

DETERMINACIÓN DE TRIAZOLES EN JUGOS NATURALES Y PROCESADOS DE ARÁNDANOS POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA GASEOSA

MONTTI, M; CHAULET, M.; VISCIGLIO, S.; SUBOVICH G; RAVIOL H.; MUNITZ M.; LESIEUX L.; WILLIMAN C.; GERARD, J.

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

Palabras Claves: Triazoles, Jugos Arándanos, Microextracción fase sólida, cromatografía gaseosa

1. Resumen

El cultivo de arándanos surge en la Argentina como una nueva alternativa de producción orientada a la exportación. Dado que no toda la producción tiene la calidad exigida internacionalmente, existe en los empaques un volumen importante de fruta remanente. A fin de optimizar la rentabilidad y agregar valor a la producción, ha comenzado en la región el desarrollo de diferentes subproductos, tales como frutas deshidratadas y jugos de arándanos. Las progresivas exigencias de los mercados, respecto a productos libres o con bajos niveles de plaguicidas, requieren de un adecuado manejo de la producción. Las enfermedades fúngicas son las principales causales de pérdidas en los cultivos y la aplicación de fungicidas, tales como los triazoles, son necesarios para su control. Siendo factible la presencia de los mismos en frutas y consecuentemente, en los jugos procesados. Se plantearon como objetivos, la determinación por cromatografía gaseosa de triazoles en jugos de arándanos. Las muestras fueron obtenidas en planta piloto, por procesos extractivos y tratamiento enzimático, identificándose como jugos procesados y los sin tratamiento, como jugos naturales. La metodología extractiva fue la microextracción en fase sólida con fibra de Carbowax/divinilbenceno, 15 minutos de inmersión, agitación magnética de 2000 rpm, pH 7 y volumen de muestra de 100ml. Se determinaron las curvas de regresión lineal para triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole, a partir de soluciones acuosas de estándares y muestras de jugos adicionadas, por cromatografía gaseosa con detector de nitrógeno-fósforo. Los parámetros estadísticos de los resultados indicaron que existen diferencias significativas en las rectas, existiendo efecto matriz, por lo que para muestras incógnitas se debió calibrar con muestras adicionadas. El método es lineal, preciso, de elevada exactitud y sensibilidad, los límites de cuantificación para estándares y jugos, oscilaron en un rango de 0,10 - 0,26 y 0,25 - 0.50ppb. Los porcentajes de recuperación fueron entre 95,6 y 98,6%. Las rectas de regresión para jugos naturales y procesados, también muestran diferencias significativas. Se efectuó la identificación de los analitos por espectrometría de masa. De los 15 muestreos para jugos naturales, sólo 5 muestras evidenciaron presencia de residuos de propiconazole y 3 con tebuconazole, en un rango de 15 a 30 y 25 a 36 ppb respectivamente. En jugos procesados de los mismos lotes anteriores, los niveles fueron un 45 a 50% menor, debido posiblemente a los tratamientos enzimáticos de estos últimos. La transferencia al sector se consideró de relevancia.

2. Introducción

En Argentina el cultivo de arándanos es muy reciente, pero ha alcanzado un notable crecimiento de producción e importante desarrollo de sus exportaciones. En nuestra región, una de las principales variedades cultivadas son la O`Neal y Misty como variedad temprana (Seidán, 2008).

El fruto es una baya casi esférica de 7 a 15 mm. de color azul claro a oscuro, de alto valor nutritivo y propiedades antioxidantes (Clifford, 2000; Arakelian, 2005; Raffer J. 2002). Son frutos climatéricos, es decir que, cosechados a partir de la madurez fisiológica, son capaces de adquirir características similares a los unidos al arbusto. Sobreviene muy rápidamente la sobremadurez, asociada a una pérdida de calidad, por lo que una vez cosechados, deben ser enfriados lo más rápido posible. Son susceptibles al desarrollo de enfermedades, en su mayoría causadas por hongos, produciendo importantes pérdidas sino son controladas.

