

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE
VALENCIA**

**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**



**"DESARROLLO DE NUEVAS
METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE
FUNGICIDAS TRIAZÓLICOS EN
ARÁNDANOS"**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Bqca. María Isabel Tatiana Montti

Dirigida por:

Dra. Alicia Estela Ronco

Valencia/Concordia, 20 de octubre de 2010

A mi seres queridos, que han sido y serán
por siempre mi motivo de vivir

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos por los que hoy puedo agradecer el haber llegado a lo que ellos desearon para mí.

RESUMEN

El cultivo de arándanos surge en la Argentina como una nueva alternativa de producción orientada a la exportación. Las progresivas exigencias de los mercados respecto a productos libres o con bajos niveles de plaguicidas requieren de un adecuado manejo de la producción. Las enfermedades fúngicas son las principales causales de pérdidas en los cultivos, por lo cual la aplicación de fungicidas tales como los triazoles son necesarios para su control. Una vez efectuado el depósito sobre el tejido vegetal comienza una serie de procesos que modifican en el tiempo los niveles de residuos presentes. La eliminación y disipación progresiva dependen de numerosos factores, tales como la naturaleza del vegetal, propiedades fisicoquímicas del plaguicida, condiciones y momentos de las aplicaciones, condiciones climáticas, siendo la degradación química uno de los más relevantes. El carácter sistémico de estos fungicidas y la rápida maduración de las bayas hace prever que la eliminación total de los residuos no se logre, en virtud de lo cual se plantean como objetivos de la presente tesis doctoral, evaluar los niveles residuales de estos fungicidas en frutas y jugos de arándanos y estimar la cinética de degradación, cuando éstos son aplicados en determinadas condiciones en los cultivos y en condiciones de almacenamiento de las bayas envasadas en atmósferas modificadas. Las determinaciones cromatográficas de plaguicidas

en alimentos, implican en la mayoría de los casos, el análisis a niveles trazas de residuos de plaguicidas, con los inconvenientes aparejados al tratamiento de las muestras y pérdidas de analitos en diferentes etapas, tales como la extracción, el "clean up", concentración y diluyentes adecuados para la inyección cromatográfica. Además éstos involucran el uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos de elevada pureza, en su mayoría tóxicos y costosos. La microextracción en fase sólida, surge como nueva metodología tendiente a acotar los tiempos de análisis, reducir los costos, evitar el uso de solventes y aumentar la sensibilidad del método para la determinación de niveles trazas de contaminantes. La aplicación de esta nueva metodología ha tenido un creciente desarrollo en los últimos años, por lo que se adoptó este proceso extractivo para la determinación de fungicidas en las matrices mencionadas. Comparada con las técnicas de separación tradicionales, las ventajas de la misma incluyen la completa eliminación de solventes orgánicos, la simplificación de las etapas analíticas, mejoras en la sensibilidad y precisión, mejor selectividad y menores límites de cuantificación, como así también reducción del tiempo de análisis y ahorro de costos. Surge en los últimos años, el desarrollo de nuevos tipos de inyectores acoplados al sistema cromatográfico, tal como el inyector de vaporización de temperatura programada, a los fines de lograr incrementar la sensibilidad en cromatografía gaseosa y espectrometría de masa. Este inyector tiene importantes áreas de aplicación, ya que puede usarse para introducir grandes volúmenes de muestras y en modo de venteo de solvente logra concentrar en el inserto del sistema una alta masa de los analitos,

que luego son transferidos a la columna. La introducción de un gran volumen de muestra permite reducir los límites de detección y por lo tanto de gran ventaja para la determinación de plaguicidas a niveles traza. Sin embargo fue necesario establecer y optimizar algunas de las múltiples variables que inciden sobre la eficiencia de la vaporización de los plaguicidas, detección e identificación cromatográfica. Comparando ambas metodologías es factible concluir que para estos analitos fácilmente extraíbles desde soluciones acuosas, la microextracción en fase sólida es la más adecuada, ya que la masa inyectada y consecuentemente las respuestas cromatográficas son mayores a las observadas en otros métodos. En los casos que se requiera efectuar extracciones con solventes orgánicos, la utilización del inyector de temperatura programada es más apropiada que las técnicas tradicionales de inyección. La aplicación y optimización de técnicas tales como la microextracción en fase sólida y el uso de grandes volúmenes de muestras por múltiples inyecciones en modo venteo del solvente en el inyector de temperatura programada, han permitido la determinación e identificación por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa de residuos de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en arándanos y jugos de arándanos adicionados y en muestras reales, con adecuada precisión y elevada recuperación y sensibilidad, siendo los niveles de detección y cuantificación determinados, aproximadamente dos órdenes por debajo de los valores aceptables para dichos analitos y comparables a los observados en publicaciones bibliográficas. Por otro lado, cuando la muestra contiene muy bajos niveles residuales la sensibilidad de detección se puede incrementar

notablemente si se aumenta el tiempo de inmersión en la muestra. La aplicación y optimización del proceso extractivo, utilizando como polímeros de recubrimiento el polidimetilsiloxano y cambios en las condiciones cromatográficas, permitieron determinar otros plaguicidas de uso tradicional en los cultivos de la región. Se detectaron y cuantificaron en muestras reales residuos de malatión, clorpirifos, tebuconazole y trifloxistrobin, clorotalonil, fludioxonil y boscalid. Para todas las muestras el método de calibración adoptado fue a partir de muestras adicionadas, ya que existe efecto matriz. Los residuos evaluados en muestras de empaques fueron variando en las distintas temporadas y el total de muestras positiva fue relativamente bajo, aproximadamente de un 12% y con niveles menores a los límites máximos permitidos, sólo un 5 % de las muestras superaron estos valores. Los resultados obtenidos en jugos de arándanos, permitieron concluir que la persistencia relativa respecto a la carga inicial de residuos presentes en los frutos está influenciada por diversos factores; siendo factiblemente los más importantes la temperatura y los tratamientos enzimáticos. Respecto a las curvas de degradación de los plaguicidas evaluados, se pudo observar que las reacciones de disipación son de primer orden y determinando la constante específica de la velocidad de reacción se pudo calcular la vida media residual, la cual varía según los analitos y momento de aplicación. Debe tenerse en cuenta que estos resultados refieren a condiciones específicas, no necesariamente repetibles, aún para un mismo tipo de cultivo o una misma región geográfica, lo cual advierte sobre la necesidad de inspecciones continuas. Las técnicas analíticas optimizadas y los resultados obtenidos son

relevantes durante la toma de decisiones del sector productivo, ya que es factible efectuar el registro de residuos, en el marco de controles de calidad, logrando mayor competitividad en los mercados, protegiendo además la salud de potenciales consumidores y disminuyendo la contaminación ambiental.

Palabras claves: triazoles - arándanos - microextracción - espectrometría de masa

SUMMARY

The blueberry crop became an alternative for export-oriented production in Argentina. New market requirements related to product quality containing low levels of pesticides, require appropriate management of the crop production. Fungal diseases are the main causes of crop losses, thus the application of fungicides such as triazoles are needed for control. A series of processes that change over time the levels of residues on the plant tissue begins after the pesticides have been applied. The removal and gradual dissipation depend on many factors such as the nature of the plant, the chemical properties of the pesticides, time and conditions during application, weather, etc. The most relevant is the chemical degradation. The systemic nature of these fungicides and the rapid maturation of the berries seem to indicate that the total elimination of residues may not be reached. For these reasons, evaluating residual levels of these fungicides in fruits and blueberry juices, and estimation of degradation rates when applied on crops and under modified atmosphere storage conditions, are proposed as objectives of the present study. Chromatographic analysis of pesticides in food usually involve detection of trace levels of residues, requiring sample pretreatment steps, associated with potential losses of the analyte during different process stages, such as extraction, clean up, concentration and diluents for chromatography injections. In addition, they involve the use of large volumes of high purity organic solvents, mostly toxic and

expensive. Solid phase microextraction emerged as a new methodology aiming to reduce time of analysis and costs, avoiding the use of solvents and increasing the sensitivity of methods by allowing the determination of trace levels of contaminants. The application of this new methodology has been in growing development during recent years. Hence, this extraction procedure was adopted for the determination of fungicides in the matrices previously mentioned. In comparison with traditional methods, this technique has some advantages such as the complete elimination of organic solvents, the simplification of the analytical steps, improvements in sensitivity and accuracy, better selectivity and lower limits of quantification, as well as the reduction of the analysis time and cost savings. Developments during the last years incorporated analytical procedures such as programmed temperature vaporization injector attached to chromatographic systems, in order to achieve greater sensitivity in gas chromatography and mass spectrometry. This injector is very important in different areas of application. It can be used to introduce large volumes of samples and when used in the solvent vent mode is able to concentrate a large amount of analyte in the system inlet. Then they are transferred to the column. The introduction of a large sample volume allows lower limits of detection and therefore it represents a great advantage for the determination of trace levels pesticides. However, it was necessary to establish and optimize some of the many variables that affect the efficiency of the vaporization process of pesticides, and the chromatographic detection and identification. If both methodologies are compared, is feasible to conclude that for

analytes that are easily removed from aqueous solutions, solid phase microextraction is the best choice, with high injected mass and consequently leading to better chromatographic response than those observed in other methods. The use of the programmed temperature vaporization injector is more appropriate than traditional injection techniques when an organic solvent extraction is needed. The implementation and optimization of solid phase microextraction and large sample volume injection by multiple injections on solvent vent mode, in the programmed temperature vaporization injector, have allowed the determination and identification of triadimefon, penconazole, propiconazole and tebuconazole residues in fresh blueberries and blueberry juices spiked and in real samples by gas chromatography and mass spectrometry with adequate precision and high recovery and sensitivity. The limits of detection and quantification of these techniques are about two orders lower than the maximum residue guideline limits for these analytes and are comparable to those observed in published literature. On the other hand, when a sample contains very low residue levels, the sensitivity of the method could be significantly increased by extending the fiber immersion time. The implementation and optimization of the extraction process, using polydimethylsiloxane as polymers coating, and changes in the chromatographic conditions allowed determination of other pesticides commonly used for crops in the region. Residues of malathion, chlorpyrifos, tebuconazole, trifloxystrobin, chlorothalonil, fludioxonil and boscalid were detected and quantified in real samples. Spiked samples were used in all cases for calibration because of the matrix effect.

Residues from packaging house samples varied from one to another season and the total positive samples were relatively low, approximately 12%. Generally this value was below the maximum residues limits, except for only 5% of the samples. The results obtained in blueberry juice, allowed concluding that the relative persistence of residues related to the initial charge in fruits is influenced by several factors, being the most important the temperature and enzymatic treatments. The dissipation curves of the evaluated pesticides showed a first-order reaction behavior. The kinetic constant was determined and the half life time calculated. These values vary depending on the analytes and application conditions. Continuous inspection of residues levels are needed since values relate to specific conditions, not necessarily repeatable, even for the same type of crop or geographical region. The optimized analytical techniques and obtained results are very relevant during decision making steps within productive sector. Registering the residues as a quality control step allows achieving greater competitiveness in markets, besides to protecting consumers health and reducing environmental pollution.

Key words: triazoles – blueberries – microextraction – mass spectrometry

RESUM

El cultiu de nabius sorgix en l'Argentina com una nova alternativa de producció orientada a l'exportació. Les progressives exigències dels mercats respecte a productes lliures o amb baixos nivells de plaguicides requereixen d'un adequat maneig de la producció. Les malalties fúngiques són les principals causals de pèrdues en els cultius, per la qual cosa l'aplicació de fungicides tals com els triazoles són necessaris per al seu control. Una vegada efectuat el depòsit sobre el teixit vegetal comença una sèrie de processos que modifiquen en el temps els nivells de residus presents. L'eliminació i dissipació progressiva depenen de nombrosos factors, tals com la naturalesa del vegetal, propietats fisicoquímiques del plaguicida, condicions i moments de les aplicacions, condicions climàtiques, sent la degradació química un dels més rellevants. El caràcter sistèmic d'estos fungicides i la ràpida maduració de les baies fa prevore que l'eliminació total dels residus no s'aconsegueixca, en virtut de tot això es plantegen com a objectius de la present tesi doctoral, avaluar els nivells residuals d'estos fungicides en fruites i suc de nabius i estimar la cinètica de degradació, quan estos són aplicats en determinades condicions en els cultius i en condicions d'emmagatzemament de les baies envasades en atmosferes modificades. Les determinacions cromatogràfiques de plaguicides en aliments, impliquen en la majoria dels casos, l'anàlisi a nivells traces de residus de plaguicides, amb els inconvenients aparellats al

tractament de les mostres i pèrdues d'analitos en diferents etapes, tals com l'extracció, el "clean up", concentració i diluents adequats per a la injecció cromatogràfica. A més estos involucren l'ús de grans volums de solvents orgànics d'elevada puresa, en la seua majoria tòxics i costosos. La microextracció en fase sòlida, sorgix com nova metodologia tendent a acotar els temps d'anàlisi, reduir els costos, evitar l'ús de solvents i augmentar la sensibilitat del mètode per a la determinació de nivells traces de contaminants. L'aplicació d'esta nova metodologia ha tingut un creixent desenrotllament en els últims anys, per la qual cosa es va adoptar este procés extractiu per a la determinació de fungicides en les matrius mencionades. Comparada amb les tècniques de separació tradicionals, els avantatges de la mateixa inclouen la completa eliminació de solvents orgànics, la simplificació de les etapes analítiques, millores en la sensibilitat i precisió, millor selectivitat i menors límits de quantificació, com així també reducció del temps d'anàlisi i estalvi de costos. Sorgix en els últims anys, el desenrotllament de nous tipus d'injectors adaptats al sistema cromatogràfic, tal com l'injector de vaporització de temperatura programada, als fins d'aconseguir incrementar la sensibilitat en cromatografia gasosa i espectrometria de massa. Este injector té importants àrees d'aplicació, ja que pot usar-se per a introduir grans volums de mostres i en mode de venteo de solvent aconseguix concentrar en l'inserisc del sistema una alta massa dels analitos, que després són transferits a la columna. La introducció d'un gran volum de mostra permet reduir els límits de detecció i per tant de gran avantatge per a la determinació de plaguicides a nivells traça. No obstant va ser necessari establir i

optimar algunes de les múltiples variables que incidixen sobre l'eficiència de la vaporització dels plaguicides, detecció i identificació cromatogràfica. Comparant ambdós metodologies és factible concloure que per a estos analitos fàcilment extraïbles des de solucions aquüoses, la microextracció en fase sòlida és la més adequada, ja que la massa injectada i conseqüentment les respostes cromatogràfiques són majors a les observades en altres mètodes. En els casos que es requerisca efectuar extraccions amb solvents orgànics, la utilització de l'injector de temperatura programada és més apropiada que les tècniques tradicionals d'injecció. L'aplicació i optimització de tècniques tals com la microextracció en fase sòlida i l'ús de grans volums de mostres per múltiples injeccions en mode venteo del solvent en l'injector de temperatura programada, han permés la determinació i identificació per cromatografia gasosa i espectrometria de massa de residus de triadimefon, penconazole, propiconazole i tebuconazole en nabius i sucs de nabius addicionats i en mostres reals, amb adequada precisió i elevada recuperació i sensibilitat, sent els nivells de detecció i quantificació determinats, aproximadament dos ordres per davall dels valors acceptables per a dits analitos i comparables als observats en publicacions bibliogràfiques. D'altra banda, quan la mostra conté molt baixos nivells residuals la sensibilitat de detecció es pot incrementar notablement si s'augmenta el temps d'immersió en la mostra. L'aplicació i optimització del procés extractiu, utilitzant com polímers de recobriment el pòlidimeilsiloxano i canvis en les condicions cromatogràfiques, van permetre determinar altres plaguicides d'ús tradicional en els cultius de la regió. Es van

