloraz Fluxapyroxad Hidróxido de cobre Sulfato de Cobre Kresoxim-metil Sulfato de Cobre Mancozeb neutralizado Ziram

Tabla 1.2. Control químico para plagas y enfermedades de los cítricos en Uruguay.
Elaborado a partir de la Guía Sata.com.

Sin embargo, no todos se usan siempre y en conjunto, ni con la misma intensidad. Es importante tener en cuenta que el paquete tecnológico de pesticidas aplicados en el cultivo cítrico es dinámico y depende de factores como lo es la generación de resistencia genética, de las distintas poblaciones, así como de los mercados objetivos para la exportación, como fuera discutido anteriormente.

Esto, sin duda, lleva a la incorporación de nuevos activos para proteger al cultivo. Consecuentemente, el escaneo y determinación analítica deben estar sometidos a nuevos ajustes constantemente. Las características estructurales así como sus propiedades

fisicoquímicas que son propias de cada activo influyen directamente sobre la etapa de preparación de muestra y su posterior análisis instrumental.

Dentro de los más de 1.000 pesticidas registrados en el mundo, se describen a continuación los compuestos y sus familias químicas más relevantes empleadas en la citricultura en la actualidad. En lo que respecta a insecticidas, las familias con mayor relevancia empleados en etapa de campo, son los neonicotinoides, spinosines y avermectinas. Dentro de los fungicidas, destacan las familias de los bencimidazoles, azoles y estrobirulinas.

El encare por familias químicas implica también un modo de acción, por lo tanto, la efectividad de su acción y la generación de resistencia estará asociado a esa estructura química básica.

1.3.1. Neonicotinoides

El desarrollo de estos insecticidas comenzó en años 80 y han sido modelados tomando como base la acción de la nicotina natural. Son insecticidas de amplio espectro, actúan por contacto e ingestión, tienen alta actividad sistémica sobre follaje y raíces. El primer neonicotinoide comercial, imidacloprid, fue desarrollado por Bayer y lanzado al mercado en 1991 (ver Figura 1.9). El receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChR) es blanco de acción de los insecticidas neonicotinoides. La unión del insecticida al receptor origina la hiperexcitación del sistema nervioso y la muerte del insecto. Su uso indiscriminado ha ocasionado problemas ambientales, particularmente se lo vincula al *Colony Collapse Disorder* (CCD) descrito cada vez más frecuentemente en las colmenas de diferentes países (Lu, Warchol, & Callahan, 2014). En la Unión Europea se ha prohibido recientemente (2018) el uso de imidacloprid, tiametoxam y clotianidina, todos neonicotinoides, en espacios abiertos debido a los estudios reportados (European Commission, 2018). En la Figura 1.9 se presentan las estructuras de imidacloprid y tiametoxam.

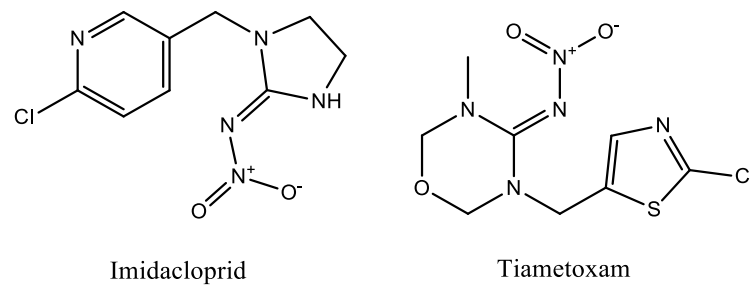


Figura 1.9. Estructuras químicas de 2 neonicotinoides incluido el más utilizado en citricultura: imidacloprid.

1.3.2. Avermectinas

Las avermectinas son derivadas de compuestos obtenidos por fermentaciones de la bacteria *Streptomyces avermitilis* (M. Fisher & Mrozik, 1989). Abamectina es una de ellas, insecticida de amplio espectro de acción translaminar y sistemica localizada. Está constituido por una mezcla de al menos 80 % de avermectina B1a y el resto de avermectina B1b.. La abamectina es una opción para el control del minador de los cítricos. Su mecanismo de acción se basa en la estimulación de la liberación presináptica del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) desde las terminales nerviosas y potenciando la fijación de este ácido a los receptores postsinápticos, entre ellos el receptor glutamato lo que ocasiona el bloqueo de la transmisión eléctrica (Stevens, Breckenridge, & Wright, 2010). Los insectos quedan paralizados irreversiblemente y mueren. A diferencia de la mayoría de los insecticidas no afecta al sistema colinérgico. En la Figura 1.10 se presentan la estructura de las lactonas macrocíclicas avermectina B1a y B1b.

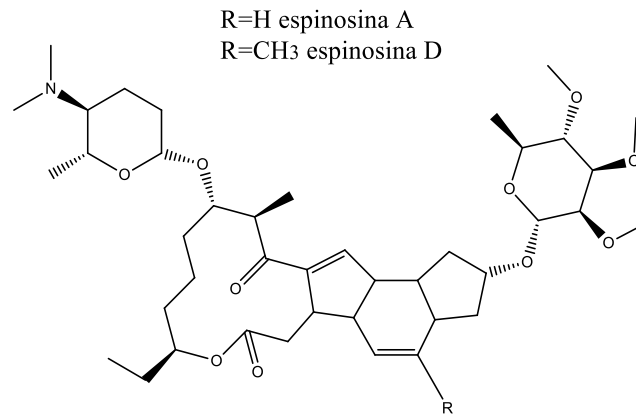


Figura 1.11. Estructuras químicas espinosina A y D.

1.3.4. Bencimidazoles

Los fungicidas bencimidazólicos se introdujeron para el control de enfermedades de las plantas en los años 60 y principios de los 70 como fungicidas foliares, cura semillas y para su uso en aplicaciones posteriores a la cosecha. Son fungicidas sistémicos de amplio espectro y con acción posterior a la infección que permitió un intervalo de aplicación extendido. Todas estas cualidades los hicieron muy populares entre los productores, pero también llevó al mal uso, como una mala cobertura de aplicación y abuso de aplicaciones curativas. El primer caso de resistencia a los bencimidazoles ocurrió con el moho polvoriento (*Erysiphaceae spp.*) en invernaderos en 1969, un año después de su introducción (Smith, 1988). Para 1984, se había reportado resistencia en muchos de los patógenos contra los cuales los bencimidazoles son activos. La razón para el rápido desarrollo de la resistencia fue la alta especificidad de su modo de acción, inhibiendo el ensamblaje de microtúbulos durante la mitosis en hongos, a través de las interacciones tubulina-bencimidazol. Mutaciones de un punto en el sitio de unión de la tubulina fueron suficientes para la generación de resistencia (Morton & Staub, 2008).

En la Figura 1.12 se presentan las estructuras de tiabendazol y carbendazim.

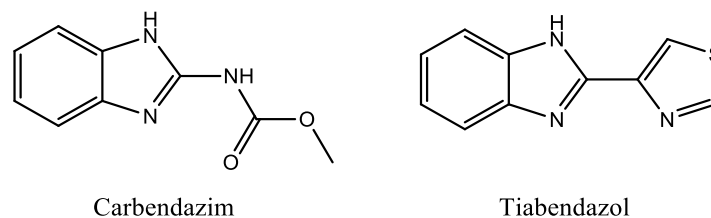


Figura 1.12. Estructuras químicas de los bencimidazoles tiabendazol y carbendazim usados en citricultura.

1.3.5. Azoles

La familia de los azoles está conformada por los imidazoles y triazoles. Estos fungicidas afectan a la enzima P-450 inhibiendo la demetilación del lanosterol, el primer precursor tetracíclico del ergosterol. Específicamente actúan a nivel de la demetilación de C-14 por lo que se conocen como inhibidores de la demetilación (IDM). La inhibición de la biosíntesis del ergosterol tiene como consecuencia la no funcionalidad de las paredes y membranas celulares de los hongos (Park, Shin, & Kang, 2017).

Imazalil y procloraz son de los imidazoles más utilizados en los cítricos. Ambos son activos frente a *Penicillium spp.*, aunque el procloraz posee una menor penetración en la corteza lo que le confiere una cierta actividad subcuticular y mayor control a nivel de esporulación (Fonfria, 2003). El imazalil es el fungicida de poscosecha más efectivo para el control de *Penicillium digitatum* e *italicum* aunque ya se han reportado cepas resistentes a este activo tanto a nivel mundial (Erasmus, Lennox, Korsten, Lesar, & Fourie, 2015) como en nuestro país (Pérez, et al., 2011). En la Figura 1.13 se presentan las estructuras de imazalil y procloraz, los 2 imidazoles más usados en poscosecha.

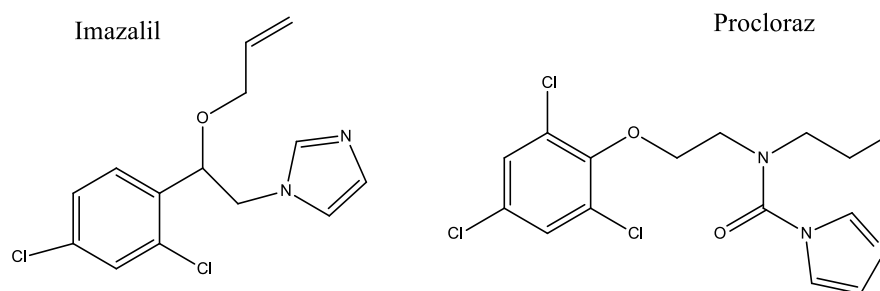


Figura 1.13. Estructuras químicas de imidazoles usados en citricultura.

1.3.6. Triazoles

Los triazoles son la clase de compuestos fungicidas más numerosa disponible. Bayer fue el primero en lanzar un triazol, a saber, el triadimefon (Bayleton) en 1973. En 1979 Janssen Pharmaceuticals vendió los derechos de uso agrícola a Ciba-Geigy para propiconazol (Morton & Staub, 2008). El uso de propiconazol en la poscosecha se realiza principalmente para el control de la pudrición amarga en cítricos que es provocada por un hongo similar a una levadura conocido como *Galactomyces citri-aurantii* E.E. Butler (anamorfo *Geotrichum citri aurantii*). La utilización de difenoconazol suele realizarse en instancias de campo para el control de la mancha

grasienta ocasionada por *Mycosphaerella citri*. En la Figura 1.14 se presentan la estructura de propiconazol y difenoconazol.

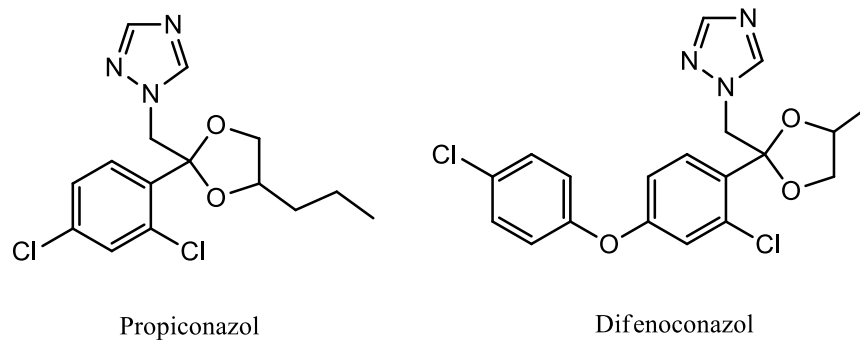


Figura 1.14. Estructuras químicas de triazoles usados en citricultura.

1.3.7. Estrobirulinas

Es interesante observar que los hongos producen poderosos fungicidas naturales; tal es el caso de las estrobirulinas, sustancias naturales aisladas principalmente de setas (basidiomycetes). Las estrobirulinas pertenecen junto con la famoxadona y fenamidona al grupo de los inhibidores de la ubiquinona: IQo. Su mecanismo de acción se basa en la unión a un sitio específico en las mitocondrias, el sitio de oxidación de quinol (Qo) (o el sitio del ubiquinol) del citocromo b y, por lo tanto, detienen la transferencia de electrones provocando la inhibición de la respiración celular (Balba, 2007).

Azoxistrobina fue la primer estrobirulina sintética y fue descubierta y comercializada por Syngenta en 1992. Estos fungicidas son utilizados en una amplia gama de cultivos. Las estructuras químicas de las estrobirulinas comúnmente utilizadas en cítricos se presentan en la Figura 1.15.

Piraclostrobina es utilizado a nivel de chacra para el control principalmente de *Alternaria spp.*

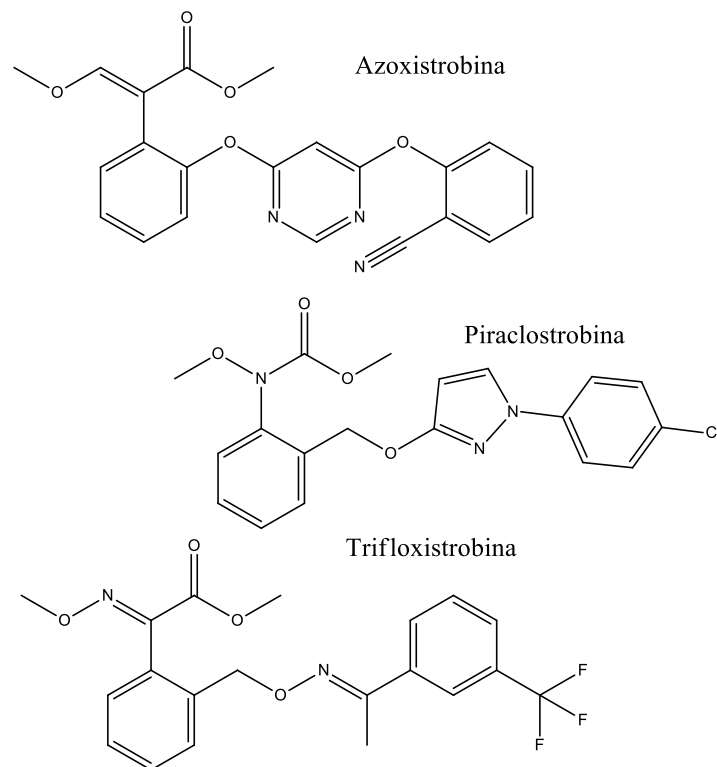


Figura 1.15. Estructuras químicas de fungicidas estrobirulínicos.

Todos estos fungicidas presentan resistencia cruzada (el mismo modo de acción) y deben ser empleados cuidadosamente para evitar la aparición de hongos fitopatógenos resistentes. Se han reportado cepas resistentes como *Erysiphe graminis tritici* responsable del moho polvo polvoriento en pepino (Amano & Takeda, 2002).

1.4. Propiedades fisicoquímicas y su influencia en la distribución de pesticidas en fruta y productos industriales derivados de la producción

Los residuos de pesticidas permanecen en casi todos los productos alimenticios, como resultado de su aplicación durante la producción de la materia prima, antes de la cosecha o posterior a esta. La retención de los pesticidas depende de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, así como de las de los alimentos. En frutas y verduras, dependiendo del modo de acción y las características fisicoquímicas, los residuos de pesticidas se retienen en la superficie de la cáscara o penetran al producto fresco (Awasthi, 1986; T. Yang, et al., 2016).

Aquellos pesticidas que permanecen sobre la superficie del fruto pueden ser eliminados mediante lavado, pelado o tratamientos con soluciones como vinagre, cúrcuma, bicarbonato de sodio, sal común o alcohol (Bajwa & Sandhu, 2014). En particular el uso

de ozono para la remoción de pesticidas sobre limones y naranjas ha sido estudiado y muestra mayor capacidad de remoción de tetradifon, clorpirifos etil y clorotalonil que el lavado con agua (Kusvuran, Yildirim, Mavruk, & Ceyhan, 2012). Sin embargo, no parece ser una práctica adecuada para uso doméstico.

El modo de acción de los activos se relaciona con la posible presencia de los mismos sobre el fruto. Por ejemplo, los pesticidas de contacto o translaminares (ej. spinosad, azoxistrobin) son más fácil de ser arrastrados de la superficie del cultivo mientras que los sistémicos como imidacloprid, se absorben, resultando más difícil su remoción. Dado que la mayoría de los insecticidas orgánicos no iónicos son solubles en aceites y ceras de plantas, pueden penetrar hasta cierto punto en los tejidos cuticulares y subcuticulares de las partes tratadas de las plantas, incluso si no son sistémicos (Edwards, 1975). Esto puede darse sobre la piel de los cítricos dado su composición en ceras y aceites esenciales.

Es importante resaltar que además de los fenómenos anteriormente mencionados, los residuos presentes en la materia prima (en nuestro caso fruta cítrica) pueden ser transferidos a los productos industrializados. Los estudios de dinámica de los pesticidas durante el procesamiento industrial y el balance de masas de los residuos, permiten evaluar los factores de transferencia o factores de procesamiento del residuo de cada uno de los pesticidas. Los datos que permiten evaluar esta transferencia son: la transición del pesticida desde el producto agrícola crudo al producto procesado la que puede ser estimada y por lo tanto, la influencia de estos productos en la ingesta diaria admisible de los pesticidas. Solamente algunos factores de procesamiento son de dominio público, mientras que otros están disponibles en los organismos de registro de pesticidas y otros no se conocen en absoluto, a pesar de que los estudios de procesamiento se han convertido en parte de los requisitos de registro de pesticidas comerciales (Ryad & Mahmoud, 2006).

La concentración, dilución o ausencia de residuos de pesticidas en los distintos productos elaborados dependen de diversos factores como por ejemplo, la forma de procesamiento de la materia prima así como las características fisicoquímicas del conjunto de los productos finales y los pesticidas involucrados (Montti, Visciglio, Raviol, Subovich, & Munitz, 2013). Por ejemplo, no se esperaría que un pesticida soluble en agua que posea una solubilidad en agua $> 0,5 \text{ mgL}^{-1}$ se concentre en el aceite procesado de una semilla oleaginosa, pero el mismo pesticida podría concentrarse en el

jugo de una naranja (OECD, 2008).

En productos cítricos, existen ensayos primarios que intentan describir esta distribución, pero en general no reflejan la realidad productiva de la industria. Por ejemplo, Barba y colaboradores, evaluaron la transferencia de 9 pesticidas incluidos organofosforados y piretroides donde se encontró la presencia de dicofol en mermeladas elaboradas a partir de pulpa de naranja tratada (Barba, Cámara, Galindo, Navarro, & Escribano, 1987). Por otro lado, se investigaron los niveles de residuos de 8 pesticidas en cítricos tratados después de la cosecha, evaluando su comportamiento durante el almacenamiento y el procesamiento en mermelada de limón. Las frutas se sumergieron en una solución de bifenilo (DP), o-fenilfenol (OPP), ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), imazalil, tiabendazol (TBZ), benomil y sec-butilamina (BA), o se fumigaron con bromuro de metilo. En el producto final evaluado, mermelada de limón, se encontraron 95 % de DP, 41 % de OPP, 42 % de imazalil y 22 % de bromuro (relación a los contenidos iniciales), mientras que no se detectaron 2,4-D, TBZ, benomil ni BA (Tsumura-Hasegawa, Tonogai, Nakamura, & Ito, 1992).

De acuerdo con las disposiciones de la Directriz 508 de la OCDE, los estudios de procesamiento que utilizan muestras fortificadas con pesticidas se mencionan explícitamente como "no aceptable", a menos que exista evidencia experimental de que no hay diferencias en el patrón de distribución en comparación con los residuos "incurridos" (OECD, 2008).

Se ha estudiado también el factor de procesamiento de algunos activos durante la obtención de jugo a nivel doméstico y a nivel comercial. Naranjas que contenían residuos de clorpirifos etil se procesaron en jugo de naranja en ocho estudios en los que se simuló el procesamiento habitual de obtención de jugo a nivel doméstico. Los factores de procesamiento oscilaron entre 0,02 y 0,06 (FAO, 2000).

Se realizaron también estudios individuales de procesamiento comercial con naranjas, pomelos, limones y tangelos, en los que el factor de procesamiento fue 0,02-0,03. El promedio de procesamiento de los 12 estudios fue de 0,03 (FAO, 2000).

Naranja, toronja, limones y tangelos con residuos de clorpirifos incurridos se procesaron comercialmente en jugo, pulpa seca y aceite. El factor de procesamiento para pulpa fue 3,8 para toronja; 1,5 para limones; 2,6 para naranja y 4 para tangelos, con un promedio de 3. Los respectivos factores de procesamiento para el aceite fueron 22; 3,2; 6,4 y 13 respectivamente (FAO, 2000).

Debido a las propiedades de partición de los pesticidas entre el jugo, la piel y la pulpa en frutas y verduras, se espera que los niveles de residuos de pesticidas moderados a altamente lipofílicos se transfieran pobremente a los jugos durante los procesos de extracción industrial o doméstica. Se podría lograr una reducción adicional de los residuos mediante operaciones de clarificación, como la centrifugación o el filtrado, aunque, debido a la etapa de concentración en la producción de jugo, no sería sorprendente que los residuos de pesticidas aumenten (Đorđević & Đurović-Pejčev, 2016).

Entre las propiedades fisicoquímicas con mayor incidencia sobre la distribución de los residuos de pesticidas se destacan la presión de vapor, solubilidad y constante de reparto octanol/agua (K_{ow}) como medida de la lipofilia de una molécula. El pK_a es una constante relevante a ser considerada en aquellos pesticidas que tienen reacción ácida o básica. Esto es particularmente importante cuando consideramos los fungicidas azólicos, los que están ionizados a los pH de los jugos cítricos. Esa es una explicación de la mayor ocurrencia de imazalil en jugos concentrados que en aceites esenciales, donde el reparto entre las dos fases favorece la solubilidad en agua de la fracción ionizada. Estudios previos en nuestro grupo, mostraron que durante una simulación de la obtención de jugo de naranja mediante el contacto entre cáscara fortificada con pesticidas y el jugo, se da una mayor transferencia de aquellos compuestos más hidrofílicos como tiabendazol y procloraz respecto a otros más lipofílicos como clorpirifos y mepanipirim (Besil, Pérez, Niell, Cesio, & Heinzen, 2010).

1.5. Metodologías de análisis de residuos de pesticidas

La utilización de pesticidas, genera, como se expresó anteriormente, residuos en los alimentos cuyos niveles deben ser investigados a fin de que no constituyan un riesgo toxicológico para el consumidor y cumplan con los estándares de control internacionales.

Para la determinación de las trazas de pesticidas, la química analítica juega un rol fundamental. Esto se debe a que es la herramienta que permite determinar la presencia y conocer la cantidad de residuo presente en una muestra dada. Disponer de un método preciso y veraz, permite evaluar la presencia de residuos presentes en muestras reales así como en muestras obtenidas durante experimentos. Las metodologías analíticas que

se emplean en la actualidad en el análisis de trazas de compuestos orgánicos son multiresiduos, miniaturizadas y amigables con el medio ambiente. De esta forma se acompañan los principios de la química verde, buscando generar menos residuos y menor gasto de solventes orgánicos.

Una metodología analítica de análisis de residuos de pesticidas consta básicamente de los puntos que se presentan en la Figura 1.16. Las etapas de muestro, recepción así como tratamiento de datos fueron excluidas de este esquema.

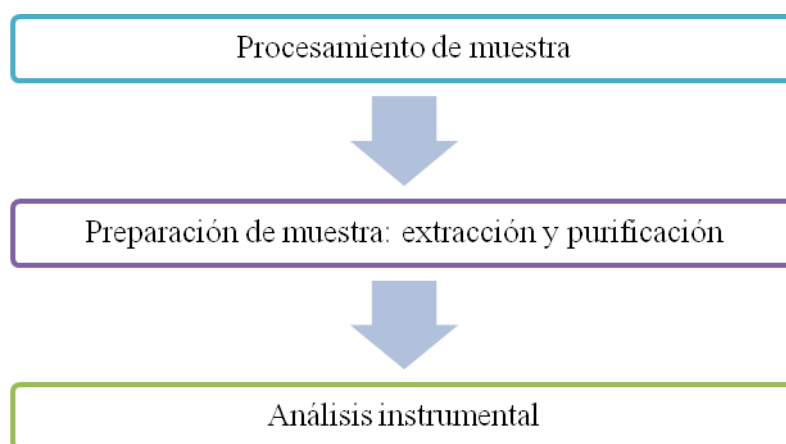


Figura 1.16. Esquema de etapas de análisis.

1.5.1. Procesamiento de muestra

Los LMRs del *Codex Alimentarius* se establecen en la mayoría de los casos con relación a un determinado producto agrícola bruto y entero tal como circula en el comercio internacional. En algunos casos, se incluye una calificación que describe la parte del producto agrícola bruto a la que se aplica el LMR, por ejemplo, almendras sin cáscara o para durazno producto entero, previa eliminación del tallo y hueso, pero calcular y expresar el residuo en relación con el fruto entero. En otros casos, no se dan tales calificaciones. Por consiguiente, de no especificarse otra cosa, la parte del producto agrícola bruto a que se aplica el LMR y que ha de prepararse como *muestra analítica* para la determinación de residuos de pesticidas es la que se describe en el documento CAC/GL 41 (*Codex Alimentarius*, 2010). En particular para las frutas cítricas se establece que se debe analizar el fruto entero.

1.5.2. Preparación de muestra

A pesar de disponer de instrumentos con tecnologías modernas y avanzadas, la preparación de la muestra previa al análisis instrumental sigue siendo un paso crítico en la determinación de compuestos trazas. A pesar de contar con técnicas instrumentales muy poderosas, el riesgo de interferencia aumenta con la complejidad de la matriz estudiada, por lo que la preparación de muestras antes del análisis instrumental es obligatoria en muchas aplicaciones, por ejemplo, el análisis de alimentos (Lambropoulou & Albanis, 2007). Por lo tanto, dicha etapa es el cuello de botella para el análisis efectivo y preciso de trazas de pesticidas.

Influyen en esto no solamente la naturaleza fisicoquímica de las moléculas a investigar, que es muy variada, desde una marcada lipofilia como organoclorados hasta compuestos relativamente hidrofílicos como los neonicotinoides, sino también las diferentes composiciones de las matrices a estudiar. (Lambropoulou & Albanis, 2007). Por ejemplo, en el caso de los jugos concentrados, todos los componentes de la matriz se encuentran en mayor concentración con respecto a un jugo normal y a una fruta, y como consecuencia, durante el análisis de esta matriz se esperan mayores efectos de matriz. La eliminación selectiva de compuestos a un nivel de concentración más alto en comparación con los pesticidas estudiados podría ser una tarea difícil. Además, durante el proceso de concentración, algunos artefactos, conjugados y compuestos de descomposición se forman, volviendo la matriz aún más compleja. Como consecuencia, la distribución de los analitos de estudio en los distintos compartimentos de la cadena citrícola será diferencial de acuerdo a la matriz que se considere. Esto hace que la preparación de muestra sea particular para cada una de las matrices y a su vez la técnica cromatográfica a utilizar depende de la compatibilidad de los pesticidas evaluados. Por ejemplo, insecticidas como el imidacloprid no son volátiles y su análisis se limita a la cromatografía líquida.

Separar a los analitos (pesticidas) de los demás componentes de una matriz compleja (muestra de análisis), es el objetivo de la etapa de preparación de muestra. Este proceso involucra, por un lado la extracción de los analitos de interés de la matriz, generalmente utilizando un solvente orgánico, y posteriormente (de ser necesario) una purificación del extracto o *clean up*. En esta última etapa se busca eliminar selectivamente la mayor cantidad de co-extractivos (tanto metabolitos primarios como secundarios) que pueden

interferir durante el análisis instrumental, tanto a nivel cromatográfico debido a la co-elución, como a nivel espectrométrico a causa de co-elución de compuestos o fragmentos isobáricos.

En algunos casos, y dependiendo del sistema instrumental, en la preparación de muestra se incluye la concentración de los analitos de interés por evaporación del solvente con el fin de obtener menores límites de detección.

Debido al gran número de pesticidas en el mercado y dado que una muestra de análisis puede contener un número variable de residuos de pesticidas, el método más común y eficiente es el uso de métodos multiresiduos (MRM, del inglés Multi Residue Methods) capaces de determinar en un solo análisis la mayor cantidad de compuestos posibles (Susana Grimalt & Dehouck, 2016). Las nuevas tendencias de la química analítica, buscan economizar tiempo de análisis al realizar una sola preparación de muestra lo que se acompaña de una reducción de los costos de reactivos y materiales; y al mismo tiempo se optimiza el uso y se beneficia de los modos de adquisición de datos que ofrecen los sistemas instrumentales modernos, como por ejemplo trabajar con ventanas de adquisición y de esta manera realizar la determinación en simultaneo de todos los analitos de interés.

Sin embargo, hay ciertos compuestos que no son adecuados para la determinación en MRMs, ya que tienen propiedades fisicoquímicas que difieren significativamente de la mayoría de los pesticidas y hace que requieran una extracción, limpieza o columna analítica diferente. Estos compuestos necesitan métodos específicos para su determinación, los métodos monoresiduo (SRM: Single Residue Methods por sus siglas en inglés) (EURL-SRM, 2010).

Otro aspecto que se busca en los métodos de análisis, es que sean amigables con el ambiente, por lo que la tendencia es la miniaturización del método partiendo de la mínima cantidad de muestra posible así como el uso de mínimas cantidades de solventes y reactivos de extracción y limpieza.

Se han propuesto muchas opciones para el tratamiento previo y/o la extracción de residuos de pesticidas en los alimentos. En la mayoría de estos, el procedimiento de extracción generalmente involucra la homogeneización de la muestra con un solvente orgánico, solo o mezclado con agua o agua de pH ajustado, utilizando un homogeneizador, mezclador o sonicador (Lambropoulou & Albanis, 2007).

Además de estas técnicas de extracción clásicas, las técnicas más utilizadas actualmente están enfocadas en el concepto de miniaturización de los procedimientos analíticos como la extracción en fase sólida (SPE) (L. Zhang, et al., 2012) que es utilizada generalmente para matrices como agua y otros líquidos, dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) (Torres, Picó, & Mañes, 1995) o extracciones dispersivas (aquellas donde una fase sólida se dispersa sobre una fase líquida mediante agitación mecánica) que han dado como resultado nuevas posibilidades en el tratamiento de la muestra y ventajas tales como una reducción sustancial del tiempo de extracción e incorporación a los sistemas de análisis de flujo en línea. Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y desventajas y su elección depende del problema analítico (Lambropoulou & Albanis, 2007).

Dentro de las técnicas modernas, QuEChERS es uno de los métodos de análisis de residuos de pesticidas en matrices alimentarias más utilizado, cuyo acrónimo significa: rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro (del inglés, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (M. Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher, & Schenck, 2003). QuEChERS es una miniaturización rápida y conveniente de la extracción líquido-líquido que proporciona resultados de alta calidad en un número mínimo de pasos y con un bajo consumo de solvente y materiales.

El procedimiento original consiste en una extracción de una muestra con alto contenido de agua y previamente homogeneizada, mediante agitación manual o mezcla en vórtice con la misma cantidad de MeCN para proporcionar un extracto final lo suficientemente concentrado para eliminar la necesidad de evaporación del solvente. A continuación, se agregan sales (4 g de sulfato de magnesio anhidro, $MgSO_4$ y 1 g de cloruro de sodio, NaCl). Esta combinación proporciona una separación de fases bien definida y da una fuerza iónica alta a la solución acuosa que facilita el reparto de los analitos entre ambas fases: el residuo acuoso y el solvente orgánico. Las fases se separan luego de agitación manual y centrifugación. Una alícuota de la fase orgánica es sometida a un proceso de clean-up (purificación o limpieza) y eliminación del agua simultáneos mediante un procedimiento rápido, llamado extracción en fase sólida dispersiva (dSPE), en el que se utilizan, distintos tipos de adsorbentes que retienen selectivamente diferentes tipos de metabolitos que podrían interferir en el análisis. Por ejemplo la amina primaria y secundaria (PSA) se mezcla con $MgSO_4$ anhidro con el extracto de la muestra. La SPE

dispersiva se basa en los fenómenos de absorción y adsorción al igual que en la SPE, pero el adsorbente se agrega directamente al extracto sin acondicionamiento y la remoción de coextractivos adsorbidos se realiza fácilmente mediante agitación y centrifugación. En la dSPE no hay un fenómeno cromatográfico, que si ocurre en la SPE. El procedimiento de purificación dispersivo requiere menos tiempo que el SPE tradicional y elimina simultáneamente el agua residual y muchos componentes de la matriz, por ejemplo, ácidos orgánicos, algunos pigmentos polares, y azúcares que fueron co-extraídos con los analitos y son fuente de posibles interferencias al momento de la determinación (Lambropoulou & Albanis, 2007).

Versiónes posteriores al QuEChERS original han surgido debido a la necesidad de expandir el alcance del método principalmente a compuestos cuya extracción dependía del pH de la muestra, por lo que la extracción se ajustó para ser realizada empleando ya sea un buffer acético-acetato (Lehotay, et al., 2007) o bien el buffer cítrico-citrato (M. Anastassiades, Scherbaum, E., Tsdelen, B., Stajnbaher, D., 2007). En el caso de la solución amortiguadora acético-acetato se agrega 1 % de ácido acético al acetonitrilo, y se sustituye el NaCl por acetato de sodio. En el buffer citrato, junto con el acetonitrilo y las sales $MgSO_4$, NaCl, se agrega $Na_3Cit.2H_2O$ y $Na_2HCitr.1.5H_2O$. La versión del método que utiliza el buffer acético-acetato es el método oficial para la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (AOAC 2007.01) mientras que a nivel Europeo, el método oficial para EN 15662 es el QuEChERS con buffer citrato. Un esquema general de las 3 versiones de QuEChERS es presentado en la Figura 1.17.

Original	AOAC 2007.01	CEN15662
<ul style="list-style-type: none"> •10-15 g muestra •10-15 mL MeCN 	<ul style="list-style-type: none"> •10-15 g muestra •10-15 mL 1% HAc en MeCN 	<ul style="list-style-type: none"> •10-15 g muestra •10-15 mL MeCN
<p>• <i>agitación</i></p>	<p>• <i>agitación</i></p>	<p>• <i>agitación</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> •0,4 g/mL MgSO₄ anh + 0,1 g/mL NaCl. 	<ul style="list-style-type: none"> •0,4 g/mL MgSO₄ anh + 0,1 g/mL de NaAc. 	<ul style="list-style-type: none"> •0,4 g/mL MgSO₄ anh + 0,1 g/mL + 0,1 g/mL Na₃. Cit. 2H₂O + 0,05 g/mL Na₂. Cit. 1,5H₂O
<p>• <i>agitación y centrifuga</i></p>	<p>• <i>agitación y centrifuga</i></p>	<p>• <i>agitación y centrifuga</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> •150 mg/mL MgSO₄ anh + 25 mg/mL PSA* 	<ul style="list-style-type: none"> •150 mg/mL MgSO₄ anh + 50 mg/mL PSA** 	<ul style="list-style-type: none"> •150 mg/mL MgSO₄ anh + 25 mg/mL PSA
<p>• <i>agitación y centrifuga</i></p>	<p>• <i>agitación y centrifuga</i></p>	<p>• <i>agitación y centrifuga</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> •*Opcional: 50 mg/mL C18 y 7,5 mg/mL de GCB 	<ul style="list-style-type: none"> •**Opcional: 50 mg/mL C18 y 2,5-7,5 mg/mL de GCB 	

Figura 1.17. Estructura general de las 3 versiones más empleadas de QuEChERS.

Posteriormente al desarrollo de QuEChERS, otros métodos clásicos de análisis de residuos de pesticidas, fueron miniaturizados basándose en los conceptos planteados por Anastassiades (M. Anastassiades, et al., 2003). Por ejemplo, el método Luke, que utiliza 100 g de muestra y 200 mL de acetona (Luke, Froberg, & Masumoto, 1975), también el método Acetato de Etilo original, que consiste en una extracción con dicho solvente orgánico, en la que se parte de 75 g de muestra y se agrega Na₂SO₄ y NaHCO₃ y no se realiza etapa de purificación (Pihlström, Blomkvist, Friman, Pagard, & Österdahl, 2007), tomaron este concepto de preparación de muestra. En el caso de Luke, se pasó a utilizar 15 g de muestra y 30 mL de acetona, 30 mL de éter de petróleo y 30 mL de diclorometano para la extracción (Hiemstra & de Kok, 2007) y en 2016 Lozano *et al.* presentaron la miniaturización del mini Luke pasando a utilizar 15 g de muestra y 20 mL de cada uno de los solventes –método NL-(Lozano, et al., 2016). En el caso del método de acetato de etilo, se conocen la versión sueca (método SweEt - (Pihlström, 2015)) que utiliza 5 g de muestra y también versiones donde se utilizan 10 g de muestra (C. Ferrer, et al., 2010; S. Uclés, et al., 2014), entre otras variantes donde el extracto es purificado (Mol, et al., 2007). Un esquema general de este método de extracción se presenta en la Figura 1.18.



Figura 1.18. Estructura general método de Acetato de Etilo (AcOEt) sin clean up.

Estas metodologías permiten una extracción simplificada de un gran número de residuos de pesticidas en un amplio rango de matrices con características muy diferentes. Estos procedimientos, han sido expandidos y utilizados en numerosas combinaciones de pesticidas-matrices en muchas partes del mundo. (Niell, Besil, Colazzo, Cesio, & Heinzen, 2017; Paya, et al., 2007).

1.5.3. Análisis instrumental

Se ha avanzado mucho en el análisis de pesticidas durante la última década, durante el cual las técnicas *hyphenated* (acopladas), que implican una separación altamente eficiente unida por interfases específicas a una detección sensible se han convertido en las técnicas de elección. Entre éstas, los métodos basados en la separación cromatográfica con detección espectrométrica de masas han resultado en una mayor probabilidad de identificación y se reconoce que son métodos extremadamente útiles y autorizados para determinar los residuos de pesticidas (Lambropoulou & Albanis, 2007). Las técnicas de cromatografía de gases (GC) como las de líquidos (LC) acopladas a diferentes detectores han sido tradicionalmente aplicadas para separar, identificar y cuantificar pesticidas en un amplio rango de matrices. Las propiedades fisicoquímicas de los pesticidas condicionan la elección del sistema analítico separativo, siendo la cromatografía gaseosa la técnica de elección para compuestos volátiles y la cromatografía líquida la que permite el análisis de una mayor diversidad de compuestos incluidos los polares, y no volátiles entre otros (Forgács & Cserhádi, 2003). Si bien existen compuestos que pueden analizarse tanto por GC como LC, algunos solo pueden analizarse exclusivamente por una de las dos. La utilización de ambos sistemas permite

ampliar el alcance de las metodologías analíticas a los cientos de pesticidas aprobados para su uso.

Estas técnicas separativas suelen utilizar detectores clásicos y de espectrometría de masas (MS). Los métodos multiresiduos en muestras de alimentos con resultados obtenidos con detectores selectivos como ECD, NPD o FPD requieren confirmación por MS (Taga & Bilgin, 2010) para cumplir con las exigencias de identificación de las guías para análisis de residuos de pesticidas como las de la Unión Europea (DG-SANTE, 2017) y del *Codex Alimentarius* (Codex_Alimentarius, 2005).

Debido a su alta sensibilidad y selectividad, la espectrometría de masas (MS) se considera hoy en día como uno de los métodos de detección más versátiles y potentes (Desfontaine, Veuthey, & Guillarme, 2017). En las últimas décadas, los espectrómetros de masa más comúnmente empleados para el análisis de rutina de residuos de pesticidas en frutas y verduras han sido los de triple cuadrupolo (QqQ) y trampa de iones (IT), debido a la selectividad, sensibilidad y al rendimiento de estas técnicas (S. Uclés, et al., 2017). Sin embargo, se utilizan aún configuraciones más simples como lo es la cromatografía gaseosa y líquida acopladas a espectrómetro de masa de tipo cuadrupolo simple (SQ) (Banerjee, Mujawar, Utture, Dasgupta, & Adsule, 2013; Soler, Mañes, & Picó, 2005)

1.5.1. Resolución, poder resolutivo y exactitud de masas

Los sistemas instrumentales de espectrometría de masa pueden caracterizarse según su poder resolutivo y la exactitud de masas que alcanzan. La *resolución* de un espectrómetro de masa es su habilidad de distinguir entre dos iones con similares valores de m/z . La IUPAC define a la *resolución* de masa como la menor diferencia de masas entre dos picos de igual magnitud de tal forma que el valle entre ellos es de 10 % de la altura de pico (IUPAC, 1997). Por otro lado, se define el *poder de resolución* de un espectrómetro, como $m/\Delta m$ donde m es la m/z medida y Δm es el ancho de pico a mitad altura, definido en base a FWHM (DG-SANTE, 2015). Esto estipula que tanto la resolución como el poder de resolución de los analizadores de masa sean variables a lo largo de un rango de masas y dependientes de la masa medida, siendo mayor a m/z mayores.

La *exactitud de masas* es la desviación entre la masa exacta medida y la masa exacta calculada de un ión. Una medida de la exactitud es mediante el error de masa. El error

puede ser expresado como un valor absoluto en miliDaltons (mDa) o como un valor relativo en partes por millón (ppm). El valor más utilizado es el de ppm y se determina como se indica en la Ecuación 1.

$$\text{Error (ppm): } \frac{(\text{masa exacta experimental} - \text{masa exacta teórica}) \times 10^6}{\text{masa exacta teórica}}$$

Ecuación 1

Es considerado un valor adecuado de masa exacta apto para la identificación de un ión cuando su exactitud es inferior a 5 ppm (DG-SANTE, 2015); esto aplica para pesos moleculares inferiores a 1.000 Da. Cuando se trabaja con analizadores de MS es imprescindible mantener un ajuste del eje de masas que asegure la correcta asignación de las masas espectrales. Con tal fin, se realiza una calibración del eje de masas. En el caso de analizadores de masas exactas, la calibración se realiza con mayor frecuencia que en aquellos instrumentos de masa nominal, debido a que en los últimos, la resolución y las exigencias para su resolución de masas son menores. En los analizadores tipo TOF, el ajuste de masas debe ser frecuente, para obtener valores de masas exactas con un mínimo de error. Para esto, se utiliza una sustancia de referencia que se infunde durante cada inyección cromatográfica para corregir posibles desviaciones de la medida de las masas. Estas variaciones en las condiciones de trabajo, refieren básicamente a las causadas por diferencias de temperaturas que afectan por dilatación o contracción al tubo de vuelo y por ende al recorrido de masas y su tiempo de vuelo (Boyd, Basic, & Bethem, 2008a).

1.5.1.1. Cuadrupolo

En el caso de los cuadrupolos acoplados a GC, después de su generación en una fuente de iones (típicamente impacto electrónico o ionización química), los iones son filtrados según su relación masa- carga (m/z) en el analizador de masas que consiste en cuatro varillas hiperbólicas que se colocan paralelas en una matriz radial. Las barras opuestas se cargan mediante corriente continua positiva o negativa sobre la cual se superpone una radiofrecuencia oscilante (Desfontaine, et al., 2017). Los iones se introducen en el campo cuádrupolar (da origen al nombre) por medio de un bajo potencial de aceleración de típicamente 10-20 V y comienzan a oscilar en un plano perpendicular a la longitud de la varilla. Cuando las oscilaciones no son estables, los iones no pasan el filtro porque

la amplitud de las oscilaciones se vuelve infinita y colisionan con las barras. Cuando se hacen trayectorias estables, los iones se transmiten hacia el detector. El cuadrupolo actúa así como un filtro, generalmente configurado para transmitir iones de una relación m/z particular y presenta una resolución de masa unitaria (Stan, 2005). En la Figura 1.19 se presenta el diseño general de este analizador.

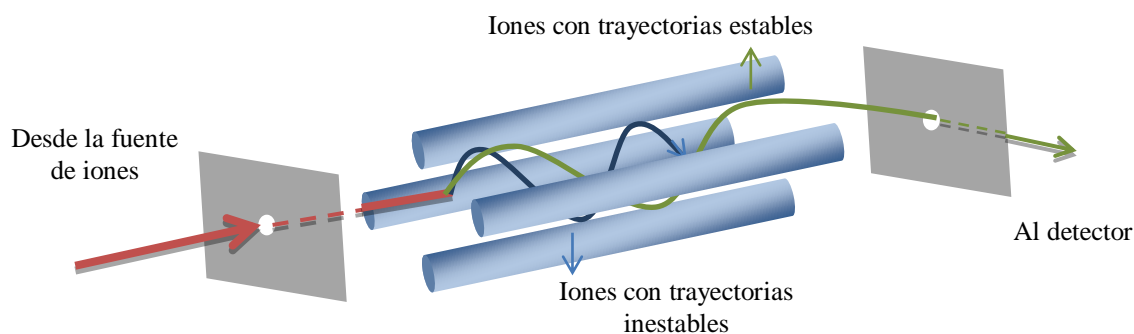


Figura 1.19. Esquema de un analizador de masas de tipo cuadrupolo.

Cuando se trabaja con este tipo de analizadores, existe la posibilidad de optar entre dos modos operativos: adquisición en *full scan* donde todos los iones generados en la fuente a partir del eluato son monitoreados, o en modo *Single Ion Monitoring* (SIM, por sus siglas en Inglés) es decir: monitoreo de iones seleccionados.

Un paso importante en la identificación de pesticidas es la posibilidad de una búsqueda automática en una biblioteca de referencia. La adquisición en *full scan* permite la comparación del espectro de masas de una molécula en condiciones estándar, a 70 eV utilizando GC-EI-Q. Al comparar el espectro de masas del analito con otros en un archivo de referencia, se puede reconocer la identidad. Una característica útil de todos los algoritmos de comparación computarizados es el cálculo de factores que se utilizan para distinguir entre coincidencias buenas, medias y malas. Sin embargo, en lo que refiere al análisis de rutina de pesticidas utilizando analizadores de tipo cuadrupolo, el modo de adquisición SIM gana terreno en el análisis *target*, donde se buscan compuestos objetivo. Cuando se opera en modo SIM, los requerimientos de las guías internacionales establecen que en lo que refiere a parámetros espectrométricos, se deben seleccionar 3 iones característicos para cada compuesto (DG-SANTE, 2015).

Esto se debe a la mayor sensibilidad instrumental y por ende se obtienen niveles de calibrado (LCL) más bajos, es decir, la concentración (o masa) más baja de analito con la que el sistema de determinación se calibra con éxito, en todo el lote de

análisis, lo cual compensa con creces la pérdida de información estructural (DG-SANTE, 2015; Stan, 2005).

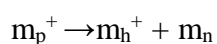
1.5.1.2. Triple cuadrupolo

La información estructural proporcionada por la espectrometría de masas se puede mejorar aún más con la combinación de espectrómetros de masa en un instrumento que agrega una nueva dimensión.

Los detectores de masas en tándem presentan 2 grandes ventajas frente a los detectores clásicos como ECD, FPD, SQ. Por un lado presentan una elevada capacidad para la identificación y confirmación simultánea de los analitos, otorgando un alto grado de confianza en la determinación estructural del compuesto y por otro lado, poseen una alta selectividad para detectar concentraciones de pesticidas muy pequeñas, del orden del picogramo (10^{-12} g) en muestras complejas, estas características lo convierten en el sistema instrumental de elección para este tipo de análisis (Schreiber 2010). Uno de estos instrumentos es el triple cuadrupolo, donde tres cuadrupolos (Q1, Q2, Q3) están unidos en serie. En estos instrumentos, el primer y tercer cuadrupolo son analizadores de masas mientras que el intermedio es una celda de colisión. En ella, los iones seleccionados en Q1 colisionan con un gas inerte, generando nuevos iones que son analizados en Q3. El triple cuadrupolo es designado QqQ, donde la "q" corresponde a la celda de colisión.

El sistema de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), funciona como detector, y estará acoplado a un sistema cromatográfico que será el que defina la interfase utilizada y por ende el tipo de ionización que sufrirá el compuesto.

Si bien se puede utilizar una amplia variedad de configuraciones de instrumentos en MS-MS, existe un concepto básico único en el que está incluido la configuración QqQ: la medición de la m/z de iones antes y después de una reacción en el espectrómetro de masas. La reacción implica un cambio en la masa y se puede representar como:



donde m_p^+ es el ion precursor (ión padre), m_h^+ es el ión producto (ión hijo) y m_n representa una o más especies neutras. El experimento básico de MS-MS es la selección del ión precursor en la primera etapa de análisis (MS1), la fragmentación del ión precursor en la región de reacción, por ejemplo, por disociación inducida por colisión (CID), y el análisis en base a la relación m/z de los iones hijos en la segunda etapa de

análisis (MS2) (análisis de iones producto) (Niessen, 2017). La instancia de activación iónica se puede dar de muchas maneras, pero lo más habitual es la CID. La disociación inducida por colisión se basa en la conversión de la energía de traslación del ión precursor en energía interna mediante colisiones con un gas neutro, por ejemplo, helio, nitrógeno o argón, admitidos en la celda de colisión. Se deben considerar dos regímenes de energía de colisión: colisiones de baja energía y alta energía, dependiendo de la energía de traslación inicial del ión precursor tras la colisión. En los sistemas de QqQ, las fragmentaciones son de baja energía (Niessen, 2017).

Estos analizadores tienen distintos modos operativos, y en lo que respecta a analítica de pesticidas, el modo más utilizado es el MRM (Multiple Reaction Monitoring). Cuando se trabaja en modo MRM en un QqQ acoplado a un sistema de cromatografía líquida, el primer analizador selecciona $[M+H]^+$, conocido como ión precursor o ión padre, en Q2 se fragmenta el ión seleccionado que fuera seleccionado en Q1, y Q3 monitorea solamente un ión producto o ión hijo. La fragmentación de un ion precursor a un ión hijo se conoce como “transición”. En la Figura 1.20 se presenta el esquema general de funcionamiento de un QqQ acoplado a cromatografía líquida.

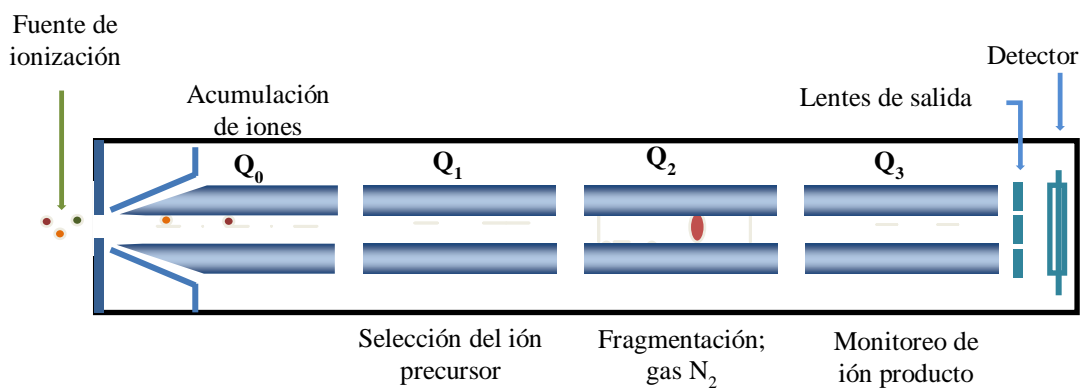


Figura 1.20. Esquema de funcionamiento de un triple cuadrupolo operando en modo de monitoreo de reacción simple (SRM), elaborado en base a un LC-ESI-QqQ.

1.5.1.3. Tiempo de vuelo (ToF)

Actualmente, la espectrometría de masa exacta de alta resolución (HR-AMS) acoplada a sistemas de separación cromatográfica se incluye cada vez más en el trabajo rutinario de los laboratorios de control de residuos de pesticidas. Los analizadores de tiempo de vuelo (ToF, del inglés, Time of Flight) son analizadores que permiten trabajar en alta resolución (HR, del inglés High Resolution de masas) y que determinan la masa exacta

del compuesto. Es probablemente el método más simple de medición de masas para conceptualizar, aunque existen complejidades cuando se trata de aplicaciones de mayor resolución. Las características inherentes de ToF-MS son sensibilidad extrema (todos los iones son detectados), rango de masa y velocidad de análisis casi ilimitados (Boesl, 2017). Esto hace que ToF-MS sea uno de los métodos más versátiles de análisis de masas.

Un analizador ToF mide el tiempo que pasan los iones de diferentes masas para pasar de la fuente de ionización al detector (Boesl, 2017). A continuación se presenta la ecuación 2 que vincula el tiempo de vuelo con la relación masa-carga (m/z) para un ión dado.

$$T_{oF} = \frac{L}{\sqrt{2V}} \cdot \sqrt{m/z}$$

Ecuación 2

Donde L representa la distancia recorrida, V la velocidad, m es la masa y z la carga.

En un espectrómetro de masas ToF, un haz pulsado de iones se acelera mediante la aplicación de un potencial en un tubo de vuelo y se mide el tiempo necesario para que cada ión alcance el detector. La fuente de iones se pulsa de manera que se registra un espectro de masas completo antes de que los primeros iones del siguiente pulso lleguen al detector (Boesl, 2017). Una característica importante de todos los instrumentos ToF es la alta transmisión de iones. En consecuencia, se espera que los límites de detección de ToF-MS sean mejores que los de los cuadrupolos. La resolución de masa de los ToF ha sido limitada durante mucho tiempo, aunque en las últimas décadas se han logrado mejoras en este sentido mediante el uso de reflectrones. Todos los iones reciben la misma energía cinética inicial por el pulso de extracción y luego se desplazan a lo largo del tubo de vuelo, donde se separarán de manera que todos los iones de la misma m/z lleguen al detector al mismo tiempo. En la práctica, existe una distribución de energía cinética para cada m/z discreta. Esto reduce la resolución al crear una distribución de tiempo de vuelo para cada m/z . Esto se corrige mediante la aplicación de un reflectrón al final de la zona de deriva. Consiste en una serie de campos eléctricos que rechazan los iones a lo largo del tubo de vuelo, generalmente en un ángulo ligeramente desplazado (ver figura 1.21), lo que resulta en un reenfoque de iones con el mismo valor m/z en el detector reflectron (Niessen, 2017).

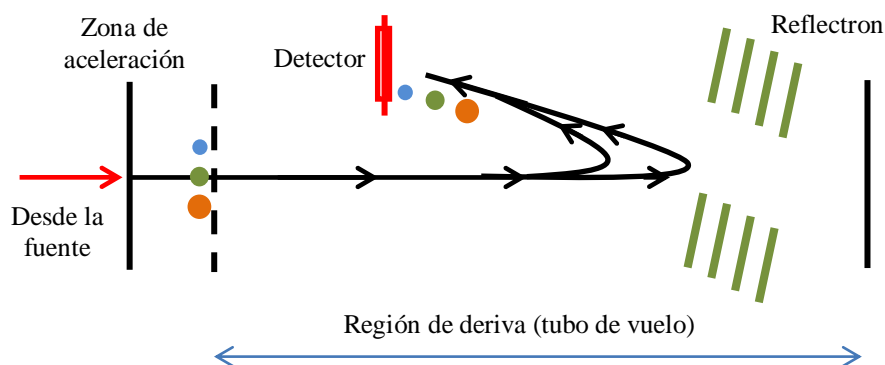


Figura 1.21. Esquema de funcionamiento de un analizador de tipo tiempo de vuelo (ToF).

1.5.1.4. Fuentes de ionización e interfases

La ionización del analito es el primer paso crucial y desafiante en el análisis de cualquier clase de compuestos por espectrometría de masas. La clave para un experimento exitoso de espectrometría de masas radica en gran medida en el enfoque para convertir un compuesto neutro en una especie iónica en fase gaseosa. Una amplia variedad de técnicas de ionización están disponibles a lo largo de los años, pero ninguna tiene aplicación universal (Dass, 2007).

1.5.1.4.1. Fuentes de GC-MS

Cuando se acopla un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masa, las sustancias separadas en el GC se introducen al MS a través de una interfase. Seguidamente, se encuentra la fuente de ionización, que en lo que respecta a analítica de pesticida las más utilizadas son impacto electrónico (EI) e ionización química (CI), siendo la primera una ionización fuerte (típicamente 70 eV) mientras que CI es una ionización débil (Moldoveanu & David, 2017). Es relevante enfatizar que ambas fuentes requieren la introducción de analitos en fase gaseosa, y que las fuentes están ubicadas dentro de la cámara de alto vacío del espectrómetro de masas; por lo tanto, es esencial limitar severamente la cantidad de fase móvil que puede ingresar al espectrómetro de masas para mantener las condiciones de vacío necesarias (Boyd, Basic, & Bethem, 2008b). Dentro de la fuente de iones (típicamente 10^{-4} torr, 200–250 °C), la muestra gaseosa es bombardeada con electrones rápidos a través de 70 eV, generados a partir de un filamento de tungsteno o renio calentado eléctricamente. El proceso IE para una molécula de analito M se puede describir como en la ecuación:





El analito M da lugar a un catión-radical como ión molecular ($M^{\bullet+}$) y los iones fragmentos pueden ser tanto cationes como iones radicales mientras que la partícula N puede ser radical o neutra. La aplicación de IE está restringida a analitos térmicamente estables con masas moleculares relativamente bajas (<600 Da) con una volatilidad suficiente para que se vaporicen completamente a la temperatura de la fuente (Dass, 2007; Moldoveanu & David, 2017).

1.5.1.4.1. Fuentes de LC-MS

Por otro lado, el acople de un cromatógrafo líquido a un analizador de masas conlleva la necesidad de utilizar una interfase que tenga una capacidad dual: eliminar la fase móvil e ionizar a los analitos para introducirlos al alto vacío. Las técnicas de ionización a presión atmosférica (Atmosphere Pressure Ionization, API) hoy en día dominan el trabajo LC-MS. Actualmente hay tres tipos de fuentes API de uso común para análisis cuantitativos de traza, a saber, ionización química a presión atmosférica (Atmosphere Pressure Chemical Ionization, APCI, por sus siglas en inglés), fotoionización a presión atmosférica (APPI) e ionización por electropulverización (Electro Spray Ionization, ESI, por sus siglas en inglés). Esta última implica la producción gaseosa de iones a presión atmosférica a partir de una solución líquida de analitos, mediante la nebulización de la solución de manera que produzca pequeñas gotas que transporten una carga eléctrica neta (Desfontaine, et al., 2017).

Es conveniente considerar el proceso general como 3 pasos, formación de gotitas, contracción de las gotitas y desorción de iones gaseosos. Una serie de factores, como el potencial aplicado, la velocidad de flujo del disolvente, el diámetro capilar, y las características del disolvente influyen en el tamaño de las gotitas formadas inicialmente. La evaporación del solvente de estas gotitas conduce a la contracción de las mismas. Sigue una cascada de procesos de fisión de la gota. A medida que éstas disminuyen de tamaño, la densidad de carga en su superficie aumenta hasta alcanzar el límite de inestabilidad de Rayleigh.

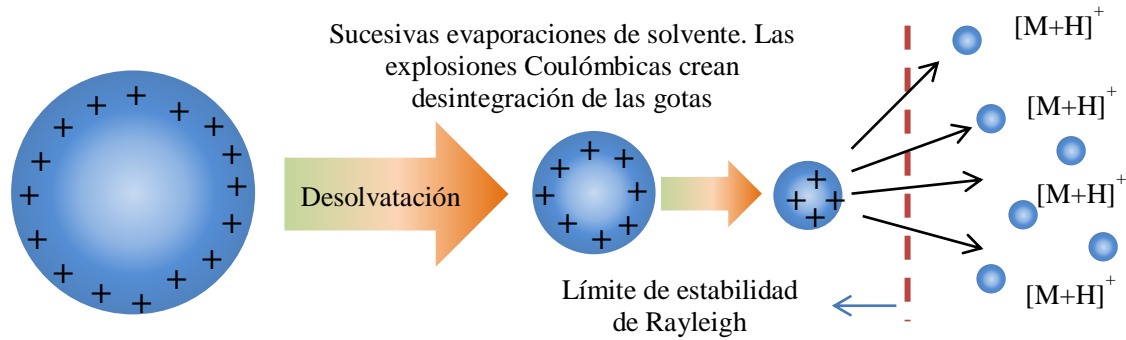


Figura 1.22. Explosión Coulómbica en la interfase de electrospray (ESI) operando en modo positivo.

En este punto, las fuerzas coulombianas repulsivas exceden la tensión superficial de la gotita, causando la fisión de las gotitas en otras más pequeñas y altamente cargadas. La evaporación adicional del disolvente da como resultado la fisión de Coulomb de las gotitas en otras de segunda generación (Dass, 2007; Desfontaine, et al., 2017)

La evaporación de las gotitas cargadas es asistida por un flujo de nitrógeno caliente. Durante el proceso de evaporación, algunos de los iones disueltos se liberan a la atmósfera. Los iones resultantes se transportan desde la región de presión atmosférica al alto vacío del analizador de masas a través de una serie de etapas de reducción de presión.

Los iones que se forman en ESI pueden ser de carga positiva o negativa, generalmente se presentan como: (a) en modo positivo, iones de moléculas protonadas ($[M+H]^+$), y aductos de sodio, amonio; (b) en modo negativo, iones moleculares desprotonados ($[M-H]^-$) o aductos de formiato o acetato, en el caso de emplear fases móviles modificadas.

1.5.2. Validación de metodologías analíticas

La validación de un método analítico se debe realizar para demostrar que el mismo es adecuado para el propósito analítico para el cual se va a utilizar, y asegurar que los resultados analíticos arrojados por el método sean exactos y confiables (Huber, 1998). En otras palabras, es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. El uso de métodos validados es importante para que un laboratorio analítico demuestre su calificación y competencia.

A nivel internacional, organismos tales como la Unión Internacional de Química Pura y

Aplicada (IUPAC), el *Codex Alimentarius*, la *International Standardization Organisation* (ISO), la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) así como *A Focus for Analytical Chemistry in Europe* (Eurachem) establecen guías para la validación de métodos analíticos (Taverniers, De Loose, & Van Bockstaele, 2004).

En lo que refiere a validación y aseguramiento de la calidad de metodologías de análisis de residuos de pesticidas, tanto la Unión Europea (UE) como el *Codex Alimentarius* (más recientemente) disponen de guías específicas en el tema del análisis de pesticidas. La guía del *Codex Alimentarius* “Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed” ha sido adoptada por primera vez muy recientemente, en el año 2017 (Codex_Alimentarius, 2017).

En el caso de la UE, la guía establecida por Dirección General de Sanidad y Seguridad Alimentaria -DG-SANTE- “Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed”, la cual se actualiza cada dos años y es la de referencia para los laboratorios oficiales Europeos que realizan el control o la vigilancia de residuos de pesticidas en alimentos y ración de animales, tiene criterios exigentes y adaptados a las particularidades de la analítica de pesticidas y está en uso desde el año 1997 con el documento No. SANCO/7826/VI/97. Los parámetros establecidos son consensuados por un comité de expertos con amplia experiencia en la temática y se adaptan a los avances instrumentales, así como también a nuevos ajustes en preparación de muestra. Cabe mencionar, que estas definiciones no son absolutas ya que están en constante evolución. En consecuencia, durante los años en que se realizó este trabajo de tesis, se trabajó con las ediciones de los años 2011, 2013, 2015 y 2017. Los principales cambios en esos periodos en lo que a parámetros de validación y confirmación se refiere, fueron: i) de 2011 a 2013, se modificaron las tolerancias de la abundancia relativa de iones entre estándar y muestra pasando a ser 30 % para todos los instrumentos de espectrometría de masa con la excepción de GC-EI-MS. También se define que el efecto matriz (EM) debe medirse calculándolo como porcentaje de EM. ii) de 2013 a 2015, se define como criterio que un porcentaje de EM \pm 20 % es despreciable; y la abundancia relativa de iones para confirmar la presencia de un analito paso a ser 30 % para todos los sistemas instrumentales. iii) de 2015 a 2017, se define claramente que si el % de EM es mayor a 20 %, se debe cuantificar con calibración en matriz y ser reportado en la validación. En lo que refiere a verificación de linealidad, el

último documento establece que la desviación de las concentraciones calculadas a partir de la calibración de las concentraciones verdaderas, utilizando la curva de calibración en la región relevante no debe ser superior a $\pm 20\%$. También se incorpora la abundancia de iones y la tolerancia de tiempo de retención como parámetros a ser considerados en la validación.

Los trabajos realizados se ajustaron para cumplir con los requerimientos del documento 2015 y en particular en efluentes, se trabajó con la versión 2017 que entró en vigencia el 01/01/2018.

Las cifras de mérito a ser evaluadas para la validación de una metodología según la guía SANTE, se listan y definen a continuación.

1.5.2.1. Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos mediante la aplicación del procedimiento experimental en condiciones establecidas. Cuanto menor es la parte aleatoria de los errores experimentales que afectan los resultados, más preciso es el procedimiento. Una medida de precisión (o imprecisión) es la desviación estándar.

1.5.2.1.1. Repetitividad

Es la precisión de medición de un analito, obtenidos utilizando el mismo método, en la misma muestra en un solo laboratorio en un corto período de tiempo durante el cual no existen diferencias en analistas, materiales y/o equipos involucrados.

1.5.2.1.2. Reproducibilidad

Es la precisión (desviación estándar) de medición de un analito (generalmente obtenida de la recuperación o análisis de materiales de referencia), obtenidos utilizando el mismo método en la misma muestra, en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, ó durante un período de tiempo en el cual existan variaciones en los materiales y equipos. También se puede definir como el valor por debajo del cual se puede esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales en material idéntico, obtenido en las condiciones anteriores, se encuentre con una probabilidad específica (por ejemplo, 95 %).

1.5.2.1.3. Precisión intermedia

Es la precisión en condiciones donde los resultados de un ensayo se obtienen con el mismo método, en pruebas idénticas, en el mismo laboratorio, realizado por diferentes analistas utilizando diferentes equipos durante un periodo de tiempo prolongado.

1.5.2.2. Selectividad

Es la habilidad de la extracción, la purificación, la derivatización, el sistema de separación y (especialmente) el detector para discriminar entre el analito y otros compuestos presentes en el extracto.

1.5.2.3. Especificidad

Es la capacidad del detector (respaldada por la selectividad de la extracción, purificación, derivatización o separación, si es necesario) para proporcionar señales que identifiquen efectivamente al analito. Por ejemplo, GC-MS con EI es un sistema de determinación poco selectiva pero con alta especificidad. La espectrometría de masas de alta resolución y MS en tándem, pueden ser altamente selectivas y altamente específicas.

1.5.2.4. Veracidad

Es el grado de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie de resultados esperado y el valor de referencia aceptado o valor verdadero. La medida de la veracidad se expresa normalmente como 'sesgo'. En caso de existir materiales de referencia se expresa como el z-score, en ausencia de materiales de referencia se expresa como el porcentaje de recuperación.

Se define cómo recuperación a la proporción de un analito remanente en el punto final de su determinación, luego de su adición, generalmente a una matriz blanco (no contiene niveles detectables del analito en estudio), inmediatamente antes de su extracción. Se suele expresar como porcentaje de recuperación.

La evaluación de la veracidad se realiza, como mínimo, a dos niveles de concentración: el límite de cuantificación (límite de reporte), y al menos otro nivel superior, por ejemplo, entre 2-10x, el LOQ objetivo o, el LMR.

1.5.2.5. Límite de cuantificación

Se define como la mínima concentración o masa del analito que puede ser cuantificada con una veracidad y precisión adecuada (media de recuperación en el rango de 70 a 120 %, con una RSD \leq 20 %).

1.5.2.6. Linealidad

Es habilidad del método de obtener resultados experimentales proporcionales linealmente a la concentración del analito. Evaluada en al menos 5 niveles de concentración.

1.5.2.7. Robustez

Es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inalterado por pequeñas y deliberadas variaciones en los parámetros operacionales del método y que provee la seguridad de obtención de resultados confiables durante su normal ejecución. Se determina con la recuperación promedio y RSD_{wR}, derivados de la validación/verificación del método en curso durante la utilización del mismo a lo largo del tiempo.

1.5.2.8. Exactitud

Es el grado de concordancia entre el resultado experimental y el valor de referencia aceptado (valor real). Un método es exacto cuando es veraz y preciso.

1.5.2.9. Efecto matriz

Este es un concepto que se debe evaluar particularmente en el análisis de residuos de pesticidas, por lo que merece especial atención. Luego de la separación cromatográfica de la muestra, los analitos se determinan a través de plataformas de espectrometría de masas muy bien establecidas en la analítica de pesticidas.

A pesar de las herramientas analíticas disponibles y de las metodologías modernas de preparación de muestra que son sumamente selectivas, los componentes que se co-extraen con los compuestos de interés generan el llamado el efecto matriz (EM). Este fenómeno puede afectar la correcta cuantificación de los analitos durante los programas de monitoreo y el análisis de rutina.

Todos estos efectos están relacionados con la presencia de compuestos distintos del

analito objetivo en el extracto que se inyecta en el cromatógrafo, y que co-eluyen con uno o más de los analitos e interfieren con el análisis espectrométrico de masas.

Este fenómeno lo define la IUPAC (Guilbault & Hjelm, 1989) como "el efecto combinado de todos los componentes de la muestra distintos del analito en la medición de la cantidad del mismo", mientras que la guía SANTE (DG-SANTE, 2015) lo describe como "la influencia de uno o más componentes no detectados de la muestra en la medición de la concentración o masa del analito".

Las interferencias más simples de reconocer son aquellas en las que un compuesto coeluyente produce una señal espectrométrica de masas que coincide o se superpone con la que se usa para controlar la concentración de un analito; estos efectos a veces se denominan interferencias directas. En contraste, las interferencias indirectas son más sutiles y no implica superposición de señales espectrométricas de masas. Más bien, la presencia del compuesto interferente junto con un analito en la fuente de iones, o bien suprime o aumenta la eficiencia de ionización de esta última de una manera impredecible siendo la supresión la interferencia más común que se observa en análisis de residuos. Tales compuestos interferentes pueden ser endógenos (originalmente presente en la matriz de la muestra y extraídos conjuntamente con los analitos) o exógenos (introducidos en el extracto durante la etapa de preparación de la muestra, por ejemplo, compuestos introducidos a partir de tubos de plástico, y también aquellos generados como artefactos en el proceso de extracción, etc.) (Boyd, et al., 2008b).

La matriz, el procedimiento de tratamiento de la muestra y otros aspectos como el tipo de espectrómetro de masas o el modo de adquisición influyen directamente en los efectos de la matriz (I. Ferrer, García-Reyes, & Fernandez-Alba, 2005). La presencia o ausencia de tales efectos se puede demostrar comparando la respuesta producida del analito en una solución de solvente con la obtenida de la misma cantidad de analito en el extracto de muestra. Durante el paso de cuantificación, el EM puede desempeñar un papel importante disminuyendo o mejorando la señal obtenida del analito (Trufelli, Palma, Famigliani, & Cappiello, 2011). Para compensarlo, las curvas de calibración en matriz se utilizan comúnmente y se recomienda su uso (DG-SANTE, 2015). El cálculo del EM se realiza según la Ecuación 3.

$$EM = \left(\frac{\text{pendiente (calibración en matriz)}}{\text{pendiente (calibración en solvente)}} - 1 \right) \times 100$$

Ecuación 3

Los valores positivos y negativos representan respectivamente aumento y supresión de la señal del analito inducida por la matriz.

El EM se clasifica en 3 niveles: a) **débil** considerado cuando EM es menor o igual al 20 %, o también se puede considerar de que no hay efecto de la matriz porque este cambio está entre los valores de repetitividad (C. Ferrer, Lozano, Agüera, Girón, & Fernández-Alba, 2011); b) **medio** cuando el valor está entre el 20 y el 50 %, y c) **fuerte** cuando los valores están por encima del 50 %.

Los parámetros antes mencionados junto a los criterios de aceptabilidad establecidos por la guía SANTE 2015/11945 se presentan en la Tabla 1.3.

Parámetro	Qué/Cómo	Criterio
Sensibilidad/linealidad	Verificar la linealidad a 5 niveles de concentración	Residuales $< \pm 20 \%$
Efecto matriz	Comparación de la respuesta en solvente frente a la respuesta de calibración en matriz	($\pm 20 \%$)
LOQ	Nivel de fortificación más bajo que cumple los criterios de veracidad y precisión	$\leq \text{LMR}$
Especificidad	Respuesta en blanco de reactivo y en muestra blanco de control.	$< 30 \%$ of LR
Veracidad	Promedio de recuperación para los niveles de fortificación evaluados.	70-120 %
Precisión (DSR_r)	Repetitividad para los niveles evaluados (DSR_r).	$\leq 20 \%$
Precisión (DSR_{WR})	La reproducibilidad dentro del laboratorio, derivada de la validación / verificación continua del método.	$\leq 20 \%$
Robustez	Recuperación promedio y RSD_{WR} , derivados de la validación / verificación continua del método.	Ver veracidad y precisión

Tabla 1.3. Parámetros y criterios para la validación de una metodología analítica según la guía SANTE/11945/2015.

1.5.3. Criterios para la identificación de residuos de pesticidas

1.5.3.1. Requisitos cromatográficos

El tiempo de retención del analito en la muestra debe coincidir con el del estándar en la curva de calibración. La tolerancia admitida por la guía SANTE es de $\pm 0,1$ min tanto para la cromatografía de gases como para la cromatografía de líquidos.

1.5.3.2. Requisitos en espectrometría de masas

La detección utilizando espectrometría de masas puede proporcionar espectros de

masas, patrones de isótopos y/o señales para iones seleccionados. Aunque los espectros de masas pueden ser altamente específicos para un analito, los valores de coincidencia difieren según el software particular utilizado, lo que hace imposible establecer una guía genérica sobre los valores de coincidencia para la identificación. En consecuencia, los laboratorios que utilizan la concordancia espectral para la identificación deben establecer sus propios criterios y demostrar que son aptos para el propósito.

La guía para la identificación basada en el espectro de masa se limita a algunas recomendaciones, mientras que para la identificación basada en iones seleccionados se proporcionan criterios más detallados que se establecen claramente según el sistema instrumental utilizado y se presentan en la Tabla 1.3.

La identificación se basa en la correcta selección de iones diagnóstico. Éstos deben ser lo suficientemente selectivos para el analito en la matriz en estudio. Los iones moleculares, moléculas protonadas o iones aductos son altamente característicos para el analito y deben incluirse en el procedimiento de medición e identificación siempre que sea posible. En general los iones m/z mayores que 100 presentan mayor seguridad como iones diagnóstico. Además, los iones isotópicos, especialmente los de Cl o Br son particularmente útiles a la hora de la confirmación.

Espectrómetro de masas/ características	Sistemas típicos (ejemplos)	Adquisición	Requerimientos para la identificación	
			Número mínimo de iones	Otros
Resolución de masa unitaria	Cuadropolo, trampa de iones, ToF	Iones totales, rango de m/z limitado, SIM	3 iones	$S/N \geq 3^e$ Los picos de analito en los cromatogramas de iones extraídos deben solaparse completamente.
MS/MS	Triple cuadropolo, trampa de iones, Q-TRAP, Q-ToF, Q-Orbitrap	Monitoreo de reacción seleccionada o múltiple (SRM, MRM), resolución en masa para el aislamiento del ión precursor igual o mejor que resolución unitaria	2 iones producto	
Medición de masa exacta	Espectrometría de masas de alta resolución: (Q-)ToF, (Q-)Orbitrap	Iones totales, rango m/z limitado, SIM, fragmentación con o sin selección de ión precursor, o combinaciones de los mismos.	2 iones con exactitud de masa ≤ 5 ppm _{a,b,c)}	Relación de iones dentro de $\pm 30\%$ (relativo) del promedio de los estándares

	FT-ICR-MS sector MS	MS de una sola etapa combinada con MS/MS con resolución de masa para aislamiento de iones precursores igual o mayor a resolución unitaria	2 iones: 1 ion molecular , molécula (des) protonada o ion aducto con exactitud de masa ≤ 5 ppm ^{a,c)} <u>más:</u> 1 MS/MS ión product ^{d)}	de calibración de la misma secuencia.
--	------------------------	---	---	---------------------------------------

Tabla 1.4. Requisitos para la identificación de los compuestos según el sistema de detección de espectrometría de masas (DG-SANTE, 2015).

Como se detalla en la Tabla 1.4, dependiendo del sistema instrumental, es necesario tener en consideración que los picos observados en los cromatogramas generados para cada analito deben presentar una relación señal ruido (S/N) mayor que 3 y forma de pico totalmente superpuestas. Según el instrumento, se necesitan 2 o más iones diagnóstico. El ión con mayor intensidad debe ser utilizado para la cuantificación. Conjuntamente, se debe cumplir para la identificación que la intensidad relativa de los iones detectados, expresada en porcentaje de intensidad del ión o fragmento más abundante, se debe corresponder con la del promedio de la calibración en la misma secuencia de inyección. La tolerancia permitida es de ± 30 %. Es importante tener en cuenta que cuando se trabaja con sistemas de MS/MS y se monitorean reacciones múltiples (como se explica en el punto 1.6.1.2), se habla de abundancia relativa entre transiciones (pasaje desde un ión precursor a un ión hijo).

1.5.4. Incertidumbre asociada al análisis de pesticidas

La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse al mensurando. (JCGM, 2008). Un requisito en virtud de la norma ISO/IEC 17025 es que los laboratorios determinen y faciliten la incertidumbre asociada con los resultados analíticos. Para ese fin, los laboratorios deberían disponer de suficientes datos derivados de la validación/verificación del método, de estudios entre laboratorios y actividades de control interno de la calidad, que pueden utilizarse para estimar las incertidumbres, especialmente para los métodos rutinarios utilizados en el laboratorio. El *Codex Alimentarius* presenta en su documento CAC/GL 59-2006, las directrices para la estimación de la incertidumbre de los resultados y el documento contempla los

approaches definidos por la guía SANTE.

Los procedimientos más comúnmente utilizados para calcular la incertidumbre de la medición son los denominados *bottom up* y *top down*. El método *bottom up* o método de componente por componente el analista descompone todas las operaciones analíticas en actividades primarias para luego agruparlas en actividades comunes y se hace una estimación de su contribución al valor combinado de incertidumbre del proceso de medición. Este método puede ser muy laborioso y exige un conocimiento exacto de todo el proceso analítico. La ventaja de este método es que proporciona una clara comprensión de los puntos críticos de control para reducir o dirigir la incertidumbre de la medición en las aplicaciones futuras del método.

El método *top down* está basado en la validación del método y datos de precisión a largo plazo derivados de muestras de control del laboratorio, resultados de ensayos de aptitud, datos bibliográficos publicados y/o ensayos de colaboración entre laboratorios. Las estimaciones de la incertidumbre basadas en estudios entre laboratorios también pueden tomar en consideración la variabilidad de los datos entre laboratorios y proporcionar la estimación más fiable del desempeño del método y de la incertidumbre asociada a su aplicación. Sin embargo, es importante reconocer que los estudios de colaboración están diseñados para evaluar el desempeño de un método específico y de los laboratorios participantes.

Dada la cantidad de residuos de pesticidas que se suelen buscar en un laboratorio y considerando la diversidad de matrices, se recomienda que para estimar la incertidumbre asociada a los procedimientos para la determinación multi-residuos los laboratorios utilicen una gama de analitos y matrices seleccionados convenientemente según las propiedades fisicoquímicas y la composición según la clasificación presente en las Directrices sobre Buenas Prácticas de Laboratorio en el Análisis de Residuos de Pesticidas en lugar de establecer la incertidumbre para cada combinación de método/analito/matriz. La selección de una gama representativa de analitos y matrices para proporcionar una estimación de la incertidumbre debería fundamentarse en datos y estudios de validación sobre la combinación elegida de matriz/analito. En resumen, los laboratorios deben utilizar o bien sus propios datos de precisión a largo plazo o el procedimiento basado en la actividad (cálculo de componente por componente) para

establecer y refinar los datos de la incertidumbre.

El resultado se expresará junto con la incertidumbre expandida:

$$\text{Resultado} = x \pm U \text{ (unidades)}$$

Siendo U, calculada a partir de la incertidumbre combinada con un factor de cobertura de 2 (según Eurachem) o el valor t Student para el nivel de fiabilidad requerido.

El cálculo de la incertidumbre puede ser abordado de las siguientes maneras:

- a) Aplicación de un valor por defecto para la incertidumbre en la medida en los residuos de pesticidas en los alimentos.
- b) Datos de precisión del uso de la relación de Horwitz
- c) Datos de precisión derivados de estudios entre laboratorios
- d) Incertidumbre en la medida derivada de la validación interna y datos de control de calidad

En este trabajo de tesis se emplearon los abordajes a y b.

1.5.5. Metodologías de análisis de residuos de pesticidas en matrices cítricas

1.5.5.1. Frutas cítricas

Es importante tener en cuenta que cada fruta cítrica (limón, naranja, mandarina) posee una composición química distinta, pudiendo aun diferenciarse entre variedades de una misma fruta y por lo tanto, para el análisis de residuos, cada una debe ser considerada como una matriz diferente. En este sentido, el fruto cítrico es una matriz compleja ya que posee compuestos de variada naturaleza y polaridad (pectinas, carotenos, ácido málico y cítrico y ácidos hidroxicinámicos, terpenos y ceras) (Dugo & Di Giacomo, 2002). Asimismo, las frutas cítricas son una fuente rica de flavonoides. Algunos de ellos no tienen sabor, otros son responsables de la amargura de algunas especies de cítricos y están presentes en las formas de glucósidos o aglicona. Entre las agliconas, naringenina y hesperetina son las flavanonas más importantes, mientras que entre las formas de glucósidos, se clasifican dos tipos: neohesperidosides y rutinosides (Macheix, Fleuriet, & Billot, 1990). Las flavanonas neohesperidosides (naringina, neohesperidina y neoeriocitrina) consisten en una flavanona con neohesperidosa (ramnosil-a-1, 2 glucosa)

y tienen un sabor amargo, mientras que las flavanonas rutinosidas (hesperidina, narirutin y didymin) tienen una flavanona y un residuo de disacárido, por ejemplo rutinosa (ramnosyl-a-1, 6 glucosa) y no tienen sabor. Las flavononas suelen estar presentes en forma de diglicósido, lo que confiere el sabor típico a los cítricos. Las flavonas son otro grupo importante y se pueden encontrar en todas las partes de las plantas. Las flavonas han sido aisladas del aceite esencial de los cítricos (en el flavedo) y también se identifican en el jugo (Robards & Antolovich, 1997). Las principales flavonas en los cítricos son diosmina, apigenina, luteolina, diosmetina y tangeretina. La quercetina, la quercetina-3-glucósido, la quercetina-galactósido, la quercetina-xilósido, la quercetina-ramnosida, la quercetina-arabinósido y la rutina son los flavonoles más importantes (Khan, Ahmad, Ahmad Asad, & Shahzad, 2014).

Por lo tanto, el desarrollo de métodos de extracción y purificación son etapas cruciales para eliminar selectivamente los compuestos interferentes y extraer los pesticidas de acuerdo a los parámetros analíticos actualmente exigidos (DG-SANTE, 2015). Existen reportes de distintas metodologías de análisis que involucran diversas preparaciones de muestra utilizando diferentes sistemas instrumentales; tanto detectores clásicos como de masas y masas en tándem. En lo que respecta a fruta fresca se han planteado estrategias como MSPD y QuEChERS, entre otras así como también se reportan metodologías utilizando Luke, SPE, SPME (Fernandes, Domingues, Delerue-Matos, & Mateus, 2011).

Torres y colaboradores han estudiado el desempeño de MSPD partiendo de solamente 0,5 g de limones o naranjas y utilizando RP-C18 como sorbente (Torres, et al., 1995). Posteriormente se realiza una separación cromatográfica en una columna conteniendo sílica y utilizando 10 mL de AcOEt. Se determinaron los residuos de pesticidas utilizando GC-ECD, FPD, NPD y la confirmación se realizó por MS. Los porcentajes de recuperación se encontraron entre 41-108 % con desviaciones estándares menores a 14 %.

En 2005, en un relevamiento de pesticidas en frutas cítricas (240 muestras) obtenidas en mercados de Suiza, presentó la utilización de dos métodos multiresiduos diferentes para la determinación de más de 200 pesticidas. El primer método consiste en una extracción con 40 mL de acetato de etilo partiendo de 20 g de muestra (fruta entera) procesada y homogeneizada, con el agregado de 10 mL de agua, y ajuste de pH (entre 6 y 7),

centrifugación y concentración de 5 mL de sobrenadante (fase orgánica) seguida de análisis por LC-MS/MS). Este método permite la determinación de más de 74 compuestos que incluyen principalmente carbamatos, conazoles, bencimidazoles y pirimidinas. El segundo método, para la determinación de pesticidas organoclorados (OC) y organofosforados (OP) por GC-ECD y GC-NPD consistió en una extracción con 100 mL de acetonitrilo de 50,0 g de muestra homogénea. Después de agitar durante 30 minutos, la fase líquida se recogió por filtración y se puso en una bola de extracción conteniendo 500 mL de agua, 10 mL de solución saturada de cloruro de sodio y 50 mL de hexano. Para el análisis de pesticidas OC, se recogió 1 mL del sobrenadante orgánico y se diluyó a 10 mL con hexano antes de la inyección. Para pesticidas OP, 10 mL de sobrenadante orgánico se evaporaron a sequedad y luego se disolvieron en 2 mL de hexano antes del análisis (Ortelli, Edder, & Corvi, 2005).

