

RST - RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

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

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

ACRONYM: **RapidDetTBZ**



Etapa nr. 4

*Interpretarea rezultatelor obținute pe probele de fructe și legume congelate
achiziționate de pe piață și tragerea concluziilor*

*Evaluarea recunoașterii moleculare eficiente a TBZ-lui, utilizând echipamentul
Raman compact și portabil în piață și compararea rezultateelor cu datele
obținute în laborator*

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

Perioada: 01/01/2022 - 17/12/2023

Rezumatul etapei

În cadrul acestei etape de execuție a proiectului s-au interpretat rezultatele obținute prin SERS pe probele de fructe și legume congelate achiziționate de pe piață.

În cadrul acestei etape s-a dezvoltat și validat o metodă pentru detecția simultană a tiabendazolului (TBZ) și a carbendazimului (CBZ) prin HPLC-PDA.

S-a monitorizat prezența altor reziduurilor de pesticide utilizând metoda de extracție QuEChERS și cuantificare a pesticidelor organoclorurate din fructe și legume congelate achiziționate de pe piață prin tehnica GC-ECD, dezvoltată și validată în etapa anterioară.

Pe baza setului de date experimentale obținut cu metodele convenționale UHPLC-PDA și GC-ECD, s-au interpretat rezultatele.

S-a atribuit semnalului Raman/SERS a probelor de fructe și legume organice cu cele care conțin pesticidul TBZ și s-a cuantificat TBZ în probele investigate.

S-a testat și validat metoda „verde”, rapidă, ieftină de detectare a TBZ-lui în fructe și legume congelate, și confirmarea ei prin metode complementare HPLC și GC-ECD.

S-a evaluat recunoașterea moleculară a TBZ-lui în piață, utilizând echipamentul Raman compact și portabil și s-au comparat rezultatele cu datele obținute în laborator.

S-au validat rezultatele obținute prin SERS pe probele de fructe și legume congelate și s-au tras concluziile prin comparație cu rezultatele obținute din monitorizarea prezenței reziduurilor de pesticide în fructe și legume congelate achiziționate de pe piață cu metodele convenționale HPLC și GC-ECD.

De asemenea, pagina web a proiectului a fost actualizată, incluzând rezultatele obținute în cadrul acestei etape: <https://www.itim-cj.ro/PNCIDI/rapidettbz/>. Rezultatele proiectului au fost diseminate prin organizarea unui workshop, prezentarea rezultatelor la 5 conferințe internaționale și publicarea unui articol la un jurnal care aparține quartilei (Q2), în Applied Sciences.

Activitatea 4.1. Interpretarea rezultatelor obținute cu metodele convenționale HPLC și GC-ECD

În cadrul acestei activități, o gamă variată de probe de fructe și legume congelate, cum ar fi vișine, zmeură, căpșuni, afine, mure, spanac, mazăre, brocoli, fasole verde și morcovi, au fost colectate pentru analiză. Metoda de extracție QuEChERS dezvoltată și validată în etapa anterioară a acestui proiect, a fost folosită pentru a izola reziduurile de pesticide din matricele complexe de produse fructe și legume congelate. Tehnicile GC-ECD și UHPLC-PDA au fost utilizate pentru cuantificarea precisă și simultană a mai multor pesticide la limite scăzute de detecție, asigurând conformitatea cu standardele de siguranță reglementate.

Pentru a evalua fezabilitatea metodei validate UHPLC-PDA, a fost utilizată pentru monitorizarea de rutină a CBZ și TBZ 15 probe de fructe și 19 probe de legume congelate. Aceste probe au fost colectate de la supermarketurile locale și prelucrate utilizând metoda de extracție QuEChERS dezvoltată și descrisă în etapa anterioară, apoi injectate în sistemul cromatografic. Fiecare probă a fost rulată în trei exemplare. Din cele 34 de probe analizate, doar o probă a fost contaminată (a dat rezultate pozitive) și au fost detectate doar reziduuri de tiabendazol (0.12 mg/kg). Cantitatea de TBZ găsită a fost la un nivel de concentrație mai mare decât MRL autorizată UE (0.01 mg/kg).

