

Desarrollo y validación de una metodología para la determinación de residuos de orto-fenilfenol en aceite esencial de frutas cítricas en Tucumán, R. Argentina

Norma Kamiya*, Marina Lacina*, Diego Tolosa*, Christian Contreras*, Sergio Lagoria* y Roberto M. Ruiz*

RESUMEN

Los aceites esenciales de frutas cítricas constituyen mezclas complejas de compuestos orgánicos que interfieren en la cuantificación de residuos de plaguicidas. Siendo escasa la bibliografía encontrada para la determinación de orto-fenilfenol (OPP) en estas matrices, este trabajo apunta a adaptar, desarrollar, validar y acreditar bajo Norma IRAM 301 (ISO/IEC 17025:2005), un método sencillo y de menor costo. Para dicha cuantificación, se tomaron como punto de partida metodologías aplicadas al análisis de frutas cítricas y se aprovechó el carácter ácido del OPP para separarlo mediante una extracción ácido-base. Posteriormente, fue detectado y cuantificado por cromatografía gaseosa (CG) con detector de ionización de llama (FID). Se obtuvieron recuperaciones promedio de 89% a 104%, en el rango de 0,1 a 100 mg/kg, para aceite esencial de limón (AEL); de 93% a 103 % y de 90% a 114% entre 0,2 mg/kg y 10 mg/kg de OPP para aceite esencial de pomelo (AEP) blanco y rosado, respectivamente. Los límites de detección fueron 0,05 mg/kg para AEL y 0,1 mg/kg para AEP blanco y rosado. Los límites de cuantificación fueron 0,1 mg/kg para AEL y 0,2 mg/kg para AEP. Además, se observaron una linealidad aceptable en los rangos evaluados e incertidumbres relativas de 24% para AEL, 14% para AEP blanco y 23% para AEP rosado.

Palabras clave: OPP, plaguicidas, cítricos, cromatografía.

ABSTRACT

Development and validation of a methodology for determining orto-phenylphenol residues in citrus essential oil in Tucumán, Argentina

The essential oils of citric fruits constitute complex mixtures of organic compounds which interfere with pesticide residues quantitation. As there exists scarce bibliography on ortho-phenylphenol (OPP) determination in this commodity, the present work aims to adapt, develop and validate a simple and cheaper method for determining phenylphenol residues in citrus essential oil, while certifying it under IRAM 301 standard (ISO/IEC 17025:2005). Citrus fruit analysis methods were used, taking advantage of OPP acidity for its extraction from the commodity by simple acid-base extraction. Later, gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) was used for detection and quantitation. Average recoveries were the following: 89% to 104% within the range of 0.1 mg/kg to 100 mg/kg for lemon essential oil; 93% to 103% and 90% to 114%, for white and red grapefruit, respectively, within the range of 0.2 -10 mg/kg. Detection limits were 0.05 mg/kg for lemon essential oil and 0.1 mg/kg for both white and red grapefruit essential oils. Quantitation limits were 0.1 and 0.2 mg/kg for lemon and grapefruit essential oils, respectively. Also, an acceptable linearity was observed in the evaluated ranges and relative uncertainties of 24%, 14% and 23% for lemon, white and red grapefruit essential oils, respectively, were obtained.

Key words: OPP, pesticide, citric fruits, chromatography.

*Sección Química de los Productos Agroindustriales, EEAOC. plaguicidas@eeaoc.org.ar

INTRODUCCIÓN

La provincia de Tucumán, situada en el noroeste de la Argentina, es considerada la más importante productora de aceite esencial de limón del hemisferio sur. Este producto se exporta principalmente a las industrias alimenticia y cosmética. Para sostener las exportaciones, es necesario cumplir con las rigurosas exigencias del mercado internacional, que incluyen también el control de residuos de plaguicidas. Teniendo en cuenta la importancia socioeconómica que esta actividad tiene en la región, la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) de Tucumán, consideró importante contribuir con una metodología sencilla y rápida para determinar uno de los principales contaminantes de los aceites esenciales, el orto-fenilfenol (OPP).

Este compuesto, conocido comúnmente como OPP, y su sal sódica (SOPP), se aplican a las frutas cítricas frescas destinadas a exportación durante el tratamiento post-cosecha, realizado en los empaques.

Para la obtención de aceite esencial de frutas cítricas, uno de los productos principales de industrialización, se emplean tanto frutas provenientes de campo como de descarte de los empaques.

El OPP, que se encuentra sobre la piel y dentro de las celdillas de aceite de frutas que fueron tratadas con este producto en los empaques, es extraído junto con el aceite esencial. La concentración de residuos de OPP que se detecte en el aceite esencial dependerá de la cantidad de fruta con tratamiento que se emplee para su elaboración y de la concentración de OPP que esta posea al momento de su industrialización. Es por ello que el manejo de la materia prima y el control de los lotes de producción resulta de suma importancia para la industria cítrica.