En Turquía se analizaron 210 muestras de frutas cítricas (limón, mandarina y naranja) para la determinación de 107 pesticidas OC y OP. La preparación de muestra se realizó con el método Luke partiendo de 50 g de muestra y 200 mL de acetona. La determinación instrumental fue realizada en GC-ECD (OC) y GC-NPD (OP) y confirmación por GC-MS (Taga & Bilgin, 2010).

Desde el desarrollo de QuEChERS, dicha metodología y sus posteriores versiones han sido empleadas para el análisis de residuos de pesticidas en frutas cítricas. Particularmente durante el desarrollo de la versión AOAC 2007.01, se trabajó con naranja (Lehotay, et al., 2007). Se ha evaluado también su desempeño en otras especies de cítricos. Por ejemplo, el análisis de 38 pesticidas en limón y 42 en naranjas, analizados por GC-MS/MS y LC-MS/MS fue reportado por Payá *et al.* (Paya, et al., 2007). Wong y colaboradores, han estudiado la utilización de QuEChERS acetatoacético para el análisis de 191 pesticidas en naranja por LC-MS/MS durante un estudio inter-laboratorio. Los resultados mostraron que 14 de los 191 compuestos, no pudieron ser analizados debido a la baja eficiencia de ionización o al efecto matriz ejercido. Para un 74 % de los 177 pesticidas restantes, los porcentajes de recuperación estuvieron entre 80 y 120 % y los límites de detección entre 0,5 y 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para más del 94 % de los mismos (Wong, et al., 2010).

Otra estrategia de análisis, combinando QuEChERS y microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) fue desarrollada para la determinación simultánea de 19

pesticidas de nueve grupos químicos que exhiben o se sospecha que exhiben propiedad de disruptores endocrinos en muestras de naranja, por Andraščíková y colaboradores (Andraščíková, Hrouzková, & Cunha, 2013). El extracto de acetonitrilo obtenido de la extracción QuEChERS se usó para DLLME como disolvente dispersivo y tetracloruro de carbono como disolvente extractivo para aumentar el factor de enriquecimiento del procedimiento de extracción. Se probó el efecto de varios parámetros de extracción, como el volumen de extracto alcanzado por el método QuEChERS y posteriormente utilizado para DLLME, la selección del disolvente extractivo y su volumen. Finalmente, los límites de cuantificación alcanzados van desde 0,02 a 47 ng g⁻¹.

1.5.5.1. Subproductos cítricos

En el caso de los subproductos cítricos, se ha reportado el desarrollo de diferentes metodologías para la determinación de residuos de pesticidas en jugos cítricos (principalmente de naranja), tanto naturales como concentrados mientras que pocos trabajos informan metodologías para la determinación de residuos de pesticidas en jugo concentrado de limón (Sannino, 2007; Sannino, Bolzoni, & Bandini, 2004). El análisis de jugo incluye preparaciones de muestra basadas en QuEChERS (Rizzetti, et al., 2016), MSPD (Radišić, Grujić, Vasiljević, & Laušević, 2009), hasta otras más simples como la reportada por Boeris y colaboradores, donde a la alícuota de jugo se le agrega agua y ajusta el pH para posteriormente centrifugar la muestra y diluir el extracto con metanol y analizarlo mediante LC-DAD. En dicho estudio se incluyeron 5 pesticidas: tiabendazol, carbendazim, carbaril, propoxur y fuberidazol para los cuales los límites de detección fueron 0,9; 2,3; 0,32; 12 y 0,46 µg L⁻¹ respectivamente (Boeris, Arancibia, & Olivieri, 2014).

Por otro lado, límites de cuantificación de 0,5 µg kg⁻¹ para tiabendazol y carbendazim en jugos concentrados de naranja fueron determinados realizando una extracción con acetato de etilo sin etapa de purificación del extracto y análisis por UHPLC-MS/MS por Zheng y colaboradores (Zheng, et al., 2015).

En Brasil, Rizzetti *et al.* realizaron un diseño central compuesto (DCC) para ajustar la determinación de más de 60 pesticidas en jugo de naranja elaborado a nivel doméstico, basándose en el método QuEChERS. El método QuEChERS AOAC 2007.01 modificado (se usó 1,7 g de NaAc en lugar de 1 g en la extracción, y 40 mg mL⁻¹ de PSA y 150 mg mL⁻¹ de MgSO₄ en la etapa de purificación) fue validado y las

recuperaciones se encontraron entre 70 -118 % (Rizzetti, et al., 2016)

Por otro lado, los aceites esenciales (AE) se extraen de la cáscara de los cítricos y la concentración de pesticidas lipofílicos es mucho más alta que la que se encuentra en la fruta (Barrek, Paise, & Grenier-Loustalot, 2003). Su presencia en AE ha sido ampliamente estudiada por diferentes investigadores que han encontrado residuos de organoclorados (Saitta, Di Bella, Salvo, Lo Curto, & Dugo, 2000) y de organofosforados (Alves, et al., 2012), entre otros. Una revisión de la presencia y evolución de pesticidas y plastificantes en aceites esenciales en Italia, según el tipo de AE cítrico fue publicada por Saitta y su grupo en 2012 (Saitta, Di Bella, & Dugo, 2012). La preparación de muestra desarrollada para AEs es diversa; desde la extracción sólida/líquida (Barrek, et al., 2003) hasta una simple etapa de dilución de muestra aplicada por Fillatre *et al.* para el análisis de AE de naranja (Fillatre, Rondeau, Daguin, & Communal, 2016).

1.5.5.1. Efluentes

En el caso de los efluentes o aguas residuales industriales generados en los packings cítricos, para el análisis de los pesticidas que eventualmente pueden estar presentes se reporta principalmente el empleo de extracciones líquido-líquido, SPE o simplemente dilución de la muestra de agua. La EPA en su método 622 para determinación de pesticidas OP en aguas residuales municipales e industriales indica una extracción líquido-líquido utilizando diclorometano. Sin embargo esta técnica presenta algunas desventajas respecto a la SPE, debido a que se utilizan mayores volúmenes de solvente orgánico, además de que los factores de concentración del SPE generalmente permiten llegar a menores límites de cuantificación. En Irlanda, se analizaron 204 muestras de aguas residuales colectadas entre 2011-2012 donde 13 pesticidas se extrajeron con SPE en cartuchos poliméricos que contenían grupos funcionales hidrofílicos y lipofílicos capaces de retener pesticidas con diversas propiedades físico-químicas. Los límites de detección del método fueron de 1 ng mL^{-1} (Jones, Kinsella, Forde, Furey, & Regan, 2017).

Por otro lado, un método de cromatografía líquida con detector de fluorescencia para determinar el TBZ y 2-fenilfenol en aguas residuales ha sido reportado por Peris-Vicente. La muestra se inyectó directamente sin ningún tratamiento adicional a la filtración. El procedimiento se aplicó para el análisis de aguas residuales de plantas

empacadoras de cítricos, canaletas agrícolas, entre otras (Peris-Vicente, Roca-Genoves, Tayeb-Cherif, & Esteve-Romero, 2016).

1.6. Curvas de disipación

Las regulaciones internacionales son cada vez más restrictivas, y los Límites Máximos de Residuos (LMR) de los pesticidas se revisan y actualizan periódicamente. Por esta razón, las Buenas Prácticas Agrícolas (BPAs) deben adaptarse en consecuencia. Un factor clave para el cumplimiento de BPAs es el estudio de las tasas de disipación de los pesticidas para establecer intervalos seguros antes de la cosecha, dando lugar a estrategias eficientes de control de plagas y garantizar el bienestar de los consumidores. En el caso de la etapa de precosecha, el tiempo entre la última aplicación del producto hasta alcanzar una concentración de residuo de pesticida menor al LMR se conoce como periodo de carencia o intervalo pre-cosecha (PHI, del inglés pre-harvest interval) (Dong, et al., 2018). Las reglamentaciones para los LMRs requieren un PHI bien conocido para asegurar la disipación de los pesticidas por debajo del LMR propuesto en el momento de la cosecha (Karmakar & Kulshrestha, 2009).

La disminución de la concentración de residuos a lo largo del tiempo se puede representar gráficamente en forma de una curva de disipación. Los procesos de disipación de pesticidas en las plantas dependen de una combinación de factores como las propiedades fisicoquímicas de la sustancia (Farha, Abd El-Aty, Rahman, Shin, & Shim, 2016), características de la planta (Katagi, 2004), y condiciones ambientales: temperatura, viento, luz solar y exposición a la lluvia; esos factores varían a través de cada región geográfica donde se encuentra la plantación (Navarro, Oliva, Navarro, & Barba, 2001) y de las cuales la temperatura juega un papel predominante (Katagi, 2004). La cinética de la descomposición de pesticidas en los cultivos tratados depende en gran medida de varios factores, tales como: modo de acción, tipo de formulación y tecnología de aplicación, entre otros (Rahman, et al., 2015). Además, la vida media ($t_{1/2}$) puede diferir entre los tipos de plantas (árboles, cereales, cultivos de raíces / tubérculos, etc.) así como entre componentes, como hojas (superficie), pulpa de fruta (interior) y raíces (interior, bajo tierra) (Fantke, Gillespie, Juraske, & Jolliet, 2014).

El conocimiento preciso de la cinética de degradación de los pesticidas desempeña un papel clave en el establecimiento de un período seguro de consumo en relación con los LMR permitidos para cada combinación pesticida-producto. Curiosamente, la mayoría

de los estudios donde se basó la propuesta de LMR en frutas y verduras para pirimetanil (fungicida comúnmente usado en la citricultura) por parte de la Comisión Conjunta de Residuos de Pesticidas de FAO/OMS, son informes confidenciales de las compañías de agroquímicas y no publicados (Funk, 2007). Idéntica situación se observa con muchos otros principios activos. Nuevos principios activos se introducen continuamente en el mercado, pero rara vez se conocen las características de su disipación en las condiciones agroclimáticas del país donde se venderán. Como consecuencia, muchas veces los datos detallados de disipación de pesticidas no son de dominio público, rara vez se generan en el país y por lo tanto, su ajuste a esa realidad es incierto y debe ser entonces estudiado para proteger la producción del país y darle seguridad a los exportadores por un lado y a los consumidores por el otro.

La determinación del tiempo de carencia se logra mediante experimentos realizados al nivel de campo y en condiciones semejantes a las existentes en las zonas de producción agrícola, para que los resultados sean representativos de la realidad existente en cada caso.

Varios estudios han investigado la disipación de los pesticidas más aplicados en la producción de cítricos bajo condiciones de campo. Algunos trabajos incluyen el análisis de insecticidas como imidacloprid en limón (Phartiyal & Srivastava, 2014) o curvas de declinación de clorpirifos etil a partir de diferentes formulaciones aplicadas en naranja (Montemurro, Grieco, Lacertosa, & Visconti, 2002). También se han estudiado los comportamientos de disipación de forclorfenuron y spiroadiclofen-piridaben en cítricos en China (W. Chen, et al., 2013; Sun, Zhu, Pang, Zhou, & Jiao, 2016).

En lo que refiere a poscosecha, se han realizado estudios del efecto del almacenamiento sobre el decaimiento de distintos activos. Al igual que en la etapa de precosecha, luego de aplicado un pesticida sobre la fruta, se establecen intervalos de poscosecha, que se definen como el tiempo entre la aplicación y el consumo del alimento al llegar a destino (Ferrucci, 1997). Respetar estos tiempos de espera, asegura que la concentración de los residuos de pesticidas no superen los LMRs.

En el caso de las estrobirulinas, un estudio del comportamiento de kresoxim metil y trifloxistrobina en cáscara y pulpa muestra que los residuos encontrados en cáscara disipan en un 97 % en 15 días, mientras que el remanente en la pulpa alcanza concentraciones menores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ 9 días posaplicación. En este trabajo se aplicó por

inmersión (3 min) dosis de 100 y 167 mg L⁻¹ de una mezcla de los activos y la fruta se almacena en bolsas de plástico (Zhu, Dai, Fang, & Zhu, 2013).

En Italia, D'Aquino y colaboradores estudiaron el efecto de la temperatura en la concentración, decaimiento y control que ejerce pirimetanil sobre *P. italicum*. Se encontró que las tasas de disipación fueron insignificantes durante el almacenamiento de naranjas Salustiana y Torocco (D'Aquino, et al., 2006). Este resultado es comprobado en Uruguay, donde, sobre mandarinas Clementinas almacenadas a 4 °C no se evidenció disipación de dicho fungicida. En el mismo estudio, la disipación de 2-fenilfenol y de imazalil aplicado en cascada y en cera en la línea de packing y fue evidenciada bajo las condiciones del ensayo (Besil, et al., 2016).

1.7. Efluentes cítricos

1.7.1. Generación de efluentes y reglamentación

La aplicación de los pesticidas en la cadena citrícola con los fines antes descriptos, necesita por otro lado un estricto seguimiento en lo que respecta al posterior tratamiento en los efluentes de los packings y de la industria. El ciclo de cada uno de los pesticidas utilizados debe ser monitoreado de forma de asegurar su inocuidad en su destino final.

Específicamente, las aguas residuales de la industria de envasado de frutas constituyen una importante fuente de contaminación por pesticidas. Se ha reportado la ocurrencia de imazalil, tiabendazol, pirimetanil en las aguas de las plantas de empaque de cítricos (Peris-Vicente, Marzo-Mas, Roca-Genovés, Carda-Broch, & Esteve-Romero, 2016). En ausencia de métodos de depuración efectivos, se descargan en las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales o se extienden a la tierra (Karas, et al., 2015; Sánchez Pérez, Carra, Sirtori, Agüera, & Esteban, 2014). En nuestro país, por lo general, los efluentes de la industria son tratados mediante distintos mecanismos que buscan la eliminación de la materia orgánica presente en el efluente, de manera de cumplir con lo establecido en el Decreto 253/79 para el vertido de efluentes a cursos de agua. El parámetro medido para este propósito, es la demanda bioquímica de oxígeno (DBO). Los tratamientos empleados habitualmente no son adecuados para lograr una eliminación completa de los pesticidas que contienen. Estos compuestos son relativamente persistentes y mantienen su toxicidad a concentraciones bajas afectando organismos no blanco (Verdisson, Couderchet, & Vernet, 2001) e interaccionando en

algunos casos (ej. propiconazol) sinérgicamente con insecticidas (Iwasa, Motoyama, Ambrose, & Roe, 2004). En este sentido, en los últimos años se ha realizado un abordaje multidisciplinario al tema. Se han presentado estrategias como el uso de arcillas y organoarcillas para la retención de ciertos compuestos (Cruz & Alcalá, 2007), el uso de lodos activados como etapa indispensable para bajar la carga de estos contaminantes en efluentes de industrias así como también la nano-remoción con Fe_3O_4 (Vitta Brito, Fernandez, Moliner-Martínez, & Campíns Falco, 2014) y adsorción (García- Portillo, et al., 2004) y de esta forma, directamente se baja la cantidad remanente de los pesticidas sobre cursos de agua.

En nuestro país, la legislación vigente incide directamente sobre la existencia de plantas de tratamientos de efluentes industriales, pero no contempla la evaluación de la degradación de pesticidas y solamente se limita a establecer límites máximos de residuos de unos pocos pesticidas: aldrin más dieldrin; clordano, DDT, endosulfan, endrin, heptacloro más heptacloro epox, lindano, metoxicloro, mirex, 2,4 D; 2,4,5 T; 2,4,5 TP y paration. Sin embargo, las características específicas de las aguas industriales, por su heterogeneidad y por la toxicidad inherente de los contaminantes que están contenidos en ellas, hacen necesaria una gestión por separado empleando tratamientos específicos en función del tipo y carga de contaminante. Es necesario el desarrollo de metodologías de bajo costo, efectivas y amigables con el ambiente para eliminar estos contaminantes en el mismo lugar donde se generan y remediar el efluente peligroso. Uno de los manejos comunes para eliminar al menos la contaminación biológica, es la cloración de los efluentes. Lamentablemente, al reaccionar el cloro con materia orgánica que se desecha se pueden generar compuestos organoclorados, potencialmente tóxicos como los trihalometanos (Henry & Heinke, 1999). Esta práctica elimina además la flora bacteriana que podría degradar compuestos químicos peligrosos. Como respuesta a esta problemática se exploran alternativas de manejo “verdes” que no agregan mayor contaminación al ambiente, como por ejemplo procesos de remediación usando organismos vivos (bioremediación) (Karas, et al., 2015; Omirou, et al., 2012), o mediante el empleo de energía solar junto con catalizadores (remediación por fotocatalisis) (Jiménez-Tototzintle, Oller, Hernández-Ramírez, Malato, & Maldonado, 2015; Miralles-Cuevas, et al., 2017) así como también con el uso de ozono, biofiltros, entre otras estrategias.

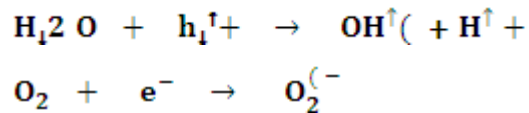
1.7.2. Fotocatálisis para la remediación de efluentes

La eliminación de aquellos compuestos refractarios a su eliminación por microorganismos se puede llevar a cabo mediante fotocatalisis heterogénea (García-Gómez, Gortáres-Moroyoqui, & Drogui, 2011). Esta metodología se presenta como una estrategia catalítica de oxidación avanzada muy prometedora. Su eficiencia es notoria en el tratamiento de sustancias difícilmente biodegradables, siendo un claro ejemplo del empleo con éxito de catalizadores sólidos en el tratamiento y degradación de concentraciones moderadas de contaminantes orgánicos.

Entre las técnicas no convencionales para el tratamiento de aguas se encuentran los Procesos de Oxidación Avanzada (POA), que permiten la conversión de la materia orgánica en compuestos inorgánicos estables como agua, dióxido de carbono y sales. Los POA se definen como procesos que involucran la generación y uso de especies transitorias de alto poder oxidante, principalmente el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), altamente efectivo en la oxidación de la materia orgánica. Estos procesos tienen ventajas frente a los métodos convencionales: (i) transforman químicamente al contaminante, (ii) convierten contaminantes que resisten otros métodos en productos tratables por métodos más económicos como el biológico y (iii) permiten incluso tratar contaminantes en muy baja concentración (Domènech, Jardim, & Litter, 2001). En general los POA pueden aplicarse al tratamiento de aguas residuales, aunque también se han aplicado al tratamiento de aguas subterráneas, a la remediación de suelos, la producción de agua ultrapura, el tratamiento de compuestos orgánicos volátiles y control de olores (Cominellis, et al., 2008), y pueden usarse solos o combinados, ya sea entre ellos o con métodos biológicos u otros métodos convencionales.

La fotocatalisis heterogénea es uno de los POA más utilizado y se basa en la absorción de fotones ($h\nu$) por un material semiconductor donde se promueve el pasaje de electrones de la banda de valencia a la banda de conducción. Si la energía del fotón es mayor que la energía de la banda prohibida o band gap (E_{bg}), la absorción del fotón lleva a un electrón a la banda de conducción (e^-) y genera un hueco en la banda de valencia (h^+). Los pares electrón-hueco pueden ser transferidos a sustancias absorbidas en la superficie del semiconductor y promover reacciones redox. En medio acuoso el agua y los iones hidroxilo (OH^-) generan radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) por transferencia de

sus electrones hacia los huecos foto-generados en la banda de valencia y el oxígeno disuelto actúa como aceptor final de electrones produciendo radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Los radicales OH^{\bullet} y $O_2^{\bullet-}$ tienen una elevada reactividad química y pueden promover la transformación de otras sustancias presentes en solución.



En fotocatalisis heterogénea los catalizadores consisten en óxidos de metales de transición. En particular el más utilizado es el dióxido de titanio (TiO_2) ya que presenta una mayor actividad fotocatalítica, no es tóxico, es estable en solución acuosa y no es costoso. Los catalizadores generalmente son utilizados en forma de polvo en suspensión en el medio de reacción. Esto presenta dificultades asociadas con la recuperación del catalizador después del proceso catalítico. Para evitarlo el catalizador puede ser inmovilizado sobre la superficie de un material sólido como vidrio, carbón activado o metales, utilizando diferentes técnicas para la inmovilización como Sol-gel, tratamiento térmico, depósito de vapor químico, deposición electroforética y anodización (Shan, Ghazi, & Rashid, 2010). El TiO_2 absorbe radiación de longitudes de onda menores a 400 nm, por lo que la fotocatalisis heterogénea empleando este material utiliza luz ultravioleta (UV) como principal fuente de energía (Malato, Blanco, Vidal, & Richter, 2002). En los últimos años se han realizado esfuerzos para aplicar la fotocatalisis heterogénea con radiación solar como fuente de energía (Carbajo, et al., 2016; Nair, Bharadwaj, & Samdarshi, 2016). Esto permite disminuir costos debidos a la irradiación del sistema y aprovechar una energía limpia y disponible. En lo que respecta a la remediación de efluentes agroindustriales, se ha reportado recientemente el uso en forma conjunta de un biotratamiento y fotocatalisis solar usando TiO_2/H_2O_2 para degradar imazalil, tiabendazol y acetamiprid (Jiménez-Tototzintle, et al., 2015).

La introducción a la temática de la tesis y su marco conceptual, nos muestra la relevancia y el vínculo indisoluble entre la cadena de producción citrícola y el uso de pesticidas. El estudio de la dinámica de los residuos de pesticidas resultantes en las distintas etapas de la cadena productiva, su distribución en los productos procesados y los compartimentos ambientales es crítico para comprobar el cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas, la sustentabilidad del sistema productivo global y la inocuidad de los alimentos que resulten. Para lograrlo, la instrumentación de alta sensibilidad junto a exhaustivos métodos de preparación de muestra, permiten trabajar con metodologías analíticas con límites de cuantificación a nivel de trazas. Los datos que se obtengan servirán para corroborar el cumplimiento de los límites máximos de residuos y plantear estrategias de remediación de los residuos de pesticidas generados en los packing cítricos. De lo antes expuesto se plantean los siguientes objetivos para este trabajo de tesis.

2. OBJETIVOS DE LA TESIS

2.1. Objetivo general

- Estudiar la dinámica de los residuos de pesticidas en la cadena citrícola mediante el desarrollo de metodologías analíticas multi-residuo para su determinación en fruta fresca, jugos concentrados, aceite esencial y efluentes cítricos.

2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar y validar metodologías analíticas multi-residuo para las diferentes matrices de la cadena citrícola
 - Estudiar la disipación de pesticidas seleccionados durante la precosecha y poscosecha en diferentes variedades.
 - Estudiar la presencia de residuos de pesticidas en aceites esenciales y jugos concentrados.
 - Estudiar el uso de procesos de oxidación avanzada para remediar efluentes.
-

CAPÍTULO I: Validación de metodologías analíticas para el análisis de residuos de pesticidas en matrices cítricas. Introducción

Las frutas cítricas y sus productos derivados están presentes en todo el mundo. Para preservar la calidad de la fruta y evitar el ataque de plagas, el cultivo de cítricos comúnmente implica el uso de agroquímicos y los residuos de pesticidas permanecen en las diferentes especies de cítricos. Estos residuos pueden comprometer la salud humana, pero también pueden obstaculizar el comercio internacional, lo que obliga a controlar los residuos remanentes en frutas y productos derivados de la producción de la cadena de cítricos. La omnipresencia de los residuos de pesticidas en los productos cítricos se señaló en un total de 8920 cítricos analizados en Sudáfrica donde un 84 % y un 14 % de las muestras contenían fungicidas imidazol-bencimidazol e insecticidas organofosforados, respectivamente (Mutengwe, Chidamba, & Korsten, 2016). En China, los residuos de imazalil y tiabendazol se determinaron en 19 muestras de naranja y 21 de mandarina utilizando UHPLC-QToF-MS y búsqueda en biblioteca automatizada de MS/MS (Z. Wang, et al., 2016).

Se han desarrollado varias metodologías analíticas para la determinación de residuos de pesticidas en cítricos (Soler, et al., 2005; Sun, Pang, Jiao, Zhao, & Zhou, 2015; A. Uclés, et al., 2015; Valenzuela, Lorenzini, Redondo, & Font, 1999), pero solo unos pocos estudian el limón como matriz. La mayoría de estos trabajos se ocupan del análisis de pesticidas como imazalil, tiabendazol, carbendazim y 2-fenilfenol (Boeris, et al., 2014; Navickiene & Ribeiro, 2002; Prousalis, Polygenis, Syrokou, Lamari, & Tsegenidis, 2004; Yamazaki & Ninomiya, 1996). En todos los casos, se señala la complejidad de los cítricos como matriz analítica para el análisis de residuos de pesticidas, ya sea mediante determinaciones de LC-MS o GC-MS (Besil, Cesio, Heinzen, & Fernandez-Alba, 2017; Niell, et al., 2017).

La producción de la cadena citrícola involucra la elaboración de jugo fresco, jugo concentrado, aceites esenciales y pellets, entre otros productos. La base para la producción de jugo concentrado es aumentar el contenido de materia seca y disminuir el contenido de agua de los jugos, a fin de prolongar la vida útil y mejorar las propiedades de transporte y almacenamiento (Horváth-Kerkai & Stéger-Máté, 2012). A escala industrial, los aceites esenciales se obtienen como un subproducto de la producción de

jugo (Arce & Soto, 2008). La presencia, distribución y persistencia de residuos de pesticidas en estos subproductos se deben al proceso de producción y a las propiedades físico-químicas de los compuestos (Montti, et al., 2013).

En el caso de los derivados de los cítricos, se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación de residuos de pesticidas en jugos de cítricos (Boeris, et al., 2014; Dreassi, et al., 2010; Rizzetti, et al., 2016), mientras que pocos trabajos informan metodologías para la determinación de residuos de pesticidas en jugo concentrado de limón (Sannino, 2007; Sannino, et al., 2004). Por otro lado, los aceites esenciales (AE) se extraen de la cáscara de los cítricos y la concentración de pesticidas lipofílicos es mucho mayor que la que se encuentra en la fruta (Barrek, et al., 2003). Los residuos de pesticidas en los AE son ampliamente estudiados por diferentes investigadores que han encontrado en los mismos, la presencia de residuos de organoclorados (Saitta, et al., 2000) y organofosforados (Alves, et al., 2012), entre otros. Saitta y su grupo publicaron en 2012 (Saitta, et al., 2012) una revisión de la presencia y evolución de pesticidas y plastificantes en aceites esenciales italianos según el tipo de AE cítrico. Las preparaciones de muestra desarrolladas para AEs son diversas; desde la extracción sólido-líquido (Barrek, et al., 2003) hasta una simple etapa de dilución de la muestra como la aplicada por Fillatre *et al.* (Fillatre, et al., 2016).

Los objetivos planteados en este capítulo son i) ajustar y re-validar el método AcOEt para el análisis de imazalil y 2-fenilfenol en mandarina y naranja; ii) desarrollar y validar de metodología analítica para el análisis de pesticidas aplicados en instancias de campo en mandarinas, naranjas y limones; iii) incorporar pesticidas de poscosecha en la metodología validada en el punto i) para la matriz limón; iv) desarrollar y validar una metodología analítica para el análisis de pesticidas aplicados en instancias de campo y poscosecha en jugo concentrado y aceite de limón.

3.2. Frutas: mandarina, naranja y limón

3.2.1. Experimental

Reactivos y aparatos.

Acetonitrilo (MeCN) y acetato de etilo (EtOAc) de calidad para cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se compraron en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y Pharmco Products Inc. (Brookfield, CT, EE. UU.), respectivamente. Para la obtención

de agua desionizada, se usó un sistema de purificación de agua ultrapura EASYpure RoDi de Thermo Scientific (Marietta, OH, EE. UU.). Ácido fórmico (HCOOH) p.a., 88 % se obtuvo de Macron Chemicals (Países Bajos). Cloruro de sodio p.a (NaCl) se obtuvo de Carlo Erba (Italia). Sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄) se adquirió en Scharlau (Barcelona, España). Se utilizó citrato de sodio dihidratado de J. T. Mallinsonck Inc. (Phillipsburg, NJ, EE. UU.). El acetato de sodio se obtuvo de Carlo Erba (Italia). El citrato di-sódico sesquihidratado se adquirió en Scharlau (Barcelona, España). El ácido acético glacial (HAc) es de Dorwill (Argentina), los sorbentes RP-C18, amina primaria y secundaria (PSA, 40-60 µm) y carbón negro grafitizado (GCB, malla 120-400) proceden de Scharlau (Barcelona, España).

Los estándares de referencia de alta pureza (> 98 %) se adquirieron a Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Alemania) y se almacenaron a -40 °C. Se prepararon soluciones patrón de 2000 µg mL⁻¹ disolviendo los estándares en acetonitrilo o acetato de etilo y se almacenaron en viales de vidrio a -40 °C. Las soluciones de los estándares de trabajo se prepararon diluyendo las soluciones madre con acetonitrilo.

Un baño de ultrasonidos Wisd WUC-A03H de Daihan Scientific Co. Ltda. (Corea), una centrífuga SL16 de Thermo IEC HN-SII (Langensfeld, Alemania), un mezclador vortex Wisd VM 10 y un evaporador Turbovap® Biotage LV (Estados Unidos) se emplearon durante la etapa de preparación de la muestra.

Sistemas instrumentales

GC-MS

Los residuos de pesticidas compatibles con cromatografía gaseosa se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases Agilent HP6890 (GC) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas HP5973 (MS) que funciona en modo de ionización por impacto de electrones (IE) con una energía ionizante de 70 eV. Las temperaturas de la fuente y cuadrupolo fueron de 230 °C y 150 °C, respectivamente, y la temperatura de la interfaz fue de 280 °C. Las muestras se inyectaron en modo *splitless* a 280 °C con un volumen de inyección de 1 µL. Helio con una pureza del 99,999 % fue el gas portador. La separación por GC se realizó utilizando una columna capilar de sílice fundida HP-5MS UI de 30 m x 0,25 mm de diámetro interior y un espesor de película de 0,25 µm (Agilent, Palo Alto, CA, EE. UU.). La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: desde 120 °C (se mantiene 1

min), aumentó a 190 °C a una velocidad de 10 °C min⁻¹ (se mantiene 1 min), luego a 250 °C a 5 °C min⁻¹ (se mantiene 5 min), luego hasta 280 °C (36,5 min total de análisis). Se utilizó la versión D.03.00.611 de ChemStation para la adquisición y análisis de datos. Los parámetros cromatográficos y del espectrómetro de masas que fueron determinados, se presentan en la Tabla 3.1.

Pesticida	tR (min)	m/z
2-fenilfenol (OPP)	8,4	169, 170 , 141
Imazalil	17,6	173, 215 , 217
<i>Trifenilfosfato (TPP) EI</i>	21,0	325, 326 , 327

Tabla 3.1. Pesticida, tiempo de retención (tR) e iones seleccionados para el análisis en GC-MS. IE: estándar interno

LC-MS/MS

Se utilizó un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 LC (Santa Clara, CA) acoplado a un sistema 4000 QTRAP® LC-MS/MS de SCIEX (Concord, Canadá) programado para realizar el análisis LC-MS/MS en el modo MS-MS. La separación cromatográfica se realizó en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) a 20 °C. Se aplicaron tres métodos instrumentales para el análisis de los pesticidas. Los métodos 1 y 2 utilizaron gradientes de agua con 0,1 % de HCOOH (A) y acetonitrilo (B) y operaron en modo de ionización por electrospray en modo positivo y negativo, respectivamente. El método 1 comenzó con el 70 % de la fase móvil A, que se redujo al 0 % en 12 min (retención de 3,50 min) y luego volvió a subir al 70 % en 1,50 min (retención de 4 min) para un tiempo total de ejecución de 21 min, mientras que el método 2 comenzó con el 70 % de la fase móvil A (retención de 1 minuto), se redujo al 0 % en 3,50 min y luego volvió a subir al 70 % en 2,50 min (retención de 3 min) para un tiempo total de ejecución de 10 min.

Por otro lado, para la determinación de las avermectinas, la composición de la fase móvil fue (C) acetato de amonio 10 mM y (D) metanol con el fin de formar el aducto de [M+NH₄]⁺ con la fase móvil y permitir su detección. El método comenzó con el 50 % de la fase móvil C (retención de 1 min) que luego se redujo al 0 % en 3 min (retención de 2 min) y luego al 50 % de C en 4 min (retención de 2 min) para un tiempo total de ejecución de 12 min. En los 3 métodos, el volumen de inyección fue de 5 µL y la velocidad de flujo fue de 0,6 mL min⁻¹.

La detección de pesticidas se realizó utilizando el modo de monitoreo de reacciones

múltiples (MRM). Las condiciones de MRM óptimas para cada compuesto se optimizaron usando infusión directa del estándar a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ en MeCN: H₂O 0,1 % de ácido fórmico o MeOH: H₂O acetato de amonio 10 mM, respectivamente. En todos los casos, se aplicó electropulverización en modo positivo (ESI +). El voltaje de ionización fue 5000 V y la temperatura de la fuente fue 500 °C. El nitrógeno se usó como gas de cortina a 20 psi y el gas del nebulizador fue aire a 50 psi. Los ajustes de MS/MS (iones precursores, potencial de desintegración, iones del producto y energía de colisión) utilizados en este trabajo se enumeran en la Tabla 3.2. Para adquirir y procesar los datos obtenidos se utilizó el software Analyst versión 1.5.1 de AB SCIEX.

Pesticida por LC-MSMS	Familia química	LMR <i>Codex Alimentarius</i> (mg kg ⁻¹)	LMR Unión Europea (mg kg ⁻¹)	<i>t_R</i> (min)	ESI (+/-)	Ion Precursor (<i>m/z</i>)	Ion Producto (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)
Carbendazim	Benzimidazol	(ndef)	0,7; 2 (n)	2,5		192,1	160,0	80	22,8
							132,1		41,9
Tiabendazol	Benzimidazol	7	7	2,6	(+)	202,1	175,1	100	34
							131,1		42,9
Imidacloprid	Neonicotinoide	1	1	5,6	(+)	256,1	209,1	86	22
							175,1		23
Imazalil	Imidazol	5	5	6,1	(+)	297,0	159,0	130	32
							255,1		23
2,4-D	Ácido Fenoxi-carboxílico	1	1	7,3	(-)	219,0	160,9	-21	-14
							124,9		-34
Fludioxonil	Fenilpirrol	10	10	7,8	(-)	247,0	125,9	-65	-42
							179,9		-40
Ditianona	Quinona	(ndef)	1; 3 (m)	8,1	(-)	294,9	250,8	-130	-42

Difenoconazol	Triazol	0,6	0,6	12,9	(+)	406,0	$\frac{251,1}{337,0}$	90	$\frac{37}{21}$
Piraclostrobina	Estrobirulina	2	1; 2 (n)	13,4	(+)	388,1	$\frac{194,2}{163,1}$	67	$\frac{17}{39}$
Trifloxistrobina	Estrobirulina	0,5	0,5	13,8	(+)	409,3	$\frac{186,0}{206,1}$	50	$\frac{22}{18}$
Avermectina B1a	Avermectinas	0,02	0,04 (expresado como Avermectina B1a)	9,6	(+)*	890,5	$\frac{305,4}{567,3}$	75	$\frac{34}{19}$
Avermectina B1b	Avermectinas	(ndef)	Avermectina B1a)	9,2	(+)*	876,6	$\frac{553,3}{291,5}$	73	$\frac{19}{33}$
Pesticida por GC-MS					Modo de ionización	Ion cuantificador	Ion Ref	Ion Ref	
2-fenilfenol	Fenol	10	5; 10 (m)	11,7	EI	169	170	115	

Tabla 3.2 Pesticida, familia química, límite máximo de residuo (LMR) establecido por *Codex Alimentarius* y Unión Europea [(m) mandarina, (n) naranja, ndef: no definido], tiempo de retención (tR), modo de ionización (* formación de aducto con NH₄) ión precursor, ión producto, potencial de desintegración (DP) y energía de colisión (CE) para cada analito por LC y ion de cuantificación (Ion Cuant) y iones de referencia (Ion Ref) para pesticidas analizados por GC-MS (Shimadzu).

Preparación de muestra.

Procesamiento de la muestra

El procesamiento de muestra se realizó siguiendo las directivas del *Codex alimentarius* en lo que se refiere a la parte del alimento a analizar (ver sección 1.5.1). Cada fruta seleccionada, se cortó en cuatro pedazos, se seleccionaron los dos pedazos opuestos para el análisis, mientras que el resto se descartó. El procesamiento

La muestra de laboratorio se compuso, homogeneizó y almacenó en bolsas de polietileno individuales a -18°C hasta la extracción.

Método AcOEt

Se pesaron 10 g de muestra homogeneizada en un tubo de centrífuga de teflón de 50 mL. Se añadió EtOAc (10 mL) y el tubo se agitó manualmente durante 1 minuto. Posteriormente, se añadieron 8 g de MgSO_4 anhidro y 1,5 g de NaCl. El tubo se agitó vigorosamente a mano durante 1 minuto, se colocó en un baño de ultrasonido durante 15 min y se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm. Después de la separación de fases, se recogieron 2 mL de la fase orgánica en un matraz de 4 mL. Los extractos se concentraron a sequedad bajo flujo de N_2 en un baño de agua a 40°C . El residuo se disolvió en 1 mL de MeCN para su introducción al LC-MS/MS. En el caso de trabajar con GC-MS se toma una alícuota de 2 mL del sobrenadante y se transfiere a un vial de 4 mL, el que se lleva a sequedad bajo corriente de N_2 . El extracto se retoma con TPP a 1 mg L^{-1} en AcOEt.

Método AOAC

Se pesa 10g de la muestra homogeneizada en un tubo de centrifuga de 50 mL. Se agrega 10 mL de MeCN al 1 % HCOOCH_3 y se agita manualmente durante 1 min. Posteriormente, se agregan 4 g de MgSO_4 anhidro y 1 g de NaOAc. Se agita durante 1 min y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. Se toma una alícuota de 2 mL del sobrenadante y se transfiere a un tubo de d-SPE conteniendo 300 mg de MgSO_4 y 100 mg de PSA. Se lleva al Vortex por 30 s y posteriormente se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. Se toma 1 mL del sobrenadante y se realiza la inyección en el sistema LC-MS/MS.

Procedimiento de fortificación

En todos los casos, el procedimiento de fortificación consistió en agregar la cantidad de pesticida necesaria para cada nivel de concentración a partir de las soluciones de trabajo preparadas en cada uno de los tubos de extracción en donde la muestra fue mezclada con una espátula. La extracción se realizó 15 min después de realizada la fortificación. Este procedimiento fue empleado para todas las recuperaciones realizadas sobre fruta fresca y en jugo concentrado.

Validación del método

Para garantizar que el método sea adecuado para la determinación de los pesticidas en estudio en las distintas frutas cítricas se evaluaron para cada analito, la veracidad, precisión, límite de cuantificación (LOQ), linealidad y efecto matriz (EM). El EM se determinó para cada analito como:

$$EM = \left(\frac{\text{pendiente (calibración en matriz)}}{\text{pendiente (calibración en solvente)}} - 1 \right) \times 100$$

Los porcentajes de recuperaciones se evaluaron a 0,05, 0,2 y 0,5 mg kg⁻¹ para el análisis de OPP e imazalil en mandarinas ($n=3$) y a 0,01, 0,1 y 0,2 mg kg⁻¹ para la determinación de los pesticidas de chacra en mandarina, limón y naranja ($n=5$). Se determinaron los LOQ, definidos como el nivel de concentración más bajo que cumple con los criterios de rendimiento del método de veracidad y precisión para cada analito. La linealidad en el solvente y la matriz también se evaluaron mediante curvas de calibración.

3.2.2. Resultados y discusión

3.2.2.1. *Análisis de imazalil y 2-fenilfenol en mandarina por GC-MS*

El análisis de imazalil y 2-fenilfenol se ajustó en mandarina por GC-MS. La extracción se realizó con el método de AcOEt que se describe en la sección 3.2.1. Esta metodología analítica había sido validada previamente para el análisis de 44 pesticidas en mandarinas. En este trabajo se verifica el desempeño del método para utilizarlo posteriormente en la sección 5.4 del Capítulo III. No se encontraron interferencias para la determinación de los analitos en estudio en la matriz estudiada. En la Figura 3.1 se presenta la superposición de ión fragmento utilizado para la cuantificación de imazalil

en la matriz (libre de pesticida) y en la matriz fortificada.

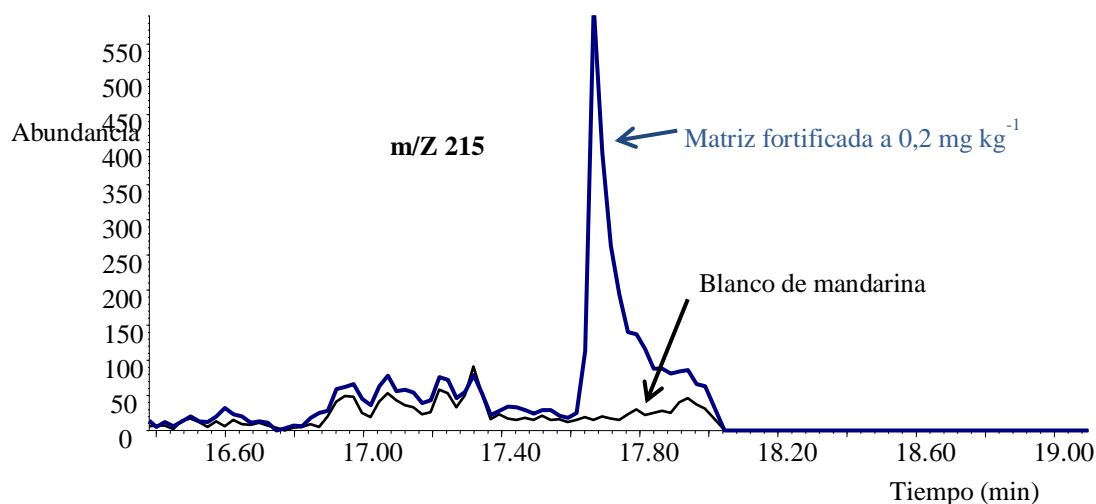


Figura 3.1. Superposición de m/z 215 escaneado en una muestra blanco de mandarina (trazo negro) y en una muestra fortificada (trazo azul) al nivel de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de fruta.

Veracidad y precisión

Se estudiaron tres niveles de recuperación $0,05$; $0,2$ y $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. En la Tabla 3.3 se muestran los porcentajes de recuperación y las DSR para cada pesticida, donde se puede observar que todos cumplen con el criterio establecido en el documento SANTE. Las recuperaciones variaron entre $73,3$ y $120,6 \%$ con DSR menores a 20% . Las curvas de calibración en solvente y en matriz fueron lineales para los 2 analitos en estudio. Todos los coeficientes de correlación (R^2) son mayores a $0,99$. Los rangos lineales oscilan entre $0,01$ y $1,50 \text{ mg L}^{-1}$.

	Nivel de concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						EM (%)
	0,05		0,2		0,5		
Pesticida	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)	
Imazalil	73,3	4,6	107,7	4,2	76,0	4,6	5,1
OPP	85,3	3,6	82,4	2,9	88,8	0,8	7,8

Tabla 3.3. Porcentajes de recuperación (% Rec), porcentaje de desviación estándar relativa (% DSR) y efecto matriz (EM) para el análisis de imazalil y OPP por GC-MS.

3.2.2.2. Análisis de pesticidas de chacra en mandarina, naranja y limón por LC-MS/MS.

La recuperación promedio (%) y la desviación estándar relativa (%) de cada pesticida en mandarina, naranja y limón se muestran en la Tabla 3.4 y para todos los pesticidas, los

parámetros evaluados cumplen los criterios de la guía SANTE (European Commission, 2015). El LOQ para todos los analitos en ambas matrices fue de 0,01 mg kg⁻¹. Estos valores son significativamente más bajos que los LMR establecidos por la Unión Europea y el *Codex Alimentarius* (ver Tabla 3.2).

Pesticida	Naranja				Mandarina				Limón			
	Conc $\mu\text{g kg}^{-1}$											
	10		100		10		100		10		100	
	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)
Spinosad	76,7	10,2	74,1	4,1	86,5	3,9	98,3	15,9	79,2	7,8	68,2	6,9
Difenoconazol	86,6	5,1	87,1	5,3	71,8	8,0	88,7	7,4	88,2	2,1	77,5	5,8
Piraclostrobina	88,3	5,2	90,1	5,9	72,1	2,1	100,0	2,2	91,6	5,0	84,1	5,3
Imidacloprid	86,6	8,1	99,2	3,9	113,4	6,6	80,9	2,5	91,8	4,0	84,1	5,3
Abamectina	114,6	7,1	78,6	4,6	101,7	12,4	110,4	14,4	106,4	8,7	77,4	7,1

Tabla 3.4. Porcentajes de recuperación (% Rec), porcentaje de desviación estándar relativa (% DSR) abamectina, difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad en mandarina, naranja y limón con el método AcOEt analizados por LC-MS/MS

Se determinaron los efectos de la matriz (EM) para cada combinación de pesticida/fruta cítrica (naranja, mandarina y limón). En este trabajo, se estudió el efecto general comparando las pendientes de las curvas de calibración en la matriz y el solvente. Con el fin de minimizar el EM, se estudió la linealidad mediante una calibración matriz. Como consecuencia de la presencia de EM, el análisis cuantitativo correcto de los pesticidas en niveles traza puede verse seriamente comprometido (Besil et al., 2017). Con la excepción de spinosad e imidacloprid, los demás compuestos presentan un EM menor a 20 % para mandarina y naranja. En el caso de limón, los EM son más pronunciados. Estos pesticidas, cuando se analizaron a través de HRAMS, tuvieron poco o ningún efecto matriz, con la excepción del imidacloprid. Este hecho demuestra la gran influencia que el analizador de masas tiene en el EM y, por lo tanto, en la determinación del analito. Cuanto más precisa sea la determinación de masa, menores serán los efectos de la matriz. El método mostró una respuesta lineal para todos los analitos en un rango de concentraciones de 0,010 a 0,075 mg kg⁻¹ con residuos inferiores al 20 %, en las 3 matrices en estudio.

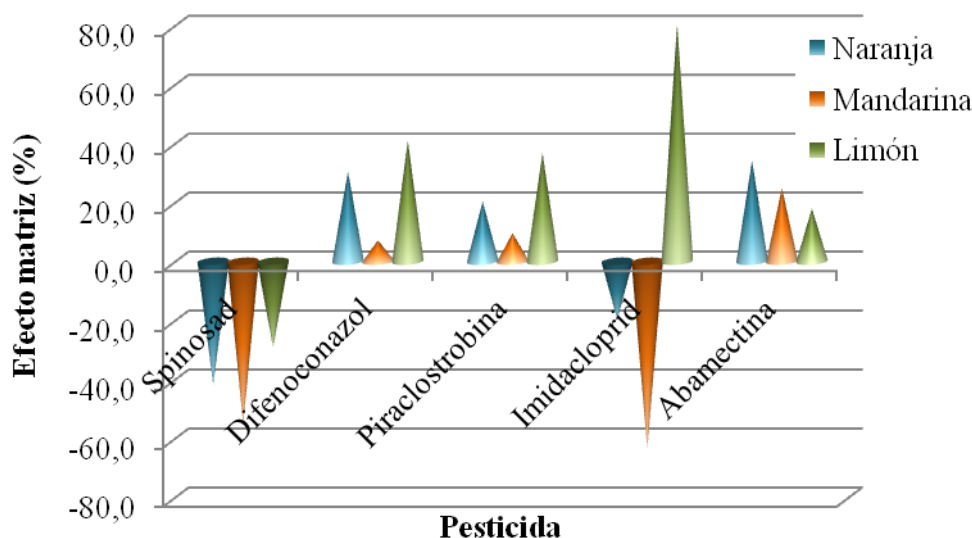


Figura 3.2. Efecto matriz (%) para abamectina, difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad en mandarina, naranja y limón con el método AcOEt en un LC-MS/MS

3.2.2.3. Ampliación del alcance de la metodología para análisis de pesticidas en limón por LC-MS/MS.

El método AcOEt validado previamente para el análisis de pesticidas utilizados en instancias de precosecha, fue evaluado para ampliar su alcance e incorporar pesticidas utilizados en la poscosecha de cítricos como imazalil, pirimetanil, procloraz, entre otros. Con tal fin, se utilizaron las condiciones instrumentales descritas anteriormente en la sección 3.2.1 sobre las cuales se optimizaron las condiciones del espectrómetro de masas para determinar los compuestos incorporados y que se presentan en negrita en la Tabla 3.2. Se utilizaron dos métodos cromatográficos (en el LC-MS/MS) debido a las características fisicoquímicas de los pesticidas seleccionados (métodos 1 y 2).

Para el análisis de residuos de pesticidas en fruta de limón, se evaluaron dos metodologías reportadas: AcOEt (Besil, et al., 2016) y QuEChERS AOAC 2007.01 (Lehotay, et al., 2007). El método EtOAc (validado previamente para el análisis de pesticidas de chacra –sección 3.2.2.2-) mostró recuperaciones para 3 de los 18 pesticidas estudiados en esta matriz, que no cumplían los criterios de requisitos del documento SANTE (recuperaciones de pesticidas entre 70 y 120 % y desviaciones estándar relativas (DSR) <20 %) (DG-SANTE, 2015). Imazalil, carbendazim y tiabendazol (familia química de imidazol y benzimidazol), cuyo pKa es 6,53, 4,2 y 4,73 (BCPC, 2012) respectivamente, no se recuperaron adecuadamente durante la etapa de extracción debido al bajo pH de la matriz. En el método QuEChERS AOAC, el pH de la matriz se estabiliza a través de un tampón generado *in situ* que permite la extracción cuantitativa de pesticidas susceptibles al bajo pH. Como consecuencia, se eligió el último método para su validación.

Se estudió la selectividad del método y no se encontraron iones interferentes con los de los pesticidas en la matriz blanco. Los porcentajes de recuperación y DSR a dos niveles de concentración (10 y 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y el efecto de matriz obtenido en LC-MS/MS para cada pesticida en estudio se presentan en la Tabla 3.5. Basado en los resultados de las curvas de calibración en matriz y en solvente, se puede concluir que se verifica un comportamiento lineal. El límite de cuantificación de todos los analitos estudiados fue de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Como era de esperarse, cuando se usa la interfaz de electrospray, los efectos de la matriz causan la supresión de la señal analítica para el 83 % de los compuestos estudiados. Sin embargo, el efecto de matriz observado para imidacloprid es la mejora de la señal con un valor de 96 %. Este último resultado esta en concordancia con un trabajo reciente reportado por nuestro grupo, en el que utilizando

LC-AHRMS-ToF, se encontró un valor positivo de 84 % para este compuesto en fruta de limón (Besil, et al., 2017).(véase cap.XX,pagYY de esta tesis)

Pesticida	Nivel de concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				EM (%)
	10 (n=5)		50 (n=5)		
	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)	
Boscalid	76,0	12,0	111,3	7,3	-15
Carbendazim	77,0	6,0	97,4	3,0	-47
Difenoconazol	117,3	12,8	107,0	4,0	-36
Fenhexamid	125,7	3,4	97,0	11,0	-6
Imazalil	111,0	10,0	113,7	5,4	-37
Imidacloprid	98,7	8,4	95,4	3,0	96
Iprodiona	98,5	5,8	113,6	6,9	-22
Procloraz	93,5	2,9	110,8	2,9	-10
Propiconazol	106,1	8,7	127,2	3,8	-25
Piraclostrobina	111,1	14,6	79,0	5,0	-39
Primetamil	99,0	4,9	106,9	2,5	-22
Espinosina A	87,6	1,6	109,7	2,0	-19
Epinosina D	109,2	2,5	105,8	4,4	-10
Tiabendazol	89,4	3,9	95,6	3,9	-67
Trifloxistrobina	99,7	3,6	115,3	3,5	5
2,4 D	92,1	6,7	102,6	5,8	19
Fludioxonil	126,4	2,8	115,4	2,8	-1

Tabla 3.5. Valores de porcentajes de recuperación (Rec%) y desviación estándar relativa (RSD%) para cada nivel de concentración utilizado durante la validación del método QuEChERS AOAC en limón.

Para demostrar la idoneidad del método validado durante el análisis de rutina, se analizaron muestras reales obtenidas a nivel local. Se estudiaron 6 muestras y se detectaron residuos de iprodiona ($0,040 \pm 0,020 \text{ mg kg}^{-1}$), boscalid ($0,24 \pm 0,12 \text{ mg kg}^{-1}$) y piraclostrobina ($0,11 \pm 0,060 \text{ mg kg}^{-1}$).

3.3. Jugo concentrado

3.3.1. Experimental

Reactivos y aparatos

Para la realización del análisis de jugo concentrado, se utilizaron los reactivos y aparatos descritos en la sección 3.2.1 de este capítulo.

Condiciones de funcionamiento LC-MS/MS

El análisis de HPLC-MS/MS se realizó con un HPLC Agilent 1200, acoplado a un triple

cuadrupolo API 4000 (4000 Q-TRAP ABSCIEX) bajo las condiciones descritas en el punto 3.2.1.

Preparación de la muestra

Para jugo concentrado, se evaluaron 3 metodologías de extracción basadas en las diferentes variaciones del método QuEChERS: original (M. Anastassiades, et al., 2003) y las versiones tamponadas (M. Anastassiades, Scherbaum, E., Tsdelen, B., Stajnbaher, D., 2007; Lehotay, et al., 2007).

Utilizando la versión original de QuEChERS, se pesaron 5 g de jugo concentrado en un tubo de 50 mL y luego se agregaron 5 g de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 10 mL de MeCN y se agitó manualmente durante 1 min. Luego, se agregaron 4 g de MgSO₄ anhidro y 1 g de NaCl. A continuación, el tubo se agitó manualmente durante 5 minutos y se colocó en un baño ultrasonido durante 15 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm. Parte de la fase orgánica se transfirió a tubos desechables de PP de 15 mL con sorbentes previamente pesados: 25 mg de PSA y 150 mg de MgSO₄ anhidro por mililitro de sobrenadante.

Para la versión de QuEChERS citrato, se realizó un procedimiento similar, que difiere en la formación de un tampón *in situ*. La principal diferencia es el uso de 1 g de NaCl, 4 g de MgSO₄ anhidro, 1 g de citrato trisódico deshidratado y 0,5 g de hidrogencitrato de disodio sesquihidratado como sales de extracción. Para el QuEChERS acetato (AOAC), el procedimiento es similar al primer método, cambiando el disolvente de extracción por MeCN acidificado con 1 % de HAc. Otra diferencia es el uso de 1 g de acetato de sodio y 4 g de MgSO₄ anhidro como sales de partición de fase.

Para ambos QuEChERS modificados, durante la etapa de limpieza, se usaron 150 mg de MgSO₄ anhidro y 50 mg de PSA por mililitro de sobrenadante.

La principal diferencia entre las versiones clásica y modificada de QuEChERS es el ajuste del pH. En el enfoque de acetato y citrato, se genera un tampón *in situ* (4.5-5 y 5-5.55 respectivamente) que estabiliza el pH de la matriz lo que permite una mejor extracción de pesticidas dependientes del pH.

En todos los casos, para el análisis de LC-MS/MS, el sobrenadante se filtró a través de una jeringa de 22 µm y se colocaron 500 µL en un vial de inyección para el análisis. La versión final de QuEChERS AOAC validado incluye el uso de 2,5 g de muestra y 7,5 g de agua destilada (una modificación del método original) como se explicará en el punto

3.3.2.

3.3.2. Resultados y discusión

Los tres procedimientos descritos anteriormente basados en la metodología QuEChERS se evaluaron en términos de su capacidad para proporcionar una eficiente extracción del analito y maximizar la eliminación de los co-extractivos que podrían interferir. La veracidad y precisión se evaluaron a un nivel de concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. También se estudió el efecto matriz y se observó una fuerte supresión de la señal. De los tres métodos seleccionados, todos los pesticidas alcanzaron recuperaciones $\geq 100 \%$, mientras que la versión AOAC mostró un menor porcentaje de pesticidas con efectos de matriz $\geq 50 \%$. Se siguió una estrategia de "reconstrucción" del jugo original en términos de contenido sólido total con el objetivo de minimizar este efecto. La dilución de la muestra ha demostrado minimizar los efectos de la matriz durante el uso de ionización ESI y, por lo tanto, se pueden superar los fenómenos de supresión de iones y se logra una mayor sensibilidad. La etapa de preparación de la muestra se modificó y se pesaron 2,5 g de jugo concentrado y se añadieron 7,5 g de agua. (Figura 3.3).

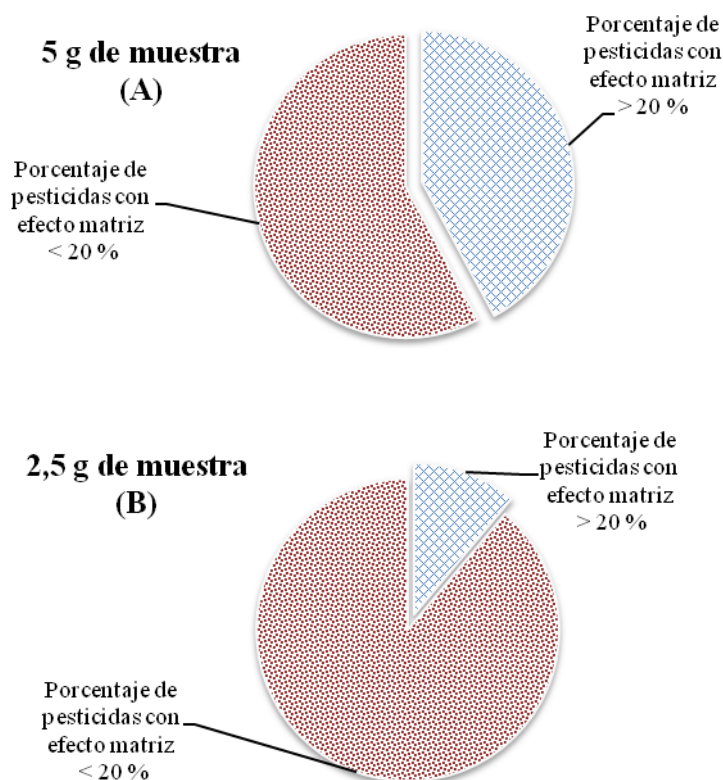


Figura 3.3. Porcentaje de pesticidas con efecto matriz (%) menor y mayor a 20, usando 5 g (A) y 2,5 g (B) de jugo concentrado durante la extracción con el método

QuEChERS acetato.

La veracidad del método se estudió a 3 niveles de concentración: 10, 100 y 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los rangos lineales fueron de 10 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para todos los analitos con la excepción de 2,4 D e imidacloprid (de 100 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) con residuos inferiores al 20 %. Todas las figuras de mérito se presentan en la Tabla 3.6.

La composición química del jugo concentrado es menos compleja que la de la fruta entera, pero el jugo tiene un mayor contenido de sólidos y compuestos potencialmente interferentes. Los efectos de la matriz se minimizan, con la excepción de carbendazim y tiabendazol, que mostraron 36 y 47 % de efecto matriz. La dilución de la muestra eliminó el alto efecto de matriz que sufre el imidacloprid en fruta entera, así como la mayoría de los otros efectos matriz observados durante su análisis.

Pesticida	Nivel de concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Rango Lineal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r^2	EM (%)
	10 (n=5)		100 (n=5)		300 (n=5)					
	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)	Rec (%)	DSR (%)				
Carbendazim	70,6	2,9	87,3	5,0	74,2	5,3	10	10-300	0,9998	-39
Tiabendazol	69,8	5,3	90,5	3,4	70,5	4,7	10	10-300	0,9985	-48
Imidacloprid	-	-	95,6	4,7	92,2	7,0	100	100-300	0,9951	8
Imazalil	87,6	15,4	90,1	3,5	66,3	9,6	10	10-300	0,9933	-4
Espinosina A	76,0	3,2	98,1	9,4	88,1	4,8	10	10-300	0,9957	-10
Espinosina D	77,0	2,9	99,0	3,3	86,6	6,2	10	10-300	0,9960	-9
Pirimetanol	79,6	5,3	95,5	3,5	101,0	13,6	10	10-300	0,9981	-12
Procloraz	82,1	4,6	94,1	4,5	90,4	4,5	10	10-300	0,9994	-8
Boscalid	77,9	5,8	98,2	3,4	86,8	4,2	10	10-300	0,9979	-9
Fenhexamid	65,3	7,3	96,8	2,8	80,1	2,3	100	10-300	0,9999	-2
Iprodiona	81,2	7,8	96,7	5,6	75,9	3,8	10	10-300	0,9971	-16
Propiconazol	77,9	4,7	98,2	3,5	89,2	5,0	10	10-300	0,9985	-10
Difenoconazol	78,5	4,4	99,1	4,2	88,6	3,8	10	10-300	0,9974	-12
Piraclostrobina	61,4	8,3	99,0	4,1	85,7	3,1	100	10-300	0,9952	-5
Trifloxistrobina	64,9	7,6	95,3	1,2	87,0	3,0	100	10-300	0,9958	-6
2,4-D	-	-	80,0	7,1	75,4	3,2	100	100-300	0,9980	-5
Fludioxonil	76,8	11,9	92,3	5,4	70,8	5,5	10	10-300	0,9956	-12

Tabla 3.6. Pesticida, porcentaje de recuperación (% Rec) y reproducibilidad (% RSD) para niveles de concentración de 10, 100 y 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$; límite de cuantificación (LOQ), rango lineal y porcentaje del efecto de la matriz (% de ME) para cada analito en jugo de limón concentrado usando 2,5 g de muestra

Análisis de muestras

La mayoría de los países dependen de las regulaciones para alimentos procesados y deben cumplir con los límites máximos para pesticidas. Sin embargo, el *Codex Alimentarius* (Codex_Alimentarius, 2003) y la legislación Europea (European_Commission, 2005) no proporcionan datos de LMR para jugos concentrados, pero establecen que el LMR apropiado aplicado al jugo concentrado corresponde al valor de LMR para cada pesticida en el producto agrícola sin elaborar (en este caso en fruta de limón).

En este trabajo se utilizó el LMR de cada pesticida notificado por el *Codex Alimentarius* para limón y el valor de LMR para el jugo concentrado es: LMR en jugo de limón ($\mu\text{g kg}^{-1}$) = LMR en fruta de limón ($\mu\text{g kg}^{-1}$). Se analizaron cinco jugos concentrados de limón. Se encontraron residuos de propiconazol en el rango de $0,1 \pm 0,06$ a $0,2 \pm 0,08$ mg kg^{-1} , imazalil a $0,2 \pm 0,08$ mg kg^{-1} y pirimetanil en el rango de $0,1 \pm 0,06$ a $0,5 \pm 0,02$ mg kg^{-1} en muestras comerciales. En todos los casos, las concentraciones encontradas fueron inferiores a los LMR para las combinaciones matriz/pesticida

3.4. Aceite esencial

3.4.1. Experimental

Los estándares de pesticidas utilizados en este ensayo fueron obtenidos y conservados como se indica en la sección 3.2.1. Los compuestos fueron analizados por LC-MS/MS como se indica también en la sección 3.2.1. En particular, los residuos de 2-fenilfenol (OPP) fueron determinados usando el sistema instrumental que se describe a continuación.

Condiciones de funcionamiento GC-MS

El análisis de OPP en GC-MS se realizó en un Shimadzu GC-MS QP2010 en modo de ionización por impacto de electrones (IE) con energía de ionización de 70 eV. El volumen de inyección fue de 1 μL de cada muestra en modo split a 280 °C. La separación cromatográfica se realizó en una columna capilar de sílice fundida Rtx-5MS (30 mx 0,25 mm de diámetro y espesor de película de 0,25 μm) con He ultrapuro como gas portador. La interfaz y la fuente de iones se establecieron a 280 y 230 °C, respectivamente. El gradiente de temperatura del horno comienza a 120 °C (se mantiene durante 5 min), aumenta a 190 °C a una velocidad de 10 °C min^{-1} (se mantiene por 1

min), luego a una velocidad de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ se alcanzan $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (se mantiene por 5 min) y finalmente a una velocidad de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ se aumenta hasta $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (se mantiene por 5 min) haciendo un tiempo total de análisis de 45 min. La detección se realizó en el modo de adquisición SIM (Single Ion Monitoring). La adquisición y procesamiento de datos se realiza con la versión 4.11 SU2 del software GC-MS Solution. Los parámetros de detección de pesticidas para ambos sistemas analíticos se muestran en la Tabla 3.2.

Para la determinación de residuos de pesticidas en aceites esenciales, se utilizó una dilución de la muestra y posterior inyección directa. Primero, la muestra se sometió a vórtice y se tomó una alícuota de $200\text{ }\mu\text{L}$ y se colocó en un vial de inyección, luego se añadieron $800\text{ }\mu\text{L}$ del disolvente apropiado: MeCN o EtOAc para análisis LC y GC, respectivamente.

Para los estudios de precisión, los aceites esenciales de limón se fortificaron con los pesticidas seleccionados en concentraciones que van de 5 a $200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Durante el análisis de las muestras reales, debido a la complejidad de los aceites esenciales y a que la composición podría ser diferente según el método de extracción utilizado, el tipo de cítricos (Arce & Soto, 2008) y las zonas geográficas donde se cultivaba la fruta (Dellacassa, et al., 1997) más las dificultades de encontrar una muestra blanco, la técnica de calibración de adición estándar se usó para fines de cuantificación. Para lograr esto, en lugar de usar $800\text{ }\mu\text{L}$ de disolvente, se usó la cantidad apropiada de mezcla de pesticida junto con el disolvente necesario para alcanzar $800\text{ }\mu\text{L}$.

3.4.2. Resultados y discusión

Para el análisis del aceite esencial de limón, se seleccionaron 16 pesticidas susceptibles LC y un pesticida susceptible al GC: 2-fenilfenol (OPP). Este fungicida se aplica comúnmente en cítricos después de la cosecha y la presencia de residuos de OPP en aceites esenciales de limón, naranja y mandarina fueron informados por Ito *et al.* [37]. En este trabajo de tesis, después de la dilución e inyección de la muestra en el instrumento, se estudió la repetibilidad del método a 5 niveles de concentración: 10, 25, 50, 100 y $200\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$). Los resultados mostraron una repetibilidad adecuada para todos los analitos estudiados (rango 0,6-9,8 %). El LOQ del método fue $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ para 73 %, $25\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ para 13 % y $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ para 6 % de los analitos, mientras que para OPP, el LOQ fue $100\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Boscalid e iprodiona también se estudiaron en esta matriz, pero

un gran efecto de matriz de supresión evita su identificación en concentraciones inferiores a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. En consecuencia, fueron eliminados del alcance. Los rangos lineales fueron de LOQ a $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para analitos sensibles LC y de LOQ a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ para OPP que se analizó mediante GC-MS, con residuos que arrojan desviaciones inferiores al 20 % en todos los casos (Tabla 3.7)

Pesticida	Repetitividad (DSR %)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	EM (%)
Carbendazim	2,6-3,9	10	10-200	0,9995	-41
Tiabendazol	0,8-5,8	10	10-200	0,9997	-65
Imidacloprid	1,3-9,7	25	25-200	0,9997	-19
Imazalil	4,8-8,9	25	25-200	0,9997	-62
Fludioxonil	1,0-3,9	10	10-200	0,9998	-22
Espinosina A	2,1-6,5	10	10-200	0,9999	-71
Espinosina D	4,4-10,6	10	10-200	0,9998	-69
Primetanil	0,6-4,4	10	10-200	0,9993	-62
Procloraz	1,5-5,5	10	10-200	0,9998	-46
Fenhexamid	3,9-8,5	50	50-200	0,9990	-67
Propiconazol	0,9-4,3	10	10-200	0,9999	-45
Difenoconazol	0,3-2,2	10	10-200	0,9998	-62
Piraclostrobina	0,9-1,9	10	10-200	0,9994	-49
Trifloxistrobina	1,6-4,0	10	10-200	0,9998	-91
2-fenilfenol	4,3-10,4	100	100-500	0,9990	73

Tabla 3.7. Pesticida, repeatability (RSD %), límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$), rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$), coeficiente de correlación (r^2) y porcentaje de efecto matriz (EM %) para cada analito en aceite esencial de limón.

Análisis de muestra

Se analizaron 101 muestras de AE. Los pesticidas poscosecha más comúnmente encontrados fueron imazalil ($0,15-2,20 \text{ mg L}^{-1}$), procloraz ($0,01-35,9 \text{ mg L}^{-1}$), 2-fenilfenol ($0,10-52,1 \text{ mg L}^{-1}$) y propiconazol ($0,01-15,0 \text{ mg L}^{-1}$). Incluso se encontraron residuos de piraclostrobina y difenoconazol (fungicidas generalmente utilizados en la etapa previa a la cosecha). La Figura 3.4 muestra la señal cromatográfica de procloraz presente en una muestra real de AE a $112 \mu\text{g}$ de nivel de concentración de L^{-1} . Para comparar los resultados con los LMR establecidos es necesario tener en cuenta la densidad del aceite esencial para convertir mg L^{-1} en mg kg^{-1} (considerarlo al comparar los resultados con los LMR). En este trabajo, se consideró un valor de $0,85 \text{ kg L}^{-1}$ basado en la investigación de Clará (Clará, Gómez Marigliano, & Sólino, 2011).

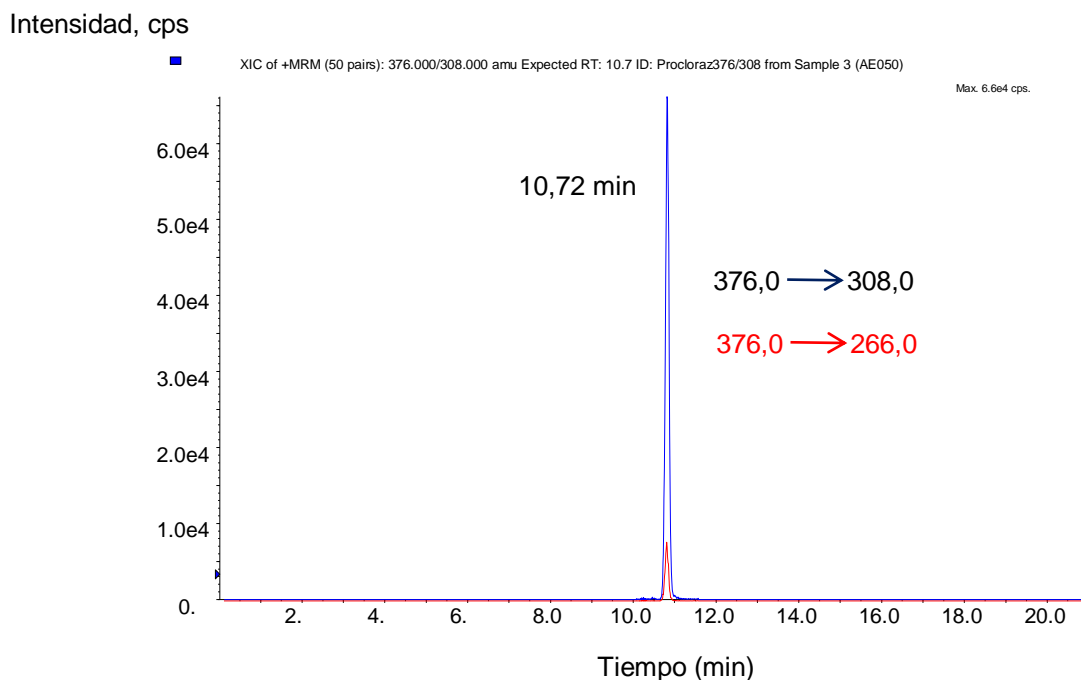


Figura 3.4. Identificación de procloraz en aceite esencial de limón por LC-MS/MS. Concentración en aceite de $112 \mu\text{g L}^{-1}$

3.5. Conclusiones

Se utilizaron técnicas instrumentales compatibles y se optimizaron los modos instrumentales para su determinación, para disponer de metodologías analíticas que permitan el análisis de residuos de pesticidas en las distintas matrices cítricas, para cada uno de los compuestos a ser estudiados.

Se ajustaron y validaron metodologías multirresiduos que permiten determinar 5 pesticidas comúnmente utilizados en etapa de campo en el cultivo de cítricos por LC-MS/MS con límites de detección menores a los LMRs de la UE y/o del *Codex Alimentarius* de cada pesticida en mandarina, naranja y limón.

La dilución de muestra previa a la etapa de extracción y análisis se aplicó con éxito para el análisis de subproductos de limón: jugo concentrado y aceite esencial. Al analizar el jugo concentrado, la dilución x 4 en la etapa de extracción permitió una aplicación uniforme del protocolo QuEChERS tamponado con acetato. Los efectos de la matriz fueron mínimos después de la dilución. Por otro lado, el análisis de aceites esenciales involucró la simple dilución de la muestra antes de la determinación y puede representar un gran beneficio para los laboratorios, ya que permite aumentar el rendimiento en tiempo de análisis. El método QuEChERS buffereado con acetato fue eficaz para

analizar los pesticidas dependientes del pH en la fruta de limón. Los tres métodos ajustados y validados para frutas de limón, jugo concentrado y aceite esencial permitieron la determinación de un grupo de pesticidas comúnmente utilizados en la industria de los cítricos. Actualmente se aplican a la determinación rutinaria de residuos de pesticidas en productos de limón para la exportación. Se encontraron residuos de pesticidas (imazalil, piraclostrobina, pirimetanil, procloraz, difenoconazol, 2-fenilfenol) en las tres matrices evaluadas. En las frutas de limón y los jugos concentrados, los residuos encontrados se encontraban en concentraciones inferiores a los LMR establecidos por el *Codex Alimentarius* y la Unión Europea (UE). En el caso de los AEs, procloraz, 2-fenilfenol y propiconazol superan los LMR de limón establecidos por la UE.

CAPÍTULO II: Utilización de sistemas instrumentales de masa exacta durante el análisis de pesticidas en frutas cítricas.

4.1. Introducción

Durante mucho tiempo, la cromatografía de gases con ionización de impacto electrónico junto con la espectrometría de masas con analizador de tipo cuadrupolo en modo de "full scan" ha sido la preferencia de los laboratorios de rutina para el análisis de pesticidas (Lesueur & Gartner, 2005; Tahboub, Zaater, & Al-Talla, 2005). La principal ventaja de esta tecnología es su capacidad para detectar e identificar una gran variedad de compuestos ya que se utilizan bibliotecas de espectros de masas bien establecidas a 70 eV, así como una evaluación analítica post-ejecución (análisis retrospectivo) (Mezcua, Martínez-Uroz, Wylie, & Fernández-Alba, 2009; Tahboub, et al., 2005). Sin embargo, las significativas limitaciones de selectividad y sensibilidad hacen que esta técnica sea inadecuada para las estrictas normas vigentes sobre residuos de pesticidas en los alimentos. La utilización de espectrómetros de masa de tiempo de vuelo (ToF-MS) proporcionó dos enfoques complementarios: (i) instrumentos que cuentan con resolución de masa unitaria con altas velocidades de adquisición (hasta 500 espectros), por lo que se vuelve muy útiles para ser usados como detectores rápidos acoplados a GC o GC bidimensional (GC×GC); y (ii) instrumentos con una velocidad de adquisición moderada (por ejemplo, 20 espectros) pero que tienen una resolución de masa alta (> 7000 FWHM), lo que permite una mayor capacidad para resolver los analitos de los componentes de la matriz. Una característica común de ambas técnicas ToF es el muestreo y análisis en simultáneo de todos los iones en todo el rango de masa. ToF-MS proporciona una mayor sensibilidad en el modo de adquisición de espectro completo en comparación con los instrumentos de exploración convencionales con IE y cuadrupolo, principalmente debido a su alta eficiencia como analizador de masas: El GC-ToF-MS puede detectar cientos de compuestos con alta sensibilidad en un solo análisis. El alto poder de resolución de la masa y la exactitud de masa proporcionada por GC-ToF-MS hace posible obtener cromatogramas de iones extraídos utilizando ventanas de masa estrecha, excluyendo así una gran proporción del ruido químico y las interferencias isobáricas, mejorando significativamente las relaciones señal/ruido. En estas

condiciones, se mejora la capacidad de identificación de los pesticidas. Las aplicaciones que emplean GC-ToF-MS (instrumentos de alta velocidad), han demostrado que es una herramienta analítica poderosa y altamente efectiva en el análisis de contaminantes en alimentos y en el ambiente (por ejemplo, residuos de pesticidas) (Cervera, Portolés, Pitarch, Beltrán, & Hernández, 2012; F. Zhang, et al., 2012). Recientemente, otras fuentes de ionización, como la ionización química atmosférica, se han acoplado a GC-ToF-MS (Portolés, Mol, Sancho, López, & Hernández, 2014). Este modo de ionización suave puede permitir la detección de una amplia variedad de contaminantes y pesticidas mediante el monitoreo de la molécula protonada a lo largo del cromatograma. En este caso se observa muy poca o ninguna fragmentación de la molécula. Como es ampliamente conocido, el IE ha sido la fuente de ionización más utilizada en los métodos de GC-MS, y la fragmentación bastante fuerte de la molécula ocurre típicamente durante la dicha etapa. Como resultado, el ion molecular a menudo se pierde. En contraste, la fuente IE puede proporcionar un criterio de identificación más robusto, considerando tanto analitos objetivo como no objetivo, ya que otros iones de diagnóstico pueden seleccionarse de los espectros de barrido completo y resultan de utilidad para el monitoreo de pesticidas.

Este enfoque, junto a otros como GC-MS, GC-MS/MS, GC-ToF-MS, LC-MS, LC-MS/MS, LC-ToF-MS se han desarrollado y aplicado al análisis de residuos de pesticidas, particularmente en frutas cítricas (Andraščíková, et al., 2013; Choi, et al., 2013; Ruiz, Morales, Barba, & Oliva, 2012; S. Uclés, et al., 2014; Yoshioka, Akiyama, & Teranishi, 2004). Sin embargo, a pesar de las herramientas analíticas disponibles, la correcta cuantificación de los analitos durante los programas de monitoreo y el análisis de rutina puede verse afectada por el efecto matriz (EM). La muestra, el procedimiento de tratamiento de la misma y otros aspectos como el tipo de espectrómetro de masas o el modo de adquisición influyen directamente en el EM (I. Ferrer, et al., 2005). Durante el paso de cuantificación, el EM puede desempeñar un papel importante al disminuir o mejorar la señal obtenida del analito (Trufelli, et al., 2011). Para compensarlo, las curvas de calibración coincidentes con la matriz (curva de calibración en matriz) se utilizan y recomiendan en las directrices DG-SANTE (DG-SANTE, 2015).

Desde 1992, muchos investigadores (Botero-Coy, Marín, Serrano, Sancho, & Hernández, 2015; Erney, Gillespie, Gilvydis, & Poole, 1993; Garrido Frenich, Martínez Vidal, Fernández Moreno, & Romero-González, 2009; Kwon, Lehotay, & Geis-

Asteggianti, 2012; Poole, 2007; Stahnke, Kittlaus, Kempe, & Alder, 2012; Y. Wang, et al., 2016; P. Yang, et al., 2015) estudiaron el EM utilizando detectores convencionales y de espectrometría de masas, y también evaluaron la influencia del paso de limpieza (Kittlaus, Kempe, & Speer, 2013; Kittlaus, Schimanke, Kempe, & Speer, 2011; A. Uclés, et al., 2015). Actualmente, la espectrometría de alta resolución y masas exacta (HR-AMS) acoplada a los sistemas de separación cromatográfica se incluye cada vez más en el trabajo de rutina de los laboratorios de monitoreo de residuos de pesticidas. Sin embargo, pocos trabajos han demostrado el rendimiento de los diferentes métodos analíticos que utilizan HR-MS para la determinación de pesticidas en matrices cítricas y en donde se discute brevemente el EM (J. Wang, Chow, Chang, & Wong, 2014; P. Yang, et al., 2015). Recientemente, Gomez-Ramos *et al.* (Del Mar Gómez-Ramos, Rajski, Lozano, & Fernández-Alba, 2016) estudiaron el EM obtenido después de realizar tres métodos diferentes de preparación dispersiva de muestra en una variedad de naranja, entre una amplia variedad de otras frutas y verduras. Aunque la composición fitoquímica de los cítricos se ha descrito ampliamente, el papel específico de los co-extractivos en el EM durante el análisis de contaminantes trazas apenas se ha estudiado. Los flavonoides, las cumarinas, las flavonas permetoxiladas entre otros polifenoles y los terpenoides se determinaron mediante cromatografía líquida (HPLC) acoplada a diferentes detectores (He, Lian, Lin, & Bernart, 1997; Kanaze, et al., 2009), pero la identificación simultánea e influencia de co-extractivos específicos en EM durante el análisis de residuos de pesticidas cítricos no ha sido estudiado en profundidad utilizando UHPLC-HR-AMS-ToF. Estudios previos de EM en extractos de naranja utilizando GC-MS informados por Sugitate *et al.* (Sugitate, et al., 2012) permitieron la identificación de 1-monopalmitina, 1-monolinoleína, escualeno, α -tocoferol y β -sitosterol.

En este capítulo, trabajando con un GC-HR-MS se planteó como objetivo estudiar y evaluar un método de escaneo múltiple, sensible y automatizado combinado con una biblioteca de masas exacta para la detección/identificación automática de pesticidas en naranja. Además, con el objetivo de contribuir a la comprensión del EM general en el análisis de residuos de pesticidas se presenta el estudio y comparación del EM de 4 naranjas, 2 mandarinas y 1 variedad de limón utilizando un método de extracción con acetato de etilo (Besil, et al., 2016) seguido de UHPLC-HR-MS. Conjuntamente, se evaluó la influencia de componentes específicos de la matriz co-extraída, teniendo en

cuenta la diversidad química del material en estudio.

4.1. *Análisis de residuos de pesticidas en naranja usando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa tiempo de vuelo de alta resolución.*

4.1.1. Experimental

Todos los estándares analíticos de pesticidas utilizados en este estudio se adquirieron del Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemania) y Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania) en grado analítico (pureza > 95 %). Se preparó una solución estándar de mezcla que contenía todos los pesticidas estudiados a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en acetato de etilo y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. El acetato de etilo se obtuvo de Fluka Analytical Pestanal. El sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4) se obtuvo de Pancreac Química S.A. y el cloruro de sodio (NaCl) de J.T Baker.

Cromatografía de gases

La separación de los pesticidas del extracto de naranja se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía de gases (Agilent 7890A). Se utilizaron dos columnas Agilent Ultra Inert GC (HP-5MS UI $15 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$) conectadas a través de una tecnología de flujo capilar (TFC) para proporcionar una separación analítica.

Las muestras se inyectaron utilizando una entrada multimodo. Las inyecciones se realizaron en modo *splitless* con un liner ultra-inerte, con una frita de lana de vidrio. El volumen de inyección fue de $2 \mu\text{L}$ y la temperatura del inyector se mantuvo a $280 \text{ }^\circ\text{C}$ durante todo el tiempo de funcionamiento. Se utilizó helio (99,999 % de pureza) como gas portador. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 min, $120 \text{ }^\circ\text{C}$ a $40 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ y luego hasta $310 \text{ }^\circ\text{C}$ a $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. La separación analítica se realizó en condiciones de bloqueo de tiempo de retención, utilizando clorpirifos metilo como compuesto de bloqueo de tiempo de retención a 18,11 min. El instrumento funcionó a flujo constante ($1,225 \text{ mL min}^{-1}$ en la primera columna y $1,425 \text{ mL min}^{-1}$ en la segunda columna. El tiempo total de ejecución fue de 40,5 min con 2 min adicionales para el *backflush*).

