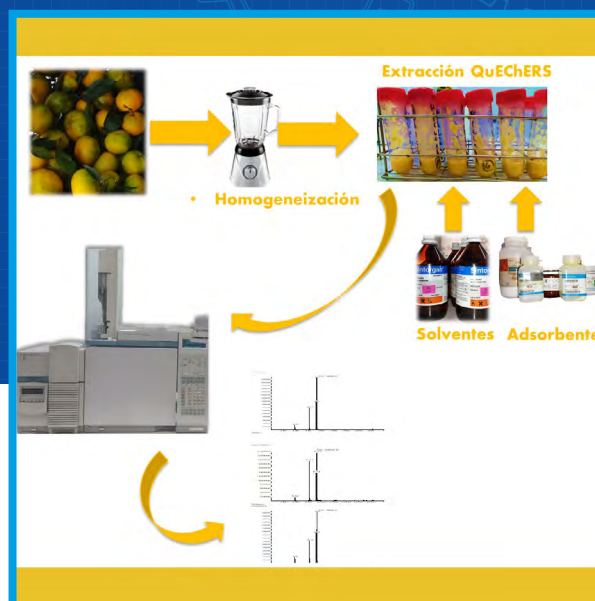


Determinación de pesticidas utilizados en cítricos. Optimización de la técnica extractiva

Lucas Matías Page, Julieta Belén Maldonado, Carlos Andrés Fernández

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Entre Ríos (ICTAER). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Facultad de Ciencias de la Alimentación – Universidad Nacional de Entre Ríos, Concordia, Argentina.

Contacto: lucas.page@uner.edu.ar



RESUMEN

Se optimizó un método extractivo de pesticidas, para determinar imazalil, etión y malatión en naranjas, mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Se tomó como base el método QuEChERS modificado. Se ensayaron diferentes solventes de extracción y reconstitución, así como adsorbentes. Se probó la combinación de acetonitrilo, etilacetato, metanol y hexano como solventes de extracción y reconstitución y la combinación de PSA, C18, C8, carbón activado, quitosano, diol y florisil como adsorbentes en la etapa de clean-up. Finalmente, se evaporó el solvente de extracción hasta sequedad para ser reconstituido en 0,5 ml de solvente orgánico. La mayor respuesta cromatográfica se obtuvo utilizando etilacetato como solvente de extracción, hexano como solvente de reconstitución y 0,5 g de florisil como adsorbente. Se obtuvo una buena linealidad, con valores de $R^2 > 0,99$ en todos los casos, desviaciones estándar relativas menores al 10% y porcentajes de recuperación entre 85% y 114%.

ABSTRACT

A pesticide extraction method was optimized to determine imazalil, etion, and malathion in oranges using gas chromatography coupled with mass spectrometry. A modified QuEChERS method served as the basis. Different extraction and reconstitution solvents, as well as adsorbents, were tested. The combination of acetonitrile, ethyl acetate, methanol, and hexane was tested as extraction and reconstitution solvents, while a combination of PSA, C18, C8, activated charcoal, chitosan, diol, and florisil was tested as adsorbents in the clean-up stage. Finally, the extraction solvent was evaporated to dryness to be reconstituted in 0.5 ml of organic solvent. The highest chromatographic response was obtained using ethyl acetate as the extraction solvent, hexane as the reconstitution solvent, and 0.5 g of florisil as the adsorbent. Good linearity was achieved, with R^2 values > 0.99 in all cases, relative standard deviations below 10%, and recovery percentages between 85% and 114%.

Palabras clave: pesticidas, naranja, QuEChERS, GC-MS

INTRODUCCIÓN

Los cítricos constituyen actualmente uno de los frutos más cultivados en distintas regiones del mundo donde la naranja y la mandarina son dos de los más destacados. Según datos aportados por la "Food and Agriculture Organization" (FAO), la producción a nivel global de naranjas en 2022 fue aproximadamente de 76 mil millones de toneladas. Esta cantidad representa alrededor del 50% de la producción de cítricos y aproximadamente el 11% de la producción de frutas totales en el mundo [1]. Por su parte, la producción de mandarinas alcanzó en 2021 y 2022 un valor de 37,9 millones de toneladas [2], de las cuales, aproximadamente 72% es destinado para su consumo como fruta fresca.

Las principales regiones productivas de estas frutas son Asia, América del Norte y América del Sur. Esta última produce en total el 19% de las frutas comercializadas en el mercado global. Dentro de la región, en 2021 Brasil fue el principal productor con una producción estimada del 14% regional y es seguido por Argentina con aproximadamente el 4% [2], [3].