No se han fijado límites máximos de residuos de plaguicidas (LMR) para los aceites esenciales, como sucede en el caso de las frutas frescas, sino límites comerciales impuestos por los mismos compradores. Los más exigentes incluso solicitan la ausencia de residuos, a niveles de límites de detección de las técnicas analíticas más sensibles disponibles actualmente en los laboratorios de control.

Debido a que los aceites esenciales contienen gran variedad de compuestos orgánicos con características de polaridad y solubilidad similares a muchos plaguicidas, es difícil conseguir una metodología que permita minimizar las múltiples interferencias que pueden generarse. Por otra parte, al momento de seleccionar los métodos, los aceites esenciales no son citados como matrices en los manuales generales más usados de análisis de residuos de plaguicidas, tales como el Pesticide analytical manual (FDA, 1994), Pesticide and industrial chemical residues (Parffit, 2000), Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs (General Inspectorate for Health Protection, 1996); tampoco estos aceites pueden ser considerados aceites vegetales comunes.

A pesar del frecuente empleo de los aceites esenciales de frutas cítricas, son escasos los métodos reportados de análisis de OPP en esta matriz. Al respecto, se encontró solamente un trabajo publicado (Johnson *et al.*, 2001) que cita la determinación de OPP en aceite esencial de naranja empleando cromatografía gaseosa (CG) con detector de espectrometría de masas (MSD), previo proceso mixto de hidrólisis, extracción con solvente, destilación por arrastre con vapor en medio ácido y derivatización con N,N-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida. Además se puede citar un trabajo (Subovich *et al.*, 2009), donde se propone una extracción con acetonitrilo y posterior determinación por cromatografía líquida con detector de fluorescencia.

En cambio, sí se encontraron trabajos sobre determinación de OPP en frutas cítricas, como el de Yoshioka *et al.* (2004), que emplea cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección por espectrometría de masas; el de Saad *et al.* (2004), que plantea el empleo de HPLC con detección por fluorescencia, y el de Ito *et al.* (2003), que utiliza un sistema de inyección en flujo con detector de masas en tandem con ionización por "electrospray". Asimismo, Rajzman (1972) propone un procedimiento de extracción ácido-base y detección colorimétrica con acetaldehído-sulfato férrico anhidro-ácido sulfúrico, aplicado a cáscara y pulpa de naranja y pomelo. Por otro lado, Farrow *et al.* (1977), luego de la extracción ácido-base, realizan el análisis por HPLC y la confirmación por CG con detector de ionización de llama (FID), empleando una columna empacada con 5% OV-17 para el análisis de residuos de OPP en muestras de cáscara y pulpa de naranja, pomelo y limón.

Todas las metodologías mencionadas son complejas y costosas, por lo que el objetivo fijado para este trabajo fue desarrollar una técnica más simple, rápida y de menor costo, aplicable a la matriz aceite esencial de frutas cítricas. Como punto de partida, se consideró conveniente adaptar el principio de extracción empleado por Rajzman (1972) y Farrow *et al.* (1977) para frutas cítricas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insumos y reactivos

Para la extracción se emplearon n-hexano grado plaguicida y ácido sulfúrico calidad analítica (p.a.), provistos por Sintorgan, e hidróxido de sodio y sulfato de sodio anhidro calidad analítica (p.a.), provistos por Merck.

Las soluciones patrones de OPP se prepararon a partir de la droga pura de 99,9% de pureza (AccuStandard Inc.-Chem Service). Se preparó una solución madre de 1000 mg/l y a partir de esta, se realizaron diluciones para obtener las soluciones de trabajo en el rango de 0,025 a 100 mg/l.

Para llevar a cabo la validación de la metodología, se emplearon muestras de aceites esenciales de limón, pomelo blanco y pomelo rosado, provistas por empresas cítricas de la región.

Equipos

Balanza analítica de 0,1 mg de resolución.

Evaporador rotatorio.

Cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 6890N con detector FID.

Cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 6850N con detector MSD 5973N.

Procedimiento de extracción

Se pesaron 5 g de aceite esencial y se colocaron en una ampolla de decantación de 100 ml, realizando tres extracciones sucesivas con porciones de 25 ml de hidróxido de sodio 1N cada una, descartándose la fase orgánica y llevando la fase acuosa a un pH ácido menor o igual a 3 con ácido sulfúrico al 50%. Se efectuaron luego tres extracciones con porciones de 10 ml de hexano grado plaguicida, descartándose finalmente la fase acuosa y secando la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro p.a. Posteriormente, se filtró y se evaporó el solvente sin dejar que la evaporación llegue a sequedad, para evitar pérdidas de OPP. Por último, se trasvasó cuantitativamente a un matraz aforado de 10 ml y se llevó a volumen final con hexano.