detectar i van quantificar en mostres reals residus de malatión, clorpirifos, tebuconazole i trifloxistrobin, clorotalonil, fludioxonil i boscalid. Per a totes les mostres el mètode de calibratge adoptat va ser a partir de mostres adicionades, ja que hi ha efecte matriu. Els residus avaluats en mostres de prestàncies van ser variant en les distintes temporades i el total de mostres positiva va ser relativament baix, aproximadament d'un 12% i amb nivells menors als límits màxims permesos, només un 5 % de les mostres van superar estos valors. Els resultats obtinguts en suc de nabius, van permetre concloure que la persistència relativa respecte a la càrrega inicial de residus presents en els fruits està influenciada per diversos factors; sent factiblement els més importants la temperatura i els tractaments enzimàtics. Respecte a les corbes de degradació dels plaguicides avaluats, es va poder observar que les reaccions de dissipació són de primer orde i determinant la constant específica de la velocitat de reacció es va poder calcular la vida mitja residual, la qual varia segons els analitos i moment d'aplicació. Ha de tindre's en compte que estos resultats referixen a condicions específiques, no necessàriament repetibles, encara per a un mateix tipus de cultiu o una mateixa regió geogràfica, la qual cosa advertix sobre la necessitat d'inspeccions contínues. Les tècniques analítiques optimades i els resultats obtinguts són rellevants durant la presa de decisions del sector productiu, ja que és factible efectuar el registre de residus, en el marc de controls de qualitat, aconseguint major competitivitat en els mercats, protegint a més la salut de potencials consumidors i disminuint la contaminació ambiental.

Paraules claus: triazoles - nabiús - microextracció - espectrometria de massa

INDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| Descripción del producto | 7 |
| Fisiología de la maduración y del deterioro de arándanos | 9 |
| Cosecha | 11 |
| Tratamiento postcosecha de arándanos | 12 |
| Refrigeración | 13 |
| Aplicación de atmósferas modificadas o controladas | 14 |
| Calidad del arándano fresco para su exportación | 18 |
| Enfermedades de los cultivos de arándanos | 19 |
| Manejo integrado de enfermedades | 24 |
| Fungicidas Triazólicos | 27 |
| Propiconazole | 28 |
| Triadimefon | 30 |
| Penconazole | 31 |
| Tebuconazole | 32 |
| Formación y evolución de los residuos de plaguicidas en el tejido vegetal | 34 |
| Depósito de plaguicida | 34 |
| Crecimiento del sustrato vegetal- Eliminación progresiva de los residuos | 36 |
| Curvas de disipación o persistencia | 40 |

| | |
|--|------------|
| Análisis de residuos en frutas | 43 |
| OBJETIVOS | 51 |
| Objetivos específicos | 53 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 61 |
| Plan de muestreo | 61 |
| Submuestreo | 66 |
| Muestra única compuesta | 67 |
| Preparación de las Muestras para el Análisis | 68 |
| Materiales y equipamiento | 69 |
| Reactivos | 69 |
| Equipamiento | 70 |
| Metodologías Analíticas | 72 |
| Condiciones cromatográficas | 75 |
| Análisis de los resultados | 77 |
| I- Determinación de triazoles por cromatografía gaseosa, detector de nitrógeno- fósforo, método de inyección directa de soluciones mezcla de estándares | 83 |
| Introducción | 83 |
| Materiales y Métodos | 84 |
| Resultados y Discusión | 87 |
| II- Determinación de Triazoles en Soluciones Acuosas de Estándares por SPME Y GC-NPD | 101 |
| Introducción | 101 |
| Materiales y Métodos | 102 |
| Resultados y Conclusiones | 122 |

| | |
|--|------------|
| III- Determinación de Triazoles en Arándanos por SPME - | |
| GC-NPD | 145 |
| Introducción | 145 |
| Materiales y Métodos | 149 |
| Resultados y Conclusiones | 151 |
| Aplicación de la Metodología SPME a Muestras de Arándanos Provenientes de Empaques | 172 |
| | |
| IV- Estudio de la Evolución de los Residuos en Muestras de Arándanos Envasados en Atmósferas Modificadas | |
| | 179 |
| Introducción | 179 |
| Materiales y Métodos | 180 |
| Resultados y Conclusiones | 181 |
| | |
| V- Curvas de Disipación | |
| | 185 |
| Introducción | 185 |
| Materiales y Métodos | 188 |
| Resultados y Conclusiones | 191 |
| | |
| VI- Determinación de Triazoles por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masa. Optimización del Sistema PTV en Modo Splits/Splitless y Venteo de Solvente | |
| | 219 |
| Introducción | 219 |
| Materiales y Métodos | 220 |
| Resultados y Conclusiones | 221 |
| Identificación de Triazoles por GC/ MSD - SPME | 231 |
| | |
| VII- Determinación de Triazoles en Jugos Procesados de Arándanos por SPME - GC-NPD | |
| | 241 |
| Introducción | 241 |
| Materiales y Métodos | 244 |
| Resultados y Conclusiones | 246 |

| | |
|--|------------|
| Jugos naturales de arándanos_____ | 256 |
| Persistencia de los Residuos en Jugos Naturales y Procesados _____ | 263 |
| VIII- Aplicación de la SPME para la Determinación de otros Plaguicidas en Muestras de Arándanos _____ | 273 |
| Introducción _____ | 273 |
| Materiales y Métodos _____ | 275 |
| Resultados y Conclusiones _____ | 277 |
| <i>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</i> _____ | 291 |
| <i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> _____ | 303 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Variedades de Arándanos | 6 |
| Tabla 2. Factores nutricionales del arándano fresco - Fuente: Northeast Regional Agriculture Engineering S. y Produce Marketing Association's Labeling Facts, USA..... | 8 |
| Tabla 3. Análisis unidimensional- Soluciones estándares de Triadimefon- I.D.-GC-NPD (n= 10 y $\alpha = 0,05$) | 89 |
| Tabla 4. Soluciones estándares en etilacetato Penconazole, Propiconazole (I y II) y Tebuconazole- I.D- GC-NPD (n= 10 y $\alpha = 0,05$)..... | 92 |
| Tabla 5. Resultados previos para la determinación de los Límites -Triadimefon I.D-GC-NPD (n=30 y $\alpha = 0,05$)..... | 99 |
| Tabla 6. Límites de Detección y Cuantificación – Inyección Directa GC-NPD | 100 |
| Tabla 7. Comparación de polímeros (n= 10 y $\alpha = 0,05$)..... | 124 |
| Tabla 8. Pesos Moleculares | 130 |
| Tabla 9. Valores medios comparativos CWX/DVB vs. Inyección Directa | 130 |
| Tabla 10. Constantes de distribución: K CWX/DVB/agua | 131 |
| Tabla 11. Volumen mínimo y coeficientes de Difusión : CWX/DVB/ agua | 133 |
| Tabla 12. Análisis Unidimensional - Triazoles en solución acuosa SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha = 0,05$)..... | 135 |
| Tabla 13. Límites de Detección y Cuantificación Triazoles en solución acuosa -CWX/DVB (n=30 y $\alpha = 0,05$)..... | 142 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 14. Recuperación Soluciones acuosas Estándares | |
| Triazoles | 143 |
| Tabla 15. Valores medios comparativos SPME vs. Inyección | |
| Directa | 155 |
| Tabla 16. Constantes de distribución CWX/DVB/ Arándanos | |
| 156 | |
| Tabla 17. Volumen mínimo y Coeficientes de Difusión | |
| CWX/DVB/ Arándanos adicionados a 10 µl/l..... | 156 |
| Tabla 18. Valores Comparativos: Constantes y Coeficientes | |
| Difusión Estándares vs. Arándanos adicionados a 10 µl/l ... | 157 |
| Tabla 19. Análisis Unidimensional Triazoles Arándanos | |
| adicionados CWX/DVB- GC-NPD -(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 159 |
| Tabla 20. Análisis Unidimensional Triazoles Arándanos | |
| adicionados CWX/DVB- GC-NPD -(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 159 |
| Tabla 21. Precisión Arándanos adicionados 10 µl/l- | |
| CWX/DVB- GC-NPD -(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 168 |
| Tabla 22. Límites de Detección y Cuantificación Muestras de | |
| Arándanos adicionados - CWX/DVB- GC-NPD-(n=30 y $\alpha =$ | |
| 0,05) | 169 |
| Tabla 23. Recuperación Triazoles - Arándanos adicionados a | |
| 50- 10- 2,5 y 1 µl/l - CWX/DVB- GC-NPD-(n= 20 y $\alpha =$ | |
| 0,05) | 170 |
| Tabla 24. Muestras de Arándanos - Empaque 1/2006..... | |
| 173 | |
| Tabla 25. Valores medios expresados en µg/ kg fruta - | |
| Empaque 1/2006..... | 173 |
| Tabla 26. Muestras de Arándanos - Empaque 2/2006..... | |
| 173 | |
| Tabla 26. Muestras de Arándanos - Empaque 2/2006 | |
| (Continuación)..... | 174 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 27. Valores medios expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta | |
| Empaque 2/2006..... | 174 |
| Tabla 28. Muestras de Arándanos - Empaque 3/2006..... | 174 |
| Tabla 29. Valores medios expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta - | |
| Empaque 3/2006..... | 175 |
| Tabla 30. Valores medios expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta - | |
| Empaque 1/2007..... | 175 |
| Tabla 31. Valores medios expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta - | |
| Empaque 2/2007..... | 175 |
| Tabla 32. Valores medios expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta - | |
| Empaque 3/2007..... | 176 |
| Tabla 33. Valores medios expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta - | |
| Empaque 1/2008..... | 176 |
| Tabla 34. Valores medios expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta - | |
| Empaque 2/2008..... | 176 |
| Tabla 35. Número de Muestras de Empaques positivas. | |
| Comparación con los Límites Máximos de Residuos- | |
| Resolución SENASA N°619/05..... | 177 |
| Tabla 36. Evolución de los residuos de Tebuconazole- | |
| Arándanos en Atmósferas Modificadas..... | 182 |
| Tabla 37. Variación del Tamaño de las bayas - Diámetro | |
| ecuatorial Promedio expresado en mm - ($n= 120$ y $\alpha=$ | |
| $0,05$) | 192 |
| Tabla 38. Evolución de los Residuos de Propiconazole I en | |
| Arándanos - Aplicación: Floración - CWX/DVB ($n=5$ y $\alpha =$ | |
| $0,05$) | 194 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 39. Evolución de los Residuos de Propiconazole II en Arándanos - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$) | 194 |
| Tabla 40. Evolución de los Residuos de Tebuconazole en Arándanos - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$) | 195 |
| Tabla 41. Persistencia Relativa - Propiconazole I - II y Tebuconazole Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$) | 197 |
| Tabla 42. Evolución Valores Medios Residuos de Tebuconazole – 3 Aplicaciones: Cuaje – Lote B - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$) | 208 |
| Tabla 43. Persistencia Relativa -Residuos de Tebuconazole – 3 Aplicaciones: Cuaje – Lote B- CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$) | 208 |
| Tabla 44. Evolución de los Residuos de Propiconazole I - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)..... | 212 |
| Tabla 45. Persistencia Relativa -Residuos de Propiconazole I - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)..... | 212 |
| Tabla 46. Evolución de los Residuos de Propiconazole II - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)..... | 214 |
| Tabla 47. Persistencia Relativa -Residuos de Propiconazole II - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)..... | 214 |
| Tabla 48. Triazoles - GC-MSD - PTV en modo split/splitless...225 | |
| Tabla 49. Límites de Detección y Cuantificación Triazoles PTV-GC/MSD- 7,5 μ l – 6 inyecciones (n = 30 y $\alpha = 0,05$) ...228 | |
| Tabla 50. Comparación de Técnicas Cromatográficas - Triazoles | 229 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 51. Triazoles - GC-MSD - PTV en modo split/splitless ... | 235 |
| Tabla 52. Análisis Unidimensional - Triadimefon Jugos de Arándanos – CWX/DVB- GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$) | 247 |
| Tabla 53. Análisis Unidimensional Penconazole –Jugos de Arándanos – CWX/DVB- GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$) | 247 |
| Tabla 54. Análisis Unidimensional Propiconazole I - Jugos de Arándanos – CWX/DVB – GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$) | 247 |
| Tabla 55. Análisis Unidimensional Propiconazole II -Jugos de Arándanos – CWX/DVB- GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$) | 248 |
| Tabla 56. Análisis Unidimensional Tebuconazole –Jugos de Arándanos – CWX/DVB – GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$) | 248 |
| Tabla 57. Precisión Jugos de Arándanos 25 μ l/l –CWX/D-GC-NPD (n=5 $\alpha=0,05$)..... | 254 |
| Tabla 58. Precisión Jugos de Arándanos 10 μ l/l –CWX/DVB-GC-NPD (n=5 $\alpha=0,05$) | 254 |
| Tabla 59. Precisión Jugos de Arándanos 10 μ l/l –CWX/DVB-GC-NPD (n= 10 y $\alpha= 0,05$)..... | 255 |
| Tabla 60. Límites de Detección y Cuantificación Jugos de Arándanos – CWX/DVB –GC-NPD (n=30 y $\alpha= 0,05$) | 256 |
| Tabla 61. Recuperación- Jugos de Arándanos Triazoles CWX/DVB- GC-NPD (n=20 $\alpha= 0,05$)..... | 256 |
| Tabla 62. Ecuaciones Regresión Lineal Triazoles Jugos - CWX/DVB-GC-NPD..... | 258 |
| Tabla 63. Persistencia de residuos de Propiconazole- Muestreo N° 3 - Lote 2 -2007 (n= 3 y $\alpha =0,05$) | 264 |
| Tabla 64. Persistencia de residuos de Propiconazole- Muestreo N° 5 - Lote 3 -2007 (n= 3 y $\alpha = 0,05$) | 264 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 65. <i>Persistencia de residuos de Propiconazole - Muestreo Nº 4- Lote1 -2008 (n= 3 y $\alpha = 0,05$)</i> | 264 |
| Tabla 66. <i>Persistencia de residuos de Tebuconazole - Muestreo Nº 5- Lote 3 -2008 (n= 3 y $\alpha =0,05$)</i> | 267 |
| Tabla 67. <i>Persistencia de residuos de Tebuconazole - Muestreo Nº 2- Lote2 -2008 (n= 3 y $\alpha =0,05$)</i> | 267 |
| Tabla 68. <i>Persistencia de residuos de Tebuconazole - Muestreo Nº 4- Lote3 -2008 (n= 3 y $\alpha =0,05$)</i> | 267 |
| Tabla 69. <i>Persistencia de residuos de Triadimefon - Muestreo Nº 1- Lote1 -2007 (n= 3 y $\alpha =0,05$)</i> | 268 |
| Tabla 70. <i>Valores medios de Clorpirifos y Malatión en Arándanos. Evaluación de la contaminación por deriva de las aplicaciones en cultivos aledaños</i> | 282 |
| Tabla 71. <i>Valores Medios de Residuos de Tebuconazole+ Trifloxistrobin, Clorotalonil, Fluodioxonil y Boscalid en Muestras de Arándanos expresados $\mu\text{g}/\text{kg}$ - E 1/2008 -.....</i> | 285 |
| Tabla 72. <i>Valores Medios de Residuos de Ciprodinil y Boscalid en Muestras de Arándanos expresados $\mu\text{g}/\text{kg}$ - E 2 /2008</i> | 285 |
| Tabla 73. <i>Valores Medios de Residuos de Tebuconazole+ Trifloxistrobin, Clorotalonil y Fludioxonil en Muestras de Arándanos expresados $\mu\text{g}/\text{kg}$</i> | 285 |
| Tabla 74. <i>Valores Medios de Residuos de Ciprodinil, boscalid y Tebuconazole +Trifloxistrobin en Muestras de Arándanos expresados $\mu\text{g}/\text{kg}$ - E2 /2009</i> | 285 |
| Tabla 75. <i>Límites Máximos de Residuos expresados en $\text{mg}/$ kg</i> | 286 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Recolección de arándanos..... | 11 |
| Figura 2. Efectos en los frutos causados por hongos..... | 24 |
| Figura 3. Cromatograma Triazoles – GC-NPD- Inyección | |
| Directa | 88 |
| Figura 4. Regresión Lineal Triadimefon I.D. GC-NPD- (n= 10 y | |
| $\alpha = 0,05$) | 90 |
| Figura 5. Regresión Lineal Penconazole I.D.- GC-NPD (n= 10 | |
| y $\alpha = 0,05$)..... | 94 |
| Figura 6. Regresión Lineal Propiconazole I - I.D.- GC-NPD | |
| (n= 10 y $\alpha = 0,05$)..... | 95 |
| Figura 7. Regresión Lineal Propiconazole II - I.D.- GC-NPD | |
| (n= 10 y $\alpha = 0,05$)..... | 96 |
| Figura 8. Regresión Lineal Tebuconazole - I.D.- GC-NPD (n= | |
| 10 y $\alpha = 0,05$)..... | 97 |
| Figura 9. Regresión Lineal Triazoles GC-NPD Inyección | |
| Directa | 98 |
| .Figura 10. Perfil Tiempo de Extracción. Fuente: Pawlisziyn J.. | 116 |
| Figura 11. Perfil de extracción Triadimefon a 10 y 50 $\mu\text{l/l}$ - | |
| SPME-CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)..... | 125 |
| Figura 12. Perfil de extracción Penconazole a 10 y 50 $\mu\text{l/l}$ - | |
| SPME-CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)..... | 126 |
| Figura 13. Perfil de extracción Propiconazole I a 10 y 50 $\mu\text{l/l}$ - | |
| SPME-CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)..... | 126 |