Se aplicó *backflush* para acortar el tiempo de análisis y reducir el mantenimiento del sistema, evitando la llegada de compuestos no deseados de la matriz al detector. El sistema cuenta con un TFC (que conecta las dos columnas) que permite eliminar los materiales pesados no deseados de la columna y prolongar la vida útil de la misma. Una

ventaja adicional de este dispositivo es que la columna se puede cambiar sin ventilar el MSD, ya que el TFC protege la entrada al MSD cuando se desconecta la primera columna al cubrir la conexión con el gas del *backflush*. Las condiciones del flujo de retorno se establecieron de la siguiente manera: temperatura del horno 310 °C, presión TFC 50 psi y presión de entrada 1 psi. Estas condiciones permiten un flujo negativo en la primera columna.

Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo

El sistema de cromatografía de gases Agilent 7200 (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) se conectó a un espectrómetro de masas conteniendo un analizador de tiempo de vuelo (ToF) y equipado con una fuente de impacto electrónico. Las temperaturas de la fuente de iones y del analizador de masas se fijaron a 280 y 150 °C, respectivamente. ToF MS fue operado a dos tasas de adquisición diferentes, 7000 y 12000 FWHM, adquiriendo en el rango de masa m/z 45-550. Se usó perfluorotributilamina (PFTBA) para la calibración diaria del MS. La exactitud de masa de los iones generados se controló a través de una calibración de masa interna realizada antes de cada inyección. Esta calibración se puede programar en la secuencia de inyecciones y, cuando la calibración de masa interna realizada entre muestras, indica errores de masa superiores a 5 ppm, la secuencia se detiene automáticamente.

Tratamiento de muestra

Una porción representativa de 10 g de muestra previamente homogeneizada se pesó en un tubo de centrífuga de PTFE de 50 mL. Luego se agregaron 10 mL de acetato de etilo y 50 μ L de estándar de sustitución (trifenilfosfato-TPP-), y el tubo se agitó vigorosamente durante 3 segundos a mano. Después de eso, se agregaron 1,5 g de NaCl y 8 g de MgSO₄ y el tubo se agitó automáticamente en un Agytax (Cirta Lab) durante 15 min. Luego se centrifugó el tubo (3500 rpm) durante 5 min. Finalmente, el extracto que contenía el equivalente de 1 g de muestra por mL de AcOEt se inyectó directamente en el sistema GC-ToF MS. La preparación de muestra utilizada, es la misma que se utilizó para la validación en la sección 3.2.

4.1.2. Resultados y discusión

Construcción de base de datos

Las condiciones experimentales descritas anteriormente se aplicaron para crear una base de datos que contiene 110 pesticidas que se encuentran típicamente en frutas y verduras. Como es bien sabido, cuando se utiliza la fuente IE, el ion molecular no está presente o la intensidad es muy baja en la mayoría de los casos. Por lo tanto, fue necesaria una investigación detallada de cada espectro para establecer la fórmula molecular con su masa exacta teórica, relacionada con la masa exacta experimental observada, como una forma de calcular los errores experimentales obtenidos en el análisis. Los iones seleccionados para este estudio fueron aquellos que producen abundancias relativas superiores al 20 % con respecto al pico base.

La base de datos creada incluye dos iones de diagnóstico con su fórmula molecular, la masa exacta neutra y el tiempo de retención de cada compuesto (Tabla 4.1). Para su desarrollo, se aplicó MS Interpreter, que es una herramienta incorporada en NIST MS Search 2.0 combinada con el software ChemDraw, y "generar fórmula desde el pico del espectro" (software Qualitative MassHunter) para facilitar la asignación correcta de los iones. La abundancia relativa de los iones seleccionados no presentó variaciones superiores al 20 % en los niveles de concentración estudiados (10-100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). La información que contiene el tiempo de retención, la fórmula molecular, la masa exacta y el nombre de cada ión asignado se recopiló en un archivo de Excel, que se convirtió en formato CSV para ser utilizado como biblioteca y vinculado al software del instrumento.

#	Pesticida	Rt (min)	Masa exacta	Formula molecular
1	Ametrina	18,469	227,1205	C9H17N5S
	Ametrina F1		212,0970	C8H14N5S
2	Benalaxil	26,003	148,1126	C10H14N
	Benalaxil F1		176,1075	C11H14NO
3	Bifentrina	28,334	181,1017	C14H13
	Bifentrina F1		166,0783	C13H10
4	Bromopropilato	28,123	182,9446	C7H4BrO
	Bromopropilato F1		338,9020	C13H9Br2O
5	Bromuconazol	27,921	172,9561	C7H3Cl2O
	Bromuconazol F1		292,9136	C10H8BrCl2O
6	Bupirinato	24,017	208,1450	C11H18N3O
	Bupirinato F1		273,1021	C10H17N4O3S
7	Butralina	20,648	266,1141	C12H16N3O4
	Butralina F1		277,1426	C14H19N3O3

8	Cadusafos	14,085	158,9703	C2H8O2PS2
	Cadusafos F1		213,0173	C6H14O2PS2
9	Chinometionato	21,921	205,9972	C9H6N2S2
	Chinometionato F1		233,9922	C10H6N2OS2
10	Clorobencilato	24,638	138,9951	C7H4ClO
	Clorobencilato F1		251,0030	C13H9OC12
11	Clorprofam	13,335	127,0189	C6H6ClN
	Clorprofam F1		171,0087	C7H6NO2Cl
12	Clorpirifos	19,999	196,9202	C5H2Cl3NO
	Clorpirifos F1		257,8948	C5H3NO3PSCl2
13	Clorpirifos Metilo	18,117	285,9261	C7H7NO3PSCl2
	Clorpirifos Metilo F1		124,9826	C2H6O2PS
14	Clozolinato	21,418	258,9803	C10H7NO3Cl2
	Clozolinato F1		186,9592	C7H3Cl2NO
15	DDE, p,p'-	23,420	246,0003	C14H8Cl2
	DDE, p,p'- F1		315,9380	C14H8Cl4
16	Diclorvos	6,163	109,0055	C2H6O3P1
	Diclorvos F1		184,9770	C4H7O4P1Cl11
17	Dicofol	26,670	138,9951	C7H4ClO
	Dicofol F1		110,9996	C6H4Cl
18	Endrin	24,170	260,8599	C7H2Cl5
	Endrin F1		242,9535	C11H6Cl3
19	Etoprofos	13,007	157,9625	C2H7O2PS2
	Etoprofos F1		113,9363	H3OPS2
20	Etrimfos	16,984	292,0647	C10H17N2O4PS
	Etrimfos F1		277,0412	C9H14N2O4PS
21	Fenitrotión	19,187	260,0146	C9H11NO4PS
	Fenitrotión F1		277,0174	C9H12NO5PS
22	Fluazifop_pbutil	24,472	282,0742	C14H11F3NO2
	Fluazifop_pbutil F1		383,1344	C19H20F3NO4
23	Fluopiram	21,640	173,0214	C8H4F3O
	Fluopiram F1		223,0250	C8H7ClF3N2
24	Flutolanil	23,150	173,0214	C8H4F3O
	Flutolanil F1		145,0265	C7H4F3
25	Hexaconazol	23,020	213,9939	C8H6Cl2N3
	Hexaconazol F1		256,0044	C10H8Cl2N3O
26	Metalaxil	18,650	206,1181	C12H16NO2
	Metalaxil F1		234,1130	C13H16NO3
27	Nuarimol	26,778	138,9951	C7H4ClO
	Nuarimol F1		235,0326	C13H9ClFO
28	Paration	20,014	291,0330	C10H14NO5PS
	Paration F1		139,0269	C6H5NO3
29	Picolinafen	28,295	238,0480	C12H7F3NO
	Picolinafen F1		376,0835	C19H12F4N2O2
30	Pirimicarb	17,387	166,0980	C8H12N3O
	Pirimicarb F1		238,1430	C11H18N4O2

31	Pirimifos Metilo	19,314	290,0728	C10H17N3O3PS
	Pirimifos Metilo F1		276,0572	C9H15N3O3PS
32	Profenofos	23,316	205,9134	C6H4BrClO
	Profenofos F1		336,9663	C11H15BrO3PS
33	Prometrin	18,627	241,1361	C10H19N5S
	Prometrin F1		226,1126	C9H16N5S
34	Propazina	15,496	214,0859	C8H13ClN5
	Propazina F1		172,0390	C5H7ClN5
35	Prosulfocarb	18,791	128,1075	C7H14NO
	Prosulfocarb F1		251,1344	C14H21NOS
36	Protiofos	23,204	112,9285	H2OPS2
	Protiofos F1		308,9940	C11H15ClO2PS2
37	Piriproxifen	29,624	136,0762	C8H10NO
	Piriproxifen F1		226,0994	C15H14O2
38	Quinoxifen	26,062	272,0278	C15H8ClFNO
	Quinoxifen F1		306,9967	C15H8Cl2FNO
39	Tebufenpirad	28,644	171,0325	C7H8ClN2O
	Tebufenpirad F1		318,1373	C17H21ClN3O
40	Tecnazene	12,430	200,8832	C5HCl4
	Tecnazene F1		212,8832	C6HCl4
41	Tetraconazol	20,372	336,0527	C13H11ClF4N3O
	Tetraconazol F1		170,9768	C8H5Cl2
42	Tetradifon	29,042	158,9671	C6H4ClOS
	Tetradifon F1		226,8892	C6H2Cl3OS
43	Tolclofos Metilo	18,281	264,9855	C9H11ClO3PS
	Tolclofos Metilo F1		249,9620	C8H8ClO3PS
44	TPP	27,052	326,0708	C18H15O4P
	TPP F1		215,0262	C12H8O2P
45	Trifluralina	13,947	264,0272	C13H5F3NO2
	Trifluralina F1		306,0702	C11H11F3N3O4

Tabla 4.1. Parámetros de identificación contenidos en la base de datos "desarrollada en el laboratorio": Pesticida, tiempo de retención (Rt), masa neutra exacta y fórmula molecular de cada fragmento.

Estudio de detección/identificación de compuestos objetivo.

La detección en naranja se evaluó a cuatro niveles de concentración: 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Los compuestos detectados por el método de procesamiento automatizado vinculado con la base de datos "desarrollada en el laboratorio" se compararon con el número total de compuestos incluidos en la base de datos. Cuando no se detectó algún ion, se realizó una búsqueda manual para confirmar la ausencia de este. Los criterios aplicados para la detección se basaron en la presencia de la masa del ion pico base seleccionado y el tiempo de retención correcto. Se trabajó con ventanas de tiempo de retención de $\pm 0,2$ min y con 5 ppm como tolerancia en la exactitud de masa. Todos los

pesticidas seleccionados se detectaron a un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ con la excepción de bupirimato y pirimicarb.

Los criterios aplicados para la identificación se basaron en la presencia de la masa del pico base y el segundo ion más abundante seleccionado (con respecto al pico base) y el tiempo de retención correcto. La ventana de tiempo de retención se estableció en $\pm 0,2$ min y la tolerancia de masa se fijó en 5 ppm. Al nivel de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, se identificó el 86,9 % de los compuestos excepto bupirimato, butralina, flutolanilo, paratión, pirimicarb y prometrina. Se observaron diferentes dificultades relacionadas con la capacidad de identificación cuando se aplicó el método de procesamiento vinculado a la base de datos de masa exacta. En algunos casos se debió a falla de software, ya que algunos compuestos no detectados automáticamente se podían detectar manualmente, tal es el caso de prosulfocarb (128,1075 masa neutra). Este compuesto no se identificó automáticamente utilizando la base de datos desarrollada en el laboratorio, pero se detectó manualmente con un error de masa inferior a 5 ppm.

Estudio de exactitud de masas

La exactitud de masa para cada ion de los pesticidas objetivo se estudió a 10, 20, 50 y $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, operando a 12000 FWHM. Estableciendo 5 ppm como tolerancia de masa, a niveles de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, el 95,6 % de los pesticidas se detectaron para naranja; mientras 86,7 % de los compuestos se identificaron. A un nivel de concentración bajo ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) hubo algunos casos en los que este valor de masa de tolerancia (5 ppm) no fue suficiente para una correcta identificación debido al bajo nivel de sensibilidad de algunos compuestos como endrina y tolclofos metilo. De otra manera, se observó que la exactitud de masa para al menos un ion estaba por debajo de 5 ppm en el rango entre 10-100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, aunque a niveles de concentración bajos la exactitud de masa era mayor. Para desarrollar este trabajo, se seleccionó una tolerancia en el error de masa de 5 ppm con el propósito de satisfacer los requisitos de identificación de acuerdo con la Guía Europea (DG-SANTE, 2015), asumiendo el inconveniente de obtener límites de identificación superiores a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para algunos compuestos.

Los valores más altos de error de masa producen un gran número de falsos positivos detectados y los valores más bajos pueden ser la fuente de dificultades, como compuestos no detectados, preferiblemente a niveles de concentración bajos. Los

cambios en el tiempo de retención fueron inferiores a 0,2 min en todos los casos estudiados.

Al utilizar los parámetros operativos seleccionados, la base de datos se utilizó como una biblioteca para evaluar la capacidad de detección/identificación en función de la exactitud de la masa y la tolerancia de la ventana de tiempo seleccionada.

El error de masa calculado depende del área del pico seleccionado. En la mayoría de los casos, la mejor opción fue calcular el error de masa en el vértice del pico, aunque en algunos casos este hecho puede ser un problema. Para dicofol, flutolanil y trifluralina se observó un efecto de saturación típico a alta concentración. Cuando se calculó el error de masa en el vértice del pico, el valor obtenido es más alto de 5 ppm, pero este problema se puede resolver si el error de masa se calcula en el escaneo promedio del 50 % de la altura de pico.

En general, para minimizar el error de masa es preferible calcularlo en la parte superior del 50 % del pico. En la figura 4.1 se muestra el fragmento característico 282,0742 (masa neutra) del compuesto fluazifop-pbutilo en naranja a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. El error de masa se calculó en cinco tiempos de retención diferentes, y se observó que en los puntos 1 y 5 el error de masa era mayor que en los puntos 2, 3 y 4; por lo que se concluyó que era preferible seleccionar la región entre los puntos 2 y 4 para calcular el error de masa, para obtener valores de error de masa mínimos.

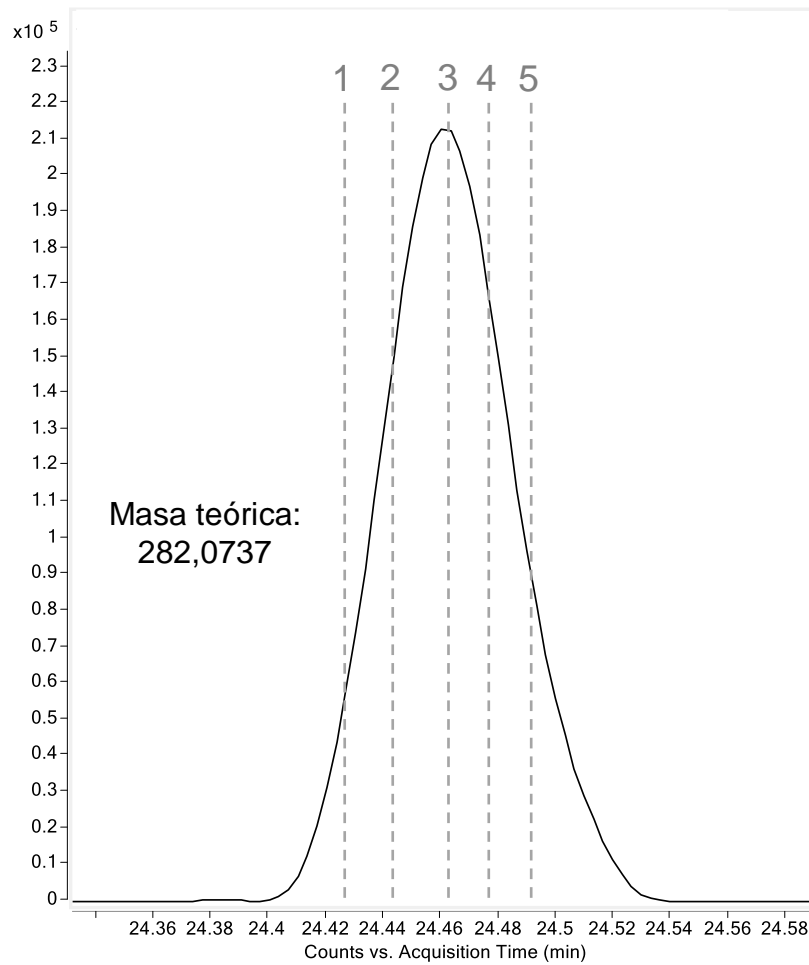
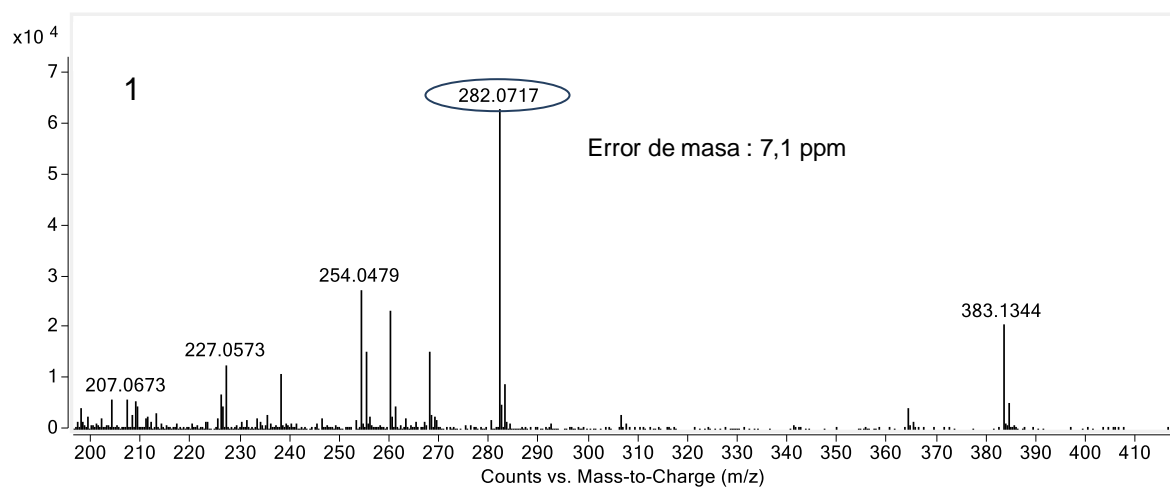
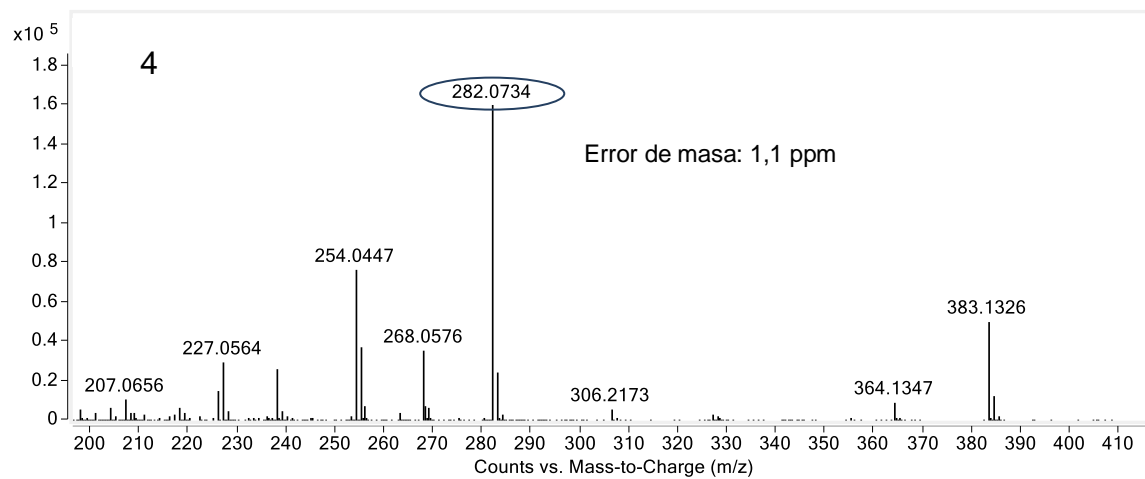
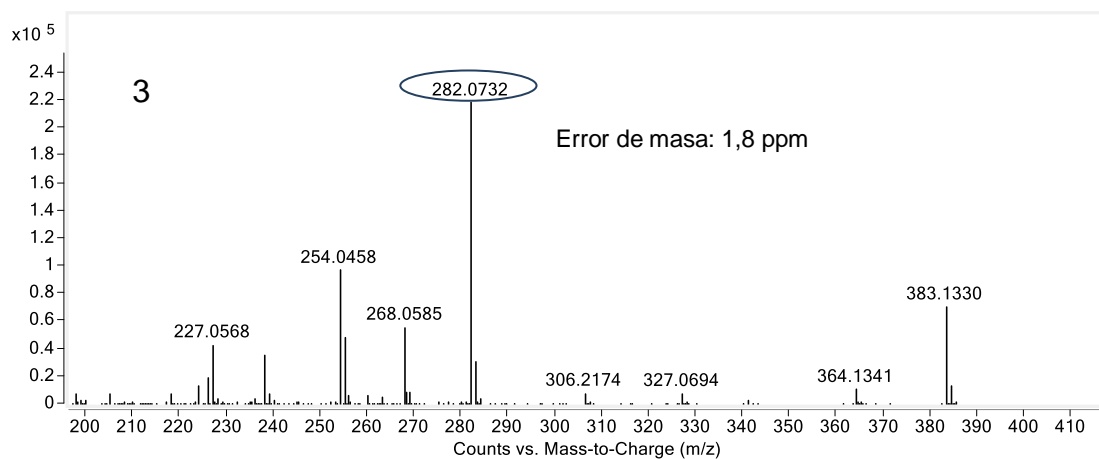
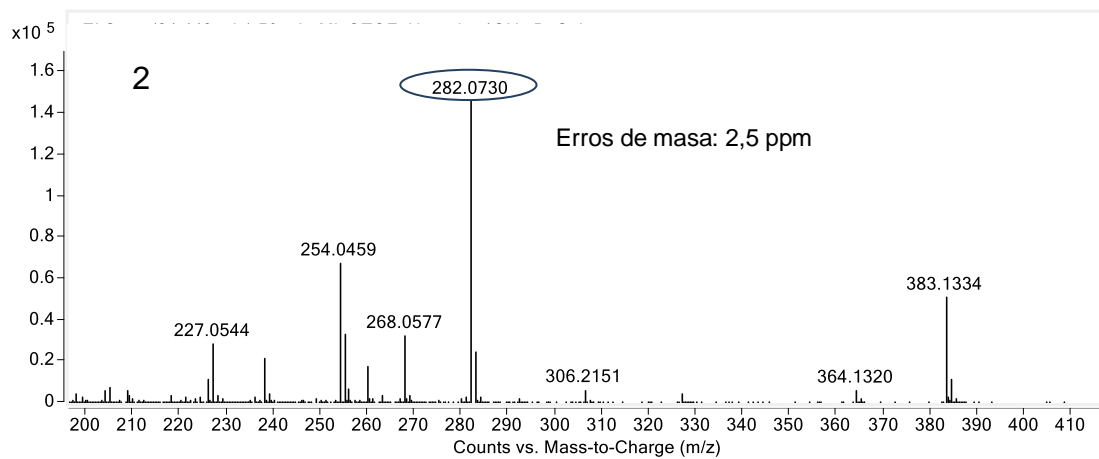


Figura 4.1 Cromatograma de ion extraído para fluazifop p-butyl (m/z 282,0737) en naranja a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.





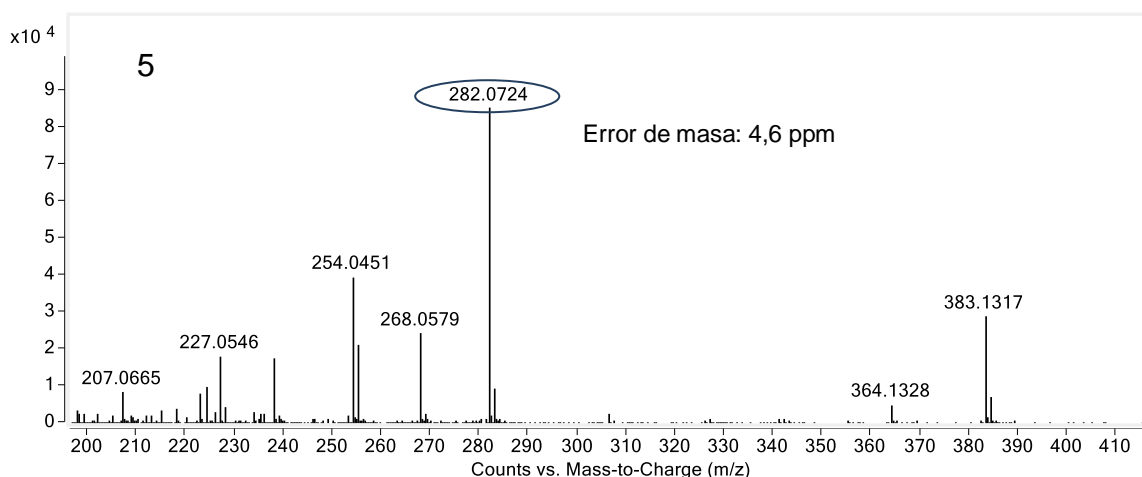


Figura 4.2. Espectro en *full scan* obtenido para cada punto definido en la Figura 4.1 para fluazifop p-butyl en naranja a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, con la exactitud de masa para el ion m/z 282,0737.

Linealidad, repetibilidad y reproducibilidad.

La linealidad se estudió trabajando a una resolución de 12000 FWHM y en el rango entre 10 y $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. La respuesta del detector se consideró lineal si el coeficiente de determinación (R^2) era igual o superior a $0,99$. Por lo general, la respuesta del detector fue lineal en todo el rango investigado, con coeficientes de determinación de acuerdo con el criterio establecido por la guía SANTE, excepto dicofol, flutolanil y trifluralina (ver Tabla 4.2). En los casos mencionados, para poder tener una buena linealidad, el rango lineal es más estrecho (10 - $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) debido a que a un nivel de concentración de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ aparece el efecto de saturación. Para el pico base, se evaluaron la repetibilidad y la reproducibilidad (entre días), obteniendo DSR menores a 20% para el 100% de los compuestos estudiados. Para este estudio, se inyectaron dos niveles de 10 - $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Cinco veces (repetibilidad) y durante cinco días consecutivos (reproducibilidad).

#	Pesticida	Rt (min)	LOI ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Efecto matriz (%)
1	Ametrina	18,469	10	20-100	-47,5
2	Benalaxl	26,003	10	10-100	7,1
3	Bifentrina	28,334	10	10-100	3,6
4	Bromopropilato	28,123	10	10-100	27,6
5	Bromuconazol	27,921	10	10-100	36,7
6	Bupirimato	24,017	20	20-100	-61,8
7	Butralina	20,648	20	20-100	72,5
8	Cadusafos	14,085	10	10-100	10,3
9	Chinometionato	21,921	10	10-100	4,3
10	Clorobencilato	24,638	10	10-100	2,5
11	Clorprofam	13,335	10	10-100	-8,6
12	Chlorpirifos	19,999	10	10-100	8,8
13	Chlorpirifos Metilo	18,117	10	10-100	18,3
14	Clozolinato	21,418	10	10-100	-11,4
15	DDE, p,p'-	23,420	10	10-100	-5,4
16	Diclorvos	6,163	10	10-100	-3,6
17	Dicofol	26,670	10	10-50	47,9
18	Endrin	24,170	10	10-100	-34,1
19	Etoprofos	13,007	10	10-100	23,4
20	Etrimfos	16,984	10	10-100	25,6
21	Fenitrotion	19,187	10	10-100	102,5
22	Fluazifop_pbutyl	24,472	10	10-100	-6,5
23	Fluopiram	21,640	10	10-100	-8,8
24	Flutolanil	23,150	20	20-50	-52,6
25	Hexaconazol	23,020	10	10-100	13,9

26	Metalaxil	18,650	10	10-100	-2,1
27	Nuarimol	26,778	10	10-100	2,1
28	Paration	20,014	50	50-100	61,8
29	Picolinafen	28,295	10	10-100	25,4
30	Pirimicarb	17,387	20	20-100	-41,5
31	Pirimifos Metilo	19,314	10	10-100	14,8
32	Profenofos	23,316	10	10-100	9,2
33	Prometrina	18,627	20	20-100	1,5
34	Propazina	15,496	10	10-100	-18,3
35	Prosulfocarb	18,791	10	10-100	6,6
36	Protiofos	23,204	10	10-100	11,1
37	Piriproxifen	29,624	10	10-100	-4,5
38	Quinoxifen	26,062	10	10-100	3,6
39	Tebufenpirad	28,644	10	10-100	7,7
40	Tecnazene	12,430	10	10-100	16,9
41	Tetraconazol	20,372	10	10-100	6,0
42	Tetradifon	29,042	10	10-100	7,8
43	Tolclofos Metilo	18,281	10	10-100	1,6
44	TPP	27,052	10	10-100	37,7
45	Trifluralina	13,947	10	10-50	-54,0

Tabla 4.2. Rango lineal, límites de identificación (LOI) y efecto matriz para cada pesticida. (n.i. no identificado)

Efecto matriz

Para el estudio del efecto de la matriz, se comparó la pendiente obtenida de la curva lineal en naranja en el rango entre 10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ con la pendiente obtenida en tomate. La elección de trabajar con una calibración en tomate se debe a que es una matriz muy simple y de alto contenido de agua y a su vez, trabajando en solvente muchos de los analitos no se ven o los picos cromatográficos presentan tailing. La supresión o mejora de la ionización se evaluó mediante la siguiente ecuación. El usar un extracto como curva de referencia permite minimizar el efecto protector de los coextractivos en la señal y enfocar el tema en el EM cuando se realiza la determinación empleando masas exactas.

$$EM = \left(\frac{\text{pendiente (calibración en naranja)}}{\text{pendiente (calibración en tomate)}} - 1 \right) \times 100$$

Al comparar inicialmente la respuesta de los extractos con la calibración en solvente, se encontró un marcado efecto de mejora de la señal en comparación con el mismo. Los EM donde mejora la señal del analito, se observan con frecuencia en GC-MS, sin embargo, las diferencias en las pendientes entre naranja y el valor de referencia fueron muy pequeñas (tomate). Mientras que un valor positivo significa una mayor sensibilidad en la matriz investigada que en el tomate, un valor negativo fue equivalente a una menor sensibilidad. Para la matriz de naranja, que es una matriz más "difícil" que el tomate, solo 3 compuestos presentaron mejoría: butralina (72,5 %), fenitrotión (102,5 %) y paratión (61,8 %). Bupirimate (-61,8 %), flutolanil (-52,6 %) y trifluralin (-54,0 %) presentaron supresión de la señal; para el resto de los compuestos estudiados, las diferencias entre la pendiente en matriz con respecto a la pendiente de la matriz de tomate estaban en el rango entre ± 20 %, por lo que se concluyó que no tenían un efecto matriz significativo.

Análisis de muestras reales.

El método desarrollado se empleó en el análisis de muestras reales, obtenidas de un mercado local en Almería (España). En el método de cuantificación, el pico base, el segundo ion más abundante respecto del pico base y el tiempo de retención, se seleccionaron como criterios de cuantificación para cada compuesto. El pico base se usó como ion cuantificador y el segundo ion más abundante se usó como ion de

confirmación. La abundancia relativa entre ambos iones se mantiene constante en diferentes niveles de concentración para los estándares y no puede diferir en más del 30 % para las muestras reales.

Compuestos objetivo

El número y la distribución de los componentes de la matriz interferente varían mucho dependiendo de la matriz vegetal particular; incluso aquellos incluidos en la misma categoría de productos según los procedimientos de la UE. Los componentes presentes en la matriz a menudo tienen masas similares a los compuestos objetivo, y cuando la coelución es posible, este hecho puede conducir a reportar falsas detecciones positivas o falsas. Los falsos positivos dependen en gran medida de la matriz: cuanto mayor sea la complejidad de la muestra, más falsos se detectarán. Se consideró falso positivo en una muestra real cuando el software informó el cuantificador y el ión calificador con una abundancia relativa por debajo del 30 % con respecto al estándar. El falso positivo se puede descartar después del análisis de confirmación por GC-MS/MS, por lo que no fue un problema, aunque representan una tarea que requiere mucho tiempo y, por lo tanto, un obstáculo importante para el flujo de trabajo eficiente del laboratorio. Las muestras reales analizadas en este trabajo y, además, siete muestras en blanco de diferentes muestras se utilizaron para realizar un estudio anterior sobre falsos positivos y negativos informados por la base de datos automática. En las muestras reales de cítricos analizadas, se encontró la presencia de clorpirifos.

Compuestos no objetivo

Los compuestos no objetivo son aquellos que no se han validado y solo fue necesaria la presencia de un ión de diagnóstico (pico base, lo que permite un error de masa inferior a 5 ppm) con el tiempo de retención correcto ($\pm 0,2$ min) para el criterio de detección. En todas las muestras reales evaluadas, los resultados obtenidos mostraron que no se detectaron residuos de pesticidas.

4.2. Estudio de los efectos de la matriz e interferencias de diferentes co-extractivos de frutos cítricos en cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.

4.2.1. Experimental

Estándares y reactivos.

Los estándares de pesticidas de alta pureza (Tabla 4.3) fueron de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y Riedel-de Hën (Selze, Alemania) y se almacenaron a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las soluciones madre de pesticidas individuales ($1000\text{-}2000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) se prepararon disolviendo los patrones de referencia en el disolvente apropiado. Cada solución se almacenó en viales de vidrio ámbar con tapón de rosca en la oscuridad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La solución estándar de trabajo para fines de fortificación se preparó a una concentración de $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ en acetonitrilo (MeCN).

Los estándares de flavonoides fueron de Fluka AG y los estándares de referencia de otros productos naturales se aislaron en Farmacognosia y Productos Naturales en la Facultad de Química, UdelaR, y se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas de ionización electrónica (IE-MS).

MeCN de grado HPLC se obtuvo de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y acetato de etilo de grado analítico (EtOAc) de Pharmco Products Inc. (Brookfield, CT, EE. UU.). El ácido fórmico (98 % de pureza para espectrometría de masas) fue de MACRON Chemicals (Países Bajos). Se emplearon cloruro de sodio de J.T. Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, EE. UU.) y sulfato de magnesio anhidro de Scharlau (España).

Instrumentación

Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas para separar e identificar pesticidas y productos naturales. El análisis UHPLC se realizó con un Agilent 1290 Infinity, equipado con una columna C8 Zorbax Eclipse Plus ($100 \times 2.1\text{ mm}$, $1.8\mu\text{m}$) de Agilent Technologies. La composición de la fase móvil empleada fue: 0,1 % de HCOOH en agua ultrapura (A) y 0,1 % de HCOOH y 5 % de agua en acetonitrilo (B) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, usando un programa de gradiente de 20 % B durante los primeros 2 min, seguido de un aumento lineal de B de 20 a 100 % de 2 a 15 min. El solvente B se mantuvo al 100 % durante 2 min, disminuyó al 20 % y se mantuvo de 17 a 19 min para volver a equilibrar la columna. El tiempo total de ejecución fue de 19 min por muestra. El flujo fue de $0,3\text{ mL min}^{-1}$ con un volumen de inyección de $4\text{ }\mu\text{L}$. El cromatógrafo de líquidos se conectó a un Agilent 6550 iFunnel QToF-MS (Palo Alto, Agilent Technologies). La exactitud de masa aceptable (dentro de $\pm 2\text{ ppm}$) del QToF-MS (utilizada solo como ToF) se calibró antes de cada análisis con una solución de

referencia de HP-0921 (disponible comercialmente de Agilent) para escanear hasta 1700 unidades de relación masa-carga (m/z) y operado a 4 GHz (12000-16000 FWHM). El modo de ionización fue electrospray en modo positivo (+ ESI), con el voltaje de fragmentación a 360 V. El nitrógeno a 350 °C fue el nebulizador y el gas de secado. En cada análisis, la solución estándar de masa de referencia se infundió constantemente en el QToF-MS para el monitoreo y medición de su exactitud de masa con las masas de referencia de 121,0509 y 922,0098 m/z .

Preparación de la muestra

Para estudiar los efectos de la matriz, se obtuvieron muestras de naranjas, mandarinas y de limón de varios productores locales en Uruguay. Una naranja no producida comercialmente se obtuvo en un jardín familiar y se consideró libre de pesticidas. Para estos ensayos, se emplearon 2 kg de cada variedad de cítricos. Cada fruta seleccionada se cortó en cuatro partes, dos opuestas se separaron para el análisis y las otras dos se descartaron. Las piezas seleccionadas de fruta se cortaron y homogeneizaron utilizando una licuadora. La muestra de laboratorio se compuso, homogeneizó y almacenó a -20 °C hasta su análisis. Se utilizó un procedimiento de extracción previamente validado (Besil, et al., 2016). Se pesaron 10 g de la muestra homogeneizada y se colocaron en un tubo de centrifuga de teflón de 50 mL. Luego, se agregaron 10 mL de acetato de etilo y el tubo se agitó a mano vigorosamente durante 1 minuto. Posteriormente, se añadieron 8 g de sulfato de magnesio anhidro y 1,5 g de cloruro de sodio. La mezcla se agitó vigorosamente a mano durante 1 min. Los tubos de centrifuga se colocaron en un baño de ultrasonidos durante 15 min y se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm. Después de la centrifugación, se separó una solución de extracto que contenía 1 g de muestra por mL de acetato de etilo. El extracto se concentró bajo corriente de N_2 hasta sequedad. El residuo se disolvió en MeCN: H_2O (1:9). El extracto final obtenido se inyectó en el sistema UHPLC usando las condiciones descritas anteriormente.

Preparación de estándares en matriz

El volumen exacto de la solución estándar de trabajo y de MeCN: H_2O (1: 9) se agregaron al extracto de cítricos (previamente llevado a sequedad) para volver a disolverlo (volumen final de 100 μL). Los extractos fortificados se diluyeron 5 veces con MeCN: H_2O (1:9). La concentración resultante en el extracto fortificado fue de 10 a

150 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Este procedimiento se aplicó a cada variedad de cítricos. La curva de calibración utilizada como referencia se preparó en solvente a los mismos niveles. Las concentraciones resultantes en el vial fueron de 2 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, terminando con el equivalente de 0,2 g de muestra por mL de MeCN: H₂O (1:9).

Determinación del efecto matriz.

Los efectos de la matriz se evaluaron mediante la inyección de curvas de calibración en matriz y las curvas de calibración de referencia en solvente. El efecto matriz se cuantificó como el porcentaje por el cual la respuesta del analito en la curva de referencia (IUPAC define la sensibilidad como la pendiente de la curva de calibración) se cambia debido a la presencia de co-extractivos de la matriz, y se calcula como:

$$EM = \left(\frac{\text{pendiente (calibración en matriz)}}{\text{pendiente (calibración en solvente)}} - 1 \right) \times 100$$

Los valores positivos y negativos representan, mejoras y supresiones de la señal del analito inducida por la matriz. En este trabajo EM fue clasificado en 3 niveles; a) la EM débil se considera cuando el EM es menor o igual al 20 %, o también puede tomarse como sin efectos de matriz porque este cambio se encuentra entre los valores de repetibilidad (C. Ferrer, et al., 2011); b) el EM medio se considera entre el 20 y el 50 %, y c) el EM fuerte ocurre cuando los valores estaban por encima del 50 %.

4.2.2. Resultados y discusión

Se caracterizaron en este trabajo los EM causados durante el análisis de residuos de pesticidas por tres especies diferentes de cítricos, limón, naranjas, mandarinas y las variedades de las dos últimas. El cálculo del EM se puede realizar al menos con dos procedimientos diferentes. Un enfoque compara la respuesta de la señal entre un analito en una matriz determinada y un solvente a una concentración dada. Este procedimiento a menudo se realiza a diferentes niveles de concentración según lo informado por Cervera (Cervera, et al., 2010).

Otros autores (Kwon, et al., 2012; S. Uclés, et al., 2014) informaron que la determinación del efecto de matriz como la comparación de las pendientes entre la curva de patrones en matriz con los estándares de calibración en solvente. El principal

inconveniente de este enfoque es que puede ser inexacto para los pesticidas con un coeficiente de regresión $r^2 < 0,99$ o la suma de mínimos cuadrados en cada punto excede el 20 % (Koesukwiwat, Lehotay, & Leepipatpiboon, 2011). Este fue el criterio seguido en el presente estudio, ya que se verificó $r^2 \geq 0,999$ a lo largo de todo el experimento.

Se observaron dos tipos de interferencias de matriz utilizando la ionización ESI seguida de la detección por espectrometría de masas. El efecto más común de los co-extractivos de la matriz en la determinación de residuos se produce cuando eluyen con los analitos de la columna cromatográfica en la etapa de ionización. Los pesticidas de interés y los co-extractivos colocados en la superficie de la gota de disolvente compiten por la generación de iones durante la explosión de Coulomb, lo que causa en la mayoría de los casos una caída en la intensidad de la señal, un efecto llamado "supresión". Además de este efecto, si el compuesto co-eluyente genera iones con una masa similar a la del analito (interferencias), la relación de iones podría cambiar, lo que provocaría una interpretación errónea de los resultados observados. Este último efecto se observa al determinar los residuos de pesticidas a través de QqQ o analizadores de cuadrupolo único, debido a su baja resolución de la masa. El problema podría evitarse parcialmente cuando se emplean espectrómetros de alta resolución, como ToF u Orbitrap™.

Linealidad

Un inconveniente importante de los sistemas ToF es el corto rango dinámico debido al rápido fenómeno de saturación del detector. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los presentados en informes anteriores (Besil, Uclés, Mezcúa, Heinzen, & Fernández-Alba, 2015; Petucci & Mallis, 2005) donde, en algunos casos, los niveles de pesticidas de tan solo $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ fueron suficientes para saturar el detector. Los resultados mostraron que los rangos lineales son variables para cada pesticida, debido a la presencia de algunos analitos específicos y componentes de la matriz. Este es el caso del ciprodinil, que tiene un rango lineal de hasta $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ en limón y naranja, mientras que su rango alcanza los $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ en mandarinas.

Efecto matriz

Todas las variedades de cítricos mostraron una respuesta diferencial de algunos analitos en estudio en comparación con la respuesta de solvente. Los valores de EM para cada combinación de pesticida-variedad de cítricos se muestran en la Tabla 4.3. Las tres

especies de cítricos muestran efectos de matriz diferenciales para algunos pesticidas en estudio, desafiando la afirmación de la validación de una matriz única como representativa de todos los componentes de una categoría de matriz.



Pesticida	tR (min)	Cuantificador (m/z)	Naranja I	Naranja II	Naranja III	Naranja IV	Mandarina I	Mandarina II	Limón
Ciromazine	0,88	167,1040	11,9	-7,2	-16	-17,3	-26	-77,2	-34,9
Carbendazim	1,23	192,0768	-20,5	8,5	-25,2	2,8	-2,7	-30,1	6
Tiabendazol	1,3	202,0433	71,1	-24,3	-30,8	-27	-34,5	-46,3	-21,6
Pirimicarb, desmetil-	1,41	225,1346	8	-5,9	-15,8	-16,4	-18,3	-13,1	-2,9
Nitenpiram	1,67	271,0956	-4,9	-14,3	-6,3	-10,4	-9,1	-16,6	-5,5
Dicrotofos	2,03	238,0839	29,5	28,8	32,4	50,1	16,3	3,2	-6,2
Pirimicarb	2,3	239,1503	24,3	-3,8	-12	-9,4	-13,6	-10	-6,9
Etirimol	2,48	210,1601	-2,5	-17,9	-24,3	-20,9	-25,8	-24,2	-18
Tiametoxam	2,58	292,0266	171,1	143	151,1	119,7	111,9	93,7	124,1
Triclorfon	3,03	256,9299	57,1	42,4	48	41,6	43,3	28,8	68,9
Clotianidin	3,53	250,0160	2,5	-5,8	-6,7	-10,2	-26,3	-27,9	23,3
Imidacloprid	3,96	256,0596	81,5	81,2	84,9	55,9	60,8	34,5	84,5
Dimetoato	4,43	230,0069	44	35,9	38,4	29,6	-6,1	-18,4	37,5
Acetamiprid	4,58	223,0745	68,7	63,8	58,7	45,5	23,8	6,8	57,4
Tiacloprid	5,64	253,0309	24	4,7	15,1	13,6	-27,8	-45,6	39,7
Fenamifos - sulfoxido	5,8	320,1080	38,1	34,9	39,3	28,5	9,9	3,4	26,6
Piriproxifen	6,16	322,1438	-0,5	-6,7	-1,6	-4,8	-17,2	-9,5	-0,4
Tiodicarb	6,93	355,0563	61,7	39,6	51,3	37,1	40,5	17,5	80,8
Fenamifos - sulfona	7,01	336,1029	29,5	19	26,6	12,7	12,2	2,6	35,2
Carbofuran	7,21	222,1125	10,8	-0,7	2,8	1,9	-11,3	-19	11,1
Flutriafol	7,65	302,1099	-17,8	-30	-17,8	-27,3	-31,7	-27,1	2,8
Espiroxamina	7,76	298,2741	-11	-31,1	-29,5	-30,4	-42,8	-37,7	5,3
Fenoxicarb	7,83	302,1387	29,5	-4,2	-8	-6,3	-23,2	-16	-4
Ciprodinil	7,84	226,1339	8,4	-16,2	-14,5	-15,2	-45,7	-42,5	-5,3
Metalaxil	7,85	280,1543	25,8	25,2	25	11,3	10,2	-3,8	32,8
Bupirimato	8,42	317,1642	-55,8	-60,3	-54,7	-58,5	-75,7	-72,1	-1,3

Pesticida	tR (min)	Cuantificador (m/z)	Naranja I	Naranja II	Naranja III	Naranja IV	Mandarina I	Mandarina II	Limón
Clorantraniliprol	8,67	483,9758	14,2	-1,5	10,2	0	-6	-21	21,3
Dimetomorf(E)	8,67	388,1310	16,1	2,4	9,7	0,4	-0,7	-8,5	22,4
Espinosina A	8,78	732,4681	-48,9	-64,3	-52	-63,8	-47,1	-46,9	7,4
Dimetomorf(Z)	8,86	388,1310	38,4	7,2	51,1	-4,4	-23,3	-21,4	58,5
Paclobutrazol	8,92	294,1368	-2,4	-8,6	0,2	-7,1	-17,4	-9,3	3
Terbutilazina	9,06	230,1167	-19,8	-26	-15	-21,8	-65,2	-56,8	21,4
Triticonazol	9,07	318,1368	-3,4	-9,9	-1,2	-9,7	-42,7	-34,2	8,6
Isocarbofos	9,16	312,0430	-7	-13	-3,2	6,5	-45,2	-35	-3
Ciproconazol	9,19	292,1211	18,5	15,6	18,9	14,7	-6,8	-8,3	30,3
Espinosina D	9,19	746,4838	3,1	-4,1	1,5	-4,7	-10,3	-2,3	6,1
Linuron	9,28	249,0192	11,1	1,2	6,6	2,4	-7,8	-7,4	11,7
Fluazifop	9,35	328,0791	3	-5,6	2,3	-4,9	-9,2	-3,5	2,2
Bromuconazol(I)	9,36	377,9590	-0,8	-8,2	2,2	-4,8	-12,7	-6,9	-1,1
Fenarimol	9,38	331,0399	2,7	-5,9	2,8	-5,6	-9,2	-2,5	3,3
Iprovalicarb	9,57	321,2173	7,9	1,6	11,4	0,6	-23,1	-23,7	15,9
Fenamifos	9,58	304,1131	12,5	5,7	12,8	4,1	-15,1	-15,5	24,5
Azoxistrobina	9,71	404,1241	20,2	13	16,2	7,9	-6,5	-13,3	20,3
Miclobutanil	9,73	289,1215	3,8	-4,2	3,9	-3,8	-8,1	-1,3	6,9
Fenamidona	9,78	312,1165	2,3	-3	2,5	-4,6	-8,8	-1,9	-6,8
Boscalid	9,8	343,0399	7,8	1,3	5,2	-3,4	-4,5	-9	23,2
Fenhexamid	9,8	302,0709	10,6	1,9	10	1,1	0,5	-4,6	21,4
Bromuconazol(II)	9,86	377,9590	-0,1	-4,7	2,9	-7,1	-12,4	-4,7	3
Etoprofos	9,86	243,0637	12,2	4,7	12,3	3,4	-5,3	-11,2	13,1
Fluquinconazol(I)	9,86	376,0163	6,1	-2,4	7	0,1	-9,8	-5,8	8,6
Propizamida	9,89	256,0290	7	1	8,7	-1,8	-9,2	-7,6	4,6
Mandipropamid	9,91	412,1310	18,6	8,5	15,4	7,4	9,4	-6,2	17,4

Pesticida	tR (min)	Cuantificador (m/z)	Naranja I	Naranja II	Naranja III	Naranja IV	Mandarina I	Mandarina II	Limón
Tebuconazol(I)	9,94	308,1524	0,6	-6	3,1	-8,3	-13,6	-1,6	0,1
Buprofezin	9,99	306,1635	27,2	1,9	-8,3	-4,4	-84,9	-0,4	3,4
Tetraconazol	10,06	372,0288	4,5	-2,4	6,1	-4,6	-8,1	0,5	2,1
Flusilazol	10,14	316,1076	1,4	-5,3	-0,1	-5,9	-9,5	-3,1	-0,5
Diflubenzuron	10,2	311,0393	9,1	-0,1	3,3	-6,4	-8,2	-15,9	-1
Fenbuconazol(I)	10,22	337,1215	4,7	-2	4,9	-4,8	-8,5	-2,9	3,9
Bitertanol	10,23	338,1863	3,6	-3,6	4,4	-5,2	-13,1	-2,4	3,3
Hexaconazol(I)	10,23	314,0821	-0,8	-5,5	1,3	-6,8	-10,8	-2,3	-1,1
Penconazol(I)	10,24	284,0716	1,3	-4,1	3,3	-5,6	-11,5	-4,2	2,6
Metconazol(I)	10,32	320,1524	1,8	-3,8	3,3	-4,4	-10,5	-0,9	-0,1
Haloxifop	10,4	362,0401	2,8	-6,9	2,3	-7,2	-7,3	-2,9	2,9
Rotenona	10,46	395,1489	16,3	3,9	11,3	5,5	6,8	5,6	35,4
Triazofos	10,49	314,0723	6	-1	5,4	-2,9	-9,3	-10	6,1
Malation	10,52	331,0433	13,8	9,5	14,6	7,4	-1,2	-6,4	12,9
Diniconazol(I)	10,56	326,0821	0,6	-5,4	1,9	-6,9	-11,3	-2,1	-1,9
Clorfenvinfos(I)	10,93	358,9768	9,7	16,1	13	4,1	-1,6	-8,6	9,7
Difenconazol	10,94	406,0720	-0,7	-5,9	3,5	-7,5	-14,3	-4,9	-7,3
Pirimifos-metil	11,07	306,1036	33,9	-4,8	-8,1	-6,3	-13	-7	-2,1
Triflumuron	11,18	359,0405	17,9	8,2	23,6	10,8	-1,5	-1,1	9,6
Piraclostrobin	11,49	388,1059	17,9	20,5	17,3	6,1	1,6	31,7	12,1
Zoxamida	11,49	336,0319	15,1	11,8	16,1	3,8	-2,4	4,8	8,9
Quinoxifen	11,67	308,0040	-4,8	-12,2	-2,4	-9,6	-18,9	-7,4	-15,8
Pencicuron	11,79	329,1415	7	2,4	6,3	0,1	-11,1	-13,4	1,4
Profenofos	12,08	374,9402	6,8	-0,9	6	-0,7	-6,1	-6,1	1,6
Tebufenpirad	12,17	334,1681	7,1	-1,6	5	-0,1	-11	-7,6	-5,4
Indoxacarb	12,27	528,0780	22,9	11,3	24,5	8,3	0,1	-2,5	9,5

Pesticida	tR (min)	Cuantificador (m/z)	Naranja I	Naranja II	Naranja III	Naranja IV	Mandarina I	Mandarina II	Limón
Trifloxistrobina	12,34	409,1370	12,2	3,4	11,4	2,3	-7,3	-13,2	-2,8
Fenazaquin	12,61	307,1805	-34,2	-36,5	-35,7	-20	-41,3	-39	-27,4
Hexitiazox	13,18	353,1085	10,3	-0,9	3,8	3,5	-10,3	-0,8	0,6
Fenpiroximato	13,2	422,2074	8,4	-0,2	6,7	1,7	-9,8	4,6	-3,3
Etion	13,4	384,9949	36	25,8	35,7	26,4	15,6	7,9	-15,8
Piridaben	13,91	365,1449	44,7	20	39,2	28,8	20,4	29,3	13,4

Tabla 4.3. Pesticida, ion de cuantificación, tiempo de retención (tR-min) y porcentaje de efecto matriz (% EM) en cada variedad cítrica.

En todas las variedades y especies cítricas, un porcentaje importante de analitos no presentó ningún efecto matriz (Figura 4.3a). El EM en mandarinas fue negativo para alrededor del 20 % de los compuestos en estudio, mientras que en naranja y limón solo alrededor del 8 % de los pesticidas estudiados tienen el mismo comportamiento. Además, se observó un aumento de la respuesta del analito en el 12 % de los pesticidas en naranjas y en el 24 % de ellos para limón. Seis pesticidas: tiametoxam, triclorfón, imidacloprid, acetamiprid, tiodicarb y piridabeno, mostraron un efecto matriz positivo para todas las variedades de cítricos evaluadas y sus diferentes especies. Los EM son globalmente diferentes para HRTof (MS) que QqQ MS/MS. Como se indicó anteriormente, en el presente estudio, alrededor del 75 % de los compuestos mostraron un efecto matriz bajo (<20 %) en las diferentes especies de cítricos y variedades estudiadas, mientras que, cuando se realizó un análisis de residuos de pesticidas con espectrómetros QqQ, el 70 % de los analitos mostró un fuerte EM. Los informes de la literatura muestran que para los extractos de QuEChERS de naranja, el 35 % de los pesticidas estaban libres de efectos de la matriz antes de la dilución, el 48 % necesitaba una dilución hasta un factor de dilución de 15 y el 17 % de los compuestos aún sufría fuertes efectos de la matriz, incluso con factor de dilución de 100 (utilizando UHPLC-MS/MS) (C. Ferrer, et al., 2011). En contraste, este trabajo demostró que la espectrometría de masas de alta resolución causó efectos de matriz significativos para solo el 20 % de los pesticidas en estudio a un factor de dilución de 1:5. Aunque la situación más común y reportada para la ionización ESI en QqQ es la supresión de iones se han informado efectos de matriz elevados para algunos pesticidas como tifenulfuron metilo, imidacloprid, ometoato, triflumizol cuando se analizan extractos de naranjas en busca de residuos de pesticidas (Kwon, et al., 2012). Sin embargo, los mismos pesticidas evaluados en otras matrices (manzana, espinaca o arroz) no presentaron el mismo comportamiento (Kwon, et al., 2012). Se pueden tener en cuenta dos hechos diferentes con el objetivo de tener una explicación completa de estos resultados. En primer lugar, centramos nuestro interés en la eficiencia de la transmisión en los instrumentos QqQ, que es bajo en espectrómetros equipados con lentes de enfoque electrónico. Cuando se pasa de Q1 a Q2 y de Q2, después de la colisión, a Q3, solo se transmite una pequeña parte de los iones. La enorme selectividad proporcionada por las transiciones de padres a hijos en los experimentos de MS/MS tándem QqQ puede superar esta brecha.

EM en variedades cítricas

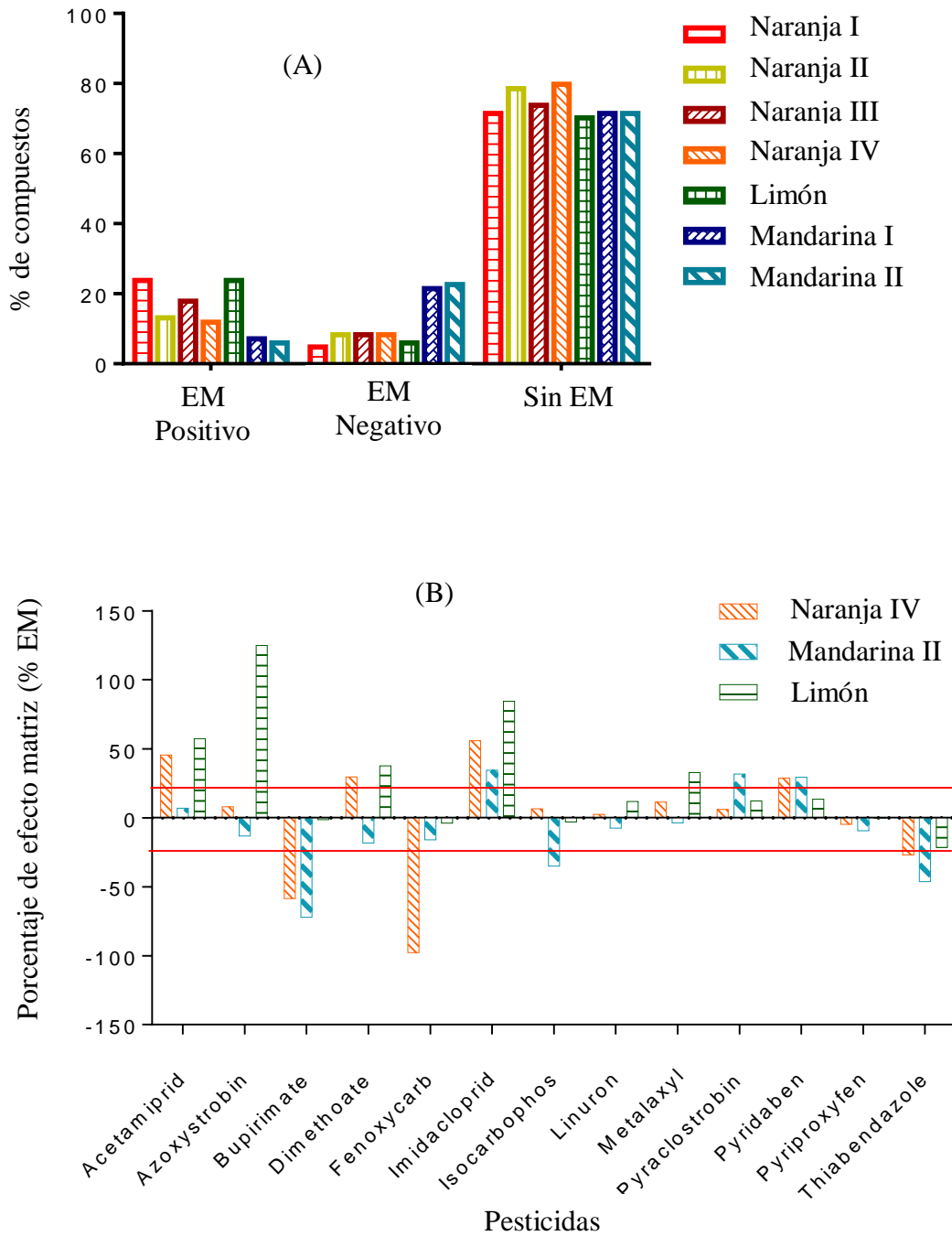


Figura 4.3. a) Porcentaje de compuestos agrupados según su efecto matriz (EM): positivo y negativo, sin EM, b) Porcentaje de efecto matriz para algunos analitos en las 3 especies de cítricos.

En el caso de los instrumentos de tiempo de vuelo, todos los iones llegan al detector. En este tipo de espectrómetros, podemos encontrar un efecto de matriz "puro" causado solo en la explosión de Coulomb en la etapa de ionización y las interferencias se deben a que

los compuestos eluyen exactamente al mismo tiempo de retención del pesticida (Stahnke, et al., 2012). El segundo punto es la alta selectividad que puede proporcionar un instrumento capaz de medir masas exactas (errores <5 ppm). Si la evaluación del efecto matriz en el ión $[M+H]^+$ se realiza utilizando la exactitud de masa de un QqQ estándar, el EM será mayor que en un instrumento de alta resolución. La celda de colisión está muy llena y podrían producirse colisiones entre los iones, lo que reduce la cantidad global de transmisión de iones. La misma falta de especificidad conduce a un mayor número de iones que llegan al detector. Al comparar el rendimiento de los espectrómetros HR/MS y QqQ MS/MS, se estableció una potencia de resolución superior a 50000 como punto de cruce donde los instrumentos de alta resolución son superiores al QqQ estándar para la identificación y determinación de compuestos traza. Sin embargo, aunque el instrumento empleado tiene una resolución de 18000, los efectos de la matriz se minimizan. Sólo se observaron unos pocos EM positivos debido a las interferencias con los compuestos de matriz donde la resolución no fue lo suficientemente alta como para discriminar entre las masas. Los resultados refuerzan las ventajas de HR/MS con respecto a los sistemas MS/MS (Kaufmann, Butcher, Maden, Walker, & Widmer, 2010).

Los pesticidas individuales mostraron diferente comportamiento dependiendo de la matriz analizada. Algunos de ellos mostraron el mismo tipo de EM para las tres especies de frutas evaluadas aunque de diferente magnitud, como fenazaquin o acetamiprid, pero en otros casos, como clotianidina o tiametoxam, una de las matrices de cítricos causó un EM inverso. Se observaron algunos casos sorprendentes: espiroxamina, mostró un 30-40 % de ME negativo en naranjas y mandarinas, pero un ME insignificante en limones, como muestra la Figura 4.3b. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias en la EM entre las variedades de cítricos, mientras que el EM entre las variedades de la misma especie muestra diferencias interesantes en el caso de la manzana, como ya informó Krueve *et al.* (Krueve, Kunnapas, Herodes, & Leito, 2008).

En el análisis de rutina, se podrían obtener algunos resultados controvertidos si la cuantificación se realiza utilizando curvas de matriz de otras especies. Como consecuencia, un segundo análisis a la concentración detectada es altamente recomendado, según lo establecido por las directrices de la DG SANTE (DG-SANTE, 2015). El EM total que afecta a la cuantificación está influenciado por el propio EM de la variedad que se está analizando más la de la variedad utilizada para la cuantificación.

Las curvas de calibración en matriz en naranjas no mostraron EM mayores al 20 %. Sin embargo, si se utiliza una curva de calibración en naranja para cuantificar mandarinas y limones, los resultados son diferentes y los EM son superiores al 20 % en muchos casos. Los compuestos que sufrieron los efectos matriciales más fuertes no fueron los mismos en cada caso. El tiametoxam mostró un $EM > 100\%$ en todas las especies estudiadas, el EM observado al usar la curva de calibración en matriz de la variedad específica se redujo a valores por debajo del 30 % de EM. Por otro lado, la espinosina A y el bupirimato que mostraron poco EM en limón, cambiaron a 60-70 % en naranja y mandarina. Los resultados obtenidos confirman que se deben obtener resultados más exactos cuando se utilizan las curvas de calibración de análisis de residuos de pesticidas preparados en las mismas especies de frutas en estudio, destacando también la importancia de usar la misma variedad de cítricos en busca de un correcto procedimiento de cuantificación.

Análisis de posibles interferencias.

Las interferencias que co-eluyen con pesticidas y tienen el mismo ión fragmento que los analitos en estudio son habituales en cuadrupolo simple y QqQ-MS/MS. Los poderosos instrumentos como HR-AMS pueden superar parcialmente este problema ajustando tanto el tiempo de retención como la ventana de masa exacta. Se analizaron las posibles interferencias para cada pesticida en las diferentes matrices cítricas. En cada blanco de variedad de cítricos, se estableció una ventana estrecha de $\pm 0,1$ min y ± 5 ppm de error para obtener el fragmento $[M+H]^+$ de cada pesticida en estudio en un extracto dado y se observaron pocas interferencias. Por ejemplo, en todas las matrices estudiadas, cuando el ion cuantificador (256,0596) de imidacloprid se extrae en una ventana estrecha de 5 ppm, aparece una interferencia isobárica en el mismo tiempo de retención (Figura 4.4).

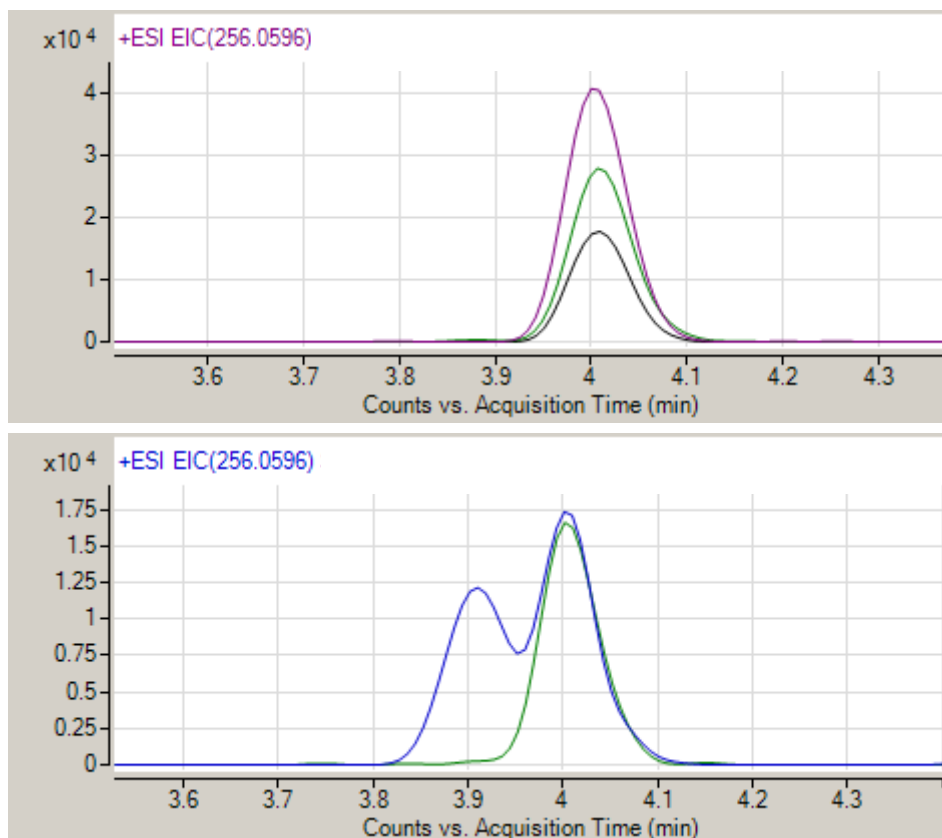


Figura 4.4. Ion extraído usando una ventana de extracción de ± 5 ppm para imidacloprid (m/z 256,0596) utilizando UHPLC-ToF-MS. A) Interferencia de la matriz presente en naranja (violeta), mandarina (verde) y limón (negro). B) Extracto de limón blanco (verde) superpuesto con un extracto fortificado con imidacloprid a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (azul).

Evaluación de componentes co-extraídos.

Los extractos de cítricos para el análisis de residuos de pesticidas contienen miles de compuestos naturales extraídos (Gomez-Ramos, Ferrer, Malato, Aguera, & Fernandez-Alba, 2013) que eluyen a lo largo de la cromatografía a diferentes niveles de concentración. Aquellos en altas concentraciones saturan el detector ToF y podrían dificultar la detección de los residuos buscados durante esos minutos de elución. Los compuestos co-extraídos en la matriz pueden causar problemas en la etapa de ionización y en los sistemas de detección de los instrumentos analíticos. El número, la cantidad y la distribución cromatográfica de los componentes de la matriz dependen de la matriz en particular, incluso entre los incluidos en la misma categoría de productos según las directrices de la UE (Gomez-Ramos, et al., 2013). Para evaluar adecuadamente el EM, se realizó un estudio secuencial. Los analitos extraídos conjuntamente se evaluaron utilizando el algoritmo del “extractor de características moleculares” (MFE) del software Mass Hunter Workstation. Esta herramienta analiza el cromatograma buscando

agrupar todos los iones que pueden unirse con un pico cromatográfico real y puede representar una característica de un compuesto. Además, el software MFE crea una lista compuesta de todos los picos en el archivo de datos que representan moléculas reales. En este trabajo, solo se consideraron los compuestos con una altura absoluta igual o superior a 10000 conteos. En los extractos de naranjas se encontraron entre 10994 y 11522 componentes, de los cuales 8059 son comunes para todas las variedades. En el caso de los extractos de mandarina, se encontraron 12966 y 12555 componentes respectivamente, mientras que en el limón 11142, 20 a 40 % más que los co-extractivos obtenidos utilizando el método CEN (Gomez-Ramos, et al., 2013). Entre las tres especies evaluadas solo 5250 compuestos, el 50 % del total de compuestos, estaban en común. Aplicando este tipo de análisis de datos, se detectaron 8017 coextractivos en extractos de naranja QuEChERS después del análisis por UHPLC-ToF-MS (Gomez-Ramos, et al., 2013). Una comparación preliminar de estos resultados muestra que los extractos de QuEChERS son más limpios que los de EtOAc para el análisis de residuos de pesticidas de cítricos. El diagrama 2D en la Figura 4.5 muestra la complejidad de los extractos de EtOAc y la distribución e intensidad de pesticidas a lo largo de una prueba de UHPLC. Muchos de los pesticidas eluyeron en la región del cromatograma donde más co-extractivos eluyen. De su interacción surge el EM observado, pero después de 10 min de corrida cromatográfica, la presencia de co-extractivos fue menor.

Como consecuencia, se redujo el EM para los 37 pesticidas que se detectan entre 10 y 14 min. Este hecho significa que para más del 40 % de los pesticidas en estudio, los efectos de la matriz son insignificantes, lo que señala la importancia de la separación cromatográfica antes de la determinación de MS. Si las muestras se inyectan directamente al espectrómetro como se ha sugerido (Nanita, 2013), a pesar del poder de alta resolución de los nuevos instrumentos, no se podrían evitar los efectos de matriz para estos pesticidas, ya que alcanzarían el detector MS simultáneamente con los componentes de la matriz. No solo interfiere con la determinación, sino que también satura el detector.

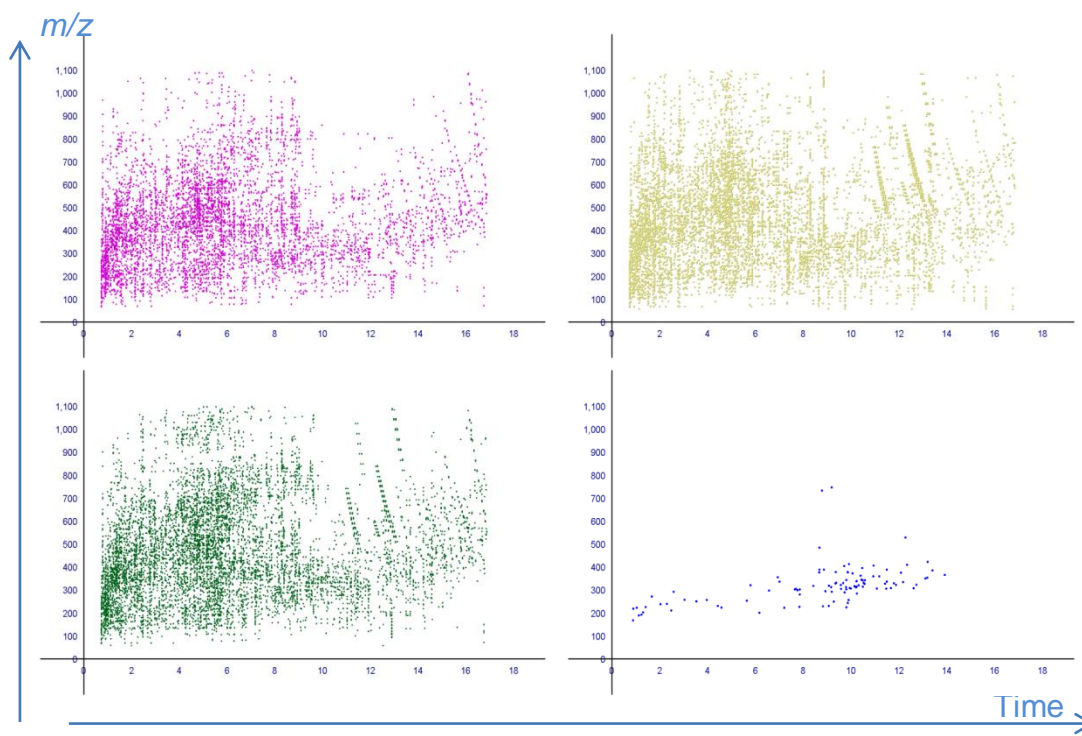


Figura 4.5. Mapeo de co-extractivos de cítricos analizados por UHPLC-ToF-MS: limón (verde oliva), mandarina (verde oscuro), naranja (rosado) y pesticidas estudiados (azul).

Identificación de co-extractivos.

Aprovechando los sistemas HR-AMS que permiten la selección y la identificación tentativa de los compuestos objetivo y no objetivo (S. Grimalt, V. Sancho, Pozoa, & Hernández, 2010), se analizó el perfil de los co-extractivos de cada matriz. Aunque no se observaron diferencias importantes en la composición de los co-extractivos entre naranjas y mandarinas, un análisis de componentes principales (PCA) muestra una clara diferenciación entre las tres especies de cítricos. Se formaron grupos separados para cada especie mientras que las diferentes variedades se agruparon entre sí (ver Figura 4.6)

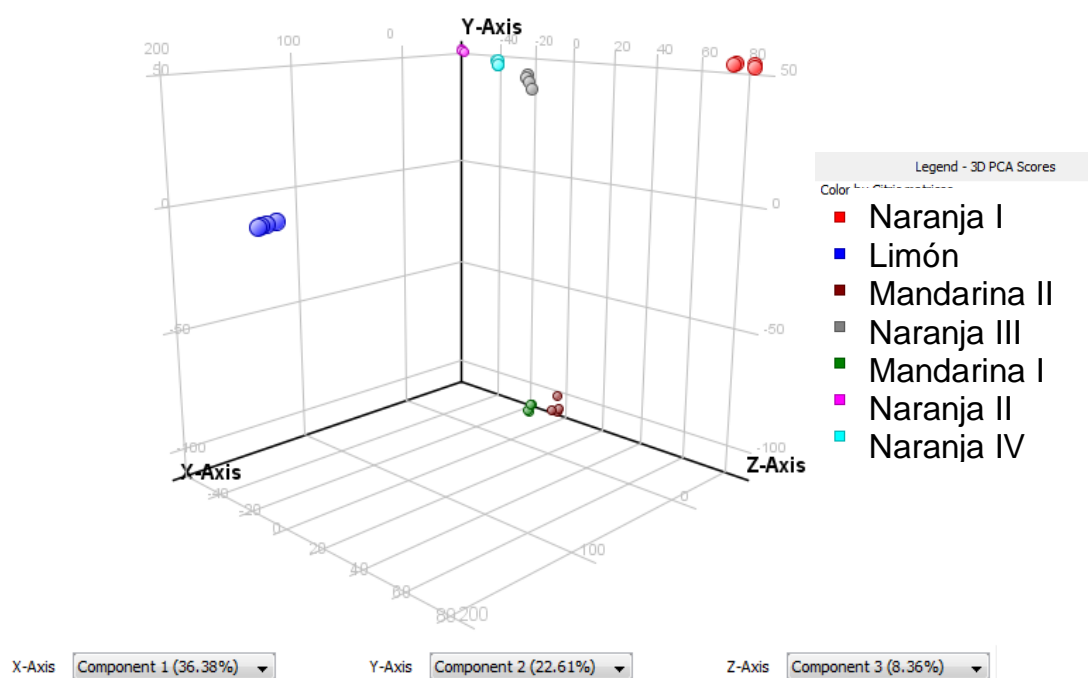


Figura 4.6. Análisis de Componentes Principales (PCA) incluyendo todos los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo de las variedades cítricas en estudio. Cada eje está compuesto por un porcentaje de cada componente.

Para identificar los co-extractivos más importantes, se realizaron diluciones de 50x, 25x y 5x. En estas condiciones, los compuestos detectados fueron principalmente polifenoles, glucósidos y agliconas de flavonoides, ácidos grasos, limonoides y un alcaloide. Los flavonoides hesperidina, y algunos de sus isómeros, neohesperidina, hidrato de meranzina, naringenina y muchas polimetoxiflavonas fueron detectadas. Se identificaron limonoides tales como limonina y nomilina (Tabla 4.4). La identificación de los productos naturales se realizó en función de sus masas exactas, sus patrones de abundancia isotópica y la comparación con los estándares y la ruta de fragmentación. El uso de patrones isotópicos para fines de identificación es un indicador valioso del alto grado de selectividad que se puede obtener con los instrumentos HR-AMS (Gilbert-López, et al., 2012). El software combina la masa exacta de las señales isotópicas características y la distancia en el eje m/z entre ellas para proporcionar un coeficiente que estima qué tan similar es el espectro de masas experimental cuando se compara con la teórica obtenida utilizando la composición elemental del producto natural. La Figura 4.7 muestra la fragmentación de la hesperidina, un glucósido de flavanona.

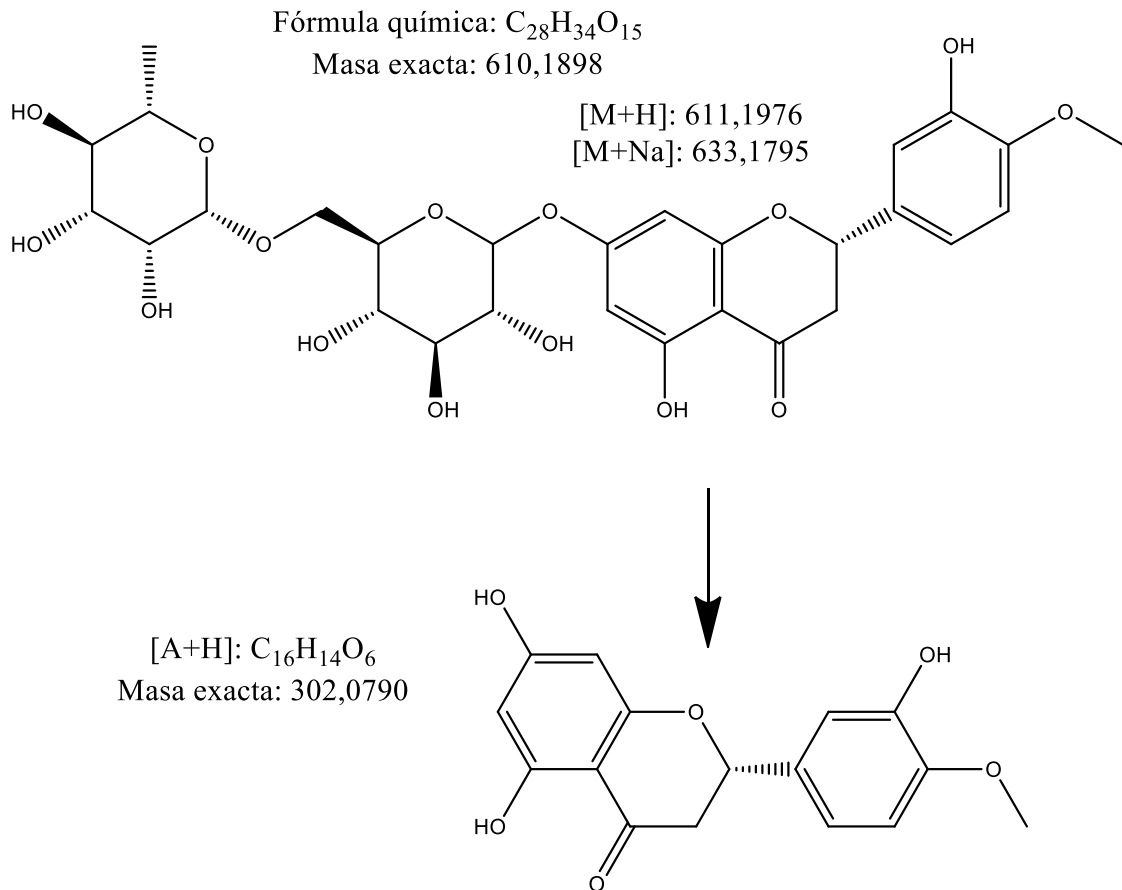


Figura 4.7. Patrón de fragmentación de hesperidina durante la etapa de ionización empleando un UHPLC-ESI-ToF

Fórmula molecular	Rt (min)	Masa exacta neutra	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[A+H] ⁺	Compuesto	Cuantificador ¹³ C	M
C9H13NO2	0,84	167,0946	168,1025	190,0844	-	Sinefrina		
C6H8O7	0,92	192,0270	193,0348	215,0168	-	Ácido cítrico		
C27H32O14	3,50	580,1793	581,1871	603,1690	273,0763	Naringina		
C28H34O15	3,80	610,1898	611,1976	633,1795	303,0869	pseudoneohesperidina		
C28H34O15	4,17	610,1898	611,1976	633,1795	303,0869	Hesperidina	[13C]C27H34O15	611,1931
C28H34O15	4,49	610,1898	611,1976	633,1795	303,0869	Neohesperidina		
C15H18O5	4,95	278,1154	279,1232	301,1052	-	Meranzina hidrato		
C28H34O14	5,67	594,1949	595,2027	617,1847	287,0919	Poncirina		
C15H12O5	6,72	272,0685	273,0763	295,0582	-	Naringenina		
C20H20O7	7,08	372,1209	373,1287	395,1107	-	C20H20O7 Polimetoxi-flavona_1	[13C]3C17H20O7	375,1310
C21H22O8	7,45	402,1315	403,1393	425,1212	-	C21H22O8 Polimetoxi-flavona_1	[13C]C20H22O8	403,1348
C20H20O7	7,73	372,1209	373,1287	395,1107	-	C20H20O7 Polimetoxi-flavona_2	[13C]3C17H20O7	375,1310
C15H16O4	8,02	260,1049	261,1127	283,0947	-	Meranzina		
C21H22O8	8,10	402,1315	403,1393	425,1212	-	C21H22O8 Polimetoxi-flavona_2	[13C]C20H22O8	403,1348
C26H30O8	8,29	470,1941	471,2019	493,1839	-	Limonina	[13C] C25H30O8	471,1974
C21H22O8	8,30	402,1315	403,1393	425,1212	-	C21H22O8 Polimetoxi-flavona_3	[13C]3C18H22O8	405,1415
C22H24O4	8,76	432,1420	433,1493	455,1313	-	Heptamethoxyflavone		
C28H34O9	8,85	514,2203	515,2281	537,2101	-	Nomilina		
C20H20O7	9,01	372,1209	373,1287	395,1107	-	C20H20O7 Polimetoxi-flavona_3	[13C]3C17H20O7	375,1310
C21H22O8	9,58	402,1315	403,1393	425,1212	-	C21H22O8 Polimetoxi-flavona_4	[13C]2C19H22O8	404,1382
C18H30O2	13,80	278,2246	279,2324	301,2144	-	Ácido Linolénico		
C18H32O2	14,58	280,2402	281,2480	303,2300	-	Ácido Linoleico		
C18H34O2	15,38	282,2559	283,2637	305,2457	-	Ácido Oleico		

Tabla 4.4. Fórmula molecular, tiempo de retención R_t (min), masa neutra exacta y masa exacta de $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ y $[A+H]^+$ (A es la aglicona correspondiente). Para evitar problemas de saturación del detector por los diferentes productos naturales, se realizaron cálculos de masa exacta para el isómero que contiene uno o dos ^{13}C : fórmula molecular y ión ^{13}C exacto se presentan.

Para determinar con precisión el tiempo de retención y evitar los problemas de saturación del detector por los diferentes productos naturales, se realizaron cálculos de masa exacta para el isómero que contiene uno o dos ^{13}C , como se muestra en la Tabla 4.4. Muchos de los productos naturales identificados estaban presentes en todas las matrices de cítricos, pero en diferentes concentraciones. La matriz más diferente fue limón, donde se pudo identificar ácido cítrico, pero no se detectaron el alcaloide sinefrina y algunos flavonoides en esta especie.

Influencia de co-extractivos específicos en los efectos de la matriz.