Gran parte de su popularidad se debe a sus características organolépticas, acompañadas de un alto valor nutricional. El mismo se evidencia con el elevado contenido de aminoácidos, ácidos orgánicos, fibra dietética, minerales, vitaminas y componentes antioxidantes que incluyen carotenoides, flavonoides y polifenoles. Esto último le añade, además, valor medicinal [4]. Esta importancia ha impulsado su desarrollo en distintos niveles de producción e investigaciones sobre compuestos específicos, como los que se centran en la nutrición y el efecto de los cítricos sobre la microbiota intestinal [5]. Además, también existen trabajos sobre los subproductos como la extracción de biodiesel a partir de cáscara de naranja [6].

Es decir que los cítricos y sus subproductos son un importante escalón en la economía desde el nivel regional al global [7]. Por su gran importancia, es necesario asegurar la productividad en la etapa de cultivo, lo que lleva a tomar la mayor cantidad de recaudos para evitar grandes pérdidas. Uno de ellos es la aplicación de pesticidas, en etapas de pre y post cosecha. Estos compuestos se emplean para combatir diversas plagas, enfermedades y malezas, reduciendo significativamente las pérdidas en el sector y aumentando la productividad [8], [9]. Si bien esto genera beneficios económicos, la aplicación de pesticidas puede llegar a ser perjudicial para los consumidores y el ambiente. Los productos y subproductos provenientes del campo pueden resultar contaminados con dichos compuestos químicos, los cuales no son selectivos en cuanto a los organismos que atacan [8], [10]. En los últimos años se ha confirmado que varios

pesticidas son capaces de causar desequilibrio en el metabolismo de los glicolípidos y afectar la función metabólica del hígado [11], [12], [13]. Además, los efluentes generados a partir del procesamiento de materia prima contaminada, como el agua de lavado de los empaques de frutas, pueden arrastrar consigo los pesticidas hacia cuerpos de agua naturales como arroyos y ríos. Pérez-Indoval & Romero-López [14], detallan cómo los pesticidas son una de las causas más comunes de deterioro de la calidad de masas de agua subterránea.

En base a esto se ve que el uso de estos compuestos tiene dos caras opuestas: por un lado, los pesticidas son tóxicos y generan problemas de salud y ambientales y por otro lado son necesarios, ya que actualmente son la mejor opción para controlar plagas y enfermedades de los cultivos [15], [17]. Tal es el caso del etión y malatión. Ambos son compuestos organofosforados comúnmente utilizados en el cultivo de naranja. El primero se emplea para el control de insectos y ácaros, mientras que el segundo para el control fúngico. Sin embargo, se ha comprobado que poseen un gran impacto sobre las rutas nerviosas del cuerpo humano [18].

Otro ejemplo de esto es el imazalil, el cual es un pesticida sistémico utilizado en cítricos, sumamente eficaz contra varios patógenos, incluidos los resistentes al benzimidazol y además, posee acciones protectoras y curativas sobre la fruta [17], [19]. Cómo efecto nocivo se ha comprobado que puede alterar el sistema endócrino y generar problemas durante la reproducción y desarrollo [19], [20].

Los efectos secundarios causados por estos compuestos químicos sobre el ambiente y la salud humana, combinado con el uso de mayor número de aplicaciones y dosis más elevadas, en la mayoría de los casos necesarias por el desarrollo de resistencia de algunas plagas y/o la frecuencia de precipitaciones, ha resultado en una necesidad de mayor control por parte de los organismos regulatorios sobre el producto final. Ejemplos de ellos son el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) [21] y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) [22]. Una de las regulaciones que estos organismos establecen definen los límites máximos de residuos (LMR) permitidos para cada pesticida en distintas matrices alimenticias y para distintos mercados. Los LMR se encuentran en niveles de concentración bajos, en el rango de las partes por millón (ppm) e incluso partes por billón (ppb). Para el imazalil, etión y malatión son de 0,5 ppm, 1,0 ppm y 2,0 ppm según SENASA y 0,01 ppm, 0,01 ppm y 2,0 ppm según FAO, respectivamente.

Por este motivo es necesario el desarrollo de técnicas analíticas sensibles que permitan la detección de niveles traza de estos contaminantes.

La determinación de residuos de pesticidas en matrices alimentarias es un desafío, especialmente por la baja concentración de analitos y las grandes cantidades de sustancias interferentes que pueden co-extraerse con los mismos y, en la mayoría de los casos, afectar negativamente a los resultados del análisis [23]. Se han propuesto varios procedimientos de preparación de muestras desde los años 90 para la determinación de residuos de pesticidas en frutas, que incluyen: extracción en fase sólida (SPE), micro extracción en fase sólida (SPME), extracción asistida por microondas (MAE), entre otros [24], [25], [26], [27].