El cultivo del arándano requiere de adecuadas prácticas agrícolas, es viable con un buen soporte técnico y comercial, aunque debe considerarse en cuanto a la magnitud de la oferta global y no incidir negativamente en el mercado con sobreproducción

El frío y el uso de atmósferas modificadas o controladas, son las técnicas más ampliamente utilizada para reducir el deterioro postcosecha de las frutas, ya que disminuye la respiración, deprime el metabolismo de los frutos e inhibe el crecimiento de hongos y bacterias. (Zheng et al.2008). La temperatura óptima para conservar la fruta es cercana a 0°C, con una humedad relativa entre 90 y 95%. Estas condiciones permiten mantener la calidad durante alrededor de 14 días. Concentraciones de O₂ entre 8% y 10% y de CO₂ entre 10% y 13% han logrado mantener la calidad de los arándanos entre 5 y 8 semanas a 0-1°C, aunque estas metodologías son costosas (Yommi y Godoy, 2008; Spotts et al., 2002).

Sin embargo, no toda la producción tiene la calidad exigida internacionalmente, existiendo en los empaques un volumen importante de fruta remanente, que al no poder exportarse, genera además del problema económico, un serio inconveniente para su conservación. A fin de optimizar la rentabilidad y agregar valor a la producción, ha comenzado en la región el desarrollo de diferentes subproductos, tales como frutas deshidratadas y jugos de arándanos.

Por otro lado, es necesario destacar que, las progresivas exigencias de los mercados, respecto a productos libres o con bajos niveles de plaguicidas, requieren de un adecuado manejo de la producción. Las prácticas de cultivo siguen siendo las tradicionales, es decir que las enfermedades fúngicas, principales causales de pérdidas en los cultivos, son controladas por la aplicación de fungicidas, tales como los triazoles. Lo que conlleva suponer, la factible la presencia de residuos de los mismos, en frutas y consecuentemente en los jugos procesados.

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar los niveles residuales de los fungicidas triazólicos en los jugos procesados y naturales de arándanos, aplicando metodologías analíticas optimizadas para frutas (Charlton y Jones, 2007; Dietz, et al., 2006; Trösken, et al., 2005; Albero et al., 2005).

3. Materiales y Métodos

El equipamiento más relevante y reactivos calidad cromatográfica, se detallan a continuación: Etilacetato (Merck). Estándares certificados de Triadimefon, Penconazole, Propiconazole y Tebuconazole (Accu Standard Inc.). Agua grado 1. Hidróxido de sodio (Merck). Fibras de sílica fundida recubiertas con: Polidimetilxilosano (PDMS), Poliacrilato (PA) y Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB); de 100, 85 y 65 μm respectivamente.

Cromatógrafo gaseoso Modelo 5890 Serie II y Cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard GC 6890, con columnas capilares HP5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Liner de 0.75 mm de diámetro interno. Con detectores de Nitrógeno-Fósforo (NPD) y Detector Selectivo de Masa (MSD) HP 5973, respectivamente. ChemStation HP. Biblioteca NIST y RTLPEst. Agitador magnético Mistral Large Magnestir II, con sistema aislante para mantener la temperatura constante.

Las muestras corresponden a jugos procesados y naturales de arándanos, los mismos. se obtuvieron a partir de diferentes partidas de frutas provenientes de diversos empaques. Se seleccionaron los lotes correspondientes a la misma variedad, aunque no siempre esto es factible, ya que las frutas de descarte generalmente están mezcladas.

Las frutas se procesaron en planta piloto y la metodología de obtención del producto final fue diferente, para *jugos procesados* o clarificados por tratamientos enzimáticos, y los sin tratamiento, identificados como *jugos naturales*.

Las bayas son pesadas, lavadas, trituradas y posteriormente tratadas con determinadas enzimas. Luego se filtra y se efectúa el segundo tratamiento enzimático; se reitera el filtrado, agregado de conservantes, pasteurización y envasado. Las características del jugo final, entre otras, fueron de 9,3° Brix, acidez de 0,39 %, expresada como gramos de ácido cítrico/100ml, y un ratio de 23,56.

Plan de Muestreo

Los lotes fueron identificados según el día de producción y se efectuaron tres (3) muestreos por producción y por triplicado, con un total de 15 muestreos. El volumen de muestra se estableció en 500 ml. El submuestreo o preparación de las muestras para el análisis, se efectuó a partir de la combinación de muestras primarias de un lote de productos preenvasados, se obtuvo una *muestra compuesta* o muestra de laboratorio que fueron conservadas en recipientes rotulados, precintados y refrigeradas hasta su procesamiento.