La presencia de productos naturales de frutas cítricas conocidos, como los flavonoides y limonoides, puede explicar el efecto de matriz global que sufrieron algunos analitos durante el análisis. Por ejemplo, la sinefrina y el ácido cítrico eluyeron conjuntamente con la triazina, cromazina, mientras que una heptametoxiflavona cuyo tiempo de elución es de 8,65 a 8,95 min influye en la determinación del clorotraniliprol, dimetomorf, espinosina A y paclobutrazol (Tabla 4.5). Influencia similar causó la poncirina y polimetoxiflavonas $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$ que eluyeron conjuntamente con tiacloprid, fenamifos, carbofuran, flutriafol, espiroxamina, fenoxicarb y ciprodinilo. El tiempo de retención exacto de elución de neohesperidina fue de $t_R = 4,17$ min, (x50 dil) pero bajo las condiciones de análisis de residuos de pesticidas (x5 dil) eluyó entre 4,05-4,30 min, donde se superpone con imidacloprid, lo que provocó un EM positivo para este pesticida (60,8 a 84,9 %)

Las enormes cantidades de algunos de los co-extractivos identificados pueden saturar el detector durante varios minutos al mismo tiempo que co-eluyen con algunos de los pesticidas en estudio, lo cual puede dificultar su determinación. Se necesita realizar más trabajo sobre la influencia de los co-extractivos individuales para comprender su influencia específica en los efectos de la matriz.

Producto natural	Rango de elución (min)	Pesticida que co-eluye	EM (%)						
			Naranja I	Naranja II	Naranja III	Naranja IV	Mandarina I	Mandarina II	Limón
Sinefrina	0,80-0,93	Ciromazina	11,9	-7,2	-16,0	-17,3	-26,0	-77,2	-34,9
Ácido cítrico	0,82-1,05	Ciromazina	11,9	-7,2	-16,0	-17,3	-26,0	-77,2	-34,9
Pseudoneohesperidina	3,72-3,88	Imidacloprid	81,5	81,2	84,9	55,9	60,8	34,5	84,5
Naringina	3,32-3,66	Clotianidina	2,5	-5,8	-6,7	-10,2	-26,3	-27,9	23,3
Poncirina	5,52-5,75	Tiacloprid	24,0	4,7	15,1	13,6	-27,8	-45,6	39,7
		Fenamifos sulfoxido	38,1	34,9	39,3	28,5	9,9	3,4	26,6
C20H20O7 Polimetoxiflavona 1	6,97-7,25	Fenamifos sulfona	29,5	19,0	26,6	12,7	12,2	2,6	35,2
		Carbofuran	10,8	-0,7	2,8	1,9	-11,3	-19,0	11,1
C20H20O7 Polimetoxiflavona 2	7,55-7,95	Flutriafol	-17,8	-30,0	-17,8	-27,3	-31,7	-27,1	2,8
		Espiroxamina	-11,0	-31,1	-29,5	-30,4	-42,8	-37,7	5,3
		Fenoxicarb	29,5	-4,2	-8,0	-6,3	-23,2	-16,0	-4,0
		Ciprodinil	8,4	-16,2	-14,5	-15,2	-45,7	-42,5	-5,3
		Metalaxil	25,8	25,2	25,0	11,3	10,2	-3,8	32,8
C21H22O8 Polimetoxiflavona 3	8,20-8,50	Bupirimate	-55,8	-60,3	-54,7	-58,5	-75,7	-72,1	-1,3
Heptametoxiflavona	8,65-8,95	Clorantraniliprol	14,2	-1,5	10,2	0,0	-6,0	-21,0	21,3
		Dimetomorf E	16,1	2,4	9,7	0,4	-0,7	-8,5	22,4

		Espinosina A	-48,9	-64,3	-52,0	-63,8	-47,1	-46,9	7,4
		Dimetomorf Z	38,4	7,2	51,1	-4,4	-23,3	-21,4	58,5
		Paclobutrazol	-2,4	-8,6	0,2	-7,1	-17,4	-9,3	3,0
Nomilina	8,75-8,95	Dimetomorf Z	38,4	7,2	51,1	-4,4	-23,3	-21,4	58,5
		Paclobutrazol	-2,4	-8,6	0,2	-7,1	-17,4	-9,3	3,0
		Paclobutrazol	-2,4	-8,6	0,2	-7,1	-17,4	-9,3	3,0
		Terbutilazina	-19,8	-26,0	-15,0	-21,8	-65,2	-56,8	21,4
C20H20O7 Polimetoxiflavona 3	8,88-9,25	Triticonazol	-3,4	-9,9	-1,2	-9,7	-42,7	-34,2	8,6
		Isocarbofos	-7,0	-13,0	-3,2	6,5	-45,2	-35,0	-3,0
		Espinosina D	18,5	15,6	18,9	14,7	-6,8	-8,3	30,3
C21H22O8 Polimetoxiflavona 4	9,52-9,67	Iprovalicarb	7,9	1,6	11,4	0,6	-23,1	-23,7	15,9
		Fenamifos	12,5	5,7	12,8	4,1	-15,1	-15,5	24,5

Tabla 4.5. Productos naturales identificados y pesticidas de co-elución con su efecto matriz en cada variedad de cítricos. En negro, el producto natural no está presente en esta matriz específica.

4.3. Conclusiones

En las dos secciones anteriores, del trabajo con instrumental analítico de masa exacta se desprenden resultados de gran relevancia. Por un lado, trabajando con un cromatógrafo de gases con espectrometría de masa exacta (GC-ToF-MS) en modo de ionización IE, se estudiaron los parámetros operacionales y se desarrolló un método automatizado rápido para la determinación de residuos de pesticidas en naranjas utilizando una base de datos de masa exacta "desarrollada en el laboratorio". La base de datos de 110 pesticidas, que incluye el tiempo de retención y dos iones por compuesto, se aplicó a la identificación automática de pesticidas en naranja. Esta base de datos "interna" es una herramienta excelente si se tiene en cuenta que no se dispone de bibliotecas de masa exacta comercial; pero aún necesita mejoras y se debe ampliar el alcance. La identificación automática se realizó y se comparó con dos potencias de resolución, mostrando mejores resultados en el modo de alta resolución. Se desarrolló un método de escaneo completo rápido y automático y se demostró una confiabilidad de identificación 87 % un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Además, se desarrolló un método de cuantificación seleccionando dos iones por compuesto, el tiempo de retención y una abundancia relativa $\leq 30 \%$ entre las muestras reales y el estándar, como criterios de identificación. El pico base del espectro de masas se usó como ion cuantificador y el más abundante con respecto al pico base como ion de confirmación. Finalmente, es importante tener en cuenta que, al trabajar en el modo de adquisición de *full scan*, es posible un análisis retrospectivo, lo que permite la búsqueda de compuestos inicialmente no incluidos en la base de datos.

Por otro lado, se estudió el efecto matriz (EM) de los extractos de acetato de etilo de siete frutas cítricas diferentes en la determinación de 80 residuos de pesticidas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo de alta resolución (UHPLC- (ESI) -HR-ToF) a modo de resolución de 4 GHz. Solo el 20 % de los pesticidas evaluados mostraron EM notable, debido a la co-elución con productos naturales entre $t_R = 3-11$ min. El Análisis de Componentes Principales de los co-extractivos detectados, agrupa las mandarinas y las variedades de naranja entre sí, pero separa el limón, la naranja y la mandarina. Los EM fueron diferentes entre las especies pero similares entre las variedades, lo que obliga a determinar los residuos de pesticidas a través de curvas de calibración de la misma fruta. Veintitrés productos naturales (sinefrina, naringina, poncirina, glucósidos de hesperitina, limonina nomilina y algunos ácidos grasos entre otros) se identificaron en los extractos analizados. Doce de los compuestos identificados co-eluyeron con 28 de los pesticidas en estudio, causando diferentes EM.

CAPÍTULO III: Estudios de disipación de pesticidas de pre y poscosecha usados en la producción cítrica.

5.1. Introducción

Los árboles cítricos son muy productivos. Por ejemplo, un árbol de mandarina de diez años puede producir entre 150-180 kg de frutas frescas. Esta capacidad productiva de las plantas de cítricos sustenta el negocio internacional de cítricos. La fruta fresca tiene una vida media larga, que puede extenderse con almacenamiento en frío, lo que permite que la fruta pueda venderse en el extranjero. En particular, los cítricos son las principales exportaciones de fruta fresca de Uruguay donde naranja, mandarina y limones representan el 52, 34 y 14 % del total de frutas cítricas exportadas, respectivamente, siendo Clementina la principal variedad de mandarina exportada (DIEA, 2017). Sin embargo, las plantas de cítricos son vulnerables a los insectos y al ataque de hongos durante los pasos previos y posteriores a la cosecha. En el campo, durante la temporada de cultivo, los cítricos son susceptibles a los insectos como *Phyllocnistis citrella* (minador de cítricos), la mosca de la fruta u hongos como *Alternaria spp.* y *Phyllosticta citricarpa* (mancha negra de los cítricos) que causan enfermedades graves que ponen en peligro la productividad general (Rodríguez, et al., 2010; Shinde, et al., 2017; Timmer, et al., 2003). Mientras después de la cosecha, la principal plaga de los cítricos es el moho verde, *Penicillium digitatum*, que crece sobre las frutas incluso durante el almacenamiento en frío (Altieri, et al., 2013; J. Lado, et al., 2010).

Para mejorar la productividad y proteger el cultivo contra plagas y pestes, actualmente se aplican diferentes pesticidas en las distintas etapas de la cadena de producción. En el campo, cuando la fruta aún está en desarrollo, se aplican fungicidas e insecticidas de diferentes familias químicas. Como los residuos de pesticidas y sus metabolitos con relevancia toxicológica permanecen en los alimentos después de la aplicación, el control del nivel de los mismos es crucial para garantizar la seguridad de los alimentos. Es bien sabido que incluso a nivel de traza pueden ser perjudiciales para la salud humana (Chen, Jiao, Su, Zhao, & Sun, 2015). Como consecuencia, las regulaciones internacionales son cada vez más restrictivas y los límites máximos de residuos (LMR) de pesticidas se

revisan y actualizan periódicamente. Por esta razón, las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) deben adaptarse en consecuencia. Un factor clave para el cumplimiento de las BPA es el estudio de las tasas de disipación del pesticida para establecer intervalos seguros previos a la cosecha (PHI), dando lugar a estrategias de control de plagas eficientes para garantizar el bienestar de los consumidores. EL PHI es el tiempo requerido después de la última aplicación del pesticida para disiparse al nivel de concentración seguro (inferior al LMR) (Dong, et al., 2018).

Los pesticidas se disipan en el medio ambiente después de la aplicación. Los procesos de disipación de pesticidas son complejos y dependen de sus propiedades fisicoquímicas, pero también de su degradabilidad por procesos bióticos y abióticos (Farha, et al., 2016; Navarro, et al., 2001). Después de la prohibición de los organoclorados más persistentes, se ha hecho un esfuerzo para garantizar la degradabilidad y la mínima bioacumulación de las nuevas moléculas. Una vez que se logra su acción protectora, deben desaparecer como tales. Como podría tratarse de más de un mecanismo que actúa sobre la disipación de pesticidas, generalmente se asume que la cinética de estos procesos sigue una ecuación de pseudo primer orden que depende únicamente de la concentración del compuesto en estudio. Este supuesto permite la determinación de la vida media (tiempo necesario para reducir la concentración del pesticida en la matriz en estudio al 50 %), un parámetro importante que se utiliza para establecer los intervalos precosecha, así como el cumplimiento de los LMR legales y así garantizar el consumo seguro de alimentos (Karmakar & Kulshrestha, 2009)

Una cuestión clave para establecer intervalos de precosecha precisos y seguros es tomar en cuenta que la disipación de pesticidas depende no solo de las propiedades químicas del compuesto sino también de las condiciones ambientales que rigen su comportamiento. La temperatura, la humedad, la lluvia, la luz solar y la biota son los principales parámetros responsables de la disipación de pesticidas y cambian de una región a otra (Navarro, et al., 2001). Aunque las condiciones climáticas en Uruguay son particularmente suaves, el invierno es generalmente húmedo, pero las heladas son comunes, con temperaturas que oscilan entre 5 y 15 °C. Mientras que en verano, dependiendo del fenómeno climático “El Niño o La Niña”, puede ser seco y cálido (temperatura promedio de alrededor de 30 °C, temperatura máxima de hasta 45 °C) o incluso lluvioso, siempre con tasas relativamente altas de Radiación UV típica de la

capa de ozono reducida en el sur de Sudamérica (Álvarez & De Souza Rocha, 2010; Tiscornia, Cal, & Giménez, 2016). Estas variaciones climáticas podrían afectar las tasas de disipación de pesticidas en condiciones de campo. Por lo tanto, las condiciones ambientales particulares de cada región geográfica obligan a los agricultores a conocer la vida útil de los residuos de pesticidas en la fruta. Como se demostró ampliamente, la PHI recomendada que se estudia en otras regiones del mundo no siempre se aplica. La tasa de disminución de un pesticida puede variar entre diferentes ubicaciones geográficas debido a factores tales como el clima, las prácticas de cultivo y las condiciones del suelo (FAO, 1997).

Muchos estudios han informado la presencia de imidacloprid (M. Chen, Tao, McLean, & Lu, 2014; Picó, El-Sheikh, Alfarhan, & Barceló, 2018), piraclostrobin (Suárez-Jacobo, et al., 2017) y difenoconazol en naranjas (Ortelli, et al., 2005). Se estableció claramente que el comportamiento de disipación de estos compuestos en condiciones de campo depende de diversos factores, incluidas las especies de plantas, la formulación química, el método de aplicación, las condiciones climáticas y las características de crecimiento de los cultivos (Fantke, et al., 2014; Fantke & Juraske, 2013; Hanson, Bond, Buhl, & Stone, 2015). En consecuencia, los estudios de disipación para una fruta dada en las condiciones específicas de cultivo de la región de cultivo son necesarios para probar si el tiempo de precosecha establecido garantiza que los niveles de residuos estén por debajo de su Límite Máximo de Residuos (LMR). Distintos trabajos reportan sobre residuos de pesticidas y su disipación en frutas cítricas, incluidos pesticidas como flusilazol (C. Wang, Qiu, Zhao, Wang, & Zhang, 2013), 2,4 D (Chen, et al., 2015), spirotetramat (Zhang, et al., 2018), spirodiclofeno-piridabeno (Sun, et al., 2016) y reguladores del crecimiento de insectos (Payá, Oliva, Cámara, & Barba, 2007). Otra fuente de variación de la vida media del pesticida se debe a los tratamientos posteriores a la cosecha. Sin embargo, a pesar de existir estudios que reportan la disipación de activos utilizados en la poscosecha, se ha prestado poca atención al efecto de los tratamientos posteriores a la cosecha sobre los niveles de residuos de pesticidas aplicados en el campo. Los lavados, baños de hipoclorito o cámaras frigoríficas tienen una influencia específica en la persistencia de los pesticidas dentro del producto. Se ha demostrado que el lavado redujo la cantidad de pesticidas lipofílicos en vegetales de hoja, pero el mismo tratamiento tuvo poco efecto en frutas con cantidades relativamente altas de ceras o pelos en su superficie, donde los pesticidas se disuelven y permanecen

sin cambios por períodos más largos. En general, el almacenamiento en frío disminuye la disipación de pesticidas al minimizar la flora microbiana viable, la falta de radiación dentro de la cámara y al disminuir la velocidad de todas las reacciones químicas que causan la degradación de los pesticidas.

En el caso de la cadena de producción de cítricos, los frutos son lavados, desinfectados, y a continuación se aplican fungicidas de poscosecha y cera protectora. El propósito del uso de cera es conferir un aspecto brillante a la fruta y reducir las pérdidas de peso al disminuir la senescencia durante el almacenamiento (Waks, Schiffmann-Nadel, Lomaniec, & Chalutz, 1985). La fruta así tratada se almacena en cámaras de frío (4-5 °C) durante algunas semanas y muchas veces se envía al extranjero.

Entre los agentes de protección de cultivos usualmente empleados en la producción de cítricos a campo, para difenoconazol y piraclostrobina el número de aplicaciones por temporada es 1 y 1-2, respectivamente. Ambos activos se aplican a una velocidad de 1600 L ha⁻¹ (20 mL en 100 L) con atomizador a la copa. En el caso de imidacloprid, se aplica 2 veces por temporada a una velocidad de 30-50 mL en 100 L (irrigación o rociando con atomizador a la copa) o i 1-3 mL árbol⁻¹ (pintando el tronco). El número de aplicaciones de spinosad por temporada es 1 o 2 a una tasa de 200-300 L ha⁻¹ (15 mL L⁻¹). El insecticida se aplica utilizando atomizador a la copa.

Si bien los residuos y los patrones de disipación de difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad se han determinado en manzanas, pepinos, uvas y tomates, existen pocos estudios sobre su disipación en especies de cítricos. La disipación de imidacloprid en limón y naranja dulce fue evaluada por Phartiyal *et al.* y Singh *et al.*, respectivamente (Phartiyal & Srivastava, 2014; N. Singh, Bisht, Yadav, & Kamari, 2017), pero existen pocos registros sobre el comportamiento de estos pesticidas durante las condiciones de campo de la precosecha en mandarina.

Los objetivos de este capítulo son: (i) evaluar la disipación de abamectina, difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad en frutos cítricos en condiciones de campo, (ii) evaluar la influencia de la etapa de poscosecha en los niveles finales de concentración de residuos en una de las variedades de estudio y (iii) estudiar la disipación de imazalil y 2-fenilfenol en frutos cítricos y la influencia del uso de NaHCO₃ en tratamientos de poscosecha.

5.2. Disipación de insecticidas y fungicidas seleccionados aplicados durante la precosecha en mandarinas y naranjas en Uruguay

5.2.1. Experimental

Formulaciones comerciales

Todos los pesticidas se aplicaron a las dosis recomendadas en las etiquetas durante los ensayos. En la Tabla 5.1 se presentan los formulados comerciales, fabricante, dosis y límites máximos de residuo

Formulación/ Fabricante	Activo (g L ⁻¹)	Vol (cc)	EU LMR (mg kg ⁻¹)	Codex LMR (mg kg ⁻¹)
SCORE 250 EC/ Syngenta	Difenoconazole 250	20	0,6	0,6
SPINGARD 35F/ Compañía Cibeles SA	Imidacloprid 350	50	1	1
FACILY 18 EC/ Compañía Cibeles SA	Abamectina 18	30	0,01 ^A 0,015 ^B /0,04 ^C	0,02 ^D
TRACER I/ Rutilan SA	Spinosad 480	20	0,3 ^E	0,3 ^E

Tabla 5.1. Formulación, fabricante, dosis de principio activo, y volumen (Vol) utilizado cada 100 L. Límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la Unión Europea y el *Codex Alimentarius* para cada analito en mandarina/naranja. Definición de residuo: “suma de avermectina B1a, avermectina B1b y delta-8,9 isomero de avermectina B1a, expresado como avermectina B1a” ^AEU 2011/508, ^BEU 2015/2075, ^CEU 2018/1514. ^D Definición de residuo para plantas: “Avermectina B1a”. ^EDefinición de residuo de spinosad en plantas: suma de espinosina A y espinosina D.

Experimentos a campo y muestreo.

Se realizaron ensayos a campo en árboles adultos y sanos de mandarina 'Nova' [(*Citrus reticulata* Blanco × (*C. paradisi* Macf. X *C. reticulata*)] y 'Navelina' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) injertadas en *P. trifoliata* (L. Raf.) con portainjertos ubicados en dos lugares. Para evaluar la disipación de los pesticidas, las formulaciones comerciales se aplicaron por separado con un rociador de mochila hasta alcanzar el punto de goteo (aprox 5-7 L árbol⁻¹). Para cada pesticida comercial, se utilizó la dosis recomendada de etiqueta y que se presenta en la Tabla 5.1. La mitad de las frutas tratadas se cubrieron inmediatamente

con tapas de nylon rojas para evaluar la incidencia de condiciones climáticas en los niveles de residuos de pesticidas. Los tratamientos se denominaron ensayos sin cobertura (SC) y cubiertos (C). Las parcelas de disipación de cítricos contienen seis árboles por prueba (Figura 5.1).

Para el análisis de residuos de pesticidas, las muestras se tomaron en el momento cero y cada 7 días hasta el día 35 (6 condiciones temporales) y se transportaron al laboratorio. Los agroquímicos se aplicaron cerca de la temporada de cosecha. El momento para la aplicación de pesticidas se seleccionó como el peor escenario para el uso de un agente de protección de plantas, cuando los residuos podrían estar en los niveles más altos, sin tener el tiempo suficiente para disiparse adecuadamente. El muestreo se realizó siguiendo las directrices del *Codex Alimentarius*. En resumen, un total de 1 kg de frutas (aprox. 8-9 mandarinas o naranjas) se extrajeron al azar del vértice y la parte media de la copa.

Condiciones climáticas y zonas geográficas.

Fue evaluada la influencia de la lluvia y de la luz solar. Un dispositivo especialmente diseñado se colocó en la parte superior de la mitad de las frutas en cada árbol (ver Figura 5.1). Se utilizaron tapas rojas de plástico para cubrir las frutas individualmente, evitando que las frutas se irradiaran al sol de las regiones azul-violeta del espectro UV. De esta manera, se estudió la disipación de pesticidas para las dos especies en cuatro escenarios posibles. Los ensayos se realizaron en dos zonas geográficas; en la región sur del país (34°35' S; 56°55' O San José) y en la región norte (31°06' S; 57°45' O Salto). Las condiciones meteorológicas fueron monitoreadas desde el día de la aplicación hasta el momento de la cosecha en ambas áreas geográficas. La temperatura promedio diaria (24 h) en las regiones norte y sur estuvo en rangos de 18,4-20,5 °C y 16,9-18,0 °C, respectivamente. Las precipitaciones diarias promedio (cantidad efectiva de precipitación) variaron de 41,5 a 61,4 mm en la región norte y de 71,7 a 93,4 mm al sur respectivamente.

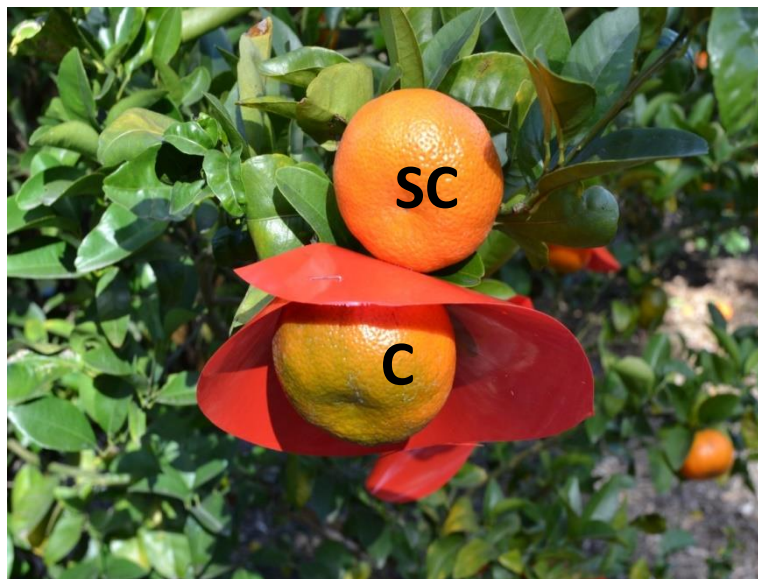


Figura 5.1. Frutas sin cobertura (SC) y cubiertas (C) durante los ensayos.

Análisis de residuos de pesticidas.

Cada fruta seleccionada se cortó en cuatro partes, dos opuestas se seleccionaron para el análisis, mientras que el resto se descartó. La muestra de laboratorio se compuso, homogeneizó y almacenó en bolsas de polietileno individuales a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción. Los residuos de pesticidas se extrajeron por triplicado con un método basado en EtOAc y se determinaron mediante el sistema LC-MS/MS como se indica en el Capítulo I, sección 3.2.1 Muestras de control negativo fueron recolectadas antes de la aplicación de pesticidas.

Modelo de disipación

La disipación de los pesticidas a lo largo del tiempo después de la aplicación se describe de acuerdo con un modelo de cinética de primer orden (Montemurro, et al., 2002; Sabale, et al., 2014) como sigue:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt} \quad \text{Ecuación 1}$$

En la ecuación, C_t es la concentración de pesticida (en $\mu\text{g kg}^{-1}$) en intervalos de tiempo t (días) donde C_0 es la concentración inicial del pesticida en el momento 0 después de la aplicación. El símbolo k es la constante de velocidad de disipación (días^{-1}).

El valor de la vida media se determinó de la siguiente manera:

$$t_{1/2} = (\ln 2)/k \quad \text{Ecuación 2}$$

Análisis estadístico

Se utilizó la herramienta de análisis de datos de Microsoft Excel para el tratamiento estadístico. Se aplicó la prueba F de la igualdad de dos varianzas y la prueba de Student en el nivel de probabilidad contrastado ($\alpha = 0.05$).

5.2.2. Resultados y discusión

Residuos restantes en tratamientos sin cobertura y cubiertos

Se estudió la evolución en los niveles de residuos para los pesticidas en naranja y mandarina. Las desviaciones estándar relativas para la concentración de las muestras recolectadas en las tres repeticiones fueron inferiores al 20 %. Los residuos iniciales y finales para los ensayos de SC y C para ambas frutas se presentan en la Tabla 5.3. Como se puede ver, hay diferencias significativas de los residuos iniciales entre las especies de cítricos (Student t ($\alpha = 0.05$)). Las diferencias en la concentración inicial de residuos en naranja versus mandarina pueden asignarse a dos aspectos: por un lado, las plantas difieren mucho en hábito, tamaño y características morfológicas. Las características estructurales que influyen en la distribución, retención y absorción de pesticidas se han enumerado como: forma de planta, forma de hoja/fruto, posición y densidad de hoja/fruto y superficie y márgenes de hoja/fruto (Edwards, 1975). Por otro lado, durante la fumigación con pesticidas, la aplicación se realiza en el punto de goteo, lo que, dada la diferencia de volumen entre la copa de una naranja (aproximadamente 7 L por árbol) y un árbol de mandarina (aproximadamente 5 L por árbol), realiza un consumo y una deposición diferencial de los formulados.

En particular, la concentración inicial de difenoconazol en mandarina para ambas áreas geográficas se encontró por encima del valor LMR establecido al momento del estudio: 0,1 mg kg⁻¹ (Comisión Europea, 2005, 2013). El LMR de difenoconazol ha evolucionado a un valor de 0,6 mg kg⁻¹ desde 2015 (European Commission, 2005, 2015a) y, por lo tanto, nuestros hallazgos cumplen con los requisitos de LMR actuales para este fungicida. En el caso de los residuos de abamectina, la concentración inicial en la mandarina fue superior al valor de LMR de la UE y del *Codex Alimentarius*. Para naranja (solo en el área sur), el residuo inicial estuvo por encima del valor LMR de la UE (utilizando como referencia el valor establecido en 2011 (Comisión Europea, 2005, 2011)). Sin embargo, para todos los pesticidas estudiados, los residuos encontrados al final del estudio (35 días) de los tratamientos de SC y C estuvieron por debajo de sus

respectivos valores de LMR Europeos y del *Codex Alimentarius*.

Los residuos iniciales de imidacloprid se encontraron por debajo del LMR establecido por la UE y *Codex*. Estos resultados están de acuerdo con el informe de Arora *et al.* (Arora, Jyot, Randhawa, & Battu, 2008), donde los residuos de imidacloprid en la mandarina entera también estaban por debajo de su LMR en el momento cero.

Estos hallazgos sugieren que las condiciones climáticas de las diferentes regiones geográficas no influyen en el residuo de imidacloprid final en las frutas de SC en las mandarinas, pero sí afecta a la naranja (Tabla 5.2).

Naranja 'Navelina'						
	Norte			Sur		
Pesticida	Residuo inicial	Residuo final SC	Residuo final C	Residuo inicial	Residuo final SC	Residuo final C
Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
Abamectina	<LR	<LR	<LR	0,013	<LR	<LR
Difenoconazol	0,033	0,018	0,014	0,080	0,041	0,029
Imidacloprid	0,670	0,020	0,146	0,573	0,035	0,225
Spinosad	0,056	<LR	<LR	0,216	<LR	0,025

Mandarina 'Nova'						
	Norte				Sur	
Pesticide	Residuo inicial	Residuo final SC	Residuo inicial	Residuo final SC	Residuo inicial	Residuo final SC
Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
Abamectina	0,024	<LR	<LR	0,024	<LR	<LR
Difenoconazol	0,120	0,016	<LR	0,122	<LR	0,021
Imidacloprid	0,580	0,127	0,198	0,365	0,122	0,200
Spinosad	0,155	0,030	0,140	0,058	<LR	0,027

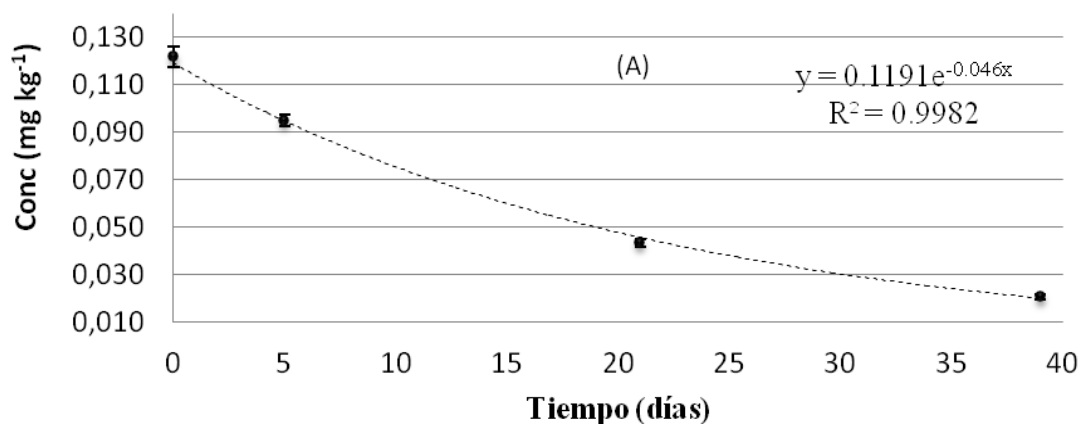
Tabla 5.2. Concentración de residuos iniciales y finales ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en mandarinas y naranja, para ambas áreas geográficas en tratamientos sin cobertura y cubiertos.

Curvas de disipación y vida media de los pesticidas estudiados.

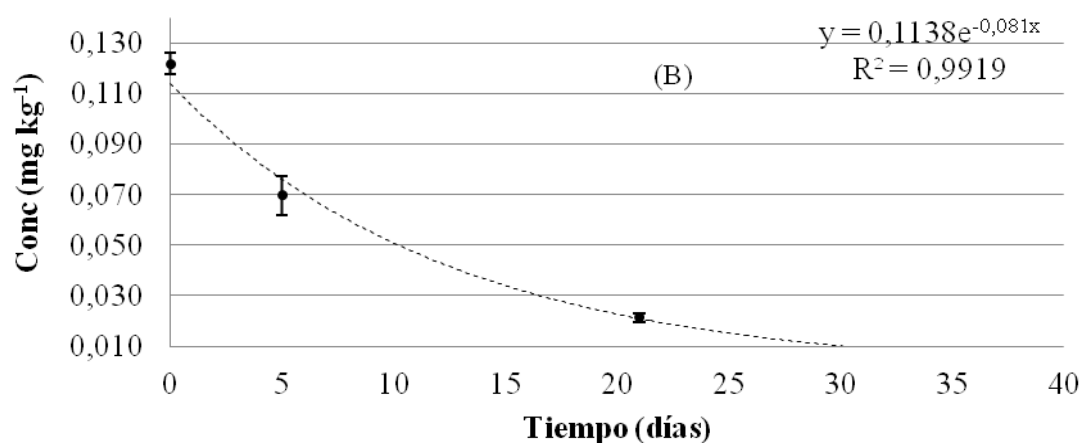
El comportamiento de la concentración de los residuos de pesticidas podría ser descrito por cinética de primer orden. El $t_{1/2}$ correspondiente para cada pesticida en estudio para el tratamiento sin cobertura se calculó y se muestra en la Tabla 5.3. Para la abamectina, el $t_{1/2}$ no se determinó ya que los residuos se encontraron solo en el muestreo de día cero. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Pirsahab (Pirsahab, Fattahi, Rahimi, Sharafi, & Ghaffari, 2017) donde en el caso de la manzana, las muestras no contenían ningún residuo de abamectina (Límite de reporte = $2,2 \mu\text{g kg}^{-1}$) después del tratamiento previo a la cosecha. La vida media para los diferentes pesticidas fue diferente según la fruta analizada. Como regla general, las tasas de disipación en las naranjas fueron más rápidas que en las mandarinas, con la excepción del difenoconazol. El último hecho puede explicarse en el coeficiente de partición de octanol/agua más alto (Kow) del fungicida que permite difundirlo en la capa de cera hacia las vesículas de aceites esenciales. También se observó una menor tasa de disipación del fungicida respecto a los insecticidas. Además, a pesar de las altas similitudes entre las regiones de cultivo en Uruguay, las vidas medias de los pesticidas determinados fueron diferentes. En naranja, el sur más frío y ventoso causó vidas medias más altas que la región norte. En el caso de la mandarina, no se pueden inferir conclusiones. Para difenoconazol y spinosad, las vidas medias fueron más bajas en la región norte, mientras que se observó un comportamiento opuesto para el imidacloprid.

La curva de disipación de difenoconazol en cítricos enteros en condiciones de campo se muestra en la Figura 5.2 para las especies de Citrus y las áreas geográficas. Se observó una disminución gradual y continua de todos los pesticidas.

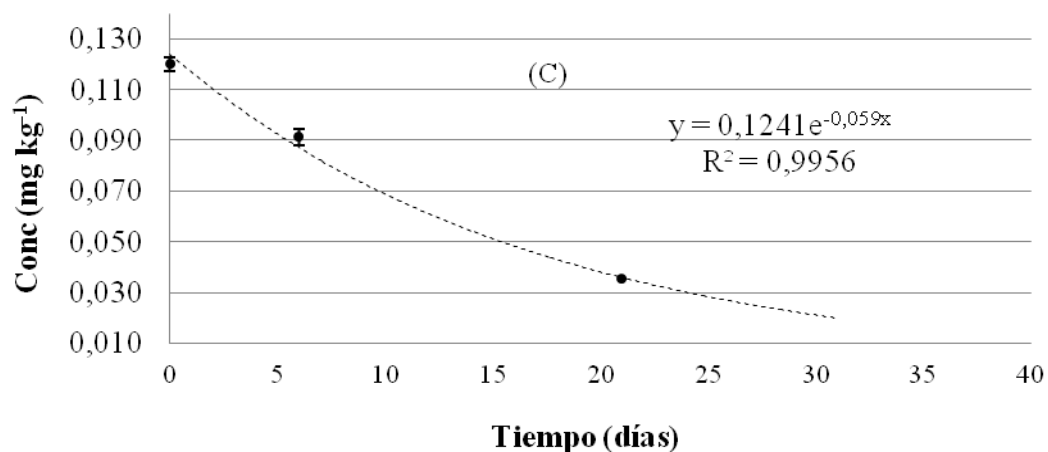
Difenoconazol C Nova de zona sur



Difenoconazol SC Nova de la zona sur



Difenoconazol C en Nova de la zona norte



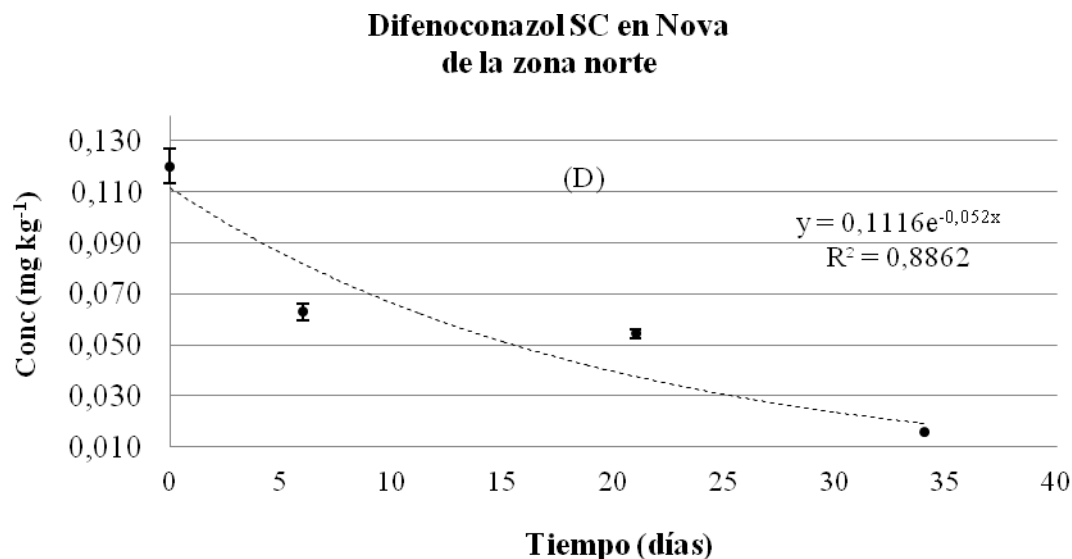


Figura 5.2. Curvas de difenoconazol en los tratamientos cubierto (A) y sin cobertura (B) en mandarinas de la zona sur. Curvas de difenoconazol en los tratamientos cubierto (C) y sin cobertura (D) en naranja de la zona norte.

La vida media de imidacloprid en naranja fue de 7,1-9,8 d, mientras que en mandarina fue de 15,8-18,7 d. La semivida del spinosad en naranja y mandarina se determinó como 7,5 y 10,7 d. Para nuestro conocimiento, no existen reportes previos sobre la disipación de spinosad en cítricos. En cebolleta y tomate en condiciones de campo, la vida media del spinosad es 1,2 y 3,18-3,74 d (Adak & Mukherjee, 2016a; Dasenaki, Bletsou, Hanafi, & Thomaidis, 2016). En todos los casos, el $t_{1/2}$ es corto, y podría explicarse porque este insecticida es degradado por la irradiación con luz ultravioleta (por ejemplo, solar) (C. D. Yang & Song, 2007). Los insecticidas biológicos derivados fueron los más rápidos de disiparse en este estudio. Estos compuestos evidencian una reducción del riesgo de excedencia de LMR. Sin embargo, su tiempo de protección es limitado. Estos pesticidas son ideales para ser empleados en programas de manejo integrado donde se sigue de cerca la evolución de las poblaciones de plagas. No se recomienda una aplicación continua de estos productos químicos para evitar el desarrollo de la resistencia a los pesticidas.

Tratamientos sin cobertura								
Pesticida	C=Co.e ^{-kt}				t _{1/2} (d)			
	Naranja		Mandarina		Naranja		Mandarina	
	Sur	Norte	Sur	Norte	Sur	Norte	Sur	Norte
Difenoconazol	0,0864e ^{-0,035t}	Nd	0,1138e ^{-0,081t}	0,1116e ^{-0,052t}	19,8	nd	8,6	13,3
Imidacloprid	0,5523e ^{-0,071t}	0,6522e ^{-0,098t}	0,04829e ^{-0,037t}	0,5667e ^{-0,047t}	9,8	7,1	18,7	15,8
Spinosad	0,1630e ^{-0,164t}	0,1265e ^{-0,165t}	0,0723e ^{-0,093t}	0,1466e ^{-0,065t}	4,2	4,2	7,5	10,7

Tabla 5.3. Modelo de cinética de primer orden y vida media estimada (t_{1/2}) para cada combinación pesticida-matriz cítrica en las dos zonas geográficas en los tratamientos sin cobertura. Nd: no determinado

En todos los casos, no hay razón para determinar una PHI específica, ya que los niveles iniciales de residuos de pesticidas estaban por debajo de los LMR establecidos por la UE y el *Codex Alimentarius*. Sin embargo, se debe tomar precaución si la tasa de aplicación o la aparición repentina de una plaga obliga a la aplicación de fungicidas cerca de la cosecha.

5.3. Disipación de pesticidas de precosecha en mandarinas 'Clementina' después de la aplicación en campo abierto y su persistencia cuando se almacenan en condiciones industriales convencionales de poscosecha

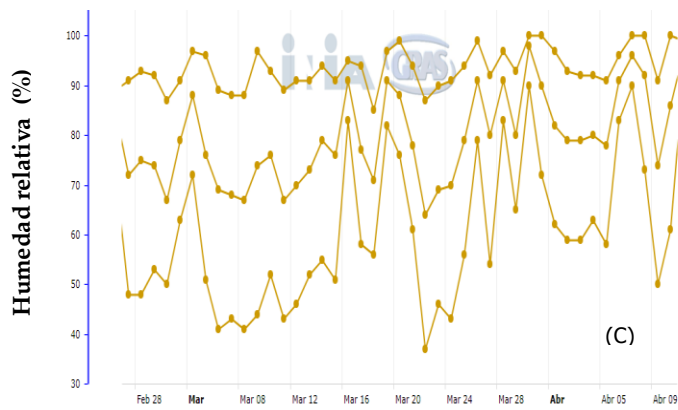
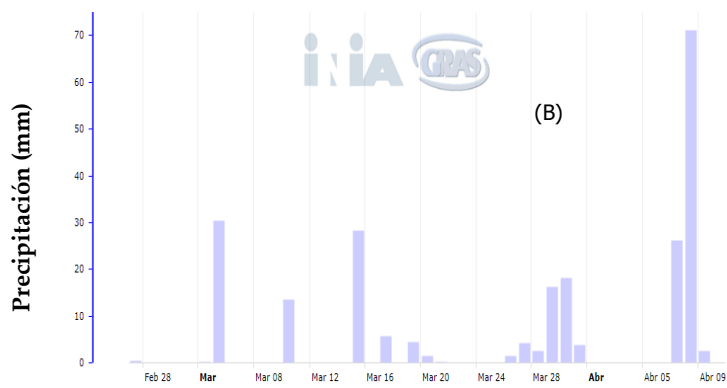
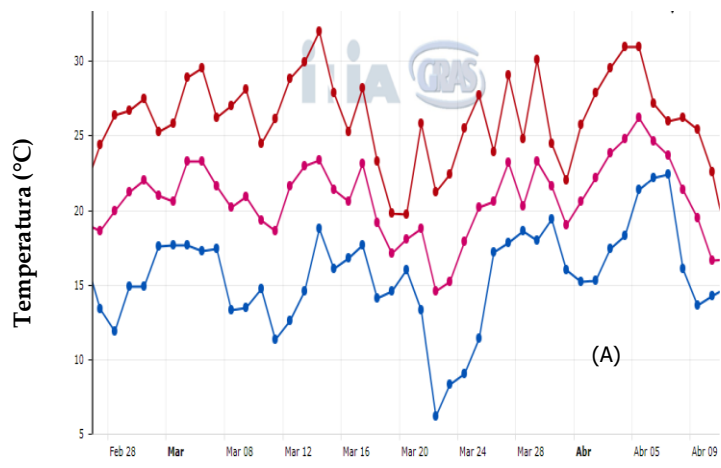
5.3.1. Experimental

Los residuos de pesticidas se determinaron por triplicado para cada muestra, utilizando una extracción con acetato de etilo (Besil, et al., 2011) y se cuantificaron por LC-MS/MS operando en modo MRM. Ver Capítulo I, sección 3.2.

Experimento a campo y poscosecha.

La aplicación de pesticidas se llevó a cabo en árboles adultos y sanos de mandarina 'Clementina' (*Citrus reticulata* Blanco) injertada en *P. trifoliata* (L. Raf.). El ensayo se realizó en la región norte del país: 31 ° 16'45.47 S, 57 ° 53'52.15 O, elevación: 41 m (Salto). Las parcelas experimentales contenían seis árboles por prueba en una sola fila. Tamaño del árbol: 9 m³. Orientación de la fila: N-NE; S-SO. El espacio entre planta y planta fue de 2 m en la fila y de 5,5 m entre filas. Para evaluar el patrón de disipación de los agroquímicos seleccionados, las formulaciones comerciales se aplicaron por separado con un rociador de mochila Stihl SR450 hasta alcanzar el punto de goteo (6 L tree⁻¹). Cada pesticida fue aplicado alrededor de la planta. Las formulaciones se aplicaron utilizando el mismo procedimiento de buenas prácticas agrícolas (BPA) empleado en la producción de cítricos y en las dosis recomendadas en las etiquetas. Los ensayos se iniciaron 42 días antes del tiempo de cosecha. Los pesticidas utilizados y las dosis se presentan en la Tabla 5.1 de la sección 5.2.1 del Capítulo 5. En este ensayo no se evaluó abamectina pero se incorporó el estudio de piraclostrobina. Se trabajó con el formulado comercial COMET de BASF que contienen 250 g L⁻¹ de piraclostrobina. El volumen utilizado fue de 30 mL de formulado para un volumen de 100 L de agua. El LMR para piraclostrobina en mandarina es de 1 y 2 mg kg⁻¹ según la UE y el *Codex Alimentarius* respectivamente.

Se monitorizaron las condiciones meteorológicas desde la pulverización hasta la recolección de la fruta. La temperatura diaria (24 h), las precipitaciones (cantidad efectiva de precipitación), el porcentaje de humedad relativa y la irradiación solar x Heliofania relativa, se midieron en condiciones de campo y se presentan en la Figura 5.3 A, B, C y D.



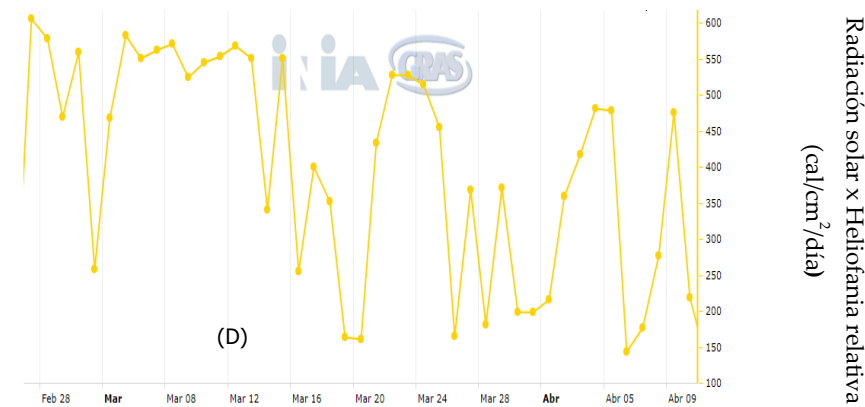


Figura 5.3. Temperatura máxima, media y mínima diaria (A), precipitaciones (B), humedad relativa (C) y radiación solar x relativa Heliofania (D)

Después del tiempo de cosecha, se realizó una simulación de tratamiento poscosecha en una línea de empaque experimental en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (Salto, Uruguay). En la línea de empaque, se aplicó imazalil (FUNGAFLO 75 PS, Janssen Pharmaceutica N.V.) a 1000 mg L^{-1} en cascada, después del saneamiento con hipoclorito y las etapas de secado previo. Luego, se roció un tratamiento de cera (Brillaqua). Las frutas tratadas se secaron con aire y se almacenaron durante 32 días a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $96 \pm 1 \%$, en una cámara de frío industrial y simulando así las condiciones comerciales empleadas para la exportación de cítricos (Figura 5.4). La humedad relativa y la temperatura fueron controladas y registradas diariamente.



Figura 5.4. Esquema de aplicación de tratamiento en la línea de empaque.

Muestreo de fruta

Durante el muestreo, se tomó un blanco de fruta de árboles no tratados. Para los tratados, el muestreo se realizó siguiendo las directrices del *Codex Alimentarius* (Codex, 1999). Se extrajo al azar un total de 1 kg de frutas (aproximadamente 8-9 unidades) de cada parte del árbol (incluida la parte central del árbol) de los seis árboles rociados. La primera muestra se tomó 1 h después de que la aplicación de pesticida se hubiera secado

y etiquetado como día 0. Posteriormente, los frutos se recolectaron al azar a los 6, 14, 21, 27 y 35 días después de la aplicación del pesticida y en el momento de la cosecha (42 días después del tratamiento). Las muestras de campo se colocaron en bolsas de polietileno y se transportaron en conservadoras al laboratorio para su análisis. Cada fruta se cortó en cuatro piezas, dos opuestas se seleccionaron para el análisis y las otras dos se descartaron. Posteriormente, cada muestra se compuso, se homogeneizó y se congeló (-18 °C) en bolsas de polietileno individuales hasta el análisis.

Durante la etapa de poscosecha, las frutas de mandarina tratadas se colocaron en cajas de plástico y se guardaron en cámaras frías. Para la medición analítica, 1 kg de frutas (aprox. 8-9 unidades) se tomó al azar de las cajas. Se tomaron muestras antes y después de la simulación de la línea de empaque y 32 días después del almacenamiento en frío. Todas las muestras fueron analizadas como se describió anteriormente.

Modelos de disipación

La representación gráfica de la disminución de la concentración de residuos de pesticidas a lo largo del tiempo se denomina curva de disipación. Los datos de residuos recopilados de cada día de muestreo y ensayo, se promediaron y se realizó un análisis de regresión lineal de los datos siguiendo el procedimiento que se indica en Timme *et al.* (G. Timme, Frehse, & Laska, 1986). Esta metodología permite la evaluación de ecuaciones "modelo" que describen la disipación de residuos de pesticidas en productos agrícolas en función del tiempo.

Para cada pesticida, los datos de residuos experimentales se convirtieron para lograr las ecuaciones del modelo de 1er, 1,5, 2do orden y Factor Raíz (R.F.) de 1er orden (Tabla 5.4). Los resultados transformados se representaron frente al tiempo o al tiempo de la raíz cuadrada (modelo R.F). Se calcularon la pendiente, la intersección y el coeficiente de determinación (R^2) de cada regresión lineal.

	3. Función y (residuo)	4. Transformación x (tiempo)
1 ^{er} orden	logR	Ninguna
1.5 orden	1/√R	Ninguna
2 ^{do} orden	1/R	Ninguna
1er orden RF	logR	√t

Tabla 5.4. Transformaciones de linealización para la ecuación de regresión $y = bx + a$. RF: “factor raíz”

La selección de la función de mejor ajuste de las cuatro funciones posibles se logra comparando las desviaciones de los valores experimentales de la curva transformada. Para ello se utilizaron un coeficiente de determinación modificado (r^2) y una prueba de la cantidad D (G. Timme & Frehse, 1980). La cantidad de prueba D se calculó como:

$$D = |r| - t (t^2 + (df))^{-0.5}$$

donde $|r|$ es el valor absoluto del coeficiente de correlación (a partir de datos transformados) y t es el valor de t-student, para $n-2$ (grado de libertad: df), de la tabla de distribución de Student-t en el nivel de probabilidad contrastado ($\alpha = 0,05$). Si la cantidad D calculada es mayor que cero, se confirma la correlación. Si el R^2 modificado se vuelve negativo, el ajuste se considera automáticamente como no asegurado (G. Timme, et al., 1986).

Tratamiento de datos y análisis estadístico.

El análisis de los datos se realizó con el software Biosystems Analyst 1.5. Se utilizó la herramienta Microsoft Excel Data Analysis para el tratamiento estadístico. Se aplicó la prueba t-Student en el nivel de probabilidad contrastado ($\alpha = 0.05$).

5.3.2. Resultados y Discusión

Disipación estudiada en condiciones de campo: modelo de mejor ajuste

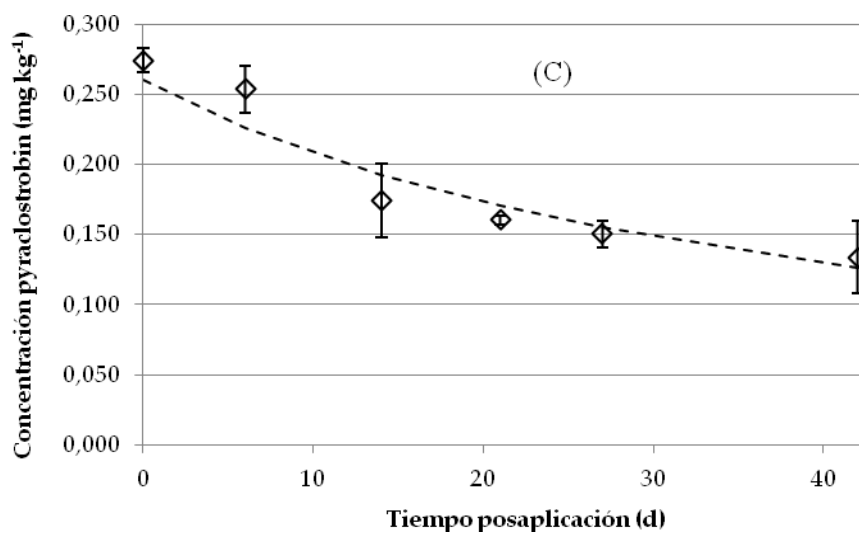
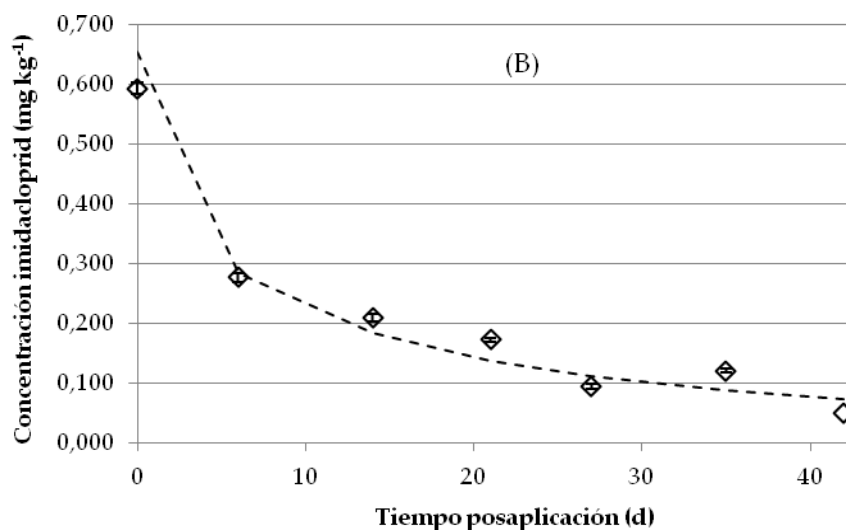
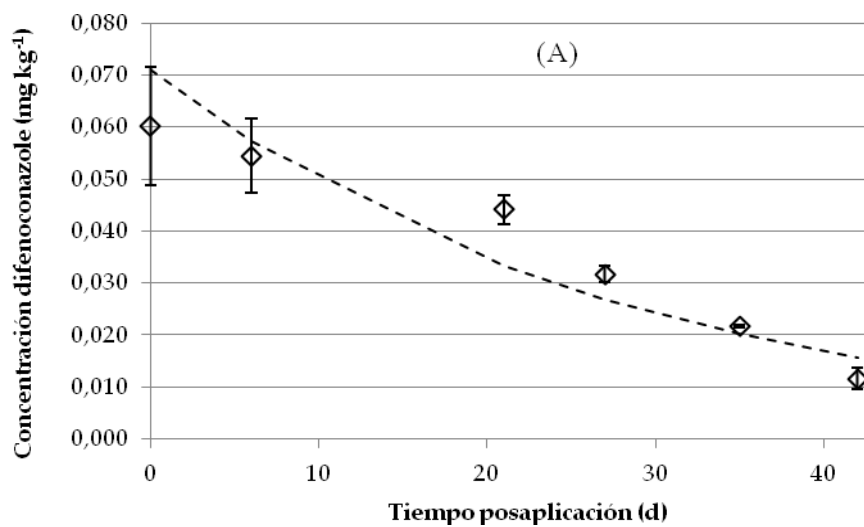
Las ecuaciones de los modelos de mejor ajuste para los pesticidas examinados bajo

condiciones de campo durante el tratamiento de Clementinas, con sus correspondientes r^2 y D se presentan en la Tabla 5.5. Los modelos que predicen mejor los datos experimentales de spinosad y difenoconazol fueron las ecuaciones de primer orden. Los datos experimentales de imidacloprid y piraclostrobina se ajustaron mejor con los modelos R.F de primer orden y de segundo orden, respectivamente. Las curvas de declinación obtenidas a partir de los datos experimentales y el modelo de mejor ajuste adaptado a los mismos, para los tratamientos con difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad se presentan en la Figura 5.5.

	Difenoconazol	Imidacloprid	Piraclostrobina	Spinosad
1^{er} orden				
Curva de disipación	$10^{-(0,016t+1,140)}$	$10^{-(0,022t+0,334)}$	$10^{-(0,008t+0,591)}$	$10^{-(0,052t+0,744)}$
r^2	0,857	0,883	0,890	0,987
D	0,198	0,197	0,124	0,003
1.5 orden				
Curva de disipación	$1/(0,116t+3,353)^2$	$1/(0,064t+1,312)^2$	$1/(0,021t+1,970)^2$	$1/(0,301t+2,011)^2$
r^2	0,509	0,951	0,906	0,871
D	0,167	0,178	0,137	<0
2^{do} orden				
Curva de disipación	$1/(1,491t+5,617)$	$1/(0,362t+0,421)$	$1/(0,096t+3,846)$	$1/(3,420t-1,062)$
r^2	<0	<0	0,918	<0
D	0,13	0,124	0,149	<0
R.F 1^{er} orden				
Curva de disipación	$10^{-(0,103\sqrt{t}+1,086)}$	$10^{-(0,148\sqrt{t}+0,185)}$	$10^{-(0,053\sqrt{t}+0,535)}$	$10^{-(0,242\sqrt{t}+0,658)}$
r^2	0,598	0,962	0,893	0,963
D	0,108	0,198	0,147	<0

Tabla 5.5. Ecuaciones del modelo de disipación que describen la disipación de difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad en mandarina Clementina. En

negrita: el modelo de mejor ajuste.



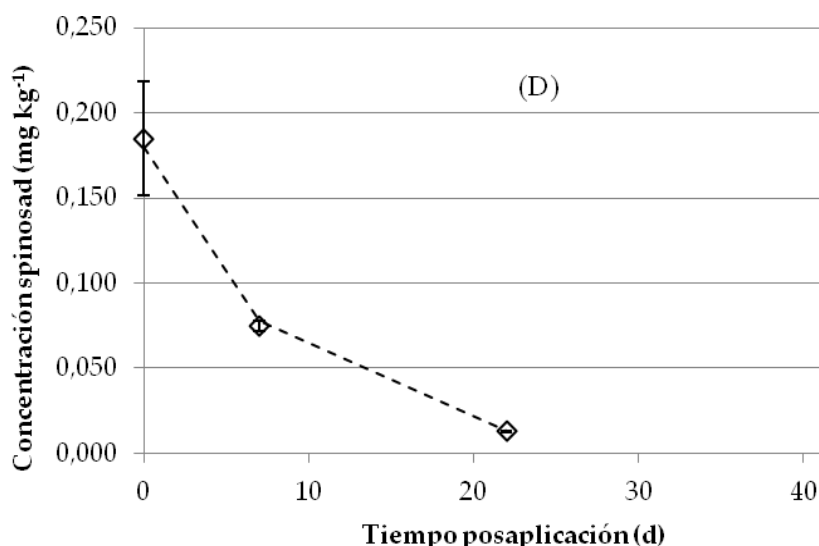


Figura 5.5. Curva de disipación para difenoconazol (A), imidacloprid (B), piraclostrobina (C) y spinosad (D) en mandarina Clementina.- \diamond - Indica datos experimentales .--- Indica la curva de disipación transformada (adaptada al mejor modelo matemático: ecuación de primer orden para A y D, ecuación de primer orden RF para B y segundo orden para C)

Residuos iniciales, dinámica de disipación y almacenamiento poscosecha.

Se estudió la disipación de residuos de pesticidas sobre la fruta en el campo y se evaluó la merma de los principios activos después de pasar la fruta por la línea de packing (aplicación de fungicida y cera). De manera similar, los residuos de pesticidas después del tratamiento de poscosecha se compararon con los encontrados al final del almacenamiento en frío. La piraclostrobina y el difenoconazol permanecen sin cambios después del almacenamiento en frío.

Difenoconazol

El nivel inicial de residuos de difenoconazol fue de $0,060 \pm 0,011$ mg kg⁻¹, el cual está por debajo del LMR internacional establecido (ver Tabla 3.2). El difenoconazol se disipó un 80 % después de 42 días de su aplicación. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones antes y después de la etapa de poscosecha (probado a través de una prueba t ($\alpha = 0,05$)) (Figura 5.6).

Imidacloprid

La deposición inicial de imidacloprid sobre clementinas fue de $0,592 \pm 0,010$ mg kg⁻¹. Los residuos de imidacloprid se disiparon un 92 % en el momento de la cosecha (42 d después de la aplicación). La concentración final de residuos de imidacloprid al final del

período posterior a la cosecha difirió significativamente del nivel de residuos determinado en el momento de la cosecha (t-Student, $\alpha = 0.05$). No se puede llegar a ninguna conclusión sobre el efecto del almacenamiento en frío en la concentración de imidacloprid. Los niveles más altos de imidacloprid detectados después del almacenamiento en frío se deben al efecto de pérdida de agua, hecho que se observó únicamente para las mandarinas tratadas con imidacloprid y podría atribuirse a algún fallo técnico en el tratamiento con cera. La deshidratación de la fruta cambia el nivel de los co-extractivos y, por lo tanto, el efecto de la matriz también cambiará. Los cambios en el efecto de la matriz significan una pendiente diferente para la curva de calibración en la matriz y, por lo tanto, en la cuantificación del residuo. Nuestro grupo estableció la presencia de compuestos isobáricos que interfieren con la determinación de imidacloprid en frutas cítricas, incluidas las mandarinas (Besil, et al., 2017). Si esta interferencia no se compensa con la calibración de la matriz, los niveles de imidacloprid se sobreestimarán, lo que arrojará valores de concentración más altos para este compuesto. Asimismo, es importante tener en cuenta la incertidumbre asociada a la medida, lo cual hace que se solapen las concentraciones encontradas.

Piraclostrobina

En el momento de la aplicación, la concentración de estrobirulina fue de $0,274 \pm 0,009$ mg kg⁻¹. Se observó una disipación del 48 % para piraclostrobin 42 d después de la aplicación. Este fungicida se degradó más lentamente que los otros pesticidas estudiados. La concentración después de las condiciones de poscosecha no difiere de la obtenida al momento de cosecha (t-Student, $\alpha = 0,05$). Estudios anteriores han demostrado la estabilidad de piraclostrobina en productos con alto contenido de aceite, agua y ácido, así como en productos secos hasta 18 meses cuando se almacenan congelados (EFSA, 2011).

Spinosad

El residuo de spinosad en Clementinas en el momento de la aplicación (día 0) se encontró por debajo de los LMR de la UE y del *Codex* (0,3 mg kg⁻¹). Los residuos de spinosad se disiparon por debajo del límite de cuantificación (DLQ) de 0,010 mg kg⁻¹ a los 28 d después de la aplicación del tratamiento. Después de 22 d de su aplicación, este compuesto se disipó casi por completo (93 %).

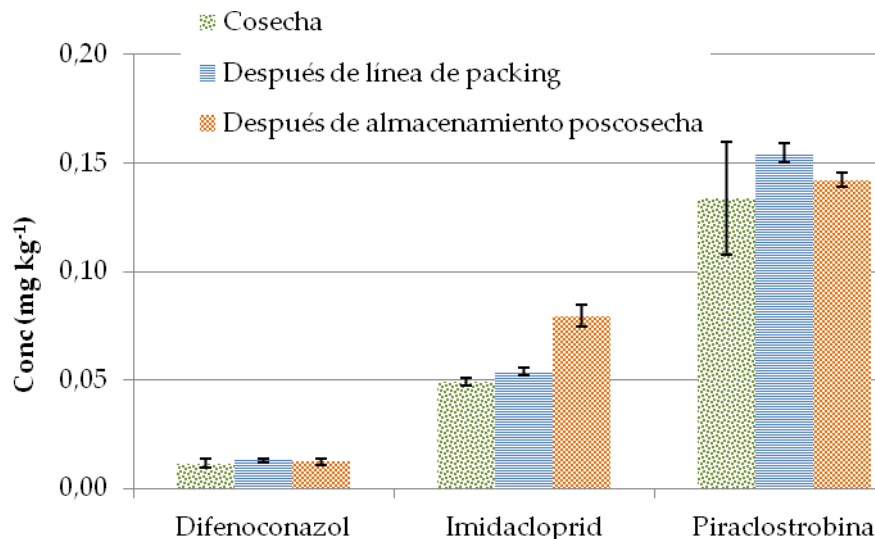


Figura 5.6. Residuos de difenoconazol, imidacloprid y piraclostrobina en Clementinas en el momento de la cosecha, después de la línea de empaque y después de 32 días de almacenamiento en frío. Para difenoconazol y piraclostrobina no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de pesticidas. Para el imidacloprid, la concentración de residuos al final del período posterior a la cosecha difirió significativamente del nivel de residuos determinado en el momento de la cosecha (t de estudiante, $\alpha = 0,05$).

El proceso de poscosecha tuvo poca influencia en la disipación general de los pesticidas en estudio sobre las mandarinas. No se detectaron diferencias significativas entre el nivel de pesticida al principio y al final de la línea de empaque. El nivel se mantuvo casi sin cambios después de 32 días en almacenamiento en frío, con la excepción de imidacloprid como se explicó anteriormente.

Vidas medias

De acuerdo con el modelo de mejor ajuste, difenoconazol y spinosad se disiparon siguiendo una cinética de pseudo primer orden que es una función de la concentración del compuesto. Eso significa que la concentración desciende exponencialmente y sus vidas medias (el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la concentración inicial) se mantienen constantes y los tiempos de decaimiento, si es necesario, se pueden estimar fácilmente. Las vidas medias de difenoconazol y spinosad fueron 19,2 y 5,8 d respectivamente. Las $t_{1/2}$ de imidacloprid y piraclostrobina determinadas con el modelo de mejor ajuste fueron 4,1 y 39,8 d, respectivamente. En estos casos, la descripción matemática de la disipación del pesticida fue R.F 1er orden y 2do orden, respectivamente. Estos tipos de descomposición dependen de la concentración, lo que

significa que el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la concentración en la fruta (la vida media del pesticida) dependerá del nivel de pesticida en la fruta en el momento de inicio.

Este es el primer informe de disipación de difenoconazol, spinosad y piraclostrobina de la mandarina Clementina. El imidacloprid mostró casi la misma vida media (4,1 d) que la determinada por Singh en la cáscara de naranja dulce que fue de 3,87 d (N. Singh, et al., 2017) luego de ser aplicado por spray. Si comparamos el $t_{1/2}$ con los obtenidos para mandarina Nova en la sección 5.2.2, se puede ver que los mismos estuvieron entre 15,8-18,7 siendo valores significativamente mayores. Estos resultados podrían deberse a las características inherentes de las variedades, la plantación así como a diferencias en las condiciones climáticas

En el caso de piraclostrobina, informes anteriores determinaron 3,5–5,3 d para la vida media en frutas como banana (M. Yang, et al., 2018), fresa (Z. Wang, et al., 2015), tomate (Jankowska, Kaczynski, Hrynko, & Lozowicka, 2016), valores que son de 7 a 10 veces más bajos que los reportados en el presente trabajo (39,2 d). Estos resultados pueden deberse parcialmente a las diferencias entre las especies, las dosis de aplicación, la formulación, el ambiente local y las características de crecimiento del cultivo (Fantke, et al., 2014; Fantke & Juraske, 2013; Hanson, et al., 2015). Debe tenerse en cuenta que los cítricos tienen una capa de cera importante donde los pesticidas de alto Kow podrían ser retenidos. Estos hechos podrían explicar la desviación de un comportamiento normal de cinética de primer orden. También se debe tener en cuenta que la piraclostrobina ($pK_{ow} = 3.99$) podría disolverse en las vesículas de aceites esenciales que tienen los cítricos. La disolución del pesticida en los sacos de aceite dificulta su contacto directo con el medio ambiente, al que se disipa. El pesticida que no se solubiliza en el aceite esencial se disipa rápidamente de la superficie de la fruta y luego, una liberación lenta del aceite cambia la velocidad de disipación de la piraclostrobina.

La vida media determinada para spinosad fue de 5,8 d. El $t_{1/2}$ corto de este insecticida está influenciado por la luz, especialmente el componente UV (Adak & Mukherjee, 2016b). Además, la disminución de residuos puede atribuirse a la hidrólisis, la biodegradación o la dilución del crecimiento (Jacobsen, Fantke, & Trapp, 2015). Aunque no hay estudios específicos sobre la disipación de spinosad en mandarinas, en la literatura se reportan valores similares de vidas medias para este pesticida en otras verduras y frutas. Se han informado valores en el rango de 3,5-3,9 d en calabacín (Liu,

Sun, & Wang, 2013), 1,7 d en tomate (Ramadan, Shawir, El-Bakary, & Abdelgaleil, 2016) y 1,4 d en repollo (S. Singh & Battu, 2012). Si se compara el $t_{1/2}$ obtenido en mandarina Clementina con los ensayos previos presentados en el punto 5.2.2 del Capítulo III, se observa que el mismo se encuentra en el orden de los obtenidos en mandarina Nova (7,5-10,7 d) y en naranja Navelina (4,2 d) trabajando con el mismo formulado comercial, dosis y sistema de aplicación.). Los resultados obtenidos garantizan la seguridad alimentaria y el cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas. Este trabajo proporciona una guía para el uso seguro y razonable de estos pesticidas en cultivos de cítricos en las condiciones descritas.

Estimación de la concentración después del almacenamiento

Las ecuaciones de los modelos de disipación de mejor ajuste permitieron estimar la influencia del proceso de poscosecha a través de la comparación entre los niveles de pesticidas obtenidos después del lavado, la aplicación de imazalil y cera y los calculados después de 32 días del almacenamiento en frío. Los valores de concentración esperados aplicando los modelos de mejor ajuste (al decaimiento sin considerar el almacenamiento en frío) versus los reales después del almacenamiento en frío a los 74 días después de la aplicación son: 0,005 versus 0,012 mg kg⁻¹ para difenoconazol, 0,035 versus 0,080 mg kg⁻¹ para imidacloprid y 0,091 versus 0,142 mg kg⁻¹ para piraclostrobina, respectivamente. Por lo tanto, el almacenamiento en frío retarda la disipación de los pesticidas estudiados, excepto para imidacloprid.

5.4. Disipación de pesticidas de poscosecha y su efectividad al ser aplicados con NaHCO₃

5.4.1. Experimental

Diseño experimental

En lo que respecta a tratamiento de fruta después de la cosecha, se procedió a la aplicación de tratamientos para control del hongo *Penicillium digitatum* sobre mandarinas: Owari, Okitsu y Afourer. Los tratamientos aplicados se basaron en un diseño 3k factorial, siendo k=2 como se muestra en la Tabla 5.6. El formulado comercial del fungicida imazalil (IMZ) fue Fungaflor 75 PS, 75 % p.a, de Janssen Pharmaceutica, (Bélgica). La aplicación de los tratamientos sobre la fruta, se realizó en

una mini-línea de packing en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Salto Grande según se muestra en la Figura 5.7. La cera empleada fue Brillaquaque™ (Brillocera Sudamericana S.A.) con un contenido de sólidos del 18 % (polietileno 97,7 %: laca 2,3 %).

Tratamiento	Dosis de IMZ	NaHCO ₃ (%)
1	0*	0
2	500	0
3	1000	0
4	0	1
5	500	1
6	1000	1
7	0	3
8	500	3
9	1000	3

Tabla 5.6. Experimentos aplicados sobre mandarinas basados en un diseño 3k factorial, siendo $k=2^*$ A pesar de no aplicarse fungicida, se detectó una concentración de $0,19 \text{ mg kg}^{-1}$ de imazalil en el blanco, debido a la contaminación de la línea de producción.



Figura 5.7. Esquema de aplicación tratamiento de pesticidas en línea de packing

Los tratamientos aplicados y evaluados se focalizan en cubrir el mercado internacional incluido el de Estados Unidos. En EEUU se prohíbe el uso de procloraz, por lo que la fruta tratada recibió tratamientos diferenciales según el destino. En el caso de fruta para EEUU no recibió aplicaciones de dicho fungicida en forma de drencher lo cual es una práctica habitual en los packings nacionales. Como consecuencia de esto, fue necesaria la realización de 2 experimentos ya que se debió incorporar el uso del fungicida ortofenilfenato de sodio (SOPP) para aumentar el control sobre el patógeno y a la vez medir el efecto o influencia del mismo. Se realizaron tratamientos llamados *variedad I* (ej. Afourer I), donde no se aplicó PCZ en drencher pero si SOPP en la línea. Y tratamiento *variedad II*, donde se aplicó PCZ en drencher y no se aplicó SOPP en la línea.

Las tres variedades de mandarinas fueron evaluadas a nivel biológico a través de la determinación de los porcentajes de esporulación e incidencia, como indicadores de pudrición de la fruta. Los tratamientos que fueron evaluados biológicamente, fueron aplicados sobre fruta que fue inoculada previamente con cepas de *Penicillium digitatum*

sensibles o resistentes al imazalil. Los niveles de residuos remanentes sobre la fruta, se evaluaron en la variedad Afourer.

Patógeno

Se utilizaron las cepas R-20 y S-22 del hongo *Penicillium digitatum*, caracterizados previamente por el grupo de fitopatología de INIA Salto Grande por su resistencia cuantitativa y cualitativa a imazalil (Pérez, et al., 2011). La cepa S-22 es sensible a 0,1 mg kg⁻¹ de imazalil *in vitro*, siendo incapaz de esporular sobre fruta tratada y con una carga de 0,5 mg kg⁻¹ de imazalil. La misma fue aislada de muestras con síntomas provenientes de un campo en producción comercial. La cepa R-22 es resistente a 3,0 mg kg⁻¹ de imazalil *in vitro* y fue aislada partir de frutas de naranja Washington Navel tratadas con imazalil por inmersión y en cera y almacenadas durante 20 días en una cámara de frío en una planta de empaque comercial.

Inoculación del patógeno y tratamientos poscosecha

Para la inoculación se utilizaron frutos de mandarina var. Okitsu, Owari y Afourer que fueron seleccionados por calibre, color y sin lesiones aparentes. Los mismos fueron desinfectados superficialmente mediante inmersión por 60 s en una solución al 1 % de cloro activo (pH 7,0) y enjuagados con abundante agua destilada. Posteriormente, los frutos permanecieron a temperatura ambiente durante 6 h para permitir su secado. La inoculación fue realizada utilizando un punzón de 2 mm de longitud y 1 mm de diámetro, el cual es sumergido previamente en una solución de 1,0 x 10⁶ esporas mL⁻¹ del patógeno *P. digitatum* (J.; Lado, Pérez, De Negris, Dol, & Knochen, 2013). Los frutos de todas las variedades fueron inoculados únicamente con los aislamientos sensible y resistente. Los frutos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 18-20 h, realizándose la aplicación de los distintos tratamientos según la Tabla 5.6 y la Figura 5.7. Los frutos destinados al análisis de residuos de pesticidas no fueron inoculados y fueron sometidos a los mismos tratamientos que la fruta inoculada conjuntamente con esta.

Almacenamiento y muestreo

Las frutas tratadas se colocaron en cajas de plástico de 50x33x28 cm y se mantuvieron

en cámara de almacenamiento frío (4 ± 1 °C; HR (%) 96 ± 1) durante todo el experimento. El muestreo se realizó siguiendo la guía del *Codex Alimentarius* y fueron realizados el día de la aplicación (día 0), 15, 30 y 45 días pos-aplicación. Se tomó un total de 1 kg de fruta (aproximadamente 8-9 frutas) del vértice y del centro de las cajas. Cada fruta seleccionada se cortó en cuatro piezas, las dos opuestas se seleccionaron para el análisis y las otras dos se descartaron. La muestra de laboratorio se compuso, se cortó, se homogeneizó, se congeló y almacenó a -20 °C hasta su análisis. Durante la etapa de muestreo, se tomó una muestra de fruta sin tratar de la cámara de frío industrial para evaluar la contaminación cruzada.

5.4.2. Resultados y discusión

Los tratamientos se realizaron como se detallan en la Tabla 5.6, haciendo una secuencia sin SOPP pero con drencher de PCZ y otra con SOPP en la línea (pero sin drencher de PCZ), el cual fue aplicado en forma de cascada de espuma posteriormente a la sanitización con hipoclorito.

En lo que respecta a residualidad, los resultados obtenidos muestran que los niveles de imazalil en todos los tratamientos evaluados, se encuentran por debajo de su LMR que es de 5 mg kg^{-1} tanto para *Codex Alimentarius* como para la Unión Europea. Por otro lado, de los tratamientos que se muestran en la Tabla 5.6, sin la aplicación de SOPP en la línea de packing, la concentración de imazalil, se mantuvo constante en los tratamientos: 2 y 5, mientras que en los tratamientos 3, 4, 6-9, se evidencia una disipación del pesticida (test t, 95 %) aunque en general se observa una velocidad de disipación lenta. Las curvas de disipación del pesticida para algunos tratamientos se muestra en las Figuras 5.8, 5.9 y 5.10.

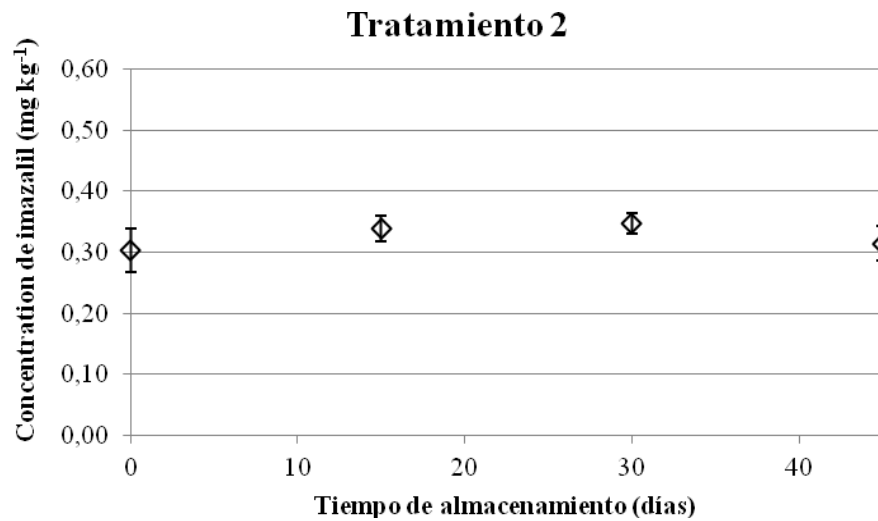


Figura 5.8. Gráfico de comportamiento de la concentración de imazalil respecto al tiempo de almacenamiento en el tratamiento 2 (imazalil a 500 mg L⁻¹)

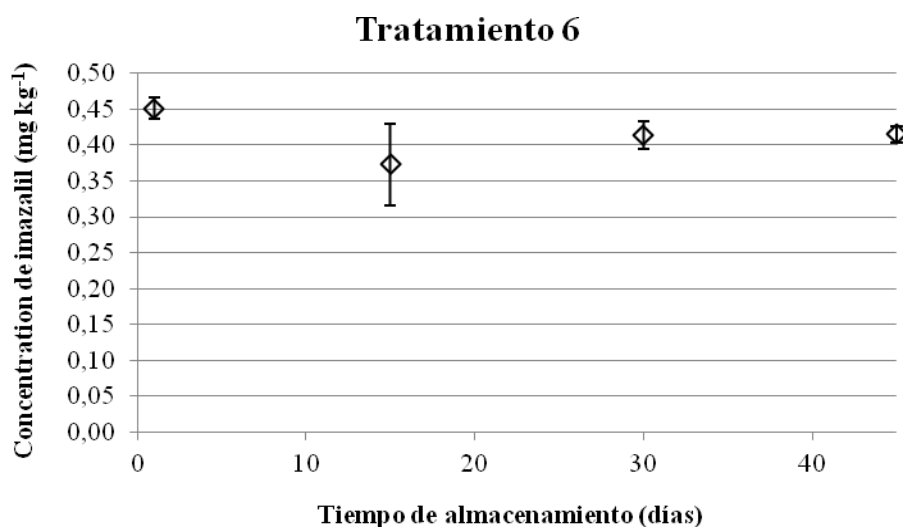


Figura 5.9. Gráfico de comportamiento de la concentración de imazalil respecto al tiempo de almacenamiento en el tratamiento 6 (imazalil a 1000 mg L⁻¹ + 1 % NaHCO₃)

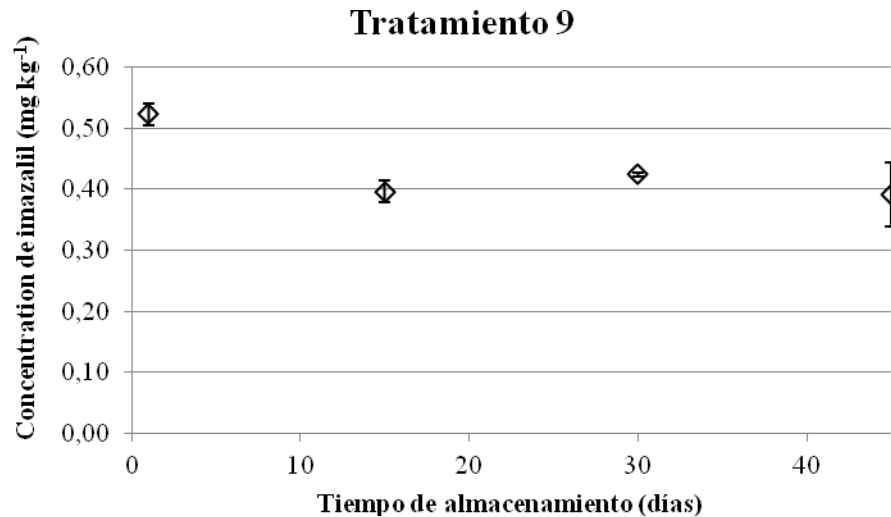
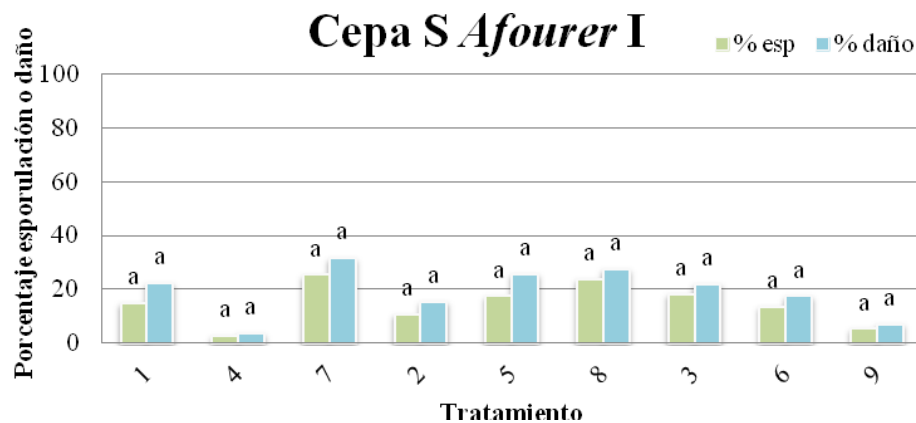
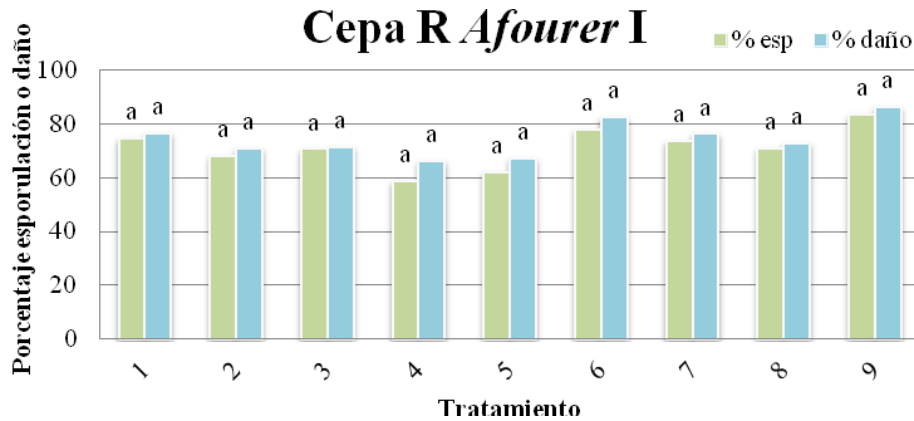


Figura 5.10. Gráfico de comportamiento de la concentración de imazalil respecto al tiempo de almacenamiento en el tratamiento 9 (imazalil a 1000 mg L⁻¹ + 3 % NaHCO₃)

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en los que respecta a esporulación e incidencia sobre la variedad Afourer inoculada con cepas de *Penicillium digitatum* resistentes y sensibles a imazalil, que se vincula a los resultados de disipación presentados anteriormente.