Desde 2003, el método introducido por Anastasiades et al. [28], denominado "QuEChERS" por sus siglas en inglés: rápido fácil, barato, efectivo, robusto y seguro, ha revolucionado el proceso de preparación de muestras para el análisis de residuos de pesticidas. Este método se basa en una extracción con acetonitrilo y una partición con adición de sal. En los últimos años, se ha validado para diferentes matrices alimentarias: vegetales [29], frutas [8], carne [30], cereales [31], [32]; jugo de vegetales [33], jugos de frutas [34], [35].

Actualmente, existe una gran tendencia hacia la optimización del método QuEChERS sobre matrices específicas. La optimización se realiza sobre los solventes a utilizar, las sales, los adsorbentes, sus cantidades y la posible adición de otras etapas que mejoren la extracción, por ejemplo, acciones mecánicas como ultrasonido. Además, estos estudios se combinan con la búsqueda de las mejores condiciones cromatográficas para lograr la mayor respuesta. A modo de ejemplo, se puede citar el trabajo de Rizzetti et al. [23], quienes optimizaron un método QuEChERS para la determinación de pesticidas en jugo de naranja mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución con espectrometría de masas en tándem. Comparan distintos niveles de acidificación y solventes para la extracción y el uso de sales y cantidades de PSA para el clean-up. Medina et. al [32] probó el uso de distintos solventes de extracción para la determinación de deltametrina, penconazole y kresoxim-metil en muestras comerciales de arroz.

Por otro lado, en el afán de ahorrar tiempo de análisis, se han desarrollado una gran variedad de kits, que contienen las sales pesadas, necesarias para realizar la extracción, el clean-up o ambas juntas. Fares et al. [16] utilizaron en su desarrollo experimental para la extracción de pesticidas en muestras de fruta entera de naranja, un kit de extracción comercial basado en tampón citrato. El mismo contenía una mezcla de 4 g de sulfato de magnesio anhidro, 1 g de cloruro sódico, 1 g de citrato trisódico dihidrato y 0,5 g de hidrogenocitrato disódico sesquihidrato.

Es decir que, el método QuEChERS es una metodología base de extracción, la cual se puede adaptar a diversas necesidades tales como matrices, analitos, necesidades de tiempo de análisis, entre otras, modificando los pasos dentro de la estructura original o agregando nuevas etapas. En el presente trabajo se tiene por objetivo desarrollar una metodología de extracción basada en el método QuEChERS y evaluar la combinación de solventes y adsorbentes más adecuada para la determinación de imazalil, malatión y etión en naranjas mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

MATERIALES Y MÉTODOS

GC-MS

La cromatografía de gases (GC) se realizó utilizando un equipo GC Agilent 6890N acoplado con un espectrómetro de masas (MS) Agilent 5973, respaldado por bibliotecas de referencia. La separación se llevó a cabo utilizando una columna capilar de sílice fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 µm de espesor de película). El gas portador fue helio (99,999 % de pureza), el cual se mantuvo a un flujo constante de 1,0 ml/min. La temperatura del horno se inició en 80°C (0,2 min) y luego se aumentó a una velocidad de 40°C/min hasta 195°C, seguido de una rampa de 12°C/min hasta 280°C y una rampa final de 5°C/min hasta 290°C (mantenida durante 8 min). La temperatura del detector fue de 290°C. Los espectros de masas de ionización por electrones (EI) se obtuvieron a 70 eV y el sistema se programó en el modo de monitoreo de iones seleccionados (SIM). La temperatura de la fuente de iones y del cuádruplo se establecieron en 230 °C y 150 °C, respectivamente.

Estándares y reactivos

Los estándares de alta pureza (>98%) de imazalil, malatión y etión fueron provistos por Sigma-Aldrich (Seelze, Alemania). Las soluciones madre (1000 mg/l) se prepararon disolviendo los estándares en metanol grado HPLC (pureza 99,9%) y se almacenaron en freezer a -18 °C en botellas color caramelo con tapón de PTFE. Las soluciones de trabajo (10, 50, 100 mg/l) se prepararon en metanol grado HPLC.

Todos los solventes utilizados en las pruebas fueron de grado HPLC (Pureza 99,9%). El acetonitrilo, etilacetato fueron provistos por Merck (Darmstadt, Alemania), el hexano y el metanol fueron provistos por Sintorgan (Buenos Aires, Argentina). El cloruro de sodio, sulfato anhidro de sodio se compraron a Biopack (Buenos Aires, Argentina), el citrato ácido de sodio sesquidratado y el citrato de sodio dihidratado se obtuvieron en Sigma-Aldrich

(Seelze, Alemania). Para la etapa de limpieza los adsorbentes PSA, C18, quitosano, carbon activado y florisil fueron obtenidos de Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos).

