

RST - RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

Contract Nr. **359PED** din **23/10/2020**

**DETECTAREA RAPIDĂ A PESTICIDULUI TBZ ÎN FRUCTELE ȘI
LEGUMELE CONGELATE,
COMERCIALIZATE PE PIAȚA DIN ROMÂNIA**

ACRONYM: **RapidDetTBZ**



Etapa nr. 3

Detectarea și cuantificarea TBZ-lui utilizând SPR-SERS a nanoparticulelor de metale nobile obținute în laborator și explicarea mecanismului de adsorbție pe suprafața metalică în diferite condiții de concentrație și pH. Testarea tehnicii de detectare a TBZ-lui în fructele și legumele congelate achiziționate de pe piață și evaluarea limitei de detecție și capacitatea de cuantificare

Perioada: 01/01/2022 - 17/12/2022

Rezumatul etapei

În cadrul acestei etape de execuție a proiectului a fost investigat pesticidul tiabendazol (TBZ) utilizând metoda SPR-SERS. În acest scop, nanoparticulele de metale nobile au fost obținute în laborator prin două metode diferite de sinteză.

S-au obținut spectrele Raman și SERS ale TBZ în diferite condiții de concentrație și pH, precum și spectrele de amprentă. Spectrele SERS înregistrate au fost ulterior interpretate pe baza datelor existente în literatură.

S-a dezvoltat metoda pentru detecția TBZului în fructe și legume congelate prin spectroscopie Raman, iar rezultatele au fost comparate cu cele obținute prin SERS aceasta din urmă dovedindu-se, așa cum era de așteptat, o metodă mult mai sensibilă pentru detecția TBZ. Astfel, pe baza comparației semnalului SERS, s-a demonstrat că se poate detecta nivelul TBZului în fructe și legume congelate, într-o concentrație aflată sub limitele de concentrație admise de legislație pentru TBZ. Aceste rezultate scot în evidență eficiența acestei abordări, care este rapidă, ieftină și foarte sensibilă pentru monitorizarea TBZului în fructele și legumele congelate.

S-a dezvoltat și optimizat metoda UHPLC-PDA de separare, identificare și cuantificare a TBZului din probe de fructe și legume congelate. S-au stabilit parametrii de validare a metodei de cuantificare TBZului din probe de fructe și legume congelate utilizând UHPLC-PDA și s-a întocmit „Raportul de validare a metodei UHPLC-PDA pentru cuantificare a TBZului”.

S-a optimizat o metodă de extracție a urmelor de pesticide din probe de fructe și legume congelate. S-a dezvoltat metoda de detecție, separare și identificare pentru cuantificarea urmelor de pesticide din fructe și legume congelate prin tehnica GC-ECD (cromatografia de gaze cu detector cu captură de electroni). S-au stabilit parametrii de validare a metodei de cuantificare a pesticidelor organoclorurate din fructe și legume congelate utilizând GC-ECD și s-a întocmit „Raportul de validare a metodei de cuantificare a pesticidelor organoclorurate din fructe și legume congelate utilizând GC-ECD”.

Pentru fiecare activitate, în continuare sunt prezentate rezultatele obținute:

3.1. Obținerea spectrelor Raman și SERS ale pesticidului TBZ în diferite condiții de pH și concentrație

Măsurătorile au fost realizate pe TBZ pudră (puritatea analitică 99%), achiziționat de la Sigma Aldrich cât și soluții etanolice. Prepararea soluțiilor de TBZ s-a efectuat cu etanol de puritate analitică 99.9%. Toate spectrele Raman și SERS al TBZ au fost înregistrate, la temperatura camerei, cu un spectrometru confocal Renishaw InVia Reflex Raman folosind liniile laser 532 nm și 785 nm și cu un mini-spectrometru Advantage 532 (DeltaNu, SUA) cu o linie de excitație de 532 nm furnizată de un laser Nd:YAG, cu o putere de ieșire de 40 mW. Rezoluția spectrală a fost 8 cm^{-1} .

În spectrul Raman al probei solide se remarcă prezența benzilor specifice TBZ-lui. Probele SERS pe diferite concentrații au fost obținute prin adăugarea a 10 μl soluție de TBZ la 490 μl coloid de argint. În cadrul acestei analize a fost utilizată soluția coloidală de argint preparată prin metoda Leopold and Lendl. A fost analizată influența pH-ului soluțiilor de TBZ asupra spectrelor SERS

În concluzie, se constată că TBZ-ul poate fi detectat rapid prin intermediul spectroscopiei Raman la nivel de concentrație de milimoli, în timp ce, investigațiile SERS permit detecția

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

TBZului la un nivel mult mai scazut, de ordinul micro- nanomolar, dacă se utilizează nanoparticule coloidale Ag ca substrat de îmbunătățire.