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

Un alt obiectiv al acestei activități a fost de a evalua nivelul altor reziduuri de pesticide în fructele și legumele congelate comercializate pe piața din România utilizând detecția și cuantificarea prin tehnica GC-ECD. În cadrul acestei activități au fost investigate un total de 33 de probe de fructe și legume congelate. În acest scop s-a utilizat metoda de extracție QuEChERS optimizată și validată în etapa anterioară. Probele colectate au fost transferate în pungi de polietilenă sterile, codate și depozitate în congelator la -20 °C până la finalizarea procedurii de extracție.

Reziduuri de pesticide au fost detectate în 4 probe (<30 %) din cele 14 probe de fructe congelate analizate. Concentrațiile reziduurilor de pesticide detectate în probele de fructe și legume congelate au fost comparate cu limitele maxime de reziduuri admise de Comisia Europeană.

În ceea ce privește pesticidele detectate în probele de fructe congelate, 4 pesticide diferite au fost detectate în 4 probe și toate concentrațiile lor au fost sub MRL stabilite pentru fructe.

În ceea ce privește legumele congelate, în 12 (>60%) din cele 19 probe investigate, s-au detectat reziduuri de pesticide. S-au detectat în total 8 pesticide, toate concentrațiile fiind sub MRL.

Printre legumele testate au fost observate: 4 probe conținând un singur pesticid (21%) și o probă conținând două pesticide (5%), și 7 probe cu reziduuri multiple de 3, 4 pesticide (37%). Aceste probe cu pesticide multireziduu, prezintă un risc mai mare pentru sănătatea consumatorilor.

Rezultatele au furnizat informații importante privind contaminarea cu reziduuri de pesticide a cinci legume consumate în mod obișnuit și au subliniat necesitatea de a controla utilizarea/aplicarea produselor fitosanitare, în special a pesticidelor persistente. Rezultatele analizei probelor reale au relevat niveluri diferite de reziduuri de pesticide în fructele și legumele congelate. Toate probele investigate prin tehnica GC-ECD, s-au încadrat în limitele maxime de reziduuri stabilite (MRL), și au respectat standardele de siguranță.

Activitatea 4.2. Atribuirea semnalului Raman / SERS a probelor de fructe și legume organice și de cele care conțin pesticidul TBZ

Mai multe stocuri de fructe și legume congelate de proveniență atât din UE, cât și din afara UE, au fost achiziționate din magazinele locale populare.

Pentru a evalua detectarea TBZ în probele de fructe congelate, au fost alese două extracte bio/eco/organice ale două probe de afine congelate. Aceste extracte au fost utilizate pentru a crea extracte de fructe congelate tratate cu TBZ pentru testarea detectării TBZ în probe. Stocurile independente de fructe congelate au furnizat semnale SERS similare în ceea ce privește pozițiile benzilor, dar cu mici diferențe în intensitatea lor relativă, indicând o ușoară diferență în conținutul de flavonoide de la un fruct la altul. Printre benzile flavonoidelor amprenta TBZ nu a putut fi observată în extractele brute.

Probele tratate de TBZ au fost realizate prin adăugarea unei soluții de TBZ 10^{-3} M la soluția de extract de fructe într-o proporție de 1/1 (v/v). Pentru soluțiile tratate cu TBZ, probele SERS au fost realizate prin adăugarea a 1 μ L la 490 μ L de soluție coloidală de argint. Sensibilitatea metodei SERS propuse permite monitorizarea eficientă a TBZ în soluțiile de extracte până la limita de detecție (LOD) la 10^{-7} M.

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

Analizele SERS ale extractelor brute au arătat în mod clar absența benzilor SERS ale TBZ, ceea ce ar putea sugera că stocurile achiziționate de fructe de pe piață erau lipsite de TBZ (sau că TBZ nu a putut fi detectat în toate stocurile de fructe achiziționate aleatoriu).