| | |
|--|-----|
| Figura 14. Perfil de extracción Propiconazole II - a 10 y 50 µl/l -SPME-CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)..... | 127 |
| Figura 15. Perfil de extracción Tebuconazole a 10 y 50 µl/l - SPME-CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)..... | 127 |
| Figura 16. Perfil Extracción Triazoles a 50 µl/l -SPME- CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)..... | 128 |
| Figura 17. Perfil Extracción Triazoles 10 µl/l - -SPME- CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)..... | 128 |
| Figura 18. Regresión Lineal -Triadimefon solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$)..... | 137 |
| Figura 19. Regresión Lineal - Penconazole en solución acuosa -CWX/DVB (n=10 y $\alpha=0,05$)..... | 138 |
| Figura 20. Regresión Lineal - Propiconazole I en solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$) | 138 |
| Figura 21. Regresión Lineal Propiconazole II en solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$) | 139 |
| Figura 22. Regresión Lineal -Tebuconazole en solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$) | 140 |
| Figura 23. Regresión Lineal -Triazoles en solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$)..... | 141 |
| Figura 24. Perfil de Extracción Triazoles en Muestras de Arándanos adicionadas a 10 µl/l -SPME CWXDVB –GC- NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$)..... | 152 |
| Figura 25. Perfil Comparativo Triadimefon Arándanos vs. Estándares..... | 152 |
| Figura 26. Perfil Comparativo Penconazole Arándanos vs Estándares a 10 µl/l | 153 |

| | |
|--|-----|
| Figura 27. Perfil Comparativo Propiconazole I Arándanos vs. Estándares..... | 153 |
| Figura 28. Perfil Comparativo Propiconazole II Arándanos vs. Estándares..... | 154 |
| Figura 29. Perfil Comparativo Tebuconazole- Arándanos vs. Estándares..... | 154 |
| Figura 30. Regresión Lineal Triadimefon –Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 162 |
| Figura 31. Regresión Lineal Penconazole – Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 162 |
| Figura 32. Regresión Lineal Propiconazole I Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 163 |
| Figura 33. Regresión Lineal Propiconazole II Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 163 |
| Figura 34. Regresión Lineal Tebuconazole Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 164 |
| Figura 35. Regresión Lineal Triazoles- Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$) | 164 |
| Figura 36. Comparación de Rectas de Regresión Penconazole Arándanos vs. Estándares- CWX/DVB | 165 |
| Figura 37. Curva de Evolución de los residuos de Tebuconazole- Arándanos en Atmósferas Modificadas..... | 182 |
| Figura 38. Curva de crecimiento -Diámetro ecuatorial bayas (mm.) | 193 |
| Figura 39. Curvas de Degradación Propiconazole y Tebuconazole - Aplicación: floración CWX/DVB (n=5 y $\alpha =$ 0,05) | 196 |

Figura 40. Curva de Regresión - Disipación de Propiconazole I - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)200

Figura 41. Curva de Regresión - Disipación de Propiconazole II - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)201

Figura 42. Curva Regresión – Disipación de Tebuconazole - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)202

Figura 43. Evolución de los Residuos de Tebuconazole en Arándanos – 3 Aplicaciones- Cuaje - Lote B- CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$).....207

Figura 44. Curva Regresión - Disipación Tebuconazole – 3 Aplicaciones: Cuaje Lote B - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)...207

Figura 45. Curva Disipación Propiconazole I (ppb vs. días) - Aplicación: Cuaje – Lote A - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)....210

Figura 46. Curva Disipación Propiconazole I (Ln R vs. días)- Aplicación: Cuaje –Lote A - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$).....211

Figura 47. Curva Disipación Propiconazole II ($\mu\text{l/l}$ vs. días) - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$).....213

Figura 48. Curva Disipación Propiconazole II (Ln R vs. días) - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$).....214

Figura 49. Curvas comparativas Disipación Propiconazole I y II - Floración vs. Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$).....216

Figura 50. Curvas comparativas Disipación Tebuconazole - Floración vs. Cuaje (Lote B) - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$) .217

Figura 51. Linealidad Triazoles - PTV-GC/MSD-7,5 μl – 6 inyecciones - (n = 5 y $\alpha = 0,05$)227

| | |
|---|-----|
| Figura 52- a. Cromatograma de Triazoles - GC-MSD – SPME (modo SCAN)..... | 234 |
| Figura 52-b. Cromatograma de Triazoles SPME - GC-NPD - 10 µl/l -720 min. CWX/DVB..... | 234 |
| Figura 53. Espectro de masa/z Triadimefon - GC-MSD – SPME Arándanos 10 µl/l..... | 235 |
| Figura 54. Espectro de masa/z - Penconazole - GC-MSD – SPME Arándanos 10 µl/l..... | 236 |
| Figura 55. Espectro de masa/z - Propiconazole II - GC-MSD – SPME Arándanos 10 µl/l..... | 236 |
| Figura 56. Espectro de masa/z - Propiconazole I - GC-MSD – SPME Arándanos 10 µl/l..... | 237 |
| Figura 57. Espectro de masa/z - Tebuconazole - GC-MSD – SPME Arándanos 10ppb..... | 237 |
| Figura 58. Regresión Lineal Triadimefon Jugos de Arándanos CWX/DVB- GC-NPD (n = 5 y $\alpha = 0,05$)..... | 249 |
| Figura 59. Comparación Rectas Regresión Triadimefon - CWX/DVB- GC-NPD Jugos Arándanos vs. Estándares | 250 |
| Figura 60. Comparación Rectas Regresión Penconazole - CWX/DVB –GC-NPD-Jugos Arándanos vs. Estándares | 250 |
| Figura 61. Comparación Rectas Regresión Propiconazole I - CWX/DVB- GC-NPD -Jugos Arándanos vs. Estándares | 251 |
| Figura 62. Comparación Rectas Regresión Propiconazole II- CWX/DVB- GC-NPD Jugos Arándanos vs. Estándares | 251 |
| Figura 63. Comparación Rectas Regresión Tebuconazole - CWX/DVB- GC-NPD Jugos Arándanos vs. Estándares | 252 |
| Figura 64. Regresión Lineal Triazoles Jugos Procesados- CWX/DVB-GC-NPD..... | 257 |

Figura 65. Regresión Lineal Triazoles Jugos Naturales-
 CWX/DVB -GC-NPD.....258

Figura 66. Comparación Rectas de Regresión Triadimefon -
 CWX/DVB- GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos
 procesados de Arándanos260

Figura 67. Comparación Rectas de Regresión Penconazole-
 CWX/DVB-GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos
 de Arándanos.....260

Figura 68. Comparación Rectas Regresión Propiconazole I
 CWX/DVB -GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos
 de Arándanos.....261

Figura 69. Comparación Rectas Regresión Propiconazole II
 CWX/DVB -GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos
 de Arándanos.....261

Figura 70. Comparación Rectas Regresión Tebuconazole -
 CWX/DVB --GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs.
 Jugos de Arándanos262

Figura 71. Evolución de los residuos de Propiconazole en la
 línea de obtención de Jugos Muestreo Nº 3 - Lote 2 -2007-
 Muestreo Nº 5 - Lote 3 -2007 - Muestreo Nº 4- Lote1 -2008
 (n= 3 y $\alpha =0.05$).....266

Figura 72. Evolución de los residuos de Tebuconazole en la
 línea de obtención de Jugos- Muestreo Nº 5- Lote 3 -2008
 - Muestreo Nº 2- Lote2 -2008- Muestreo Nº 4- Lote3 -2008
 (n= 3 y $\alpha =0.05$).....266

Figura 73. Evolución de los Residuos de Propiconazole,
 Tebuconazole y Triadimefon en la línea de obtención de
 Jugos- Muestreo 2007 y 2008 (n= 3 y $\alpha =0,05$).269

- Figura 74.** *Curvas de absorción – Muestras multiresiduos a 100 ppb de Dimetoato, Metil Paratión, Malatión y Paratión- PDMS- GC-NPD (n=3 y $\alpha =0,05$).....279*
- Figura 75.** *Cromatograma PDMS- GC-NPD. Muestra de arándanos adicionada con Diazinon, Metil Paratión, Fenitrothion, Malatión y Paratión a 50 μ l/l.281*
- Figura 76.** *Cromatograma CWX/DVB-GC-NPD. Muestra de arándanos adicionada a 100 μ g/l Clorotalonil (RT: 9,997), Boscalid (RT: 10,626), Fludioxanil (RT: 10,936), Ciproconazole (RT: 11,850) y Trifloxistrobin (RT: 12,721)...281*

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El creciente consumo en el mundo de alimentos ricos en antioxidantes, tales como los arándanos, ha incentivado notablemente el cultivo en nuestro país, que surge como una nueva alternativa de producción orientada fundamentalmente a la exportación.

En varios países este consumo no sólo es tradicional en ciertas festividades, sino que es además, requerido en los mercados por su alto valor nutritivo y propiedades antioxidantes (Clifford, 2000; Raffer, 2002; Arakelian, 2005).

El principal productor, consumidor, exportador e importador de arándanos del mundo es Estados Unidos de América y constituye un mercado de más de 265 millones de consumidores. Otros países tales como Canadá, Japón y la Comunidad Europea son también importantes consumidores de arándanos frescos y/o procesados.

La globalización y las perspectivas económicas para Argentina son algunos de los móviles básicos para alentar el aprovechamiento de su potencial productivo y la diversificación de su oferta exportable, por lo que, el cultivo de diferentes variedades de arándanos ha tenido un creciente desarrollo (Arakelian, 2005; Cornet, 2008).

La Argentina, cuenta con la ventaja comparativa de la contraestación, que permite su posición geográfica, para ofertar este tipo de productos en estado fresco a los principales mercados

ubicados en el hemisferio norte, Estados Unidos de América, Canadá y algunos países europeos, cuando éstos se encuentran en su estación invernal y no pueden abastecerse con producción local (Bruzzone, 2007).

Entre las nuevas alternativas de producción, orientadas a la exportación frutícola, se destaca el arándano como una de las más viables para Argentina (León, 2007). Esto surge en función de diversos factores tales como, las necesidades de mercado, rentabilidad, disponibilidad de condiciones agroclimáticas necesarias para su cultivo, etc., lo que ha llevado al sector, en los últimos años, a mayores posibilidades de diversificación en oferta exportable, a tener mayores expectativas de alta rentabilidad y con seguridad de una inversión firme y a largo plazo (Bruzzone, 2007).

La producción de arándanos ha crecido en la Argentina en forma vertiginosa, el año último se exportaron aproximadamente 8.000 toneladas de fruta fresca, de ese volumen, el 70% se despachó a los Estados Unidos de América, principal importador del mundo (Cobelo, 2008).

El incremento de la producción durante el año 2007 fue notable respecto al 2006, lo que se explica por la disponibilidad de un mejor paquete tecnológico, del aumento de la demanda y de la posibilidad de llegar a los mercados en contraestación relativamente antes que otros importantes exportadores de la región, tal como Chile.

La atracción de esta producción como fuente alternativa de ingresos, se debe a que ofrece una alta rentabilidad en escasa superficie, sin embargo, como contrapartida requiere una inversión

elevada por hectárea, un manejo exhaustivo y un delicado tratamiento poscosecha (Anahí, 2003; Agrícola Santa Blanca Limitada, 2007).

Aún así, cada año aumenta el volumen de fruta exportada, por lo que se prevé que en 2009 se venderá al exterior más de 9000 toneladas. (Anderson y Vera, 2008). A diferencia de otras alternativas productivas que ya transitaron un largo camino, este cultivo apenas supera en el país los diez años de vida. El cultivo de arándanos se está desplazando desde el norte de Buenos Aires hacia Entre Ríos, el resto del Litoral y hasta en regiones como Tucumán y Salta, donde se utilizan variedades más precoces. Siendo las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos las de mayor producción, aunque Tucumán ha logrado un incremento importante en su producción.