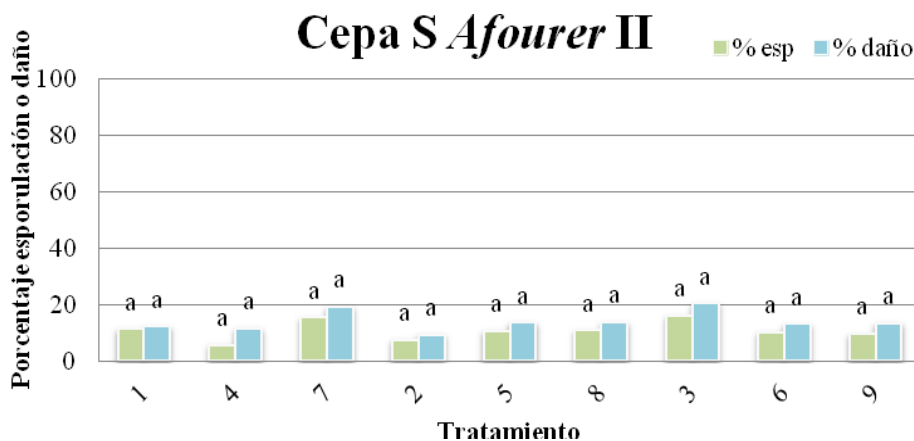


Figuras 5.11. Porcentajes de esporulación y daño de *P. digitatum* sobre mandarina Afourer inoculada con una cepa sensible al imazalil, para los distintos tratamientos realizados con SOPP/ sin PCZ (*Afourer I*)



Figuras 5.12. Porcentajes de esporulación y daño de *P. digitatum* sobre mandarina Afourer inoculada con una cepa resistente al imazalil, para los distintos tratamientos realizados con SOPP/ sin PCZ (*Afourer I*)

Como se puede observar en las Figuras 5.11 y 5.12, no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos evaluados para la cepa sensible y la cepa resistente sobre mandarina Afourer trabajando con SOPP. En el caso de los tratamientos donde no se aplicó SOPP (pero sí PCZ) en la línea de packing, los porcentajes de daño sobre la fruta inoculada con las distintas cepas, se muestran en las Figuras 5.13 y 5.14. Los resultados muestran que no existen diferencias estadísticas en el control del patógeno entre los tratamientos aunque se observa menor porcentaje de daño para la fruta inoculada con la cepa sensible y que recibió tratamiento con PCZ.



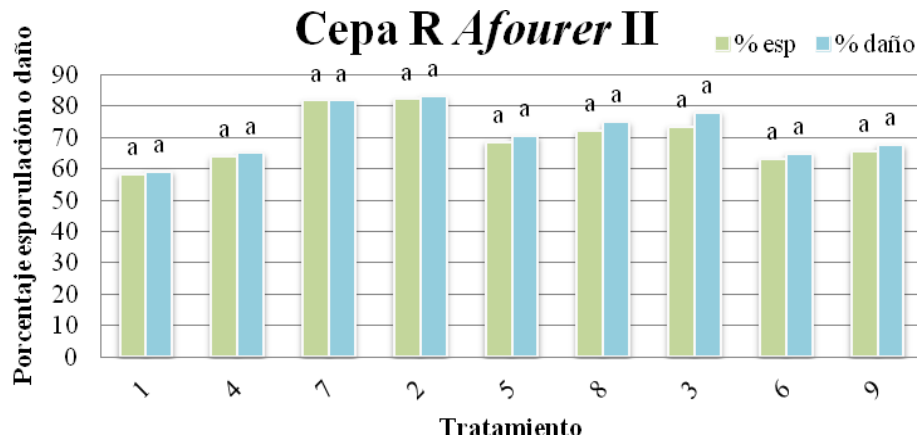
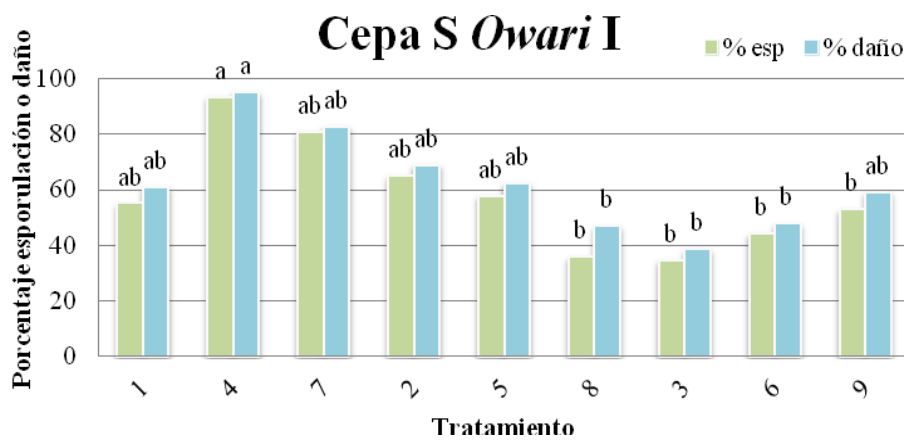
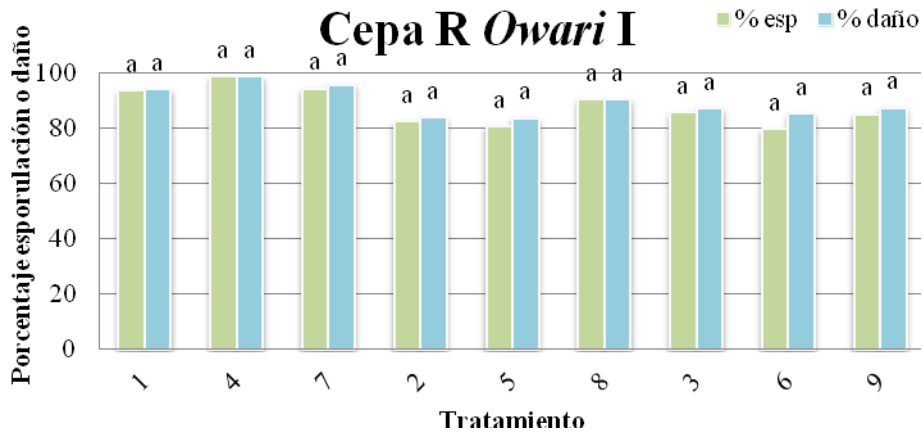


Figura 5.13 y 5.14 . Porcentajes de esporulación y daño de *P. digitatum* sobre mandarina Afourer inoculada con una cepa sensible y resistente al imazalil, para los distintos tratamientos realizados sin SOPP/ con PCZ (*Afourer II*)

Los mismos tratamientos fueron evaluados en mandarina Owari, una satsuma de media estación y la efectividad de los tratamientos se diferenció estadísticamente para las cepas sensibles a imazalil tanto en los tratamientos con y sin SOPP. Sin embargo, la efectividad de los tratamientos sobre el patógeno fue menor al alcanzado en la mandarina Afourer.





Figuras 5.15 y 5.16. Se muestran los porcentajes de esporulación y daño de *P. digitatum* sobre mandarina Owari inoculada con una cepa sensible y resistente al imazalil, para los distintos tratamientos realizados con SOPP/ sin PCZ (*Owari I*)

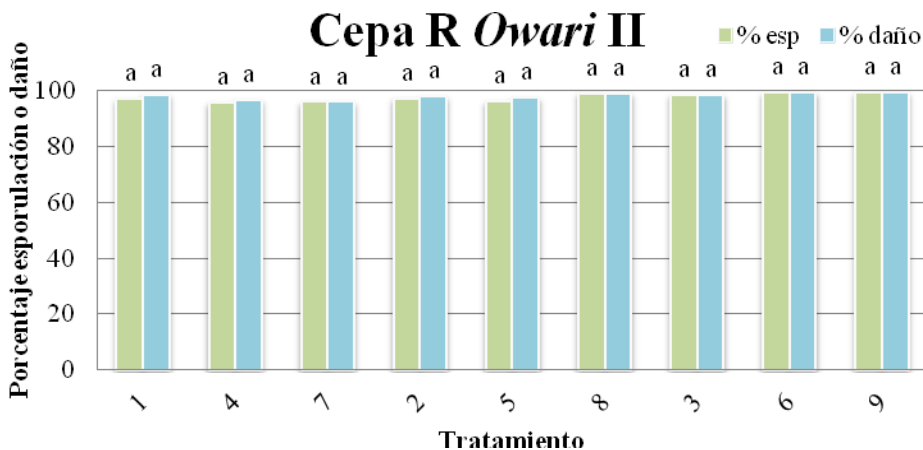
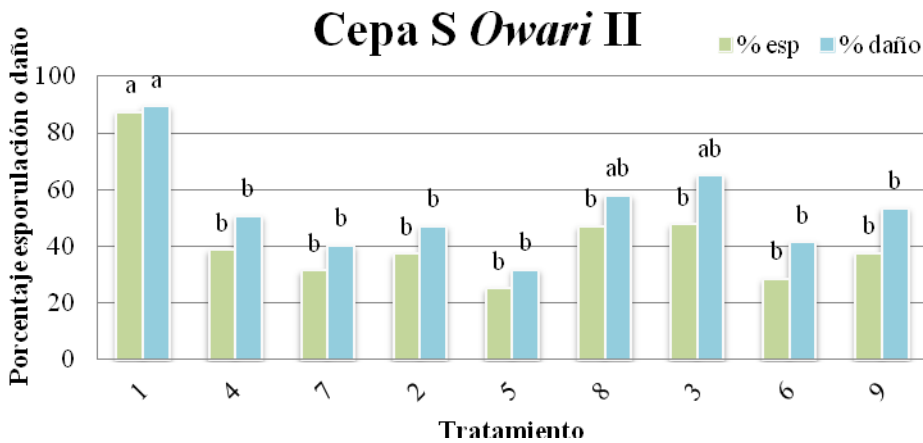


Figura 5.17 y 5.18 . Se muestran los porcentajes de esporulación y daño de *P. digitatum* sobre mandarina Owari inoculada con una cepa sensible y resistente al imazalil, para los distintos tratamientos realizados sin SOPP/ con PCZ (*Owari II*)

5.5. Conclusiones

Se investigó la disipación de los insecticidas y fungicidas seleccionados en mandarina y naranja en condiciones de campo. Los insecticidas de origen biológico spinosad y abamectina mostraron la tasa de disipación más rápida. Estos compuestos evidencian una reducción del riesgo de excedencia de LMR. Sin embargo, su protección no es por un largo período. En tales casos, si bien se presenta la posibilidad de realizar tasas de aplicación más cercanas para proteger la fruta contra el ataque de insectos, se debe considerar el riesgo de desarrollar resistencia a los pesticidas. Se sugiere aplicar estos pesticidas luego de una inspección más cercana de las poblaciones de plagas para lograr el mejor control y minimizar la probabilidad de que se desarrolle la resistencia a los pesticidas.

La disipación de residuos sobre nova y navelina siguió una cinética de primer orden. Se estableció la vida media de los pesticidas en diferentes condiciones geográficas y de campo. El resultado es relevante, ya que los fungicidas e insecticidas probados pertenecen a diferentes clases de químicos. A veces los agricultores aplican fungicidas de manera preventiva, cuando se desarrollan condiciones climáticas húmedas y aumenta el riesgo de ataque de hongos, sin importar qué tan cerca estén de la cosecha.

Dando continuidad a los resultados anteriores, se realizaron los ensayos sobre otra variedad de mandarinas, Clementinas, la de mayor importancia comercial en términos de exportaciones de Uruguay, se incluyó la incidencia del almacenamiento en frío de fruta tratada, donde evaluó el comportamiento de difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad aplicados en el campo, bajo condiciones controladas. Los resultados indican que, en el momento de la cosecha, después de 42 días desde la aplicación, las disipaciones de estos pesticidas fueron 80, 92, 48 % para los tres primeros y por debajo del nivel de determinación para spinosad. En el día 28, ya no se detectó spinosad. Las ecuaciones que mejor describen las curvas de disipación obtenidas de los pesticidas estudiados en Clementinas mostraron comportamientos diferentes entre los mismos. La vida media, calculada con los modelos de mejor ajuste a partir de los datos experimentales, fue de 19,2 d (modelo de primer orden) para difenoconazol, 4,1 d (modelo de RF primer orden) para imidacloprid, 39,8 d (modelo de segundo orden) para piraclostrobina y 5,8 d (modelo de primer orden) para spinosad en Clementinas. Esto

implica que la cinética de disipación, si bien se conserva para difenoconazol y spinosad, es diferente para el imidacloprid, lo que implica la influencia de otros factores, quizás inherentes a la variedad considerada. Los valores de $t_{1/2}$ para imidacloprid determinados en mandarina Nova fueron mayores, al igual que para spinosad, aunque en este último caso las vidas medias fueron del mismo orden (7,5-10,7 d). En el caso de difenoconazol, valor obtenido en Nova estuvo entre 8,6-13,3 d siendo valores menores que en Clementina. Los resultados son el primer registro sobre la persistencia de piraclostrobina en mandarinas, mostrando una vida media más larga en esta matriz que las reportadas para cualquier otra fruta. Las Clementinas, tratadas se cosecharon y se sometieron a los tratamientos habituales de poscosecha: después pasar la fruta por un baño con hipoclorito, se aplicó imazalil y cera y las mandarinas se almacenaron a 4 °C. Después de 32 días, el almacenamiento en frío no causó diferencias significativas en los niveles de residuos de los cuatro pesticidas en comparación con los determinados en las mandarinas recién cosechadas. Todos los residuos se encontraron por debajo de su límite máximo de residuos (LMR) de *Codex* y de la UE para mandarina desde el día de aplicación.

En instancias de poscosecha, se evaluó el uso de NaHCO_3 en forma conjunta con imazalil al ser aplicados en cascada en la línea de packing, Dado que es una práctica habitual el uso de drencher con procloraz y este activo está prohibido en EEUU, se evaluaron distintas combinaciones de NaHCO_3 – IMZ utilizando en un caso procloraz y en otro SOPP. Los tratamientos no mostraron diferencias significativas en su efectividad para el control de *P. digitatum* en mandarinas Afourer, Okitsu y Owari. Los residuos de imazalil asociados al tratamiento sobre Afourer mostraron disipación pero con una tasa baja y en particular para los tratamientos 2 y 5, en donde se trabajó con 500 mg L⁻¹ de IMZ y 500 mg L⁻¹ IMZ + 1 % de NaHCO_3 no se observó disipación del activo durante los 45 días del ensayo.

CAPÍTULO IV: Pesticidas en efluentes de packings cítricos: determinación y degradación fotocatalítica.

6.1. Introducción

Cuando se trata de la contaminación del agua tanto superficial como subterránea, uno de los principales puntos de preocupación es la eliminación de pesticidas utilizados en diversas actividades industriales y agrícolas, para evitar la contaminación del recurso. Las características específicas de las aguas industriales, debidas a su heterogeneidad y la toxicidad inherente a los contaminantes que contiene hacen necesario un manejo separado utilizando tratamientos específicos según el tipo y la carga de los mismos. Actualmente, parte de la investigación relacionada con la descontaminación del agua está dirigida a promover métodos no convencionales para degradar contaminantes recalcitrantes. Entre ellos se encuentran los procesos avanzados de oxidación (AOP) que involucran la generación de radicales hidroxilo ($\text{HO}\bullet$) con alto poder oxidante, capaces de transformar la materia orgánica en dióxido de carbono, agua y sales. Específicamente, las aguas residuales de los packing de cítricos son un punto importante de contaminación con pesticidas. Buscando desarrollar metodologías efectivas y de bajo costo para eliminar estos contaminantes en el mismo lugar donde se generan, fue evaluada la degradación fotocatalítica de 4 pesticidas empleados típicamente en la cadena de cítricos: imazalil (IMZ), pirimetanil (PYR), procloraz (PCZ) y propiconazol (PROP).

6.2. Caracterización de efluente en contenido de pesticidas

6.2.1. Experimental

La determinación de imazalil, pirimetanil, procloraz y propiconazol se realizó utilizando un LC-MS/MS bajo las condiciones analíticas descritas en el Capítulo I, sección 3.2.1. La linealidad de los analitos se estudió trabajando en solvente y en matriz y se comprobó calculando los *back-calculated concentration* (BCC). El actual documento SANTE establece que la desviación de las concentraciones calculadas a partir de la calibración de las concentraciones verdaderas, utilizando la curva de calibración en la

región relevante no debe ser superior a $\pm 20\%$ (DG-SANTE, 2017).

También se evaluó el efecto matriz al preparar la curva de calibración con agua (90 %) respecto a la calibración en solvente. Para todos los pesticidas, el EM fue despreciable ($< 20\%$).

Las muestras de efluente se diluyeron con acetonitrilo (9:1), buscando en todos los casos que la respuesta para un analito dado quede comprendida en el rango de trabajo. En el caso de las muestras obtenidas en los ensayos de fotocátalisis, las mismas parten de una mezcla 1:1 H₂O:MeOH que es diluida con MeCN por lo que la cuantificación se realizó en solvente.

6.2.2. Resultados y discusión

Desempeño instrumental

Se estableció un límite de reporte de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos los analitos y un rango lineal de 10 a 100 y $120 \mu\text{g L}^{-1}$ con BBC menores a 20 %.

Análisis de muestras reales

Se obtuvieron muestras de efluentes de un packing cítrico a las que se les determinó pH y se cuantificó los pesticidas presentes. En la Tabla 6.1 se presentan los resultados obtenidos. Los 4 fungicidas utilizados en poscosecha se encuentran presentes en los efluentes generados en las distintas etapas del proceso. Las concentraciones de los mismos varían desde 1,5 a 540 mg L^{-1} como se muestra a continuación.

Pesticida	Conc (mg L^{-1})					
	LR	Pileta	Precalibradora	Drencher	SOPP	Packing 2
IMZ	0,01	< LR	< LR	< LR	< LR	202,87
PCZ	0,01	< LR	< LR	< LR	< LR	< LR
PYR	0,01	1,74	293,85	340,46	1,75	2,77
PROP	0,01	1,53	542,72	240,07	2,63	216,83
<i>pH</i>	-	<i>7,19</i>	<i>6,44</i>	<i>5,79</i>	<i>7,03</i>	<i>5,83</i>

Tabla 6.1. Concentraciones de los principios activos en estudio en distintos efluentes de un packing cítrico y medidas de pH. Nota: <LR: concentración menor a límite de reporte.

6.3. *Degradación fotocatalítica de pesticidas habitualmente contenidos en efluentes de packings*

6.3.1. Experimental

Foto-reactor

El reactor está compuesto por un tubo de vidrio de borosilicato que transmite aproximadamente un 80% de la luz UVA, irradiado por 4 lámparas que emiten radiación UVA en el rango de longitudes de onda de 340 a 420 nm. El conjunto formado por el tubo y la lámpara está rodeado por un reflector de aluminio. El reactor incluye un depósito encamisado que mantiene una temperatura constante al recircular el agua de un baño termostático y un agitador magnético que permite que el catalizador (TiO_2) se mantenga en suspensión. El uso de este semiconductor aumenta la eficiencia del proceso respecto a la fotólisis que pueda darse en aquellos compuestos que sean capaces de absorber la luz UV naturalmente. El medio de reacción es forzado a recircular a través del tubo por una bomba peristáltica.

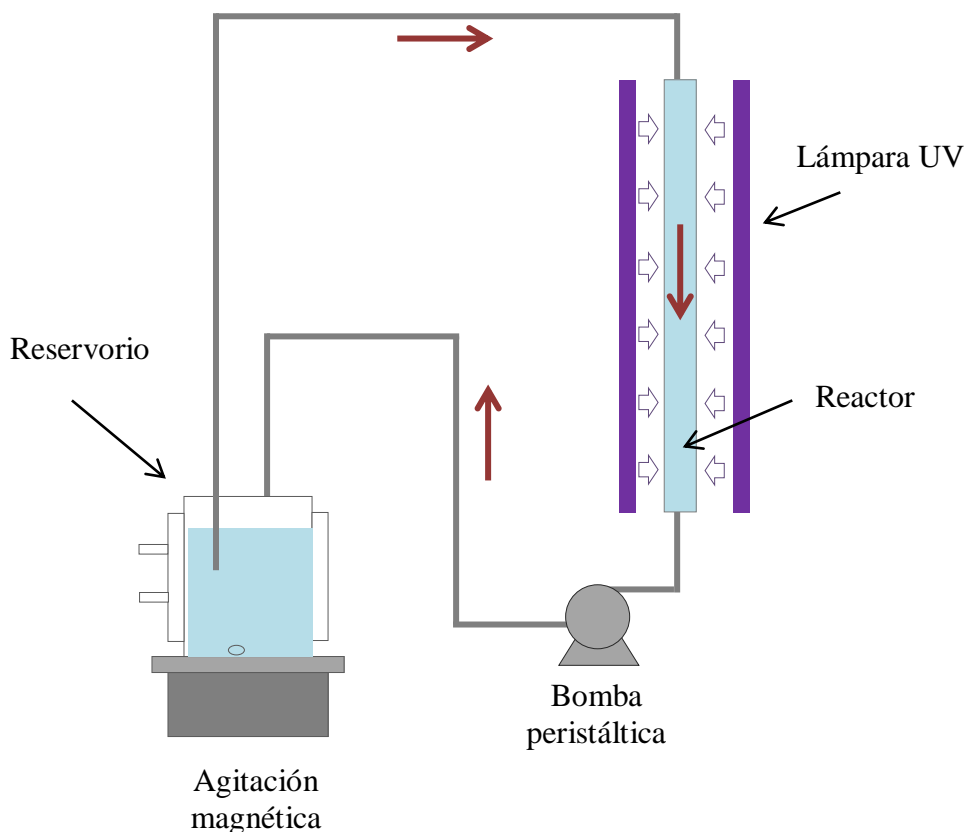


Figura 6.1. Esquema de foto-reactor utilizado

Pruebas catalíticas y toma de muestras.

El medio de reacción consistió en 150 mL de 10 mg L⁻¹ de solución acuosa de cada pesticida: IMZ, PYR, PCZ o PROP. Se aplicó una carga de catalizador de 1 g L⁻¹ de TiO₂. Las muestras se tomaron a tiempo cero y cada 30 min hasta 180 min de reacción. Se añadió metanol a cada muestra tomada y se almacenó en viales oscuros para su análisis.

Condiciones analíticas

El análisis de imazalil, pirimetanil, procloraz y propiconazol se realizó utilizando un LC-MS/MS bajo las condiciones analíticas descritas en el Capítulo I, sección 3.2.1. Se incorporó al análisis la determinación del metabolito de procloraz con significancia toxicológica: 2,4,6-triclorofenol. Para su determinación se trabajó con el mismo sistema instrumental, variando únicamente el modo de ionización (ESI negativo) y el gradiente de fase móvil. Las fases móviles son agua con 0,1 % de HCOOH (A) y acetonitrilo (B). El proceso de elución comenzó con el 70 % de la fase móvil A, que se redujo al 0 % en

4,5 min y luego se elevó al 70 % en 2,5 min (se mantiene por 3 min) haciendo un tiempo total de ejecución de 10 min.

Pesticida	tR (min)	Ion precursor (m/z)	PD (V)	Ion producto (m/z)	EC (V)
2,4,6- Triclorofenol	8,1	194,8	-65	158,9	-30
				35,0	-40

Tabla 6.2 Pesticida, tiempo de retención (tR), ión precursor, ión producto, potencial de desintegración (DP) y energía de colisión (EC).

6.3.2. Resultados y discusión

La eliminación de los 4 pesticidas en el medio de reacción alcanzó 97,7 % (PYR), 98.7 % (PROP), 99,0 % (PCZ) y 99,2 % (IMZ) a los 180 min de tratamiento (ver Figura 6.1). Por lo tanto, se puede concluir que el proceso catalítico en las condiciones estudiadas puede degradar estos agroquímicos. El proceso de degradación es más efectivo para PCZ y PROP debido a que su degradación prácticamente total se logra en solo una hora. La degradación de los otros pesticidas, IMZ y PYR, tiene lugar a una velocidad de reacción más baja.

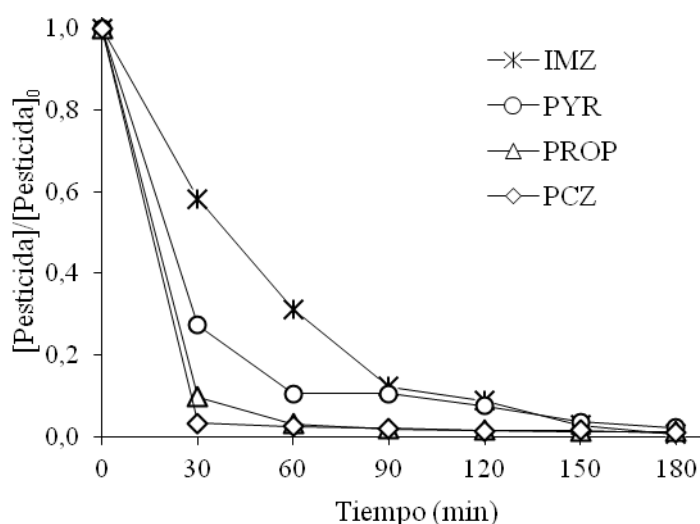


Figura 6.2. Patrón de degradación fotocatalítica de imazalil (IMZ), pirimetanil (PYR), procloraz (PCZ) y propiconazol (PROP) a escala de laboratorio.

Durante la realización de la fotocatalisis para procloraz, se analizó el medio de reacción buscando determinar la presencia de 2,4,6 triclorofenol y de esa forma comentar a establecer rutas de degradación. No se encontró la presencia del mismo por encima del límite de reporte: $10 \mu\text{g L}^{-1}$. La visión global de la idoneidad del proyecto se completará con ensayos ecotoxicológicos y el esclarecimiento de los productos de transformación de cada pesticida.

6.4. Conclusiones

El desarrollo de herramientas que involucren procesos verdes para la eliminación de pesticidas contenidos en las aguas residuales de la industria de los cítricos es relevante para nuestro país. Los procesos basados en tecnologías de oxidación avanzadas como la foto-catálisis son amigables con el ambiente, fáciles de realizar y baratos. En este trabajo, la eliminación de los 4 pesticidas en el medio de reacción alcanzó 97,7 % (PYR), 98,7 % (PROP), 99,0 % (PCZ) y 99,2 % (IMZ) a los 180 min de tratamiento. Estos resultados preliminares confirman la efectividad de los POA para la remoción de contaminantes en agua y sugieren que la fotocatalisis podría ser una tecnología muy adecuada para el tratamiento de efluentes de la industria de los cítricos. La visión global de la idoneidad del proyecto deberá completarse con ensayos eco-toxicológicos, medición de carbono total y la elucidación de los productos de transformación de cada pesticida.

Conclusiones y perspectivas

Durante la ejecución del presente trabajo de tesis se ha contribuido al desarrollo de herramientas para estudiar la dinámica de los residuos de pesticidas en la cadena cítrica. La estrategia para cumplir este objetivo general fue estudiar el contenido de pesticidas en matrices cítricas (fruta, aceite esencial y jugo concentrado) y evaluar el comportamiento de los mismos durante su aplicación a nivel de campo y en poscosecha bajo condiciones definidas a lo largo de la cadena productiva.

La selección de los pesticidas a ser evaluados en los distintos estudios se realizó en base a la probabilidad de ser encontrados en frutas cítricas y productos derivados, determinada mediante la ocurrencia de aparición de muestras positivas en datos bibliográficos y finalmente priorizada según datos de compuestos incluidos en la guía SATA de Uruguay (Guía_SATA, 2016-2017).

Se desarrollaron y validaron metodologías analíticas y se buscaron las mejores técnicas de detección, optimizando los modos instrumentales para la determinación de los pesticidas seleccionados para alcanzar los menores límites de detección posible. Estas metodologías permiten determinar la mayoría de los pesticidas seleccionados a niveles adecuados para cada matriz estudiada.

Se ajustaron y validaron metodologías multiresiduos que permiten determinar 5 pesticidas comúnmente utilizados en etapa de campo en el cultivo de cítricos por LC-MS/MS: abamectina, imidacloprid, difenoconazol, piraclostrobina y spinosad. Se alcanzaron límites de detección ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) menores a los LMRs de la UE y/ o del *Codex Alimentarius* de cada pesticida en mandarina, naranja y limón.

La dilución de muestra previa a la etapa de extracción y análisis se aplicó con éxito para el análisis de los subproductos de limón: jugo concentrado y aceite esencial. Al analizar el jugo concentrado, la dilución x 4 en la etapa de extracción permitió una aplicación uniforme del protocolo QuEChERS tamponado con acetato. Los efectos de la matriz fueron mínimos después de la dilución.

Por otro lado, el análisis de aceites esenciales involucró la simple dilución de la muestra antes de la determinación y puede representar un gran beneficio para los laboratorios, ya que permite aumentar el flujo de análisis de muestras. El QuEChERS buffereado con ácido acético/acetato fue eficaz para analizar los pesticidas dependientes del pH en la fruta de limón que no fueron posibles de analizar con el método de acetato de etilo.

Los tres métodos ajustados y validados para frutas de limón, jugos concentrados y aceites esenciales permitieron la determinación de un grupo de pesticidas comúnmente utilizados en la industria de los cítricos. Actualmente se aplican a la determinación rutinaria de residuos de pesticidas en productos de limón para la exportación. Se encontraron residuos de pesticidas (imazalil, piraclostrobina, pirimetanil, procloraz, difenoconazol, 2-fenilfenol) en las tres matrices evaluadas. En las frutas de limón y los jugos concentrados, los residuos se encontraban en concentraciones inferiores a los LMR establecidos por el *Codex Alimentarius* y la Unión Europea (UE). En el caso de los AEs, procloraz, 2-fenilfenol y propiconazol superan los LMR de limón de la UE.

Se estudió el efecto matriz (EM) de los extractos de acetato de etilo de siete frutas cítricas diferentes en la determinación de 80 residuos de pesticidas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo de alta resolución (UHPLC- (ESI) -HR-ToF) a modo de resolución de 4 GHz. Se demostró la importancia de la exactitud y precisión en la determinación de masas para minimizar los efectos de la matriz, que en el análisis de triple cuadrupolo son muy importantes de acuerdo a la literatura. Solo el 20 % de los pesticidas evaluados mostraron EM notable, debido a la co-elución con productos naturales entre $t_R = 3-11$ min. En el Análisis de Componentes Principales que analiza los co-extractivos detectados, agrupa las mandarinas y las variedades de naranja entre sí, pero separa el limón, la naranja y la mandarina. Los EM fueron diferentes entre las especies pero similares entre las variedades, lo que obliga a determinar los residuos de pesticidas a través de curvas de calibración de la misma fruta. Esta conclusión es relevante ya que muestra la necesidad de validar cada método para la fruta que se va a analizar y que no alcanza con el estudio exhaustivo de una sola de las frutas cítricas.

Por otro lado, trabajando con un cromatógrafo de gases con espectrometría de masa

exacta (GC-ToF-MS) en modo de ionización electrónica (IE), se desarrolló un método automatizado rápido para la determinación de residuos de pesticidas en naranjas utilizando una base de datos de masa exacta "desarrollada en el laboratorio". Esta base de datos es una herramienta excelente si se tiene en cuenta que no se dispone de bibliotecas de masa exacta comercial. Pero aún necesita mejorarse y se debe ampliar su alcance. La identificación automática se realizó y se comparó con dos potencias de resolución, mostrando mejores resultados en el modo de alta resolución. Se demostró una confiabilidad de identificación del 87 % un nivel de concentración de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ en naranja. Finalmente, es importante tener en cuenta que al trabajar en el modo de adquisición de escaneo completo, es posible un análisis retrospectivo, lo que permite la búsqueda de compuestos inicialmente no incluidos en la base de datos.

Las metodologías validadas para el análisis de pesticidas en fruta fresca cumplen un objetivo dual, ya que por un lado son un insumo para el contralor de fruta para exportación y consumo interno, y por otro lado fueron empleadas para estudiar la disipación de pesticidas en instancias de chacra y poscosecha.

Por un lado, se investigó la disipación de los insecticidas y funguicidas seleccionados en mandarina y naranja en condiciones de campo en donde los insecticidas de origen biológico spinosad y abamectina mostraron la tasa de disipación más rápida. Estos compuestos evidencian una reducción del riesgo de excedencia de LMR. Sin embargo, la protección que dan no es por un largo período. En tales casos, si se presenta la posibilidad de realizar tasas de aplicación más cercanas para proteger la fruta contra el ataque de insectos, se debe considerar el riesgo de desarrollar resistencia a los pesticidas. Se sugiere aplicar estos pesticidas luego de una inspección más cercana de las poblaciones de plagas para lograr el mejor control y minimizar la probabilidad de que se desarrolle la resistencia a los pesticidas.

Por otro lado, dando continuidad a los resultados anteriores, se evaluó la incidencia del almacenamiento en frío de fruta tratada en campo, donde se evaluó el comportamiento de difenoconazol, imidacloprid, piraclostrobina y spinosad en mandarinas Clementina. Se desprende que en el momento de la cosecha, después de 42 días desde la aplicación, las disipaciones de estos pesticidas fueron 80, 92, 48 % para los tres primeros y por

debajo del nivel de determinación para spinosad ya que en el día 28, ya no se lo detectó mas. Los resultados son el primer registro sobre la persistencia de piraclostrobina en mandarinas, mostrando una vida media más larga en esta matriz que las reportadas para cualquier otra fruta. Las frutas tratadas se cosecharon y se sometieron a los tratamientos habituales de poscosecha y se almacenaron a 4 °C. Después de 32 días, el almacenamiento en frío no causó diferencias significativas en los niveles de residuos en comparación con los determinados en las mandarinas recién cosechadas. Todos los residuos se encontraron por debajo de su límite máximo de residuos (LMR) de Codex y de la UE para mandarina desde el día de aplicación.

Los resultados obtenidos en los estudios de disipación garantizan la seguridad alimentaria y el cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas. Con estos resultados se proporciona una guía para el uso seguro y razonable de estos pesticidas en cultivos de cítricos en las condiciones descritas.

En lo que refiere al desarrollo de herramientas que involucren procesos verdes para la eliminación de pesticidas contenidos en las aguas residuales de la industria de los cítricos, en este trabajo la eliminación de 4 de los pesticidas más usados en la poscosecha de cítricos, alcanzó 97,7 % (pirimetanil), 98,7 % (propiconazol), 99,0 % (procloraz) y 99,2 % (imazalil) a los 180 min de tratamiento. Estos resultados preliminares confirman la efectividad de los PAO para la remoción de contaminantes en agua y sugieren que la fotocatalisis podría ser una tecnología muy adecuada para el tratamiento de efluentes de la industria de los cítricos. La visión global de la idoneidad del tratamiento deberá completarse con ensayos eco-toxicológicos, medición de carbono total y la elucidación de los productos de transformación de cada pesticida.

Referencias bibliográficas

- Adak, T., & Mukherjee, I. (2016a). Dissipation kinetics of spinosad from tomato under sub-tropical agro-climatic conditions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(5).
- Adak, T., & Mukherjee, I. (2016b). Investigating Role of Abiotic Factors on Spinosad Dissipation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(1), 125-129.
- AECOSAN. (2018). Cómo se fijan los LMR? In (Vol. 2018). <http://www.aecosan.msssi.gob.es>: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social.
- Agustí, M. (2012). Plagas. In *Citricultura* (2da ed.). España-México: Mundi Prensa.
- Altieri, G., Di Renzo, G. C., Genovese, F., Calandra, M., & Strano, M. C. (2013). A new method for the postharvest application of imazalil fungicide to citrus fruit. *Biosystems Engineering*, 115(4), 434-443.
- Álvarez, W., & De Souza Rocha, R. (2010). El clima en Uruguay. In (Material complementario. Geografía 3 ed., Vol. 2017). http://www.santillana.com.uy/descargas/Geografia_3_fichas_tematicas/Ficha_2.pdf: Santillana.
- Alves, A. A. R., Rezende, M. J. C., Hovell, A. M. C., Bizzo, H. R., Oliveira, A. C. L., Rodrigues, S. V., & Rezende, C. M. (2012). Comparison between GC-MS-SIM and GC-ECD for the determination of residues of organochlorine and organophosphorus pesticides in brazilian citrus essential oils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(2), 306-314.
- Amano, T., & Takeda, T. (2002). Case studies of fungicide-resistance management in Japan. In *ACS Symposium Series* (Vol. 808, pp. 230-241).
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431.
- Anastassiades, M., Scherbaum, E., Tsdelen, B., Stajnbaher, D. (2007). Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. In M. H. Ohkawa H, Lee PW. (Ed.), *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*. (pp. 439-458). Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Andraščíková, M., Hrouzková, S., & Cunha, S. C. (2013). Combination of QuEChERS and DLLME for GC-MS determination of pesticide residues in orange samples. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(2), 286-297.
- Arce, A., & Soto, A. (2008). *Citrus Essential Oils: Extraction and Deterpenation* (Vol. 2). London: Global Sciences Book.
- Arora, K., Jyot, G., Randhawa, P., & Battu, R. (2008). Dissipation of imidacloprid on Kinnow mandarin fruits under sub-tropical conditions. *Indian Journal of Horticulture*, 65(3), 277-279.
- Awasthi, M. D. (1986). Chemical treatments for the decontamination of brinjal fruit from residues of synthetic pyrethroids. *Pesticide Science*, 17(2), 89-92.
- Badii, M., & Garza, V. (2007). Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos *CULCyT//Impacto Ecológico*, 4(18).
- Bajwa, U., & Sandhu, K. S. (2014). Effect of handling and processing on pesticide residues in food- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(2), 201-220.
- Balba, H. (2007). Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42(4), 441-451.
- Banerjee, K., Mujawar, S., Utture, S. C., Dasgupta, S., & Adsule, P. G. (2013). Optimization of gas chromatography-single quadrupole mass spectrometry conditions for multiresidue analysis of pesticides in grapes in compliance to EU-MRLs. *Food Chem*, 138(1), 600-
-

- 607.
- Barba, A., Cámara, M. A., Galindo, L., Navarro, S., & Escribano, J. A. (1987). Residuos de plaguicidas en conservas de frutos cítricos. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, *13*, 241-248.
- Barrek, S., Paise, O., & Grenier-Loustalot, M. F. (2003). Analysis of pesticide residues in essential oils of citrus fruit by GC-MS and HPLC-MS after solid-phase extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *376*(2), 157-161.
- BCPC. (2012). *A World Compendium The Pesticide Manual* (Seventeenth ed.). Hampshire, United Kingdom.
- Besil, N., Cesio, V., Heinzen, H., & Fernandez-Alba, A. R. (2017). Matrix Effects and Interferences of Different Citrus Fruit Coextractives in Pesticide Residue Analysis Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(23), 4819-4829.
- Besil, N., Pareja, L., Colazzo, M., Niell, S., Rodríguez, A., Cesio, V., & Heinzen, H. (2011). GC-MS method for the determination of 44 pesticides in mandarins and blueberries. In (pp. 156). Montevideo, Uruguay: 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop, Food and Environment.
- Besil, N., Pérez-Parada, A., Cesio, V., Varela, P., Rivas, F., & Heinzen, H. (2016). Degradation of imazalil, orthophenylphenol and pyrimethanil in Clementine mandarins under conventional postharvest industrial conditions at 4 °C. *Food Chemistry*, *194*, 1132-1137.
- Besil, N., Pérez, A., Niell, S., Cesio, V., & Heinzen, H. (2010). Estudio piloto de la transferencia de pesticidas de la cáscara al jugo de naranja durante el procesamiento. In (pp. 185-188). III Simposio de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus: INIA.
- Besil, N., Uclés, S., Mezcúa, M., Heinzen, H., & Fernández-Alba, A. R. (2015). Negative chemical ionization gas chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated accurate mass data processing for determination of pesticides in fruit and vegetables. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(21), 6327-6343.
- Boeris, V., Arancibia, J. A., & Olivieri, A. C. (2014). Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, *814*, 23-30.
- Boesl, U. (2017). Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. *Mass Spectrometry Reviews*, *36*(1), 86-109.
- Botero-Coy, A. M., Marín, J. M., Serrano, R., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2015). Exploring matrix effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *407*(13), 3667-3681.
- Boyd, K., Basic, C., & Bethem, R. A. (2008a). Mass analyzers for quantitation: separation of ions by m/z values. In K. Boyd, C. Basic & R. A. Berthem (Eds.), *Trace quantitative analysis by mass spectrometry*. Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.
- Boyd, K., Basic, C., & Bethem, R. A. (2008b). Tools of the Trade IV. Interfaces and Ion Sources for chromatography–Mass Spectrometry. In K. Boyd, C. Basic & R. A. Berthem (Eds.), *Trace quantitative analysis by mass spectrometry*. Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.
- Carbajo, J., Jiménez, M., Miralles, S., Malato, S., Faraldos, M., & Bahamonde, A. (2016). Study of application of titania catalysts on solar photocatalysis: Influence of type of pollutants and water matrices. *Chemical Engineering Journal*, *291*, 64-73.
- Carman, G. (1989). Chemical control of insect and mites on citrus. In W. Reuther, E. Calavan & G. Carman (Eds.), *The citrus industry* (Vol. 5). USA: University of California.
- Cervera, M. I., Medina, C., Portoles, T., Pitarch, E., Beltran, J., Serrahima, E., Pineda, L., Munoz,
-

- G., Centrich, F., & Hernandez, F. (2010). Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 397(7), 2873-2891.
- Cervera, M. I., Portolés, T., Pitarch, E., Beltrán, J., & Hernández, F. (2012). Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1244, 168-177.
- Chen, Jiao, B., Su, X., Zhao, Q., & Sun, D. (2015). Dissipation and residue of 2,4-d in citrus under field condition. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(5).
- Chen, M., Tao, L., McLean, J., & Lu, C. (2014). Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6082-6090.
- Chen, W., Jiao, B., Su, X., Zhao, Q., Qin, D., & Wang, C. (2013). Dissipation and residue of forchlorfenuron in citrus fruits. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(6), 756-760.
- Choi, S. J., Kim, E. J., Lee, J. I., Cho, I. S., Park, W. H., Hwang, I. S., Kim, M. S., & Kim, G. H. (2013). Determination of post-harvest fungicide in citrus fruits using LC-MS. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 45(4), 409-415.
- Clará, R. A., Gómez Marigliano, A. C., & Sólamo, H. N. (2011). Physicochemical properties and vapor-liquid equilibrium data for steam-distilled lemon essential oil. *Latin American Applied Research*, 40(1), 61-66.
- Codex. (1999). Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs CAC/GL 33-199. In .
- Codex_Alimentarius. (2003). Maximum residue limits for processed or ready to eat foods or feeds. In (Vol. CX/PR 03/17). The Netherlands.
- Codex_Alimentarius. (2005). Directrices para el uso de la espectrometría de masas (EM) en la identificación, confirmación y determinación cuantitativa de residuos. . In (Vol. CAC/GL 56 2005). The Netherlands.
- Codex_Alimentarius. (2010). Parte del producto a la que se aplican los límites máximos para residuos y que se analiza In (Vol. CAC/GL 41-1993): Codex_Alimentarius.
- Codex_Alimentarius. (2017). GUIDELINES ON PERFORMANCE CRITERIA FOR METHODS OF ANALYSIS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN FOOD AND FEED In (Vol. CAC/GL 90-2017): Codex_Alimentarius.
- Cominellis, C., Kapalka, A., Malato, S., Parsons, S., Poullos, I., & Mantzavinos, D. (2008). Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(6), 769-776.
- Cruz, M., & Alcalá, G. (2007). *La contaminación de suelos y aguas: su prevención con nuevas sustancias*. España: Universidad de Sevilla.
- D'Aquino, S., Palma, A., Angioni, A., & Schirra, M. (2013). Residue levels and efficacy of fludioxonil and thiabendazole in controlling postharvest green mold decay in citrus fruit when applied in combination with sodium bicarbonate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 296-306.
- D'Aquino, S., Schirra, M., Palma, A., Angioni, A., Cabras, P., & Migheli, Q. (2006). Residue levels and effectiveness of pyrimethanil vs imazalil when using heated postharvest dip treatments for control of *Penicillium* decay on citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4721-4726.
- Dasenaki, M. E., Bletsou, A. A., Hanafi, A. H., & Thomaidis, N. S. (2016). Liquid chromatography–tandem mass spectrometric methods for the determination of spinosad, thiacloprid and pyridalyl in spring onions and estimation of their pre-harvest interval values. *Food Chemistry*, 213, 395-401.
- Dass, C. (2007). Modes of ionization. In *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*
-

- (pp. 15-64). New Jersey, EE.UU: John Wiley & Sons, Inc.
- Del Mar Gómez-Ramos, M., Rajska, Ł., Lozano, A., & Fernández-Alba, A. R. (2016). The evaluation of matrix effects in pesticide multi-residue methods: Via matrix fingerprinting using liquid chromatography electrospray high-resolution mass spectrometry. *Analytical Methods*, 8(23), 4664-4673.
- Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P., Verzera, A., Mondello, L., & Dugo, P. (1997). Uruguayan essential oils. Part VI. Composition of lemon oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 12(4), 247-255.
- Desfontaine, V., Veuthey, J. L., & Guilleme, D. (2017). Chapter 8 - Hyphenated Detectors: Mass Spectrometry. In C. F. Poole (Ed.), *Supercritical Fluid Chromatography* (pp. 213-244): Elsevier.
- DG-SANTE. (2015). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document SANTE/11945/2015. In: European Commission.
- DG-SANTE. (2017). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document SANTE/11813/2017. In: European Commission.
- DIEA. (2003). La citricultura en Uruguay: contribución a su conocimiento. In E. Agropecuarias (Ed.): MGAP.
- DIEA. (2017). Anuario Estadístico Agropecuario In (20th ed.): MGAP.
- Domènech, X., Jardim, W., & Litter, M. (2001). Procesos Avanzados de Oxidación para la eliminación de contaminantes. In M. p. C. Blesa (Ed.), *Usos de óxidos semiconductores y materiales relacionados para aplicaciones ambientales y ópticas*. La Plata, Argentina: Gráfica 12 y 50. .
- Dong, M., Wen, G., Tang, H., Wang, T., Zhao, Z., Song, W., Wang, W., & Zhao, L. (2018). Dissipation and safety evaluation of novaluron, pyriproxyfen, thiacloprid and tolfenpyrad residues in the citrus-field ecosystem. *Food Chemistry*, 269, 136-141.
- Đorđević, T., & Đurović-Pejčev, R. (2016). Food processing as a means for pesticide residue dissipation. *Pesticide and Phytomedicine*, 31(3-4), 89-105.
- Dreassi, E., Zanfini, A., Zizzari, A. T., La Rosa, C., Botta, M., & Corbini, G. (2010). Lc/Esi/Ms/Ms determination of postharvest fungicide residues in citrus juices. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1301-1306.
- Dugo, G., & Di Giacomo, A. (2002). *The Genus Citrus: Medicinal and Aromatic Plants — Industrial Profiles*. London: Taylor & Francis
- Edwards, C. (1975). Factors that can affect the persistence of pesticides in plants and soils. *Pure Applied Chemistry*, 42(12), 39-56.
- EFSA. (2011). Modification of the existing MRLs for pyraclostrobin in various crops. *EFSA Journal*, 9(3), 2120.
- Erasmus, A., Lennox, C. L., Jordaan, H., Smilanick, J. L., Lesar, K., & Fourie, P. H. (2011). Imazalil residue loading and green mould control in citrus packhouses. *Postharvest Biology and Technology*, 62(2), 193-203.
- Erasmus, A., Lennox, C. L., Korsten, L., Lesar, K., & Fourie, P. H. (2015). Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. *Postharvest Biology and Technology*, 107, 66-76.
- Erney, D. R., Gillespie, A. M., Gilvydis, D. M., & Poole, C. F. (1993). Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 638(1), 57-63.
- EURL-SRM. (2010). Development and Validation of Single Residue Methods - Strategy of EURL-SRM. In (Vol. 2018). <http://www.eurl->
-

- pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?CntID=764&LabID=200&Lang=EN.
- European Commission. (2005). Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*
- European Commission. (2013). Commission Regulation (EU) No 212/2013 of 11 March 2013 replacing Annex I to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards additions and modifications with respect to the products covered by that Annex.
- European Commission. (2015). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document SANTE/11945/2015. In.
- European Commission. (2018). Regulation (EC) No 2018/783-784-785 of the European Parliament and of the Council of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance imidacloprid, thiamethoxam and chlothianidin *Official Journal of the European Union*
- Fantke, P., Gillespie, B. W., Juraske, R., & Jolliet, O. (2014). Estimating Half-Lives for Pesticide Dissipation from Plants. *Environmental Science & Technology*, 48(15), 8588-8602.
- Fantke, P., & Juraske, R. (2013). Variability of pesticide dissipation half-lives in plants. *Environ Sci Technol*, 47(8), 3548-3562.
- FAO. (1997). Estimation of residue levels for calculation of dietary intake of pesticide residues. In *FAO Manual on the Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed* (pp. 79-122).
- FAO. (2000). Pesticide residue in food-2000 In *Plant Production and Protection Paper-163*. Rome: Food Agricultural Organization
- FAO. (2002). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. In (pp. 35). Rome: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- FAO. (2018a). Codex Alimentarius. LMR de plaguicidas. In (Vol. 2018). http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/es/?p_id=177: FAO.
- FAO. (2018b). FAOSTAT. In (Vol. 2018): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- FAO. (2018c). Integrated Pest Management (IPM) definition. In (Vol. 2018, pp. <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en/>): Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farha, W., Abd El-Aty, A. M., Rahman, M. M., Shin, H. C., & Shim, J. H. (2016). An overview on common aspects influencing the dissipation pattern of pesticides: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(12).
- Fernandes, V. C., Domingues, V. F., Delerue-Matos, C., & Mateus, N. (2011). Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatographic Methods. An Overview. *Journal of Chromatographic Science*, 49(9), 715-730.
- Ferrer, C., Agüera, A. N. A., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A. R., Mack, D., Anastassiades, M., & Gamón, M. (2010). Efficiency evaluation of the main multiresidue methods used in Europe for the analysis of amitraz and its major metabolites. *Journal of AOAC International*, 93(2), 380-388.
- Ferrer, C., Lozano, A., Agüera, A., Girón, A. J., & Fernández-Alba, A. R. (2011). Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7634-7639.
-

- Ferrer, I., García-Reyes, J. F., & Fernandez-Alba, A. (2005). Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(7), 671-682.
- Ferrucci, F. (1997). *Estudio Global para Identificar Oportunidades de Mercado de Frutas y Hortalizas en la Región Andina*: PROCIANDINO.
- Fillatre, Y., Rondeau, D., Daguin, A., & Communal, P. Y. (2016). A workflow for multiclass determination of 256 pesticides in essential oils by liquid chromatography tandem mass spectrometry using evaporation and dilution approaches: Application to lavandin, lemon and cypress essential oils. *Talanta*, 149, 178-186.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, 19(3), 156-164.
- Fisher, M., & Mrozik, H. (1989). Chemistry. In Campbell (Ed.), *Ivermectin and Abamectin* (1 ed.). New York: Springer-Verlag.
- Flamini, G., Tebano, M., & Cioni, P. L. (2007). Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of Citrus limon. *Analytica Chimica Acta*, 589(1), 120-124.
- Fonfria, M. A. (2003). *Citricultura*: Mundi-Prensa Libros, S.A.
- Forgács, E., & Cserháti, T. (2003). CHROMATOGRAPHY | Principles. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 1259-1267). Oxford: Academic Press.
- Funk, S. (2007). Pyrimethanil. In (Vol. 2018): FAO.
- García-Portillo, M., Salvador, E., Olivares, J., Llamas, R., Soriano, M., & Lorenzo, J. (2004). Purification system for wastewater coming from fruit and vegetable processing plants and phytosanitary treatments in the field. In (Vol. US 6,709,585). Spain: Tecnidex, Tecnicas de Desinfeccion S.A, Paterna.
- García-Gámez, C., Gortáres-Moroyoqui, P., & Drogui, P. (2011). *Tratamientos biológicos y de oxidación avanzada combinados para una solución a la biotecnología ambiental* (Vol. 6).
- Garrido French, A., Martínez Vidal, J. L., Fernández Moreno, J. L., & Romero-González, R. (2009). Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition. *Journal of Chromatography A*, 1216(23), 4798-4808.
- Gilbert-López, B., Jaén-Martos, L., García-Reyes, J. F., Villar-Pulido, M., Polgar, L., Ramos-Martos, N., & Molina-Díaz, A. (2012). Study on the occurrence of pesticide residues in fruit-based soft drinks from the EU market and morocco using liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Control*, 26(2), 341-346.
- Gomez-Ramos, M. M., Ferrer, C., Malato, O., Aguera, A., & Fernandez-Alba, A. R. (2013). Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: screening and quantitative studies. *J Chromatogr A*, 1287, 24-37.
- Grimalt, S., & Dehouck, P. (2016). Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. *Journal of Chromatography A*, 1433, 1-23.
- Grimalt, S., V.Sancho, J., Pozoa, O. J., & Hernández, F. E. (2010). Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(4), 421-436.
- Guía_SATA. (2016-2017). Guía Uruguay para la protección y nutrición vegetal. In (14 ed.).
- Guilbault, G. G., & Hjelm, M. (1989). Nomenclature for automated and mechanised analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 61(9), 1657-1664.
- Hanson, B., Bond, C., Buhl, K., & Stone, D. (2015). Pesticide Half-life Fact Sheet. In (Vol. 2018). <http://npic.orst.edu/factsheets/half-life.html>: National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services.
- He, X.-g., Lian, L.-z., Lin, L.-z., & Bernart, M. W. (1997). High-performance liquid
-

- chromatography–electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.). *Journal of Chromatography A*, 791(1), 127-134.
- Henry, J., & Heinke, G. (1999). *Ingeniería ambiental*. México: Pearson Education.
- Hiemstra, M., & de Kok, A. (2007). Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 3-25.
- Holmes, G. J., & Eckert, J. W. (1999). Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*, 89(9), 716-721.
- Horváth-Kerkai, E., & Stéger-Máté, M. (2012). Manufacturing Fruit Beverages and Concentrates. In N. Sinha, J. Sidhu, J. Barta, J. Wu & M. Cano (Eds.), *Handbook of Fruits and Fruit Processing* (2nd Edition ed., pp. 223). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Huber, L. (1998). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*: Taylor & Francis.
- ICA. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos (*Citrus*): Medidas para la temporada invernal. In Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario.
- IUPAC. (1997). *Compendium of Chemical Terminology* (2nd ed.). England: Blackwell Scientific Publications.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23(5), 371-378.
- Jacobsen, R. E., Fantke, P., & Trapp, S. (2015). Analysing half-lives for pesticide dissipation in plants. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 26(4), 325-342.
- Jankowska, M., Kaczynski, P., Hrynko, I., & Lozowicka, B. (2016). Dissipation of six fungicides in greenhouse-grown tomatoes with processing and health risk. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11885-11900.
- JCGM. (2008). Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement In 100:2008
- Jiménez-Tototzintle, M., Oller, I., Hernández-Ramírez, A., Malato, S., & Maldonado, M. I. (2015). Remediation of agro-food industry effluents by biotreatment combined with supported $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ solar photocatalysis. *Chemical Engineering Journal*, 273, 205-213.
- Jones, L., Kinsella, B., Forde, K., Furey, A., & Regan, F. (2017). A robust analytical method for the determination of pesticide residues in wastewater. *Analytical Methods*, 9(28), 4167-4174.
- Kanaze, F. I., Termentzi, A., Gabrieli, C., Niopas, I., Georgarakis, M., & Kokkalou, E. (2009). The phytochemical analysis and antioxidant activity assessment of orange peel (*Citrus sinensis*) cultivated in Greece-Crete indicates a new commercial source of hesperidin. *Biomed Chromatogr*, 23(3), 239-249.
- Kanetis, L., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2008). Baseline sensitivities for new postharvest fungicides against *Penicillium* spp. on citrus and multiple resistance evaluations in *P. digitatum*. *Plant Disease*, 92(2), 301-310.
- Karas, P., Metsoviti, A., Zisis, V., Ehaliotis, C., Omirou, M., Papadopoulou, E. S., Menkissoglou-Spiroudi, U., Manta, S., Komiotis, D., & Karpouzias, D. G. (2015). Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agro-industrial effluents. *Science of the Total Environment*, 530-531, 129-139.
- Karmakar, R., & Kulshrestha, G. (2009). Persistence, metabolism and safety evaluation of thiamethoxam in tomato crop. *Pest Management Science*, 65(8), 931-937.
- Katagi, T. (2004). Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 182, 1-195.
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2010). Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid
-

- chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): "Where is the crossover point?". *Analytica Chimica Acta*, 673(1), 60-72.
- Khan, S., Ahmad, R., Ahmad Asad, S., & Shahzad, M. (2014). Citrus Flavonoids: Their Biosynthesis, Functions and Genetic Improvement. In K. Hayat (Ed.), *Citrus Molecular Phylogeny, Antioxidant properties and medicinal uses*. New York: Nova Science Publishers.
- Kinay, P., Mansour, M. F., Mlikota Gabler, F., Margosan, D. A., & Smilanick, J. L. (2007). Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, 26(4), 647-656.
- Kittlaus, S., Kempe, G., & Speer, K. (2013). Evaluation of matrix effects in different multipesticide residue analysis methods using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, including an automated two-dimensional cleanup approach. *Journal of Separation Science*, 36(13), 2185-2195.
- Kittlaus, S., Schimanke, J., Kempe, G., & Speer, K. (2011). Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(46), 8399-8410.
- Koesukwiwat, U., Lehotay, S. J., & Leepipatpiboon, N. (2011). Fast, low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables. *J Chromatogr A*, 1218(39), 7039-7050.
- Kruve, A., Kunnapas, A., Herodes, K., & Leito, I. (2008). Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1187(1-2), 58-66.
- Kusvuran, E., Yildirim, D., Mavruk, F., & Ceyhan, M. (2012). Removal of chlorpyrifos ethyl, tetradifon and chlorothalonil pesticide residues from citrus by using ozone. *Journal of Hazardous Materials*, 241-242, 287-300.
- Kwon, H., Lehotay, S. J., & Geis-Asteggiane, L. (2012). Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *Journal of Chromatography A*, 1270, 235-245.
- Lado, J., Manzi, M., Silva, G., Luque, E., Blanco, O., & Pérez, E. (2010). Effective alternatives for the postharvest control of imazalil resistant *Penicillium digitatum* strains. In *Acta Horticulturae* (Vol. 877, pp. 1449-1456).
- Lado, J., Pérez, E., De Negris, A., Dol, I., & Knochen, M. (2013). Residuos en frutos de Naranja del fungicida imazalil. *Agrociencia Uruguay*, 7(2), 83-90.
- Lambropoulou, D., & Albanis, T. (2007). *Methods of Sample Preparation for Determination of Pesticide Residues in Food Matrices by Chromatography-Mass Spectrometry-Based Techniques: A Review* (Vol. 389).
- Lehotay, S. J., O'Neil, M., Tully, J., García, A. V., Contreras, M., Mol, H., Heinke, V., Anspach, T., Lach, G., Fussell, R., Mastovska, K., Poulsen, M. E., Brown, A., Hammack, W., Cook, J. M., Alder, L., Lindtner, K., Vila, M. G., Hopper, M., De Kok, A., Hiemstra, M., Schenck, F., Williams, A., & Parker, A. (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 90(2), 485-520.
- Lesueur, C., & Gartner, M. (2005). Routine Identification and Quantification of Pesticide Multiresidues in Fruit and Vegetable Samples with Full Scan, SIM and Deconvolution Reporting Software. *Ernährung/NUutrition*, 29, 466-471.
- Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530-545.
- Liu, Y., Sun, H., & Wang, S. (2013). Dissipation and residue of spinosad in zucchini under field
-

- conditions. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(2), 256-259.
- Lozano, A., Kiedrowska, B., Scholten, J., de Kroon, M., de Kok, A., & Fernández-Alba, A. R. (2016). Miniaturisation and optimisation of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 192, 668-681.
- Lu, C., Warchol, K. M., & Callahan, R. A. (2014). Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology*, 67(1), 125-130.
- Luke, M. A., Froberg, J. E., & Masumoto, H. T. (1975). Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58(5), 1020-1026.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit phenolics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Malato, S., Blanco, J., Vidal, A., & Richter, C. (2002). Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: an overview. *Applied Catalysis B: Environmental*, 37(1), 1-15.
- Mezcua, M., Martínez-Uroz, M. A., Wylie, P. L., & Fernández-Alba, A. R. (2009). Simultaneous screening and target analytical approach by gas chromatography-quadrupole-mass spectrometry for pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 92(6), 1790-1806.
- MGAP. (2018). Resolución N° 75/018. In D. G. d. S. Agrícolas (Ed.). Montevideo, Uruguay.
- Miles, A. K., Willingham, S. L., & Cooke, A. W. (2004). Field evaluation of strobilurins and a plant activator for the control of citrus black spot. *Australasian Plant Pathology*, 33(3), 371-378.
- Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Llorca, M., Sánchez Pérez, J. A., & Malato, S. (2017). Combination of nanofiltration and ozonation for the remediation of real municipal wastewater effluents: Acute and chronic toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 442-451.
- Mol, H. G. J., Rooseboom, A., Van Dam, R., Roding, M., Arondeus, K., & Sunarto, S. (2007). Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(6), 1715-1754.
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017). Chapter 2 - Short Overviews of Analytical Techniques Not Containing an Independent Separation Step. In S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis* (pp. 31-53). Boston: Elsevier.
- Montemurro, N., Grieco, F., Lacertosa, G., & Visconti, A. (2002). Chlorpyrifos decline curves and residue levels from different commercial formulations applied to oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5975-5980.
- Montti, M., Visciglio, S., Raviol, F., Subovich, G., & Munitz, M. (2013). Incidencia de la carga inicial de pesticidas en fruta sobre los niveles residuales en aceites esenciales cítricos. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, XXIV(47), 187-218.
- Morton, V., & Staub, T. (2008). A Short History of Fungicides. In APSnet Feature: The American Phytopathological Society.
- MSP. (1994). Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto 315/994. In (3er Edition ed., pp. 464). Montevideo, Uruguay: IMPO.
- MSP. (2009). Decreto N° 285/009. In Montevideo, Uruguay: Ministerio de Salud Pública.
- Mutengwe, M. T., Chidamba, L., & Korsten, L. (2016). Pesticide residue monitoring on South African fresh produce exported over a 6-year period. *Journal of Food Protection*, 79(10), 1759-1766.
- Nair, R. G., Bharadwaj, P. J., & Samdarshi, S. K. (2016). Design improvement and performance evaluation of solar photocatalytic reactor for industrial effluent treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 134, 301-307.
-

- Nanita, S. C. (2013). Quantitative mass spectrometry independence from matrix effects and detector saturation achieved by flow injection analysis with real-time infinite dilution. *Anal Chem*, *85*(24), 11866-11875.
- Nannapaneni, R., Chalova, V. I., Crandall, P. G., Ricke, S. C., Johnson, M. G., & O'Bryan, C. A. (2009). Campylobacter and Arcobacter species sensitivity to commercial orange oil fractions. *Int J Food Microbiol*, *129*(1), 43-49.
- Navarro, S., Oliva, J., Navarro, G., & Barba, A. (2001). Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(1), 35-40.
- Navickiene, S., & Ribeiro, M. L. (2002). A simple and rapid extraction for gas chromatographic determination of thiabendazole and imazalil residues in lemons. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *13*(5), 592-596.
- Niell, S., Besil, N., Colazzo, M., Cesio, V., & Heinzen, H. (2017). QuEChERS and Other MRM Sample Preparation Methods SPE, SPME, DLLME, SBSE, ASE, MAE, SFE. In H. Heinzen, L. Nollet & A. R. Fernandez-Alba (Eds.), *Multiresidue Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Food* (Vol. 1, pp. 452): Boca Raton: CRC Press.
- Niessen, W. M. A. (2017). MS-MS and MSn☆. In J. C. Lindon, G. E. Tranter & D. W. Koppenaal (Eds.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)* (pp. 936-941). Oxford: Academic Press.
- Obagwu, J., & Korsten, L. (2003). Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*, *28*(1), 187-194.
- OECD. (2008). *Test No. 508: Magnitude of the Pesticide Residues in Processed Commodities*.
- Omirou, M., Dalias, P., Costa, C., Papastefanou, C., Dados, A., Ehaliotis, C., & Karpouzias, D. G. (2012). Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies. *Environmental Pollution*, *166*, 31-39.
- Ortelli, D., Edder, P., & Corvi, C. (2005). Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food Additives and Contaminants*, *22*(5), 423-428.
- Paranjape, K., Gowariker, V., Krishnamurthy, V. N., & Gowariker, S. (2014). Prochloraz. In *The Pesticide Encyclopedia* (pp. 406).
- Park, N.-H., Shin, K.-H., & Kang, M. K. (2017). 34 - Antifungal and Antiviral Agents. In F. J. Dowd, B. S. Johnson & A. J. Mariotti (Eds.), *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry (Seventh Edition)* (pp. 488-503): Mosby.
- Páscoa, R. N. M. J., Moreira, S., Lopes, J. A., & Sousa, C. (2018). Citrus species and hybrids depicted by near- and mid-infrared spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(10), 3953-3961.
- Pássaro, C. P. (2012). *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización* (Vol. 1): Universitaria Lasallista.
- Paya, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., & Barba, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem*, *389*(6), 1697-1714.
- Payá, P., Oliva, J., Cámara, M. A., & Barba, A. (2007). Dissipation of insect growth regulators in fresh orange and orange juice. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, *72*(2), 161-169.
- Pérez, E., Blanco, O., Berreta, C., Dol, I., & Lado, J. (2011). Imazalil concentration for in vitro monitoring of imazalil resistant isolates of *Penicillium digitatum* in citrus packinghouses. *Postharvest Biology and Technology*, *60*(3), 258-262.
- Peris-Vicente, J., Marzo-Mas, A., Roca-Genovés, P., Carda-Broch, S., & Esteve-Romero, J.
-

- (2016). Use of micellar liquid chromatography for rapid monitoring of fungicides post harvest applied to citrus wastewater. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *42*, 284-292.
- Peris-Vicente, J., Roca-Genoves, P., Tayeb-Cherif, K., & Esteve-Romero, J. (2016). Development and validation of a method to determine thiabendazole and o-phenylphenol in wastewater using micellar liquid chromatography-fluorescence detection. *Electrophoresis*, *37*(19), 2517-2521.
- Petucci, C., & Mallis, L. (2005). Automated accurate mass data processing using a gas chromatograph/time-of-flight mass spectrometer in drug discovery. *Rapid Commun Mass Spectrom*, *19*(11), 1492-1498.
- Phartiyal, T., & Srivastava, R. M. (2014). Dissipation of imidacloprid on lemon fruit rind under tarai agro-climatic condition of Uttarakhand. *Journal of Entomological Research*, *38*(4), 285-288.
- Picó, Y., El-Sheikh, M. A., Alfarhan, A. H., & Barceló, D. (2018). Target vs non-target analysis to determine pesticide residues in fruits from Saudi Arabia and influence in potential risk associated with exposure. *Food and Chemical Toxicology*, *111*, 53-63.
- Pihlström, T. (2015). Analysis of pesticide residues in food using ethyl acetate extraction and detection with GC382 MS/MS and LC-MS/MS (SweET). . In E. Cortes, N. Gras, N. D.; & P. Lillo (Eds.), *Proceedings of the 5th Latin American Pesticide Residues Workshop, food and environment* (pp. 72). Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Pihlström, T., Blomkvist, G., Friman, P., Pagard, U., & Österdahl, B. G. (2007). Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *389*(6), 1773-1789.
- Pirsaheb, M., Fattahi, N., Rahimi, R., Sharafi, K., & Ghaffari, H. R. (2017). Evaluation of abamectin, diazinon and chlorpyrifos pesticide residues in apple product of Mahabad region gardens: Iran in 2014. *Food Chemistry*, *231*, 148-155.
- Poole, C. F. (2007). Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1158*(1-2), 241-250.
- Portolés, T., Mol, J. G. J., Sancho, J. V., López, F. J., & Hernández, F. (2014). Validation of a qualitative screening method for pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography quadrupole-time of flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Analytica Chimica Acta*, *838*, 76-85.
- Prousalis, K. P., Polygenis, D. A., Syrokou, A., Lamari, F. N., & Tsegenidis, T. (2004). Determination of carbendazim, thiabendazole, and o-phenylphenol residues in lemons by HPLC following sample clean-up by ion-pairing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *379*(3), 458-463.
- Racke, K. D. (2006). A Reduced Risk Insecticide for Organic Agriculture: Spinosad Case Study. In *Crop Protection Products for Organic Agriculture* (Vol. 947, pp. 92-108): American Chemical Society.
- Radišić, M., Grujić, S., Vasiljević, T., & Laušević, M. (2009). Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *113*(2), 712-719.
- Rahman, M. M., Farha, W., Abd El-Aty, A. M., Kabir, M. H., Im, S. J., Jung, D. I., Choi, J. H., Kim, S. W., Son, Y. W., Kwon, C. H., Shin, H. C., & Shim, J. H. (2015). Dynamic behaviour and residual pattern of thiamethoxam and its metabolite clothianidin in Swiss chard using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *174*, 248-255.
- Ramadan, G., Shawir, M., El-Bakary, A., & Abdelgaleil, S. (2016). Dissipation of four insecticides in tomato fruit using high performance liquid chromatography and QuECHERS methodology. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *76*(1), 129-133.
- Rizzetti, T. M., Kemmerich, M., Martins, M. L., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R.
-

- (2016). Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 196, 25-33.
- Robards, K., & Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. A review. *Analyst*, 122(2), 11R-34R.
- Rodríguez, V. A., Avanza, M. M., Mazza, S. M., & Giménez, L. I. (2010). Pyraclostrobin effect to control of citrus black spot. *Summa Phytopathologica*, 36(4), 334-337.
- Ruiz, I., Morales, A., Barba, A., & Oliva, J. (2012). Determination of natural pesticides in fresh fruits using liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 95(1), 238-243.
- Ryad, L., & Mahmoud, A. (2006). Study the Effect of Household Processing on some Pesticide Residues in Olive Fruits. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 6, 588-593.
- Sabale, R., Shabeer, T. P. A., Utture, S. C., Banerjee, K., Jadhav, M. R., Oulkar, D. P., Adsule, P. G., & Deshmukh, M. B. (2014). Dissipation kinetics, safety evaluation, and assessment of pre-harvest interval (PHI) and processing factor for kresoxim methyl residues in grape. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(4), 2369-2374.
- Saitta, M., Di Bella, G., & Dugo, G. (2012). Pesticides and plasticizers in Citrus essential oils: An ordinary history of research. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 171-180.
- Saitta, M., Di Bella, G., Salvo, F., Lo Curto, S., & Dugo, G. (2000). Organochlorine pesticide residues in Italian citrus essential oils, 1991-1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 797-801.
- Sánchez Pérez, J. A., Carra, I., Sirtori, C., Agüera, A., & Esteban, B. (2014). Fate of thiabendazole through the treatment of a simulated agro-food industrial effluent by combined MBR/Fenton processes at µg/L scale. *Water Research*, 51, 55-63.
- Sannino, A. (2007). Determination of three natural pesticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(13), 2079-2086.
- Sannino, A., Bolzoni, L., & Bandini, M. (2004). Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1036(2), 161-169.
- Scattolini, A. (2003). Algunas enfermedades de los cítricos. In A. Rodríguez & A. García (Eds.), *Producción orgánica: aportes para el manejo de sistemas ecológicos en el Uruguay* (pp. 213-224). Montevideo: PREDEG. GTZ.
- Schirra, M., Palma, A., Barberis, A., Angioni, A., Garau, V. L., Cabras, P., & D'Aquino, S. (2010). Postinfection activity, residue levels, and persistence of azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil applied alone or in combination with heat and imazalil for green mold control on inoculated oranges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3661-3666.
- Schreiber, A. (2010). Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples In: AB SCIEX.
- Schulman, Y., & Monselise, S. P. (1970). Some Studies on the Cuticular Wax of Citrus Fruits. *Journal of Horticultural Science*, 45(4), 471-478.
- Shan, A. Y., Ghazi, T. I. M., & Rashid, S. A. (2010). Immobilisation of titanium dioxide onto supporting materials in heterogeneous photocatalysis: A review. *Applied Catalysis A: General*, 389(1-2), 1-8.
- Shinde, S., Neharkar, P., Dhurve, N., Sawai, H., Lavhe, N., & Masolkar, D. (2017). Evaluation of different insecticides against citrus leaf miner on Nagpur mandarin. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(6), 1889-1892.
- Singh, N., Bisht, S., Yadav, G., & Kamari, B. (2017). Dissipation of imidacloprid on sweet orange
-

- fruits. *International Journal of Chemical Studies*, 5(6), 683-686.
- Singh, S., & Battu, R. S. (2012). Dissipation kinetics of spinosad in cabbage (*Brassica oleracea* L.var. capitata). *Toxicological and Environmental Chemistry*, 94(2), 319-326.
- 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(2), 226-238.
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Margosan, D. A., Mlikota Gabler, F., & Goodwine, W. R. (2005). Influence of pH and NaHCO₃ on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. *Plant Disease*, 89(6), 640-648.
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., & Sorenson, D. (2006). Pre- and postharvest treatments to control green mold of citrus fruit during ethylene degreening. *Plant Disease*, 90(1), 89-96.
- Smith, C. (1988). *History of benzimidazole use and resistance*. Minnesota: American Phytopathological Society.
- Soler, C., Mañes, J., & Picó, Y. (2005). Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits. *Journal of Chromatography A*, 1088(1–2), 224-233.
- Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., & Alder, L. (2012). Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? *Analytical Chemistry*, 84(3), 1474-1482.
- Stan, H.-J. (2005). GC-MS. I: Basic principles and technical aspects of GC-MS for pesticide residue analysis. In A. Fernández-Alba (Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry XLIII* Elsevier.
- Stevens, J., Breckenridge, C. B., & Wright, J. (2010). Chapter 97 - The Role of P-glycoprotein in Preventing Developmental and Neurotoxicity: Avermectins – A Case Study. In R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)* (pp. 2093-2110). New York: Academic Press.
- Suárez-Jacobo, A., Alcantar-Rosales, V. M., Alonso-Segura, D., Heras-Ramírez, M., Elizarragaz-De La Rosa, D., Lugo-Melchor, O., & Gaspar-Ramírez, O. (2017). Pesticide residues in orange fruit from citrus orchards in Nuevo Leon State, Mexico. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 10(3), 192-199.
- Sugitate, K., Nakamura, S., Orikata, N., Mizukoshi, K., Nakamura, M., Toriba, A., & Hayakawa, K. (2012). Search of components causing matrix effects on GC/MS for pesticide analysis in food. *Journal of Pesticide Science*, 37(2), 156-163.
- Sun, D., Pang, J., Jiao, B., Zhao, Q., & Zhou, Z. (2015). Multiresidue method for the simultaneous determination of 16 acaricides by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in citrus. *Journal of Separation Science*, 38(22), 3845-3851.
- Sun, D., Zhu, Y., Pang, J., Zhou, Z., & Jiao, B. (2016). Residue level, persistence and safety of spirodiclofen-pyridaben mixture in citrus fruits. *Food Chemistry*, 194, 805-810.
- Taga, O., & Bilgin, B. (2010). *Determination of 107 Pesticide Residues in Citrus Fruits by Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (Vol. 22).
- Tahboub, Y. R., Zaater, M. F., & Al-Talla, Z. A. (2005). Determination of the limits of identification and quantitation of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1098(1-2), 150-155.
- Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535-552.
-

- Tetra_Pak. (2004). Fruit Processing. In *The Orange Book* (pp. 198). Lund, Sweden: Tetra Pak Processing Systems AB.
- Timme, G., & Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradation behaviour of pesticide residues. 1. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 33(1), 47-60.
- Timme, G., Frehse, H., & Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradation behavior of pesticide residues II. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 39, 187-203.
- Timmer, L. W., Peever, T., Solel, Z., & Akimitsu, K. (2003). *Alternaria diseases of citrus - Novel pathosystems* (Vol. 42).
- Tiscornia, G., Cal, A., & Giménez, A. (2016). Análisis y caracterización de la variabilidad climática en algunas regiones de Uruguay. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 42(1), 66-71.
- Torres, C. M., Picó, Y., & Mañes, J. (1995). Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables by matrix solid phase dispersion (MSPD) and different gas chromatography element-selective detectors. *Chromatographia*, 41(11-12), 685-692.
- Truffelli, H., Palma, P., Famigliani, G., & Cappiello, A. (2011). An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 30(3), 491-509.
- Tsumura-Hasegawa, Y., Tonogai, Y., Nakamura, Y., & Ito, Y. (1992). Residues of Post-Harvest Application Pesticides in Citrus Fruits after Storage and Processing into Lemon Marmalade. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 33(3), 258-266.
- Uçan, F., Ağçam, E., & Akyildiz, A. (2016). Bioactive compounds and quality parameters of natural cloudy lemon juices. *Journal of Food Science and Technology*, 53(3), 1465-1474.
- Uclés, A., Herrera López, S., Dolores Hernando, M., Rosal, R., Ferrer, C., & Fernández-Alba, A. R. (2015). Application of zirconium dioxide nanoparticle sorbent for the clean-up step in post-harvest pesticide residue analysis. *Talanta*, 144, 51-61.
- Uclés, S., Belmonte, N., Mezcuca, M., Martínez, A. B., Martínez-Bueno, M. J., Gamón, M., & Fernández-Alba, A. R. (2014). Validation of a multiclass multiresidue method and monitoring results for 210 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 49(8), 557-568.
- Uclés, S., Lozano, A., Sosa, A., Parrilla Vázquez, P., Valverde, A., & Fernández-Alba, A. R. (2017). Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Talanta*, 174, 72-81.
- USDA. (2017). The National List of Allowed and Prohibited Substances. National Organic Program. In *205.600* (Vol. 205.600): USDA.
- Valenzuela, A. I., Lorenzini, R., Redondo, M. J., & Font, G. (1999). Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit. *Journal of Chromatography A*, 839(1-2), 101-107.
- Verdisson, S., Couderchet, M., & Vernet, G. (2001). Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants. *Chemosphere*, 44(3), 467-474.
- Vicent, A., Armengol, J., & García-Jiménez, J. (2007). Rain fastness and persistence of fungicides for control of alternaria brown spot of citrus. *Plant Disease*, 91(4), 393-399.
- Vitta Brito, Y., Fernandez, A., Moliner-Martínez, Y., & Campíns Falco, P. (2014). Remoción de pesticida organo-fosforados en aguas con nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ soportadas en sílice. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.*, 29(3), 65-72.
- Waks, J., Schiffmann-Nadel, M., Lomaniec, E., & Chalutz, E. (1985). Relation between fruit waxing and development of rots in citrus fruit during storage. *Plant Disease*, 69(10),
-

- 869-870.
- Wang, C., Qiu, L., Zhao, H., Wang, K., & Zhang, H. (2013). Dissipation dynamic and residue distribution of flusilazole in mandarin. *Environmental Monitoring and Assessment*, *185*(11), 9169-9176.
- Wang, J., Chow, W., Chang, J., & Wong, J. W. (2014). Ultrahigh-performance liquid chromatography electrospray ionization Q-orbitrap mass spectrometry for the analysis of 451 pesticide residues in fruits and vegetables: Method development and validation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(42), 10375-10391.
- Wang, Y., Li, S., Zhang, F., Lu, Y., Yang, B., Zhang, F., & Liang, X. (2016). Study of matrix effects for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 4 aminoglycosides residues in milk. *Journal of Chromatography A*, *1437*, 8-14.
- Wang, Z., Cang, T., Qi, P., Zhao, X., Xu, H., Wang, X., Zhang, H., & Wang, X. (2015). Dissipation of four fungicides on greenhouse strawberries and an assessment of their risks. *Food Control*, *55*, 215-220.
- Wang, Z., Cao, Y., Ge, N., Liu, X., Chang, Q., Fan, C., & Pang, G. F. (2016). Wide-scope screening of pesticides in fruits and vegetables using information-dependent acquisition employing UHPLC-QTOF-MS and automated MS/MS library searching. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(27), 7795-7810.
- West, S. D., & Turner, L. G. (2000). Determination of spinosad and its metabolites in citrus crops and orange processed commodities by HPLC with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(2), 366-372.
- Wong, J., Hao, C., Zhang, K., Yang, P., Banerjee, K., Hayward, D., Iftakhar, I., Schreiber, A., Tech, K., Sack, C., Smoker, M., Chen, X., Utture, S. C., & Oulkar, D. P. (2010). Development and Interlaboratory Validation of a QuEChERS-Based Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Multiresidue Pesticide Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(10), 5897-5903.
- Yamazaki, Y., & Ninomiya, T. (1996). Determination of Imazalil Residues in Lemons by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection. *Journal of AOAC International*, *79*(3), 787-790.
- Yang, C. D., & Song, L. H. (2007). Analyses of spinosad and its degradates from light irradiation. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities*, *28*(11), 2056-2059.
- Yang, M., Zhang, J., Zhang, J., Rashid, M., Zhong, G., & Liu, J. (2018). The control effect of fungicide pyraclostrobin against freckle disease of banana and its residue dynamics under field conditions. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*.
- Yang, P., Chang, J. S., Wong, J. W., Zhang, K., Krynitsky, A. J., Bromirski, M., & Wang, J. (2015). Effect of sample dilution on matrix effects in pesticide analysis of several matrices by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(21), 5169-5177.
- Yang, T., Zhao, B., Hou, R., Zhang, Z., Kinchla, A. J., Clark, J. M., & He, L. (2016). Evaluation of the Penetration of Multiple Classes of Pesticides in Fresh Produce Using Surface-Enhanced Raman Scattering Mapping. *Journal of Food Science*, *81*(11), T2891-T2901.
- Yoshioka, N., Akiyama, Y., & Teranishi, K. (2004). Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *Journal of Chromatography A*, *1022*(1-2), 145-150.
- Zhang, F., Yu, C., Wang, W., Fan, R., Zhang, Z., & Guo, Y. (2012). Rapid simultaneous screening and identification of multiple pesticide residues in vegetables. *Analytica Chimica Acta*, *757*, 39-47.
- Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A., & Chen, F. (2012). A review of sample preparation
-

- methods for the pesticide residue analysis in foods. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3), 900-925.
- Zhang, Q., Chen, Y., Wang, S., Yu, Y., Lu, P., Hu, D., & Yang, Z. (2018). Dissipation, residues and risk assessment of spirotetramat and its four metabolites in citrus and soil under field conditions by LC-MS/MS. *Biomedical Chromatography*, 32(4).
- Zheng, X., Ding, L., Chen, Z., Guo, J., Zhang, & Wu, W. (2015). Rapid determination of thiabendazole and carbendazim in concentrated fruit juices by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)*, 33(6), 652-656.
- Zhu, J., Dai, X. J., Fang, J. J., & Zhu, H. M. (2013). Simultaneous detection and degradation patterns of kresoxim-methyl and trifloxystrobin residues in citrus fruits by HPLC combined with QuEChERS. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48(6), 470-476.
-



ANEXO I: Analysis of pesticide residues in fruits and vegetables using gas chromatography-high resolution time-of- flight mass spectrometry

CrossMark
click for updatesCite this: *Anal. Methods*, 2015, 7, 2162

“Analysis of pesticide residues in fruits and vegetables using gas chromatography-high resolution time-of-flight mass spectrometry”

Noelia Belmonte Valles,^a Samanta Ucles,^a Natalia Besil,^{ab} Milagros Mezcua^{*a} and Amadeo R. Fernandez-Alba^a

This work reports a study on the operational parameters and development of a rapid automatic method for determining pesticide residues in fruit and vegetables using gas chromatography full spectra mass acquisition time-of-flight accurate mass spectrometry (GC-TOF-MS) in electron ionization mode (EI) based on the use of an “in-house” accurate-mass database. The database contains 110 GC amenable compounds, with their main fragment ions obtained under electron ionization at 70 eV. In addition, it includes the retention times of each pesticide working at constant flow. This customized database was linked to commercial software, which extracted all the potential compounds of interest from the GC-TOF MS raw data for each sample and matched them against the database to search for the targeted compounds in the sample. Ethyl acetate extracts spiked at 10, 20, 50 and 100 mg kg⁻¹ levels in tomato, orange and spring onion were tested using the automatic detection of the target pesticides; at 10 mg kg⁻¹, 100% of pesticides in tomato, 97.8% of pesticides in spring onion and 95.6% in orange were detected. These results were obtained under an acquisition rate of 4 GHz (12 000 FWHM) and a mass error tolerance of 5 ppm. The retention time window for detection and identification was 0.2 min. Adequate linear responses in the 10–100 mg kg⁻¹ range were obtained for all the compounds in all the matrices, although saturation effects were observed in some cases. The developed method was applied to real samples with the qualitative and quantitative results comparable to those obtained using GC-QqQ-MS/MS.

