

DETERMINACIÓN DE ORTOFENILFENOL EN PRODUCTOS CÍTRICOS. INCIDENCIA DE LA CARGA RESIDUAL EN FRUTA SOBRE LOS ACEITES ESENCIALES

SUBOVICH, G. E.; MONTTI, MA. I. T.; LESIEUX, L.R. (1)

(1) Laboratorio de Investigación de Residuos en Alimentos, Facultad de Ciencias de la Alimentación, U.N.E.R., Av. Mons. Tavella 1450-Concordia-Entre Ríos-Argentina, Tel/Fax: 0345-4231450 subovg@fcal.uner.edu.ar

Palabras claves: Ortofenilfenol, cítricos, aceites esenciales

1. Resumen

Los aceites esenciales son productos de relevante impacto económico en la industria cítrica. La Argentina se encuentra entre los principales exportadores de aceites esenciales del mundo, fundamentalmente el obtenido a partir de limón.

Es factible que las frutas tratadas con plaguicidas que son procesadas industrialmente presenten residuos de dichos plaguicidas en sus subproductos, en estrecha relación con los niveles residuales de la fruta utilizada como materia prima.

La exigencia actual de los mercados requiere un estricto control de dichos residuos, siendo uno de los factores de calidad de fundamental importancia a considerar al momento de la comercialización.

Los objetivos de este trabajo fueron desarrollar una metodología analítica adecuada para la determinación de Ortofenilfenol por HPLC con detector de Fluorescencia y establecer la incidencia de la carga inicial de residuos de dicho plaguicida en frutas sobre los residuos de los aceites esenciales.

Se optimizó el proceso extractivo con acetonitrilo, se estableció la composición de la fase móvil de trabajo y las condiciones cromatográficas.

La linealidad se determinó a partir de las respuestas cromatográficas existiendo una correlación lineal para: estándares, fruta y aceite adicionados.

El método es preciso, con recuperación elevada del analito y adecuada sensibilidad para la determinación a niveles trazas de Ortofenilfenol en frutas y aceites esenciales.

Los límites de detección y cuantificación del método para las muestras, oscilaron en un rango de 0,01 a 0,09 y 0,03 a 0,30 ppb respectivamente.

Se compararon rectas de regresión observándose diferencias significativas en las ecuaciones de la recta, indicando la presencia de efecto matriz considerable, por lo que será necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas en la determinación de Ortofenilfenol en muestras reales.

Los valores medios de recuperación del método obtenidos para fruta y aceite fueron del 94,76% y 97,54% respectivamente. Los parámetros estadísticos permitieron establecer que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100%.

Las muestras de fruta provenientes de la industria presentan una carga inicial de residuos de Ortofenilfenol y se observa una posible persistencia de la carga inicial de estos residuos sobre los aceites esenciales obtenidos.

El proceso de lavado en la línea de producción logra reducir los residuos de la carga inicial en aproximadamente un 40%. Los valores indican que para aceite pulido y aceite descerado, los residuos de la carga inicial de Ortofenilfenol en fruta, persisten en un rango comprendido entre 1,51 - 1,66% y 1,54 - 1,70%, respectivamente.

2. Introducción

Actualmente nuestro país se sitúa como uno de los más importantes exportadores de frutos cítricos frescos, jugos concentrados, cáscara deshidratada, pulpa congelada y aceites esenciales, principalmente de limón. En la provincia de Entre Ríos la producción de cítricos está localizada sobre la costa del Río Uruguay en los departamentos de Concordia, Federación y Norte de Colón. Esta provincia es la principal productora de naranja, con más de un 46% de la producción nacional y un 63% de la producción nacional de mandarina. En cuanto al pomelo se distingue Salta con el 76% del total nacional y con respecto a la producción de limón la líder es Tucumán con más del 87% sobre el total.

Estos productos definen su valor en el mercado externo en función de sus propiedades y características fisicoquímicas, siendo uno de los factores de calidad de fundamental importancia a considerar al momento de la comercialización, el contenido de residuos de plaguicidas en el producto, el cual se encuentra en estrecha relación con los niveles residuales en la fruta que se utiliza como materia prima.

La calidad y cantidad de los aceites esenciales depende de la variedad y madurez de la fruta, como de la localización de la plantación. Los aceites esenciales prensados en frío pueden destilarse para producir diferentes fracciones de aromas para uso en la industria de bebidas. La metodología de extracción es de fundamental importancia en la calidad de los aceites. El rendimiento de extracción en fruta fresca es de aproximadamente un 0,4 % en limón, 0,2 – 0,4% en naranjas y 0,2 % en pomelos.