Activitatea 3.2. Pregătirea în laborator a nanoparticulelor de metale nobile cu rezonanță plasmonică în intervalul vizibil și NIR

Ca substrat metalic pentru măsurătorile SERS s-au folosit soluții coloidale de argint preparate prin metoda Lee și Meisel, și, respectiv, prin metoda Leopold și Lendl, prezentând o absorbție la 420 nm și respectiv 418 nm.

Activitatea 3.3. Identificarea speciilor absorbite pe suprafața nanoparticulelor de metale nobile și a grupurilor funcționale implicate în interacțiunea TBZ-NPs

În cadrul acestei activități pe baza literaturii de specialitate au fost identificate speciile absorbite pe suprafața nanoparticulelor de metale nobile și a grupurilor funcționale implicate în interacțiunea TBZ-NPs.

Activitatea 3.4. Obținerea profilului de excitare SERS al speciilor adsorbite: - set de date experimentale SERS ale speciilor TBZ adsorbite

În cadrul acestei activități, coloidul de AgNPs a fost utilizat pentru identificarea și caracterizarea SERS a pesticidului TBZ. Spectrele au fost achiziționate folosind diferite suprafețe de Ag coloidal și diferite linii de laseri. Caracteristicile spectrale observate au fost foarte asemănătoare în toate spectrele, subliniind buna reproductibilitate. În consecință, benzile principale caracteristice TBZ pot fi detectate în spectrele SERS și atribuite unor vibrații specifice..

Activitatea 3.5. Construirea unor curbe de calibrare pentru estimarea cantitativă a TBZ-lui în diferite condiții de concentrație și pH pe baza semnalelor corespunzătoare SERS

Pe baza spectrelor de dependență de concentrație ale soluțiilor de TBZ, ecuațiile de regresie liniară, obținute, cu laserul 532 nm, la pH 5, pentru cele mai intense trei benzi SERS, și anume 778, 1005 și 1571 cm^{-1} au fost construite curbele de calibrare.

Forma spectrală SERS sugerează că scăderea concentrației sau modificarea pH-lui soluției în domeniul pH 2-9 nu afectează orientarea speciilor adsorbite în raport cu suprafața Ag. Forma spectrală a TBZ la o concentrație de $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ (0,2 μM) este încă în concordanță cu amprenta principală a TBZ. Prin urmare, sugerăm **limita de detecție SERS** a TBZ în soluție etanolică $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

Activitatea 3.6. Obținerea datelor SERS ale probelor de fructe și legume congelate organice (fără pesticide)

În această activitate au fost înregistrate spectrele SERS ale probelor de fructe și legume congelate, folosind o abordare simplă de scufundare a acestora în etanol sau în soluție etanol + apă (50/50 (v/v)) și folosind supernatantul.

Probele de fructe denumite *bio* au fost cumpărate din magazinele din Cluj-Napoca; probele denumite *forest* au fost obținute prin colectare directă din zona de munte și sunt considerate de asemenea probe bio. Extractele de fructe au fost preparate prin scufundarea a 1 g fruct în 1.5 ml etanol de puritate analitică. La 24 de ore după imersare, 10 μl din soluția supernatantă rezultată s-

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

a adăugat la 490 µl de coloid de Ag; soluția obținută s-a folosit pentru măsurători SERS, fără nicio filtrare anterioară a extractului.

Extractele de legume au fost preparate prin scufundarea a 1 g legume în 2 ml soluție etanol + apă. La 24 de ore după imersare, 10 µl din soluția supernatantă rezultată s-a adăugat la 500 µl de coloid de Ag. Soluția obținută s-a folosit pentru măsurători SERS, fără nicio filtrare anterioară a extractului.

Activitatea 3.7. Obținerea și interpretarea datelor SERS ale probelor de fructe și legume organice și ale probelor contaminate artificial cu TBZ

Au fost înregistrate spectrele SERS ale probelor de legume și fructe bio/eco/organic tratate cu TBZ.

Probele tratate cu TBZ au fost făcute prin adăugarea unei soluții de concentrație 10^{-3} M de TBZ la soluția de extract în proporție de 1/1 (v/v). Pentru măsurătorile SERS a probelor contaminate artificial cu TBZ a fost folosită 10 µl de soluție astfel obținută a fost depusă pe 500 µl de AgNPs.