Received 2nd October 2014
Accepted 15th January 2015

DOI: 10.1039/c4ay02284j

www.rsc.org/methods

Introduction

For a long time, electron ionization gas chromatography coupled with mass spectrometry and a single quadrupole ana-lyser has been the technique of choice for routine laboratories for the analysis of pesticides in fruits and vegetables.^{1–5} The main advantage of this technology is its capability in detecting or identifying a great variety of compounds using well estab-lished mass spectral libraries at 70 eV as well as open post-run analytical evaluation.^{6,7} However, significant selectivity and sensitivity limitations make this technique inadequate with respect to the current strict regulations on pesticide residues in food.^{8,9}

The application of time-of- ight mass spectrometry (TOF-MS) provided two complementary approaches: (i) instruments that feature unit mass resolution at high acquisition speeds (up to 500 spectra per second), which predetermines their use as

detectors coupled to fast and ultra-fast GC or comprehensive two-dimensional GC (GC GC); and (ii) instruments with a moderate acquisition speed (e.g. 20 spectra per second) but which have high mass resolution (>7000 FWHM), allowing a greater ability to resolve the analytes from the matrix compo-nents. A common characteristic of both TOF techniques is the simultaneous sampling and analysis of all the ions across the entire mass range. TOF-MS provides greater sensitivity in full-spectrum acquisition mode as compared to conventional GC-q-MS instruments in electron ionization mode principally due to its high mass-analyzer efficiency; GC-TOF-MS can screen hundreds of compounds at high sensitivity within one run. The high mass-resolving power and mass accuracy provided by GC-TOF-MS makes it possible to obtain extracted ion chromatograms using narrow mass windows, thus excluding a large proportion of the chemical background and isobaric interfer-ences, significantly improving the signal-to-noise ratio. Under these conditions, pesticide identi cation capability is improved. Applications employing GC-TOF-MS (high-speed instruments) have shown it to be a powerful and highly effective analytical tool in food and environmental contaminant analysis (e.g. pesticide residues).^{10–12} Recently, other ionization sources such as atmospheric chemical ionization have been coupled to GC-TOF-MS.¹³ This so ionization mode can allow the

^aUniversity of Almer´ia, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3) Pesticide Residue Research Group, Department of Chemistry and Physics, University of Almer´ia, 04120 La Canada de San Urbano, Almer´ia, Spain. E-mail: mmezcu@ual.es
^bPolo Agroalimentario y Agroindustrial, Departamento de Qu´imica Del Litoral, Centro Universitario Paysandu, Universidad de la Republica, Km 363, Ruta 3, 60000

screening of a wide variety of contaminants and pesticides by tracing the protonated molecule along the chromatogram. In this case, very little or no molecule fragmentation is observed. As widely known, EI has been the most frequently used ionization source in GC-MS methods and rather strong fragmentation of the molecule typically occurs during ionisation. As a result, the molecular ion is often lost. However, EI source can provide a more robust identification criterion, considering that both target and non-target analytes and other diagnostic ions can be selected from the full scan spectra.

The aim of this work is to develop a method for the detection of 110 pesticides and the identification of 45 pesticides in fruits and vegetables using GC-EI-TOF-MS combined with an in-house accurate mass library for automatic detection/identification.

The 45 target pesticides are fully validated and the 110 non-target pesticides are that only match with the library in a diagnostic ion, for this reason these pesticides are considered as detected but not identified.

Experimental

Chemicals and reagents

All pesticide analytical standards used in this study were purchased from Dr Ehrenstorfer (Ausburg, Germany) and Sigma Aldrich (Steinheim, Germany), and they were of analytical grade (purity >95%). A mixed standard solution containing all the pesticides studied was prepared at the concentration of 10 mg mL⁻¹ in ethyl acetate and stored at 20 °C. Ethyl acetate was obtained from Fluka Analytical Pestanal. Anhydrous magnesium sulphate (MgSO₄) was obtained from Pancreac Química S.A. and sodium chloride (NaCl) was obtained from J.T Baker.

Gas chromatography

The separation of the pesticides from the whole fruit or vegetable extracts was carried out using a gas chromatography system (Agilent 7890A); two Agilent Ultra Inert GC column (HP-5MS UI 15 m 0.25 mm 0.25 mm) connected through a capillary flow technology (CFT) were used to provide analytical separation.

The samples were injected using a multimode inlet; injections were carried out in splitless mode with an ultra-inert liner equipped with a glass wool frit obtained from Agilent. The injection volume was 2 mL and the injector temperature was held at 280 °C during the run time. Helium (99.999% purity) was used as the carrier gas. The oven temperature programme was as follows: 60 °C for 1 min, 120 °C at 40 °C min⁻¹, then to

a °C at 5 °C min⁻¹. The analytical separation was performed under retention time locking conditions using chlorpyrifos methyl as the locking compound at a retention time of 18.11

min. The instrument was operated at a constant flow (1.225 mL min⁻¹ in the first column and 1.425 mL min⁻¹ in the second column). The total run time was 40.5 min with 2 additional minutes for back-flushing.

Back-flushing was employed to shorten the analysis time and reduce system maintenance avoiding the arrival of undesirable compounds in the matrix to the detector.

The end of the chromatographic column was connected to the second column through a CFT (capillary flow technology) union, which allows system back-flushing, eliminating unwanted heavy materials from the first column and prolonging the column life. During the run time, the flow was set at 1.0 mL min⁻¹ in the first column and 1.2 mL min⁻¹ in the second column (with a difference of 0.2 mL min⁻¹ over the flow in the first column). Once the analysis was finished, there was a 2 min post run time, where a change in the flow is set: 6 mL min⁻¹ in the second column and consequently the flow in the first column decreased to 5.8 mL min⁻¹. The direction of flow inside the first column was changed, which allows the removal of all high weight molecules or compounds that are not easy to volatilize from the system. One added advantage of this device is that the first column can be changed without venting the mass spectrometer detector (MSD) because the CFT protects the MSD entrance when the column is disconnected by blanketing the connection with the back-flush gas.

Time-of-flight mass spectrometry

The gas chromatography system was connected to a 7200 mass spectrometer time-of-flight instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) equipped with an electron ionization (EI) source. The ion source and quadrupole analyser temperatures were set at 280 and 150 °C, respectively. TOF-MS was operated at two different acquisition rates, 2 GHz (7000 FWHM) and 4 GHz (12 000 FWHM), with acquisition over the mass range of m/z 45–

Perfluorotributylamine (PFTBA) was used for daily MS calibration. The mass accuracy of the generated ions was controlled using an internal mass calibration performed before each injection. This calibration can be programmed in the work list, and when the internal mass calibration performed between the samples showed mass errors higher than 5 ppm, the sequence was automatically stopped to ensure the accuracy of the masses.

Sample treatment

The matrices studied (tomato, spring onion and orange) were obtained from an ecological plantation in Almeria. The fruit and vegetable samples used for the application of the developed method were purchased from different local markets. For all the matrices, an ethyl acetate extraction method¹⁴ was employed, which is described in a subsequent section. A representative 10 g portion of previously homogenized sample was weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube. Then, 10 mL of ethyl acetate and 50 mL of surrogate standard (triphenylphosphate) were added and the tube was shaken vigorously for 3 seconds. Subsequently, 1.5 g of NaCl and 8 g of MgSO₄ were added and the tube was shaken on an Agytax (Cirta Lab) for 15 min. The tube was then centrifuged (3500 rpm) for 5 min. Finally, the extract containing the equivalent of 1 g of sample per mL in 100% ethyl acetate was directly injected into the GC-TOF MS and GC-QQQ MS systems.

Accurate mass database building

The experimental conditions described above were applied to create an accurate mass database containing 110 GC amenable pesticides that are typically found in fruit and vegetables. As it is well known, when EI source is used, the molecular ion is not present or the intensity is very low in the majority of the cases. Therefore, it was necessary to conduct a detailed investigation of each mass spectrum to establish the molecular formula with its theoretical exact mass related to the exact mass observed experimentally. The selected ions for this study were those ones that produce relative abundances higher than 20% with respect to the base peak.

The created database includes two diagnostic ions for each pesticide, the molecular formula and exact molecular mass for each elucidated ion, and the retention time for each compound (see Table 1); Table 1 shows all the information collected for the 110 pesticides selected. For the development of the database, MS Interpreter was applied. MS Interpreter is a tool incorporated in the NIST MS Search 2.0 database, and it is combined with ChemDraw software. To facilitate the correct mass assignment of the ions, the "generate formula from spectrum peak" tool included in the Qualitative Mass Hunter software was used. The information containing retention time, molecular formula, exact mass and the name for every assigned ion was collected in an Excel file, which was converted into CSV format to be used as the library and linked to the instrument software to perform an automatic search of the pesticides present. This library, containing only 110 pesticides, can be easily enlarged following the procedure explained above for each additional compound.

Regarding the relative abundances of the selected ions, from all the ions present on the full scan spectrum of each pesticide, only those ions have been selected, which do not present variations of over 20% between the different concentration levels studied (10–100 mg kg⁻¹).

Results and discussion

Resolution power

Resolving power is one of the most critical parameters when working with "difficult" matrices in HRMS. It was observed that operating at a resolution power of 12 000 FWHM, the number of detected pesticides with a mass error lower than 5 ppm is higher than that obtained working at a resolution power of 7000 FWHM. The main advantage in accurate mass assignments is the ability of a mass spectrometer to resolve two peaks on the *m/z* scale, even when they are very close to each other. When peaks are not (fully) resolved (this happens when the resolution power is not enough to distinguish between two close masses), the resulting measured mass profile will be the sum of the two individual mass profiles and the top of the combined profile will lie somewhere between the exact masses of the two individual peaks. As a consequence, the mass assignment, which is based on a centroid algorithm of the detected profile, will result in an incorrect analyte mass. As sample complexity becomes greater (the number and intensity for matrix ions are higher than those

Table 1 Identification parameters contained in the "in house" data-base: name, retention time (R_t), exact neutral mass and molecular formula of each fragment

#	Compound	R _t (min)	Exact mass	Molecular formula
1	Ametryn	18.469	227.1205	C ₉ H ₁₇ N ₅ S
	Ametryn F1		212.0970	C ₈ H ₁₄ N ₅ S
2	Benalaxyl	26.003	148.1126	C ₁₀ H ₁₄ N
	Benalaxyl F1		176.1075	C ₁₁ H ₁₄ NO
3	Bifenthrin	28.334	181.1017	C ₁₄ H ₁₃
	Bifenthrin F1		166.0783	C ₁₃ H ₁₀
4	Bromopropylate	28.123	182.9446	C ₇ H ₄ BrO
	Bromopropylate F1		338.9020	C ₁₃ H ₉ Br ₂ O
5	Bromuconazole	27.921	172.9561	C ₇ H ₃ Cl ₂ O
	Bromuconazole F1		292.9136	C ₁₀ H ₈ BrCl ₂ O
6	Bupirimate	24.017	208.1450	C ₁₁ H ₁₈ N ₃ O
	Bupirimate F1		273.1021	C ₁₀ H ₁₇ N ₄ O ₃
7	Butralin	20.648	266.1141	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O
	Butralin F1		277.1426	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O
8	Cadusafos	14.085	158.9703	C ₂ H ₈ O ₂ PS ₂
	Cadusafos F1		213.0173	C ₆ H ₁₄ O ₂ PS
9	Chinomethionate	21.921	205.9972	C ₉ H ₈ N ₂ S ₂
	Chinomethionate F1		233.9922	C ₁₀ H ₆ N ₂ OS ₂
10	Chlorobenzilate	24.638	138.9951	C ₇ H ₄ ClO
	Chlorobenzilate F1		251.0030	C ₁₃ H ₉ OCl ₂
11	Chlorpropham	13.335	127.0189	C ₆ H ₆ ClN
	Chlorpropham F1		171.0087	C ₇ H ₆ NO ₂ Cl
12	Chlorpyrifos	19.999	196.9202	C ₅ H ₂ Cl ₃ NO
	Chlorpyrifos F1		257.8948	C ₅ H ₃ NO ₃ PSCl ₂
13	Chlorpyrifos methyl	18.117	285.9261	C ₇ H ₇ NO ₃ PSCl ₂
	Chlorpyrifos methyl F1		124.9826	C ₂ H ₆ O ₂ PS
14	Chlozolinate	21.418	258.9803	C ₁₀ H ₇ NO ₃ Cl ₂
	Chlozolinate F1		186.9592	C ₇ H ₃ Cl ₂ NO
15	DDE, p,p ⁰ -	23.420	246.0003	C ₁₄ H ₈ Cl ₂
	DDE, p,p ⁰ -F1		315.9380	C ₁₄ H ₈ Cl ₄
16	Diclorvos	6.163	109.0055	C ₂ H ₆ O ₃ P
	Diclorvos F1		184.9770	C ₄ H ₇ O ₄ PCl
17	Dicofol	26.670	138.9951	C ₇ H ₄ ClO
	Dicofol F1		110.9996	C ₆ H ₄ Cl
18	Endrin	24.170	260.8599	C ₇ H ₂ Cl ₅
	Endrin F1		242.9535	C ₁₁ H ₆ Cl ₃
19	Etoprophos	13.007	157.9625	C ₂ H ₇ O ₂ PS ₂
	Etoprophos F1		113.9363	H ₃ OPS ₂
20	Etrimphos	16.984	292.0647	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS
	Etrimphos F1		277.0412	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₄ PS
21	Fenitroton	19.187	260.0146	C ₉ H ₁₁ NO ₄ PS
	Fenitroton F1		277.0174	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS
22	Fluazifop-p-butyl	24.472	282.0742	C ₁₄ H ₁₁ F ₃ NO ₂
	Fluazifop-p-butyl F1		383.1344	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄
23	Fluopyram	21.640	173.0214	C ₈ H ₄ F ₃ O
	Fluopyram F1		223.0250	C ₈ H ₇ ClF ₃ N ₂
24	Flutolanil	23.150	173.0214	C ₈ H ₄ F ₃ O
	Flutolanil F1		145.0265	C ₇ H ₄ F ₃
25	Hexaconazole	23.020	213.9939	C ₈ H ₆ Cl ₂ N ₃
	Hexaconazole F1		256.0044	C ₁₀ H ₈ Cl ₂ N ₃ O
26	Metalaxyl	18.650	206.1181	C ₁₂ H ₁₆ NO ₂
	Metalaxyl F1		234.1130	C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O
27	Nuarimol	26.778	138.9951	C ₇ H ₄ ClO
	Nuarimol F1		235.0326	C ₁₃ H ₉ CIFO
28	Parathion	20.014	291.0330	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS
	Parathion F1		139.0269	C ₆ H ₅ NO ₃
29	Picolinafen	28.295	238.0480	C ₁₂ H ₇ F ₃ NO

Picolinafen F1	376.0835	$C_{19}H_{12}F_4N_2O_2$
30 Pirimicarb	17.387 166.0980	$C_8H_{12}N_3O$
Pirimicarb F1	238.1430	$C_{11}H_{18}N_4O_2$
31 Pirimiphos methyl	19.314 290.0728	$C_{10}H_{17}N_3O_3PS$

Table 1 (Contd.)

#	Compound	R _t (min)	Exact mass	Molecular formula
	Pirimiphos methyl F1		276.0572	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₃ PS
32	Profenophos	23.316	205.9134	C ₆ H ₄ BrClO
	Profenophos F1		336.9663	C ₁₁ H ₁₅ BrO ₃ PS
33	Prometryn	18.627	241.1361	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S
	Prometryn F1		226.1126	C ₉ H ₁₆ N ₅ S
34	Propazine	15.496	214.0859	C ₈ H ₁₃ ClN ₅
	Propazine F1		172.0390	C ₅ H ₇ ClN ₅
35	Prosulfocarb	18.791	128.1075	C ₇ H ₁₄ NO
	Prosulfocarb F1		251.1344	C ₁₄ H ₂₁ NOS
36	Prothiophos	23.204	112.9285	H ₂ OPS ₂
	Prothiophos F1		308.9940	C ₁₁ H ₁₅ ClO ₂ PS ₂
37	Pyriproxyfen	29.624	136.0762	C ₈ H ₁₀ NO
	Pyriproxyfen F1		226.0994	C ₁₅ H ₁₄ O ₂
38	Quinoxifen	26.062	272.0278	C ₁₅ H ₈ ClFNO
	Quinoxifen F1		306.9967	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO
39	Tebufenpyrad	28.644	171.0325	C ₇ H ₈ ClN ₂ O
	Tebufenpyrad F1		318.1373	C ₁₇ H ₂₁ ClN ₃ O
40	Tecnazene	12.430	200.8832	C ₅ HCl ₄
	Tecnazene F1		212.8832	C ₆ HCl ₄
41	Tetraconazole	20.372	336.0527	C ₁₃ H ₁₁ ClF ₄ N ₃ O
	Tetraconazole F1		170.9768	C ₈ H ₅ Cl ₂
42	Tetradifon	29.042	158.9671	C ₆ H ₄ ClOS
	Tetradifon F1		226.8892	C ₆ H ₂ Cl ₃ OS
43	Tolclofos methyl	18.281	264.9855	C ₉ H ₁₁ ClO ₃ PS
	Tolclofos methyl F1		249.9620	C ₈ H ₈ ClO ₃ PS
44	TPP	27.052	326.0708	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P
	TPP F1		215.0262	C ₁₂ H ₈ O ₂ P
45	Tri uralin	13.947	264.0272	C ₁₃ H ₅ F ₃ NO ₂
	Tri uralin F1		306.0702	C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₃ O ₄

for the analytes), the mass resolution can become a key parameter for the correct assignment of analyte masses.

Tomato, spring onion and orange matrix spiked with pesti-cides at different concentrations were analysed at resolutions of 7000 FWHM and 12 000 FWHM, and it was observed that the mass error was higher working at low resolution, especially at low concentration levels. Therefore, for the development of this work, it was decided to operate at a resolution power of 12 000 FWHM with the purpose of obtaining the best identi cation reliability at low concentration levels of pesticides.

Detection/identi cation study for target compounds

The capabilities of the developed method were tested in three different matrices: tomato, spring onion and orange at four concentration levels: 10, 20, 50 and 100 mg kg⁻¹. Spiked samples were processed with the Mass Hunter Software in which the created database was linked. The searching parameters set for detection were as follows: a retention time window of 0.2 min and a mass error tolerance of 5 ppm for the diagnostic ion (base peak of the mass spectrum). All the selected pesticides included in the database were detected in tomato at 10 mg kg⁻¹ concentration level. In the case of the spring onion matrix, all the pesticides were detected except chlorpropham; this pesticide was detected at 20 mg kg⁻¹. In the

pirimicarb; these pesticides were detected at 20 mg kg⁻¹.

The criteria applied for identification was based on the presence of the mass of the base peak and the second more abundant ion selected (respect to the base peak) and the correct retention time. The retention time window was set at 0.2 min and the mass tolerance was fixed at 5 ppm. Almost all the pesticides studied were identified at 10 mg kg⁻¹, except for fenitrothion in tomato matrix. In the case of spring onion matrix, 91.3% of the pesticides included in the database were identified; the exceptions were chlorpropham, utolanil, parathion and triphenylphosphate. In orange matrix, 86.9% of the compounds were identified, except bupirimate, butralin, utolanil, parathion, pirimicarb and prometryn. Different difficulties related with the capability of identification were observed when the processing method linked to the accurate mass database was applied. In some cases, the difficulties were due to shortcomings in the software, where some not automatically detected compounds could be manually detected. In Fig. 1, an example for prosulfocarb (128.1075 exact mass) in tomato matrix at 10 mg kg⁻¹ is presented. This compound was not automatically identified using the in-house database, but it was detected manually with a mass error lower than 5 ppm in all the matrices.

Mass accuracy study

The mass accuracy for each ion of the target pesticides was studied for all matrices assayed at 10, 20, 50 and 100 mg kg⁻¹, operating at 12 000 FWHM. Setting 5 ppm as the mass tolerance, at a 10 mg kg

concentration level, 100% of the pesticides were detected in the tomato matrix and 95.6% of the pesticides were detected in the spring onion and orange matrices. In addition, 97.8% of the compounds were identified in tomato, 91.3% in spring onion and 86.9% in orange. At low concentration levels (10 mg kg⁻¹), there were some cases in which this tolerance mass value (5 ppm) was not enough for a correct identification due to low sensitivity level observed for some compounds: benalaxyl and chlorobenzilate (in tomato), chlorobenzilate (in spring onion), and endrin and tolclofos methyl (in orange). However, it was observed that the mass accuracy for at least one ion was below 5 ppm in the range of 10–100 mg kg⁻¹ for all the matrices studied, although the mass accuracy was higher at low concentration levels. To develop this work, a mass tolerance of 5 ppm was selected with the purpose to satisfy the requirements for identification according to European Procedures,¹⁵ assuming the drawback to obtain the limits of identification higher than 10 mg kg⁻¹ for some compounds.

Higher values of mass tolerance result in a large number of false positives being detected and lower values can be the source of difficulties such as undetected compounds, preferably at low concentration levels. Retention times were lower than 0.2 min in all the cases studied.

Using the selected operational parameters, the database was employed as a library to evaluate the capability of detection/ identification depending on the mass accuracy and the time window tolerance selected.

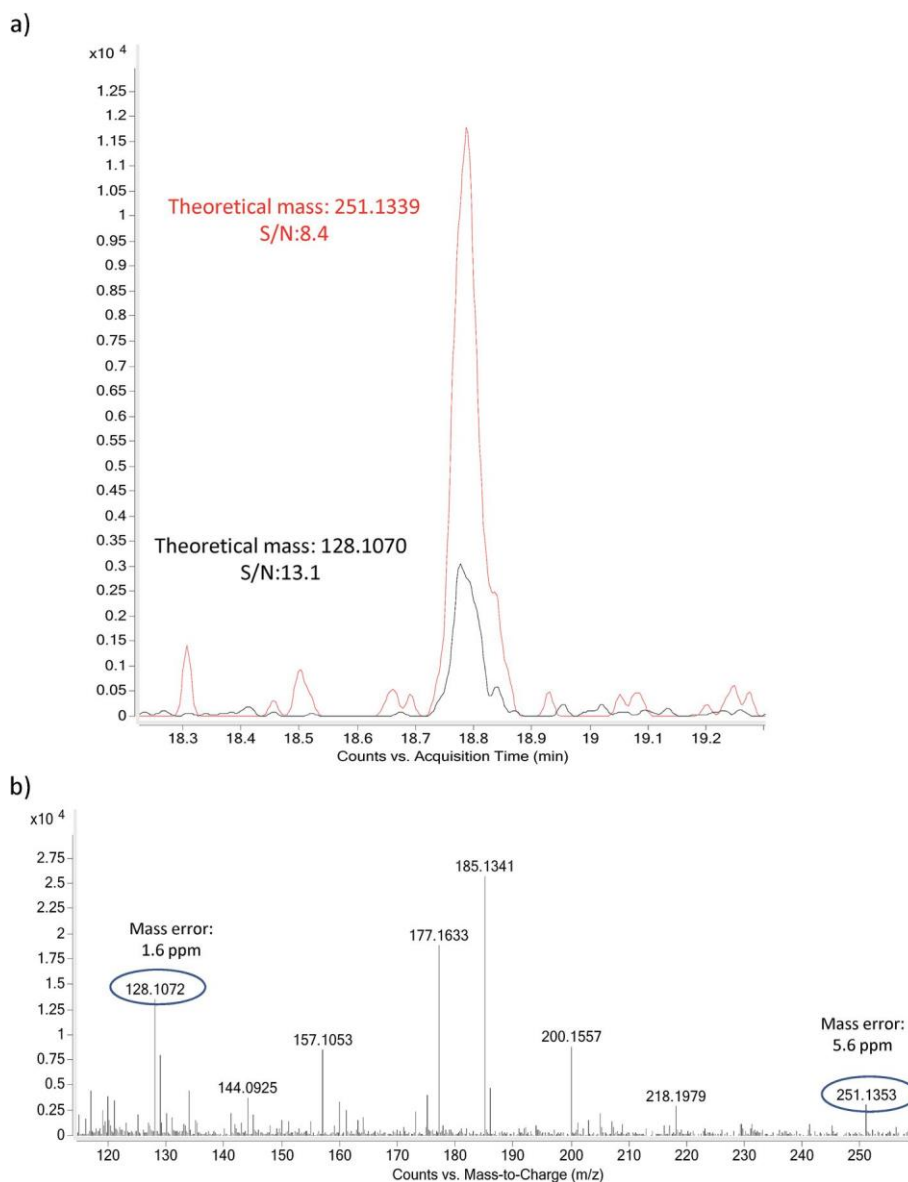


Fig. 1 (a) Overlapped extract ion chromatograms for prosulfocarb (m/z 128.1070 and 251.1339) at 10 mg kg^{-1} in a tomato matrix, with its signal-to-noise (S/N) ratio. (b) Mass accuracies for prosulfocarb ions in tomato at 10 mg kg^{-1} .

The mass error calculated depends on the area of the selected peak. In the most of the cases, the best option was to calculate the mass error at the apex of the peak, although this fact can be a problem in some cases. For example, Fig. 2 displays the characteristic fragment at m/z 136.0762 for pyriproxyfen at different concentration levels. At 100 mg kg^{-1} concentration, the shape of the peak was considerably different than at lower concentration levels. For this compound, a typical saturation effect was observed at high concentrations. When the mass error was calculated at the apex of the peak, the value obtained was higher (11.1 ppm), but this problem can be solved if the mass error was calculated on the average scan of 50% of the peak height (1.46 ppm).

In general, to minimize the mass error, it is preferable to calculate it in the 50% upper part of the peak. Fig. 3 shows the characteristic fragment at m/z 282.0742 (exact mass) for uazifop-p-butyl in the orange matrix at 50 mg kg^{-1} . The mass

error was calculated at ve different retention times and it was observed that in points 1 and 5, the mass error was higher than that found at points 2, 3 and 4. Thus, it was concluded that it was preferable to select the region between points 2 and 4 to calculate the mass error to obtain minimum mass error values.

Validation of the target method

The feasibility of the target method was evaluated in terms of linearity, reproducibility, repeatability and matrix effect.

Limits of detection and identification have been discussed above.

The recoveries of the selected compounds has been evaluated in a previous work;¹⁴ in all the cases the percentage of recovery was between 70% and 120%.

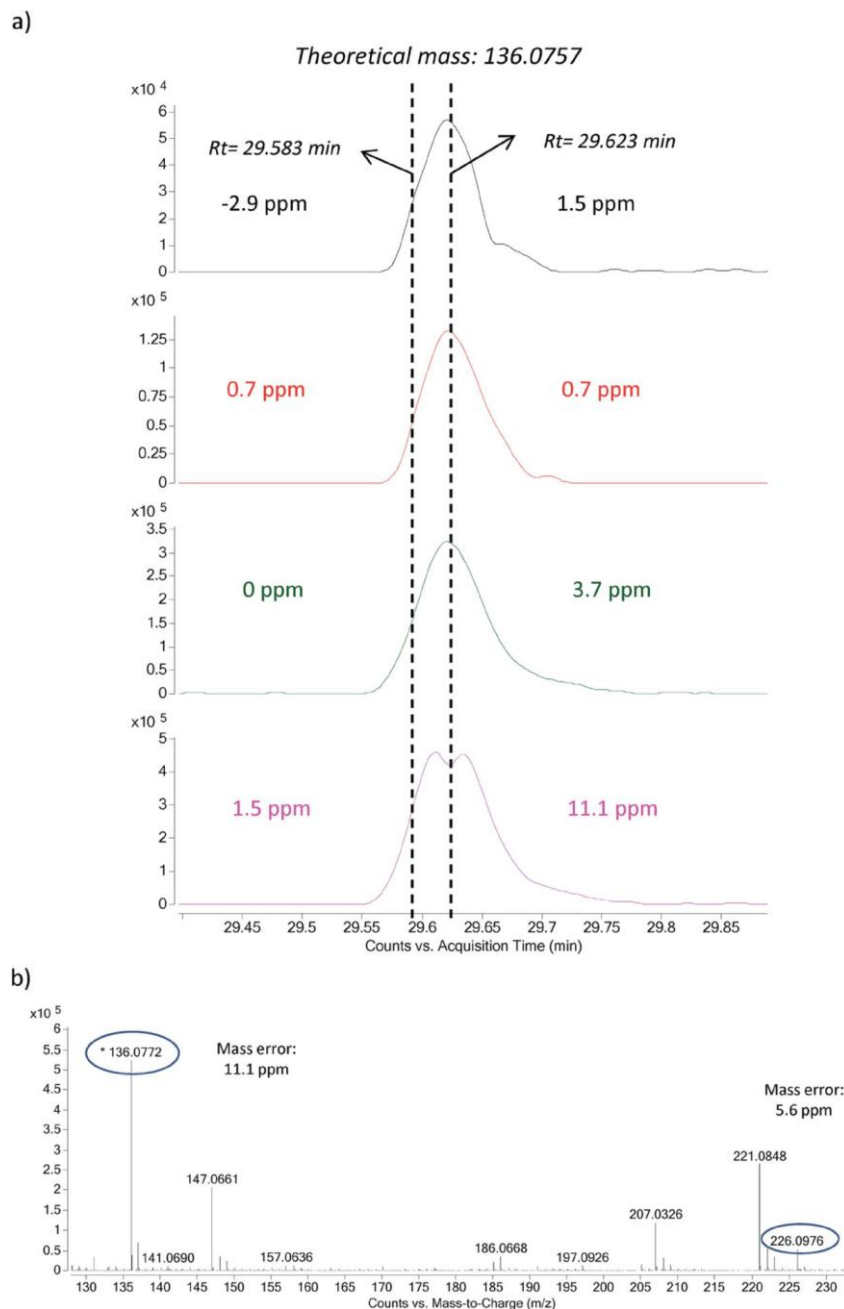


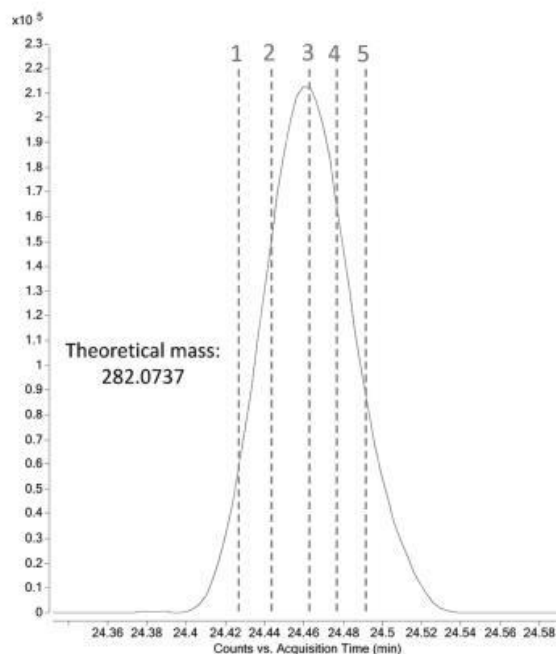
Fig. 2 (a) Extract ion chromatogram for pyriproxifen (m/z 136.0757) at different concentration levels in spring onion: black, red, green and pink (10, 20, 50 and 100 mg kg^{-1} , respectively). Mass errors have been calculated in two parts of the peak: in the apex and around 50% of the peak height. (b) Mass accuracies for pyriproxifen ions in spring onion at 100 mg kg^{-1} for a retention time of 29.623 min.

Linearity, repeatability and reproducibility. The linearity was studied working at a resolution of 12 000 FWHM and in the range between 10 and 100 mg kg^{-1} in all the matrices assayed. The detector response was considered linear if the coefficient of determination (R^2) was equal or higher than 0.99. Usually the detector response was linear across the entire range investigated, with very good linearity observed in this range, showing correlation coefficients according to the established criterion, except for bromconazole and butralin in tomato; bifenthrin, utolanil and pirimiphos methyl in spring onion and dicofol,

utolanil and tri uralin in orange (see Table 2). In the mentioned cases, good linearity was obtained only in a narrow linear range of 10–50 mg kg^{-1} because of the appearance of saturation effect at the concentration level of 100 mg kg^{-1} .

The high resolution operation mode was selected for this work instead of extended dynamic range mode. The selected operation mode has limitations in quantification at high concentration levels. The highest level of the studied range is a mg kg^{-1} considering two reasons: (i) the typical saturation effects at high concentration levels of this type of analyzer

a)



b)

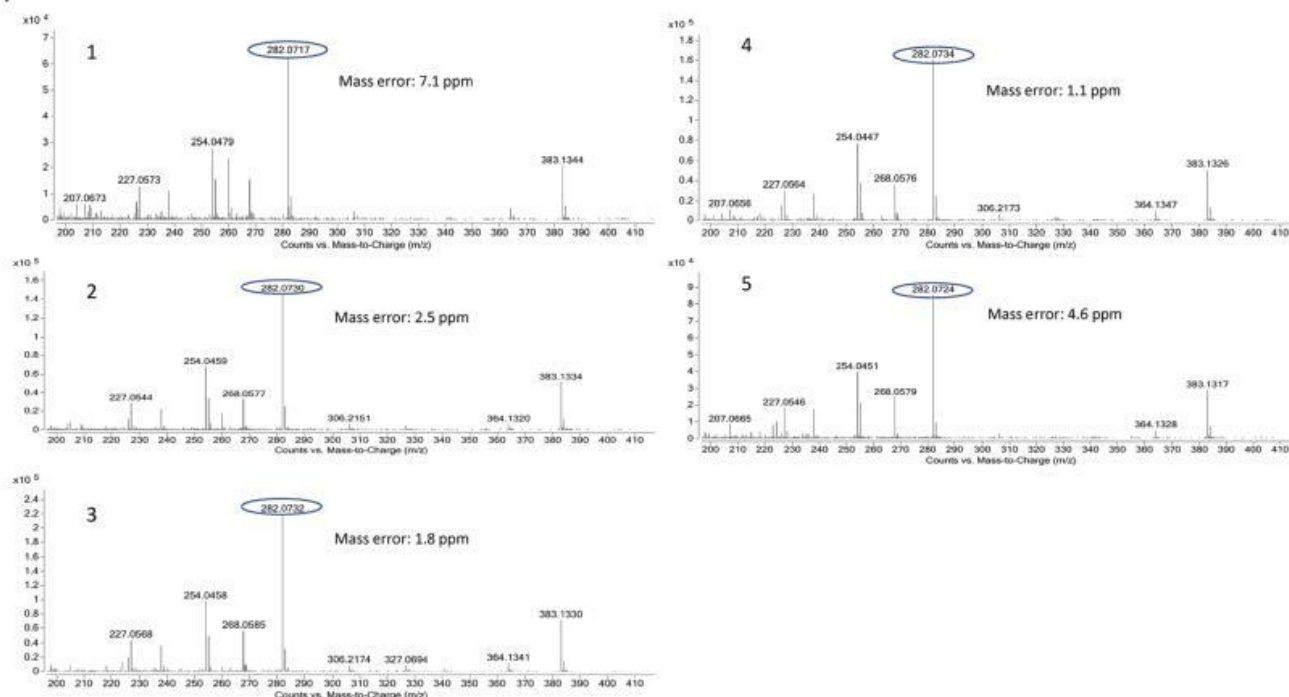


Fig. 3 (a) Extracted ion chromatogram for fluzafip p-butyl (m/z 282.0737) in orange at 50 mg kg^{-1} . (b) Full scan spectra obtained for each point decided in Fig. 3 (a) for fluzafip p-butyl in orange at 50 mg kg^{-1} with the mass accuracy for its m/z 282.0737 ion.

and (ii) the number MRLs present in the range of $10\text{--}100 \text{ mg kg}^{-1}$ are around 70% according to the EU regulations. In addition, the quantification of higher levels of concentration can be performed following different approaches such as selecting ion fragments with lower abundance or injecting fewer amounts (e.g. 1 mL).

The lowest level of the range (10 ppb) has been selected because it is the LMR default value (regulation (EC) no. 396/ 2005). Lower values could be included in the range for some compounds because the observed instrumental limit of identification is lower than 10 ppb in some cases. However, these lower levels have not been thoroughly studied; thus, no results have been presented in this paper.

Table 2 Linear range and identification limits (LOIs) for each pesticide in the three matrices evaluated. (n.i. ¼ not identified)

#	Compound	R _t (min)	LOI (mg Kg ⁻¹)			Linear range (mg Kg ⁻¹)		
			Tomato	Spring onion	Orange	Tomato	Spring onion	Orange
1	Ametryn	18.469	10	10	10	10–100	10–100	20–100
2	Benalaxyl	26.003	10	10	10	10–100	10–100	10–100
3	Bifenthrin	28.334	10	10	10	10–100	10–50	10–100
4	Bromopropylate	28.123	10	10	10	10–100	10–100	10–100
5	Bromuconazole	27.921	10	10	10	10–50	10–100	10–100
6	Bupirimate	24.017	10	10	20	10–100	10–100	20–100
7	Butralin	20.648	10	10	20	10–50	10–100	20–100
8	Cadusafos	14.085	10	10	10	10–100	10–100	10–100
9	Chinomethionate	21.921	10	10	10	10–100	10–100	10–100
10	Chlorobenzilate	24.638	10	10	10	10–100	10–100	10–100
11	Chlorpropham	13.335	10	n.i.	10	10–100	n.i.	10–100
12	Chlorpyrifos	19.999	10	10	10	10–100	10–100	10–100
13	Chlorpyrifos methyl	18.117	10	10	10	10–100	10–100	10–100
14	Chlozolinate	21.418	10	10	10	10–100	10–100	10–100
15	DDE, p,p ⁰ -	23.420	10	10	10	10–100	10–100	10–100
16	Diclorvos	6.163	10	10	10	10–100	10–100	10–100
17	Dicofol	26.670	10	10	10	10–100	10–100	10–50
18	Endrin	24.170	10	10	10	10–100	10–100	10–100
19	Etoprophos	13.007	10	10	10	10–100	10–100	10–100
20	Etrimphos	16.984	10	10	10	10–100	10–100	10–100
21	Fenitroton	19.187	20	10	10	20–100	10–100	10–100
22	Fluazifop-p-butyl	24.472	10	10	10	10–100	10–100	10–100
23	Fluopyram	21.640	10	10	10	10–100	10–100	10–100
24	Flutolanil	23.150	10	20	20	10–100	20–50	20–50
25	Hexaconazole	23.020	10	10	10	10–100	10–100	10–100
26	Metalaxyl	18.650	10	10	10	10–100	10–100	10–100
27	Nuarimol	26.778	10	10	10	10–100	10–100	10–100
28	Parathion	20.014	10	20	50	10–100	20–100	50–100
29	Picolinafen	28.295	10	10	10	10–100	10–100	10–100
30	Pirimicarb	17.387	10	10	20	10–100	10–100	20–100
31	Pirimiphos methyl	19.314	10	10	10	10–100	10–50	10–100
32	Profenophos	23.316	10	10	10	10–100	10–100	10–100
33	Prometryn	18.627	10	10	20	10–100	10–100	20–100
34	Propazine	15.496	10	10	10	10–100	10–100	10–100
35	Prosulfocarb	18.791	10	10	10	10–100	10–100	10–100
36	Prothiophos	23.204	10	10	10	10–100	10–100	10–100
37	Pyriproxyfen	29.624	10	10	10	10–100	10–100	10–100
38	Quinoxifen	26.062	10	10	10	10–100	10–100	10–100
39	Tebufenpyrad	28.644	10	10	10	10–100	10–100	10–100
40	Tecnazene	12.430	10	10	10	10–100	10–100	10–100
41	Tetraconazole	20.372	10	10	10	10–100	10–50	10–100
42	Tetradifon	29.042	10	10	10	10–100	10–50	10–100
43	Tolclofos methyl	18.281	10	10	10	10–100	10–100	10–100
44	TPP	27.052	10	n.i.	10	10–100	n.i.	10–100
45	Tri uralin	13.947	10	10	10	10–100	10–100	10–50

For the base peak, the repeatability (inter-day) and reproducibility (inter-day) were evaluated; good results were obtained with RSDs of <20% for 100% of the compounds studied in all the matrices assayed. For this study, two spiked levels at 10–50 mg kg⁻¹ were injected ve times (repeatability) and over ve consecutive days (reproducibility).

Matrix effect. For the study of the matrix effect, the slope of all the matrices obtained from the linear curve in the range between 10 and 100 mg kg⁻¹ were compared with the slope obtained in solvent.

All the matrices showed a marked signal enhancement effect when compared with solvent. Matrix enhancement effects are

frequently observed in GC/MS; however, the differences in the slopes between the matrices were very small. Therefore, in this work, we consider the tomato matrix as a good reference of low matrix effects. A positive value means higher sensitivity in the investigated matrix than in tomato, while a negative value was

equivalent to a lower sensitivity. Comparing the ME (%) between tomato and spring onion, the general tendency was not

(D) significant matrix effect. Only four compounds showed an enhancement: bromuconazole (51.4%), butralin (169.2%), fenitrothion (117.1%) and tri uralin (96.85%). For orange matrix, which is a more “complex” matrix than tomato, only 3 compounds presented an enhancement: butralin (72.5%),

fenitrothion (102.5%) and parathion (61.8%). Bupirimate (61.8%), utolanil (52.6%) and triuralin (54.0%) pre-sented suppression of the signal; for the rest of the compounds studied as well as the other matrices investigated, the differences between the slope of the matrix studied with respect to the slope of the tomato matrix was in the range of 20%; thus, it was concluded that the matrix effect was not significant.

Analysis of real samples

The developed method was employed in the analysis of real samples collected from a local market in Almeria (Spain). In the quantification method, the base peak, the second more intensive ion with respect to the base peak and the retention time were selected as the criteria of quantification per each compound. The base peak was used as the quantifier ion and the second more intensive ion was used as the qualifier ion. The relative abundance between both ions was observed to be constant at different concentration levels for the standards and did not differ more than 30% for the real samples.

Target compounds. The tomato matrix was selected as the quantification matrix because all the matrices analysed belonged to the high water content group within the classification for commodity groups in Annex A of the European Procedure. Moreover, the differences observed in the slopes between the matrices were very small as previously discussed in the matrix effect study. The quantification was performed in the tomato-matched calibration in the range of 10–100 mg kg⁻¹. The obtained results showed that all the samples analysed were positives with different residues of pesticides. The range of concentration detected was between 0.01 and 0.32 mg kg⁻¹. The pesticides found were as follows: bifenthrin, bupirimate, metalaxyl pirimicarb, pyriproxyfen and p,p⁰-DDE. Bupirimate, bifenthrin and pyriproxyfen were present in two different samples. The rest of the target positives were found only once. All the pesticides detected exceeded the maximum limits of residues permitted by the European Union Legislation. The results obtained were compared with those obtained using a GC-QqQ-MS system. The quantification differences with both systems are mostly within 50%.

Fig. 4 shows a positive result for bifenthrin in a tomato sample. The quantifier ion was at m/z 181.1012 and the qualifier ion was at m/z 166.0788. The mass spectrum of the tomato sample was compared with the mass spectrum for the bifenthrin standard. The relative abundance in the tomato sample was 63.6%, whereas the amount of bifenthrin standard in a tomato matrix was 57.4%; thus, the difference between both was below 30%. The concentration found in the tomato sample was 0.12 mg kg⁻¹.

The number and distribution of interfering matrix components varies greatly depending on the particular vegetable matrix, even among those included within the same commodity category according to EU procedures. The components present in the matrix often have similar masses as the target compounds; thus, if co-elution occurs, this fact can lead to a false positive or false detection. False positives depend heavily on the matrix; the higher the complexity of the sample, the more false detections will appear. When the so were reported

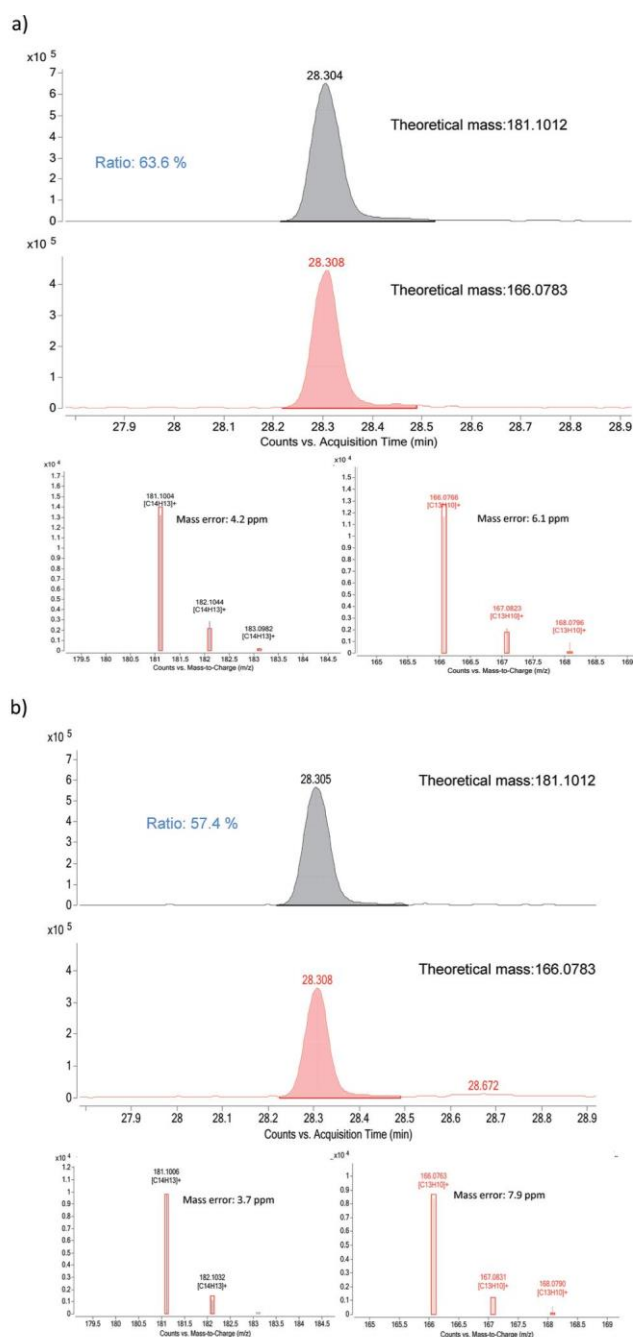


Fig. 4 (a) Automatic identification of bifenthrin at 0.12 mg kg⁻¹ in a tomato sample. (b) Automatic identification of bifenthrin standard in the matrix matched in tomato at 0.10 mg kg⁻¹.

the quantifier and qualifier ion with a relative abundance below 30% with respect to the standard, it was considered as a false positive in a real sample. The false positive could be discarded after confirmation analysis by GC-MS/MS; thus, it was not a problem; however, this introduces an additional time-consuming task, and therefore it is an important handicap to efficient laboratory work. The real samples analysed in this work and seven blanks of different samples were used to obtain the previous study on false positives and negatives reported by the automatic database.

Non-target compounds. Non-target compounds are those, which have not been validated and only have the presence of one diagnostic ion (base peak, allowing a mass error lower than 5 ppm) with the correct retention time of (0.2 min) as the necessary detection criteria. In all the real samples evaluated, the obtained results showed the detection of non-target pesti-cide residues. The pesticides found were azoxystrobin, boscalid, iprodione, lambda-cyhalothrin, myclobutanil, penconazole and tri oxystrobin. Iprodione was detected in eight different samples (tomatoes, green beans and grapes); azoxystrobin was detected in four samples (green beans, melon and tomato); lambda-cyhalothrin and myclobutanil were detected in two samples (green beans). The rest of the non-target positives were only found once (green bean, zucchini, andcabbage).

Conclusions

The database created with 110 pesticides, which included the retention time and two ions per compound, was applied to automatic pesticide identi cation in tomato, spring onion and orange. This “in-house” database is an excellent tool consid-ering that commercial exact mass libraries are not available.

The presented work allows the possibility to separate target and non-target compounds; the full scan method has been validated for 45 target pesticides. For the detection or identi - cation of non-target methods, the created library containing 110 pesticides can be used; this database can be easily enlarged.

The automatic identi cation was made and compared at two resolution powers, showing better results at the high-resolution mode. A rapid and automatic full scan method has been developed and a reliability of identi cation between 87% and 100% at 10 mg kg⁻¹ concentration level was demonstrated in all the matrices assayed.

In addition, a quanti cation method was developed selecting two ions per compound, the retention time and a relative abundance #30% between real samples and the standard, as criteria for identi cation. The base peak of the mass spectrum was used as the quanti er ion and the more intensity with respect to the base peak as quali er ion. The method was applied for the analysis of real samples and the results obtained were compared with those using GC-QqQ-MS, showing differences in the quanti cation results of less than 50%, which is the accepted value of uncertainty. Finally, it is important to note that by working in full scan acquisition mode, a retrospective analysis is possible, which allows to search the compounds that are initially not included in the database.

References

- 1 Y. J. Lian, G. F. Pang, H. R. Shu, C. L. Fan, Y. M. Liu, J. Feng, Y. P. Wu and Q. Y. Chang, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 9428–9453.
- 2 R. Huskova, E. Matisova, S. Hrouzkova and L. Svorc, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 6326–6334.
- 3 J. J. Ramos, M. J. Gonz'alez and L. Ramos, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 7307–7313.
- 4 H. Guan, W. E. Brewer, S. T. Garris, C. Cra and S. L. Morgan, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 5973–5981.
- 5 M. L. G. de Oliveira, F. D. Madureira, F. Aur'elio, A. P. Pontelo, G. Silva, R. Oliveira and C. Paes, *Food Addit. Contam., Part A*, 2012, **29**, 657–664.
- 6 M. Mezcuca, M. A. Mart'inez-Uroz, P. L. Wylie and A. R. Fern'andez-Alba, *J. AOAC Int.*, 2009, **92**, 1790–1806.
- 7 M. Nakamura, S. Noda, M. Kosugi, N. Ishiduka, K. Mizukoshi, M. Taniguchi and S. Nemoto, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 2010, **51**, 213–219.
- 8 Regulation (EC) no. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC (2005).
- 9 Commission Regulation (EU) no. 212/2013 of 11 March 2013 replacing Annex I to Regulation (EC) no. 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards additions and modifications with respect to the products covered by that Annex. (2013).
- 10 F. Zhang, C. Yu, W. Wang, R. Fan, Z. Zhang and Y. Guo, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **757**, 39–47.
- 11 M. I. Cervera, T. Portol'es, E. Pitarch, J. Beltr'an and F. Hern'andez, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1244**, 168–177.
- 12 S. J. Lehotay, U. Koesukwiwat, H. Van Der Kamp, H. G. J. Mol and N. Leepipatpiboon, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 7544–7556.
- 13 T. Portol'es, J. G. J. Mol, J. V. Sancho, F. J. L'opez and F. Hern'andez, *Anal. Chim. Acta*, 2014, **838**, 76–85.
- 14 S. Ucl'es, N. Belmonte, M. Mezcuca, A. B. Mart'inez, M. J. Martinez-Bueno, M. Gam'on and A. R. Fern'andez-Alba, *J. Environ. Sci. Health, Part B*, 2014, **49**, 557–568.
- 15 Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document SANCO/12571/2013.

**ANEXO II: Matrix effects and interferences
of different citrus fruits coextractives in
pesticide residue analysis using ultra
highperformance liquid chromatography–
high resolution mass spectrometry**

Matrix Effects and Interferences of Different Citrus Fruit Coextractives in Pesticide Residue Analysis Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry

Natalia Besil,^{†,§,⊗} Verónica Cesio,^{§,⊗} Horacio Heinzen,^{§,⊗} and Amadeo R. Fernandez-Alba^{*,†}

[†] Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues in Fruit and Vegetables, Pesticide Residue Research Group, Department of Chemistry and Physics, University of Almeria, La Cañada de San Urbano, 04120 Almeria, Spain

[§] Grupo de Análisis de Compuestos Traza, Departamento de Química del Litoral, Facultad de Química, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República (UdelaR), 11800 Montevideo, Uruguay

[⊗] Grupo de Análisis de Compuestos Traza, Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

* Supporting Information

ABSTRACT: The matrix effects of ethyl acetate extracts from seven different citrus fruits on the determination of 80 pesticide residues using liquid chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-(ESI)-HR-TOF) at 4 GHz resolution mode were studied. Only 20% of the evaluated pesticides showed noticeable matrix effects (ME) due to coelution with natural products between $t_R = 3$ and 11 min. Principal component analysis (PCA) of the detected coextractives grouped the mandarins and the orange varieties, but separated lemon, oranges, and mandarins from each other. Matrix effects were different among species but similar between varieties, forcing the determination of pesticide residues through matrix- matched calibration curves with the same fruit. Twenty-three natural products (synephrine, naringin, poncirin, glycosides of hesperitin, limonin, nomilin, and a few fatty acids, among others) were identified in the analyzed extracts. Twelve of the identified compounds coeluted with 28 of the pesticides under study, causing different matrix effects.

KEYWORDS: *Citrus sp.*, pesticide residues, matrix effects, natural products, high-resolution time-of-flight mass spectrometry

INTRODUCTION

Several approaches to determine pesticide residues in citrus fruit^{1–5} and processed citrus products, such as fruit soft drinks,^{6,7} juices,^{8,9} and essential oils,^{10,11} have been developed. The most notable is the QuEChERS method and its different versions,^{13,14} as well as the ethyl acetate method.⁵ After chromatographic separation, the extraction methods are usually coupled to sophisticated and powerful mass spectrometry platforms. Despite the available analytical tools, the correct quantification of analytes during monitoring programs and routine analysis is affected by matrix effects (MEs). MEs are the resultant of the presence of interfering matrix components at the time of measurement. The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)¹⁵ defined it precisely, as well as the SANTE guidelines, which also explicitly added that “...The response of some determination systems (e.g. GC-MS, LC-MS/MS) to certain analytes may be affected by the presence of co-extractives from the sample (matrix)...”.¹⁶ It is therefore clear that the commodity, the sample treatment procedure, and other aspects such as the type of mass spectrometer or the acquisition mode have a direct influence on matrix effects.¹⁷ During the quantification step the ME can play an important role, such as diminishing or enhancing the signal for the analyte.¹⁸ To compensate for it, matrix-matched calibration curves are

commonly used and recommended in the DG-SANTE guidelines.¹⁶

Since 1992, the occurrence of MEs in pesticide residue analysis using either conventional or mass spectrometer detectors was investigated by many researchers,^{19–26} as well

as the influence of the cleanup step.^{27–29}

Actually, accurate high-resolution mass spectrometry (HR-MS) coupled to chromatographic separation systems are being increasingly incorporated in the routine work of pesticide residue monitoring laboratories. Nevertheless, few studies have shown the performance of the different analytical methods using HR-MS for the determination of pesticides in citrus matrices where the ME was briefly discussed.^{25,30} Recently, Gomez-Ramos et al.³¹ studied the ME caused by three different dispersive sample preparation methods in one orange variety among a wide variety of other fruits and vegetables. Although the phytochemical composition of citrus fruits has been largely described, the role of specific coextractives on the ME in trace contaminant analysis has been only scarcely studied. Previous studies of ME in orange extracts using GC-MS reported by

Received: January 17, 2017

Revised: May 8, 2017

Accepted: May 25, 2017

Published: May 25, 2017

Table 1. Pesticide Name, Quantifier Ion, Retention Time (t_R), and Percentage of Matrix Effect (% ME) in Each Citrus Variety^a

pesticide	t_R (min)	quantifier (m/z)	% ME						
			orange I	orange II	orange III	orange IV	mandarin I	mandarin II	lemon
cyromazine	0.88	167.1040	11.9	-7.2	-16	-17.3	-26	-77.2	-34.9
carbendazim	1.23	192.0768	-20.5	8.5	-25.2	2.8	-2.7	-30.1	6
thiabendazole	1.3	202.0433	71.1	-24.3	-30.8	-27	-34.5	-46.3	-21.6
pirimicarb, desmethyl-	1.41	225.1346	8	-5.9	-15.8	-16.4	-18.3	-13.1	-2.9
nitenpyram	1.67	271.0956	-4.9	-14.3	-6.3	-10.4	-9.1	-16.6	-5.5
dicrotophos	2.03	238.0839	29.5	28.8	32.4	50.1	16.3	3.2	-6.2
pirimicarb	2.3	239.1503	24.3	-3.8	-12	-9.4	-13.6	-10	-6.9
ethirimol	2.48	210.1601	-2.5	-17.9	-24.3	-20.9	-25.8	-24.2	-18
thiamethoxam	2.58	292.0266	171.1	143	151.1	119.7	111.9	93.7	124.1
trichlorfon	3.03	256.9299	57.1	42.4	48	41.6	43.3	28.8	68.9
clothianidin	3.53	250.0160	2.5	-5.8	-6.7	-10.2	-26.3	-27.9	23.3
imidacloprid	3.96	256.0596	81.5	81.2	84.9	55.9	60.8	34.5	84.5
dimethoate	4.43	230.0069	44	35.9	38.4	29.6	-6.1	-18.4	37.5
acetamiprid	4.58	223.0745	68.7	63.8	58.7	45.5	23.8	6.8	57.4
thiacloprid	5.64	253.0309	24	4.7	15.1	13.6	-27.8	-45.6	39.7
fenamiphos sulfoxide	5.8	320.1080	38.1	34.9	39.3	28.5	9.9	3.4	26.6
pyriproxyfen	6.16	322.1438	-0.5	-6.7	-1.6	-4.8	-17.2	-9.5	-0.4
thiodicarb	6.93	355.0563	61.7	39.6	51.3	37.1	40.5	17.5	80.8
fenamiphos sulfone	7.01	336.1029	29.5	19	26.6	12.7	12.2	2.6	35.2
carbofuran	7.21	222.1125	10.8	-0.7	2.8	1.9	-11.3	-19	11.1
flutriafol	7.65	302.1099	-17.8	-30	-17.8	-27.3	-31.7	-27.1	2.8
spiroxamine	7.76	298.2741	-11	-31.1	-29.5	-30.4	-42.8	-37.7	5.3
fenoxycarb	7.83	302.1387	29.5	-4.2	-8	-6.3	-23.2	-16	-4
cyprodinil	7.84	226.1339	8.4	-16.2	-14.5	-15.2	-45.7	-42.5	-5.3
metalaxyl	7.85	280.1543	25.8	25.2	25	11.3	10.2	-3.8	32.8
bupirimate	8.42	317.1642	-55.8	-60.3	-54.7	-58.5	-75.7	-72.1	-1.3
chlorantraniliprole	8.67	483.9758	14.2	-1.5	10.2	0	-6	-21	21.3
dimethomorph (E)	8.67	388.1310	16.1	2.4	9.7	0.4	-0.7	-8.5	22.4
spinosyn A	8.78	732.4681	-48.9	-64.3	-52	-63.8	-47.1	-46.9	7.4
dimethomorph (Z)	8.86	388.1310	38.4	7.2	51.1	-4.4	-23.3	-21.4	58.5
paclobutrazol	8.92	294.1368	-2.4	-8.6	0.2	-7.1	-17.4	-9.3	3
terbutylazine	9.06	230.1167	-19.8	-26	-15	-21.8	-65.2	-56.8	21.4
triticonazole	9.07	318.1368	-3.4	-9.9	-1.2	-9.7	-42.7	-34.2	8.6
isocarbofos	9.16	312.0430	-7	-13	-3.2	6.5	-45.2	-35	-3
cyproconazole	9.19	292.1211	18.5	15.6	18.9	14.7	-6.8	-8.3	30.3
spinosyn D	9.19	746.4838	3.1	-4.1	1.5	-4.7	-10.3	-2.3	6.1
linuron	9.28	249.0192	11.1	1.2	6.6	2.4	-7.8	-7.4	11.7
fluazifop	9.35	328.0791	3	-5.6	2.3	-4.9	-9.2	-3.5	2.2
bromuconazole (I)	9.36	377.9590	-0.8	-8.2	2.2	-4.8	-12.7	-6.9	-1.1
fenarimol	9.38	331.0399	2.7	-5.9	2.8	-5.6	-9.2	-2.5	3.3
iprovalicarb	9.57	321.2173	7.9	1.6	11.4	0.6	-23.1	-23.7	15.9
fenamiphos	9.58	304.1131	12.5	5.7	12.8	4.1	-15.1	-15.5	24.5
azoxystrobin	9.71	404.1241	20.2	13	16.2	7.9	-6.5	-13.3	20.3
myclobutanil	9.73	289.1215	3.8	-4.2	3.9	-3.8	-8.1	-1.3	6.9
fenamidone	9.78	312.1165	2.3	-3	2.5	-4.6	-8.8	-1.9	-6.8
boscalid	9.8	343.0399	7.8	1.3	5.2	-3.4	-4.5	-9	23.2
fenhexamid	9.8	302.0709	10.6	1.9	10	1.1	0.5	-4.6	21.4
bromuconazole (II)	9.86	377.9590	-0.1	-4.7	2.9	-7.1	-12.4	-4.7	3
ethoprophos	9.86	243.0637	12.2	4.7	12.3	3.4	-5.3	-11.2	13.1
fluquinconazole (I)	9.86	376.0163	6.1	-2.4	7	0.1	-9.8	-5.8	8.6
propyzamide	9.89	256.0290	7	1	8.7	-1.8	-9.2	-7.6	4.6
mandipropamid	9.91	412.1310	18.6	8.5	15.4	7.4	9.4	-6.2	17.4
tebuconazole (I)	9.94	308.1524	0.6	-6	3.1	-8.3	-13.6	-1.6	0.1
buprofezin	9.99	306.1635	27.2	1.9	-8.3	-4.4	-84.9	-0.4	3.4
tetraconazole	10.06	372.0288	4.5	-2.4	6.1	-4.6	-8.1	0.5	2.1
flusilazol	10.14	316.1076	1.4	-5.3	-0.1	-5.9	-9.5	-3.1	-0.5
diflubenzuron	10.2	311.0393	9.1	-0.1	3.3	-6.4	-8.2	-15.9	-1
fenbuconazole (I)	10.22	337.1215	4.7	-2	4.9	-4.8	-8.5	-2.9	3.9
bitertanol	10.23	338.1863	3.6	-3.6	4.4	-5.2	-13.1	-2.4	3.3

Table 1. continued

pesticide	<i>t_R</i> (min)	quantifier (<i>m/z</i>)	% ME						
			orange I	orange II	orange III	orange IV	mandarin I	mandarin II	lemon
hexaconazole (I)	10.23	314.0821	-0.8	-5.5	1.3	-6.8	-10.8	-2.3	-1.1
penconazole (I)	10.24	284.0716	1.3	-4.1	3.3	-5.6	-11.5	-4.2	2.6
metconazole (I)	10.32	320.1524	1.8	-3.8	3.3	-4.4	-10.5	-0.9	-0.1
haloxyfop	10.4	362.0401	2.8	-6.9	2.3	-7.2	-7.3	-2.9	2.9
rotenone	10.46	395.1489	16.3	3.9	11.3	5.5	6.8	5.6	35.4
triazophos	10.49	314.0723	6	-1	5.4	-2.9	-9.3	-10	6.1
malathion	10.52	331.0433	13.8	9.5	14.6	7.4	-1.2	-6.4	12.9
diniconazole (I)	10.56	326.0821	0.6	-5.4	1.9	-6.9	-11.3	-2.1	-1.9
chlorfenvinphos (I)	10.93	358.9768	9.7	16.1	13	4.1	-1.6	-8.6	9.7
difencozazole	10.94	406.0720	-0.7	-5.9	3.5	-7.5	-14.3	-4.9	-7.3
pirimiphos-methyl	11.07	306.1036	33.9	-4.8	-8.1	-6.3	-13	-7	-2.1
triflumuron	11.18	359.0405	17.9	8.2	23.6	10.8	-1.5	-1.1	9.6
pyraclostrobin	11.49	388.1059	17.9	20.5	17.3	6.1	1.6	31.7	12.1
zoxamide	11.49	336.0319	15.1	11.8	16.1	3.8	-2.4	4.8	8.9
quinoxifen	11.67	308.0040	-4.8	-12.2	-2.4	-9.6	-18.9	-7.4	-15.8
pencycuron	11.79	329.1415	7	2.4	6.3	0.1	-11.1	-13.4	1.4
profenofos	12.08	374.9402	6.8	-0.9	6	-0.7	-6.1	-6.1	1.6
tebufenpyrad	12.17	334.1681	7.1	-1.6	5	-0.1	-11	-7.6	-5.4
indoxacarb	12.27	528.0780	22.9	11.3	24.5	8.3	0.1	-2.5	9.5
trifloxystrobin	12.34	409.1370	12.2	3.4	11.4	2.3	-7.3	-13.2	-2.8
fenazaquin	12.61	307.1805	-34.2	-36.5	-35.7	-20	-41.3	-39	-27.4
hexythiazox	13.18	353.1085	10.3	-0.9	3.8	3.5	-10.3	-0.8	0.6
fenpyroximate	13.2	422.2074	8.4	-0.2	6.7	1.7	-9.8	4.6	-3.3
ethion	13.4	384.9949	36	25.8	35.7	26.4	15.6	7.9	-15.8
pyridaben	13.91	365.1449	44.7	20	39.2	28.8	20.4	29.3	13.4

^aPercentage of matrix effect was determined as [(slope (matrix-matched calibration)/slope (reference curve) - 1) × 100].

ionization mass spectrometry (EI-MS).

Sugitate et al.³⁴ allowed the identification of 1-monopalmitin, 1-monolinolein, squalene, α -tocopherol, and β -sitosterol. Flavonoids, coumarins, and permethoxylated flavones among other polyphenols as well as terpenoids were determined using liquid chromatography (HPLC) coupled to different detectors,^{32,33} but the simultaneous identification and influence of specific coextractives on MEs during citrus pesticide residue analysis using UHPLC-HR-MS-TOF has not been judiciously studied yet.

Aiming to contribute to the understanding of the overall ME in the pesticide residue analysis in citrus fruits, four orange, two mandarin, and one lemon variety were studied using an ethyl acetate extraction method³⁵ followed by UHPLC-HR-MS. The behaviors of different citrus species and varieties were compared. Furthermore, the influence of specific coextracted matrix components was evaluated, taking into account the chemical diversity of the material under study.

MATERIALS AND METHODS

Standards and Reagents. High-purity pesticide standards (Table 1) purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and Riedel-de Haën (Seelze, Germany) were stored at -30 °C. Individual pesticide stock solutions (1000–2000 μ g/mL) were prepared by dissolving reference standards in the appropriate solvent. Each solution was stored in amber screw-capped glass vials in the dark at -20 °C. The working standard mix solution for spiking purposes was prepared at 10 μ g/mL concentration in acetonitrile (MeCN).

Flavonoid standards were from Fluka AG and the other natural product reference standards were isolated in Pharmacognosy and Natural Product at the Faculty of Chemistry, UdelaR, and characterized using nuclear magnetic resonance (NMR) and electronic

HPLC grade MeCN was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and analytical grade ethyl acetate (EtOAc) from Pharmco Products Inc. (Brookfield, CT, USA). Formic acid (98% purity for mass spectrometry) was from MACRON Chemicals (The Netherlands). Sodium chloride from J. T. Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA) and magnesium sulfate anhydrous from Scharlau (Spain) were employed throughout the whole study.

Instrumentation. Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry was used to separate and identify pesticides and natural product compounds. The UHPLC analysis was performed with an Agilent 1290 Infinity, equipped with a C8 Zorbax Eclipse Plus column (100 × 2.1 mm, 1.8 μm) from Agilent Technologies. A gradient program at 30 °C, using two solvents, A (0.1% of HCOOH in ultrapure water) and B (0.1% of HCOOH and 5% of water in acetonitrile), was developed for the chromatographic separations. It started at 80:20 A/B for the first 2 min. Then, B was linearly increased to 100% from 2 to 15 min. Solvent B was maintained at 100% for 2 min, decreased to 20%, and kept from 17 to 19 min to re-equilibrate the column. The total run time was 19 min per sample. The flow rate was 0.3 mL/min with an injection volume of 4 μL.

The liquid chromatograph was connected to an Agilent 6550 iFunnel QTOF-MS (Palo Alto, Agilent Technologies). The acceptable mass accuracy (within ±2 ppm) of the QTOF-MS (used as TOF only) was calibrated before each analysis with a reference solution of HP-0921 (commercially available from Agilent) for scanning up to mass-to-charge ratio (m/z) 1700 and operated at 4 GHz (12000–16000 fwhm). The ionization mode was positive electrospray (+ESI), with the fragmentation voltage at 360 V. The nebulizer and drying gas was nitrogen at 350 °C. In each analysis, the reference mass standard solution was constantly infused into the QTOF-MS for the monitoring and measurement of its mass accuracy with reference masses of m/z 121.0509 and 922.0098.

Sample Preparation. The orange, mandarin, and lemon samples used in the study were obtained from several local growers in Uruguay. One of them came from a noncommercial, pesticide-free orange tree grown in a family garden. Each sample employed weighed 2 kg of the

different citrus fruit varieties. The fruits were cut in four pieces, the two opposite ones were separated for analysis and the other two were discarded. The selected fruit pieces were chopped and homogenized using a kitchen blender. After composition and homogenization, the final laboratory sample was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The extraction method procedure chosen was previously validated by our group.³⁵ Ten grams of the homogenized sample was weighed and placed into a 50 mL Teflon centrifuge tube. Then, 10 mL of ethyl acetate was added and the tube was vigorously shaken by hand for 1 min. Afterward, 8 g of anhydrous magnesium sulfate and 1.5 g of sodium chloride were added. The mixture was shaken vigorously by hand for 1 min. The centrifuge tubes were placed in an ultrasonic bath for 15 min and centrifuged during 10 min at 5000 rpm. The ethyl acetate supernatant solution of 1 g/mL of sample was separated and concentrated under a N_2 stream to dryness. The residue was redissolved in MeCN/ H_2O (1:9). The final extract was injected in the UHPLC system using the conditions described above.

Matrix-Matched Standard Preparation. To each citrus species and variety extract was added the exact volume of pesticide working standard solution and MeCN/ H_2O (1:9) to redissolve it (final volume of 100 μL). The fortified extracts were diluted 5 times with MeCN/ H_2O (1:9), yielding a final concentration in the fortified extract from 10 to 150 $\mu\text{g/L}$. The calibration curve used as reference was prepared in solvent at the same studied levels. The resulting concentrations in vial were from 2 to 30 $\mu\text{g/L}$, respectively, ending with the equivalent of 0.2 g of sample per milliliter of MeCN/ H_2O (1:9).

Determination of Matrix Effect. Matrix effects were evaluated by injecting matrix-matched calibration curves and reference calibration curves in solvent. Matrix effects were quantified as the percentage of deviation of the response of the analyte in matrix versus its signal intensity in the reference curve (IUPAC defines sensitivity as the slope of the calibration curve) calculated as

$$\left[\frac{\text{slope (matrix matched)}}{\text{slope (reference curve)}} - 1 \right] \times 100$$

Positive values represent enhancements and negative values, suppressions, of the analyte signal induced by the matrix. In this work ME was classified, as currently, in three levels: (a) *Weak ME* is considered when the ME value is $\leq 20\%$. It can also be assumed as *no matrix effect* because the shift is between the repeatability values.³⁶ (b) *Medium ME* is considered between 20 and 50%, and (c) *strong ME* occurred when the values were $>50\%$.

5. RESULTS AND DISCUSSION

The MEs caused by ethyl acetate extracts of three different citrus species, lemon, orange, mandarin, and varieties from the latter two, during pesticide residue analysis were characterized. ME calculation is usually performed using, at least, two different procedures. The first one compares the signal response between an analyte in a determined matrix and in solvent. This procedure is often done at different concentration levels as reported by Cervera.³⁷

Other authors^{3,22} reported the determination of ME as the comparison between the slopes of matrix-matched standard curves against calibration standard curves in solvent. The requirements to accomplish this criteria are that either the sum of least-squares at each point must not exceed 20%, or the regression coefficient (r^2) of both curves is >0.99 . The main drawback of this approach is that it can be inaccurate for pesticides with an $r^2 < 0.99$ or whose sum of least-squares at each point exceeds 20%.³⁸ This was the criterion followed in the present study, and thus the slope adjustment to $r^2 \geq 0.999$ was verified throughout the experiment.

Two types of matrix interferences are observed using ESI ionization followed by mass spectrometry detection. The most common effect of matrix coextractives on residue determination

occurs when they coelute with the analytes from the chromatographic column in the ionization step. The pesticides of interest and the coextractives placed in the surface of the solvent droplet compete in ion generation during the Coulomb explosion, causing in most cases a drop in the signal intensity (i.e., "suppression"). In addition to this effect, if the coeluting compound generates ions with mass similar to those of the analyte (interferences), the ion ratio could change, leading to misinterpretation of the results. The latter is seen when pesticide residues are determined through single-quadrupole analyzers, due to their poor mass resolution, and even in QqQ ones, despite the selectivity improvement they have in these instruments. The problem could be partially avoided when high-resolution spectrometers are employed, such as TOF or Orbitrap.

Linearity. An important drawback of TOF systems is their short dynamic range due to rapid saturation of the detector. The results obtained in this work confirmed previous findings.^{39,40} In some cases pesticide levels as little as 0.01 mg/kg were enough to saturate the detector. The linear ranges are variable for each pesticide due to the combination of specific analytes and matrix components. This is the case of cyprodinil, which has a linear range up to 0.05 mg/kg in lemons and oranges, but reached 0.10 mg/kg in mandarins.

Matrix Effects. All citrus varieties caused a differential response for a number of analytes when compared with the corresponding signal in solvent. ME values for each combination of pesticide and citrus variety are shown in Table 1. The three citrus species showed differential matrix effects for some pesticides under study. This fact stresses the need for protocol validation of each citrus species matrix to perform accurate residue determinations, despite the generally

accepted statement that it is sufficient to validate a single matrix as representative for all components in a matrix category.

In all varieties and species an important percentage of analytes did not present any matrix effect (see Figure 1a). The ME in mandarins was negative for around 20% of the compounds under study, whereas in orange and lemon only around 8% of the studied pesticides have the same behavior. In addition, an enhancement of the analyte response was observed in 12 and 24% of the pesticides in oranges and lemons, respectively. Six pesticides, including thiamethoxam, trichlorfon, imidacloprid, acetamiprid, thiodicarb, and pyridaben, showed positive matrix effects for all of the evaluated citrus varieties and their different species. The MEs are globally different for HRTOF(MS) than for QqQ MS/MS. As stated above, in the present study around 75% of the compounds showed low matrix effects ($<20\%$) in the different citrus species and varieties studied, whereas when pesticide residue analysis was performed with QqQ spectrometers, 70% of the analytes showed strong matrix effects. The literature indicates that when UHPLC-MS/MS was used for the analysis of orange QuEChERS extracts, 35% of the pesticides were free of matrix effects before dilution, 48% needed dilution up to a dilution factor of 15, and 17% of the compounds still suffered from strong matrix effects even with a dilution factor of 100.³⁶ In contrast, this work demonstrated that high-resolution mass spectrometry had significant matrix effects for only 20% of the pesticides under study at a dilution factor of 1:5. Although the most common and reported situation for ESI ionization in QqQ is ion suppression,²² considerable matrix effects have been reported for some pesticides such as thifensulfuron-methyl, imidacloprid, omethoate, and triflumizole when orange extracts

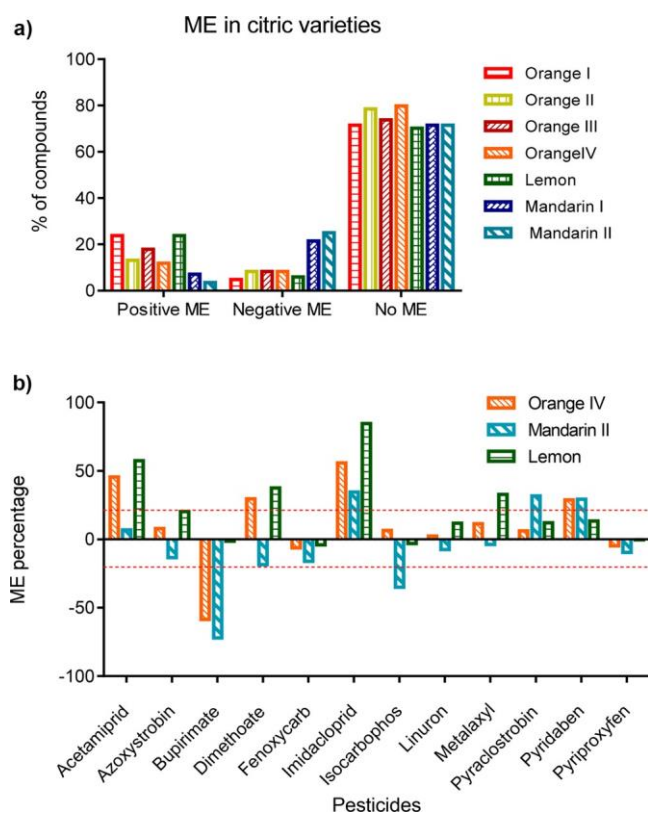


Figure 1. (a) Percentage of compounds clustered according to matrix effect (ME): no ME, positive and negative ME. (b) Percentage of matrix effect for some representative analytes in three citrus species.

were analyzed. Nevertheless, the same pesticides evaluated in other matrices (apple, spinach, or rice) did not present the same behavior.²² Two facts can be taken into account when aiming to explain these results. First, we focused our interest on the efficiency of transmission of QqQ instruments, which is low in spectrometers equipped with electrofocusing lenses. When going from Q1 to Q2 and from Q2, after the collision, to Q3, only a small portion of the ions are transmitted.⁴¹ The enormous selectivity provided by the transitions from parent to daughter ions in the QqQ tandem MS/MS experiments can overcome this gap. In the case of time-of-flight instruments, all of the ions reach the detector. In this type of spectrometer we can find a “pure” matrix effect caused only at the Coulomb explosion during the ionization step, and the interferences are due to compounds eluting at exactly the same retention time of the pesticide and bearing the exactly the same mass.¹⁹ The second point is the high selectivity that an instrument capable of measuring exact masses can provide (errors of <5 ppm). If the evaluation of the matrix effect on the $[M + H]^+$ ion is performed using the mass accuracy of a standard QqQ, the ME will be higher. The collision cell is much more crowded, and collisions between ions could occur, lowering the global amount of ions transmission, a fact that has been described by Lee and Zhu.⁴² The same lack of specificity leads to a greater number of ions reaching the detector. Comparing the performance of HR-MS and QqQ MS/MS spectrometers, a resolution power >50,000 was established as the cross point where high-resolution instruments are superior to standard QqQ for the identification and determination of trace compounds. Nevertheless, although the instrument employed for this study has a resolution of 18,000, matrix effects are

minimized. Only a few positive MEs due to interferences with matrix compounds were observed where the resolution was not high enough to discriminate between masses. The results reinforce some of the advantages of HR-MS in regard to MS/MS systems.⁴³

Individual pesticides showed different behaviors depending on the analyzed matrix. Some of them, such as fenazaquin or acetamiprid, showed the same type of ME, albeit of different magnitude, for the three evaluated fruit species. In other cases, such as clothianidin or thiametoxam, one of the citrus matrices caused an inverse ME. Some striking cases were observed. For example, spiroxamine suffered a 30–40% negative ME in oranges and mandarins but a negligible ME in lemons (Figure 1b). Nevertheless, the results did not show differences in ME among citrus varieties, whereas the opposite was already reported by Krueve et al. for apple varieties.⁴⁴

In routine analysis, some controversial results could be obtained if the quantification was performed using matrix-matched curves of different species. The total ME that affects the quantification is influenced by the ME of the variety being analyzed plus that of the variety used for quantification. An overall evaluation of the changes in the MEs was observed when the reference curve was varied (see the Supporting Information). Matrix-matched (MM) calibration curves in oranges showed no MEs >20%. However, if the same orange MM calibration curve is used to quantify mandarins and lemons, the results are different and the MEs are >20% in many cases. The compounds that suffered the strongest matrix effects were not the same in each case. Whereas thiametoxam showed an ME >100% in all of the studied species, the ME observed when using MM calibration curve of the specific variety dropped to values <30%. On the other hand, spinosyn A and bupirimate, both of which showed little ME in lemon, shifted to 60–70% in orange and mandarin. This confirmed that more accurate results in pesticide residue analysis should be obtained when MM calibration curves of the same fruit species are used. Nevertheless, and as stated by the DG SANTE guidelines,¹⁶ for every positive found, a second analysis at the concentration detected is highly recommended.

Analysis of Possible Interferences. As stated above, pesticide coeluting interferences having the same ion fragment as the analytes under study are usual in single-quadrupole and QqQ-MS/MS. Powerful instruments such as HR-MS can partially overcome this problem by adjustment of both the retention time and exact mass windows. The possible interferences were analyzed for each pesticide in the different matrices. In each spiked citrus variety, narrow error windows of ± 0.1 min in retention time and ± 5 ppm in mass were set to accurately extract the $[M + H]^+$ fragment, and few interferences were observed. For example, when the quantifier ion of imidacloprid (256.0596) is extracted in a narrow window of 5 ppm, an isobaric interference appeared at the same retention time in all of the studied matrices (see Figure 2). Similar isobaric interferences could explain the positive ME observed for many pesticides, although the phenomenon deserves a deeper study.

Evaluation of Coextracted Components. Citrus extracts for pesticide residue analysis contain thousands of natural compounds⁴⁵ that coelute throughout the chromatographic run at different concentration levels. The matrix coextracted compounds can cause problems at the ionization step and in the detection systems of the spectrometers. Those at high concentrations saturate the TOF detector and could hamper

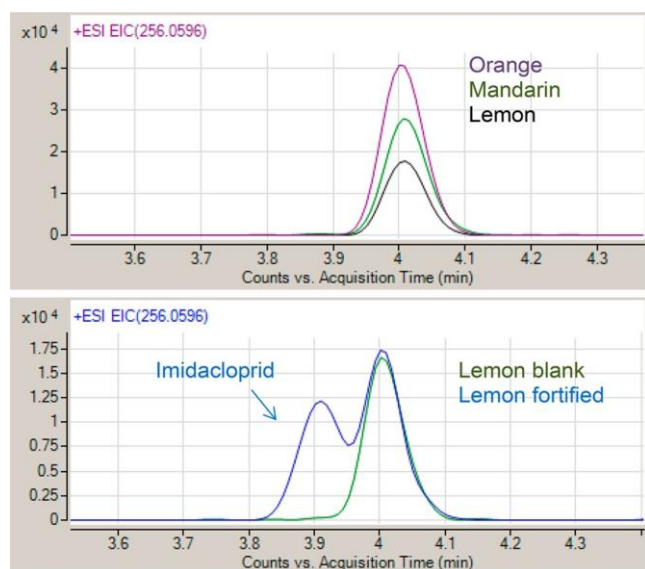


Figure 2. UHPLC-TOF-MS extracted ion chromatograms (m/z 256.0596) using a mass extraction window of ± 5 ppm of imidacloprid: (top) matrix interference in orange (violet), mandarin (green), and lemon (black); (bottom) lemon blank (green) overlapping with fortified extract at 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (blue).

the detection of the sought residues for some minutes. The number, amount, and chromatographic distribution of matrix components depend on the particular matrix, even among

those included within the same commodity category according to EU guidelines.⁴⁵ To evaluate the effect properly, a sequential study was performed. The coextracted analytes were evaluated using the Molecular Feature Extractor (MFE) algorithm from the MassHunter Workstation software. This tool analyzes the chromatogram searching for groups of all the ions that can be joined with a real chromatographic peak and may represent a characteristic of a compound. In addition, the MFE algorithm creates a compound list of all the peaks in the data file that represent real molecules. In this work, only compounds with an absolute peak height of $\geq 10,000$ counts were considered. In orange extracts between 10,994 and 11,522 components were found, of which 8059 are common for all of the varieties studied. In the case of mandarin extracts, between 12,966 and 12,555 components were found, whereas in lemon, 11,142. Among the three evaluated species, only 5250 compounds, 50% of the total compounds, were common. Applying this type of data analysis, 8017 coextractives were detected in QuEChERS orange extracts after analysis by UHPLC-TOF-MS.⁴⁵ Therefore, ethyl acetate protocols extract 20–40% more matrix compounds than the CEN method.⁴⁵ A preliminary comparison of these results shows that QuEChERS extracts are cleaner than EtOAc ones for citrus pesticide residue analysis.