Dentro de los tratamientos previos a los que se someten las frutas, la aplicación de plaguicidas, constituye uno de los más relevantes en cuanto a la calidad de los productos que de ellas se obtienen (Montti y Col., 1998). Es de especial interés disponer de la información correcta respecto a los fitosanitarios utilizados en los tratamientos (drencher y/o empaque), la forma en que se depositan, la penetración y persistencia en el tejido vegetal, niveles residuales en frutos y productos derivados, dado que la presencia en línea de producción industrial de fruta con diferentes niveles residuales tendrá incidencia en los distintos subproductos obtenidos.

El Ortofenilfenol (OPP) es un fungicida de post-cosecha utilizado como bactericida, biocida y cicatrizante en prácticas agrícolas modernas. Generalmente se aplica en el lavado de la fruta en forma conjunta con detergentes en cortina de espuma, en forma de sal sódica y como baño o aspersion. También se lo emplea en la desinfección de cajas y envoltorios de cítricos. Su acción es preventiva de contacto. Tiene propiedades fungicidas y fungistáticas.

Debido a la naturaleza del tejido de las frutas cítricas y las propiedades fisicoquímicas del fungicida, es factible su persistencia en las vesículas oleosas. Los niveles residuales de OPP en los aceites esenciales de las frutas cítricas, comprometen seriamente las exportaciones de estos productos, dado que las normativas de los mercados importadores, son cada vez más exigentes. En tal sentido, en nuestro país, como uno de los mayores exportadores mundiales de aceite esencial de limón, se hace relevante el interés por el desarrollo de metodologías analíticas que permitan la determinación cuantitativa de OPP tanto en fruta, como en sus derivados.

Es de gran importancia lograr un equilibrio entre el uso de plaguicidas y el sector agroindustrial, los mercados internos y de exportación, el medio ambiente, el consumidor, etc., tratando de compatibilizar acciones que tiendan a optimizar la producción citrícola hacia el uso de bajas dosis de plaguicidas, así como la posibilidad de facilitar métodos analíticos de control acordes a las necesidades del sector.

3. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- Lograr una metodología analítica adecuada para la determinación de Ortofenilfenol por Cromatografía Líquida de Alta Performance con detector de Fluorescencia
- Establecer la incidencia de la carga inicial de Ortofenilfenol presente en la fruta sobre los aceites esenciales obtenidos industrialmente.

4. Metodología

Las muestras de frutas y aceites esenciales corresponden a la variedad Valencia.

Para establecer el plan de muestreo se tuvieron en cuenta las normativas establecidas, a fin de asegurar la representatividad de la muestra, procedimientos de recolección, trazabilidad, identificación del lote, transporte y conservación durante el muestreo en la línea de producción y en el laboratorio. El plan de muestreo se efectuó en función de la naturaleza y disponibilidad de las muestras en la línea de producción de la industria, para cada tipo de matriz: fruta cítrica y aceites esenciales. Se coordinó con el personal profesional de la industria para la efectiva y adecuada toma de muestra de las dos matrices a estudiar.

Los puntos de muestreo considerados y la identificación correspondiente fueron: **frutas ingreso** (al ingreso de la línea), **frutas poslavado** (antes de su ingreso a la extractora), **aceite esencial pulido** (a la salida de la centrifuga pulidora) y **aceite esencial descerado** (del tambor del lote correspondiente a aceite descerado a temperaturas de -18°C durante 15 a 30 días). El intervalo de muestreo en la línea de producción para las muestras de frutas, fue de 120 minutos por cada turno laboral. Una vez puesto el sistema en régimen se efectuaron los muestreos de las restantes matrices, quedando los tiempos condicionados al proceso de obtención de los aceites esenciales. Se efectuaron 5 muestreos de la variedad elegida.

Las muestras de frutas fueron conservadas en bolsas de red en cámaras, los aceites en frascos de vidrio color caramelo con tapa plástica y contratapa de teflón o aluminio.

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

Preparación de estándares y muestras adicionadas

Se prepararon quintuplicados de soluciones estándares de OPP, de frutas y aceites adicionados. Para la determinación de precisión se utilizaron muestras $n=10$ y $\alpha=0,5$ a diferentes concentraciones.