El tratamiento previo de las muestras es más simple, ya que es sólo una dilución acuosa y ajuste de pH a neutralidad. A fin de establecer el rango lineal del método, se prepararon por quintuplicados, soluciones acuosas de jugos de arándanos adicionados de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole de 100 ml, a: 50- 25- 10- 2,5 y 1,0 ppb.

En investigaciones previas para este tipo de matriz, se optimizó la metodología de microextracción en fase sólida, seleccionándose para el proceso las siguientes condiciones: pH 7, agitación magnética de 2000 rpm y 15 minutos de inmersión del polímero CWX/DVB (Goncalves y Alpendurada, 2002; Pawliszyn, 1997).

Las condiciones cromatográficas se establecieron en 3 minutos de desorción, inyector a 250 °C, horno a 80°C durante 3,5 minutos y rampa de 55°/min hasta 280°C durante 8,5 minutos y detector (NPD) a 300°C.

La cuantificación e identificación de estos analitos se efectuaron por cromatografía gaseosa, con detector de nitrógeno fósforo e identificación de los iones target e iones cualificadores por espectrometría de masas (Ouyang et al., 2005; Zambonin, et al., 2002).

A partir de las respuestas cromatográficas, se efectuó el análisis unidimensional de las observaciones, coeficientes de variación, desviación estándar, intervalos de confianzas, se determinó la linealidad del método y evaluaron los parámetros estadísticos correspondientes a fin de disponer de una metodología adecuada que posibilite controlar los factibles niveles residuales de los fungicidas en los jugos correspondientes (Dejaegher y Vander Heyden, 2007; Trösken et al., 2005; Soleas et al., 2000; Athanasopoulos et al., 2003).

4. Resultados y Conclusiones

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

Los resultados obtenidos a partir de las respuestas cromatográficas expresados en alturas y áreas de pico, indicaron en el análisis unidimensional de las observaciones, que proceden de una distribución normal, los coeficientes de variación para todas las muestras estuvieron en el rango adecuado. Se graficó la curva de regresión lineal, intervalos de confianza, el histograma y la curva de trazas de densidad de residuos, para soluciones acuosas de jugos procesados y naturales de arándanos adicionadas.

Se identificaron cromatográficamente los enantómeros I y II para propiconazole, expresándose los resultados individualmente (Wang, et al., 2005).

En las figuras (1) y (2), se pueden observar los resultados correspondientes a los diferentes analitos extraídos de dichas muestras adicionados a 50- 25- 10- 2,5 y 1,0 ppb, en las condiciones establecidas para n=5 y $\alpha= 0,05$.