The 2D diagram in Figure 3 shows the complexity of the EtOAc extracts and the pesticide distribution and intensity throughout one UHPLC run. Many of the pesticides eluted in the most coextractive-crowded region of the chromatogram.

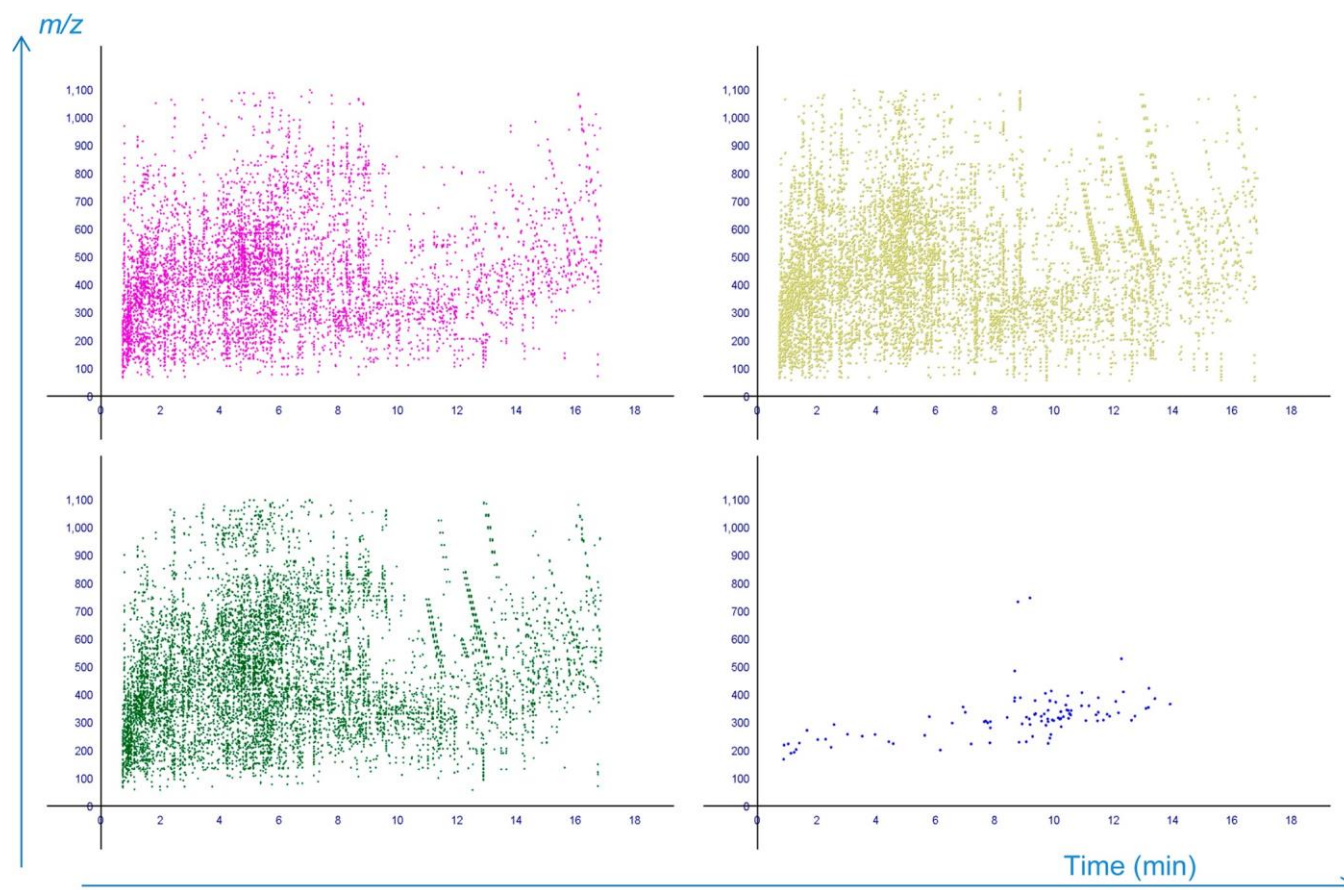


Figure 3. Coextracted matrix compound map of citrus extracts analyzed by UHPLC-TOF-MS (absolute height = 10,000 counts): lemon (olive green), mandarin (dark green), orange (pink) and the studied pesticides (blue).

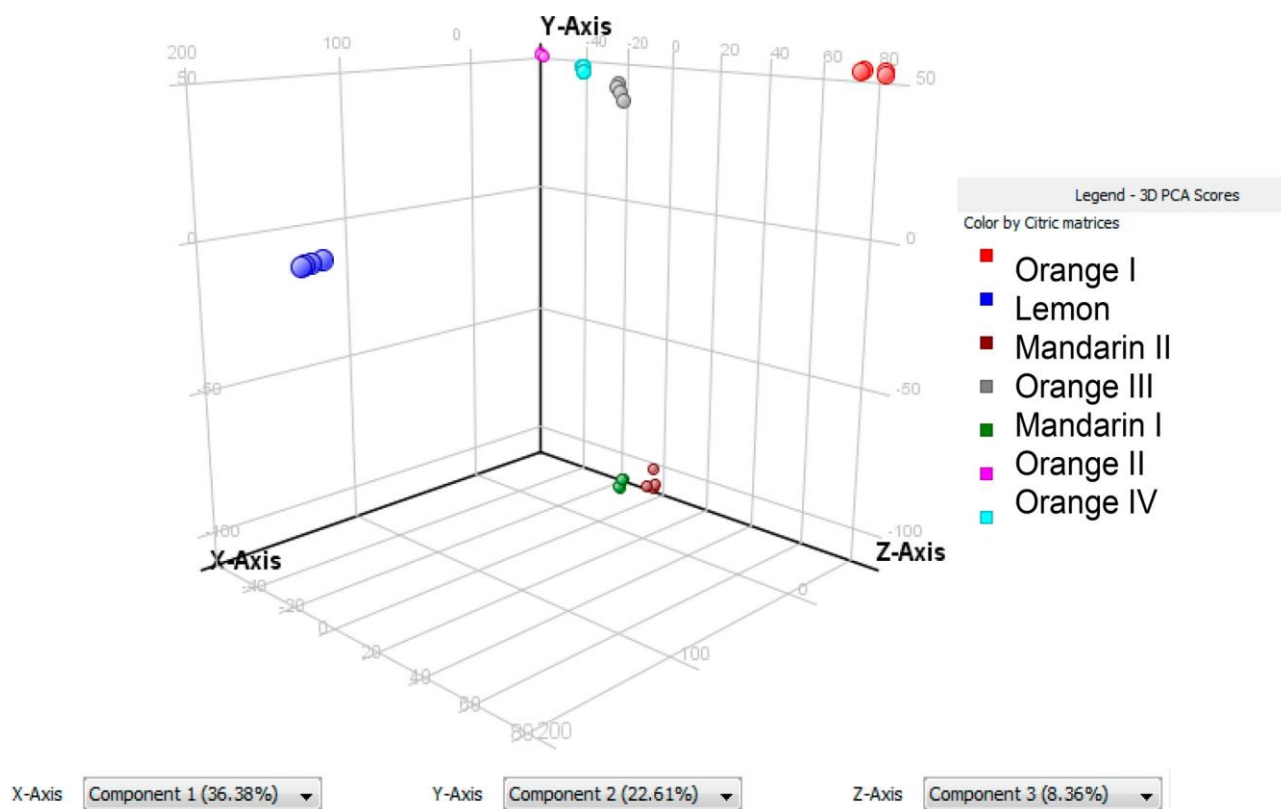


Figure 4. Principal component analysis (PCA) including all compounds present in ethyl acetate extracts of the studied citric matrices. Each axis is composed of a percentage of each component.

From their interaction stems the observed ME, but after 10 min of elution, the presence of coextractives was lower.

As a consequence, the matrix effect for the 37 pesticides that are detected between 10 and 14 min was lowered. This fact means that for >40% of the pesticides under study, the matrix effects are negligible, pointing out the importance of the chromatographic separation before the MS determination. If the samples are injected directly to the TOF analyzer, as has been suggested,⁴⁶ matrix effects could not be avoided for these pesticides despite the high-resolution power of new instruments. They would reach the MS detector simultaneously with the matrix components, not only interfering with the determination but also saturating the detector.

Coextractive Identification. Taking advantage of HR-MS systems that allow screening and tentative identification for both nontarget and target compounds,⁴⁷ the profile of coextractives from each matrix were analyzed. Although no major differences in the composition of coextractives were observed between oranges and mandarins, a principal component analysis (PCA) shows a clear differentiation between the three citrus species. Separated clusters for each species were formed, but the different varieties grouped together (see Figure 4).

To identify the most important coextractives, 50, 25, and 5 times dilutions were performed. In these conditions, the detected compounds were mainly polyphenol glycosides and aglycones of flavonoids, fatty acids, limonoids, and an alkaloid. The flavonoid hesperidin and some of its isomers (neohesperidin and meranzin hydrate), naringenin, many polymethoxyflavones, and limonoids such as limonin and nomilin were identified (see Table 2). The identification of the natural products was performed on the basis of their exact masses, their

isotopic abundance patterns, and the comparison to true standards and fragmentation pathway. The use of isotopic patterns for identification purposes is a valuable indicator of the high degree of selectivity that can be obtained with HR-MS instruments.⁴⁸ The accurate mass of characteristic isotopic signals and the distance in the m/z axis between them are combined by the software, providing an estimation of the similarity between the experimental mass spectrum and the theoretical one obtained using the elemental composition of the natural product. Figure 5 shows the fragmentation of hesperidin, a flavanone glycoside.

To determine precisely the retention time and avoid detector saturation problems by the different natural products, exact mass calculations were performed for the isomer containing one or two ¹³C atoms, as shown in Table 2. Many of the identified natural products were present in all of the citrus matrices, but in different amounts. The most different matrix was lemon, where citric acid could be identified but the alkaloid synephrine and some flavonoids were not detected.

Influence of Specific Coextractives in the Matrix Effects. The presence of known natural products from citrus fruits, such as flavonoids, acids, and limonoids, can explain the global matrix effect that some analytes suffered during the analysis. The relative amounts of each coextractive in the studied citrus species and varieties played an important role. For example, synephrine and citric acid coeluted with the triazine cyromazine. In sweet oranges, the citric acid content was the lowest for the three species, whereas in lemons it was largely the highest. Synephrine was absent in lemons and at lower concentrations in oranges, but it was significant in mandarins. The observed ME followed this trend. Mandarin II, for which the sum in both metabolites was the highest, showed the

Table 2. Molecular Formula, Retention Time (t_R), Exact Neutral Mass, Exact Mass of $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$, and $[A + H]^+$, and Exact Neutral Mass for the Isomer Containing One, Two, or Three ^{13}C for Each Natural Product (“A” Is the Corresponding Aglycone)^a

molecular formula	t_R (min)	exact neutral mass	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[A + H]^+$	compound name	quantifier ^{13}C ion	exact neutral mass
C ₉ H ₁₃ NO ₂	0.84	167.0946	168.1025	190.0844		synephrine		
C ₆ H ₈ O ₇	0.92	192.0270	193.0348	215.0168		citric acid		
C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	3.50	580.1793	581.1871	603.1690	273.0763	naringin		
C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	3.80	610.1898	611.1976	633.1795	303.0869	pseudoneohesperidin		
C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	4.17	610.1898	611.1976	633.1795	303.0869	hesperidin	$[^{13}C]C_{27}H_{34}O_{15}$	611.1931
C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	4.49	610.1898	611.1976	633.1795	303.0869	neohesperidin		
C ₁₅ H ₁₈ O ₅	4.95	278.1154	279.1232	301.1052		meranzin hydrate		
C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	5.67	594.1949	595.2027	617.1847	287.0919	poncirin		
C ₁₅ H ₁₂ O ₅	6.72	272.0685	273.0763	295.0582		naringenin		
C ₂₀ H ₂₀ O ₇	7.08	372.1209	373.1287	395.1107		C ₂₀ H ₂₀ O ₇ polymethoxy	$[^{13}C]3C_{17}H_{20}O_7$	375.1310
					flavone 1			
C ₂₁ H ₂₂ O ₈	7.45	402.1315	403.1393	425.1212		C ₂₁ H ₂₂ O ₈ polymethoxy	$[^{13}C]C_{20}H_{22}O_8$	403.1348
					flavone 1			
C ₂₀ H ₂₀ O ₇	7.73	372.1209	373.1287	395.1107		C ₂₀ H ₂₀ O ₇ polymethoxy	$[^{13}C]3C_{17}H_{20}O_7$	375.1310
					flavone 2			
C ₁₅ H ₁₆ O ₄	8.02	260.1049	261.1127	283.0947		meranzin		
C ₂₁ H ₂₂ O ₈	8.10	402.1315	403.1393	425.1212		C ₂₁ H ₂₂ O ₈ polymethoxy	$[^{13}C]C_{20}H_{22}O_8$	403.1348
					flavone 2			
C ₂₆ H ₃₀ O ₈	8.29	470.1941	471.2019	493.1839		limonine	$[^{13}C]C_{25}H_{30}O_8$	471.1974
C ₂₁ H ₂₂ O ₈	8.30	402.1315	403.1393	425.1212		C ₂₁ H ₂₂ O ₈ polymethoxy	$[^{13}C]3C_{18}H_{22}O_8$	405.1415
					flavone 3			
C ₂₂ H ₂₄ O ₄	8.76	432.1420	433.1493	455.1313		heptamethoxyflavone		
C ₂₈ H ₃₄ O ₉	8.85	514.2203	515.2281	537.2101		nomilin		
C ₂₀ H ₂₀ O ₇	9.01	372.1209	373.1287	395.1107		C ₂₀ H ₂₀ O ₇ polymethoxy	$[^{13}C]3C_{17}H_{20}O_7$	375.1310
					flavone 3			
C ₂₁ H ₂₂ O ₈	9.58	402.1315	403.1393	425.1212		C ₂₁ H ₂₂ O ₈ polymethoxy	$[^{13}C]2C_{19}H_{22}O_8$	404.1382
					flavone 4			
C ₁₈ H ₃₀ O ₂	13.80	278.2246	279.2324	301.2144		linolenic acid		
C ₁₈ H ₃₂ O ₂	14.58	280.2402	281.2480	303.2300		linoleic acid		
C ₁₈ H ₃₄ O ₂	15.38	282.2559	283.2637	305.2457		oleic acid		

^aTo avoid detector saturation problems by the different natural products, exact mass calculations were performed for the isomer containing one or two ^{13}C : molecular formula and exact ^{13}C ion mass are presented.

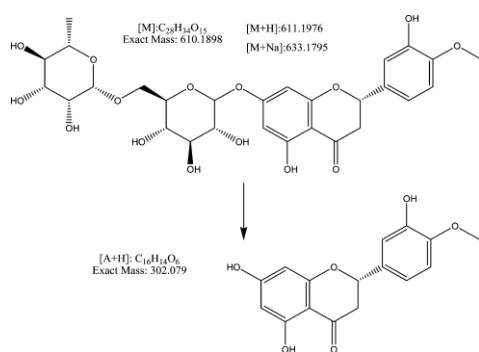


Figure 5. Fragmentation pattern of hesperidin suffered in the ionization step using UHPLC-ESI-TOF.

greatest ME on cyromazine, followed by lemon. In the four orange varieties ME was negligible (<20%) for this pesticide. A heptamethoxyflavone that eluted between 8.65 and 8.95 min influenced chlorotraniliprole, dimethomorph, spinosyn A, and paclobutrazol determination (see Table 3). Similar influences were caused by poncirin and polymethoxyflavones that coeluted with thiacloprid, fenamiphos, carbofuran, flutriafol, spiromaxime, fenoxycarb, and cyprodinil. Polymethoxyflavones are typical metabolites of mandarins, and their occurrence in oranges is lower, but they are scarce in lemons. Therefore, it is most probable that other metabolites are influencing the ME in

oranges and particularly in lemons, but the higher concentration of polymethoxyflavones caused ion suppression in all of the coeluting pesticides within the mandarin varieties. The exact retention time of neohesperidin was $t_R = 4.17$ min (50× dilution), but under the pesticide residue analysis conditions (5× dilution), it eluted between 4.05 and 4.30 min, where it overlapped with imidacloprid, causing a positive matrix effect on this pesticide (60.8–84.9%). Similar analysis can be performed by comparing the chemical structures and concentrations of the coeluting analytes and pesticides to get a deeper knowledge around ME and their consequences in residue determination.

The huge amounts of some of the identified coextractives can saturate the detector for several minutes, coeluting with some of the pesticides under study and hampering their determination.

Summarizing the results thus obtained, UHPLC-TOF accurate HR-MS minimizes ME on citrus fruits compared to QqQ spectrometers. Almost 70% of the pesticides under study were free from ME. The use of MM calibration curves allows a more precise and accurate pesticide determination, but it has to be performed using the fruit under study. Finally, the metabolites and their concentrations in the extracts influence the determinations when coeluting with the evaluated pesticides either at the ionization step or at the MS detector. Nevertheless, further work on the influence of the individual

Table 3. Identified Natural Products and Coeluting Pesticides with Their Matrix Effect in Each Citrus Variety^a

natural product	elution range (min)	coeluted pesticide	% ME						
			orange I	orange II	orange III	orange IV	mandarin I	mandarin II	lemon
synephrine	0.80–0.93	cyromazine	11.9	–7.2	–16.0	–17.3	–26.0	–77.2	–34.9
citric acid	0.82–1.05	cyromazine	11.9	–7.2	–16.0	–17.3	–26.0	–77.2	–34.9
neohesperidin	3.72–3.88	imidacloprid	81.5	81.2	84.9	55.9	60.8	34.5	84.5
naringin	3.32–3.66	clothianidin	2.5	–5.8	–6.7	–10.2	–26.3	–27.9	23.3
poncirin	5.52–5.75	thiacloprid	24.0	4.7	15.1	13.6	–27.8	–45.6	39.7
C ₂₀ H ₂₀ O ₇ polymethoxyflavone 1	6.97–7.25	fenamiphos sulfoxide	38.1	34.9	39.3	28.5	9.9	3.4	26.6
		fenamiphos sulfone	29.5	19.0	26.6	12.7	12.2	2.6	35.2
		carbofuran	10.8	–0.7	2.8	1.9	–11.3	–19.0	11.1
C ₂₀ H ₂₀ O ₇ polymethoxyflavone 2	7.55–7.95	flutriafol	–17.8	–30.0	–17.8	–27.3	–31.7	–27.1	2.8
		spiroxamine	–11.0	–31.1	–29.5	–30.4	–42.8	–37.7	5.3
		fenoxycarb	29.5	–4.2	–8.0	–6.3	–23.2	–16.0	–4.0
		cyprodinil	8.4	–16.2	–14.5	–15.2	–45.7	–42.5	–5.3
		metalaxyl	25.8	25.2	25.0	11.3	10.2	–3.8	32.8
C ₂₁ H ₂₂ O ₈ polymethoxyflavone 3	8.20–8.50	bupirimate	–55.8	–60.3	–54.7	–58.5	–75.7	–72.1	–1.3
		heptamethoxyflavone	14.2	–1.5	10.2	0.0	–6.0	–21.0	21.3
		dimethomorph E	16.1	2.4	9.7	0.4	–0.7	–8.5	22.4
		spinosyn A	–48.9	–64.3	–52.0	–63.8	–47.1	–46.9	7.4
nomilin	8.75–8.95	dimethomorph Z	38.4	7.2	51.1	–4.4	–23.3	–21.4	58.5
		paclobutrazol	–2.4	–8.6	0.2	–7.1	–17.4	–9.3	3.0
		dimethomorph Z	38.4	7.2	51.1	–4.4	–23.3	–21.4	58.5
		paclobutrazol	–2.4	–8.6	0.2	–7.1	–17.4	–9.3	3.0
C ₂₀ H ₂₀ O ₇ polymethoxyflavone 3	8.88–9.25	paclobutrazol	–2.4	–8.6	0.2	–7.1	–17.4	–9.3	3.0
		terbutylazine	–19.8	–26.0	–15.0	–21.8	–65.2	–56.8	21.4
		triticonazole	–3.4	–9.9	–1.2	–9.7	–42.7	–34.2	8.6
		isocarbofos	–7.0	–13.0	–3.2	6.5	–45.2	–35.0	–3.0
		spinosyn D	18.5	15.6	18.9	14.7	–6.8	–8.3	30.3
C ₂₁ H ₂₂ O ₈ polymethoxyflavone 4	9.52–9.67	iprovalicarb	7.9	1.6	11.4	0.6	–23.1	–23.7	15.9
		fenamiphos	12.5	5.7	12.8	4.1	–15.1	–15.5	24.5

^aIn bold, natural product does not present in this specific matrix.

coextractives is needed to better understand the matrix effects observed during pesticide residue analysis of citrus fruits.

6. ASSOCIATED CONTENT

* Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00243.

S1 Table 1. Pesticide name, retention time, and percentage of matrix effect in orange III and IV and mandarin I calculated on orange II (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(A.R.F.-A.) E-mail: amadeo@ual.es. Phone: +34 950 015 034.

Fax: +34 950 015 483.

ORCID

Horacio Heinzen: 0000-0001-8985-478X

Funding

The research was funded by the European Commission, DG SANCO, of the annual financing decision (2011/889/EU) and according to Article 5 of Commission Implementing Regulation (EU) No. 926/2011. N.B. acknowledges a fellowship from CSIC, Uruguay (Comisión Sectorial de Investigación Científica) and financial support from ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) and PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Professor Dr. G. Moyna is kindly acknowledged for correcting the English language spelling and syntax of the manuscript.

7. ABBREVIATIONS USED

AMS, accurate mass spectrometry; EI, electron impact; ESI, electrospray; EtOAc, ethyl acetate; fwhm, full width at half-maximum; GC, gas chromatography; UHPLC, ultrahigh-performance liquid chromatography; HR, high resolution; ME, matrix effects; MeCN, acetonitrile; MFE, molecular feature extractor; MM, matrix matched; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; PCA, principal component analysis; QqQ, triple quadrupole; QTOF, quadrupole time of flight; TOF, time of flight

REFERENCES

- (1) Yoshioka, N.; Akiyama, Y.; Teranishi, K. Rapid simultaneous determination of *o*-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J. Chromatogr., A* 2004, 1022, 145–150.
- (2) Andrásková, M.; Hrouzková, S.; Cunha, S. C. Combination of QuEChERS and DLLME for GC-MS determination of pesticide residues in orange samples. *Food Addit. Contam., Part A* 2013, 30, 286–297.

- (3) Choi, S. J.; Kim, E. J.; Lee, J. I.; Cho, I. S.; Park, W. H.; Hwang, I. S.; Kim, M. S.; Kim, G. H. Determination of post-harvest fungicide in citrus fruits using LC-MS. *Han'guk Sikip'um Kwahakhoechi* 2013, 45, 409–415.
- (4) Ruiz, I.; Morales, A.; Barba, A.; Oliva, J. Determination of natural pesticides in fresh fruits using liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2012, 95, 238–243.
- (5) Ucles, S.; Belmonte, N.; Mezcuca, M.; Martínez, A. B.; Martínez-Bueno, M. J.; Gamón M.; Fernández-Alba, A. R. Validation of a multiclass multiresidue method and monitoring results for 210 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Health, Part B* 2014, 49, 557–568.
- (6) Ivanova, B.; Spittler, M. UV-MALDI mass spectrometric quantitation of uracil based pesticides in fruit soft drinks along with matrix effects evaluation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014, 100, 233–241.
- (7) Gilbert-López, B.; JaerMartos, L.; García-Reyes, J. F.; Villar-Pulido, M.; Polgar, L.; Ramos-Martos, N.; Molina-Díaz, A. Study on the occurrence of pesticide residues in fruit-based soft drinks from the EU market and morocco using liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Control* 2012, 26, 341–346.
- (8) Cherta, L.; Beltran, J.; Pitarch, E.; Hernández, F. Comparison of simple and rapid extraction procedures for the determination of pesticide residues in fruit juices by fast gas chromatography-mass spectrometry. *Food Anal. Methods* 2013, 6, 1671–1684.
- (9) Zheng, X.; Ding, L.; Chen, Z.; Guo, J.; Zhang, R.; Wu, W. Rapid determination of thiabendazole and carbendazim in concentrated fruit juices by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Sepe* 2015, 33, 652–656.
- (10) Alves, A. A. R.; Rezende, M. J. C.; Hovell, A. M. C.; Bizzo, H. R.; Oliveira, A. C. L.; Rodrigues, S. V.; Rezende, C. M. Comparison between GC-MS-SIM and GC-ECD for the determination of residues of organochlorine and organophosphorus pesticides in Brazilian citrus essential oils. *J. Braz. Chem. Soc.* 2012, 23, 306–314.
- (11) Di Bella, G.; Lo Turco, V.; Rando, R.; Arena, G.; Pollicino, D.; Luppino, R. R.; Dugo, G. Pesticide and plasticizer residues in citrus essential oils from different countries. *Nat. Prod. Commun.* 2010, 5, 1325–1328.
- (12) Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) approach for the determination of pesticide residues. In *18th Annual Waste Testing and Quality Assurance Symposium, WTQA 2002 Proceedings*; 2003; pp 231–241.
- (13) Lehotay, S. J.; O'Neil, M.; Tully, J.; García, A. V.; Contreras, M.; Mol, H.; Heinke, V.; Anspach, T.; Lach, G.; Fussell, R.; Mastovska, K.; Poulsen, M. E.; Brown, A.; Hammack, W.; Cook, J. M.; Alder, L.; Lindtner, K.; Vila, M. G.; Hopper, M.; De Kok, A.; Hiemstra, M.; Schenck, F.; Williams, A.; Parker, A. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2007, 90, 485–520.
- (14) Anastassiades, M.; Scherbaum, E.; Tassdelen, B.; Stajnbaher, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In *Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2007; pp 439–458.
- (15) Guilbault, G. G.; Hjelm, M. Nomenclature for automated and mechanised analysis. *Pure Appl. Chem.* 2009, 61, 1657–1664.
- (16) European Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed; Document SANTE/11945/2015, 2015.
- (17) Ferrer, I.; García-Reyes, J. F.; Fernández-Alba, A. Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 671–682.
- (18) Truffelli, H.; Palma, P.; Famigliani, G.; Cappiello, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2011, 30, 491–509.
- (19) Stahnke, H.; Kittlaus, S.; Kempe, G.; Alder, L. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? *Anal. Chem.* 2012, 84, 1474–1482.
- (20) Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; Poole, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with splitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr., A* 1993, 638, 57–63.
- (21) Poole, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J. Chromatogr., A* 2007, 1158, 241–250.
- (22) Kwon, H.; Lehotay, S. J.; Geis-Asteggiante, L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops. *J. Chromatogr., A* 2012, 1270, 235–245.
- (23) Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; Fernández Moreno, J. L.; Romero-González, R. Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition. *J. Chromatogr., A* 2009, 1216, 4798–4808.
- (24) Botero-Coy, A. M.; Marín, J. M.; Serrano, R.; Sancho, J. V.; Hernández, F. Exploring matrix effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of pesticide residues in tropical fruits. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 3667–3681.
- (25) Yang, P.; Chang, J. S.; Wong, J. W.; Zhang, K.; Krynetsky, A. J.; Bromirski, M.; Wang, J. Effect of sample dilution on matrix effects in pesticide analysis of several matrices by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 5169–5177.
- (26) Wang, Y.; Li, S.; Zhang, F.; Lu, Y.; Yang, B.; Zhang, F.; Liang, X. Study of matrix effects for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 4 aminoglycosides residues in milk. *J. Chromatogr., A* 2016, 1437, 8–14.
- (27) Uclés A.; Herrera López, S.; Dolores Hernando, M.; Rosal, R.; Ferrer, C.; Fernández-Alba, A. R. Application of zirconium dioxide nanoparticle sorbent for the clean-up step in post-harvest pesticide residue analysis. *Talanta* 2015, 144, 51–61.
- (28) Kittlaus, S.; Kempe, G.; Speer, K. Evaluation of matrix effects in different multipesticide residue analysis methods using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, including an automated two-dimensional cleanup approach. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 2185–2195.
- (29) Kittlaus, S.; Schimanke, J.; Kempe, G.; Speer, K. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2011, 1218, 8399–8410.
- (30) Wang, J.; Chow, W.; Chang, J.; Wong, J. W. Ultrahigh-performance liquid chromatography electrospray ionization Q-orbitrap mass spectrometry for the analysis of 451 pesticide residues in fruits and vegetables: method development and validation. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 10375–10391.
- (31) Del Mar González-Ramos, M.; Rajski, Ł.; Lozano, A.; Fernández-Alba, A. R. The evaluation of matrix effects in pesticide multi-residue methods: via matrix fingerprinting using liquid chromatography electrospray high-resolution mass spectrometry. *Anal. Methods* 2016, 8, 4664–4673.
- (32) He, X. G.; Lian, L. Z.; Lin, L. Z.; Bernart, M. W. High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.). *J. Chromatogr., A* 1997, 791, 127–134.
- (33) Kanaze, F.; Termentzi, A.; Gabrieli, C.; Niopas, I.; Georgarakis, M.; Kokkalou, E. The phytochemical analysis and antioxidant activity assessment of orange peel (*Citrus sinensis*) cultivated in Greece-Crete indicates a new commercial source of hesperidin. *Biomed. Chromatogr.* 2009, 23, 239–249.
- (34) Sugitate, K.; Nakamura, S.; Orikata, N.; Mizukoshi, K.; Nakamura, M.; Toriba, A.; Hayakawa, K. Search of components causing matrix effects on GC/MS for pesticide analysis in food. *J. Pestic. Sci.* 2012, 37, 156–163.
- (35) Besil, N.; Perez-Parada, A.; Cesio, V.; Varela, P.; Rivas, F.; Heinzen, H. Degradation of imazalil, orthophenylphenol and

pyrimethanil in Clementine mandarins under conventional postharvest industrial conditions at 4 °C. *Food Chem.* 2016, 194, 1132–1137.

(36) Ferrer, C.; Lozano, A.; Agüera, A.; Girón A. J.; Fernández-Alba, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J. Chromatogr., A* 2011, 1218, 7634–7639.

(37) Cervera, M. I.; Medina, C.; Portolés T.; Pitarch, E.; Beltrán J.; Serrahima, E.; Pineda, L.; Muñoz, G.; Centrich, F.; Hernández, F. Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397, 2873–2891.

(38) Koesukwiwat, U.; Lehotay, S. J.; Leepipatpiboon, N. Fast, low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr., A* 2011, 1218, 7039–7050.

(39) Besil, N.; Uclés S.; Mezcua M.; Heinzen, H.; Fernández-Alba, A. R. Negative chemical ionization gas chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry and automated accurate mass data processing for determination of pesticides in fruit and vegetables. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407, 6327–6343.

(40) Petucci, C.; Mallis, L. Automated accurate mass data processing using a gas chromatograph/time-of-flight mass spectrometer in drug discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 1492–1498.

(41) Muntean, F.; Moeller, R. *Lenses or No Lenses? A Study of Ion Transfer Efficiency at Interfaces in a Lens-Free Triple Quadrupole MS*; Bruker: 2012.

(42) Lee, M.; Zhu, M. *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Disposition: Basic Principles and Applications*; Wiley: 2011; Vol. 1.

(43) Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M. Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): “where is the crossover point?”. *Anal. Chim. Acta* 2010, 673, 60–72.

(44) Kruve, A.; Künnapas, A.; Herodes, K.; Leito, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 2008, 1187, 58–66.

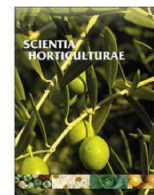
(45) Góñez-Ramos, M. M.; Ferrer, C.; Malato, O.; Agüera, A.; Fernández-Alba, A. R. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: screening and quantitative studies. *J. Chromatogr., A* 2013, 1287, 24–37.

(46) Nanita, S. C. Quantitative mass spectrometry independence from matrix effects and detector saturation achieved by flow injection analysis with real-time infinite dilution. *Anal. Chem.* 2013, 85, 11866–11875.

(47) Grimalt, S.; Sancho, J.; Pozoa, O. J.; Hernández, F. E. Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. *J. Mass Spectrom.* 2010, 45, 421–436.

(48) 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, 1310–1321.

**ANEXO III: Dissipation of selected
insecticides and fungicides applied during
preharvest on mandarin and orange trees
in Uruguay**



Dissipation of selected insecticides and fungicides applied during pre-harvest on mandarin and orange trees in Uruguay

Natalia Besil^{a,b}, Andrés Pérez-Parada^{b,c}, Franco Bologna^d, María Verónica Cesio^b, Fernando Rivas^d, Horacio Heinzen^{a,b}

^b Grupo de Análisis de Compuestos Traza, Departamento de Química del Litoral, Facultad de Química, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República UdelaR, Ruta 3, Km 363, 60000, Paysandú, Uruguay

^c Grupo de Análisis de Compuestos Traza, Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República UdelaR, General Flores 2124, 11800, Montevideo, Uruguay

^d Departamento de Desarrollo Tecnológico – DDT, Centro Universitario Regional del Este (CURE), Universidad de la República (UdelaR), Ruta 9 y Ruta 15, 27000, Rocha, Uruguay

^e Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental Salto Grande, Camino al Terrible s/n, 50000, Salto, Uruguay



ARTICLE INFO

Keywords:

Citrus fruits

Pre-harvest dissipation

Pesticide residues

LC–MS/MS

ABSTRACT

The dissipation of 4 commercial pre-harvest pesticides used in two Citrus species under field conditions is presented. The influence of agroecological region, the Citrus species and weather conditions on abamectin, spinosad, imidacloprid and difenoconazole dissipation rate on fruits were evaluated. A validated ethyl acetate method coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry allowed the determination of pesticide residues having recoveries of 72–115%, relative standard deviations $\leq 16\%$ and quantification limits below the international Maximum Residue Levels (MRLs). After 35–40 days from pesticides spraying, all residues were below the international required MRL. For each citrus species, the influence of the agroecological region on the pesticide dissipation was assessed. Film-protected fruits against direct radiation and rain showed higher residue levels of imidacloprid and spinosad than the non-protected ones. Either for orange or mandarin, abamectin residues were detectable only at the first day after application. These findings provide useful information to state safer pre harvest intervals and to ensure food safety and compliance with good agricultural practices.

1. Introduction

As pesticide residues and their metabolites with toxicological re-levance remain on food after application, residues level control is crucial to assure food safety. It is well known that even at trace levels they can be harmful for human health (Chen et al., 2015). As a consequence, international regulations are becoming more restrictive, and the Maximum Residue Levels (MRLs) of pesticides are periodically reviewed and updated. For this reason, Good Agricultural Practices (GAP) must be adapted accordingly. A key factor for GAP compliance is the study of the pesticide's dissipation rates to establish safe pre-harvest intervals (PHI), giving rise to efficient pest management strategies for ensuring wellness to consumers. The PHI is the time required after the last

application of the targeted pesticide to dissipate to a safe level, below the MRL (Dong et al., 2018). Establishing correct PHIs will ensure the adjustment of produce to the food safety regulations and as a consequence, the protection of consumers' health in an overall framework of GAP accomplishment. Therefore, for fixing MRLs, PHI determination is required, which it is performed through the kinetics of pesticides dissipation. These curves permit to accurately predict if the pesticide level is below the MRL at harvest time (Karmakar and Kulshrestha, 2009). Kinetics of pesticide decay from treated crops greatly depends on various factors such as: mode of action, type of formulation and application technology, among others (Rahman et al., 2015). Factors affecting the dissipation rate belongs mostly to environmental conditions: temperature, wind, sunlight and rain exposure; those factors

Abbreviations: C, Covered treatment; GAP, Good Agricultural Practice; GC–MS, Gas Chromatography–Mass Spectrometry; HRMS, High Resolution Mass Spectrometry; LC, Liquid Chromatography; LC–MS/MS, Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry; LOQ, Limit of Quantitation; ME, Matrix Effect; MRL, Maximum Residue Level; MS, Mass Spectrometry; PHI, Pre-harvest Interval; UC, Uncovered treatment; UV, Ultraviolet

Corresponding author at: Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay.

E-mail address: heinzen@fq.edu.uy (H. Heinzen).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.053>

Table 1

Pesticide name, class, chemical family, Codex Alimentarius and EU Maximum Residue Levels (MRL) for each analyte in the studied matrices: orange and mandarin.

Pesticide	Chemical family	Class	Codex Alimentarius MRL (mg/kg)	EU MRL (mg/kg)
Abamectin: avermectin B1 ^a + avermectin B1b	Avermectin	Insecticide	0.02 ^a	0.015 ^b /0.04 ^c
Difenoconazole	Triazole	Fungicide	0.6	0.1/0.6
Imidacloprid	Neonicotinoid	Insecticide	1	1
Spinosad: spinosyn A + spinosyn D	Spinosyn	Insecticide	0.3 ^d	0.3 ^d

^b Residue definition for plant commodities: "Avermectin B1a".

^c Residue definition: "sum of avermectin B1a, avermectin B1b and delta-8,9 isomer of avermectin B1a, expressed as avermectin B1a". EU 2015/2075.

^d Residue definition: "sum of avermectin B1a, avermectin B1b and delta-8,9 isomer of avermectin B1a, expressed as avermectin B1a". EU 2018/1514.

^e Residue definition for plant and animal commodities: "sum of spinosyn A and spinosyn D".

varies through each geographical region where the plantation is located (Navarro et al., 2001).

Citrus is cultivated throughout the world and is one of the major fruit class consumed in daily life (Wang et al., 2013). Citrus crop is highly traded all over the world (FAO, 2017). Several studies have investigated the dissipation of the most applied pesticides on citrus production under field conditions (Chen et al., 2015; Singh et al., 2017; Sun et al., 2016). Some reports involve the study of dissipation patterns of insecticides such as imidacloprid in lemon (Phartiyal and Srivastava, 2014) or chlorpyrifos ethyl from different formulations applied in oranges (Montemurro et al., 2002). Also the dissipation behaviors of forchlorfenuron and spiroticlofen-pyridaben have been studied in citrus fruits in China (Chen et al., 2013; Sun et al., 2016). New active principles are introduced to the market continuously but the characteristics of their dissipation under the agro-climatic conditions of the country where they will be sold is seldom known.

In Uruguay, the citrus cultivation is conducted in the southern and northern regions of the country, located 50 and 400 km far away from the seaside, respectively. The southern region is the windiest with lower average temperatures compared to the north (Álvarez and De Souza Rocha, 2010).

Although the climatic conditions in Uruguay are particularly mild, the winter is generally humid, but frosts are common, with temperatures ranging from 5 to 15 °C. Whereas in summer, depending on the "El Niño" or "La Niña" climatic phenomena, it could be either dry and warm (average temperature around 30 °C, maximum temperature up to 45 °C) or even rainy, always with relatively high rates of UV radiation due to the reduced ozone layer in Southern South America (Álvarez and De Souza Rocha, 2010; Tiscornia et al., 2016). These climatic variations could affect pesticide dissipation rates at field conditions. Therefore, the particular environmental conditions of each geographical region force growers to know the life span of the pesticide residues on the fruit. As it has been largely demonstrated, PHIs recommended in other regions in the world do not always apply. The decline rate of a pesticide may vary between different geographical locations due to such factors as the weather, cultivation practices and soil conditions (FAO, 1997). Pesticides that remain on the surface of plant organs can disappear quite rapidly through various forms. On one hand, the influence of the climatic factors such as temperature, precipitation, radiation and wind, on pesticide breakdown is extremely complex, because not only most of the chemical, plant and soil factors can be affected, but they also could interact with each other. On the other hand, the rate of uptake of pesticides from soil is greatly influenced by the type of soil to which the pesticide is applied. Pesticides become readily absorbed on to soil particles, thus making the pesticide to persist much longer than it otherwise would, through processes such as physical adsorption, chemical adsorption (ion exchange or protonation), hydrogen bonding, and coordination, hampering the pesticide bioavailability to the plant (Edwards, 1975; Navarro et al., 2001).

Besides, the persistence of a particular pesticide depends greatly on the application technology. For example, at either end of the droplet scale of size, there is risk of loss of the pesticide, the larger droplets

tending to coalesce and run off from the leaves surface whereas the smaller ones could be lost because of wind and air movements. More concentrated ultra-low-volume applications tend to penetrate leaves more readily than greatly diluted water emulsions (Edwards, 1975).

An additional issue to be considered is the combined peculiarities of citrus fruits, and the lipophilic character of the applied pesticides. Citrus fruits are characterized by the presence of essential oils and waxes on their skin. The natural wax layer of a growing orange is secreted at a rate which is just sufficient to counterbalance growth in fruit surface area. However, when fruit growth slows down, wax accumulation proceeds apparently unhampered and wax coverage becomes thicker and prevent the weight losses during storage (Schulman and Monselise, 1970). Since most non-ionic organic pesticide are soluble in plant oils and waxes, they can penetrate to some extent into the cuticular and subcuticular tissues of the treated parts of plants, even if they are not truly systemic (Edwards, 1975). The pesticides can potentially penetrate through the wax into the essential oil glands and be held there and remain, protected from degradation, driving to pesticides higher half-life, forcing PHI adjustments. In such cases, the octanol/water partition coefficient (Kow) of the pesticides allows to infer its persistence on the fruit, which must be demonstrated experimentally anyway.

Uruguayan maximum residue limits (MRLs) in fruit and vegetables are those established by the Codex Alimentarius (FAO, 2018) and for those pesticides that do not have it fixed by the Codex Alimentarius, the MRLs or tolerances established by the European Community or the competent authority of the United States will be applied (MGAP, 2018; MSP, 1994, 2009) (see Table 1). However, the regulations of importing countries settle different MRLs for the same pesticides and this fact forces to adjust the PHI for each destination. Previously, our group studied the dissipation of 3 post-harvest fungicides currently employed in citrus production when stored at 4 °C, by means of an analytical procedure adjusted for the Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (GCeMS) determination of the re-sidues (Besil et al., 2016). As citrus fruits are complex matrices, that present strong matrix effects, the characterization of the main co-extractives that hamper pesticide determination was undertaken using HRMS (Besil et al., 2017). Continuing with our studies focused in the food safety and MRL compliance of Uruguayan citrus fruits, the aim of the present work was to establish whether the existing environmental conditions in the different geographic areas can affect pesticide decay and persistence. Moreover, the behavior or dissipation of multiclass insecticides (abamectin, imidacloprid and spinosad) and a fungicide (difenoconazole) in different citrus species is presented. The selection of these pesticides is based on the citrus pest management program during pre-harvest step in Uruguay.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and instrumentation

High purity reference standards of abamectin, spinosad, difenoco-nazole and imidacloprid were purchased from Dr. Ehrenstofer

(Augsburg, Germany) and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Individual pesticide stock solution in the range of 1000 to 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of concentration were prepared by dissolving reference standards in the appropriate solvent and stored in glass vials in the dark at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. A standard mix stock solution mixture (10 mg L^{-1}) was prepared in acetonitrile and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Acetonitrile (MeCN) obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and ethyl acetate (EtOAc) from Pharmco Products Inc. (Brookfield, CT, USA), both, of analytical grade, were used for chromatographic and extraction step throughout the work. NaCl and anhydrous MgSO_4 from J.T.Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA) were employed. An ultrasonic bath Wisd WUC-A03H from Daihan Scientific Co. Ltda. (Korea) and a SL16 centrifuge from Thermo IEC HN-SII (Langensfeld, Germany) were used. Analytical balances were SIMADZU TXB622 L, readability 0.01 g (Philippines) and SHIMADZU AUX220, readability, 0.1 mg (Philippines).

FACILY 18 EC emulsifiable concentrate [18 g L^{-1} of abamectin] and SPINGARD 35 F soluble concentrate [350 g L^{-1} imidacloprid] were purchased from Compañía Cibeles SA; TRACER I soluble concentrate [480 g L^{-1} of spynosad] from Rutilan SA and SCORE 250 EC emulsifiable concentrate [250 g L^{-1} of difenoconazol] from Syngenta. All were applied at the recommended doses in labels for field trials.

2.2. Field experiments

2.2.1. Field conditions and sampling

Field trials were conducted in adult and healthy trees of 'Nova' mandarin [(*Citrus reticulata* Blanco \times (*C. paradisi* Macf. \times *C. reticulata*)] and 'Navelina' orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) grafted onto *P. trifoliata* (L. Raf.) rootstock located at two locations. In order to assess the dissipation of pesticides, commercial formulations were sprayed separately with a backpack sprayer until reaching the drip point (approx.

$5\text{--}7\text{ L tree}^{-1}$). The label dose for each commercial pesticide was used: 20 mL of FACILY 18, 50 mL of SPINGARD 35 F, 20 mL of SCORE 250 EC and 20 mL of TRACER I per 100 litres of solution. Half of the treated fruits were immediately covered with red nylon caps to evaluate the incidence of weather conditions on pesticide residue levels. Treatments were named as uncovered (UC) and covered (C) trials. Each citrus experimental plot contains six trees in a single row. The application step was mimicking the GAPs employed for citrus export in Uruguay.

For pesticide residue analysis samples were taken at time zero and every 7 days until day 35 (6 temporal conditions) and transported to laboratory. Agrochemicals were applied near harvesting season. The moment for pesticide application was selected as the worst case scenario for the use of a plant protection agent, when residues could be at the highest levels, not having enough time to dissipate properly.

Sampling was performed following the Codex Alimentarius guidelines. Briefly, a total of 1 kg of fruits (approx 8–9 mandarins or 6–7 oranges) was randomly taken from the vertex and the middle part of the canopy of each treated citrus tree. Each analytical sample consists in fruits from two trees.

2.2.2. Climatic conditions and geographical areas

Sunlight and rain influence was tested. Caps were placed on the top of half of the fruits in each tree with a device specially designed for this purpose (see Fig. 1). Plastic red caps were used to cover the fruits individually, preventing fruits from sun radiations of the blue-violet and UV regions of the spectra. In this way, pesticide dissipation was studied for the two species in four possible scenarios. The trials were conducted at two geographical areas; in the southern region of the country ($34^{\circ}35'\text{ S}$; $56^{\circ}55'\text{ W}$ San José) and in the northern region ($31^{\circ}06'\text{ S}$; $57^{\circ}45'\text{ W}$ Salto). Weather conditions were monitored over the whole experiment periods, since the spraying day until harvest time, in both geographic areas. The average daily temperature (24 h) at north and south regions, were in ranges of $18.4\text{--}20.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $16.9\text{--}18.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. Average daily precipitations (effective amount of precipitation) ranged from 41.5 to 61.4 mm at north region and from 71.7 to 93.4 mm at south

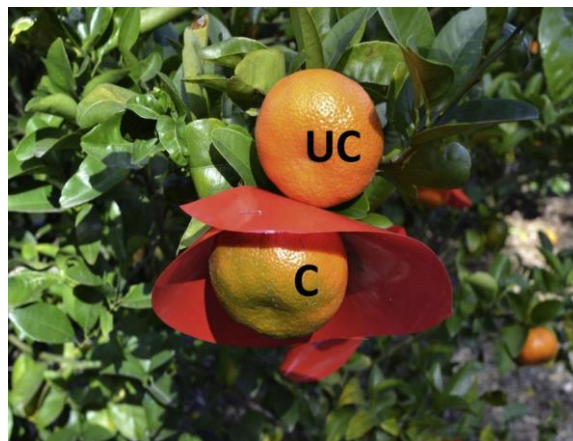


Fig. 1. Cover (C) and uncovered (UC) fruits during the experimental trials.

respectively.

2.3. Pesticide residues analysis

2.3.1. Sample preparation and LC–MS/MS analysis

Each selected fruit, from the whole sample, was cut into four pieces, two opposite ones were selected for analysis while the rest were discarded. The laboratory sample was then composed, homogenised and stored in individual polyethylene bags at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ until extraction. Pesticide residues were extracted for triplicate with EtOAc-based method and determined by LC–MS/MS system operating in MRM mode (Besil et al., 2016). Negative control samples were collected before pesticide application.

Briefly, 10 g of homogenized sample was weighed into a 50 mL Teflon centrifuge tube. EtOAc (10 mL) was added, and the tube was manually shaken for 1 min. Afterwards, 8 g anhydrous MgSO_4 and 1.5 g NaCl were added. The tube was shaken vigorously by hand for 1 min, placed in an ultrasonic bath for 15 min, and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. After phase separation, 2 mL of the organic phase was collected in a 4 mL flask. The extracts were concentrated to dryness under N_2 flow in a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath. The residue was dissolved in 1 mL of MeCN and then filtered through a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ membrane. The final extract obtained was injected in the LC–MS/MS using the conditions described below. Compound identification was confirmed by injection of matrix-matched standards and comparison of their retention times and MS spectra in accordance to DG-SANTE guidelines (DG-SANTE, 2015).

An Agilent Technologies 1200 Liquid Chromatograph (LC) system (Santa Clara, CA) coupled to a 4000 QTRAP® mass spectrometer from SCIEX (Concord, Canada) was used to perform the LC–MS/MS analysis. The chromatographic separation was performed on a ZORBAX Eclipse XDB-C18 ($150\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) column at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Two mobile phase gradients were applied for the analysis of a total of 7 analytes. For gradient 1, the mobile phase consisted of (A) water/ HCOOH 0.1% (v/v) and (B) MeCN. The elution program used started at 10% B where it was held for 3 min and increased to 100% B over 17 min where it was held for 5 min. After that, the percentage of B was decreased to 10% over 3 min and it was held during 5 min in this condition making a total of 33 min of run. On the other hand, the adduct $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ was formed with the mobile phase for the analysis of avermectin B_{1a} and B_{1b}. The composition of mobile phase was (C) 10 mM ammonium acetate and (E) MeOH. The LC gradient involved the following elution program: started with 50% of mobile phase C (1 min hold) which was then dropped to 0% in 3 min (2 min hold) then to 50% C in 4 min (2 min hold) for a total run time of 12 min. In both chromatographic conditions, injection volume was $5\text{ }\mu\text{L}$ and flow rate was settled at 0.6 mL min^{-1} .

The pesticide detection was performed using the multiple reaction

monitoring (MRM) mode. The optimal MRM transitions, collision en-ergies (CE) and declustering potentials (DP) for each studied compound were determined infusing with a syringe directly the standard solutions (0.2 mg L^{-1} in MeCN:H₂O 0.1% (v/v) of formic acid or MeOH:H₂O 10 mM ammonium acetate) to the instrument at a constant flow and are listed in supplementary material. In all cases, electrospray in positive mode was applied (ESI+). The ionization voltage was 5000 V and source temperature was 500 °C. Nitrogen was used as curtain gas at 20 psi and the nebulizer gas was air at 50 psi. To acquire and to process the data obtained Analyst software version 1.5.1 from AB SCIEX was applied.

2.3.2. Method validation

To ensure that the method is fit for purpose for the determination of the pesticides under study in orange and mandarin; trueness, precision, quantification limit (LOQ), linearity and matrix effects (ME) were evaluated for each analyte. The percentages of recoveries were assessed at 0.01, 0.05 and 0.2 mg kg^{-1} and each level was designed with five replicates ($n = 5$). The LOQs, defined as the lower concentration level meeting the method performance criteria of trueness and precision for each analyte were determined. Linearity in solvent and matrix were also evaluated by calibration curves and matrix effects were calculated. For linearity verification, a residuals value lower than 20% is settled by the SANTE guide as criteria (DG-SANTE, 2015).

2.4. Dissipation model

Dissipation of the pesticides over time after the application is de-scribed according to a first-order kinetics model (Montemurro et al., 2002; Sabale et al., 2014) as follow:

$$C_t = C_o \cdot e^{-kt} \quad (1)$$

In equation, C_t is the pesticide concentration (in $\mu\text{g kg}^{-1}$) at time t intervals (days) where C_o is the initial concentration of the pesticide at time 0 after application. The symbol k is the dissipation rate constant (days^{-1}).

The half-life value was determined as follow:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2)$$

2.5. Statistical analysis

Microsoft Excel Data Analysis tool was used for the statistical treatment. F-test of the equality of two variances and Student-test at the contrasted level of probability ($\alpha = 0.05$) were applied.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

The method showed good linearity for all analytes from 0.010 to 0.075 mg kg^{-1} with residuals lower than 20%, in both matrices. The average recovery (%) and relative standard deviation (%) of each pesticide in mandarin and orange sample are shown in Table 2 meeting the criteria of SANTE guide (DG-SANTE, 2015). The LOQ for all analytes in both matrices were 0.01 mg kg^{-1} . These values are significantly lower than the established MRLs by the European Union and Codex Alimentarius (see Table 1). Matrix effects (ME) were determined for each combination pesticide- orange or mandarin. In this work, the overall effect was studied by comparing the slopes of the calibration curves in matrix and solvent. In order to minimize the ME, linearity was studied by external matrix-matched standard calibration. As consequence of the presence of ME the correct quantitative analysis of the pesticides at trace levels can be seriously compromised (Besil et al., 2017). As expected, the predominant ME observed was medium suppression, but

these pesticides when analyzed through HRAMS suffered of little if any matrix effects with the exception of imidacloprid. This fact proves the large influence the type of mass analyzer has in the matrix effects and therefore in the analyte determination. The more accurate mass de-termination, the lower the matrix effects.

3.2. Pesticide residues

3.2.1. Remaining residues on uncovered and covered treatments

The evolution in the levels of the residues for the five pesticides on orange and mandarin was studied. The relative standard deviations for the concentration of the collected samples in the three replicates were below 20%. Initial and final remaining residue for UC and C trials for both fruits are presented in Table 3. As seen, there are significant differences of initial remaining residues between citrus species (Student t ($\alpha = 0.05$)). Moreover, significance is observed for climate as well as spraying of the active matter. The differences in the initial residue concentration on orange versus mandarin can be assigned to two aspects: from one point of view, plants differ greatly in habit, size and morphological features. Those structural features that influence the distribution, retention and uptake of pesticides have been listed as: plant form, leaf/fruit shape, leaf/fruit position and density and leaf/ fruit surface and margins (Edwards, 1975). From the other side, during pesticide spraying, the application is made to drip point, which, given the difference of volume between the crown of an orange (approx. 7 L per tree) and a mandarin tree (approx. 5 L per tree), causes differential consumption and deposition of pesticide formulation.

Particularly, difenoconazole initial concentration residue in mandarin for both geographical areas was above the previous established MRL value: 0.1 mg kg^{-1} (European Commission, 2005, 2013). Difenoconazole MRL turn to a value of 0.6 mg kg^{-1} was settled since 2015 (European Commission, 2005, 2015) and therefore, our findings complain the MRL requirements for this fungicide. In the case of abamectin residues, the initial concentration in mandarin was above the EU and Codex Alimentarius MRL value. For orange (only at south area), the initial residue was above the EU MRL value (using as reference the settled value in 2011 (European Commission, 2005, 2011)). Nevertheless, for all the studied pesticides, the remaining residues at the end of the study (35 days) from both UC and C treatments were below their respective European and Codex Alimentarius MRLs values.

Imidacloprid initial residues were below its European and Codex MRLs. These results are in agreement with the report of Arora (Arora et al., 2008), where the residues of imidacloprid in whole mandarin were also below its MRL at time zero.

These findings suggest that weather conditions of the different geographical regions do not influence the final imidacloprid residue in UC fruits on mandarins but it does effect on orange (Table 3).

The significance between the different data from covered to uncover fruits from the same trees, (either orange or mandarins) was tested through a t-test ($\alpha = 0.05$). The final concentrations of imidacloprid differed between the two types of fruits and the geographical zone. The concentration obtained on covered treatments was higher than in un-covered ones. The same behavior was also observed for spinosad treatment on mandarins in the north area. Nevertheless, the opposite behavior was observed for difenoconazole in southern Uruguay. The concentration in the UC treatment was higher than in the C one. Although one of the main degradation mechanisms involved in pesticide dissipation are the photo-degradation reactions and C treatments are less exposed to radiation, in this region, where the average temperatures are lower, the coverage can generate microenvironments with higher humidity, favoring the development of the microbial flora responsible for the pesticide degradation

3.2.2. Dissipation curves and half-life for the studied pesticides

The concentration behavior could be described by first-order kinetics. The corresponding $t_{1/2}$ for each pesticide under study for the

Table 2

Percentage of recovery (Rec %), relative standard deviation (RSD%) at 10 and 100 µg kg⁻¹ concentration level for both citrus matrices and matrix effects percentage (ME%).

Orange	Orange					Mandarin				
	Concentration level (µg kg ⁻¹)					Concentration level (µg kg ⁻¹)				
	10		100			10		100		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	ME (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	ME (%)
Abamectin	114.6	7.1	78.6	4.6	34.1	101.7	12.4	110.4	14.4	24.8
Difenoconazole	86.6	5.1	87.1	5.3	29.8	71.8	8.0	88.7	7.4	8.6
Imidacloprid	86.6	8.1	99.2	3.9	-19.8	113.4	6.6	80.9	2.5	-63.5
Spinosad	76.7	10.2	74.1	4.1	-42.0	86.5	3.9	98.3	15.9	-55.1

Table 3

Initial and final residue concentration (µg kg⁻¹) on mandarin and orange, for both geographical areas and uncovered and covered treatments.

Pesticide	Orange 'Navelina'					
	North			South		
	Initial residue	UC final residue	C final residue	Initial residue	UC final residue	C final residue
	Concentration (µg kg ⁻¹)					
Abamectin	< LR	< LR	< LR	0.013	< LR	< LR
Difenoconazole	0.033	0.018	0.014	0.080	0.041	0.029
Imidacloprid	0.670	0.020	0.146	0.573	0.035	0.225
Spinosad	0.056	< LR	< LR	0.216	< LR	0.025

Pesticide	Mandarin 'Nova'					
	North			South		
	Initial residue	UC final residue	C final residue	Initial residue	UC final residue	C final residue
	Concentration (µg kg ⁻¹)					
Abamectin	0.024	< LR	< LR	0.024	< LR	< LR
Difenoconazole	0.120	0.016	< LR	0.122	< LR	0.021
Imidacloprid	0.580	0.127	0.198	0.365	0.122	0.200
Spinosad	0.155	0.030	0.140	0.058	< LR	0.027

Table 4

First-order kinetics model and estimated half-life (t_{1/2}) for each combination pesticide-citrus matrix in both geographical areas for uncovered treatments. Note: nd not determined.

Pesticide	Uncovered treatments							
	C = Co.e ^{-kt}				t _{1/2} (d)			
	Orange		Mandarin		Orange		Mandarin	
	South	North	South	North	South	North	South	North
Difenoconazole	0.0864e ^{-0.035t}	nd	0.1138e ^{-0.081t}	0.1116e ^{-0.052t}	19.8	nd	8.6	13.3
Imidacloprid	0.5523e ^{-0.071t}	0.6522e ^{-0.098t}	0.04829e ^{-0.037t}	0.5667e ^{-0.047t}	9.8	7.1	18.7	15.8
Spinosad	0.1630e ^{-0.164t}	0.1265e ^{-0.165t}	0.0723e ^{-0.093t}	0.1466e ^{-0.065t}	4.2	4.2	7.5	10.7

uncovered treatment was calculated and it is shown in Table 4. For abamectin, the $t_{1/2}$ was not determined since residues were found only at the zero day sampling. These results are consistent with those found by Pirsahab (Pirsahab et al., 2017), where in the case of apple, the samples did not contain any abamectin residue ($LR = 2.2 \mu\text{g kg}^{-1}$) after pre-harvest treatment. The half-lives for the studied pesticides were different depending on the fruit analyzed. As a general rule, the dissipation rates on oranges were faster than in mandarins, with the exception of difenoconazole. The latter fact can be explained on the higher K_{ow} of the fungicide that allows to diffuse it into the wax layer towards the essential oil vesicles. It was also observed a lower fungicide dissipation rate over the insecticides. Also, despite the high similarities between cropping regions in Uruguay, the determined pesticides half-lives were different. For oranges, the rather colder and windy south

showed higher half-lives than the North region. In the case of mandarins, no conclusions can be inferred. For difenoconazole and spinosad, the half-lives were shorter in the north region while the opposite behavior was observed for imidacloprid.

The dissipation curve of difenoconazole in whole citrus fruits under field conditions was shown in Fig. 2 for both Citrus species and geographical areas. A gradual and continuous decrease was observed for all pesticides.

The half-life of imidacloprid on orange was 7.1–9.8 d while on mandarin was 15.8–18.7 d. respectively. On the other hand, spinosad half-life in orange was 4.2 and on mandarin was 7.5–10.7 d. From our knowledge, no previous work on the dissipation of spinosad in citrus fruit is reported.

In spring onion and tomato under field conditions, the half-life of

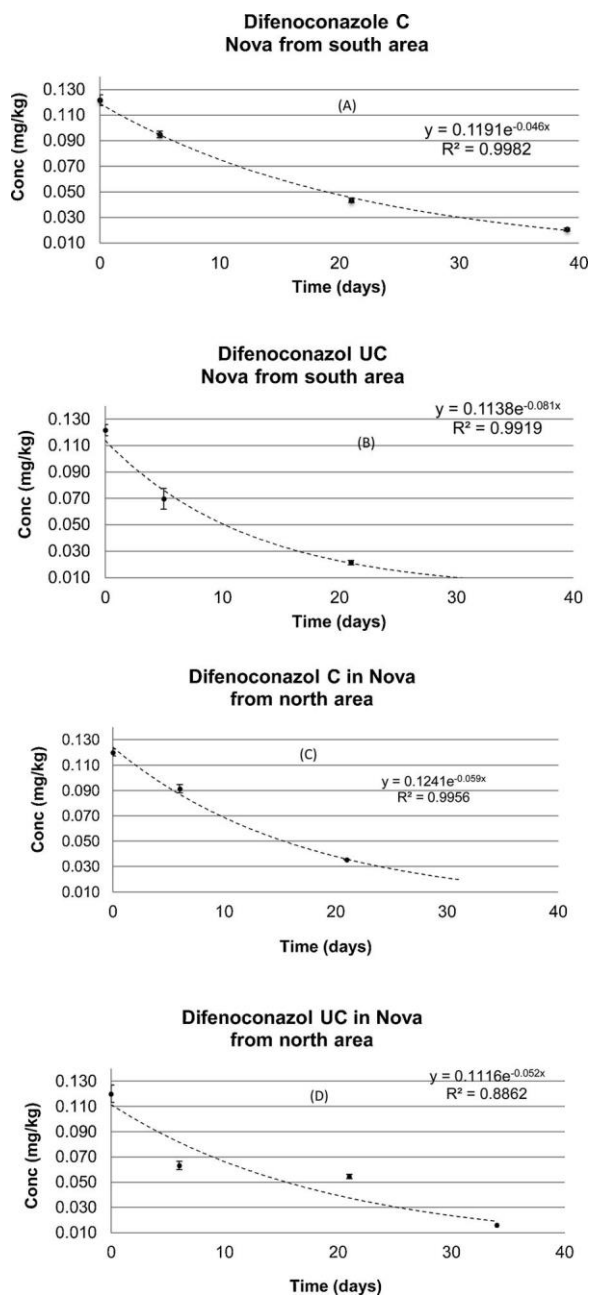


Fig. 2. Difenonazole dissipation curves of covered (A) and uncovered (B) mandarin treatment from south region. Difenonazole dissipation curves of covered (C) and uncovered (D) orange treatment from north region.

spinosad is 1.2 and 3.18–3.74 d (Adak and Mukherjee, 2016; Dasenaki et al., 2016). In all cases, the $t_{1/2}$ is short, and it could be explained because this insecticide is easily degraded under ultraviolet light irradiation (e.g. solar) (Yang and Song, 2007). The biological derived insecticides were the fastest to be dissipated in this study. These compounds evidence reduced risk of MRLs exceedance. However, their protection window time was limited. These pesticides are ideal to be employed in integrated management programs where the evolution of plague populations is closely followed. A continuous application of these chemicals is not advised in order to inhibit the development of pesticide resistance.

In all cases, there is no reason to determine a specific PHI as the initial pesticide residues levels were below the respectively established European and Codex Alimentarius MRLs. Nevertheless, caution has to be taken if the rate of application or a sudden plague breaks out forces the

application of fungicides near harvest.

4. Conclusions

The validated method was successfully applied for the analysis of abamectin, difenoconazol, imidacloprid and spinosad residues in Navelina oranges and Nova mandarins. The dissipation of the selected insecticides and fungicide in mandarins and oranges under field condition was investigated. The dissipation of residues followed first order kinetics. The half-lives of the pesticides under different geographical and field conditions were established. They were different according to the fruit studied. As a rule, pesticides dissipated faster over oranges than on mandarins. The biologically derived insecticides spinosad and abamectin showed the fastest dissipation rate. These compounds evidence reduced risk of MRLs exceedance. However, the protection window they give is not a long one. In such cases, if the possibility of performing closer application rates to protect the fruit against insect attack is considered, the risk of developing pesticide resistance has to be evaluated. It is suggested to apply these pesticides following a closer inspection of plague populations to achieve the best control and to minimize the probability of developing pesticide resistance.

The environmental conditions affected pesticide dissipation. Protection of the fruit with plastic films slowed down pesticide degradation. In pure field conditions, over the uncovered fruits, the pesticides dissipated differentially according to the cropping region. The combination of temperature/ radiation seems to influence the most in contact pesticides disappearance whereas for a systemic insecticide such as imidacloprid, the lower temperatures, that causes lower tree metabolism, also enlarges pesticide half-life.

Sometimes, farmers applied fungicides preventively, when humid weather conditions develop, and the risk of fungal attack rises, no matter how close they are prior to harvest. Care should be taken as the fungicide showed a relatively large half-life, in cases of massive applications. Nevertheless, the results obtained ensure food safety and compliance with good agricultural practices. This work provides a guide for the safe and reasonable use of these pesticides in citrus cropping under the described conditions.

Funding sources

Financial support from Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay, (L2_12_1_VI_CT_GT4_7639 project). N. Besil is grateful to Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay, for her scholarship POS_NAC_2012_1_9348.

Acknowledgements

The authors are grateful to Agr. Eng. Pablo Varela and Pablo Zoccalo for their generous contributions to this study.

References

- Adak, T., Mukherjee, I., 2016. Dissipation kinetics of spinosad from tomato under sub-tropical agro-climatic conditions. *Environ. Monit. Assess.* 188.
- Álvarez, W., De Souza Rocha, R., 2010. El clima en Uruguay, Material complementario. Geografía. Santillana. 3 ed. http://www.santillana.com.uy/descargas/Geografia_3_fichas_tematicas/Ficha_2.pdf.
- Arora, K., Jyot, G., Randhawa, P., Battu, R., 2008. Dissipation of imidacloprid on Kinnow mandarin fruits under sub-tropical conditions. *Indian J. Hortic.* 65, 277–279.
- Besil, N., Pérez-Parada, A., Cesio, V., Varela, P., Rivas, F., Heinzen, H., 2016. Degradation of imazalil, orthophenylphenol and pyrimethanil in Clementine mandarins under conventional postharvest industrial conditions at 4 °C. *Food Chem.* 194, 1132–1137.
- Besil, N., Cesio, V., Heinzen, H., Fernandez-Alba, A.R., 2017. Matrix effects and interferences of different citrus fruit coextractives in pesticide residue analysis using ul-trahigh-performance liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 65, 4819–4829.
- Chen, W., Jiao, B., Su, X., Zhao, Q., Qin, D., Wang, C., 2013. Dissipation and residue of forchlorfenuron in citrus fruits. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 756–760.
- Chen, W., Jiao, B., Su, X., Zhao, Q., Sun, D., 2015. Dissipation and Residue of 2,4-d in Citrus under Field Condition. *Environmental Monitoring and Assessment*, pp. 187.

- Dasenaki, M.E., Bletsou, A.A., Hanafi, A.H., Thomaidis, N.S., 2016. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for the determination of spinosad, thiacloprid and pyridalyl in spring onions and estimation of their pre-harvest interval values. *Food Chem.* 213, 395–401.
- DG-SANTE, 2015. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. Document SANTE/11945/2015. European Commission.
- Dong, M., Wen, G., Tang, H., Wang, T., Zhao, Z., Song, W., Wang, W., Zhao, L., 2018. Dissipation and safety evaluation of novaluron, pyriproxyfen, thiacloprid and tol-fenpyrad residues in the citrus-field ecosystem. *Food Chem.* 269, 136–141.
- Edwards, C., 1975. Factors that can affect the persistence of pesticides in plants and soils. *Pure Appl. Chem.* 42, 39–56.
- European Commission, 2005. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Off. J. Eur. Union*. full In force document at <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32005R0396> Consulted 31/12/2018.
- European Commission, 2011. Commission Regulation (EU) No 508/2011 of 24 May 2011 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for abamectin, acetamiprid, cyprodinil, difenoconazole, dimethomorph, fenhexamid, proquinazid, prothioconazole, pyraclostrobin, spirotetramat, thiacloprid, thiamethoxam and tri-floxystrobin in or on certain products. *Off. J. Eur. Union* Consulted 31/12/2018. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/508/oj>.
- European Commission, 2013. Commission Regulation (EU) No 34/2013 of 16 January 2013 amending Annexes II, III and IV to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for 2-phenylphenol, ametoctradin, Aureobasidium pullulans strains DSM 14940 and DSM 14941, cyproconazole, difenoconazole, dithiocarbamates, folpet, propamocarb, spi-nosad, spirodiclofen, tebufenpyrad and tetraconazole in or on certain products. *Off. J. Eur. Union* Consulted 31/12/2018. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2013/34/oj>.
- European Commission, 2015. Commission Regulation (EU) No 2015/845 of 27 May 2015 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for azoxystrobin, chlorantraniliprole, cyantraniliprole, dicamba, difenoconazole, fenpyroximate, flu-dioxonil, glufosinate-ammonium, imazapic, imazapyr, indoxacarb, isoxaflutole, mandipropamid, penthiopyrad, propiconazole, pyrimethanil, spirotetramat and tri-nexapac in or on certain products. *Off. J. Eur. Union* Consulted 31/12/2018. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2015/845/oj>.
- FAO, 1997. Estimation of residue levels for calculation of dietary intake of pesticide re-sidues. *FAO Manual on the Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed*. pp. 79–122.
- FAO, 2017. Citrus Fruit - Fresh and Processed. Statistical Bulletin 2016. Rome.
- FAO, 2018. Codex Alimentarius. LMR de plaguicidas. FAO. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/pesticide-detail/es/?p_id=177.
- Karmakar, R., Kulshrestha, G., 2009. Persistence, metabolism and safety evaluation of thiamethoxam in tomato crop. *Pest Manag. Sci.* 65, 931–937.
- MGAP, 2018. Resolución n° 75/018. In: Agrícolas, D.G.S. (Ed.), Montevideo, Uruguay.
- Montemurro, N., Grieco, F., Lacertosa, G., Visconti, A., 2002. Chlorpyrifos decline curves and residue levels from different commercial formulations applied to oranges. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5975–5980.
- MSP, 1994. Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto 315/994, 3er edition. IMPO, Montevideo, Uruguay, pp. 464.
- MSP, 2009. Decreto N° 285/009. Ministerio de Salud Pública. Montevideo, Uruguay. Navarro, S., Oliva, J., Navarro, G., Barba, A., 2001. Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 35–40.
- Phartiyal, T., Srivastava, R.M., 2014. Dissipation of imidacloprid on lemon fruit rind under tarai agro-climatic condition of Uttarakhand. *J. Entomol. Res.* 38, 285–288.
- Pirsaheb, M., Fattahi, N., Rahimi, R., Sharafi, K., Ghaffari, H.R., 2017. Evaluation of abamectin, diazinon and chlorpyrifos pesticide residues in apple product of Mahabad region gardens: iran in 2014. *Food Chem.* 231, 148–155.
- Rahman, M.M., Farha, W., Abd El-Aty, A.M., Kabir, M.H., Im, S.J., Jung, D.I., Choi, J.H., Kim, S.W., Son, Y.W., Kwon, C.H., Shin, H.C., Shim, J.H., 2015. Dynamic behaviour and residual pattern of thiamethoxam and its metabolite clothianidin in Swiss chard using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 174, 248–255.
- Sabale, R., Shabeer, T.P.A., Utture, S.C., Banerjee, K., Jadhav, M.R., Oulkar, D.P., Adsule, P.G., Deshmukh, M.B., 2014. Dissipation kinetics, safety evaluation, and assessment of pre-harvest interval (PHI) and processing factor for kresoxim methyl residues in grape. *Environ. Monit. Assess.* 186, 2369–2374.
- Schulman, Y., Monselise, S.P., 1970. Some studies on the cuticular wax of Citrus fruits. *J. Hortic. Sci.* 45, 471–478.
- Singh, N., Bisht, S., Yadav, G., Kamari, B., 2017. Dissipation of imidacloprid on sweet orange fruits. *Int. J. Chem. Stud.* 5, 683–686.
- Sun, D., Zhu, Y., Pang, J., Zhou, Z., Jiao, B., 2016. Residue level, persistence and safety of spirodiclofen-pyridaben mixture in citrus fruits. *Food Chem.* 194, 805–810.
- Tiscornia, G., Cal, A., Giménez, A., 2016. Análisis y caracterización de la variabilidad climática en algunas regiones de Uruguay. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 42, 66–71.
- Wang, C., Qiu, L., Zhao, H., Wang, K., Zhang, H., 2013. Dissipation dynamic and residue distribution of flusilazole in mandarin. *Environ. Monit. Assess.* 185, 9169–9176.
- Yang, C.D., Song, L.H., 2007. Analyses of spinosad and its degradates from light irradiation. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chem. J. Chin. Univ.* 28, 2056–2059.

**ANEXO IV: Dissipation of Pre-Harvest
Pesticides on ‘Clementine’ Mandarins
after Open Field Application, and Their
Persistence When Stored under
Conventional Postharvest Conditions**



Dissipation of Pre-Harvest Pesticides on ‘Clementine’ Mandarins after Open Field Application, and Their Persistence When Stored under Conventional Postharvest Conditions

Natalia Besil ¹, Verónica Cesio ², Eleana Luque ³, Pedro Pintos ³, Fernando Rivas ³ and Horacio Heinzen ^{2,*}

¹ Grupo de Análisis de Contaminantes Trazas (GACT), Departamento de Química del Litoral, Facultad de Química, CENUR Litoral Norte, UdelAR, Paysandú 60000, Uruguay; nbesil@fq.edu.uy

² Grupo de Análisis de Contaminantes Trazas (GACT), Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelAR, Montevideo 11800, Uruguay; cs@fq.edu.uy

³ Programa Nacional de Investigación Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA, Estación Experimental Salto Grande, Camino al Terrible s/n, Salto 50000, Uruguay; eluque@sg.inia.org.uy (E.L.); ppintos@sg.inia.org.uy (P.P.); cfrivas@sg.inia.org.uy (F.R.)

* Correspondence: heinzen@fq.edu.uy; Tel.: +598-2924-4068

Received: 13 October 2018; Accepted: 12 December 2018; Published: 18 December 2018



Abstract: The dissipation of field-applied difenoconazole, imidacloprid, pyraclostrobin and spinosad on Clementine mandarins (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) under controlled conditions throughout the citrus production chain was assessed. At harvest, 42 days after application, the dissipation of these pesticides were 80, 92, and 48% for difenoconazole, imidacloprid, pyraclostrobin, respectively, and spinosad was below the level of detectability. At day 28 after application, spinosad was no longer detected. The model equations that best describe the dissipation curves of these pesticides on Clementine mandarins showed different patterns. Their half-life on Clementine, calculated by the best-fitted experimental data, were 19.2 day (1st-order model) for difenoconazole, 4.1 day (Root Factor (RF) 1st-order model) for imidacloprid, 39.8 day (2nd-order model) for pyraclostrobin and 5.8 day (1st-order model) for spinosad. These results are the first record of pyraclostrobin persistence on mandarins, showing a longer half-life in this matrix than those reported for any other fruit. The treated fruit were harvested and submitted to the usual postharvest treatments: first, a hypochlorite drenching was performed; as a second step, imazalil and wax were applied, and then the mandarins were stored at 4 °C. After 32 days, cold storage caused no significant effects on the residue levels of the four pesticides compared with those determined on freshly harvested mandarins. All residues were below their Codex and European Union (EU) maximum residue limit (MRL) for mandarin since the spray application day.

Keywords: pesticide residues; degradation dynamic; citrus; LC-MS/MS

Introduction

Citrus fruit are among the most widely produced and popular fruit in the world [1,2], due to their well-known health-promoting properties, their unique flavor, and versatility for combining with other ingredients to develop new foods. Citrus trees are very productive, and a normal 10 year old mandarin tree can produce 150–180 kg of fresh fruit. This productive capacity of citrus sustains the citrus fruit international business. The fresh fruit has a long half-life, which can be extended with cold

storage, and the fruit can be sold overseas. Citrus are Uruguay's main fresh fruit export with sales in the international market as high as 110,000 tons per year. Orange, mandarin, and lemon represent 52, 34, and 14%, respectively, of the total fresh fruit volume exported, with Clementine the main mandarin cultivar exported [3]. Nevertheless, citrus plants are vulnerable to insects and fungal attack during the pre- and postharvest steps. In the field during the cropping season, citrus fruit are susceptible to insects such as *Phyllocnistis citrella* (citrus leafminer), the fruit fly, or fungi such as *Alternaria* spp. and *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot), which cause serious diseases that jeopardize overall productivity [4–6]. However, after harvest, the main citrus pest is green mold, *Penicillium digitatum*, which grows on the fruit even during cold storage [7,8].

To enhance productivity and protect the crop against plagues and pests, different pesticides are currently applied at different stages of the production chain. In the field, when the fruit is still developing, fungicides and insecticides from different chemical families are applied. Among the fungicides, the most widely employed are the phthalimides captan and folpet, benzimidazoles such as carbendazim, and tebuconazole, an inhibitor of ergosterol biosynthesis. The insecticides currently applied are chlorpyrifos, an organophosphate, and neonicotinoids such as imidacloprid or the chitin biosynthesis inhibitor buprofezin [9]. Pesticide residues and their persistence on or in food are an important and well-known concern for human health and environmental safety. When a pesticide is applied, it not only reaches the target but also reaches other organisms in the ecosystem. Pesticides dissipate within the environment after application. The processes of pesticide dissipation are complex and depend on their physicochemical properties, but also in their degradability by biotic and abiotic process [10,11]. After the banning of the most persistent organochlorines, efforts have been made to ensure the degradability and minimal bioaccumulation of newer pesticides. Once their protective action is accomplished, they should dissipate. As there could be more than one mechanism acting on pesticide dissipation, it is generally assumed that the kinetics of these processes follows a pseudo 1st-order equation that depends solely on the concentration of the compound under study. This assumption allows the determination of the half-life (time needed to reduce the concentration of the pesticide in the matrix under study to 50%), an important parameter that is used to establish the pre-harvest interval as well as the adjustment to accomplish the legal MRLs to ensure safe consumption [12]. A key issue for establishing accurate and safe pre-harvest intervals is to realize that pesticide dissipation depends not only on the chemical properties of the compound but also on the environmental conditions that rules their behavior. Temperature, moisture, rain, sunlight, and biota are the main parameters responsible for pesticide dissipation and they change from one region to another [11]. Many studies have reported the presence of imidacloprid [13,14], pyraclostrobin [15], and difenoconazole in oranges [16]. It is clearly established that the dissipation behavior of these compounds under field conditions depends on diverse factors, including plant species, chemical formulation, application method, weather conditions, and crop growth characteristics [17–19].

An extensive database of pesticide dissipation is available on the web. Lewis et al. [20] developed a dataset of pesticide dissipation rates in/on various plant matrices for the Pesticide Properties Database (PPDB). The influence of the specific part of the plant is highlighted, the leaves being the part that showed the greatest variations in the pesticide dissipation rates. A pesticide's mode of action plays a crucial role. Systemic pesticides suffer biotransformation and metabolism within the plant, but non-systemic ones can only be degraded by the epiphytic flora and the environmental conditions, which can change from one region to another and even from one cropping season to the next. The amount of epicuticular wax on the surface of the specific plant under study is also critical, and the amount depends on the water available to the plant. Water deficits trigger epicuticular wax biosynthesis, whereas epicuticular wax is thinner when the plant has good water supply. In addition, half-lives determined in greenhouses are different from those found in open field experiments. When the fruit are in greenhouses radiation is diminished, rainfall is nonexistent, while temperature can be controlled and, therefore, the pesticide half-life can change enormously [17,18]. Open field experiments are far more complicated to perform as the climatic conditions vary without any control, a situation

that is avoidable in experiments performed in greenhouses. Another source of variation of pesticide half-life is postharvest treatment. Produce washing, hypochlorite baths or cold storage may have specific influences on the persistence of pesticides within the commodity. It has been demonstrated that washing reduced the lipophilic pesticide amount in leafy vegetables, but the same treatment had little effect in fruit with relatively high amounts of wax or hairs on their surface, where the pesticides dissolve and the lipophilic pesticide amount remains unchanged for longer periods. In general, cold storage diminishes pesticide dissipation by minimizing the viable microbiological flora, the lack of radiation inside the chamber and for slowing down all the chemical reactions that cause pesticide degradation. Consequently, dissipation studies for a given fruit in the specific growing conditions of the cropping region are necessary to determine if the established pre-harvest time ensures that residue levels are below the maximum residue limit (MRL). Several authors have reported on pesticide residues and their dissipation in citrus fruit, including pesticides such as flusilazole [21], 2,4 D [22], spirotetramat [23], spirodiclofen-pyridaben [24], and insect growth regulators [25]. Nevertheless, little attention has been paid to the effect of postharvest treatments on the level of the remaining residues of the pesticides applied in the field. In the case of the citrus production chain, fruit are washed and sanitized, followed by postharvest fungicide and protecting wax applications. The purpose of waxing is to impart a shiny appearance to the fruit and to reduce weight loss by slowing down senescence during storage [26]. The fruit thus treated is stored at 4 °C for some weeks and often shipped overseas. As has been pointed out, the artificial wax is another factor that influences the dissipation of pesticides from the fruit.

Among the crop-protecting agents employed in citrus production, pyraclostrobin and difenoconazole, two broad spectrum fungicides for citrus *Alternaria* brown spot control and citrus black spot control [27,28] have been intensively applied. Difenoconazole belongs to the largest fungicide family: the triazoles. Difenoconazole acts by inhibition of the demethylation step at C-14 of lanosterol during ergosterol synthesis [29]. By contrast, pyraclostrobin is a strobilurin fungicide. Its mechanism of action is based on binding at the oxidation site of quinol (Qo) (or ubiquinol site) of cytochrome b in the mitochondria and, therefore, it stops the transfer of electrons causing the inhibition of cellular respiration [30]. These fungicides also are transported within the plant. Difenoconazole is a systemic fungicide that is absorbed and translocated in a plant, whereas the strobilurins are quasi-systemic, as they diffuse translaminarily within a leaf, but do not spread throughout an entire whole plant. The number of applications per season is 1 and 1–2 for difenoconazole and pyraclostrobin, respectively. Both are applied at a rate of 1600 L ha⁻¹ (20 mL 100 L⁻¹) with an atomizer to the crown. The insecticides imidacloprid and spinosad are commonly sprayed for citrus leafminer control [4]. Imidacloprid is a neonicotinoid insecticide that targets the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). The union of the insecticide to the receptor causes a hyper-excitation of the nervous system and the death of the insect [31]. This systemic insecticide is commonly applied by painting the trunk, by irrigation or by spraying with an atomizer to the crown. Imidacloprid is applied twice per season at a rate of 30–50 mL 100 L⁻¹ (irrigation or spray) or 1–3 mL tree⁻¹ (painting the trunk). Spinosad is a biological insecticide derived from the fermentation of the Actinomycete bacterium *Saccharopolyspora spinosa* [32], and is a natural mixture of spinosyn A and spinosyn D [33]. The mode of action of spinosad is over the nicotinic receptor, but the inhibition of the transmission of the nervous impulse does not occur at the nicotinic receptor itself. It also targets the Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) receptor at the ion channels. This efficient insecticide is allowed in organic production, giving organic farmers an important tool to protect their production within the rules. The number of spinosad applications per season is 1 or 2 at a rate of 200–300 L ha⁻¹ (15 cc L⁻¹). The insecticide is applied using an atomizer to the crown.

Even though the residues and dissipation patterns of difenoconazole, imidacloprid, pyraclostrobin, and spinosad have been determined for apple, cabbage, cucumber, grapes and tomato, there are few studies regarding their dissipation in citrus species. The dissipation of imidacloprid in lemon and

sweet orange was evaluated by Phartiyal et al. [34] and Singh et al., [35], but there are few records of the behavior of these four pesticides during mandarin pre-harvest field conditions.