Tratamiento previo de las muestras

Frutas Cítricas: En tubo de centrifuga de 25ml, la fruta es exactamente pesada, aproximadamente 5gr, se adicionan 5gr de Na_2SO_4 , 1gr de ClNa y 10ml de Acetonitrilo. Se agita en Vortex durante 3 a 5 minutos y luego se centrifuga 5min a 4000rpm a fin de extraer la fase sobrenadante. Los diferentes extractos son mezclados y filtrados con Na_2SO_4 a través de filtro Whatman N° 90. Volumen final de la muestra: 25ml.

Aceites Esenciales: En tubo de centrifuga de 10ml, el aceite es exactamente pesado, alrededor de 1gr, se adiciona 1ml de AcN y se agita vigorosamente durante unos minutos. La mezcla es llevada a baja temperatura por 10 minutos. La fase sobrenadante es extraída, repitiéndose el proceso. Se mezclan las extracciones y filtran a través de membranas de $0,45\mu$. Volumen final: 8ml.

Equipamiento

Cromatógrafo Shimadzu HPLC modular LC-20A Prominence. Inyección de la muestra a través de muestreador automático para 105 viales con separación cromatográfica en forma isocrática. Horno Shimadzu CTO-20A con columna VP ODS 250 x 4.6mm. Software CLASS-VP versión 6.14 SP1. Detector de Fluorescencia RF-10AXL, que permite regular la sensibilidad y ganancia de las respuestas cromatográficas a obtener.

Determinación de las condiciones cromatográficas

A partir de soluciones de estándar se establecieron todos los parámetros cromatográficos correspondientes. Las longitudes de onda adoptadas para el trabajo fueron 285nm y 304nm de excitación y emisión respectivamente (Bahruddin Saad, et al, 2003). Velocidad de flujo de 1,4ml/min y temperatura del horno de 35°C.

Selección de la Fase Móvil

Se efectuaron diversos ensayos a fin de establecer la fase móvil más adecuada, siendo la elegida una solución buffer de $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 0,005M y Acetonitrilo como componente orgánico, en la siguiente proporción Buffer:Acetonitrilo (48:52 v/v).

Determinación de parámetros estadísticos

Todo el tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa Statgraphics Centurion XV Corporate (2007).

A fin de determinar la curva de linealidad, intervalo de confianza, precisión, recuperación, límites de detección y cuantificación del método; se procesaron quintuplicados de estándares de OPP (0,5, 0,75, 1, 2, 10, 20, 50, 100, 250, 500, 700, 1000, 1300 y 1500 ppb), fruta adicionada (100, 250, 700, 1000, 1300 y 1500 ppb) y aceite adicionado (1, 10, 20 y 50 ppb). De las concentraciones de 5ppb de estándares y aceite adicionado y 500ppb de fruta adicionada se prepararon 10 muestras para el cálculo de precisión.

El análisis unidimensional de los datos obtenidos en altura de pico incluye las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma. En estos casos, el valor del coeficiente de asimetría estandarizado y el del coeficiente de curtosis están dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

De este análisis se determinó la independencia de los residuos a partir del estadístico de D. Watson (p -valor $>$ a 0,05). Además, el Test de Kolmogorov (p -valor $>$ 0,10) indicó una distribución normal de los mismos, para un nivel de confianza del 95%.

Se compararon rectas de regresión realizando un análisis de regresión múltiple, residuos (D.Watson), R-cuadrado y test ANOVA para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y puntos de corte para los diferentes valores al 99% de confianza.

Los Límites de Detección y Cuantificación se estimaron a partir de la curva de regresión para bajas concentraciones de los analitos.

5. Resultados

De los datos obtenidos se pudieron realizar las gráficas correspondientes de Regresión Lineal tanto para estándares de OPP, como para fruta adicionada y aceite adicionado.

Del análisis estadístico se determinó que, para un nivel de confianza del 95%, estas distribuciones son normales, existiendo una correlación lineal entre las concentraciones y las respuestas cromatográficas expresadas como alturas para los tres casos estudiados.

Precisión

Los resultados y los datos estadísticos correspondientes a soluciones de 5ppb para estándares y aceite adicionado y de 500 ppb para fruta adicionada ($n-1=9$ y $\alpha=0,05$), pueden observarse en la TABLA 1.