En Entre Ríos, la zona de mayor cultivo y producción es la región del Departamento de Concordia y alrededores, toda la zona ofrece la posibilidad de entrar con producciones más tempranas y llegar luego a los Estados Unidos de América con mejores precios, como para aprovechar el momento de altos valores que se dan en la primavera.

El cultivo de arándanos lo constituyen un grupo de especies nativas principalmente del hemisferio norte, que pertenecen al género *Vaccinium* de la familia de las Ericáceas, representan una de las especies de más reciente domesticación, ya que los programas formales de mejoramiento genético se inician solo a principios del presente siglo. De las 30 especies que constituyen este género, sólo un pequeño grupo de ellas tienen importancia comercial, las cuales se detallan en la tabla 1.

De las especies cultivadas, las de mayor importancia son: *Vaccinium corymbosum* el “Arándano Alto” (highbush), que representa más del 80% del total de las demás especies cultivadas, exceptuando el arándano (cranberry); le sigue, en base al mismo análisis, la especie *Vaccinium ashei* “Ojo de Conejo” (rabbiteye), con una proporción de alrededor del 14%.

Tabla 1. Variedades de Arándanos

| Nombre Científico | Nombre Vulgar | Tipo de Cultivo |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| <i>Vaccinium corymbosum</i> | Arándano alto (“Highbush”) | Cultivado |
| <i>Vaccinium ashei</i> | Arándano ojo de conejo | Cultivado |
| <i>Vaccinium macrocarpon</i> | Arándano (“Cranberry”) | Silvestre y cultivado |
| <i>Vaccinium vitis-idaea</i> | Arándano europeo (“Ligonberry”) | Silvestre |
| <i>Vaccinium myrtillus</i> | Arándano europeo (“Bilberry”) | Silvestre |

El “Arándano Alto” fue la especie que primero se introdujo a cultivo. Es una planta originaria de la costa este de América del Norte, con alrededor de 50 variedades, y que bajo ciertas condiciones de cultivo puede alcanzar alturas de hasta 2,5 metros.

Debido al largo proceso de mejoramiento (iniciado en 1906) al que se somete a esta especie, se considera como el arándano de mejor calidad en cuanto a tamaño y sabor. El período de desarrollo del fruto es corto, comparado al arándano ojo de

conejo.

El “Arándano Ojo de Conejo” es una especie que puede alcanzar hasta 4 metros de alto. Su mejoramiento genético se inicia en 1940 siendo por ello de domesticación más reciente. Es nativo del sur de Norteamérica y ha ganado popularidad como especie cultivada por su tolerabilidad a pH de suelo altos, mayor resistencia a la sequía, mayor producción y fruta de mejor conservación en la post-cosecha (NIDETEC, 2004).

En nuestra región, las principales variedades cultivadas y en producción son, la O`Neal y la Misty como variedad temprana, ambas variedades poseen altas cualidades nutritivas y contenido de antioxidantes. El cultivo del arándano en Argentina es viable con un buen soporte técnico y comercial y puede conseguirse una atractiva rentabilidad

Descripción del producto

El fruto del arándano, también conocido como baya azul o blueberry, conforma el grupo de las frutas denominadas comercialmente en el ámbito internacional como berries, entre las que además se encuentran la frutilla, frambuesa (roja, negra, púrpura y amarilla), grosella, mora, “baby kiwi”, “cranberry”, etc. El fruto del arándano es una baya casi esférica de 7 a 15 mm de color azul claro a oscuro; que contiene pequeñas semillas y presenta un sabor agridulce muy característico.

El valor nutricional del arándano, según la estandarización de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, lo resume como un alimento entre bajo y libre de grasas y sodio,

libre de colesterol y rico en fibras y vitamina C. El consumo de esta fruta en porciones de alrededor de 142 g (5 onzas), aporta a la dieta alimenticia diaria lo que se expone en la tabla 2.

Tabla 2. Factores nutricionales del arándano fresco - *Fuente: Northeast Regional Agriculture Engineering S. y Produce Marketing Association's Labeling Facts, USA.*

| Composición Nutricional del Arándano cada 142 g | | | |
|--|-------------|----------------|-----------|
| Calorías | 100,00 Kcal | Zinc | 0,16 mg |
| Proteínas | 0,97g | Cobre | 0,09 mg |
| Grasas | 1,00 g | Manganeso | 0,41 mg |
| Carbohidratos | 20,50 g | Vitamina C | 18,90 mg |
| Fibra | 3,00 g | Tiamina | 0,07 mg |
| Calcio | 9,00 mg | Riboflamina | 0,07 mg |
| Hierro | 0,24 mg. | Niacina | 0,52 mg |
| Magnesio | 7,00 mg | A. Pantoténico | 0,13 mg |
| Fósforo | 15,00 mg | Vitamina B6 | 0,05 mg |
| Potasio | 129,00 mg | Folacina | 9,30 mg |
| Sodio | 9,00 mg | Vitamnia A | 145,00 IU |

En una dieta basada en 2000 calorías/día esta composición nutricional, en una porción de 142 g, representa entre sus componentes más relevantes, el aporte del 1% de grasas, el 9% de carbohidratos, el 14% de fibra y el 15% de vitamina C. En síntesis, es un excelente alimento, sano, especial para dietas

hiposódicas e hipocalóricas y con un gran contenido de fibra y vitamina C, cuyas virtudes son bien conocidas (Clifford, 2000; Raffer, 2002).

Últimamente desde el ámbito científico se promociona el arándano como un poderoso antioxidante, reductor del colesterol y protector de riesgos cardiovasculares. Las antocianinas son pigmentos que imparten la coloración característica a los arándanos y están asociadas a las propiedades antes mencionadas. En trabajos efectuados en nuestra región, se ha observado que las mayores concentraciones de antocianinas se encuentran en las bayas de las variedades Misty y O`Neal, entre otras (Vuarant et al., 2010).

Fisiología de la maduración y del deterioro de arándanos

Cuando los frutos alcanzan la madurez fisiológica comienzan a sufrir numerosos cambios de color, firmeza y sabor, relacionados con la maduración organoléptica, que los hace finalmente más atractivos para el consumo. Los arándanos son frutos climatéricos, es decir que, cosechados a partir de la madurez fisiológica, son capaces de adquirir características similares a los que maduraron unidos al arbusto (Yommi y Godoy, 2002).

Sin embargo, una vez alcanzado el estado de máxima calidad, sobreviene muy rápidamente el de sobremadurez, asociado a un excesivo ablandamiento, pérdida de sabor y de color, lo cual debe ser evitado. La velocidad con la que ocurre la

pérdida de calidad posterior a la cosecha está relacionada fundamentalmente con la temperatura, y por ello, un adecuado manejo de la misma desde la cosecha en adelante contribuye notablemente con el mantenimiento de la calidad de la fruta.

A 4 y 5°C los arándanos tienen una tasa respiratoria considerada baja a moderada, pero la misma se eleva considerablemente a temperatura ambiente. Cuanto mayor es la tasa respiratoria, más rápido se producen los cambios involucrados en la maduración y en la pérdida de calidad. En comparación con otros "berries", los arándanos presentan menor tasa de deterioro. Son susceptibles a la deshidratación, siendo 3% el valor de pérdida de peso máximo admisible.

Entre los procesos que ocurren durante la maduración, el más evidente es el cambio de color externo, desde el verde al rosa y finalmente al azul. A medida que el color cambia, se produce un aumento en el contenido de sólidos solubles (azúcares), y una disminución de la acidez. También se observa un progresivo ablandamiento de la pulpa, lo cual constituye una de las principales causas de descarte, pero es dependiente de la variedad utilizada.

Los arándanos son altamente susceptibles al desarrollo de enfermedades durante la postcosecha, pudiéndose observar síntomas apenas transcurridas 12 horas de permanencia a temperatura ambiente, principalmente si se encuentran húmedos. Se ha encontrado que las frutas más ácidas, y por lo general menos maduras, son menos susceptibles al desarrollo de las enfermedades causadas por *Alternaria* sp y *Botrytis* sp. Nuevamente en este aspecto se ha determinado diferente

comportamiento según la variedad utilizada.

Cosecha

La cosecha de las bayas puede efectuarse manual o mecánicamente, siendo la más habitual en nuestra región, la cosecha manual. Dado que la maduración de las bayas no es homogénea, tal como se observa en la figura 1 se efectúan aproximadamente ocho ingresos desde el inicio hasta el final de la cosecha. Se efectúa selectivamente en base al índice de madurez de la fruta, siendo los indicadores de éste, el tamaño y color de las bayas, se deben evitar daños y la remoción de la cera propia de los frutos. Como índices de cosecha, por lo general, se debe tener en cuenta, el color de la superficie de la fruta. También pueden tomarse en consideración los sólidos solubles y la acidez titulable. La fruta se debe cosechar casi madura ya que la calidad de consumo no mejora tras la cosecha.



Figura 1. Recolección de arándanos

Como índices de calidad se consideran la apariencia

(color, tamaño, forma, ausencia de defectos), firmeza, sabor (sólidos solubles, acidez titulable y compuestos volátiles aromáticos) y valor nutritivo (Vitaminas A y C), entre otros.

Una vez cosechados, embalados y empacados los arándanos deben ser enfriados lo más rápido posible. En el caso de tener que efectuarse el bromurado (fruta con destino a Estados Unidos de América), las bayas son fumigadas con bromuro de metilo a 21 °C en la pulpa, durante 3,5 horas, seguida de una hora de evacuación y posteriormente se enfría a 0,5 a 1°C.

Tratamiento postcosecha de arándanos

Los tratamientos postcosecha implican la aplicación de un conjunto de técnicas tendientes al mantenimiento de la calidad obtenida en el campo, para posibilitar que los productos perecederos se encuentren disponibles al consumidor con su máximo grado de frescura, sabor y valor nutritivo.

Luego de ser cosechada la fruta es trasladada al empaque. El proceso comienza en el túnel de frío, que es donde se le da una temperatura adecuada para que la fruta no se degrade; pasa a la sala de empaque, donde la fruta transita por una máquina tamañadora que va descartando el arándano menor a 8 mm.

Luego es transportado por cintas, donde manualmente se saca la fruta que aún está verde, picada o en mal estado y las que pasan ese proceso son envasadas en cubetas plásticas de 125 g que conforman una caja de un kilo y medio con 12 cubetas. A esta altura la fruta estará lista para ser exportada por vía aérea a Estados Unidos y Europa.

En la planta de empaque la fruta es clasificada, pesada automáticamente y empacada para su despacho en un ambiente refrigerado a 14°C. En el túnel de enfriamiento rápido con ventilación forzada, se enfría la fruta empacada a la temperatura de despacho, ya sea a 10 ó 0°C y los “pallets” o cajas se almacenan en cámaras hasta su despacho.

Los principales tratamientos postcosecha aplicados a arándanos son la refrigeración y la aplicación de atmósferas modificadas o controladas.

Refrigeración

El frío es una de las técnicas más ampliamente utilizada en el mundo para reducir el deterioro postcosecha de frutas y hortalizas frescas. Como ya se ha mencionado, el aumento de la temperatura tiene un efecto más que proporcional sobre el aumento de la respiración y con ello, sobre el deterioro. Adicionalmente, el uso del frío permite reducir la deshidratación, deprime el metabolismo de los frutos e inhibe el crecimiento de hongos y bacterias.

El preenfriado es una práctica cuyo objetivo es reducir la temperatura de la pulpa de la fruta lo más rápidamente posible hasta alcanzar valores cercanos al aconsejado para la conservación. Debe efectuarse dentro de las 4 horas desde la cosecha, ya que cuanto mayor sea la demora, mayor será la pérdida de la calidad. No es aconsejable utilizar agua como refrigerante ('hidrocooling') debido a que la fruta húmeda es altamente susceptible a podredumbres. El enfriamiento en cámara

frigorífica tampoco es útil debido a la ineficiencia del sistema para reducir la temperatura de la pulpa de la fruta en poco tiempo.

El método recomendado para preenfriar arándanos rápidamente es el que utiliza aire forzado. En este sistema de preenfriado se obliga a pasar el aire frío dentro de los envases por acción de un ventilador o forzador de aire ubicado en uno de los extremos de la carga. Mientras que por aire forzado se logra bajar la temperatura de la pulpa desde 20 y 25°C hasta 1,5°C en 2 horas, se requieren 48 horas utilizando una cámara fría. La fruta preenfriada debe permanecer a baja temperatura, para lo cual puede disponerse en el interior de una cámara frigorífica durante un corto almacenamiento o bien, puede ser enviada a destino en transportes refrigerados. La temperatura óptima para conservar la fruta es cercana a 0°C, con una humedad relativa entre 90 y 95%. Estas condiciones permiten mantener la calidad durante alrededor de 14 días.

Aplicación de atmósferas modificadas o controladas

En el almacenamiento en atmósfera controlada las cámaras cuentan con sensores que informan de la concentración de los distintos gases en su interior. Además, los sistemas de control de las mismas permiten modificar éstas.

En el envasado en atmósfera modificada de vegetales frescos y mínimamente procesados también se combinan un volumen de O₂ y una proporción de CO₂ además de N₂. La concentración de estos gases en el espacio de cabeza del paquete varía debido al metabolismo respiratorio de estos

productos. En este caso, los cambios se compensan con la difusión de gases a través del material de envasado hasta establecer una atmósfera en equilibrio.

Se usan las coberturas enteras de las cajas o pallets y envases para el consumidor con una película plástica, resistente a las bajas temperaturas y a las agresiones mecánicas, a fin de contener la AM. Los productos así envasados deben ser enfriados inmediatamente antes de modificar la atmósfera.

Se debe tener en cuenta la relación entre el volumen libre y el volumen ocupado, ya que el tiempo de conservación está relacionado con la cantidad de gas en el envase; la relación gas/producto nunca debe ser inferior a 1:1.

La mezcla de gases y la refrigeración tienen como objetivo disminuir la tasa de respiración y retrasar la velocidad de las reacciones responsables de la maduración y la senescencia. Cada especie vegetal presenta una tolerancia diferente a los gases.

En comparación a la composición del aire, la cual consiste en una proporción de $O_2 \cong 21\%$; $CO_2 \cong 0.03\%$; $N_2 \cong 78\%$ y otros gases hasta completar 100%; las atmósferas modificadas o controladas contienen en general niveles más bajos de O_2 y mayores de CO_2 que el aire.

Mediante el uso de estas tecnologías se consigue reducir la respiración de la fruta y por lo tanto, retrasar la maduración y deprimir el metabolismo en general, inclusive el de los microorganismos (Ceponis y Cappellini, 1983; Ceponis y Cappellini 1985).