Benzile principale a TBZ-lui au fost observate în spectrul SERS al extractului tratat cu TBZ.

Activitatea 3.8. Determinarea limitei de detecție SERS: - determinarea limitei de detecție a TBZ-lui în probe congelate

REGULAMENTUL (UE) 2021/1807 AL COMISIEI din 13 octombrie 2021, stabilește nivelurile maxime de reziduuri de TBZ (mg/kg) în fructele și legumele proaspete sau congelate. Limita admisă pentru fructe de pădure și fructe mici este de 0,01 mg/kg, adică 50 µM.

Pentru determinarea limitei de detecție SERS a TBZ în probele de extracte se urmărește intensitatea semnalelor de la 785, 887, 1011, 1196 și 1577 cm^{-1} . Se observă posibilitatea de detecție a TBZ până la concentrații de 10^{-7} M.

Activitatea 3.9. Obținerea și interpretarea datelor SERS privind probele de fructe și legume achiziționate

Probele de fructe convenționale și bio alături de probele de legume convenționale au fost achiziționate din mai multe magazine din Cluj. Probe bio de legume au fost colectate de la o fermă ecologică din Cluj, iar probele forest au fost colectate din pădure. Măsurătorile SERS au fost efectuate pe extractele de fructe și legume, folosind un coloid de argint și o linie de laser 532 nm.

Datele SERS obținute în cadrul acestui proiect au fost transformate în valori numerice, obținându-se un set de date experimentale, utilizat ulterior pentru crearea unei: „**Bază de date a rezultatelor SERS a produselor congelate investigate**”, pentru a facilita stocarea într-un mod organizat a rezultatelor, precum și utilizare ulterioara mult mai ușoară.

Activitatea 3.10. Optimizarea metodei de extracție pentru biocidele studiate: - 1 metodă de extracție optimizată

În cadrul acestei activități, metoda de extracție a pesticidelor din fructe și legume congelate, dezvoltată și optimizată în cadrul activității 2.11., a fost adaptată și optimizată pentru condițiile de analiză UHPLC-PDA, după cum urmează:

➤ După efectuarea extracției QuEChERS din fructe și legume, din faza organică s-a colectat 1 mL de extract și s-a adus la sec sub flux de azot;

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

- Extractul adus la sec a fost reconstituit într-o soluție de 500 μl acetonitril/apă (10/90 (v/v)), soluție similară cu condițiile de analiză UHPLC-PDA;
- Filtrarea extractului prin de filtru de nylon de 0.45 μm înainte de analiză UHPLC, pentru îndepărtarea posibilo interferenți care ar putea îngreuna analiza pesticidelor din fructe și legume.

Activitatea 3.11. Optimizarea metodei de extracție pentru compușii organoclorurați studiați: - 1 metodă de extracție optimizată

În cadrul acestei activități a fost optimizată o metodă de extracție QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) pentru determinarea simultană a pesticidelor organoclorurate selectate în fructe și legume cu conținut ridicat de apă (congelate) pentru analiza cromatografică GC-ECD.

Activitatea 3.12. Validarea metodei UHPLC-DAD pentru cuantificarea biocidelor: - 1 metodă validată UHPLC

În cadrul acestei activități, a fost dezvoltată și optimizată o metodă UHPLC-PDA, sensibilă și precisă pentru determinarea reziduurilor de TBZ în probe congelate de fructe și legume. În acest scop au fost optimizate condițiile cromatografice, fiind studiate diferite faze mobile, cum ar fi metanol: apă, acetonitril: apă, în diferite rapoarte. În funcție de sensibilitate și selectivitate s-a constatat că eluția în condiții de gradient cu faza mobilă apă (A): acetonitril (B) a fost cea mai bună fază mobilă pentru metoda dezvoltată. Sistemul a rulat cu urmatorul program de eluție: 0-2 min, 10% B; 2-7 min gradient linear de la 10-35% B și menținut până la 10 min; în final s-a revenit la 10% B de la 10-12 și s-a menținut timp de 4 minute pentru re-echilibrarea coloanei la condițiile inițiale de solvent. Debitul de eluție de 500 μl/min a fost cel mai potrivit pentru o bună eluție a peak-urilor. Coloana Hypesyl GOLD C18 (4,6 × 150 mm, 5 μm) utilizată cu un volum de injecție de 10 μL, au fost optime pentru eluția compușilor într-un timp scurt. Detectia s-a realizat la lungimea de undă $\lambda = 302$ nm.