Muestras

Para las muestras se compró un cajón de aproximadamente 15 kg de naranjas en tiendas de la zona, de esta manera se obtuvo un lote de partida homogéneo. De aquí se separaron muestras de 1 kg para su procesamiento en licuadora durante 1 min 30 s para obtener una pasta uniforme, la cual se almacenó en freezer a -18°C hasta el momento de las pruebas y análisis.

Metodología de extracción

Para la extracción se utilizó como método base el método QuEChERS modificado por Medina et al. [32]. El mismo consta de los siguientes pasos: 1) pesar 10 g de muestra en un tubo de centrifuga de 50 ml. Si la humedad es menor al 25% agregar 10 ml de agua destilada; 2) agregar 10 ml de acetoni-trilo; 3) agitar en vórtex durante 1 min; 4) agregar 1 g de ClNa + 4g de Na_2SO_4 + 1 g de citrato de sodio dihidratado + 0,5 de citrato ácido de sodio sesqui-dratado; 5) agitar en vórtex durante 1 min; 6) cen-trifugar a 4000 rpm durante 5 min; 7) separar fase orgánica en un tubo de centrifuga de 50 ml; 8) agre-gar 0,25 g de PSA + 0,25 g de C18 + 1,5g Na_2SO_4 ; 9) agitar a mano durante 1 min; 10) centrifugar a 4000 rpm durante 1 min; 11) separar fase orgánica en un tubo de vidrio HACH; 12) evaporar hasta sequedad. Este paso se realiza en dos etapas para evitar la eyeción del contenido de los tubos: a presión baja de vacío inicial 280 mmHg. b. presión alta de vacío final 208 mmHg; 13) reconstituir contenido de los tubos HACH en 0.5 ml de Hexano, filtrar con filtro de jeringa 0,22 μm y colocar en vial con inserto; 14) proceder a la lectura en el equipo.

Elección del solvente de extracción y reconstitución

Para la elección del solvente de extracción y re-constitución se modificaron los pasos 2 y 13 del método original, cambiando acetoni-trilo y hexano por una de las combinaciones presentadas en la Tabla 1.

Tabla 1 Combinación de solventes de extracción y reconsti-tución

Solvente de extracción	Solvente de reconstitución
Acetonitrilo	Acetonitrilo
Acetonitrilo	Hexano
Acetonitrilo	Etilacetato
Acetonitrilo	Metanol

Etilacetato	Acetonitrilo
Etilacetato	Hexano
Etilacetato	Etilacetato
Etilacetato	Metanol
Hexano	Acetonitrilo
Hexano	Hexano
Hexano	Etilacetato
Hexano	Metanol

Cada método extractivo se realizó por triplica-do, adicionando cada muestra con los pesticidas en estudio en una concentración de 5 ppm. Luego de realizar las mediciones se pudieron comparar las alturas cromatográficas obtenidas y elegir la mejor combinación en base a la mayor respuesta cromatográfica, ya que esta proporcionaría una mayor sensibilidad.

Elección de adsorbentes para la etapa de clean-up

Con la combinación de solventes elegida, se pro-cedió a realizar una prueba de adsorbentes. Modifi-cando en este caso el paso número 8 de la extrac-ción, correspondiente al clean-up. Para aplicar los distintos adsorbentes en el método extractivo en la fruta, se tomaron muestras de naranjas comercia-les, por triplicado, se cortaron en trozos pequeños y se trituraron en licuadora hasta obtener una pasta homogénea. Las muestras fueron adicionadas con imazalil, malatión y etión a una concentración de 5 ppm y se desarrolló la técnica con el agregado de los compuestos y combinaciones presentados en la Tabla 2.

Tabla 2 Combinaciones de adsorbentes analizadas

1	0,25 g de quitosano + 0,25 g de carbón activado
2	0,25 g de quitosano + 0,25 g de florisil
3	0,25 g de quitosano
4	0,25 g de quitosano 0,25 g de C8
5	0,50 g de florisil
6	0,50 g de quitosano
7	0,50 g de diol
8	0,25 g de PSA + 0,25 g de c18
9	0,25 g quitosano + 0,25 g de diol
10	0,25 g de PSA + 0,25 g de C18 + 0,25 g de quitosano

En todos los casos se agregó 1,5 g de sulfato de sodio anhidro.

Luego se procedió con el desarrollo normal del método y la lectura en el cromatógrafo. Para la elección se comparó las alturas cromatográficas obtenidas.