La disminución de la tasa respiratoria (deterioro) de algunas frutas se logra con niveles de CO_2 de alrededor de 10% a

20%. Algunos resultados señalan que concentraciones de O₂ entre 8% y 10% y de CO₂ entre 10% y 13% han logrado mantener la calidad de los arándanos entre 5 y 8 semanas a 0-1°C, considerando un período adicional de 3 días a 18-20°C. A su vez, concentraciones de CO₂ de 15% reducirían la incidencia de podredumbres (Spotts et al., 2002; Yommi y Godoy, 2002).

Cuando la modificación de las atmósferas se realiza manteniendo un control más o menos exacto de la concentración gaseosa dentro de cierto rango, recibe el nombre de *atmósfera controlada* (AC); si la modificación de la atmósfera no es controlada activamente, sino que utiliza una mezcla de gases resultante del intercambio gaseoso del envase en equilibrio con la respiración del producto, la técnica se denomina *atmósfera modificada* (AM) (Zheng et al.2008)

Se ha demostrado que los arándanos responden positivamente al uso de AC, uno de los inconvenientes que presenta el uso de esta tecnología es su alto costo, además, para cargar un contenedor equipado con generador de atmósferas para la exportación por vía marítima se requieren alrededor de 3 a 4 toneladas de arándanos, volumen que debe reunirse en un máximo de 2 días y representa un problema operativo real. No obstante, la aplicación de AC se hace indispensable cuando se requiere almacenar la fruta por largos períodos, mayores a las 3 semanas.

El uso de AM se ha incrementado en los últimos años en los países desarrollados, una de las razones es que esta tecnología puede ser aplicada a diversos tamaños de envase. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los niveles de O₂ y CO₂

alcanzados en el interior del paquete deben encontrarse dentro del intervalo recomendado para esta fruta, ya que puede haber producción de aromas extraños y diferentes manifestaciones de daño fisiológico en la misma.

Otra de las ventajas de esta tecnología es que permite reducir o prescindir de otros tratamientos complementarios, inclusive puede aumentarse la temperatura de refrigeración para evitar los daños por frío. Además pueden utilizarse determinados gases protectores como alternativa a los tratamientos con fungicidas y/o insecticidas.

El envasado en AM mejora la presentación del producto, los envases herméticos evitan el riesgo de goteos, transmisión de olores, puede reducirse la frecuencia de distribución, disminuir la reposición en los puntos de venta y las devoluciones del producto, etc.

Efectos de la aplicación de Atmósferas Controladas

El uso de la AC en el empaque y durante el transporte, con un 15 a 20% de dióxido de carbono, y un 5 a 10% de oxígeno, reduce el crecimiento de *Botrytis cinerea* (pudrición gris) y otros organismos degenerativos, y reduce la tasa de respiración y el ablandamiento de arándanos azules, frambuesas y zarzamoras, extendiendo así su vida postcosecha.

Fisiopatías

Arrugamiento/pérdida de agua: las bayas son muy susceptibles a la pérdida de agua, lo que lleva al arrugamiento de la fruta y a su pérdida de brillo. Para minimizar la pérdida de agua,

la humedad relativa se debe mantener a 90-95% en el almacenamiento y en el entorno de la fruta, siempre bajo temperaturas óptimas (Li y Kader, 1989).

Se denomina “leakers” a la pérdida de jugo que presentan las bayas, posiblemente causada por una degradación fisiológica.

Desórdenes relacionados con atmósferas controladas: la exposición de las bayas a una concentración <2% oxígeno y/o >25% dióxido de carbono puede causar el desarrollo de sabores desagradables y una decoloración parda, dependiendo del cultivar, de la duración de la exposición y de la temperatura.

El daño por frío, son de los síntomas que se desarrollan en arándanos rojos, los que adquieren una apariencia deslustrada, textura gomosa y una mayor susceptibilidad a la pudrición.

Calidad del arándano fresco para su exportación

Los estándares de calidad del arándano fresco fueron revisados el 1° de enero de 1995 por el Código Federal de Regulaciones de los Estados Unidos de América y los nuevos procedimientos de inspección de calidad, empaque, rotulado, temperatura, tamaños y defectos fueron renormalizados por la Fresh Products Branch dependiente del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América en junio de 1996.

En general, estas normas reglamentan la categoría de calidad según una serie de condiciones preestablecidas para alcanzar las tipificaciones de “U.S. N°1”, “U.S. N° 2”, “U.S. N°3” y “Unclassified”.

La tipificación más alta de calidad es la “U.S. N°1”, que

estará dada por la uniformidad de tamaño, color y madurez y la ausencia de daños producidos en la fruta por diferentes causas, con ciertos porcentajes de tolerancia. Cuanto mayor sea el tamaño del fruto mayor puede ser el precio. Generalmente los calibres se definen por pequeño, mediano, grande, o muy grande.

Enfermedades de los cultivos de arándanos

Las enfermedades son la causa principal de pérdidas de postcosecha en las bayas (Wright y Rivera, 2003; APROA, 2008).

Diversas son las enfermedades que atacan estos cultivos (Caruso y Ramsdell, 1995). Las pérdidas por podredumbre son debidas fundamentalmente a:

- *Pudrición por Botrytis (pudrición gris)*: causada por *Botrytis cinerea*, es un patógeno común en la fruta. Este hongo aún sigue creciendo a 0°C, sin embargo el crecimiento a esta temperatura es muy lento.
- *Pudrición por Rhizopus*: causada por el hongo *Rhizopus stolonifer*. Las esporas de este hongo generalmente se encuentran presentes en el aire y se propagan fácilmente. El hongo no crecerá a temperaturas inferiores a 5°C, por lo que el método más simple de control es el manejo de la temperatura.

Según los informes de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires - Producción de arándanos en Argentina (Wright y Rivera, 1997; Wright y Rivera, 2003), las enfermedades detectadas, en cultivos de arándano en la

República Argentina, según los informes obtenidos a partir de recorridas a cultivos y consultas recibidas en el LASAVE (Laboratorio de Sanidad Vegetal), desde 1995 hasta la fecha son:

- 1)- Atizonamiento de tallos y manchas foliares (*Pestalotiopsis sp.*; *Colletotrichum gloeosporioides*).
- 2)- Atizonamiento de tallos (*Fusarium sp.*) (Wright et al., 1996).
- 3)- Muerte de esquejes (*Fusarium sp.*) (Rodríguez Codazzi et al., 1997)
- 4)- Marchitamiento (*Phytophthora sp.*).
- 5)- Manchas foliares y de tallos. Manchas y pudrición de frutos (*Alternaria tenuissima*) (Cheheid et al., 1997).
- 6)- Ablandamiento de frutos poscosecha (*Alternaria tenuissima*; *Colletotrichum gloeosporioides*).
- 7)- Atizonamiento de tallos (*Phomopsis sp.*).
- 8)- Roya de la hoja (*Pucciniastrum vaccinii*). (Dal Bello y Perelló, 1998; Wright et al. 1998a).
- 9)- Tumores en raíces y base del tallo.
- 10)- Atizonamiento de tallos (*Phomopsis sp.*).
- 11)- Atizonamiento de tallos y pudrición de frutos (*Botrytis cinerea*).

Manchas foliares y de tallos. Manchas y pudrición de frutos (*Alternaria tenuissima*)

Cheheid et al. (1997) determinan su presencia en la provincia de Buenos Aires. Sobre las hojas se observan manchas circulares grises a marrón claro con bordes rojos más oscuro, que pueden necrosar parte de los tejidos. Sobre los tallos se observan manchas rojizas alargadas, que pueden terminar atizonándolo. Sobre los frutos se observan manchas oscuras y

reblandecimiento. En los últimos años la importancia de esta enfermedad ha ido en aumento.

Atizonamiento de tallos y manchas foliares (Pestalotiopsis sp. y Colletotrichum gloeosporioides)

Se observó un atizonamiento en forma de “die-back” (a partir del extremo de los tallos hacia abajo) y manchas foliares necróticas producidos por *Pestalotiopsis sp.* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Wright et al., 1998b).

Para su penetración ambos hongos requieren de heridas o de condiciones de stress, ya que no se reprodujeron los síntomas sobre plantas inoculadas sin heridas.

Atizonamiento de tallos (Fusarium sp.)

Se observaron síntomas de atizonamiento de tallos que avanzaban desde el extremo de los mismos hacia la base de las plantas, determinándose como agente causal a un hongo del género *Fusarium* (Wright y Cotta, 1996).

Muerte de esquejes (Fusarium sp.)

Se observaron síntomas de marchites en las plantas, las que al descalzarlas evidenciaban pudrición de raíces.

Marchitamiento (Phytophthora sp.)

Se observa un oscurecimiento de los tejidos en la base del tallo, debilitamiento general de la planta, hojas más pequeñas que se vuelven rojizas prematuramente, la planta se marchita y muere

Ablandamiento de frutos poscosecha (Alternaria tenuissima; Colletotrichum gloeosporioides)

En 2002 se produjo un importante descarte de frutos entre la cosecha y el envasado. Los frutos presentaban síntomas de reblandecimiento, sin ningún signo aparente. A partir de los mismos se realizaron cámaras húmedas y se detectó la presencia de *Alternaria tenuissima* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Roya de la hoja (Pucciniastrum vaccinii)

En nuestro país fue estudiada por Dal Bello y Perelló (1998). Las lesiones en las hojas comienzan como manchas cloróticas que se extienden y se vuelven necróticas con aparición de pústulas uredosóricas de color amarillo anaranjado en la cara inferior de las hojas. En nuestro país no se lo observó sobre Ericaceae ornamentales y el hospedante alternativo (hemlock) no está presente.

Tumores en raíces y base del tallo

Se han observado tumores en la base de los tallos y en las raíces principales, al principio de color marrón claro y luego, al volverse leñosos, de color marrón oscuro. Si bien, no se han realizado aún los estudios correspondientes, los síntomas observados corresponderían a la enfermedad conocida como agalla de corona, producida por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Es una bacteria que penetra por heridas.

Atizonamiento de tallos (Phomopsis sp.)

Afecta los tallos de año, observándose al principio una

coloración marrón en la base del mismo. En poco tiempo ese tallo se marchita y muere.

Atizonamiento de tallos, necrosis de hojas y pudrición de frutos (Botrytis cinerea)

El hongo ataca preferentemente órganos en desarrollo y bajo condiciones de alta humedad relativa y fresco puede causar severos daños en varias variedades de frutas (Navarro, 2000; Navarro, 2002; Millán et al., 2003; Walter et al., 2005). Las ramitas se amarronan y se cubren rápidamente de un moho gris, que constituye el signo de la enfermedad. Las hojas presentan manchas al principio cloróticas y luego necróticas. Los frutos pueden presentar podredumbres a campo y en poscosecha.

Las enfermedades causadas por hongos, atacan a numerosos cultivos, de diferentes países (Caruso y Ramsdell 1995; Larraín et al., 2007) y su control es muy importante.

Los cultivos de vid (Soleas et al., 2000; Athanasopoulos et al., 2003; Trösken et al. 2005), cebada (Jayasena et al., 2002), trigo (Ramirez et al., 2004), "sweet cherry" (Spotts et al. 2002), aromáticas (Groenewoud et al., 1995) entre otros, son propensos a estas enfermedades, siendo los triazoles los fungicidas de aplicación más reciente, tal como se observa en la bibliografía consultada respecto a la aplicación de estos plaguicidas. En Chile las plagas del arándano, varía según las regiones y son similares a las que atacan nuestros cultivos (Larraín et al., 2007)

En la siguiente figura se presentan los diferentes efectos de los frutos causados por diversas enfermedades

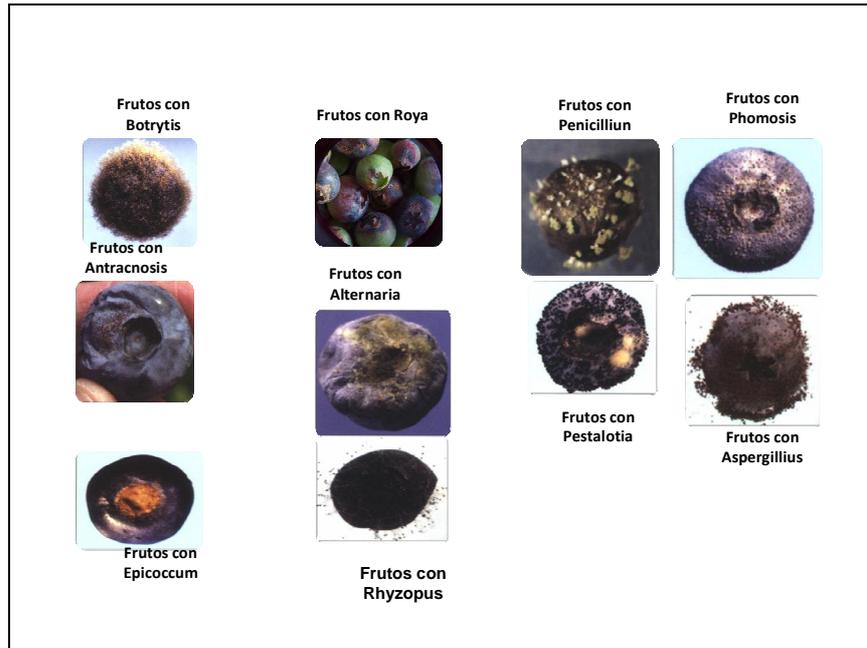


Figura 2. Efectos en los frutos causados por hongos

Manejo integrado de enfermedades

El manejo integrado de enfermedades involucra, en primera instancia, identificar las principales enfermedades que se desarrollan en la región y conocer su ciclo biológico. Hacer uso de cultivares resistentes y de prácticas culturales. Como así también las siguientes recomendaciones:

- Uso de material libre de enfermedades.
- Selección del lugar de cultivo (características de clima y suelo, historia previa del lugar o potrero y proximidad de otros cultivos)
- Fertilización adecuada.
- Control de malezas dentro y alrededor del cultivo.

- Eliminación de fuentes de inóculo.
- Densidad de plantación.
- Inspección del cultivo y eliminación de plantas virósicas.
- Ajustar las técnicas de manejo para prevenir heridas.
- Cosecha, manipulación y almacenamiento adecuados.
- Control biológico.
- Aplicación de fungicidas.

Ya que los productos autorizados para su uso en distintos cultivos pueden variar con el tiempo, en todos los casos se deberá verificar que el mismo esté autorizado en el país de destino. Verificar siempre que el momento y la dosis de aplicación y el modo de acción del producto sean los adecuados.

Las enfermedades fúngicas causadas por los principales patógenos, pueden producir pérdidas de hasta un 30 ó 40% de la producción, cuando no se controlan a tiempo. Tal es el caso de la moniliasis o mummyberry, que ataca los frutos, momificándolos. La infección aparece con brotes atizonados, sin embargo en las flores no se manifiesta sino hasta el momento en que el fruto comienza a madurar, en esta etapa éstos se van arrugando tomando color rosado y por último caen al suelo, iniciándose el ciclo en primavera apareciendo los apotecios del hongo. El control consiste en la aplicación de fungicidas antes y durante la floración (Walter et al., 2005).