TABLA 1. Datos de precisión

	Estándar en AcN	Fruta adicionada	Aceite adicionado
Concentración (ppb)	5	500	5
Media (altura)	8959	156238	3798
Desviación típica	47	169	56
Coef. de Variación	0,52	0,11	1,48
Intervalo de confianza	± 34	± 121	± 40

Límites de Detección y Cuantificación

A partir de las curvas de regresión determinadas para soluciones a bajas concentraciones de estándares, fruta y aceite adicionado, se determinaron los Límites de Detección y de Cuantificación ($\alpha=0,05$, $n=5$). Los valores obtenidos fueron: estándares, 0,06 y 0,22ppb, fruta adicionada 0,09 y 0,30ppb y para aceite adicionado, 0,01 y 0,03ppb respectivamente.

Comparación de líneas de regresión

La comparación de rectas de regresión de estándares, fruta y aceite adicionados pueden observarse en las FIGURAS 1 y 2, existiendo diferencias estadísticamente significativas tanto para las pendientes como para los puntos de corte para los diferentes valores correspondientes a las curvas.

Según lo observado el efecto matriz es significativo, de manera tal que, en la determinación de OPP en muestras reales, tanto de fruta como de aceite, será necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas a fin de establecer la curva de linealidad correspondiente.

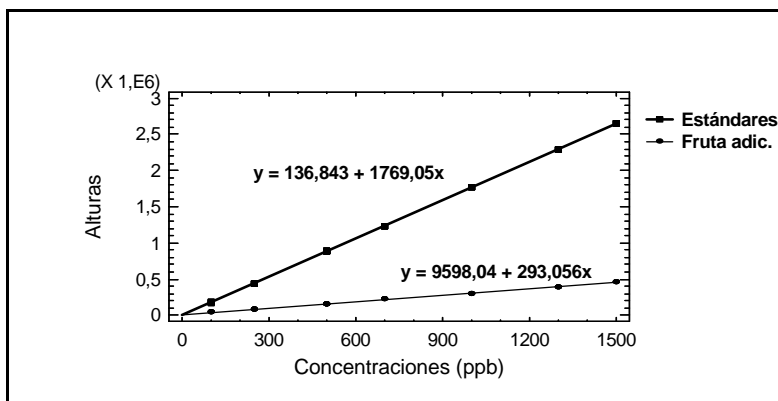


FIGURA 1. Comparación de rectas: estándares vs. fruta adicionada

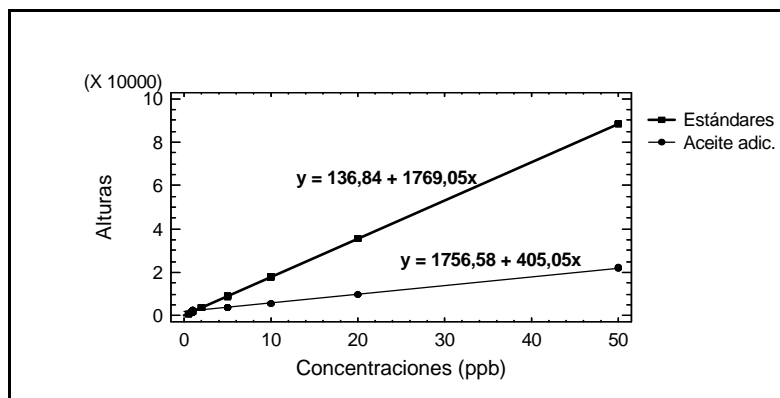


FIGURA 2. Comparación de rectas: estándares vs. aceite adicionado

Recuperación

La recuperación del método fue efectuada a partir de quintuplicados de muestras adicionadas a diferentes concentraciones, siendo los valores medios obtenidos para fruta y aceite del 94,76% y 97,54% respectivamente. Las desviaciones estándar y los coeficientes de variación relativa fueron de 0,58 y 0,61 RSD% para fruta, 0,49 y 0,52 RSD% para aceite. Los parámetros estadísticos permitieron establecer que no existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100%.

Resultados línea de producción industria

La metodología analítica desarrollada fue aplicada a muestras provenientes de la industria cuya trazabilidad indicaba factible presencia de residuos de OPP. Según el plan de muestreo previamente establecido, se efectuaron 5 muestreos de frutas al ingreso de la línea, fruta poslavado, aceite esencial pulido y aceite esencial descerado. Los resultados obtenidos se detallan en TABLA 2.