Validación del método

Para la validación de la metodología optimizada se siguieron las recomendaciones de la guía europea SANTE (EC, 2021), determinando linealidad, precisión, veracidad, límites de detección y cuantificación e incertidumbre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elección del solvente de extracción y reconstitución

Para las pruebas de solventes, la combinación de etilacetato como solvente de extracción y hexano como solvente de reconstitución logró la mayor respuesta cromatográfica. El uso de metanol no resultó viable ya que al mezclarse en la matriz naranja no se logró separar el agua contenida en la muestra de 10 g, por lo que el volumen final a evaporar fue aproximadamente el doble del de los demás ensayos. Esto implicaría un aumento en el tiempo de evaporación por el mayor volumen y la presencia de agua. En la Figura 1 pueden apreciarse las distintas alturas cromatográficas obtenidas con cada combinación.

En base a lo obtenido en el análisis cromatográfico, se puede observar en la Figura 1a, que la utilización de hexano como solvente de extracción no resulta favorable dada la pérdida del imazalil. Para el mismo analito, la menor respuesta se obtuvo con la combinación etilacetato/metanol. Las combinaciones acetonitrilo/acetonitrilo y etilacetato/hexano no presentaron diferencias significativas y fueron un 6,5% menor a la respuesta generada por acetonitrilo/metanol, la cual fue la mayor.

En la Figura 1b se pueden observar los resultados para malatión, en donde la mayor respuesta cromatográfica se obtuvo con la combinación etilacetato/hexano.

En el caso del etión, en la Figura 1c se puede apreciar que las combinaciones acetonitrilo/etilacetato, etilacetato/acetonitrilo, etilacetato/etilacetato, etilacetato/hexano, hexano/etilacetato y hexano/hexano presentaron los mayores valores sin diferencias estadísticamente significativas.

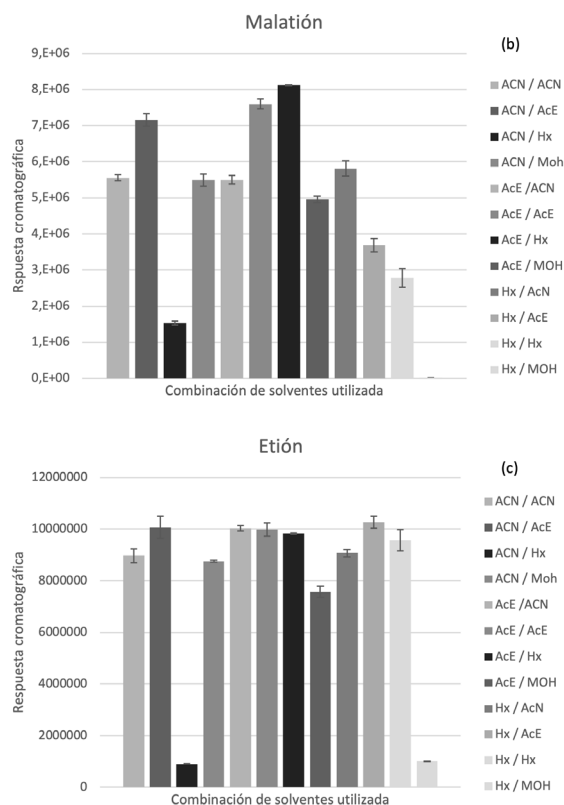
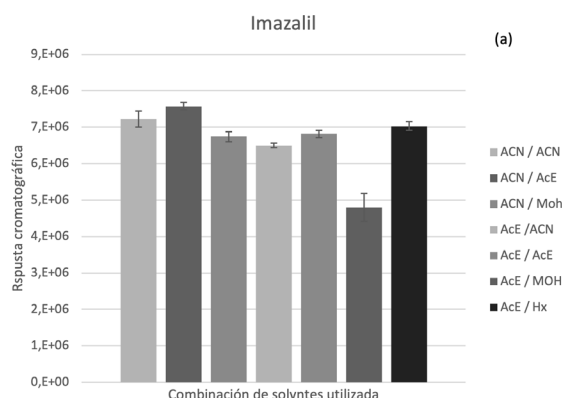


Figura 1 Respuestas cromatográficas obtenidas en las pruebas de solventes de extracción y reconstitución para a) imazalil b) etion c) malarion

Elección de adsorbentes para la etapa de clean-up

Con la selección de los solventes de extracción y reconstitución fijada, se procedió a realizar la prueba de adsorbentes. Los datos recolectados se presentan en la Figura 2.

En la Figura 2a se puede observar que el uso de 0,25 g de quitosano con 0,25g de carbón ocasiona la pérdida de la señal del imazalil, al igual que el uso de 0,5g de diol. Luego, la menor respuesta cromatográfica fue generada con el uso de 0,25 g de C8 con 0,25 g de quitosano. La mayor respuesta cromatográfica se obtuvo con el uso de 0,5 g de forisil.