La botrytis es una enfermedad que puede causar daños considerables, afecta flores y racimos en primavera. Provoca antracnosis y se presenta principalmente como una enfermedad de post-cosecha, pero la infección ocurre antes. Cuando los frutos

están madurando y tomando coloración azul, el extremo del mismo se hunde y arruga, apareciendo una esporulación color salmón. Para su control se deben aplicar fungicidas a los cultivos en época de floración y cosecha (Zambonin et al, 2002).

El hongo *Collecotrichum gloesporioides* produce en los arándanos una enfermedad sistémica muy grave y el control sólo es hasta el momento, la erradicación de las plantas, las cuales deben quemarse a los fines de evitar la propagación del hongo.

En nuestra región y sobre la variedad O`Neal, se han efectuado estudios epidemiológicos de roya del arándano (*Pucciniastrum vaccinii*) evaluando la incidencia y severidad del hongo como parámetro de la enfermedad y el hospedante a través del crecimiento de las plantas, renuevos y fenología de estados vegetativo y reproductivo. El monitoreo fitosanitario de los lotes, permitió obtener resultados ó datos fenológicos a lo largo del ciclo completo de la planta, la identificación de plagas y hongos patógenos que afectan al cultivos en la zona del Río Uruguay, siendo la roya del arándano el principal agente causante de pérdida económica de la cosecha. Para el control de roya se aplicaron fungicidas protectores, tales como, estrobilurinas y triazoles.

Las enfermedades causadas por bacterias, virus e insectos son también de importancia y su control en los cultivos debe efectuarse con tratamientos adecuados.

La producción comercial de fruta de alta calidad, libre de plagas y enfermedades, requiere del uso racional de plaguicidas como parte de las Buenas Prácticas Agrícolas, es decir todas las acciones involucradas en la producción, procesamiento y

transporte de los productos (Anahí, 2003).

Las políticas agroalimentarias deben estar orientadas a ofrecer al mercado productos de alta calidad, logrados con el mínimo impacto ambiental y previniendo contaminaciones físicas, químicas y biológicas, tanto a los trabajadores como a los consumidores. Por otro lado, las aplicaciones de plaguicidas para el control de las plagas, deben efectuarse de acuerdo a las normas ambientales establecidas. Inclusive existen estudios de las condiciones climáticas, en las que se optimiza la eficacia de la aplicación, llamadas “ventanas de aplicación”, es decir la existencia y magnitud de los periodos de días apropiados para la aplicación eficaz y no contaminante en los cultivos de arándanos (Hetz et al., 2004).

Aún, con adecuadas y cuidadosas aplicaciones, es relevante destacar que, los residuos de plaguicidas en los cultivos y/o sus productos, son en si mismo, un tema polifacético que debe considerarse exhaustivamente, teniendo en cuenta diversos factores tales como, propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas, naturaleza del sustrato vegetal, dosis y aplicaciones, etc. (Barberá, 1989; Coscolla, 1993; Garland et al. 1999; Jayasena et al., 2002; Palanti y Susco, 2004; Spotts et al., 2002; Zambonin et al. 2002; Sanagui et al., 2004; Kyriakidis et al., 2005; Lhomme et al., 2007 ; Footprint, 2009).

Fungicidas Triazólicos

Según información de la Community Reference Laboratories for Residues of Pesticide (2009), Footprint (2009) y el

Instituto Nacional de Ecología (2009), las características y propiedades fisicoquímicas de los pesticidas en estudio son las que se detallan a continuación.

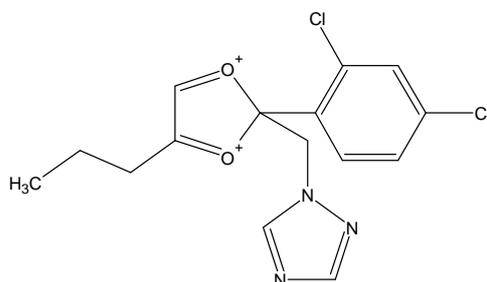
En nuestro país los Límites Máximos de Residuos permitidos para estos fungicidas están establecidos por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) según Resolución 619/2006 y 803/2006, siendo de 50 µg/kg para frutos frescos. Igual valor establece la Legislación española para Propiconazole en bayas

Propiconazole

Nomenclatura química (IUPAC):

1[2(2,4,diclorofenil)-4-propil-1,3,dioxolan-2-ilmetil]-1H-
1,2,4, triazole

CAS N° 60207-90-1. Clasificación química: Triazol. Fórmula
Química: C₁₅H₁₇Cl₂N₃O₂



Propiedades fisicoquímicas: Líquido viscoso amarillento, de peso Molecular: 328.20 g, densidad: 1,27/20 °C, punto de ebullición de 180 °C a 0,1mmHg. Solubilidad en agua:110 mg/l y

es miscible en acetona, metanol, isopropanol, alcoholes, etc. Algo soluble en hexano (6%). Escasamente hidrolizable. Presenta enantiómeros (Wu et al., 2001; Hutta et al., 2002; Toribio et al. 2004).

Acción: sistémica, preventiva y curativa. Uso: fungicida

Información general: Este fungicida, tiene propiedades sistémicas, actúa preventiva y curativamente sobre un gran número de hongos, en especial aquellos que atacan a los cereales, vid, miel, madera, etc. (Oidium, Septoria, Royas, Helminthosporium, Pietín). La persistencia de su acción es del orden de las 4-6 semanas (Garland et al., 1999; Nozal et al., 2005; Trösken et al., 2005). El producto es absorbido por las hojas y tallos verdes, dependiendo de las condiciones climáticas y del desarrollo del cultivo. Es trasladado en forma ascendente. El movimiento sistémico asegura la distribución dentro de la planta

Información toxicológica: Categoría II (moderadamente tóxico). DL₅₀ oral aguda: 1,517mg/kg (rata). DL₅₀ dermal aguda: < 4mg/kg (rata)

Riesgos ambientales: Virtualmente no tóxico para abejas. Moderadamente tóxico para peces. Prácticamente no tóxico para aves.

El producto técnico tiene una concentración del principio activo del 25 %. La concentración y dosis de las aplicaciones en los cultivos de arándanos es de aproximadamente 70 a 100 ml/100 l de agua y 500 ml/ha. Pudiéndose aplicar tres veces como máximo.

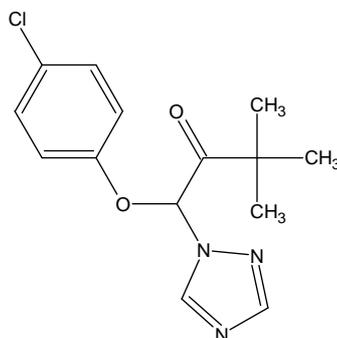
Triadimefon

Nomenclatura química (IUPAC):

1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1(1H-1,2,4-triazol-1il)butan-2-ona

CAS N°: 43121-43-3. Clasificación química: Triazol. Fórmula

Química: $C_{14}H_{16}ClN_3O_2$



Propiedades fisicoquímicas: Sólido cristalino incoloro, de peso Molecular: 293.76 g, punto de ebullición 82.3 °C. Solubilidad en agua: 260 mg/l y soluble en la mayor parte de los solventes orgánicos. Muy estable en agua sin experimentar hidrólisis. Algunos autores han identificado enantiómeros (Wu et al., 2001; Athanasopoulos et al., 2003; Toribio et al., 2004).

Acción: sistémica, preventiva y curativa. Uso: fungicida.

Información general: Fungicida de acción preventiva, pero igualmente curativa, sobre un gran número de hongos (oídios y royas) (Soleas et al., 2000; Athasopoulos et al., 2003; Da Silva et al., 2003; Trösken et al., 2005; Walter et al., 2005).

Su persistencia de acción es del orden de las cuatro semanas. Su persistencia en agua fue investigada por (Da Silva et al., 2004). Mecanismo de acción: inhibe la biosíntesis de la

ergosterina que realiza el hongo.

Información toxicológica: probablemente sin riesgo toxicológico (Categoría IV). DL50 oral aguda: 300 a 600 mg/kg (rata). DL50 dermal aguda: 1000 mg/kg (rata).

Riesgos ambientales: ligeramente tóxico para peces, y prácticamente no tóxico para abejas y aves.

El producto técnico tiene una concentración del principio activo del 25 %. La concentración y dosis de las aplicaciones en los cultivos es de aproximadamente 20g/100 l de agua y 100 ml/ha.

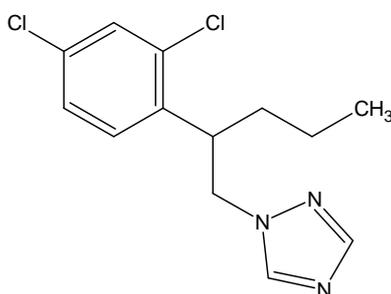
Penconazole

Nomenclatura química (IUPAC):

1-(2-(2,4-diclorofenil) pentil)-1H-1,2,4-triazole.

CAS N° 66246-88-6. Clasificación química: Triazol. Fórmula

Química: $C_{13}H_{15}Cl_2N_3$



Propiedades fisicoquímicas: Peso Molecular: 284.2g, solubilidad en agua: 260 mg/l, insoluble en acetona (< 0.5 %).

Acción: sistémica. Uso: fungicida

Información general: Este fungicida es absorbido por las hojas y órganos herbáceos de los vegetales. Está indicado para numerosos hongos y particularmente es eficaz sobre oídios de numerosas plantas cultivadas (Oliva et al., 1999; Navarro et al., 2002; Millán et al., 2003; Otero et al., 2003) Es interesante su uso preventivo, muestra también ciertas propiedades curativas y un efecto erradicante de ciertos hongos como *Venturia inaequalis*. No tiene acción sobre los insectos benéficos, por lo que puede ser utilizado en programas de control integrado. Es compatible con la mayoría de los productos agroquímicos de reacción neutra.

Información toxicológica: ligeramente tóxico (Categoría III). DL₅₀ oral aguda: 2000 mg/kg (rata). DL₅₀ dermal aguda: > 3000 mg/kg (rata).

Riesgos ambientales: ligeramente tóxico para aves, moderadamente tóxico para peces y virtualmente no tóxico para abejas.

El producto técnico tiene una concentración del principio activo del 10 %. La concentración y dosis de las aplicaciones en los cultivos es de aproximadamente 50 ml/100 l de agua y 25 ml/ha.

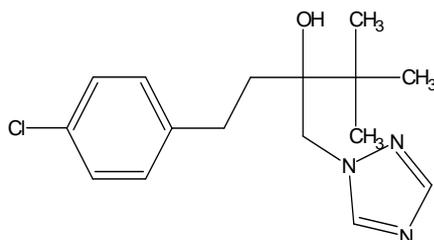
Tebuconazole

Nomenclatura química (IUPAC):

1-p-clorofenil-4, 4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-ol

CAS N°: 107534-96-3. Clasificación química: Triazol. Fórmula

Química: C₁₆H₂₂ClN₃O.



Propiedades fisicoquímicas:

Peso Molecular: 307.81 g. Es insoluble en acetona (<0.3 %). Según algunos autores, se ha comprobado la existencia de enantiómeros de este fungicida (Wu et al., 2001; Wang et al., 2005a).

Acción: sistémica. Uso: fungicida

Información general: Fungicida con propiedades preventivas, curativas y erradicantes (Juan- García et al., 2004).

Mecanismo de acción: inhibe la biosíntesis del ergosterol del hongo parásito de la planta huésped, impidiendo la multiplicación del hongo.

Información toxicológica: probablemente sin riesgo toxicológico (Categoría IV). DL₅₀ oral aguda: 4000 mg/kg (rata). DL₅₀ dermal aguda: > 5000 mg/kg (rata).

Riesgos ambientales: virtualmente no tóxico para abejas y prácticamente no tóxico para aves. Moderadamente tóxico para peces.

La concentración y dosis de las aplicaciones en los cultivos de arándanos es de aproximadamente 70 a 100 ml/100 l de agua y 500 ml/ha. Pudiéndose aplicar tres veces como máximo.

Formación y evolución de los residuos de plaguicidas en el tejido vegetal

Se considera necesario definir algunos términos y/o factores que inciden en la formación y evolución de los residuos, tales como:

Depósito de plaguicida

Se refiere a la cantidad de plaguicida que queda sobre el vegetal inmediatamente después de un tratamiento o aplicación. Se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo del vegetal en base húmeda (mg/kg) ó partes por millón (ppm). (Coscolla, 1993; FAO/OMS, 2007)

Algunos trabajos lo expresan también como la cantidad en peso de plaguicida por unidad de superficie vegetal, concretamente en microgramos de plaguicida por centímetro cuadrado de superficie vegetal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Siendo esta cifra menos variable que la anterior, pero con menos valor práctico.

La variabilidad de los depósitos es muy importante y es debida a diversos factores. Al efectuar una aplicación en un cultivo, hay que tener en cuenta que no todo lo aplicado queda sobre la superficie del vegetal, por los motivos clásicos de pérdidas en suelo, evaporación, efectos de deriva, etc.

El porcentaje o parte que ha sido interceptada por la planta, depende de muchos factores y los coeficientes de variación son altos (RSD mayores a 35%).

La configuración física de la superficie del vegetal, como la composición química y cantidad de ceras que recubren

principalmente a los frutos, etc., inciden en el modo o ángulo de contacto y en la retención de las gotas o partículas de plaguicida. La morfología de la planta y/o frutos es de importancia sobre la cantidad de plaguicida depositado.

Diversos ensayos han demostrado que la cantidad de plaguicida interceptado por la planta, cuando la aplicación es terrestre es del orden de $62 \pm 27\%$ y del $45 \pm 20\%$. (Coscolla, 1993). Los factores que determinan el depósito, entre otros, son: dosis, naturaleza química, formulación y características de aplicación del plaguicida, morfología y naturaleza de la superficie vegetal, en especial la relación superficie/peso, condiciones climáticas, etc.

Para el caso que nos compete, frutos o bayas de arándanos, el tamaño pequeño de los mismos y por lo tanto una importante relación superficie/peso, hace que los depósitos sean mayores, si son comparados con otros frutos de mayor tamaño para una misma aplicación. Variabilidades importantes son observadas entre frutos de la misma forma y mayores aún cuando son diferentes.

Numerosas investigaciones se han efectuado respecto a la metodología de aplicación de los diferentes plaguicidas en estos cultivos, que arriban a diversas conclusiones, según los aspectos que aborden. Las recomendaciones más relevantes, además de las de buenas práctica, es que con termonebulizadores a bajo volumen se reduce la cantidad de depósito, con dosis biológicamente posibles para el control adecuado de las enfermedades (dosis mínima de control). En general, se tiende a mejorar las técnicas de aplicación, tratando de lograr una mejor

distribución del producto, consumiendo menor cantidad, mayor eficacia y menor contaminación.