Separación y cuantificación

Para la separación y cuantificación de OPP en el extracto obtenido, se trabajó con un cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 6890N, con automuesteador, inyector con/sin derivación ("split/splitless"), columna con fase estacionaria de polietilenglicol con dimensiones de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de film, detector FID y nitrógeno como gas portador. Se emplearon soluciones patrones de OPP para realizar las cuantificaciones por comparación de áreas de la señal de OPP en las muestras y en soluciones de patrón. Para optimizar las condiciones cromatográficas, se llevaron a cabo numerosos ensayos empleando diferentes rampas de temperatura, con el objetivo de conseguir la mejor separación en el menor tiempo de análisis. Finalmente, se definió como condición óptima una rampa de temperatura de 3°C/minuto, desde 100°C hasta 220°C.

Para la confirmación de identidad de residuos de OPP, se utilizó un cromatógrafo gaseoso con iguales características que el precedentemente descrito, con una columna con fase estacionaria de 5% de metilfenilsiloxano de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de film, helio como gas portador y un detector MSD 5973 network en modo monitoreo de ion seleccionado (SIM). Se empleó una programación de temperatura de dos rampas, la primera desde 70°C a 150°C, con una variación de 25°C/min y la segunda a 2°C/min hasta 165°C. Los valores de relación masa/carga (m/z) seleccionados para la identificación fueron 115, 141, 169 y 170.

Los criterios de aceptación se basaron en la normativa del Documento N° SANCO/2007/3131 (European

Commission, 2007) que exige los siguientes requisitos:

- El tiempo de retención del pico en la muestra deberá coincidir con el del analito en cuestión en la muestra fortificada.

- La relación señal/ruido de cada uno de los iones característicos de los analitos a determinar debe ser igual o superior a 3.

- Las intensidades relativas de los iones detectados, expresadas como un porcentaje de la intensidad del ión más intenso, deberán corresponder a las de la muestra fortificada o, en su defecto, a las de una solución patrón a concentraciones comparables, bajo las mismas condiciones y con las tolerancias establecidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Tolerancias de intensidades relativas de iones para confirmación de identidad empleando detector de espectrometría de masas.

Intensidad relativa (% pico base)	% tolerancia (relativa)
> 50%	± 10%
> 20% a 50%	± 25%
> 10% a 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

Teniendo en cuenta los requisitos antes mencionados, se realizaron los cálculos de confirmación de identidad de OPP en una muestra por cada nivel de fortificación.

Para obtener la concentración de OPP en la muestra se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{mg OPP/kg} = \frac{Am \times Cp \times V \times 1000}{Ap \times Pm}$$

Donde:

Am: área correspondiente a OPP en la muestra.

Ap: área correspondiente a OPP en la solución patrón.

Cp: concentración de OPP de la solución patrón [mg/l].

V: volumen final (0,010 l).

Pm: peso de muestra [g].

1000: factor de conversión de g a kg.

Validación

Para llevar a cabo la validación de la metodología desarrollada, se evaluaron los siguientes parámetros:

- Precisión en condiciones de repetibilidad.
- Precisión en condiciones de precisión intermedia.
- Límite de detección.
- Límite de cuantificación.
- Veracidad medida como porcentaje de recuperación.
- Linealidad.
- Intervalo de trabajo.
- Incertidumbre.

De acuerdo con las Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas (CCPR, 2003), la estimación de precisión en condiciones de repetibilidad se basó en un esquema de fortificaciones, con seis repeticiones para aceite esencial de limón, en cinco niveles de concentración entre 0,1 y 100 mg/kg, y cinco repeticiones para aceites esenciales de pomelo blanco y rosado, en tres niveles de concentración entre 0,2 y 10 mg/kg. Todas las repeticiones de cada nivel de fortificación fueron procesadas por un analista el mismo día.

Para la estimación de precisión en condiciones de precisión intermedia, se empleó un esquema de fortificaciones en donde distintos analistas, en distintos días, realizaron un ensayo fortificando la muestra a un mismo valor de concentración.

Los datos obtenidos fueron sometidos al Test de Grubbs para eliminar datos anómalos (Grubbs, 1969).

Para evaluar la precisión, se calcularon los valores de desvío estándar (Desvest) y de coeficiente de variación porcentual (CV%) con los datos obtenidos de concentración hallados en las muestras fortificadas.

Posteriormente, con el objetivo de determinar los límites de detección y de cuantificación, se consideraron las concentraciones en solución patrón de OPP y de OPP en muestra fortificada, respectivamente, que pudieran cumplir con condiciones aceptables de CV% y porcentaje de recuperación, según la tabla Criterios de aceptación de exactitud y precisión de las Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas (CCPR, 2003).

Para determinar la veracidad, se calculó la recuperación porcentual de las muestras fortificadas.