Au fost înregistrate spectrele SERS ale probelor de legume congelate și au furnizat semnale SERS similare în ceea ce privește pozițiile benzilor, dar cu mici diferențe în intensitatea lor relativă, indicând o ușoară diferență în conținutul de carotenoide. Printre benzile carotenoizilor, amprenta TBZ a putut fi observată în anumite extracte brute de spanac.

Pentru a evalua detectarea TBZ în probele de legume congelate, a fost alesă un extract bio/eco/organice de spanac congelat. Acest extract a fost utilizată pentru a crea extractul de legume congelată tratată cu TBZ pentru testarea detectării TBZ în probe. Proba tratată cu TBZ a fost realizată prin adăugarea unei soluții de TBZ 10^{-3} M la soluția de extract de legume într-o proporție de 1/1 (v/v). Proba SERS cu soluția tratată cu TBZ, a fost realizată prin adăugarea a 1 μ L la 490 μ L de soluție coloidală de argint. Spectrele SERS au fost înregistrate de la fiecare în triplicat, iar spectrul mediu a fost ulterior utilizat pentru analize.

Semnalul SERS al TBZ a fost identificat cu succes în extracte de spanac congelate. Picurile caracteristice TBZ din extractele de legume au fost vizibile comparabile cu cele din soluția standard. Din intensitatea relativă a bandei de amprentă SERS în funcție de concentrație, am estimat o cantitate de **TBZ în probele de spanac de 0,50 μ M, deci sub limita de detecție admisă de EU (0.01 mg/kg).**

Activitatea 4.3. Tragerea concluziilor cu privire la validarea rezultatelor prin comparație cu metodele convenționale HPLC și GC-ECD pentru identificarea, caracterizarea și cuantificarea TBZ

Metoda propusă SERS, poate servi ca o tehnică alternativă sau complementară pentru analiza pesticidelor în probe complexe precum fructele și legumele și ar putea fi adoptată pe scară largă în domeniul siguranței și controlului alimentar. În plus, deoarece tiabendazolului (TBZ) este permis la un nivel de concentrație foarte mică, mai puțin decât MRL autorizat de UE (0.01 mg/kg) [1], LOD scăzut, metoda de preparare nu foarte laborioasă și timpul scurt de analiză a metodei SERS o fac foarte potrivită pentru verificarea de rutină a fructelor și legumelor congelate pentru a detecta prezența unei cantități la nivel de urme de TBZ.

Compararea datelor de laborator al TBZ cu cele furnizate de instrumentul portabil duc la concluzii ca echipamentului Raman portabil este eficient pentru monitorizarea pesticidului TBZ în probele de fructe și legume congelate.

Activitatea 4.4. Diseminare: 1 articol ISI si 1 conferință internațională

Rezultatele obținute au fost diseminate prin:

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

2. Articol ISI:

- Publicarea unui articol la un jurnal care aparține quartilei (Q2), a unui articol ISI cu titlul: **“Characterization and Differentiation of Wild and Cultivated Berries Based on Isotopic**

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

and Elemental Profiles”, Autori: Gabriela Cristea, Adriana Dehelean, Romulus Puscas, Florina-Dorina Covaciu, Ariana Raluca Hategan, Csilla Müller Molnár, Dana Alina Măgdaș, Applied Sciences, 2023, 13(5), 2980. <https://doi.org/10.3390/app13052980>.