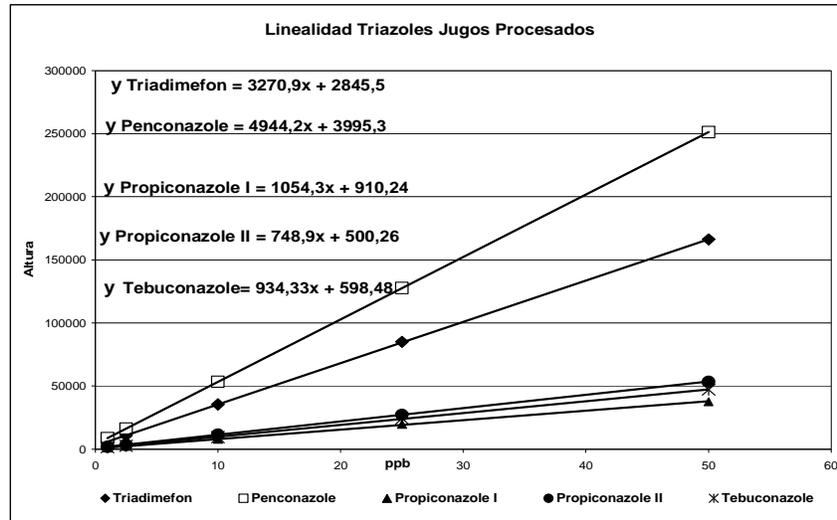


Figura 1.- Regresión Lineal Triazoles Jugos Procesados de Arándanos

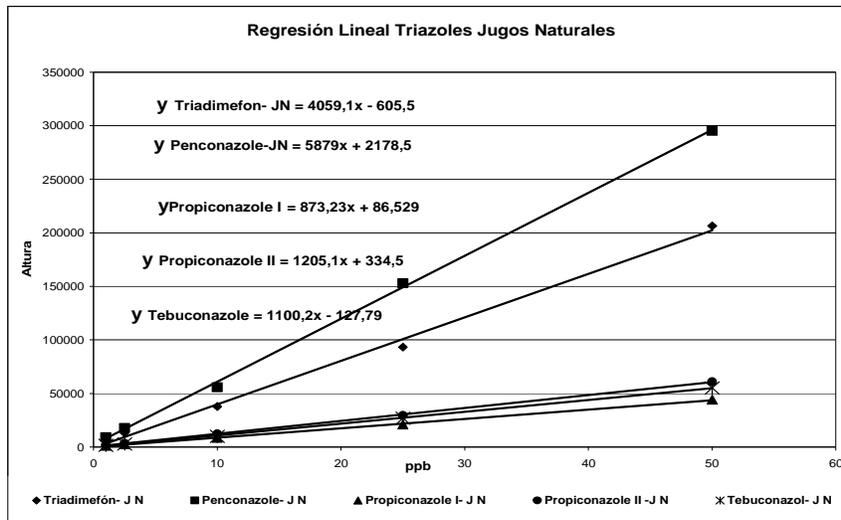


Figura 2. Regresión Lineal Triazoles Jugos Naturales de arándanos

Los parámetros estadísticos permitieron establecer la idoneidad del modelo ajustado. Se determinó la independencia de los residuos a partir del estadístico de Durbin Watson (P-valor).

Mediante el test de Kolmogorov (P-valor) se determinó si los residuos proceden de una distribución normal para un nivel de confianza de al menos un 90 %.

Se estableció la ecuación de la recta y el estadístico R² que indica la relación entre las variables (respuestas cromatográficas vs. concentración).

Se efectuó la comparación de las rectas de regresión para estándares vs. jugos procesados y naturales adicionados, y el análisis estadístico de ANOVA indicó las diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y puntos de corte para los diferentes valores al 99% de nivel de confianza. Podemos concluir que existe efecto matriz, y por lo tanto, para la determinación de muestras de jugos de arándanos, en ambos casos, es necesario calibrar con muestras adicionadas.

La precisión del método fue determinada a partir de soluciones de jugos procesados de arándanos adicionados de triadimefon, penconazole, propiconazole (I- II) y tebuconazole, a 50- 25- 10- 2,5 y 1,0 ppb, para n= 10 mediciones individuales con v = n-1 grados de libertad y $\alpha = 0.05$. Dado que los RSD% oscilaron entre 0,20 y 1,75% el método pudo ser considerado preciso.

De las curvas de regresión correspondientes, n= 30 determinaciones individuales y $\alpha = 0,05$, se estimaron los límites de detección y cuantificación, calculados a partir de las ecuaciones correspondientes, en las que se considera 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, para n determinaciones individuales. Siendo para triadimefon, propiconazole I, propiconazole II, y tebuconazole de 0,18-0,25; 0,19-0,26; 0,21-0,38; 0,23-0,43 y 0,26-0,49 ppb respectivamente.

La recuperación del método se determinó para soluciones acuosas de jugos procesados de arándanos adicionadas de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole a 50- 10- 2,5 y 1 ppb, n=20 $\alpha = 0,05$ - $t_{\text{tabla}} = 2,093$, en las mismas condiciones de extracción y a partir de las curvas de calibración respectivas. Los resultados se pueden observar en la tabla (1)

Tabla 1. Recuperación Triazoles - Jugos de Arándanos

Analitos	Recuperación Media %	Desviación Estándar	RSD%	t calculado
Triadimefon	97,70	0,82	0,84	0,61
Penconazole	95,60	0,88	0,92	1,07
Propiconazole I	97,20	1,62	1,67	0,38
Propiconazole II	97,45	1,10	1,13	0,51
Tebuconazole	98,60	0,85	0,86	0,36

Dado que $t_{ob} < t_{tabla}$, para todos los analitos, podemos establecer que, no existe diferencia significativa con el 100 % de recuperación y la exactitud es apropiada.