En la Figura 2b se pueden observar los resultados de las combinaciones de adsorbentes para etión. En este caso, la menor respuesta es generada por el uso de 0,25 g PSA + 0,25 g de C18 + 0,25 g de quitosano. Mientras que la mayor respuesta se obtuvo con 0,5 g de florisil y con 0,5 g de diol, los cuales no presentaron diferencias significativas.

Para el malatión se pueden apreciar los resultados en la Figura 2c. Aquí se evidencia que la menor respuesta fue con el uso de 0,5 g de quitosano; y la mayor respuesta se obtuvo con 0,5 g de florisil.

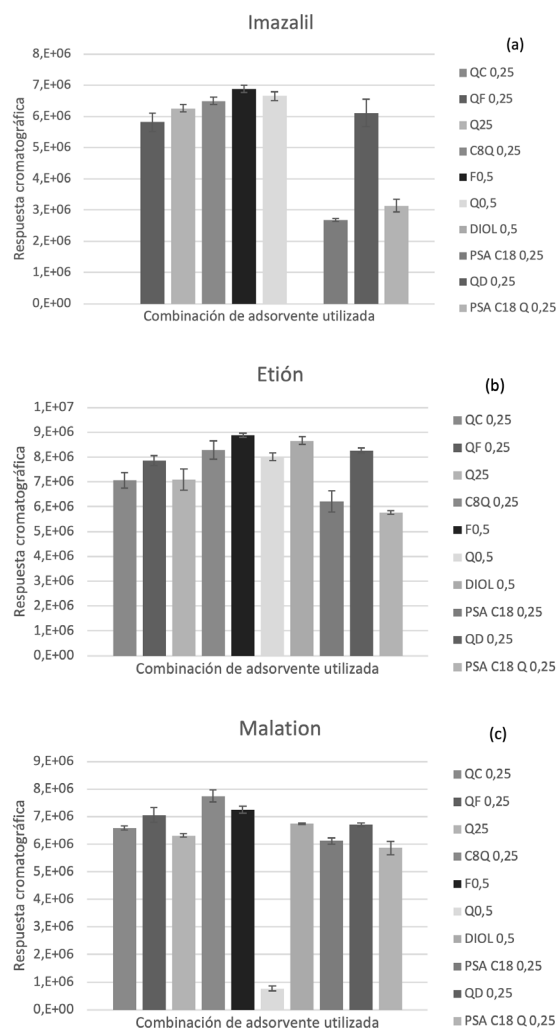


Figura 2 Respuestas cromatográficas obtenidas en las pruebas de adsorventes en la etapa de clean-up para a) imazalil b) etion c) malarion

Validación

Para la validación del método se siguieron las recomendaciones de la guía SANTE (EC, 2021). Para la determinación de linealidad se realizó la adición de soluciones estándar de los analitos en estudio. Las concentraciones utilizadas para realizar la curva fueron: 0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,10 ppm, 0,50 ppm, y 1 ppm. El coeficiente de regresión (R^2) obtenido para imazalil, etión y malatión fue de 0,9960, 0,9938 y 0,9956, respectivamente.

Para la precisión se realizó la adición de los pesticidas en el menor y mayor nivel de la curva de linealidad, en este caso 0,01 ppm y 1,00 ppm. En la concentración más baja, para imazalil, etión y malatión se obtuvieron valores de desviación estándar relativa (RSD%) de 5,30%, 6,35% y 3,42%, respectivamente. En el mismo orden para la concentración más alta el RSD% fue 7,03%, 9,67% y 6,38%, respectivamente.

La recuperación se estudió por triplicado a 3 concentraciones (0,01, 0,10, y 1,00 ppm) siendo de 111%, 114% y 98% para imazalil, de 85%, 117% y 106% para malatión, y para etión 99%, 85% y 94%, respectivamente.

Se consideró como límite de cuantificación (LOQ) el punto más bajo de la curva de calibración, en este caso 0,01 ppm.

CONCLUSIONES

Se obtuvo un método basado en QuEChERS para la determinación de imazalil, etión y malatión con LOQ menores a los LMR establecidos por SENASA y la FAO con excepción el etión y malatión donde el LOQ es igual al LMR en la reglamentación de FAO. La linealidad del método fue $R^2 > 0,99$ en todos los casos, el %RSD menor al 20% y el porcentaje de recuperación osciló entre 85% y el 114%. Esto da una herramienta que permitiría la posibilidad de brindar análisis en el sector citrícola de la región para muestras de cargamentos destinados a mercado interno y exportación para la determinación de pesticidas en fruta.