3. Participarea la conferințe internaționale:

Cu 4 prezentări de tip poster

- Csilla Molnár, Ariana-Raluca Hategan, Dana Alina Magdas
“SERS discrimination of small berry fruits varieties”
Conferința internațională: “14th International Conference on Processes in Isotopes and Molecules PIM 2023”, 19-22 Septembrie, 2023, Cluj-Napoca, România.
-premiat: best poster presentation award
- Veronica Floare-Avram, Csilla Molnár, Florina-Dorina Covaciu
“Quantification of pesticide residues in frozen fruits and vegetables by GC-ECD and HPLC”
Conferința internațională: “14th International Conference on Processes in Isotopes and Molecules PIM 2023”, 19-22 Septembrie, 2023, Cluj-Napoca, România.
- Florina-Dorina Covaciu, Adriana Dehelean, Veronica Floare-Avram, Csilla Molnár, Gabriela Cristea
„Gas Chromatography in the food control process”
Conferința internațională: “11th International Conference - Agriculture & Food”, 14-17 August 2023, Burgas, Bulgaria.
- Cornelia Veronica Floare-Avram, Florina-Dorina Covaciu, Csilla Molnár
„Chromatographic quantification of benzimidazole fungicides in frozen fruit and vegetables using QuEChERS method”
Conferința internațională: “11th International Conference - Agriculture & Food”, 14-17 August 2023, Burgas, Bulgaria.

Cu 1 short oral presentation

- Cs. Müller Molnár, C. Berghian-Groșan, D. A. Măgdaș, S. Cîntă Pînzaru
Bentonite-filtered blueberry extracts allowed lowering the SERS detection limit of thiabendazole in frozen fruits
Conferința internațională: 14th International Conference on Physics of Advanced Materials - ICPAM – 15, Sharm El Sheikh, Egypt, November 19-26, 2023

Activitatea 4.5. Identificarea altor pesticide din probe congelate achiziționate folosind setul de date cromatografice și literatura de specialitate

În cadrul acestei activități, a fost dezvoltată și validată o metodă sensibilă și precisă pentru determinarea simultană a TBZ și a carbendazimului (CBZ) în probe de fructe și legume congelate utilizând UHPLC-PDA. Pentru a obține o separare rapidă și fiabilă, condițiile cromatografice au fost optimizate. Metoda analitică optimizată pentru determinarea carbendazimului și tiabendazolului în fructele și legumele congelate a fost validată conform procedurii oficiale de

PROIECT EXPERIMENTAL DEMONSTRATIV (PED)

validare. Au fost calculați următorii parametri de validare: selectivitate, liniaritate, limită de detecție (LOD) și cuantificare (LOQ), precizie și acuratețe.

Limitele de detecție (LOD) ale analișilor studiați au fost de 0.011 mg/kg pentru CBZ și 0.012 mg/kg și cuantificare (LOQ) a fost de 0.035 mg/kg pentru CBZ și 0.038 mg/kg pentru TBZ. Aceste rezultate indică faptul că metoda HPLC propusă este suficient de sensibilă pentru determinarea reziduurilor de pesticide și aplicabilă pentru cuantificare.

Pentru a evalua acuratețea metodei propuse, au fost analizate probele de spanac cu spike (1, 2.5 și 5 mg/kg). Metoda optimizată a prezentat o acuratețe bună, recuperările de CBZ și TBZ au fost între 79.52% și 92.55%. Având în vedere că factorii de recuperare ar trebui să fie între 70% și 120% [12], se poate considera că metoda actuală oferă factori de recuperare acceptabili pentru determinarea CBZ și TBZ în probe reale.

Metoda propusă UHPLC-PDA poate servi ca o tehnică alternativă sau complementară pentru analiza pesticidelor în probe complexe precum fructele și legumele și ar putea fi adoptată pe scară largă în domeniul siguranței și controlului alimentar. În plus, deoarece carbendazimul este interzis atât de Comisia UE, cât și de SUA, LOD scăzut și timpul scurt de analiză a metodei UHPLC-PDA propuse o fac foarte potrivită pentru verificarea de rutină a fructelor și legumelor congelate pentru a detecta prezența unei cantități la nivel de urme de CBZ.

Activitatea 4.6. Diseminare: organizare a unui workshop pentru mediul economic- prezentare rezultatelor pentru reprezentanții mediului economic

- **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 6 octombrie 2022 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**