The aims of this work were: (i) to evaluate the dissipation of difenoconazole, imidacloprid, pyraclostrobin and spinosad in Clementine fruit in field conditions; and (ii) to assess the influence of postharvest practices on the terminal residue levels of the four pesticides in whole fruit.

Materials and Methods

2.1. Reagents and Apparatus

Acetonitrile (MeCN) and ethyl acetate (EtOAc) of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) quality were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and Pharmco Products Inc. (Brookfield, CT, USA), respectively. A Thermo Scientific (Marietta, OH, USA) EASYpure RoDi Ultrapure water purification system was used to obtain deionized water. Formic acid (HCOOH) p.a. 88% was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride (NaCl) was obtained from Carlo Erba (Arese, Italy). Anhydrous magnesium sulfate ($MgSO_4$) was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

High purity reference standards (>98%) were purchased from Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany) and were stored at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Stock standard solutions at $2000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared by dissolving the standards in acetonitrile or ethyl acetate and stored in glass vials at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Working standard solutions were prepared by diluting the stock solutions with acetonitrile.

An ultrasonic bath Wisd WUC-A03H from Daihan Scientific Co. Ltd. (Seoul, Korea), a SL16 centrifuge from Thermo IEC HN-SII (Langensfeld, Germany), a vortex mixer Wisd VM 10 and a Turbovap[®] Biotage LV evaporator (Charlotte, NC, USA) were employed during the sample preparation step.

2.2. Field and Postharvest Experiment

The experiment was conducted with Clementine mandarin cv. 'Clemenules' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.), one of the most popular mandarins worldwide, a medium-sized, easy to peel mandarin, with a smooth and deep reddish orange rind color and parthenocarpic ability [36]. Pesticide applications were made to healthy adult trees of Clementine mandarin grafted onto *Citrus trifoliata* (L. Raf.) rootstock. The trial was conducted in Salto in the northern region of Uruguay at $31^{\circ}16'45.47''\text{S}$, $57^{\circ}53'52.15''\text{W}$ and an elevation of 41 m. The experimental plots contained six trees per pesticide in a single row, with a tree size of 9 m^3 in rows oriented N-NE; S-SW. The tree spacing was 2 m in the row and 5.5 m between rows. To assess the dissipation pattern of the selected agrochemicals, commercial formulations were sprayed separately with a Stihl SR450 backpack sprayer until reaching the drip point (approx. 6 L tree^{-1}). Each pesticide was applied around the tree. The formulations were applied using the same Good Agricultural Practices (GAPs) procedures employed in citrus production and at the recommended label rates. Table 1 shows the pesticide, active ingredients and rates used. The trials were initiated 42 d before harvest.

Table 1. Pesticides evaluated and rate per 100 L. European Union (EU) and Codex Alimentarius Maximum Residue Levels (MRL) for each analyte in mandarin. Vol: volume.

Commercial Formulation/Manufacturer	Active (g L ⁻¹)	Vol (cc)	EU MRL (mg kg ⁻¹)	Codex MRL (mg kg ⁻¹)
SCORE 250 EC/Syngenta	Difenoconazole 250	20	0.6	0.6
SPINGARD 35F/Compañía Cibeles SA	Imidacloprid 350	50	1	1
COMET/BASF	Pyraclostrobin 250	30	1	2
TRACER I/Rutilan SA	Spinosad 480	20	0.3 ^z	0.3 ^z

^z Spinosad residue definition for plant and animal commodities: sum of spinosyn A and spinosyn D.

Meteorological conditions from the spray date to fruit harvest were monitored. The daily temperature (24 h), precipitation (effective amount of precipitation), % relative humidity, and solar irradiation x relative Heliophany, under field conditions, were measured and are presented in Figure 1.

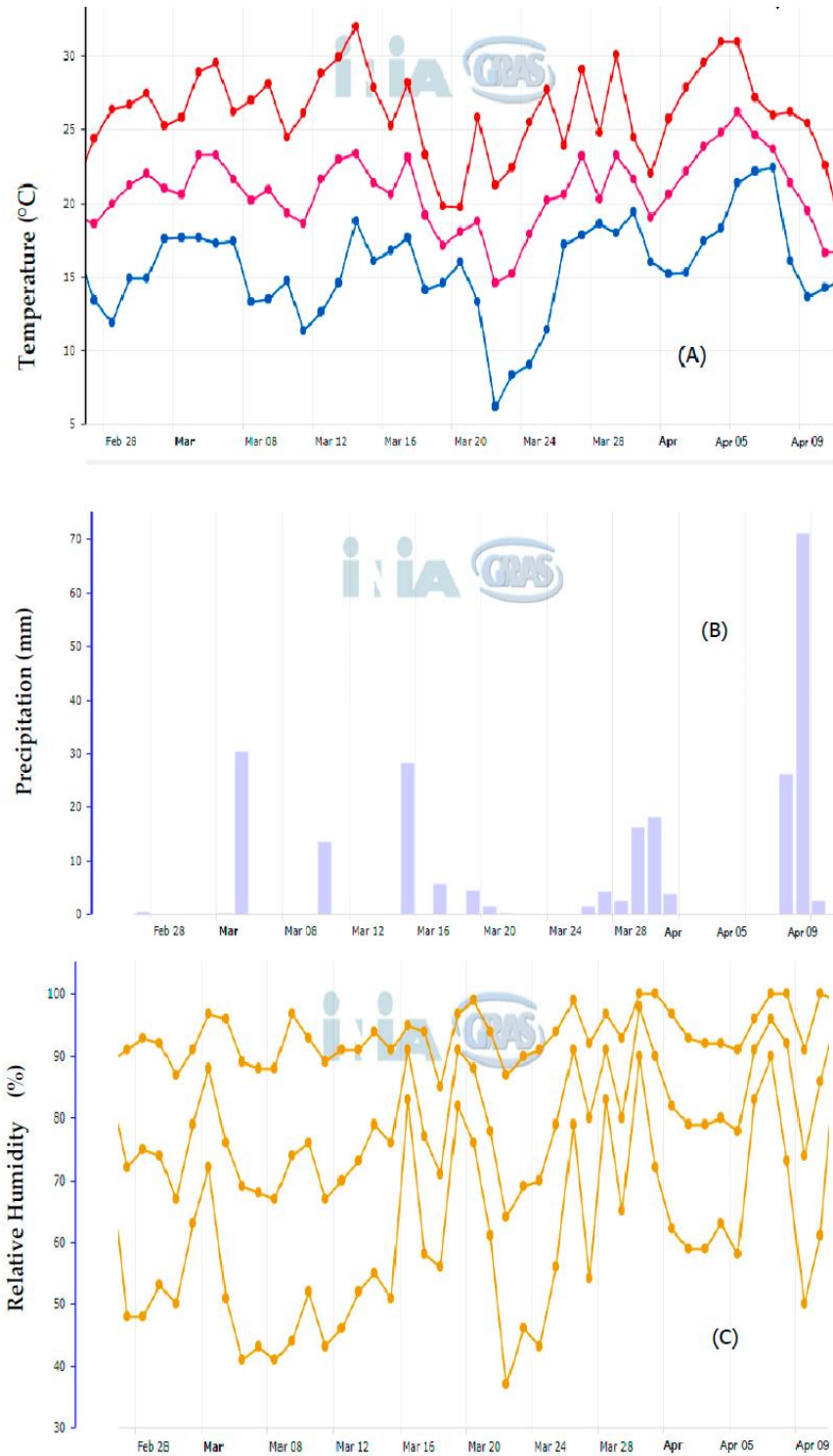


Figure 1. Cont.

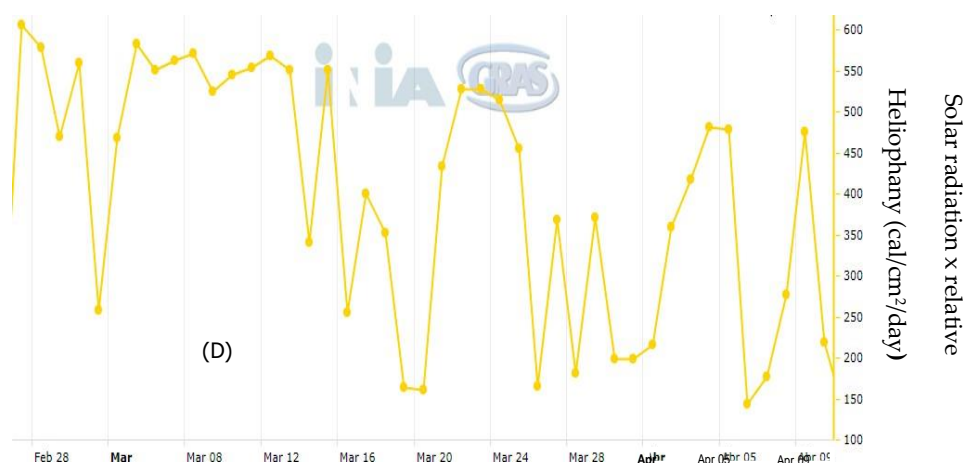


Figure 1. Maximum, average and minimum daily temperature (A), precipitation (B), relative humidity (C) and solar radiation x relative Heliofania (D).

After harvest, a postharvest treatment simulation was done in an experimental packing line at the National Agricultural Research Institute (INIA) (Salto, Uruguay). In the packing line, imazalil (FUNGAFLOR 75 PS, Janssen Pharmaceutica N.V.) at 1000 mg L^{-1} was applied in a cascade after hypochlorite sanitation and pre-drying steps. Then, a wax treatment (Brillaqua) was sprayed on the fruit. The treated fruit were air dried and stored for 32 day at $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ and a relative humidity of $96 \pm 1\%$ in an industrial cold chamber thus simulating the commercial conditions employed for citrus fruit that is exported (Figure 2). The relative humidity and temperature were controlled and recorded daily.



Figure 2. Packing-line pesticide application scheme (postharvest step).

2.3. Fruit Sampling

During sampling steps, a fruit blank was taken from untreated trees. From treated trees, sampling was performed following the Codex Alimentarius guidelines [37]. A total of 1 kg of fruit (approx. 9–10 fruit) was randomly taken by sampling from every part of the canopy (including the central part of the tree) from the six sprayed trees. The first sample was taken 1 h after pesticide application had dried and labelled as 0 day. Afterward, the fruit were collected randomly at 6, 21, 27 and 35 day after application of the pesticide and at normal harvest (42 day post spraying). Field samples were placed in polyethylene bags and transported on ice to the laboratory for analysis. Each fruit was cut into four pieces, with two opposite pieces selected for analysis. Each sample of two pieces was then homogenized and frozen ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$) in individual polyethylene bags until analysis.

During the postharvest step, treated fruit were placed in plastic boxes and kept in the cold chambers. The individual fruit sampled were weighed before and after the cold storage, and an averaged weight of the fruit was recorded. For the analytical measurement, 1 kg of fruit (approx. 9–10 units) was taken randomly from the boxes. Samples were taken before and after the packing-line simulation and 32 day after cold storage; thereafter they were analyzed as described previously.

2.4. LC-MS/MS Operating Conditions

An Agilent 1200 liquid chromatograph (LC), with quaternary pump, degasser and thermostated autosampler coupled to a triple quadrupole API 4000 (4000 Q-TRAP ABSCIEX) was used for LC-MS/MS analysis. A Zorbax Eclipse XDB-C18 column, 150 mm long, 4.6 mm i.d. and $5 \mu\text{m}$

particle size, was kept at $40 \text{ }^\circ\text{C}$ during the chromatographic analyses. Water/ HCOOH 0.1% (v/v) (A)

and acetonitrile (B) were employed as mobile phases at a flow of 0.6 mL min⁻¹. The operation of the LC gradient involved the following elution program: starting with 70% of component A, which was dropped to 0% in 12 min (3.5 min hold) then it rose back to 70% in 1.5 min (4 min hold) for a total run time of 21 min. 5 µL of each sample were injected.

MS/MS detection was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode using an electrospray ionization (ESI) interface in the positive ion mode. The optimal MRM transitions, declustering potentials (DP) and collision energies (CE) of each studied compound were determined by infusing the standard solutions directly into the Q-TRAP with a syringe at a constant flow. A retention time window of 90 s was set for each analyte.

2.5. Residue Analysis and Method Validation

Pesticide residues were determined thrice for each sample, using an in-house validated method [38] and quantified by LC-MS/MS operating in MRM mode. Briefly, 10 g of homogenized sample was weighed into a 50 mL Teflon centrifugal tube. EtOAc (10 mL) was added, and the tube was manually shaken for 1 min. Afterwards, 8 g anhydrous MgSO₄ and 1.5 g NaCl were added. The tube was shaken vigorously by hand for 1 min, placed in an ultrasonic bath for 15 min, and centrifuged for 10 min at 3000 rpm. After phase separation, 2 mL of the organic phase was collected in a 4 mL flask. The extracts were concentrated to dryness under a N₂ flow in a 40 °C water bath. The residue was dissolved in 1 mL of MeCN [39].

Prior to analyzing the tissue samples, mandarin blanks (free of pesticide) were fortified at levels of 0.010 and 0.100 mg kg⁻¹ by spiking a standard pesticide working solution in five replicate samples to determine recovery percentages. Precision was calculated as relative standard deviation (RSD) of the five replicates. An external matrix matching the standard method was used for quantification. The matrix effect (ME) was determined for each analyte as: (slope of calibration in matrix – slope of calibration in solvent)/slope of calibration in solvent. All figures of merit were determined.

2.6. Dissipation Models

The graphical representation of residue concentration decay over time is known as a pesticide dissipation curve. The residue data gathered from each sampling day and trial were averaged and a linear regression analysis of the data was performed following the procedure in [40]. This methodology allows the evaluation of different “model” equations which describe the dissipation of pesticide residues in agricultural products versus time.

For each pesticide, the experimental residue data was converted to achieve 1st-, 1.5th-, 2nd-order and 1st-order Root Factor (RF) model equations (Table 2). The transformed results were plotted versus time or versus root square time (RF model). The slope, intercept, and the coefficient of determination (R²) of each linear regression were calculated.

Table 2. Linearizing transformations for the regression equation $y = bx + a$.

Function	Transformation	
	For y (residue)	For x (time)
1 st order	logR	none
1.5 th order	1/√R	none
2 nd order	1/R	none
1 st order RF	logR	√t

RF: “root function”

The selection of the best fit function from the four possible functions was achieved by comparing the deviations of the experimental values from the back-transformed curve. A modified coefficient

of determination (r^2) and D quantity test were used for that purpose [41]. A test quantity D was calculated as:

$$D = |r| - t (t^2 + (df))^{-0.5} \quad (1)$$

where $|r|$ is the absolute value of the correlation coefficient (from transformed data) and t is the value of t , for $n-2$ (degree of freedom: df), of the Student- t distribution table at the contrasted level of probability ($\alpha = 0.05$). If the calculated D quantity test was greater than zero, the correlation was confirmed. If the modified r^2 became negative, the fit was automatically regarded as not assured [40].

2.7. Data Management and Statistical Analysis

Data analysis was performed with Biosystems Analyst 1.5 software. Microsoft Excel Data Analysis tool was used for the statistical treatment. Student-test at the contrasted level of probability ($\alpha = 0.05$) was applied.

Results and Discussion
Method Performance The main parameters including percentage of recovery, precision, linear calibration, limit of quantification (LOQ) and ME, were investigated according to the EU guidelines. The analytical method was developed to provide a rapid, accurate and efficient way to determine difenoconazole, imidacloprid, pyraclostrobin and spinosad residues in mandarins simultaneously. The results are listed in Table 3. The recovery percentages for the studied pesticides were within the Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed (SANTE) criteria (70–120%) [42].

Table 3. Percentage of recovery (Rec %), relative standard deviation (RSD %) at 10 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ concentration levels in mandarin and matrix effects percentage (ME %).

	Concentration level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				
	10		100		ME (%)
	Rec ¹ (%)	RSD (%)	Rec ¹ (%)	RSD (%)	
Difenoconazole	71.8	8.0	88.7	7.4	8.6
Imidacloprid	113.4	6.6	80.9	2.5	-63.5
Pyraclostrobin	72.1	2.1	100.0	2.2	7.2
Spinosad	86.5	3.9	98.3	15.9	-55.1

3.2

3.3 Dissipation Studied under Field Conditions

Best Fitting Model

The best-fitted model equations for the four pesticides under field conditions on Clementine with their corresponding r^2 and D are presented in Table 4. The models which best predicts the experimental data for spinosad and difenoconazole were 1st-order equations. Imidacloprid and pyraclostrobin experimental data were best fitted by RF 1st-order and 2nd-order models, respectively. Dissipation curves from experimental data and back-transformed best-fitted models for difenoconazole, imidacloprid, pyraclostrobin and spinosad treatments are presented in Figure 3.

3.4 Initial Residues, Dissipation Dynamics and Postharvest Storage

The pesticide residue dissipation in the fruit in the field was studied and the depletion of the active principles was assessed. Similarly, the pesticide residues after the postharvest treatment were

compared with those found at the end of cold storage. The fruit weight as well as the residue level of pyraclostrobin and difenoconazole remained unchanged after cold storage.

3.4.1 Difenconazole

The initial residue level of difenoconazole was $0.060 \pm 0.011 \text{ mg kg}^{-1}$, which was below the international settled MRL (see Table 1). Difenconazole dissipated 80% 42 day after spray application. No significant differences were observed between the concentrations before and after the postharvest steps (Student t-test, $\alpha = 0.05$) (Figure 4).

Table 4. The 1st, 1.5th, 2nd, and Root Factor (RF) 1st order model equations that describe the dissipation of difenoconazole, imidacloprid, pyraclostrobin and spinosad in Clementine mandarin. The Best fitting model for each pesticide are in bold font.

	Difenoconazole	Imidacloprid	Pyraclostrobin	Spinosad
1st order model				
Dissipation curve	$10^{-(-0.016t+1.140)}$	$10^{-(-0.022t+0.334)}$	$10^{-(-0.008t+0.591)}$	$10^{-(-0.052t+0.744)}$
r ²	0.857	0.883	0.890	0.987
D	0.198	0.197	0.124	0.003
1.5th order model				
Dissipation curve	$1/(0.116t+3.353)^2$	$1/(0.064t+1.312)^2$	$1/(0.021t+1.970)^2$	$1/(0.301t+2.011)^2$
r ²	0.509	0.951	0.906	0.871
D	0.167	0.178	0.137	<0
2nd order model				
Dissipation curve	$1/(1.491t+5.617)$	$1/(0.362t+0.421)$	$1/(0.096t+3.846)$	$1/(3.420t-1.062)$
r ²	<0	<0	0.918	<0
D	0.13	0.124	0.149	<0
R.F 1st order model				
Dissipation curve	$10^{-(-0.103\sqrt{t}+1.086)}$	$10^{-(-0.148\sqrt{t}+0.185)}$	$10^{-(-0.053\sqrt{t}+0.535)}$	$10^{-(-0.242\sqrt{t}+0.658)}$
r ²	0.598	0.962	0.893	0.963
D	0.108	0.198	0.147	<0

Figure 3. Dissipation curve for difenoconazole (A), imidacloprid (B), pyraclostrobin (C) and spinosad (D) in Clementine mandarin. -◇- Indicates experimental data. --- Indicates the back-transformed dissipation curve (the best fitted mathematical model: 1st order equation for A and D, R.F. 1st order equation for B and 2nd order for C)

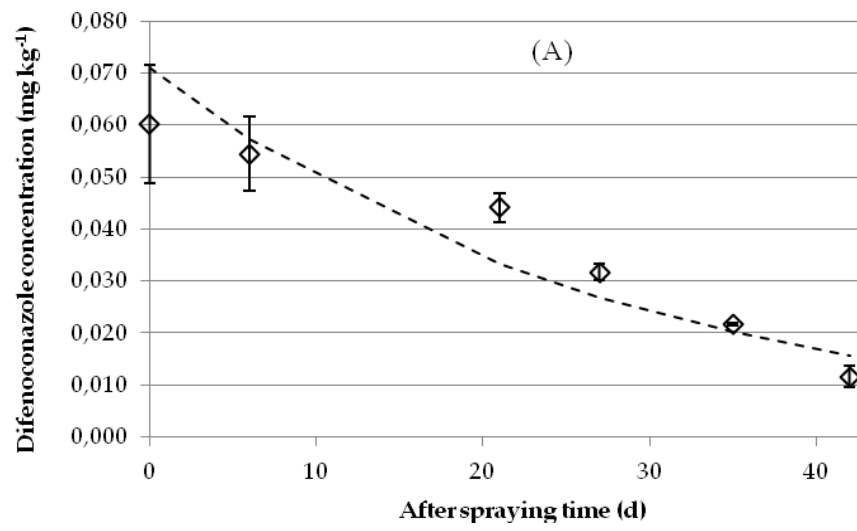
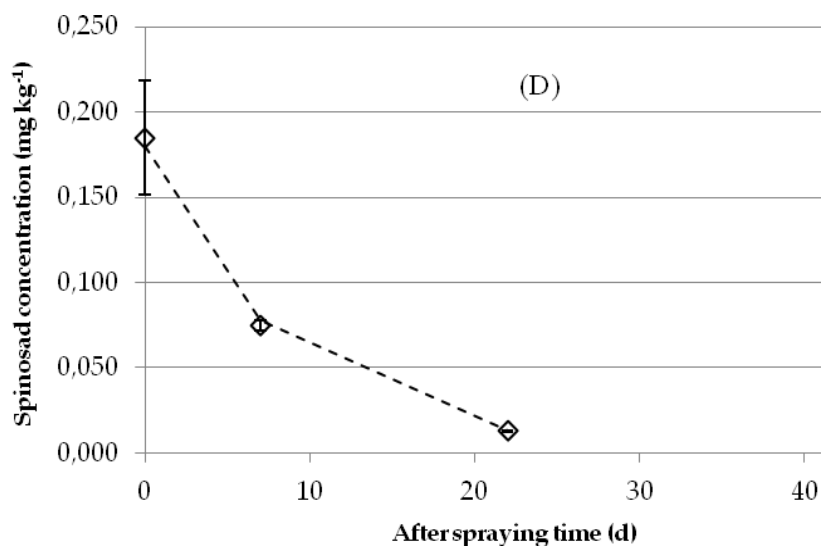
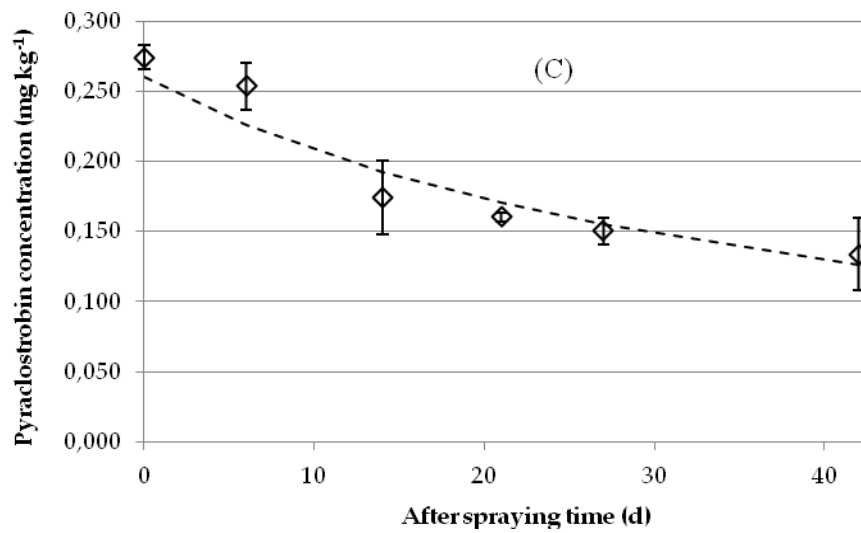
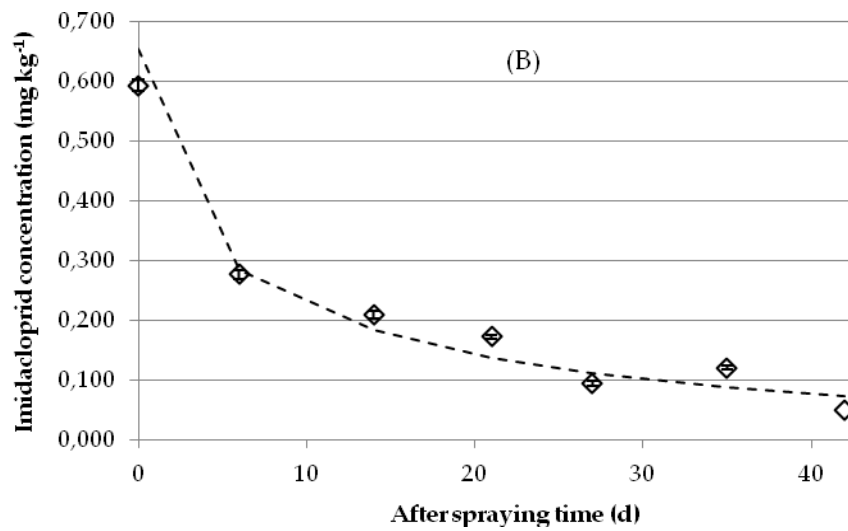


Figure 3. *Cont.*



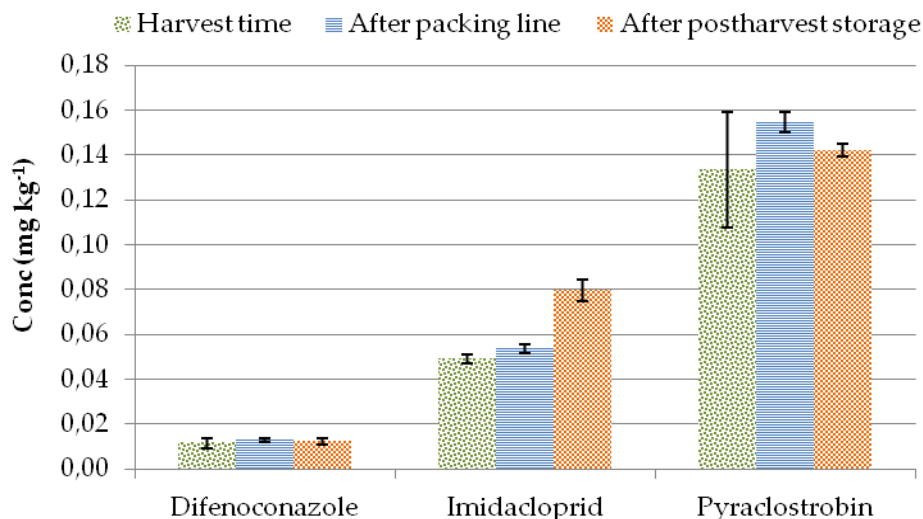


Figure 4. Difenconazole, imidacloprid and pyraclostrobin residues on Clementine at harvest time, after packing line and after 32 d of cold storage. For difenconazole and pyraclostrobin no significant differences were detected between the pesticide levels. For imidacloprid residue concentration at the end of the post-harvest period differed significantly from the residue level determined at harvest time (student t, $\alpha = 0.05$).

3.4.2 Imidacloprid

The initial deposition of imidacloprid on Clementine was 0.592 ± 0.010 mg kg⁻¹. Imidacloprid residues dissipated 92% by harvest (42 day after spraying). The final imidacloprid residue concentration at the end of the postharvest period differed significantly from the residue level determined at harvest (Student t-test, $\alpha = 0.05$). No clear conclusion can be made about the effect of cold storage on imidacloprid concentration. The higher levels of imidacloprid detected after cold storage were likely due to fruit water loss, a situation that was observed solely for the imidacloprid-treated mandarins and could be ascribed to some technical failure in the wax treatment. The dehydration of the fruit changed the level of co-extractives and, therefore, the matrix effect also changed. Changes in the matrix effect mean a different slope for the matrix-matched calibration curve, and therefore, in the residue quantitation. Our group established the presence of isobaric compounds that may have interfered with imidacloprid determination in citrus fruit that included mandarins [43]. If this interference was not compensated by the matrix-matched calibration, the imidacloprid levels would be overestimated, yielding higher concentration values for this compound.

3.4.3 Pyraclostrobin

At spraying time, the concentration of the studied strobilurin was 0.274 ± 0.009 mg kg⁻¹. A dissipation of 48% was observed for pyraclostrobin 42 day after spraying. This fungicide degraded more slowly than the other pesticides. The concentration after postharvest storage did not differ from that at harvest (Student t-test, $\alpha = 0.05$). Other studies demonstrated the storage stability of pyraclostrobin in commodities with high oil, water and acid content as well as in dry commodities for up to 18 months when stored deep frozen [44].

3.4.4 Spinosad

The residue of spinosad on Clementine at application time (day 0) was below the EU and Codex MRLs (0.3 mg kg⁻¹). Spinosad residues dissipated below the quantification limit (BQL) of 0.010 mg kg⁻¹ at 28 day after application of treatment. At 22 day after spraying, 93% of this compound had dissipated.

The postharvest processes had little influence on the overall dissipation of the pesticides. No significant differences were detected between the pesticide level at the beginning and the end of the packing line. The level was almost unchanged after 32 day in cold storage, except for imidacloprid as explained above.

3.4. Half-Lives

According to the best fitting models, difenoconazole and spinosad dissipated following a pseudo 1st-order kinetics that only was a function of the concentration of the compounds. That means that the concentration declined exponentially and their half-lives, (the time needed to reach half of the initial concentration) remained constant and the clearance times, if needed, could be easily estimated. The half-life of difenoconazole and spinosad were 19.2 and 5.8 day, respectively. Imidacloprid and pyraclostrobin half-lives determined with the best fitting models were 4.1 and 39.8 day, respectively. In these cases, the mathematical description of the pesticide dissipation were RF 1st-order and 2nd-order, respectively. These types of decay are concentration-dependent, meaning that the time needed to reach half of the concentration in the fruit (the pesticide half-life) will be a function of the pesticide level on the fruit at the starting time considered.

This is the first report of difenoconazole, spinosad and pyraclostrobin dissipation on Clementine mandarins. Imidacloprid showed almost the same half-life as that previously determined in the rind of sweet orange, which was 3.87 day [35].

Previous reports determined 3.5–5.3 day for the half-life of pyraclostrobin in fruit such as banana [45], strawberry [46], tomato [47], values that are 7 to 10 times lower than those reported in the present work (39.2 day). These results may partially be due to differences between the species, application doses, formulation, local environment, and crop growth characteristics [17–19]. It should be taken into account that citrus fruit have an important wax layer where due to the high octanol/water coefficient (K_{ow}) of this pesticide, it could be retained. These facts could explain the deviation from a normal 1st-order kinetics behavior. It also must be taken into account that pyraclostrobin ($pK_{ow} = 3.99$) could dissolve in the essential oil vesicles of the citrus fruit. The dissolution of the pesticide in the oil sacs would hamper its direct contact with the environment, to which it dissipates. The pesticide that is not solubilized in the essential oil would dissipate quickly from the fruit surface and, afterwards, a slow release from the oil would change the speed of decay of pyraclostrobin.

The determined half-life for spinosad was 5.8 day. The short $t_{1/2}$ of this insecticide is influenced by light, especially the ultraviolet (UV) component [48]. Also, residue decline may be attributed to hydrolysis, biodegradation, or growth dilution [49]. Although there are no specific studies of dissipation of spinosad on mandarins reported in literature similar values of half-lives are reported for this pesticide in other vegetables and fruit. Values in the range of 3.5–3.9 day for zucchini [50], 1.7 day for tomato [51] and 1.4 day for cabbage [52] have been reported.

3.5. Estimating Storage Effect on Pesticide Level

The equations of the dissipation models allowed the estimation of the influence of the postharvest process through the comparison between the pesticide levels obtained after washing, imazalil and wax application and the final cold storage and the calculated ones after 32 d of postharvest storage. The expected concentration values, applying the best fitting models versus actual ones after cold storage at 74 d after spraying were: 0.005 versus 0.012 mg kg⁻¹ for difenoconazole, 0.035 versus 0.080 mg kg⁻¹ for imidacloprid and 0.091 versus 0.142 mg kg⁻¹ for pyraclostrobin, respectively. Therefore, cold storage slowed down the dissipation of these pesticides.

8. Conclusions

The dissipation pattern of two fungicides and two insecticides on Clementine mandarin was studied. The dynamics of the decay of difenoconazole, imidacloprid, pyraclostrobin, and spinosad in field conditions was unique for each one. However, in all cases, a clear dissipation trend could be

drawn. Spinosad decomposition was the most rapid, dissipating to below the quantification limit of 0.010 mg kg⁻¹ 28 day after spraying. Pyraclostrobin showed the lowest dissipation rate under the field conditions. It was the highest persistence period reported for pyraclostrobin on fruit to date. For all four pesticides, the postharvest stage did not diminish the pesticide residue concentrations, which were below their MRLs before entering in the postharvest phase. These results support their safe use in Clementine cropping under the studied conditions.

Author Contributions: N.B. contributed in the design of the study, ran the laboratory work, processed the data and drafted the paper. E.L. and P.P. carried out the pesticide applications, sampling, harvest and postharvest treatment. V.C. collaborated in laboratory work, data analysis and critically read and adjusted the manuscript. F.R. and H.H. gave the conceptual frame of project, supervised the design of the study and adjusted the final version of the manuscript. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

Funding: This research was funded by Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), grant number L2_12_1_VI_CT_GT4_7639.

Acknowledgments: N. Besil be grateful to Agencia Nacional de Investigación e Innovación for her scholarship POS_NAC_2012_1_9348 and Programa de Apoyo a las Ciencias Básicas (PEDECIBA). The authors are grateful to Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria for logistical support and Eng. Franco Bologna for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Liu, Y.; Heying, E.; Tanumihardjo, S.A. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11*, 530–545. [CrossRef]
- FAO. FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed on 6 September 2018).
- DIEA. *Anuario Estadístico Agropecuario*, 20th ed.; MGAP: Montevideo, Uruguay, 2017.
- Shinde, S.; Neharkar, P.; Dhurve, N.; Sawai, H.; Lavhe, N.; Masolkar, D. Evaluation of different insecticides against citrus leaf miner on Nagpur mandarin. *J. Entomol. Zool. Stud.* **2017**, *5*, 1889–1892.
- Rodríguez, V.A.; Avanza, M.M.; Mazza, S.M.; Giménez, L.I. Pyraclostrobin effect to control of citrus black spot. *Summa Phytopathol.* **2010**, *36*, 334–337. [CrossRef]
- Timmer, L.W.; Peever, T.; Solel, Z.; Akimitsu, K. Alternaria Diseases of Citrus—Novel Pathosystems. *Phytopathol. Mediter.* **2003**, *42*, 99–112.
- Altieri, G.; Di Renzo, G.C.; Genovese, F.; Calandra, M.; Strano, M.C. A new method for the postharvest application of imazalil fungicide to citrus fruit. *Biosyst. Eng.* **2013**, *115*, 434–443. [CrossRef]
- Lado, J.; Manzi, M.; Silva, G.; Luque, E.; Blanco, O.; Pérez, E. Effective alternatives for the postharvest control of imazalil resistant *Penicillium digitatum* strains. *Acta Hort.* **2010**, *877*, 1449–1456. [CrossRef]
- Boina, D.R.; Bloomquist, J.R. Chemical control of the Asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *71*, 808–823. [CrossRef] [PubMed]
- Farha, W.; Abd El-Aty, A.M.; Rahman, M.M.; Shin, H.C.; Shim, J.H. An overview on common aspects influencing the dissipation pattern of pesticides: A review. *Environ. Monit. Assess.* **2016**, *188*. [CrossRef] [PubMed]
- Navarro, S.; Oliva, J.; Navarro, G.; Barba, A. Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 35–40.
- Karmakar, R.; Kulshrestha, G. Persistence, metabolism and safety evaluation of thiamethoxam in tomato crop. *Pest Manag. Sci.* **2009**, *65*, 931–937. [CrossRef] [PubMed]
- Picó, Y.; El-Sheikh, M.A.; Alfarhan, A.H.; Barceló, D. Target vs non-target analysis to determine pesticide residues in fruits from Saudi Arabia and influence in potential risk associated with exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *111*, 53–63. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, M.; Tao, L.; McLean, J.; Lu, C. Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6082–6090. [CrossRef] [PubMed]
- Suárez-Jacobo, A.; Alcantar-Rosales, V.M.; Alonso-Segura, D.; Heras-Ramírez, M.; Elizarragaz-De La Rosa, D.; Lugo-Melchor, O.; Gaspar-Ramírez, O. Pesticide residues in orange fruit from citrus orchards in Nuevo Leon State, Mexico. *Food Addit. Contam. Part B* **2017**, *10*, 192–199. [CrossRef] [PubMed]

16. Ortelli, D.; Patrick, E.; Corvi, C. Pesticide residues survey in citrus fruits. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 423–428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Fantke, P.; Gillespie, B.W.; Juraske, R.; Jolliet, O. Estimating Half-Lives for Pesticide Dissipation from Plants. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 8588–8602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Fantke, P.; Juraske, R. Variability of pesticide dissipation half-lives in plants. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 3548–3562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hanson, B.; Bond, C.; Buhl, K.; Stone, D. Pesticide Half-life Fact Sheet. Available online: <http://npic.orst.edu/factsheets/half-life.html> (accessed on 24 August 2018).
20. Lewis, K.; Tzilivakis, J. Development of a data set of pesticide dissipation rates in/on various plant matrices for the Pesticide Properties Database (PPDB). *Data* **2017**, *2*, 28. [[CrossRef](#)]
21. Wang, C.; Qiu, L.; Zhao, H.; Wang, K.; Zhang, H. Dissipation dynamic and residue distribution of flusilazole in mandarin. *Environ. Monit. Assess.* **2013**, *185*, 9169–9176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Chen, W.; Jiao, B.; Su, X.; Zhao, Q.; Sun, D. Dissipation and residue of 2,4-d in citrus under field condition. *Environ. Monit. Assess.* **2015**, *187*. [[CrossRef](#)]
23. Zhang, Q.; Chen, Y.; Wang, S.; Yu, Y.; Lu, P.; Hu, D.; Yang, Z. Dissipation, residues and risk assessment of spirotetramat and its four metabolites in citrus and soil under field conditions by LC-MS/MS. *Biomed. Chromatogr.* **2018**, *32*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sun, D.; Zhu, Y.; Pang, J.; Zhou, Z.; Jiao, B. Residue level, persistence and safety of spirodiclofen-pyridaben mixture in citrus fruits. *Food Chem.* **2016**, *194*, 805–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Payá, P.; Oliva, J.; Cámara, M.A.; Barba, A. Dissipation of insect growth regulators in fresh orange and orange juice. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **2007**, *72*, 161–169. [[PubMed](#)]
26. Waks, J.; Schiffmann-Nadel, M.; Lomaniec, E.; Chalutz, E. Relation between fruit waxing and development of rots in citrus fruit during storage. *Plant Dis.* **1985**, *69*, 869–870. [[CrossRef](#)]
27. Vicent, A.; Armengol, J.; García-Jiménez, J. Rain fastness and persistence of fungicides for control of alternaria brown spot of citrus. *Plant Dis.* **2007**, *91*, 393–399. [[CrossRef](#)]
28. Miles, A.K.; Willingham, S.L.; Cooke, A.W. Field evaluation of strobilurins and a plant activator for the control of citrus black spot. *Aust. Plant Pathol.* **2004**, *33*, 371–378. [[CrossRef](#)]
29. Dong, F.; Li, J.; Chankvetadze, B.; Cheng, Y.; Xu, J.; Liu, X.; Li, Y.; Chen, X.; Bertucci, C.; Tedesco, D.; et al. Chiral Triazole Fungicide Difenoconazole: Absolute Stereochemistry, Stereoselective Bioactivity, Aquatic Toxicity, and Environmental Behavior in Vegetables and Soil. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 3386–3394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Balba, H. Review of strobilurin fungicide chemicals. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2007**, *42*, 441–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Simon-Delso, N.; Amaral-Rogers, V.; Belzunces, L.P.; Bonmatin, J.M.; Chagnon, M.; Downs, C.; Furlan, L.; Gibbons, D.W.; Giorio, C.; Girolami, V.; et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, *22*, 5–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Miles, M. The effects of spinosad, a naturally derived insect control agent to the honeybee. *Bull. Insectol.* **2003**, *56*, 119–124.
33. West, S.D.; Turner, L.G. Determination of spinosad and its metabolites in citrus crops and orange processed commodities by HPLC with UV detection. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 366–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Phartiyal, T.; Srivastava, R.M. Dissipation of imidacloprid on lemon fruit rind under tarai agro-climatic condition of Uttarakhand. *J. Entomol. Res.* **2014**, *38*, 285–288.
35. Singh, N.; Bisht, S.; Yadav, G.; Kamari, B. Dissipation of imidacloprid on sweet orange fruits. *Int. J. Chem. Stud.* **2017**, *5*, 683–686.
36. Saunt, J. *Citrus Varieties of the World*; Sinclair Intl Business Resources: Norwich, UK, 2000.
37. Codex. *Recommended Methods of Sampling for the Determination of Pesticide Residues for Compliance with MRLs CAC/GL 33-199*; Codex: New Delhi, India, 1999.
38. Besil, N.; Pareja, L.; Colazzo, M.; Niell, S.; Rodríguez, A.; Cesio, V.; Heinzen, H. GC-MS method for the determination of 44 pesticides in mandarins and blueberries. In Proceedings of the 3rd Latin American Pesticide Residue Workshop, Food and Environment, Montevideo, Uruguay, 8–11 May 2011; p. 156.
39. Besil, N.; Pérez-Parada, A.; Cesio, V.; Varela, P.; Rivas, F.; Heinzen, H. Degradation of imazalil, orthophenylphenol and pyrimethanil in Clementine mandarins under conventional postharvest industrial conditions at 4 °C. *Food Chem.* **2016**, *194*, 1132–1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Timme, G.; Frehse, H.; Laska, V. Statistical interpretation and graphic representation of the degradation behavior of pesticide residues II. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **1986**, *39*, 187–203.
41. Timme, G.; Frehse, H. Statistical interpretation and graphic representation of the degradation behaviour of pesticide residues. 1. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **1980**, *33*, 47–60.
42. European. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed*; Document SANTE/11945/2015; European Commission: Brussels, Belgium, 2015.
43. Besil, N.; Cesio, V.; Heinzen, H.; Fernandez-Alba, A.R. Matrix Effects and Interferences of Different Citrus Fruit Coextractives in Pesticide Residue Analysis Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4819–4829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. EFSA. Modification of the existing MRLs for pyraclostrobin in various crops. *EFSA J.* **2011**, *9*, 2120. [[CrossRef](#)]
45. Yang, M.; Zhang, J.; Zhang, J.; Rashid, M.; Zhong, G.; Liu, J. The control effect of fungicide pyraclostrobin against freckle disease of banana and its residue dynamics under field conditions. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, Z.; Cang, T.; Qi, P.; Zhao, X.; Xu, H.; Wang, X.; Zhang, H.; Wang, X. Dissipation of four fungicides on greenhouse strawberries and an assessment of their risks. *Food Control* **2015**, *55*, 215–220. [[CrossRef](#)]
47. Jankowska, M.; Kaczynski, P.; Hrynko, I.; Lozowicka, B. Dissipation of six fungicides in greenhouse-grown tomatoes with processing and health risk. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 11885–11900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Adak, T.; Mukherjee, I. Investigating Role of Abiotic Factors on Spinosad Dissipation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2016**, *96*, 125–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Jacobsen, R.E.; Fantke, P.; Trapp, S. Analysing half-lives for pesticide dissipation in plants. *SAR QSAR Environ. Res.* **2015**, *26*, 325–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Liu, Y.; Sun, H.; Wang, S. Dissipation and residue of spinosad in zucchini under field conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2013**, *91*, 256–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Ramadan, G.; Shawir, M.; El-Bakary, A.; Abdelgaleil, S. Dissipation of four insecticides in tomato fruit using high performance liquid chromatography and QuEChERS methodology. *Chilean J. Agric. Res.* **2016**, *76*, 129–133. [[CrossRef](#)]
52. Singh, S.; Battu, R.S. Dissipation kinetics of spinosad in cabbage (*Brassica oleracea* L.var. *capitata*). *Toxicol. Environ. Chem.* **2012**, *94*, 319–326. [[CrossRef](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO V: Matrix effects minimization in LC-(ESI)-MS/MS in lemon fruits and by-products through dilution and its application to routine work

Enviado a SN Applied Science de Springer (22.09.2018)

Matrix effects minimization in LC-(ESI)-MS/MS in lemon fruits and by-products through dilution and its application to routine work

Besil, Natalia^{1,2}, Rezende, Sofía¹, Alonzo, Noel¹, Cesio, María Verónica^{1,2}, Rivas Fernando³ & Heinzen, Horacio^{1,2*}.

¹Grupo de Análisis de Contaminantes Trazas (GACT). Departamento de Química del Litoral. Facultad de Química. CENUR Litoral Norte. UdelaR. Uruguay.

²Grupo de Análisis de Contaminantes Trazas (GACT). Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química. UdelaR. Uruguay.

³Programa Nacional de Investigación Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA, Estación Experimental Salto Grande, Camino al Terrible s/n, 60000 Salto, Uruguay

*Corresponding author. Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química. Universidad de la República. General Flores 2124, CP 11800, Montevideo, Uruguay. Tel: +59829244068. Fax: +59829241906. E-mail address: heinzen@fq.edu.uy

Abstract

Citrus fruits and their by-products such as concentrated juices and essential oils are important intermediate raw products in the food industry that can selectively accumulate plant protection agrochemicals employed in their production. Unfortunately, they are also known as very difficult matrices for pesticide residue analysis due their high number and concentration of phytochemicals. Looking for a unified vision useful for the routine analysis of these three lemon matrices we applied the concept of matrix dilution. After selecting, optimizing and validating the QuEChERS AOAC 2007.01 for the determination on whole fruit and concentrated juices of 18 pesticide residues most commonly used in the citrus production followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Although in lemon fruit the pesticide residues determination is straightforward, in the case of concentrated juice a matrix dilution factor of 4 was applied to minimize the matrix effects, and for the analysis of lemon essential oils, the dilution and shoot procedure proved to be useful for LC-MS/MS and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) determination. The three methodologies were validated following SANTE guidelines, with quantitation limits below the established European Union and *Codex Alimentarius* maximum residue limits (MRLs). The developed methodologies are useful tools for the routine control analysis of pesticide residues in lemon matrices, allowing high sample throughput and enhancing labs productivity

Keywords

Pesticide residues; lemon fruit; concentrated lemon juice; essential oils; LC-MS/MS; GC-MS.

Introduction

Citrus fruits and their by-products chain of value are present throughout the entire world. The global citrus production involves around 124 246.0 thousand tons [1]. Nowadays in Uruguay, citrus production represents 2% of the gross value of agricultural production products [2] in two large producing areas that differ in terms of surface, production specificity and scale of production. Particularly, southern Uruguay is specialized in the cultivation of lemon as the main species that is consumed either as fruit or processed to juices, juice concentrates, oils, pectin base, pellets for animal feed [2].

In order to preserve the fruit quality and avoid pests attack, citrus cultivation commonly involves the use of agrochemicals but many pesticide residues remain on the different citrus species even

though there are many biological, physicochemical and mechanical factors that can cause their dissipation [3, 4]. These residues can threaten human health but also hamper international trade, forcing the monitoring of the remaining residues in both, fruits and products derived from the citrus chain production. The omnipresence of pesticide residues in citrus products was pointed out as over a total of 8920 analyzed citrus fruits in South Africa, they contained an 84% and 14% of imidazole-benzimidazole fungicides and organophosphorus insecticides respectively [5]. In China, imazalil and thiabendazole residues were determined in 19 orange and 21 mandarin samples using UHPLC-QToF-MS and automated MS/MS library searching [6].

Several analytical methodologies have been developed for the determination of pesticide residues in some citrus fruits [7-10]), but only a few studied lemon as a matrix. Most of these reports deals with the analysis of pesticides such as imazalil, thiabendazole, carbendazim and 2-phenylphenol in lemon fruit [11-14]. In every case, the complexity of citrus fruits as analytical matrix for pesticide residue analysis had been pointed out, either using LC-MS or GC-MS determinations [15, 16].

Within the citrus chain production also fresh juice, concentrated juice, essential oils, and pellets among other goods, are elaborated. The basis for concentrated juice production is to increase the dry matter content and decrease the water content of juices, in order to extend shelf life and to improve transportation and storage properties [17]. On an industrial scale, essential oils are obtained as a by-product of fruit juice production [18]. The presence, distribution and persistence of pesticide residues in these by-products are due to the production process and the physico-chemical properties of those compounds [19].

In the case of citrus by-products, different methodologies have been developed for the determination of pesticide residues in citrus juices [14, 20, 21], while few works report methodologies for pesticide residues determination in concentrated lemon juice [22, 23]. On the other hand, essential oils (EOs) are extracted from citrus peel and the concentration of lipophilic pesticides is much higher than that found in the fruit [24]. Pesticide residues in EOs are widely studied by different researchers who have found organochlorine [25] and organophosphorus residues [26] among others. A review of the presence and evolution of pesticides and plasticizers in Italian essential oils according the type of citrus EO was published by Saitta and his group in

2012 [27]. The developed sample preparations for EOs are diverse; from solid/liquid extraction [24] to a simple sample dilution step as applied by Fillatre et al. [28].

Material and Methods

Reagents and apparatus.

HPLC grade ethyl acetate (EtOAc) and acetonitrile (MeCN), free of pesticide residues, were purchased from Pharmco Products Inc. (Brookfield, CT, USA) and Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), respectively. These solvents were employed both in liquid chromatography and during the extraction step. Sodium citrate dihydrate and anhydrous magnesium sulphate from J.T.Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ, USA) were used. Sodium chloride and sodium acetate were obtained from Carlo Erba (Italy). Di-sodium hydrogen citrate 1.5 hydrate was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

Deionized water was obtained using a Thermo Scientific (Marietta, OH, USA) EASY pure RoDi Ultrapure water purification system. Formic acid p.a. 88% was obtained from Macron Chemicals (The Netherlands). Glacial acetic acid (HAc) from Dorwill (Argentina), RP-C18, amino sorbent (PSA, 40–60 μm) and graphitized carbon black (GCB, 120-400 mesh) were from Scharlau (Barcelona, Spain).

Reference standards (purity > 98%) were purchased from Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany) and were stored at -40 °C. Stock solutions (1000-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of each pesticide were prepared by dissolving the standards in acetonitrile or ethyl acetate and stored in glass vials at -40 °C. A working solution at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, was prepared by diluting stock solutions.

A SL16 centrifuge from Thermo IEC HN-SII (Langensfeld, Germany), a vortex mixer Wisd VM 10, a Turbovap® Biotage LV evaporator (United States) and an ultrasonic bath Wisd WUC-A03H from Daihan Scientific Co. Ltda. (Korea) were used. Analytical balances were SHIMADZU AUX220, readability, 0.1 mg (Philippines) and a SIMADZU TXB622L, readability 0.01 g (Philippines).

Analytical protocols

LC-MS/MS operating conditions

The HPLC-MS/MS analysis was performed with a HPLC Agilent 1200, equipped with a quaternary pump, degasser and a thermostated autosampler coupled to a triple quadrupole API 4000 (4000 Q-TRAP ABSCIEX). Electrospray ionization (ESI) was used in positive and negative mode and the triple quadrupole operated in MRM (Multiple Reaction Monitoring). The column used was a Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm long, 4.6 mm i.d. and 5 μm particle size, which was kept at 40 $^{\circ}\text{C}$ during the analysis.

HPLC methods

Methods 1 and 2 used gradients of water with 0.1% HAc (A) and acetonitrile (B) and operated in positive and negative electrospray ionization mode respectively. All methods had a 0.6 mL min^{-1} mobile phase flow and 5 μL of each sample were injected.

The elution process for each chromatographic method was different with method 1 starting with 70% of mobile phase A, which was dropped to 0% in 12 minutes (3.50 minutes hold) then it rose back to 70% in 1.50 minute (4 minutes hold) for a total run time of 21 minutes, while method 2 started with 70% of mobile phase A (1 minute hold), dropped to 0% in 3.50 minutes then rose back to 70% in 2.50 minutes (3 minutes hold) for a total run time of 10 minutes. The source temperature was set to 500 $^{\circ}\text{C}$, ionization voltage was 5000 V, a nitrogen curtain at 20 psi and air as nebulization gas at 50 psi were used. A retention time window of 90 seconds was set for each pesticide and data analysis was performed with Biosystems Analyst 1.5 software.

GC-MS operating conditions

GC-MS pesticide analysis was performed on a Shimadzu GC-MS QP2010 operating in electron impact ionization (EI) mode with ionization energy of 70 eV. The injection volume was 1 μL of each sample in split mode at 280 $^{\circ}\text{C}$ to an Rtx-5MS fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm diameter and film thickness of 0.25 μm) with ultrapure helium as gas carrier. The interface and ion source were set at 280 and 230 $^{\circ}\text{C}$ respectively. The oven temperature gradient started at 120 $^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes, increased to 190 $^{\circ}\text{C}$ with a 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ rate (1 minute hold), then to 250 $^{\circ}\text{C}$ at a 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ rate (5 minutes hold) and finally increased to 300 at a 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ rate (5 minutes hold) for a total run time of 45 minutes. Detection was performed in SIM (Single Ion Monitoring) acquisition mode. GC data was processed with GC-MS Solution software 4.11 SU2 version. Pesticides detection parameters for both analytical systems are shown in Table 1

Sample preparation

Lemon fruit

In order to obtain an homogenized sample, each selected fruit was cut in four pieces, two opposite quarters were selected for analysis and the other two were discarded as reported in previous work [3]. The laboratory sample was then composed and homogenized. Ethyl acetate sample preparation protocol (EtOAc method) [3] and acetate QuEChERS AOAC [29] using in both cases 10 g of previously homogenized sample were evaluated. The sample preparation of QuEChERS AOAC is described in concentrated juice session.

For the EtOAc method, the sample preparation consisted in weighing 10 g of sample into 50 mL PP conic tubes where 10 mL of EtOAc was added and skaked by hand for 1 minute. The salting-out was performed with 8 g of anhydrous MgSO₄ and 1.5 g of NaCl. It was then shaken for 5 minutes manually, placed in an ultrasonic bath for 15 minutes and centrifuged for 5 minutes at 3500 RPM. In this case, no sample clean up step was applied.

Citrus by products matrices: concentrated juices and essential oils.

For the concentrated juice, 3 extraction methodologies based on the different variations of the QuEChERS method were evaluated: the original one, [30], the buffered versions [29] [31]. For the pesticide residues determination on essential oils, a dilution of the sample and subsequent direct injection protocol was used. First, the sample was vortexed and an aliquot of 200 µL was taken and put into an autosampler vial then 800 µL of the appropriated solvent: MeCN or EtOAc for LC and GC analysis respectively were added.

For precision studies, lemon essential oils were spiked with the selected pesticides at concentrations ranging from 5 to 200 µg L⁻¹ was diluted with 800 µL of the appropriate solvent. Due to the complexity of essential oils and that the composition could be different according to the extraction method used, the citrus type [18] and the geographical areas from where the fruit was grown [32] plus the difficulties of finding a blank sample, the standard addition calibration technique was used for quantification purposes. To accomplish this, instead of using 800 µL of solvent, the appropriate amount of pesticide mix was used together with the needed solvent to reach 800 µL.

The trueness of the methods was evaluated as recovery percentages of all pesticides at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ concentration level. The spike process was performed with a mix of pesticides prepared from standards of each pesticide.

Preliminary tests: QuEChERS protocols

Using the original version of QuEChERS [30], 5 g of concentrated juice were weighed in a 50 mL tube and then 5 g of distilled water was added. After that, 10 mL of MeCN were added and shaken manually for 1 minute. Then, 4 g of anhydrous MgSO_4 and 1 g of NaCl were added. It was then shaken manually for 5 minutes and placed on an ultrasonic bath for 15 minutes. Finally, the tubes were centrifuged for 10 minutes at 5000 rpm. Afterwards, part of the supernatant was transferred to 15 mL PP disposable tubes with previously weighed sorbents: 25 mg of PSA and 150 mg of anhydrous MgSO_4 per milliliter of supernatant.

For the citrate QuEChERS version [31], a similar procedure was performed, differing in the formation of a buffer in situ. The main difference is the usage of 1 g of NaCl, 4 g of anhydrous MgSO_4 , 1 g trisodium citrate dehydrate and 0.5 g disodium hydrogencitrate sesquihydrate as extraction salts. For acetate QuEChERS (AOAC) [29] the procedure is similar to the first method, changing the extraction solvent by MeCN acidified with 1% of HAc. Another difference is the use of 1 g of sodium acetate and 4 g of anhydrous MgSO_4 as phase partition salts.

For both modified QuEChERS, during the clean-up step, 150 mg of anhydrous MgSO_4 and 50 mg of PSA were used per milliliter of supernatant.

The main difference between the classical and modified QuEChERS versions is the pH adjustment. In acetate and citrate approach, a buffer is generated in situ (4.5-5 and 5-5.55 respectively) and the matrix pH allowed better extraction of pH dependent pesticides.

In all cases, for the LC-MS/MS analysis, 1 mL of the supernatant was taken and filtered through a $22 \mu\text{m}$ syringe filtered and 500 μL were placed in an autosampler vial for further analysis. The final validated QuEChERS AOAC includes the use of 2.5 g of sample and 7.5 g of distilled water (a modification of original method) as will be explained in Results and Discussion session.

Results and Discussion

The aim of this work was to develop and validate three methodologies for routine analysis of pesticides residues in lemon fruit, its concentrated juice and essential oil. For the evaluation of the best performance of the analytical method, a representative group of 18 pesticides belonging to different chemical families, commonly used in pre and post-harvest citrus production were selected. Pesticides such as neonicotinoids, organophosphates; carboxamides, imidazoles, strobilurins, and benzimidazoles were included. Table 1 shows the selected pesticides.

Chromatographic and mass spectrometry conditions

Two chromatographic methods were used due to the physicochemical characteristics of the selected pesticides. For the LC configuration the optimization process was made using direct infusion with electrospray (ESI) and negative and positive acquisition modes were employed. Pesticides LC and GC detection parameters are shown in Table 1.

<Table 1>

Lemon fruit

For the analysis of pesticide residues in lemon fruit, two reported methodologies were evaluated: EtOAc [3] and QuEChERS AOAC. The EtOAc method showed recoveries for 3 of the 18 studied pesticides in this matrix, that did not meet the SANTE document requirements criteria (pesticide recoveries between 70 and 120 % and relative standard deviations (RSD) < 20%) [33]. Imazalil, carbendazim, and thiabendazole (imidazole and benzimidazole chemistry family), whose pKa is 6.53, 4.2, and 4.73 [34] respectively, were lost during the extraction step due to the low pH of the matrix. In the QuEChERS AOAC method the matrix pH is stabilized through an in situ generated buffer that allows the quantitative extraction of low-pH susceptible pesticides. As a consequence, the last method was chosen for its validation.

Method selectivity was studied, and no interfering ions with those of pesticides were found in the blank sample. Percentages of recovery and RSD at two concentration levels (10 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and matrix effect obtained in LC-MS/MS for each pesticide under study are presented in Table 2. Based on the results from matrix matched and solvents calibration curves, it can be concluded that a linear behavior is verified. The limit of quantitation of all the studied analytes was 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. As it was expected when the electrospray interface is used, the matrix effects cause

suppression of the analytical signal for 83% of the studied compounds. Nevertheless, the observed matrix effect of imidacloprid is enhancement of the signal with a value of 96 %. These results comply with a recent work reported by our group, where using LC-AHRMS-ToF, a positive value of 84% was found for this compound in lemon fruit [15].

<Table 2>

Concentrated juice

Concentrated juices are defined by the Uruguayan National Bromatological Regulation (UNBR) as "... products obtained by concentrating vegetable juices having a minimum volume ratio with the original juice of 50 % (1 to 2), except for citrus fruits, which shall be 33 % (1 to 3) and that comply with the requirements of this regulation ...” [35]. Lemon juice contains flavonoids, carotenoids, fatty acids, vitamins among others metabolites [36]. In the case of concentrated juices these compounds are at higher concentration, and as a consequence, higher matrix effects are expected. The selective removal of compounds at higher concentration level in comparison with the studied pesticides could be a difficult task. In addition, during the concentration process, some artifacts, conjugates and decomposition compounds are formed, turning the matrix even more complex. The three procedures described above based on QuEChERS methodology were evaluated in terms of their ability to provide good analyte extraction and maximizing the removal of co-extractives that could interfere. Trueness and precision were evaluated at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ concentration level. Also matrix effects were studied and a strong suppression of the signal was observed. From the three selected methods, all pesticides gave recoveries ≥ 100 whereas the AOAC version, shown lower percentage of pesticides with matrix effects ≥ 50 %. A strategy of “reconstructing” the original juice in terms of total solid content was followed aiming to minimize this effect. Sample dilution has proven to minimize matrix effects during ESI and therefore, ion suppression phenomena could be overcome and higher sensitivity is achieved. The sample preparation step was modified and 2.5 g of concentrated juice were weighted and 7.5 g of water were added. (See Figure 1). The trueness of the method was studied at 3 concentration levels: 10, 100 and 300. Linear ranges were from 10 to 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for all analytes with the exception of 2.4 D and imidacloprid (from 100 to 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) with residuals lower than 20%. All figure of merit are presented in Table 3.

The chemical composition of the concentrated juice is less complex than that of the whole fruit but the juice has a higher solid content and potentially interfering compounds. Matrix effects are minimized with the exception of carbendazim and thiabendazole that showed 36 and 47% matrix effects, all the studied pesticides suffered no matrix effects. Sample dilution eliminated the high matrix effect suffered by imidacloprid in the whole fruit, as well as most of the other matrix effects observed during its analysis.

<Figure 1>; <Table 3>

Essential oils

For the analysis of lemon essential oil 16 LC amenable pesticides and one GC amenable pesticide: 2-phenylphenol (OPP) were selected. This fungicide is commonly applied in citrus post-harvest step and OPP residues in lemon, orange and mandarin essential oils were reported by Ito et al [37]. In this work, after the sample dilution and injection in the instrument, the repeatability of the method was studied at 5 concentration levels: 10, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$). The results showed good repeatability for all the studied analytes (0.6-9.8% range). The LOQ of the method were 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for 73%, 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ for 13% and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ for 6% of the analytes while for OPP the LOQ was 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Boscalid and iprodione were also studied in this matrix but a great suppression matrix effect avoid their identification at concentrations below 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. In consequence they were eliminated of the scope. The linear ranges were from LOQ to 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ for LC amenable analytes and from LOQ to 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ for OPP that was analyzed by GC-MS, with residuals yielding deviations lower than 20% in all cases (See Table 4).

<Table 4>

Real sample analysis

In order to prove the effectiveness of the validated methods and its suitability for routine analysis, they were employed to analyze real samples. In the case of lemon, 6 samples were studied and iprodione (0.04 mg kg^{-1}), boscalid (0.24 mg kg^{-1}) and pyraclostrobin (0.11 mg kg^{-1}) residues were detected. On the other hand, 101 EOs samples were analyzed. The post-harvest pesticides most commonly found were imazalil (0.15-2.20 mg L^{-1}), prochloraz (0.01-35.9 mg L^{-1}).

1), 2-phenylphenol (0.10-52.1 mg L⁻¹) and propiconazole (0.01-15.0 mg L⁻¹). Even residues of pyraclostrobin and difenoconazole (fungicides usually used in pre-harvest) were also found. Figure 2 shows the chromatographic signal of prochloraz present in a real sample of EO at 112 µg L⁻¹ concentration level. In order to compare the results with the established MRLs is necessary to take into account the essential oil density to convert mg L⁻¹ into mg kg⁻¹ (consider it when comparing the results with the MRLs). In this work, we consider a value of 0.85 kg L⁻¹ based in the Clará research [38].

Five concentrated lemon juices were analyzed. Most countries rely on regulations for processed foods and should to comply with the maximum limits for pesticides. However, the *Codex Alimentarius* [39] and European Legislation [40] do not provide MRLs data for concentrated juices but state that the appropriate MRL applied to concentrated juice corresponds to the MRL value for each pesticide in a raw agricultural commodity.

In this work the MRL of each pesticide reported by the *Codex Alimentarius* for lemon was used and the MRL value for concentrated juice is: $\text{MRL in lemon juice } (\mu\text{g kg}^{-1}) = \text{MRL in lemon fruit } (\mu\text{g kg}^{-1})$. Propiconazole, imazalil, pyrimethanil and imidacloprid residues were found in commercial samples. In all cases, the found concentrations were below the MRLs.

Conclusions

The sample dilution prior the extraction step and analysis were successfully applied for the analysis of lemon by products, concentrated juices and essential oils. When analyzing the concentrated juice, the dilution x 4 in the extraction step allowed a smooth application of the acetate buffered QuEChERS protocol. Matrix effects were minimal after dilution. On the other hand, the analysis of essential oils involved the simple dilution of the sample before determination and it can represent great benefit for laboratories as it allows increasing samples throughput. The buffered acetate QuEChERS was effective to analyze pH-dependent pesticides in lemon fruit. The three adjusted and validated methods for lemon fruits, concentrated juices and essential oils allowed the determination of a group of pesticides commonly used in citrus industry. They are currently applied to the routine determination of pesticide residues in lemon commodities for export. Pesticide residues (imazalil, pyraclostrobin, pyrimethanil, prochloraz,

difenoconazole, 2-phenylphenol) were found on the three evaluated matrices. In lemon fruits and concentrated juices the residues found were at concentrations below the MRLs established by the *Codex Alimentarius* and European Union (EU). In the case of EOs, prochloraz, 2-phenylphenol and propiconazole exceed the lemon EU MRLs.

Acknowledgements

N. Besil be grateful to Agencia Nacional de Investigación e Innovación for her scholarship POS_NAC_2012_1_9348, Programa de Apoyo a las Ciencias Básicas (PEDECIBA). The authors are grateful to Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria for lemon samples. S. Rezende be thankful to Departamento de Química del Litoral for her ungraduate thesis supervision.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval

This research does not have any studies with human subjects or animals performed by any of the authors.

References

- [1] FAO (2017) Citrus Fruit - Fresh and Processed. Statistical Bulletin 2016 Rome
- [2] INIA (2017) Programas Nacionales de Investigación. Producción Citrícola. Antecedentes. www.inia.org.uy, www.inia.org.uy, p. www.inia.org.uy
- [3] Besil N, Pérez-Parada A, Cesio V, Varela P, Rivas F, Heinzen H (2016) Food Chemistry 194:1132-1137. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.08.111
- [4] Sun D, Zhu Y, Pang J, Zhou Z, Jiao B (2016) Food Chemistry 194:805-810. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.08.044
- [5] Mutengwe MT, Chidamba L, Korsten L (2016) Journal of Food Protection 79:1759-1766. DOI 10.4315/0362-028X.JFP-16-022
- [6] Wang Z, Cao Y, Ge N, Liu X, Chang Q, Fan C, Pang GF (2016) Analytical and Bioanalytical Chemistry 408:7795-7810. DOI 10.1007/s00216-016-9883-3
- [7] Uclés A, Herrera López S, Dolores Hernando M, Rosal R, Ferrer C, Fernández-Alba AR (2015) Talanta 144:51-61. DOI 10.1016/j.talanta.2015.05.055

- [8] Soler C, Mañes J, Picó Y (2005) *Journal of Chromatography A* 1088:224-233. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.106>
- [9] Sun D, Pang J, Jiao B, Zhao Q, Zhou Z (2015) *Journal of Separation Science* 38:3845-3851. DOI 10.1002/jssc.201500837
- [10] Valenzuela AI, Lorenzini R, Redondo MJ, Font G (1999) *Journal of Chromatography A* 839:101-107. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00055-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00055-2)
- [11] Prousalis KP, Polygenis DA, Syrokou A, Lamari FN, Tsegenidis T (2004) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379:458-463. DOI 10.1007/s00216-004-2614-1
- [12] Navickiene S, Ribeiro ML (2002) *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13:592-596.
- [13] Yamazaki Y, Ninomiya T (1996) *Journal of AOAC International* 79:787-790.
- [14] Boeris V, Arancibia JA, Olivieri AC (2014) *Analytica Chimica Acta* 814:23-30. DOI 10.1016/j.aca.2014.01.034
- [15] Besil N, Cesio V, Heinzen H, Fernandez-Alba AR (2017) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65:4819-4829. DOI 10.1021/acs.jafc.7b00243
- [16] Niell S, Besil N, Colazzo M, Cesio V, Heinzen H (2017) QuEChERS and Other MRM Sample Preparation Methods SPE, SPME, DLLME, SBSE, ASE, MAE, SFE. In: *Multiresidue Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Food*, Heinzen H, Nollet L, Fernandez-Alba AR (eds) Boca Raton: CRC Press., p. 452
- [17] Horváth-Kerkai E, Stéger-Máté M (2012) *Manufacturing Fruit Beverages and Concentrates*. In: *Handbook of Fruits and Fruit Processing*, Sinha N, Sidhu J, Barta J, Wu J, Cano M (eds) Wiley-Blackwell, Oxford, UK, p. 223
- [18] Arce A, Soto A (2008) *Citrus Essential Oils: Extraction and Deterpenation*. Global Sciences Book, London
- [19] Montti M, Visciglio S, Raviol F, Subovich G, Munitz M (2013) *Ciencia, Docencia y Tecnología XXIV*:187-218.
- [20] Dreassi E, Zanfini A, Zizzari AT, La Rosa C, Botta M, Corbini G (2010) *LWT - Food Science and Technology* 43:1301-1306. DOI 10.1016/j.lwt.2010.04.010
- [21] Rizzetti TM, Kemmerich M, Martins ML, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R (2016) *Food Chemistry* 196:25-33. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.09.010
- [22] Sannino A, Bolzoni L, Bandini M (2004) *Journal of Chromatography A* 1036:161-169. DOI 10.1016/j.chroma.2004.02.078
- [23] Sannino A (2007) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21:2079-2086. DOI 10.1002/rcm.3051
- [24] Barrek S, Paisse O, Grenier-Loustalot MF (2003) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376:157-161. DOI 10.1007/s00216-003-1899-9
- [25] Saitta M, Di Bella G, Salvo F, Lo Curto S, Dugo G (2000) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:797-801. DOI 10.1021/jf990331z
- [26] Alves AAR, Rezende MJC, Hovell AMC, Bizzo HR, Oliveira ACL, Rodrigues SV, Rezende CM (2012) *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23:306-314. DOI 10.1590/S0103-50532012000200017
- [27] Saitta M, Di Bella G, Dugo G (2012) *Journal of Essential Oil Research* 24:171-180. DOI 10.1080/10412905.2012.659522
- [28] Fillatre Y, Rondeau D, Daguin A, Communal PY (2016) *Talanta* 149:178-186. DOI 10.1016/j.talanta.2015.11.052

[29] Lehotay SJ, O'Neil M, Tully J, García AV, Contreras M, Mol H, Heinke V, Anspach T, Lach G, Fussell R, Mastovska K, Poulsen ME, Brown A, Hammack W, Cook JM, Alder L, Lindtner K, Vila MG, Hopper M, De Kok A, Hiemstra M, Schenck F, Williams A, Parker A (2007) Journal of AOAC International 90:485-520.

[30] Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ (2003) Journal of AOAC International 86:412-431.

[31] Anastassiades M, Scherbaum, E., Tasdelen, B., Stajnbaher, D. (2007) Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. In: Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety., Ohkawa H MH, Lee PW. (ed) Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 439-458

[32] Dellacassa E, Lorenzo D, Moyna P, Verzera A, Mondello L, Dugo P (1997) Flavour and Fragrance Journal 12:247-255. DOI 10.1002/(SICI)1099-1026(199707)12:4<247::AID-FFJ639>3.0.CO;2-V

[33] European (2015) Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document SANTE/11945/2015.

[34] BCPC (2012) A World Compendium The Pesticide Manual, Hampshire, United Kingdom

[35] MSP (1994) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto 315/994. IMPO, Montevideo, Uruguay, p. 464

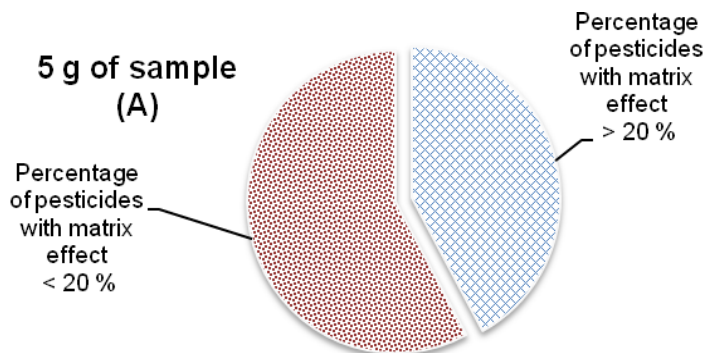
[36] Uçan F, Ağçam E, Akyildiz A (2016) Journal of Food Science and Technology 53:1465-1474. DOI 10.1007/s13197-015-2155-y

[37] Ito Y, Toyoda M, Suzuki H, Iwaida M (1977) Food Hygiene and Safety Science 18:450-454. DOI 10.3358/shokueishi.18.450

[38] Clará RA, Gómez Marigliano AC, Sólamo HN (2011) Latin American Applied Research 40:61-66.

[39] Codex Alimentarius (2003) Maximum residue limits for processed or ready to eat foods or feeds., The Netherlands

[40] European Commission (2005) Official Journal of the European Union



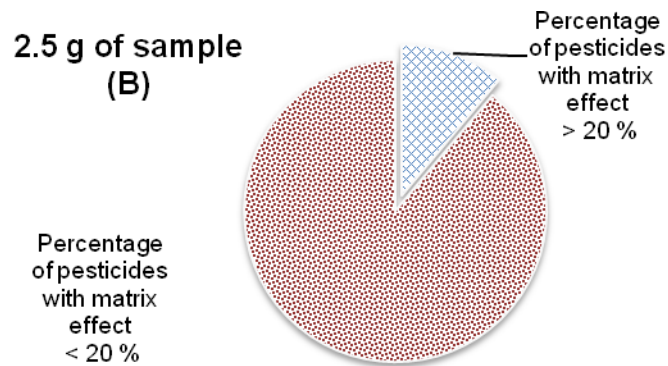


Fig 1 Percentage of pesticides with matrix effect (%) lower and higher than 20, using 5 g (A) and 2.5 g (B) of concentrated juice during QuEChERS acetate method

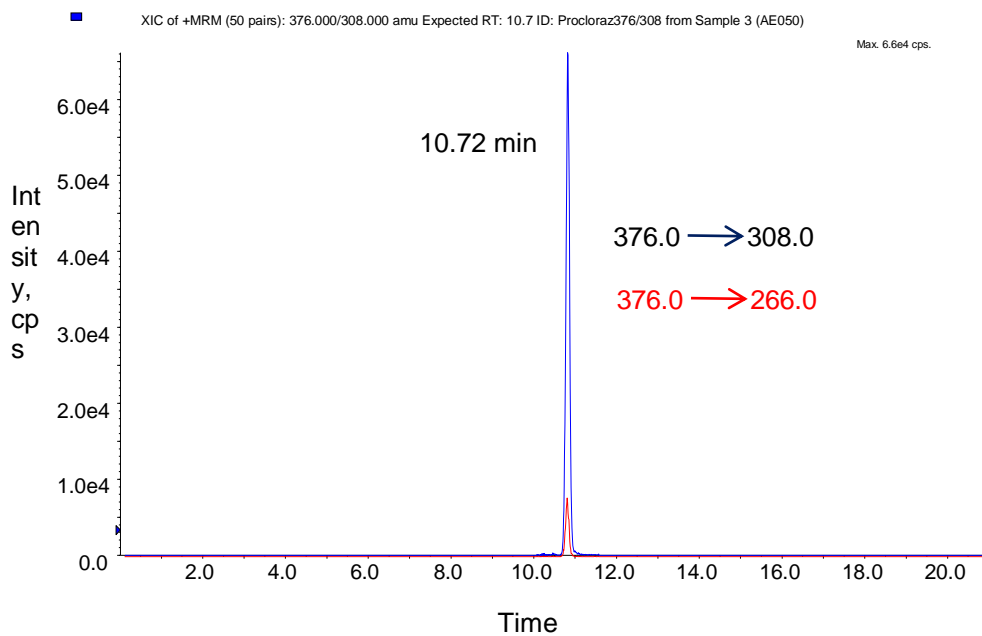


Fig 2 Prochloraz residue identification in lemon essential oil by LC-MS/MS. Residue concentration of 112 $\mu\text{g L}^{-1}$

Pesticide by LC-MSMS	Chemistry family	Codex MRL (mg kg ⁻¹)	UE MRL (mg kg ⁻¹)	<i>t_R</i> (min)	ESI (+/-)	Precursor Ion (<i>m/z</i>)	Product Ion (<i>m/z</i>)	DP (V)	CE (V)
Carbendazim	Benzimidazole		0.7	2.5	(+)	192.1	160.0 132.1	80	22.8 41.9
Thiabendazole	Benzimidazole	7	7	2.6	(+)	202.1	175.1 131.1	100	34 42.9
Imidacloprid	Neonicotinoid	1	1	5.6	(+)	256.1	209.1 175.1	86	22 23
Imazalil	Imidazole	5	5	6.1	(+)	297.0	159.0 255.1	130	32 23
2,4-D	Phenoxyacetic acid	1	1	7.3	(-)	219.0	160.9 124.9	-21	-14 -34
Fludioxonil	Phenylpyrrole	10	10	7.8	(-)	247.0	125.9 179.9	-65	-42 -40
Dithianon	Quinone		1	8.1	(-)	294.9	250.8 158.8	-	-42 -20
Spinosyn A	Spinosyn	0.3 (expressed as Spinosad)	0.3 (expressed as Spinosad)	8.2	(+)	732.5	142.2 98.3	136	43 81
Spinosyn D	Spinosyn			8.6	(+)	746.5	142.2 98.1	66	39 79
Pyrimethanil	Anilinopyrimidine	7	8	9.3	(+)	200.0	107.2 168.2	40	31 37
Prochloraz	Imidazole	10	10	10.7	(+)	376.0	308.0 266	78	15 24
Fenhexamid	Hydroxyanilide		0.01	11.4	(+)	302.0 304.0	97.0	120	34
Boscalid	Pyridinecarboxamide	2	2	11.4	(+)	343.1	139.8 112.2	89	24 27
Iprodione	Dicarboximide		6	12.0	(+)	330.1	245.1 288.0	64	21 16
Propiconazole	Triazole		5	12.4	(+)	342.1	159.0 69.1	46	37 33
Difenoconazole	Triazole	0.6	0.6	12.9	(+)	406.0	251.1 337.0	90	37 21
Pyraclostrobin	Strobirulin	2	1	13.4	(+)	388.1	194.2 163.1	67	17 39
Trifloxystrobin	Strobirulin	0.5	0.5	13.8	(+)	409.3	186.0 206.1	50	22 18
Pesticide by GC-MS					Ionization mode	Quant ion	Ref ion	Ref ion	
2-phenylphenol	Phenol	10	5	11.7	EI	169	170	115	

Table 1 Pesticides, chemistry family, *Codex Alimentarius* and European Union maximum residue level (MRL), retention time (*t_R*), precursor ion, product ion, declustering potential (DP) and collision energy (CE) for each LC amenable analyte and quantitation ion (Quant ion), reference ions (Ref ion) for GC amenable pesticides

Pesticide	Concentration level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)				ME (%)
	10 ($n=5$)		50 ($n=5$)		
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
Boscalid	76.0	12.0	111.3	7.3	-15
Carbendazim	77.0	6.0	97.4	3.0	-47
Difenoconazol	117.3	12.8	107.0	4.0	-36
Fenhexamid	125.7	3.4	97.0	11.0	-6
Imazalil	111.0	10.0	113.7	5.4	-37
Imidacloprid	98.7	8.4	95.4	3.0	96
Iprodione	98.5	5.8	113.6	6.9	-22
Prochloraz	93.5	2.9	110.8	2.9	-10
Propiconazol	106.1	8.7	127.2	3.8	-25
Pyraclostrobin	111.1	14.6	79.0	5.0	-39
Pyrimetanil	99.0	4.9	106.9	2.5	-22
Spinosyd A	87.6	1.6	109.7	2.0	-19
Spinosyd D	109.2	2.5	105.8	4.4	-10
Tiabendazol	89.4	3.9	95.6	3.9	-67
Tryfloxystrobin	99.7	3.6	115.3	3.5	5
2,4 D	92.1	6.7	102.6	5.8	19
Ditianona	93.0	32.2	30.3	16.3	-21
Fludioxonil	126.4	2.8	115.4	2.8	-1

Table 2 Recovery percentages (Rec %) and relative standard deviation (RSD %) values for each concentration level used during the validation of the Q.AOAC method in lemon

Pesticide	Concentration level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Linear range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r ²	ME (%)
	10 (n=5)		100 (n=5)		300 (n=5)					
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)				
Carbendazim	70.6	2.9	87.3	5.0	74.2	5.3	10	10-300	0.9998	-39
Thiabendazole	69.8	5.3	90.5	3.4	70.5	4.7	10	10-300	0.9985	-48
Imidacloprid	-	-	95.6	4.7	92.2	7.0	100	100-300	0.9951	8
Imazalil	87.6	15.4	90.1	3.5	66.3	9.6	10	10-300	0.9933	-4
Spinosyd A	76.0	3.2	98.1	9.4	88.1	4.8	10	10-300	0.9957	-10
Spinosyn D	77.0	2.9	99.0	3.3	86.6	6.2	10	10-300	0.9960	-9
Pyrimethanil	79.6	5.3	95.5	3.5	101.0	13.6	10	10-300	0.9981	-12
Prochloraz	82.1	4.6	94.1	4.5	90.4	4.5	10	10-300	0.9994	-8
Boscalid	77.9	5.8	98.2	3.4	86.8	4.2	10	10-300	0.9979	-9
Fenhexamid	65.3	7.3	96.8	2.8	80.1	2.3	100	10-300	0.9999	-2
Iprodione	81.2	7.8	96.7	5.6	75.9	3.8	10	10-300	0.9971	-16
Propiconazole	77.9	4.7	98.2	3.5	89.2	5.0	10	10-300	0.9985	-10
Difenoconazole	78.5	4.4	99.1	4.2	88.6	3.8	10	10-300	0.9974	-12
Pyraclostrobin	61.4	8.3	99.0	4.1	85.7	3.1	100	10-300	0.9952	-5
Trifloxystrobin	64.9	7.6	95.3	1.2	87.0	3.0	100	10-300	0.9958	-6
2,4-D	-	-	80.0	7.1	75.4	3.2	100	100-300	0.9980	-5
Fludioxonil	76.8	11.9	92.3	5.4	70.8	5.5	10	10-300	0.9956	-12

Table 3 Pesticide, percentage of recovery (Rec %) and reproducibility (RSD %) for 10, 100 and 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ concentration levels; limit of quantitation (LOQ), linear range, and percentage of matrix effect (ME %) for each analyte in concentrated lemon juice using 2.5 g of sample.

Pesticide	Repeatability (RSD %)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	ME (%)
Carbendazim	2.6-3.9	10	10-200	0.9995	-41
Thiabendazole	0.8-5.8	10	10-200	0.9997	-65
Imidacloprid	1.3-9.7	25	25-200	0.9997	-19
Imazalil	4.8-8.9	25	25-200	0.9997	-62
Fludioxonil	1.0-3.9	10	10-200	0.9998	-22
Spinosyn A	2.1-6.5	10	10-200	0.9999	-71
Spinosyn D	4.4-10.6	10	10-200	0.9998	-69
Pyrimethanil	0.6-4.4	10	10-200	0.9993	-62
Prochloraz	1.5-5.5	10	10-200	0.9998	-46
Fenhexamid	3.9-8.5	50	50-200	0.9990	-67
Propiconazole	0.9-4.3	10	10-200	0.9999	-45
Difenoconazole	0.3-2.2	10	10-200	0.9998	-62
Pyraclostrobin	0.9-1.9	10	10-200	0.9994	-49
Trifloxystrobin	1.6-4.0	10	10-200	0.9998	-91
2-phenylphenol	4.3-10.4	100	100-500	0.9990	73

Table 4 Pesticide, repeatability (RSD %), quantitation limit ($\mu\text{g L}^{-1}$), linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$), correlation coefficient (r^2) and percentage of matrix effect (ME %) for each analyte in lemon essential oil