REFERENCIAS

- [1] Bonales-Revuelta, J., Musule, R., Navarro-Pineda, F. S., & García, C. A. (2022). Evaluating the environmental performance of orange production in Veracruz, Mexico: A life cycle assessment approach. *Journal of Cleaner Production*, 343, 131002. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131002>
- [2] FoodData Central. (n.d.). Retrieved 26 September 2023, from <https://fdc.nal.usda.gov>
- [3] Federcitrus. (2020). Estadísticas - Federcitrus. <https://www.federcitrus.org/estadisticas/>
- [4] Feng, S., Zheng, S., Chen, Y., Lin, M., Hung, Y.-C., Chen, Y., & Lin, H. (2023). Effects of acidic electrolyzed-oxidizing water treatment on the postharvest physiology, storability, and quality properties of navel orange fruit. *Scientia Horticulturae*, 321, 112377. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112377>
- [5] Gu, Q., Gao, X., Zhou, Q., Li, Y., Li, G., & Li, P. (2023). Characterization of soluble dietary fiber from citrus peels (Citrus unshiu), and its antioxidant capacity and beneficial regulating effect on gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- [6] Pan, H., Xia, Q., Li, H., Wang, Y., Shen, Z., Wang, Y., Li, L., Li, X., Xu, H., Zhou, Z., & Yang, S. (2022). Direct production of biodiesel from crude Euphorbia lathyris L. Oil catalyzed by multifunctional mesoporous composite materials. *Fuel*, 309. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2021.122172>

- [7] Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., & Tounsi, M. S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39(1), 74–80. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.02.013>
- [8] Sousa, M. C., Marinho, C. S., Silva, M. P. S., Carvalho, W. S. G., Amaral, B. D., Assis-Gomes, M. M., Rodrigues, W. P., & Campostrini, E. (2019). Effects of grafting and gradual rootstock substitution on gas exchanges of orange seedlings under high atmospheric evaporative demand. *Scientia Horticulturae*, 247, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.12.011>
- [9] Tang, H., Sun, Q., Huang, J., Wen, G., Han, L., Wang, L., Zhang, Y., Dong, M., & Wang, W. (2023). Residue behaviors, degradation, processing factors, and risk assessment of pesticides in citrus from field to product processing. *Science of The Total Environment*, 897, 165321.
- [10] Al-Nasir, F. M., Jiries, A. G., Al-Rabadi, G. J., Alu'datt, M. H., Tranchant, C. C., Al-Dalain, S. A., Alrabadi, N., Madanat, O. Y., & Al-Dmour, R. S. (2020). Determination of pesticide residues in selected citrus fruits and vegetables cultivated in the Jordan Valley. *LWT*, 123, 109005. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.109005>
- [11] Souza, M. C. O., Cruz, J. C., Cesila, C. A., Gonzalez, N., Rocha, B. A., Adeyemi, J. A., Nadal, M., Domingo, J. L., & Barbosa, F. (2023). Recent trends in pesticides in crops: A critical review of the duality of risks-benefits and the Brazilian legislation issue. *Environmental Research*, 228, 115811. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.115811>
- [12] Jin, C., Weng, Y., Zhang, Y., Bao, Z., Yang, G., Fu, Z., & Jin, Y. (2021). Propamocarb exposure has the potential to accelerate the formation of atherosclerosis in both WT and ApoE^{-/-} mice accompanied by gut microbiota dysbiosis. *Science of The Total Environment*, 800, 149602. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149602>
- [13] Jin, C., Yuan, X., Wang, C., Fu, Z., & Jin, Y. (2021). Maternal exposure to imazalil disrupts intestinal barrier and bile acids enterohepatic circulation tightly related IL-22 expression in F0, F1 and F2 generations of mice. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123668. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123668>
- [14] Wu, S., Luo, T., Wang, S., Zhou, J., Ni, Y., Fu, Z., & Jin, Y. (2018). Chronic exposure to fungicide propamocarb induces bile acid metabolic disorder and increases trimethylamine in C57BL/6J mice. *Science of The Total Environment*, 642, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.084>
- [15] Pérez-Indoval, R., & Romero-López, R. (2024). Assessment of pesticide contamination in ground-water bodies in the Jucar River Basin (Spain) and its spatial distribution. *Groundwater for Sustainable Development*, 25, 101118. <https://doi.org/10.1016/J.GSD.2024.101118>
- [16] Fares, N. V., Hassan, Y. A. A., Hussein, L. A., & Ayad, M. F. (2021). Determination of fungicides and their degradation kinetics in orange tree fruits using liquid chromatography – Tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS method. *Microchemical Journal*, 168, 106376. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106376>
- [17] Han, L., Xu, H., Wang, Q., Liu, X., Li, X., Wang, Y., Nie, J., Liu, M., Ju, C., & Yang, C. (2023). Deciphering the degradation characteristics of the fungicides imazalil and penflufen and their effects on soil bacterial community composition, assembly, and functional profiles. *Journal of Hazardous Materials*, 460, 132379. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132379>
- [18] Guo, W., Engelman, B. J., Haywood, T. L., Blok, N. B., Beaudoin, D. S., & Obare, S. O. (2011). Dual fluorescence and electrochemical detection of the organophosphorus pesticides—Ethion, malathion and fenthion. *Talanta*, 87(1), 276–283. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2011.10.015>
- [19] de Freitas, J. F., Ribeiro de Queiroz, M. E. L., de Oliveira, A. F., de Paulo Ribeiro, L., Salvador, D. V., Miranda, L. D. L., Alves, R. R., & Rodrigues, A. A. Z. (2023). Evaluation of imazalil dissipation/migration in postharvest papaya using low-temperature partition extraction and GC–MS analysis. *Food Chemistry*, 418, 135969. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135969>
- [20] Boberg, J., Johansson, H. K. L., Franssen, D., Draskau, M. K., Christiansen, S., Cramer, J., Pedersen, M., Parent, A. S., & Svingen, T. (2023). Exposure to the pesticides linuron, dimethomorph and imazalil alters steroid hormone profiles and gene expression in developing rat ovaries. *Toxicology Letters*, 373, 114–122. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2022.11.010>
- [21] Senasa | Argentina.gob.ar. (n.d.). Retrieved 13 April 2024, from <https://www.argentina.gob.ar/senasa>
- [22] FAO publications catalogue 2023. (2023). FAO Publications Catalogue 2023. <https://doi.org/10.4060/CC7285EN>
- [23] 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.010>