În concluzie, utilizarea metodei QuEChERS urmată de HPLC-PDA s-a dovedit a fi una dintre cele mai bune combinații pentru determinarea reziduurilor de TBZ în matrici complexe ca fructele și legumele congelate. Aceasta oferă rezultate cu grad ridicat de recuperare, consum redus de solvenți, timp scurt de analiză, precizie și acuratețe, fiind fezabilă pentru analiza de rutină a probelor congelate de fructe și legume, pentru asigurarea calității, precum și pentru determinarea riscurilor potențiale datorate reziduurilor de pesticide din citrice, ceea ce poate ajuta la asigurarea protecției sănătății publice, precum și la consolidarea agro-comerțului.

Activitatea 3.13. Validarea metodei GC-ECD pentru cuantificarea compușilor organoclorurați: - 1 Raport de validare a metodei

Identificarea și cuantificarea pesticidelor organoclorurate individual nu este suficientă, este esențială studierea fiabilității tehnicii. Validarea unei metode cromatografice este unul dintre elementele de bază în sistemele calității care asigură eficiența și adecvarea acesteia la scopul propus. În cadrul acestei activități au fost evaluate performanțele și aplicabilitatea metodei în detectia urmelor de pesticide organoclorurate din probe de fructe și legume congelate utilizând tehnica GC-ECD. Pe parcursul validării metodei au fost urmăriti următorii parametri: selectivitatea, domeniul de lucru și liniaritatea, sensibilitatea, limita de detecție (LOD) și limita de cuantificare (LOQ), repetabilitatea, precizia și acuratețea metodei.

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

În concluzie, metodologia propusă a fost validată în termeni de selectivitate, liniaritate, precizie și acuratețe. Datele obținute au demonstrat reproductibilitatea și stabilitatea bună a procedurii în intervalul de concentrație testat până la 200 µg/kg, cu abateri standard relative (RSD) mai mici de 10%. Metodologia propusă este aplicabilă pentru detectarea și monitorizarea pesticidelor selectate nu numai în fructe și legume cu conținut ridicat de apă, ci și în probele care conțin cantități mari de pigmenți și coloranți.

Activitatea 3.14. Diseminare rezultatelor: 1 articol ISI și 1 conferință internațională

Rezultatele obținute au fost diseminate prin:

1. **Actualizarea paginii web al proiectului:** <https://www.itim-cj.ro/PNCIDI/rapiddettbz/>

2. **Articol ISI:**

- Pregătirea și trimiterea spre publicare la revista Food Chemistry, jurnal care aparține quartilei (Q1), a unui articol ISI cu titlul: “ *Testing the SERS detection on Thiabendazole in frozen food products: the case of blueberries and their extracts*”, Autori: Müller Molnár Csilla, Camelia Berghian Groșan, Dana Alina Măgdaș, Simona Cîntă-Pînzaru.

3. **Participarea cu 2 prezentari (de tip poster) la conferințe internaționale:**

- Cs. Müller Molnár, C. Berghian-Grosan, S. Cinta Pânzaru, D. A. Magdas
“*Rapid detection of Thiabendazole pesticide in frozen fruits and vegetables commercialized in Romanian stores*”
The 6th edition of International Conference on Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences (IC-ANMBES 2022), 8-10 Iunie , 2022, Brașov, România.
- Cs. Müller Molnár, C. Berghian-Grosan, S. Cinta Pânzaru, D. A. Magdas
“*SERS detection of Thiabendazole pesticide in frozen fruits and vegetables*”
10th International Conference, AGRICULTURE AND FOOD, 16-19 August 2022, Burgas, Bulgaria.

4. **Organizarea unui Workshop**

- **Programul complet este la următorul link:**
<http://ro.itim-cj.ro/wp-content/uploads/2022/09/Workshop-on-Food-Control-6-oct2022.pdf>

Workshop-ul cu titlul:” Workshop **on nano-biosensing with portable/handheld Raman systems: From food products, toxins, safety and molecular contaminants to knowledge transfer to economic partners - With practical demos!**” s-a desfășurat în cadrul a patru proiecte de cercetare, intersectate datorită utilizării aceluiași metode analitice prin spectroscopie Raman și SERS.

Toate activitățile acestei etape au fost realizate cu succes!

Director Proiect,
Dr. Molnár Csilla