La evaluación de linealidad se realizó tanto con soluciones patrón como con muestras fortificadas. Las concentraciones obtenidas fueron contrastadas con el valor de concentración a la cual fue realizada la fortificación. En cada caso, se aplicó la regresión lineal y se determinaron la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación R^2 . Siguiendo los criterios de las Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas (CCPR, 2003), para la evaluación de linealidad de OPP en soluciones patrón, se consideró aceptable un coeficiente de correlación mayor a 0,995 en la gráfica de concentración en función del valor de área obtenida. En cambio, se consideró aceptable un coeficiente de correlación mayor a 0,975 para los gráficos de concentración hallada de OPP en muestras fortificadas.

El rango de trabajo fue establecido teniendo en cuenta los niveles evaluados de concentración menor y mayor, los que evidenciaron un comportamiento lineal.

Finalmente se estimó la incertidumbre del método de la siguiente forma:

Incetidumbre = $k \times CV$ de recuperación según el documento CX/PR 09/41/5-Add.2 (Comisión del Codex Alimentarius, 2009).

$$k= 2$$

CV: coeficiente de variación porcentual. Para su cálculo, se incluyeron todos los datos de recuperación obtenidos en condiciones de precisión intermedia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es importante destacar que con el empleo de este procedimiento técnico, se obtuvieron extractos más limpios que los obtenidos mediante una extracción con solventes. Esto significó trabajar con menor cantidad de interferencias, lo que permitió, además, una mejor separación de la señal de OPP en el cromatograma. La Figura 1 muestra los cromatogramas superpuestos de un patrón de OPP de 1 mg/l y de los extractos producto del procesamiento de una muestra de aceite esencial de limón (AEL) y una muestra fortificada con OPP. Bajo las condiciones cromatográficas empleadas, el tiempo de retención de OPP fue de aproximadamente 40 minutos.

Las Figuras 2a y 2b muestran los espectros de masas con los iones seleccionados para el modo SIM, de una muestra de AEL que contiene OPP y de un patrón de OPP, respectivamente.

Las Figuras 3a y 3b muestran el cromatograma obtenido con el detector de masas del extracto de una muestra de aceite esencial y su espectro en modo SIM, respectivamente.

La identificación del pico correspondiente a OPP se estableció por comparación del tiempo de retención de las señales en la muestra con el tiempo de retención de los patrones y de muestras fortificadas con OPP.

Los datos obtenidos de la validación fueron sometidos al Test de Grubbs y se detectaron dos datos anómalos en los ensayos para evaluación de precisión por repetibilidad en aceite esencial de limón (1 mg/kg y 10 mg/kg), y uno en aceite esencial de pomelo rosado (10 mg/kg). Dichos datos fueron desestimados para calcular los parámetros establecidos en esta validación.

Precisión en condiciones de repetibilidad

Se obtuvieron valores de desvío estándar comprendidos entre 0,8% y 21,4% para AEL, 2,6% a 8,3% para aceite esencial de pomelo (AEP) blanco y 2,3% y 5,9% para AEP rosado. El coeficiente de variación (CV%) estuvo comprendido entre 0,9% y 22,7 % para AEL; 2,7% a 9,0 % para AEP blanco y 2,4% a 6,6% para AEP rosado. Si bien se observó una mayor dispersión en los resultados en el caso de AEL en el menor nivel de fortificación, el CV% obtenido se encontró dentro del valor de aceptación para esta concentración según las directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas (CCPR, 2003) (Tablas 2, 3 y 4).

Precisión en condiciones de precisión intermedia

La desviación estándar para AEL fue mayor a la obtenida en condiciones de repetibilidad en la misma matriz. En cambio, fueron menores los valores obtenidos para AEP tanto blanco como rosado en condiciones de precisión intermedia. Se obtuvieron valores de CV% aceptables comprendidos entre 3,0% y 12,4% (Tabla 5).

Límites de detección y de cuantificación

Para establecer los límites de cuantificación de OPP en AEL y AEP, se consideraron aceptables los valores