Crecimiento del sustrato vegetal- Eliminación progresiva de los residuos

Efectuado el depósito del plaguicida sobre el vegetal, éste va disminuyendo progresivamente en el tiempo por la acción de numerosos factores. Siendo los más importantes: el crecimiento natural del vegetal, agentes mecánicos como lluvia y viento, físicos tales como la volatilización y solubilización del plaguicida y fundamentalmente por la degradación química del mismo (Pei et al., 2004; Yi y Lu, 2006; Lhomme et al., 2007). Estos factores a su vez están influenciados por otros, ya mencionados, tales como característica de la molécula y coadyuvantes, formulación, temperatura, humedad relativa, insolación etc. La naturaleza del órgano vegetal, forma, tamaño y estructura física de su epidermis (rugosidad, pilosidad, recubrimiento céreo), no sólo influye en la formación del depósito, sino también en la eliminación de los residuos. La persistencia presenta variabilidad, incluso entre los diferentes órganos de la planta.

La *eliminación aparente* de los residuos se da por el crecimiento del vegetal, en este caso en especial, de los frutos, siendo *aparentemente* alta para un crecimiento rápido de los mismos. Esta eliminación aparente es simplemente explicada por la variación en la relación superficie/peso. En los casos de crecimiento lento de los frutos esta causa es menos notable, aunque no despreciable.

La eliminación real, sin embargo es más compleja y deben

analizarse otras causas que interaccionan, tal como el tiempo que quedan los frutos expuestos a los factores climáticos, que aceleran la eliminación.

Los frutos o bayas de arándanos tienen al momento de cuaje un tamaño muy pequeño, de 1 a 1,5 mm de diámetro, alcanzando para la variedad O`Neal, un valor de 14 a 15 mm al momento de maduración completa. Su velocidad de crecimiento hasta la madurez es relativamente alta, aproximadamente de 18 a 20 días, según las condiciones climáticas; además la maduración en la planta no es homogénea, requiriéndose recolectar los frutos, 8 veces por planta en cada temporada de cosecha. Esto necesariamente hace prever que existirá una gran variabilidad en los residuos.

La persistencia de los residuos también depende de la presencia de ceras en la superficie de los frutos (*pruina*), que favorece la estabilidad de los residuos con propiedades liposoluble. La penetración en el tejido vegetal y su persistencia dependen de la estructura molecular del plaguicida y la naturaleza o composición del tejido o sustrato vegetal.

Cuando la formulación contiene tensoactivos y el grado de esparcimiento es elevado, se favorece la penetración, ya que cuanto más extendido esté, mayor superficie de penetración tiene. La influencia del tipo de aplicación y formulación inciden no sólo en la determinación del depósito, sino de la evolución de los residuos. Los mismos persisten más cuando proceden de pulverizaciones líquidas, y de ellas, las formuladas como emulsiones y que contienen tensoactivos espesantes y estabilizantes.

Las causas mecánicas como la lluvia y el viento, favorecen la eliminación de los residuos por arrastre. La intensidad de las precipitaciones y el tiempo que transcurre entre la aplicación y éstas, es muy importante, ya que a mayor intensidad y menor tiempo, la eliminación es mayor. Inherente a estos factores, es la mayor o menor solubilidad que tenga el plaguicida en agua. Cuanto más soluble en agua sea mayor será su eliminación por la acción de la lluvia.

La eliminación por volatilización del plaguicida es función de la presión de vapor, del viento y de la temperatura, etc. Aunque, es de recordar, que no todo el plaguicida está expuesto a la volatilización de igual manera ni es absorbido uniformemente en el tejido vegetal.

La **degradación química** es la vía esencial de la eliminación y depende fundamentalmente de la estructura química del principio activo, del sustrato vegetal y de la temperatura. La estructura molecular es la que determina su estabilidad química y por lo tanto, cuanto mayor sea ésta, mayor su persistencia. La degradación química puede producirse por reacciones químicas simples, tales como, procesos de fotólisis, hidrólisis, oxidorreducción, isomerización, etc. y/o por reacciones bioquímicas más o menos complejas, donde intervienen procesos enzimáticos (Thom et al., 1997; Guillard et al., 2002; Da Silva et al., 2004).

Los procesos degradativos pueden ocurrir tanto en la superficie como en el interior del tejido vegetal. Los metabolitos producidos pueden llegar a ser más tóxicos que el principio activo del plaguicida, tal como el caso de los tiofosforados. La

desaparición de la molécula original no supone disipación del residuo, ya que estos metabolitos forman parte del mismo aunque son de corta vida.

En general, los procesos degradativos son considerados en conjunto y con el tiempo, como mecanismos detoxificadores. La velocidad de degradación no sólo está determinada por la estabilidad química del plaguicida, sino que es función de la temperatura y ésta es uno de los factores más decisivos en la disipación (Athanasopoulos et al.2000; Kyriakidis et al., 2005; Fenoll et al., 2008; Stenrod et al., 2008).

La degradación de los plaguicidas que puedan quedar en la superficie está notablemente vinculada con la fotodescomposición, acelerada en presencia de agua, siendo la luz solar, en el ultravioleta entre 300-400 nm de longitud de onda, la causa de la alteración fotoquímica (Sakkas et al. 2002).

Dentro del tejido vegetal, la degradación es menos afectada por los factores climáticos, aunque si por la temperatura. Esta degradación es más compleja y la velocidad de metabolización interna es muy variable y está determinada por acciones enzimáticas, propias del tejido vegetal (Montti et al. 1998; Gerard et al., 2000). La disipación de los plaguicidas, sobre o en el interior de los vegetales, se debe a diversas causas, cada una de ellas a su vez influenciada por distintos factores que pueden tener influencias múltiples y además interaccionan entre sí, por lo que el proceso es en realidad muy complejo y variable.

Curvas de disipación o persistencia

Los residuos presentes en el momento de la recolección, comercialización o consumo, son el resultado de las aplicaciones efectuadas. Las mismas no deberían sobrepasar la dosis mínima eficaz y efectuarse de la manera más regular y uniforme posible.

El depósito del plaguicida sobre el vegetal, a partir del momento de la aplicación va disminuyendo progresivamente por la acción de varias causas y éstas a su vez están influenciadas por distintos factores, el conjunto de unos y otros determinan el modelo y velocidad de disipación del plaguicida y la cantidad de residuos en un momento dado (Thom et al., 1997; Da Silva et al., 2003; Pei et al., 2004; Walter et al., 2005).

En general las reacciones de disipación son de primer orden (Athanasopolous et al., 2005; Pose-Juan et al., 2006), lo cual debe verificarse experimentalmente y determinar la constante (k) específica de la velocidad de reacción, es decir que conociendo k podemos predecir el contenido de los Residuos a un tiempo determinado (R_t) dentro del período considerado, partiendo de un nivel residual a tiempo cero igual a R_o según las ecuaciones:

$$\text{Velocidad de reacción} = \frac{-d[R]}{dt} = k[R] \quad (1)$$

$$-\int_{R_o}^{R_t} \frac{dR}{R} = \int_0^t k dt \quad \text{aplicando } \ln \frac{[R_o]}{[R_t]} = k t$$

$$R_t = R_o e^{-kt} \quad (2)$$

La evolución de los residuos, en este caso los residuos del principio activo de los plaguicidas expresados en mg/ kg de frutos frescos, puede ser determinada en la práctica a partir de los datos obtenidos de las muestras de vegetal recolectadas, según plan de muestreo, desde el momento de la aplicación y a intervalos regulares de tiempo (Garland et al., 1999; Salvestrini et al., 2001; Pose-Juan et al., 2006; Yi y Lu, 2006; Wei Li et al., 2008).

En general, si graficamos la cantidad de residuos (mg/kg) en el vegetal en función del tiempo, se observa la evolución de los mismos en una curva de tipo aproximadamente exponencial. La expresión analítica de estas curvas corresponde a la ecuación (2):

$$R_t = R_0 e^{-Kt} \quad (3)$$

A fin de no utilizar ecuaciones exponenciales se suele efectuar una transformación a través de una regresión lineal semilogarítmica y así la curva se transforma en una recta del tipo:

$$\ln R_t = \ln R_0 - K t$$

es decir:

$$\ln R_t = A - K t \quad (4)$$

donde $A = \ln R_0$ y K representa la pendiente de la recta afectada de signo negativo, pues es decreciente. De esta forma A y K son las constantes, mientras que t (tiempo) y R_t son las variables, la segunda dependiente de la primera.

En función de las curvas de disipación se han podido predecir los niveles residuales a un tiempo determinado de aplicación, verificándose además la concordancia con los obtenidos experimentalmente (Athanasopolous et al., 2003; Fenoll et al., 2008; Osman et al., 2008).

El concepto de vida residual media, se la define como el tiempo, normalmente en días (sólo en casos especiales en horas), que tarda la cantidad de residuos en llegar a un valor correspondiente a la mitad de la cantidad inicial o depósito. Es una medida cuantitativa de la persistencia de los residuos y se la representa por las siglas VR_{50} o más comúnmente por RL_{50} , correspondiente a su denominación inglesa «Residual Life» 50% (Jurasko et al., 2008). Es calculada a partir de la curva de disipación, ya que basta tomar en ordenadas el valor de residuo correspondiente al 50% del depósito inicial y determinar en el eje de abscisas cuantos días han transcurrido desde la aplicación.

De las ecuaciones puede deducirse y ser expresada como el valor de vida residual media:

$$T = \frac{\ln 0.5}{-k} = \frac{0.693}{k} \quad (5)$$

De dicha ecuación, podemos observar que es independiente de la cantidad inicial de residuo (Tariq et al., 2006; Bavcon Kralj et al., 2007; Li et al., 2008; Matthies et al., 2008). La estimación del valor de la vida residual media en este caso corresponde a una sola recta de regresión, pero cuando hay dos o tres dinámicas de disipación, representadas por sus respectivas

rectas, de distinta pendiente, la vida media puede calcularse bien en conjunto, o bien para cada una de las dos o tres rectas que representan la curva de disipación del producto.

Cuando la recta o rectas de la primera parte de la curva de disipación, corresponden a la eliminación rápida inicial, es muy dependiente de las condiciones climáticas, pero puede presentar una forma muy distinta en diferentes lugares y épocas y por ello los valores de la vida media serán muy variables (Matthies et al., 2008).

En cambio, en la última fase o recta de persistencia el residuo plaguicida suele estar más protegido de la acción de los factores ambientales, al penetrar en gran parte en el vegetal, siendo su principal forma de eliminación la vía metabólica, por lo tanto la vida media residual tiene valores relativamente constantes en cada plaguicida, para cada especie o variedad, especialmente en cítricos (Montti et.al 1998; Gerard et al., 2000).

Por lo que a la vista de un dato de la vida media de un plaguicida sobre un cultivo concreto, debe tenerse en cuenta que el intervalo de variación puede ser muy amplio. Debería ser considerado como valor práctico y orientativo, útil para comparaciones relativas, especialmente cuando los factores que influyen en la disipación del plaguicida relativamente constantes.

Análisis de residuos en frutas

Las determinaciones cromatográficas de plaguicidas en alimentos, implican en la mayoría de los casos, el análisis a niveles trazas, con los inconvenientes aparejados al tratamiento

de las muestras y pérdidas de analito en los diferentes procesos, tales como la extracción, el “clean up”, concentración y diluyentes adecuados para la inyección cromatográfica. Además éstos involucran el uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos de elevada pureza, en su mayoría tóxicos y costosos.

En la década de los 90 es la microextracción en fase sólida (SPME), surge como nueva metodología tendiente a acotar los tiempos de análisis, reducir los costos, evitar el uso de solventes y aumentar la sensibilidad del método para la determinación de niveles trazas de contaminantes (Choudhury et al., 1996; Pawliszyn, 1997; Dugay et al., 1998; Prossen y Zupancic-Kralj, 1999; Barker S., 2000a-2000b; Semenov et al., 2000; Kooijman y Kooi, 2004). La aplicación de esta nueva metodología ha tenido un creciente desarrollo en los últimos años (Pan y Ho, 2004; Ouyang et al., 2005; Wang et al., 2005b; Dietz et al., 2006; Sauret-Szczepnaski y Wortham, 2006; Zimmermann et al., 2006; Vander Heyden y Smeyers-Verbeke, 2007).

En la SPME el analito es absorbido directamente desde la muestra, particiona en la fase estacionaria, luego es desorbido térmicamente en el inyector del cromatógrafo gaseoso (GC) para su análisis (Belardi y Pawliszyn, 1989; Arthur y Pawliszyn, 1990; Arthur y Pawliszyn, 1992 a; Arthur y Pawliszyn, 1992 b; Popp et al., 1995; Poerschmann et al., 1997). Los polímeros de recubrimientos son selectivos, por lo que es necesario una adecuada elección del mismo en función del peso molecular y polaridad del analito a extraer. En SPME se establece un equilibrio entre la fase acuosa y la fase orgánica; el número de moles del analito absorbido por la fibra (n_1) está relacionado linealmente con

la concentración del analito en la fase acuosa (C_2^o) por la ecuación:

$$n_1 = k.V_1.C_2^o = A.C_2^o \quad \therefore \quad A = k.V_1 \quad (6)$$

Donde V_1 es el volumen del recubrimiento o absorbente y k es la constante de distribución.

Esta ecuación considera sólo la masa absorbida en el equilibrio y no tiene en cuenta el tiempo necesario para que el recubrimiento absorba el analito. El modelo dinámico que describe matemáticamente el proceso de extracción interpreta la relación entre los parámetros geométricos y termodinámicos sobre la eficiencia y velocidad de la extracción (Arthur et. al., 1992; Shurmer y Pawliszyn, 2000; Pan y Ho, 2004). Se asume que la dinámica de extracción está limitada por el proceso de difusión. Así la difusión es solamente un mecanismo de transporte de masa, el cual determina la migración de las moléculas del analito en el sistema. El modelo también asume que como la concentración del analito en la solución es elevada respecto al absorbente, las propiedades físicas del polímero, tales como el grosor y coeficiente de difusión del analito en el polímero, no cambian. Se presume despreciable la masa absorbida a través de la cara inferior de la fibra, ya que ésta es muy pequeña en relación con la superficie o área total de la fibra (relación 100:1).

Las hipótesis planteadas permiten una descripción matemática de la dinámica de extracción del sistema, resolviendo la ecuación diferencial, la cual está frecuentemente referida como la segunda Ley de difusión de Fick. Cuando se completa la

extracción, la fibra conteniendo el ó los analito/s absorbidos en el polímero de recubrimiento, es introducida en el inyector del cromatógrafo para su análisis. Este proceso involucra la desorción del analito en el inserto del inyector, el analito difunde desde el recubrimiento de la fibra a la corriente de gas portador favorecido por efecto de la temperatura del inyector, posteriormente los analitos ingresan y se condensan en cabeza de columna, iniciándose luego, en función de la rampa de temperatura del horno, la separación cromatográfica (Popp et. al., 1995; Boyd-Boland et. al., 1996; Choudhury et. al., 1996; Langenfeld, 1996)

Comparada con las técnicas de separación tradicionales, las ventajas de la SPME incluyen la completa eliminación de solventes orgánicos, la simplificación de las extracciones analíticas, mejoras en la sensibilidad y en la precisión, mejor selectividad y menores límites de cuantificación. Como así también reducción del tiempo de análisis y ahorro de costos.