- [24] Del Castillo, M. L. R., Rodríguez-Valenciano, M., De La Peña Moreno, F., & Blanch, G. P. (2012). Evaluation of pesticide residue contents in fruit juice by solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Talanta*, 89, 77–83. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2011.11.062>
- [25] Farajzadeh, M. A., & Afshar Mogaddam, M. R. (2016). Acid–base reaction-based dispersive liquid–liquid microextraction method for extraction of three classes of pesticides from fruit juice samples. *Journal of Chromatography A*, 1431, 8–16. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.12.059>
- [26] Fernandes, V. C., Domingues, V. F., Mateus, N., & Delerue-Matos, C. (2011). Determination of Pesticides in Fruit and Fruit Juices by Chromatographic Methods. An Overview. *Journal of Chromatographic Science*, 49(9), 715–730. <https://doi.org/10.1093/CHRSKI/49.9.715>
- [27] Shamsipur, M., Yazdanfar, N., & Ghambarian, M. (2016). Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by GC–MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. *Food Chemistry*, 204, 289–297. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.02.090>
- [28] 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. <https://doi.org/10.1093/JAOAC/86.2.412>
- [29] Du, P., Liu, X., Gu, X., Dong, F., Xu, J., Kong, Z., Wu, Y., Zhu, Y., Li, Y., & Zheng, Y. (2013). Rapid residue analysis of pyriproxyfen, avermectins and diflubenzuron in mushrooms by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 5(23), 6741–6747. <https://doi.org/10.1039/C3AY41074A>
- [30] Liu, Z., Jia, F., Wang, W., Gao, F., Liu, P., Liu, Y., & Yin, J. (2014). A highly efficient extraction, separation and detection method for pyrethroids in pork using the interaction between pyrethroids and protein. *Analytical Methods*, 6(5), 1353–1358. <https://doi.org/10.1039/C3AY40258D>
- [31] Hou, X., Han, M., Dai, X., Yang, X., & Yi, S. (2013). A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1198–1205. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.089>
- [32] Medina, M. B., Munitz, M. S., & Resnik, S. L. (2019). Pesticides in randomly collected rice commercialised in Entre Ríos, Argentina. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1617791>, 12(4), 252–258. <https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1617791>
- [33] Nguyen, T. D., Yun, M. Y., & Lee, G. H. (2009). A Multiresidue Method for the Determination of 118 Pesticides in Vegetable Juice by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10095–10101. <https://doi.org/10.1021/JF902712V>
- [34] Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. (2008). Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 76(1), 211–225. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2008.02.041>
- [35] Tran, K., Eide, D., Nickols, S. M., Cromer, M. R., Sabaa-Srur, A., & Smith, R. E. (2012). Finding of pesticides in fashionable fruit juices by LC–MS/MS and GC–MS/MS. *Food Chemistry*, 134(4), 2398–2405. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.04.034>