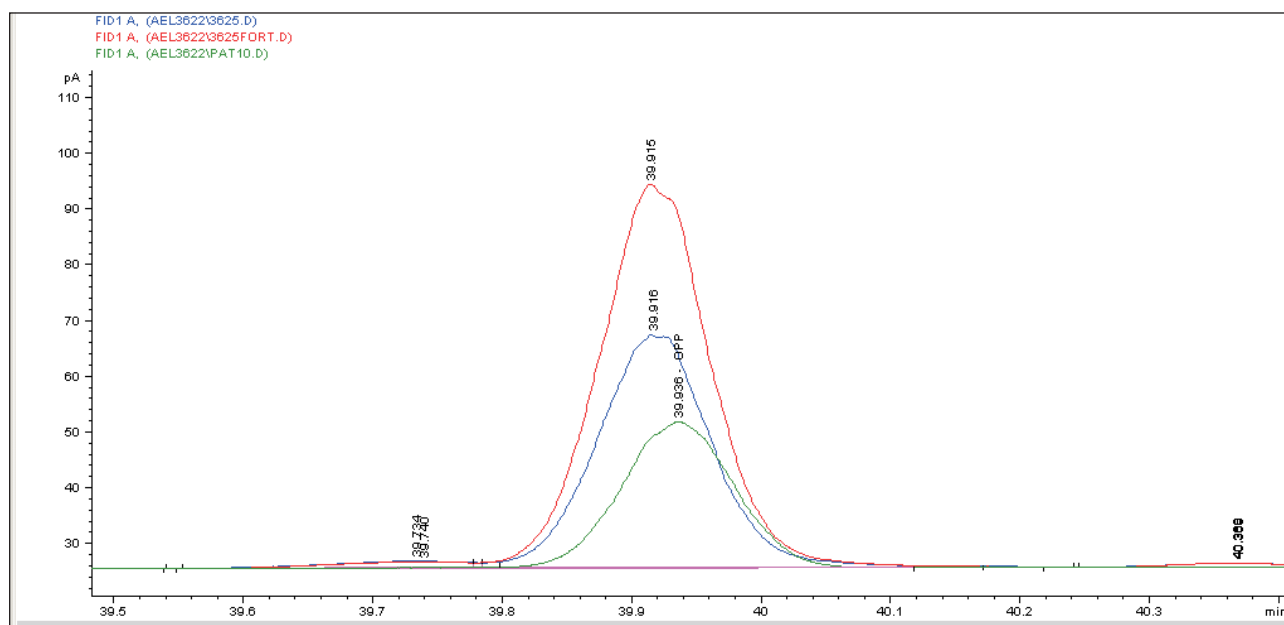


Figura 1. Cromatograma GC-FID de una muestra de aceite esencial de limón (AEL).

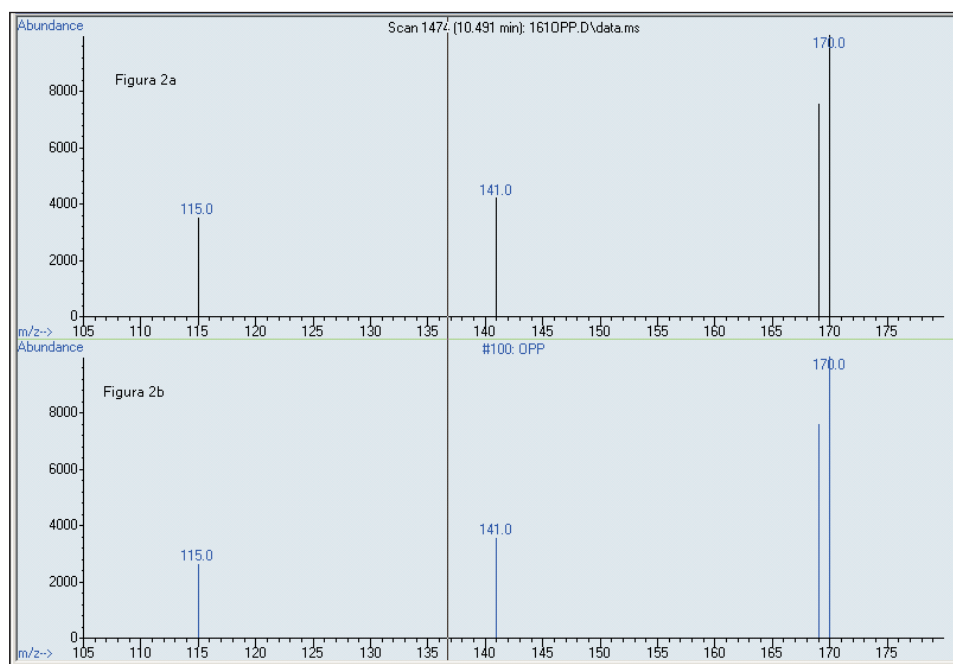


Figura 2. Espectros de masas en modo SIM de OPP. Muestra de AEL (a); espectro de patrón de OPP guardado en biblioteca (b).