Los resultados para ambos jugos presentan diferencias significativas, factiblemente atribuibles a la naturaleza de la matriz, al proceso enzimático al que fueron sometidos los jugos en planta, a su composición final y a otros factores indeterminados. La clarificación posterior de los jugos, es otro factor con factible incidencia en la composición final de los jugos, que sumado a los anteriores, pueden ser los causales de estas diferencias

Teniendo en cuenta que, la clarificación enzimática de jugos es generalmente utilizada en la industria, necesariamente las muestras representan lo que, comercialmente dispone el consumidor.

El control de calidad de frutas y jugos de arándanos, respecto a los factibles niveles residuales de estos plaguicidas, hacen relevante la aplicación de esta metodología en dichos productos al momento de su comercialización.

5. Bibliografía

- Albero, B.; Sánchez-Brunete, C. & Tadeo, J.L. (2005). Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 66, 917-924.
- Arakelián, J.P. (2005). Aspectos generales de la producción y comercialización de arándanos. <<http://www.agroalternativo.com.ar/docs/arandanos.htm>> Consulta 2006.
- Athanasopoulos, P.E.; Pappas, C.; Nikolaos, J.; Kyriakidis, V. (2003). Decomposition of myclobutanil and triadimefon in grapes on the vines and during refrigerated storage. *Food Chemistry* 82, 367–371
- Charlton, A.J.A. & Jones, A. (2007). Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1141, 117-122.
- Clifford, M.N. (2000). Anthocyanins: Nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 80:1063-1072.
- Dejaegher, B. & Vander Heyden, Y. (2007). Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, 1158, 138-157.
- Dietz, C.; Sanz, J & Cámara, C. (2006). Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1103, 183-192.

- Goncalves, C.& Alpendurada, M.F. (2002). Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency. *Journal of Chromatography A*, 963, 19-26.
- Juraske R.; Antón A.; Castells F. (2008) Estimating half-lives of pesticides in/on vegetation for use in multimedia fate and exposure models. Department of Chemical Engineering.ETSEQ, Universitat Rovira I Virgili. Av. Països Catalans 26, 43007 Tarragona. Spain.
- Ouyang, G.; Chen, Y.; Setkova, L. & Pawliszyn, J. (2005). Calibration of solid-phase microextraction for quantitative analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1097, 9-16.
- Pawliszyn, Janusz. (1997). *Solid Phase Microextraction. Theory and Practique*. Ed. Wiley-VCH. Canadá.
- Raffer J. (2002). Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br J Nutr.* 88:219S-2245S with paper dividers. *Journal of Horticultural Science* 69, 299-304.
- Seidán, F. (2008). Entrevista: Arándano un cultivo que crece a pasos agigantados. <www.produccion.com.ar/2008/08feb_07.htm>. Consulta 2008
- Soleas, G.J.; Yan, J.; Hom, K. & Goldberg, D.M. (2000). Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography A*, 882, 205-212.
- Spotts, R. A.; Cervantes, L. A. & Timothy, J. F. (2002). Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packaging, and storage temperature. *Postharvest Biology and Tecnology* 24, 251-257.
- Trösken, E.R.; Bittner, N. & Völkel, W. (2005). Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1083, 113-119.
- Wang, P.; Jiang, S.; Liu, D.; Wang, P. & Zhou, Z. (2005). Direct enantiomeric resolutions of chiral triazole pesticides by high-performance liquid chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* 62, 219-230.
- Yommi A. y Godoy C. Arándanos. Fisiología y tecnologías de postcosecha. (2002) <<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/posco/fruyhort/arandano.htm>> Consulta 2008
- Zambonin, C.G.; Cilenti, A. & Palmisano, F. (2002). Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries. *Journal of Chromatography A*, 967, 255-260.
- Zheng Y., Zhenfeng Y. and Xuehong C. (2008) Effect of high oxygen atmospheres on fruit decay and quality in Chinese bayberries, strawberries and blueberries. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, PR China.