TABLA 2. Muestras de línea de producción industrial

<i>Variedad Naranja Valencia</i>	<i>Valores medios OPP (n=5 $\alpha=0,05$)</i>				
Carga inicial fruta (ppb)	4043	3796	3646	3980	3763
Fruta poslavado (ppb)	2425	2235	2162	2398	2205
A. esencial pulido (ppb)	22324	19151	19098	20518	19015
A. esencial descerado (ppb)	22863	19620	19541	21097	19345
% persistencia fruta poslavado	59,98	58,88	59,30	60,25	58,60
% persistencia en A. pulido	1,66	1,51	1,57	1,55	1,52
% persistencia en A. descerado	1,70	1,55	1,61	1,59	1,54

Podemos observar, una disminución en los valores medios de OPP en frutas poslavado, respecto a la carga inicial de residuos en la fruta de ingreso. Esto puede atribuirse al proceso de lavado en la línea de producción, que no logra, sin embargo, la total eliminación de los residuos, puesto que sólo es de aproximadamente un 40%.

Teniendo en cuenta que en los procesos industriales de obtención de aceites esenciales de naranja, por cada tonelada (Tn) de fruta procesada el porcentaje de aceite que puede obtenerse oscila entre un 0,2 y un 0,4%, se determinaron los porcentajes relativos de

residuos para los mismos considerando un valor medio del 0,3%. Los valores indican que para aceite pulido y aceite descerado, los residuos de la carga inicial de OPP en fruta, persisten en un rango comprendido entre 1,51 - 1,66% y 1,54 - 1,70%, respectivamente.

6. Conclusiones

El método desarrollado es preciso tanto para la fruta como para los aceites esenciales, la recuperación del analito es elevada, responde con adecuada sensibilidad en la detección y cuantificación para la determinación a niveles trazas de Ortofenilfenol.

Las muestras de fruta provenientes de la industria presentan una carga inicial de residuos de OPP. Se observa una posible persistencia de la carga inicial de estos residuos sobre los aceites esenciales obtenidos. El proceso de lavado en la línea de producción logra reducir los residuos de la carga inicial en aproximadamente un 40%.

Por otro lado, el proceso de descerado de los aceites produce, aunque discreta, una reducción de masa, por lo que, el ligero incremento de los residuos en los aceites esenciales descerados con respecto a los pulidos, puede deberse a un simple proceso de concentración de los mismos.

La adopción de esta metodología por el sector citrícola podría permitir un control adecuado de los productos comercializados en el mercado. Por otro lado, cobra relevancia lograr el equilibrio entre el uso de plaguicidas y el sector agroindustrial, los mercados internos y de exportación, el medio ambiente, el consumidor, etc., tratando de compatibilizar acciones que tiendan a optimizar la producción citrícola.

7. Bibliografía

- Bahruddin Saad, Noor Hana Haniff, Muhammad Idiris Saleh, Noor Hasani Hashim, Ahamad Abu, Norhayati Ali. 2003. Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry* 84 (2004) 313–317. Elsevier Science B.V.
- Cohn, R., Cohn, A. L. 1996. The by-products of fruit processing. En: Arthey, D., Ashurst, P. R. (eds). *Fruit Processing*. Chapman & Hall. London.
- Kimball, D.A. 1999. *Citrus Processing*. 2° Ed. An Aspen Publication.
- Mazzuz, C.F. *Calidad de frutos cítricos. Manual para su gestión desde la recolección hasta la expedición*. Edición de Horticultura. Barcelona. 1996.
- Montti M. et al. (1998). Penetración y Persistencia del Thiabendazole en Naranja Valencia y Jugos Concentrados. *Estratto da Essenze - Derivati Agrumari - Anno LXVIII n.2*, 124-139.
- Pérez-Aparicio, Jesús; Zapata-Soberá, Luz; Lafuente-Rosales, Victoria; Toledano-Medina, Ma. Angeles. 2007. Resultados comparados entre tratamientos postcosecha en naranjas cv “Salustiana” y cv “Valencia” (II). V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones.
- Quattrocchi, Oscar A; Albelaira, S; Laba, R. *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*. Artes Graficas Farro S.A. Buenos Aires. 1999
- Saad, B.; Haniff H. N. ; Saleh, I. M.; Abu, A.; Ali, N.; Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry* 84. 313-317-2004
- SAGPYA. Mercado de Frutas: Perfil del Mercado de Cítricos. Dirección URL: http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil_citricos_2007.pdf. 2007.