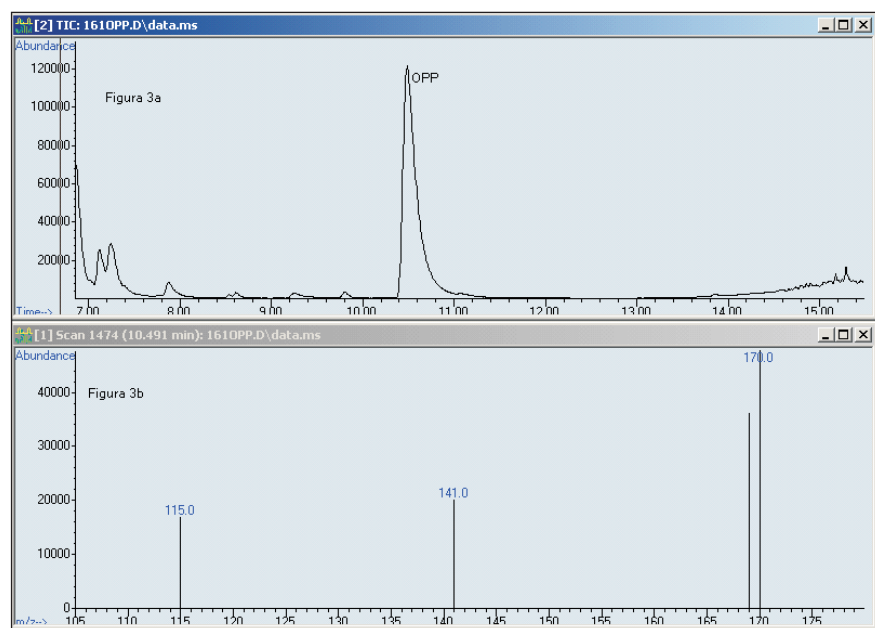


Figura 3. a) Cromatograma de una muestra de AEL; b) espectro de masas en modo SIM de la señal de OPP en el cromatograma.

Tabla 2. Datos obtenidos en condiciones de repetibilidad para aceite esencial de limón.

Aceite esencial de limón			
Niveles de fortificación (mg/kg)	Desvío estándar (mg/kg)	Recuperación promedio (%)	Coefficiente de variación CV% (%)
0,1	21,4	94	22,66
0,5	5,3	102	5,23
1	2,3	104	2,22
10	0,8	89	0,90
100	4,4	88	4,99

Tabla 3. Datos obtenidos en condiciones de repetibilidad para aceite esencial de pomelo blanco.

Aceite esencial de pomelo blanco			
Niveles de fortificación (mg/kg)	Desvío estándar (mg/kg)	Recuperación promedio (%)	Coefficiente de variación CV% (%)
0,2	8,3	93	8,95
1	3,6	103	3,45
10	2,6	97	2,71

de 0,1 mg/kg y 0,2 mg/kg, por cumplir con la condición de presentar un CV menor a 22% y a 18%, respectivamente; estos son los valores de aceptación para estas concentraciones establecidos en las Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas (CCPR, 2003) (Tabla 6).

Veracidad medida por porcentaje de recuperación

Los resultados de recuperación obtenidos para las tres matrices, tanto en condiciones de repetibilidad como de precisión intermedia, se consideraron aceptables teniendo en cuenta las Directrices sobre buenas prácticas

en el análisis de residuos de plaguicidas (CCPR, 2003), ya que estuvieron comprendidos entre un 88% y 114% (Tablas 2 a 5).

Linealidad

De acuerdo con las Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas (CCPR, 2003), se consideró aceptable el valor de coeficiente de correlación de 0,9995 obtenido del gráfico de soluciones patrón (Figura 4), al igual que los coeficientes para muestras fortificadas: 0,9972 para AEL, 0,999 para AEP blanco y 0,9989 para AEP rosado (Figuras 5 y 6).

Tabla 4. Datos obtenidos en condiciones de repetibilidad para aceite esencial de pomelo rosado.

Aceite esencial de pomelo rosado			
Niveles de fortificación (mg/kg)	Desvío estándar (mg/kg)	Recuperación promedio (%)	Coefficiente de variación CV% (%)
0,2	5,9	90	6,61
1	4,0	114	3,49
10	2,3	98	2,36

Tabla 5. Resultados de los ensayos realizados en condiciones de precisión intermedia.

Tipo de aceite esencial	Recuperación promedio (%)	Desvío estándar (%)	CV (%)
Limón	101	8,1	3,6
Pomelo blanco	93	2,8	3,0
Pomelo rosado	99	1,2	12,4

Tabla 6. Límites de detección y de cuantificación.

Tipo de aceite esencial	Límite de detección (mg/kg)	Límite de cuantificación (mg/kg)
Limón	0,05	0,1
Pomelo blanco	0,10	0,2
Pomelo rosado	0,10	0,2

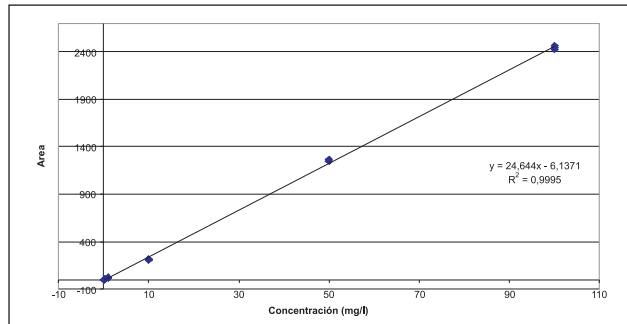


Figura 4. Linealidad de OPP – soluciones patrón.

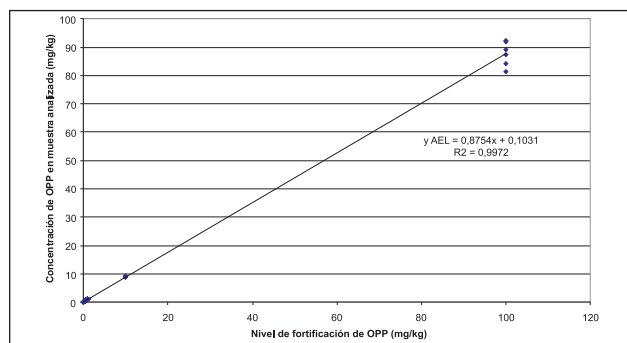


Figura 5. Linealidad de OPP – aceite esencial de limón.

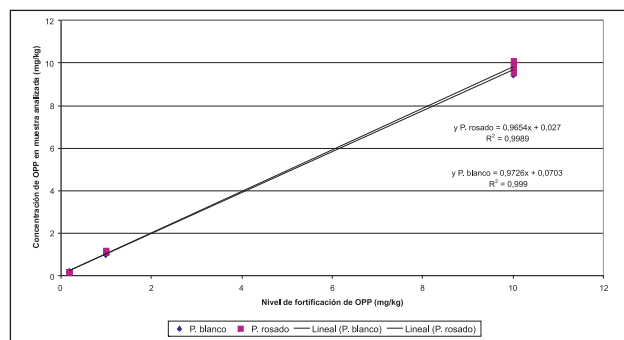


Figura 6. Linealidad de OPP – aceites esenciales de pomelo blanco y rosado.

Intervalo de trabajo

Los rangos de trabajo de esta validación fueron de 0,05 mg/kg a 100 mg/kg para AEL y de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg para AEP banco y rosado.

Incertidumbre

Para identificar las fuentes de incertidumbre, se tuvieron en cuenta los parámetros que intervienen en el cálculo de concentración de OPP en la muestra (Figura 7).

Los valores de incertidumbre relativa obtenidos fueron de 24%, 14% y 23%, para AEL y AEP blanco y rosado, respectivamente (Tabla 7). Estos resultados se consideraron satisfactorios teniendo en cuenta el procesamiento y complejidad de la muestra.

Confirmación

Se observó que las muestras fortificadas correspondientes a todos los niveles de fortificación cumplieron con los requisitos establecidos de confirmación de identidad, aún al límite de detección.

CONCLUSIONES

Se cumplió satisfactoriamente el objetivo de desarrollar una metodología para la determinación de OPP en acei-

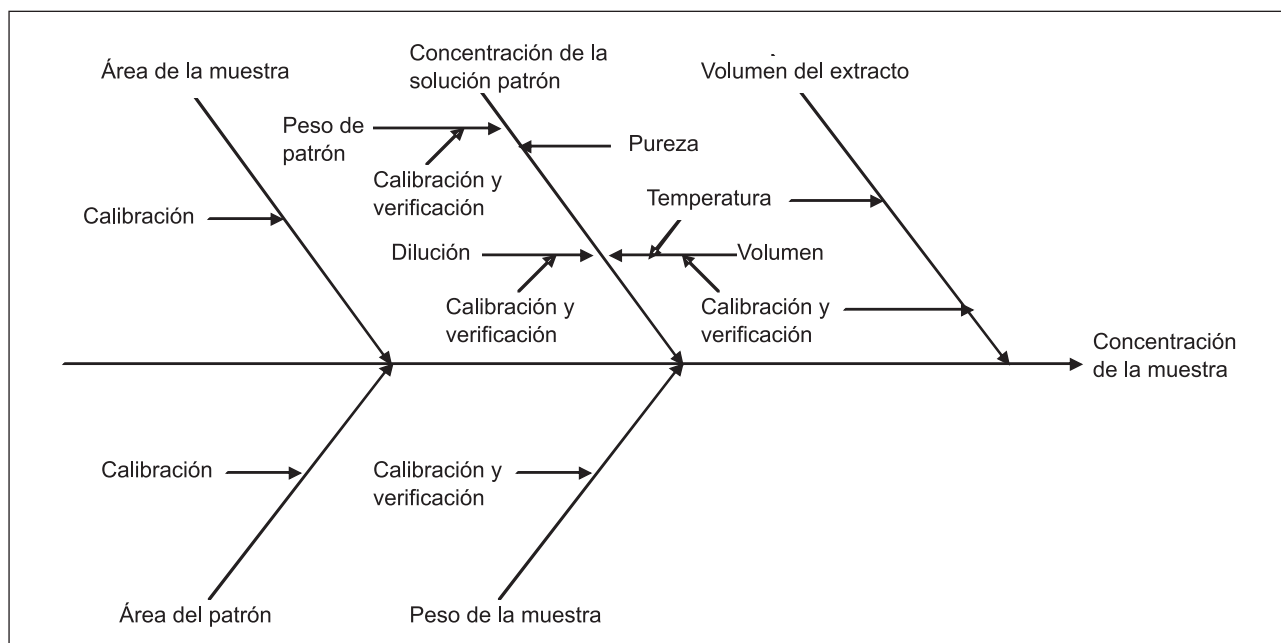


Figura 7. Identificación de las fuentes de incertidumbre – diagrama de espina de pescado.

Tabla 7. Cálculo de incertidumbre.

Tipo de aceite esencial	Desvío estándar global	Recuperación promedio (%)	Coefficiente de variación CV% global (%)	Incertidumbre $U=k.CV\%(rec)$ (k=2)
Limón	11,665	95	12	24
Pomelo blanco	6,702	97	7	14
Pomelo rosado	11,320	101	11	23

te esencial de frutas cítricas que presente valores aceptables de recuperación, según los criterios de las Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas (CCPR, 2003). Esta metodología presenta asimismo, la ventaja de fundamentarse en una extracción ácido-base simple y económica, que permite alcanzar límites de detección satisfactorios para los productores de la región. Además, estos límites son significativamente inferiores a los que se alcanzarían a través del análisis directo del aceite esencial, dado que la metodología presentada permite separar el OPP de otros componentes que interfieren en el análisis cromatográfico.

Adicionalmente, se lograron mejores recuperaciones que los obtenidos por Farrow *et al.* (1977) en frutas cítricas con extracción ácido-base.

Este trabajo de puesta a punto y validación sirvió además para la acreditación del ensayo bajo Norma IRAM 301 (ISO/IEC 17025:2005) (IRAM, 2005) por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA), tarea que fue concretada en octubre de 2007. Dicha acreditación permite al laboratorio ofrecer un servicio con garantía de calidad reconocida internacionalmente y de gran utilidad para el sector citrícola de la región.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Comisión del Codex Alimentarius. 2009.** Anteproyecto de revisión de las directrices para estimar la incertidumbre de los resultados para la determinación de residuos de plaguicidas (CAC/GL 59-2006). CX/PR 09/41/5-Add.2. FAO/OMS, Roma, Italia.
- Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas (CCPR). 2003.** Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas. CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003, Enmienda 2010. [En línea]. Disponible en http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10185/cxg_056s.pdf (consultado 31 marzo 2011).
- European Commission. 2007.** Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/2007/3131. DG SANCO, Brussels, Belgium.
- Farrow, J. E.; R. A. Hoodless; M. Sargent and J. A. Sidwell. 1977.** Fungicide residues, Part VI. Determination of residues of post-harvest fungicides on citrus fruit by high-performance liquid chromatography. Analyst 102: 752-758.
- Food and Drug Administration (FDA). 1994.** Pesticide

- Analytical Manual (PAM). 3. ed. Vol. 1. Revisión Oct. 1999. [En línea]. Disponible en www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/PesticideAnalysisManualPAM/ucm111455.htm (consultado 7 marzo 2011). FDA, USA.
- General Inspectorate for Health Protection (The Netherlands). (1996).** Analytical methods for pesticide residues in foodstuffs. 6.ed. Dutch Ministry of Public Health, Welfare, and Sport, The Netherlands.
- Grubbs, Frank. 1969.** Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics* 11 (1): 1-21.
- Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM). 2005.** Norma IRAM 301 (ISO/IEC 17025). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. 4. ed. IRAM, Argentina.
- Ito, Y.; T. Goto; H. Oka; H. Matsumoto; Y. Miyazaki, N. Takahashi and H. Nakazawa. 2003.** Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil, and o-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51 (4): 861-866.
- Johnson, G. D.; S. G. Harsy; J. Geronimo and J. M. Wise. 2001.** Orthophenylphenol and phenylhydroquinone residues in citrus fruit and processed citrus products after postharvest fungicidal treatments with sodium orthophenylphenate in California and Florida. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2497-2502.
- Parfitt, C. H. 2000.** Pesticide and industrial chemical residues. En: Horwitz, W. (ed.), *Official methods of analysis of AOAC International*. 17. ed. Vol. 1 AOAC International, Gaithersburg, USA, pp. 1-88.
- Rajzman, A. 1972.** A colorimetric method for the determination of 2-phenylphenol residues in citrus fruits. *Analyst* 97: 271-278
- Saad, B; H. N. Haniff; I. M. Saleh; A. Abu, N. Ali; and N.H. Hashim. 2004.** Determination of orthophenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection. *Food Chem.* 84: 313-317.
- Subovich, G. E.; M. T. Montti; M. Chaulet; S. Visciglio; F. Raviol; L. Lesieux; M. Munitz; J. Gerard; C. Williman and E. Gonzalez. 2009.** Determination of orthophenylphenol in citrus. Incidence of residual charge of fruit in essential oils. En: *Book of abstracts LAPRW, 2, Argentina*, pp.171.
- Yoshioka, N.; Y. Akiyama and K. Teranishi. 2004.** Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J. Chromat. A* 1022: 145-150.
-