La aplicación de la microextracción en fase sólida y la cromatografía gaseosa con espectrometría de masa, es una de las metodologías analíticas más utilizadas para la determinación de analitos a niveles trazas, ya que brinda alta sensibilidad y especificidad analítica con adecuado rigor científico. Las publicaciones son numerosas y en lo específico a esta temática, podemos citar las siguientes, entre otras: Kataoka et al., 2000; Soleas et al., 2000; Navarro et al., 2002; Zambonin et al., 2002; Athanasopoulos et al., 2003; Millan et al., 2003; Otero et al., 2003; Sanusi y Montury, 2004; Trösken et al,2005; Sauret-Szczepanski et al., 2006 ; Charlton et al., 2007; Poole et al., 2007; Valcarcel et al., 2007).

Surge en los últimos años, el desarrollo de nuevos tipos de inyectores acoplados al sistema cromatográfico, tal como el inyector de vaporización de temperatura programada (PTV), a los fines de lograr incrementar la sensibilidad en cromatografía gaseosa y espectrometría de masa. Este inyector en modo de inyección “splitless” (con división) en frío con venteo de solvente tiene dos importantes áreas de aplicación, ya que puede usarse para introducir grandes volúmenes de muestras y para eliminar el solvente, aún con volúmenes normales de inyección en los casos en que el solvente interfiera con la columna o la especificidad del detector (Bosboom et al., 1996; Grob y Biedermann, 1996; Sasano et al., 2000; Sjaak, et al., 2004).

La introducción de un gran volumen de muestra permite reducir los límites de detección y por lo tanto de gran ventaja para la determinación de plaguicidas a niveles traza. Sin embargo es necesario establecer y optimizar algunas de las múltiples variables que inciden sobre la eficiencia de la vaporización de los pesticidas, detección e identificación cromatográfica (Mol et al., 1996; Stan y Linkerhägner, 1996; Wilson et al., 1997; Wylie, 1997; Engewald et al., 1999; Hada et al., 2000; Heiden et al., 2001; Zrostlíková et al., 2001; Concha-Graña et al., 2002; Teske y Engewald, 2002; Björklund et al., 2004).

La aplicación y optimización de estas metodologías analíticas para la determinación de diversos plaguicidas en frutos y jugos de arándanos y evaluar la disipación de los residuos en diversas situaciones han sido los objetivos generales planteados en la presente tesis doctoral, Se considera factible además, ampliar el espectro de aplicación de estas técnicas analíticas a la

determinación de otros plaguicidas y/o a diferentes matrices.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los sectores agroproductores en general y en este caso el de arándanos, requieren del uso de productos fitosanitarios para el control y tratamiento de las enfermedades causales de importantes pérdidas en los cultivos y en poscosecha.

Una eficiente producción con adecuadas estrategias de control de plagas en el marco de protección medio ambiental, permitirán preservar la calidad de sus productos logrando competitividad en los mercados, con el consiguiente impacto socioeconómico y calidad de vida poblacional.

Las aplicaciones de fungicidas triazólicos en los cultivos son efectuadas generalmente en forma preventiva en brotación, floración y cuaje de las bayas. Los procesos de eliminación y/o degradación de estos fungicidas no se disponen en nuestra región, por lo que se considera relevante evaluar la dinámica dicha disipación y determinar la factible presencia de residuos en los frutos al momento de su cosecha.

La demanda creciente de productos de alta calidad y las exigencias, cada vez mayores de los mercados y de los consumidores, respecto a residuos de plaguicidas en frutos frescos y/o procesados, hacen necesaria la aplicación y optimización de nuevas metodologías analíticas para la determinación a niveles trazas de dichos residuos.

Teniendo en cuenta los bajos niveles de residuos permitidos para estos fungicidas, de 0,050 mg/kg en los frutos, fue

necesario desarrollar metodologías que tiendan a incrementar la sensibilidad y especificidad analítica, con de reducidos costos y tiempos de análisis y de escaso o nulo uso de solventes orgánicos.

Por lo que se plantearon en los objetivos generales de la presente tesis doctoral, la aplicación de nuevos procesos de extracción, tal como la microextracción en fase sólida y la optimización de metodologías cromatográficas que permitan la determinación e identificación de estos analitos en las bayas y jugos de arándanos procesados.

Determinar la dinámica del proceso de disipación en condiciones controladas de concentración, dosis de aplicación de los fungicidas aplicados en los cultivos, fundamentalmente en floración y cuaje de las bayas. Evaluar la persistencia de los residuos en los jugos de arándanos procesados y ampliar la aplicación de estas técnicas analíticas a la determinación de otros plaguicidas en estas u otras matrices.

Transferir los resultados obtenidos y satisfacer las demandas de los sectores involucrados mediante la optimización de una metodología analítica de adecuada sensibilidad, rápida y de menor costo, a fin de aportar al control eficiente de su producción; posibilitando la toma de decisiones preventivas que logren preservar la calidad con mayor rentabilidad al momento de la comercialización de sus productos y protegiendo además la salud de potenciales consumidores.

Objetivos específicos

Los objetivos generales del presente trabajo se pueden desglosar en los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de un método multiresiduo para la determinación de residuos de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en *arándanos*, mediante la aplicación de microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa (GC-NPD).
- Desarrollo de un método multiresiduo para la determinación de residuos de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en *jugos naturales* y *procesados de arándanos*, mediante la aplicación de microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa (GC-NPD).
- Desarrollo de un método multiresiduo que permita la determinación e identificación de residuos de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en arándanos y jugos de arándanos, mediante la aplicación de microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa (GC-MSD).
- Desarrollo de un método multiresiduo que permita la determinación e identificación de residuos de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en arándanos y jugos de arándanos, mediante la inyección de grandes volúmenes por aplicación de múltiples inyecciones en modo venteo del solvente (PTV), cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (GC-

MSD).

- Aplicación de los métodos desarrollados a muestras reales; estudio comparativo de los métodos aplicados y de los resultados obtenidos en muestras reales.
- Determinación de las curvas de disipación y cinética degradación de los fungicidas aplicados en los cultivos de arándanos en el momento de floración y cuaje de las bayas. Estudios comparativos de la evolución de los residuos.
- Evaluación de la persistencia de los residuos en los jugos de arándanos. Incidencia de los procesos tecnológicos.
- Aplicación de las metodologías optimizadas a la determinación de otros plaguicidas en muestras de arándanos.

A fin de lograr los objetivos anteriormente mencionados se detalla el **plan de trabajo o actividades** cumplimentadas en la presente tesis doctoral:

- Identificación de los fungicidas a estudiar en función de su importancia que revisten por su aplicación en los cultivos de arándanos de la región.
- Selección de las matrices a evaluar en función de su importancia en los mercados consumidores a nivel nacional e internacional.

- Revisión bibliográfica relacionada a la temática en cuestión, fundamentalmente antecedentes y estado actual de las metodologías analíticas para la determinación de estos fungicidas en frutas.
- Diagramación del plan de muestreo para las diferentes matrices de acuerdo a los objetivos a cumplimentar.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole por GC-NPD. Determinación del tiempo de desorción en el puerto de inyección.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas y de los espectros de masas para la determinación de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole por GC-MSD.
- Estudio y optimización del proceso extractivo por microextracción en fase sólida, según las siguientes etapas:
 - a) Evaluación de las condiciones del medio para el tratamiento previo de las muestras.
 - b) Selección del polímero de recubrimiento más adecuado y evaluación de los procesos de agitación.
 - c) Determinación del perfil de concentración para los analitos en las diferentes matrices a fin de determinar

la masa total absorbida en el tiempo de equilibrio, las constantes de distribución analito-absorbente, coeficientes de difusión de los analitos y volumen de muestra limitante.

d) Selección del tiempo de extracción o tiempo de inmersión de la fibra en la muestra.

- Optimización y validación del método multiresiduo para la determinación de los fungicidas seleccionados en frutos y jugos de arándanos por SPME y GC-NPD. Determinación del rango lineal del método, precisión, recuperación o exactitud, límites de detección y cuantificación del método.
- Diagramación del plan de muestreo en empaques y aplicación del método SPME y GC-NPD a muestras reales.
- Aplicación y optimización del método multiresiduo basado en SPME para la determinación de los fungicidas seleccionados por GC-MSD. Determinación de los parámetros de validación.
- Optimización de los parámetros del inyector de vaporización a temperatura programada (PTV), en modo "splits/splitless" y venteo de solvente, para la determinación de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole por GC-MSD.

- Aplicación y optimización del método para la identificación residuos de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en muestras de arándanos fortificadas a diferentes niveles de concentración, mediante la inyección de grandes volúmenes de muestra y múltiples inyecciones: PTV en modo venteo del solvente y GC-MSD.
- Aplicación de la metodología desarrollada (SPME y GC-NPD) para la determinación de las curvas de degradación de los fungicidas aplicados en condiciones controladas al momento de floración y cuaje de las bayas.
- Evaluación de la cinética de disipación y determinación de la vida media de los residuos. Estudio comparativo de las curvas de degradación.
- Evaluación de la persistencia de los residuos en los jugos de arándanos. Incidencia de los procesos tecnológicos.
- Aplicación de las metodologías optimizadas a la determinación de otros plaguicidas en muestras de arándanos.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Los diferentes aspectos del enfoque metodológico que permitieron arribar al cumplimiento eficiente de los objetivos están relacionados a: el manejo y discusión de la información bibliográfica, necesidades del sector productivo y experiencias previas, plan de muestreo, preparación y tratamiento de las muestras, técnicas analíticas, tratamiento estadístico de los resultados, discusión y conclusiones.

Plan de muestreo

El muestreo constituye una etapa crítica en todo desarrollo o método de análisis, por lo que se debieron establecer el diseño en función de los objetivos del estudio, sus certezas e incertidumbres, procedimientos para la recolección de las muestras, etiquetado, conservación y transporte, en los casos que correspondiera.

El plan de muestreo se planteó para las diferentes matrices: soluciones orgánicas y acuosas de estándares, frutas o bayas y jugos de arándanos.

Se tomaron como base para el muestreo y calidad del mismo las normas establecidas por el Codex Alimentarius, (1999) y FAO/OMS, (2007) y las siguientes consideraciones: identificación y propósito del plan, alcance o amplitud de cobertura

del mismo, campo de aplicación, es decir qué y dónde será efectuado el muestreo, equipo de muestreo y condiciones ambientales, procedimientos de muestreo, tamaño y toma de las muestras, etiquetado, transporte y almacenamiento de las muestras.

A fin de disponer oportunamente de la trazabilidad de las muestras objeto de análisis, se seleccionaron las parcelas e identificaron de los lotes de los cultivos de las variedades tuviesen mayor periodo de cosecha y mayor volumen de producción, ya que los arándanos presentan tiempos de cosecha relativamente cortos, por lo que, en todas las temporadas agrícolas se efectuaron muestreos de la variedad O'Neal.

Teniendo en cuenta que el depósito de los residuos en los cultivos depende, entre otros factores, de la naturaleza del sustrato vegetal, del plaguicida y de su forma de aplicación, los ensayos de campo fueron efectuados bajo el control y monitoreo de los profesionales a cargo de la plantación y/o establecimiento, y se sistematizaron las metodologías de aplicación, concentración y dosis de los fungicidas a evaluar.

A fin de establecer las curvas de disipación de los analitos de mayor impacto en el control de plagas en el cultivo, se programaron aplicaciones de propiconazole y tebuconazole al momento de floración y cuaje (Coscolla, 1993; Garland et al., 1999; Pei et al., 2004; Kyriakidis et al., 2005; Pose-Juan et al., 2006).

Para ambos fungicidas, la concentración y dosis de las aplicaciones en los cultivos de arándanos es de aproximadamente

70 a 100 ml/100 l de agua y 500 ml/ha y pudiéndose aplicar tres veces como máximo.

Las aplicaciones de propiconazole y tebuconazole en floración y cuaje fueron las normalmente establecidas para dichos cultivos, es decir, por aspersión automatizada, a una concentración del principio activo de 250 mg/l y a una dosis de 500 ml/ ha.

Se efectuó una sola aplicación de propiconazole y tebuconazole. Para el momento de floración y cuaje. Además, en un lote al inicio del cuaje, se efectuaron tres aplicaciones de tebuconazole, como caso extremo de dosis, a fin de evaluar la situación de máximo contenido de residuos en las bayas.

Para el muestreo de frutas en el campo, se consideraron las siguientes pautas generales:

- Elección del método de muestreo, el cual puede ser aleatorio, sistemático, selectivo (tomando muestras de puntos predeterminados como ser exposición, orientación, etc.).
- Tamaño de la muestra por parcela, dado que el tamaño, grado de maduración tamaño y calidad de la fruta no es homogéneo en este tipo de cultivo se deben tomar muestras lo más representativas de la población objeto de la evaluación a efectuar.
- Recolección, manipulación, identificación y conservación cuidadosa de las muestras, evitando la contaminación y deterioro de las bayas.

El plan de muestreo adoptado fue una combinación de aleatorio, sistemático y selectivo, en función de los objetivos del mismo.

En ensayos previos en muestras de frutas de los lotes de las parcelas tratadas se determinó la variabilidad de los datos, siendo elevada según lo previsto, por lo que se tomaron cinco muestras por lote, fundamentalmente en los casos en que el tamaño de los frutos al momento de cuaje no es muy homogéneo.

Para el muestreo *en campo* de las diferentes parcelas identificadas se estableció la recolección de bayas según se resume a continuación:

- 30 frutos / arbusto x 10 arbustos = 300 frutos
- Arbustos de altura alta, media y baja: 100 frutos / altura x 3 alturas = 300 frutos.
- Orientación: Norte - Sur, Este - Oeste: 75 frutos / orientación x 4 orientaciones = 300 frutos.

En las diferentes temporadas agrícolas se efectuaron los muestreos de campo desde el inicio del cuaje hasta la maduración óptima de los frutos, a los fines de evaluar la variabilidad de los residuos de los fungicidas durante el crecimiento de las bayas y al momento de su recolección; además se registraron los valores medios del diámetro ecuatorial de los frutos a fin de determinar la curva de crecimiento (Zambonin et al., 2002; Sannino et al., 2004; Sanusi et al., 2004; Walter et al., 2005).

En el muestreo para frutas, que se identificaron como *blancos de muestra y muestras adicionales*, sólo se establecieron

las siguientes condiciones: frutos provenientes de parcelas identificadas como testigos y tamaño de muestra de 300 unidades aproximadamente.

En todos los casos las muestras fueron tomadas a una hora determinada de la mañana a fin de minimizar la humedad sobre las bayas, colocadas en bolsas de red y perfectamente rotuladas e identificadas según su origen.

El *muestreo de bayas en empaques* se efectuó en las diferentes temporadas de producción (2006-2007 y 2008) de lotes de productos envasados, cuya calidad se supone garantizada ya que corresponden a productos de exportación. Se establecieron tres (3) muestreos, en tres (3) empaques, de veinticinco (25) muestras por triplicado y tamaño muestral de 100 gr.

El plan de muestreo para jugos de arándanos tuvo como objetivo aplicar a esta matriz la metodología desarrollada para frutos y poder evaluar los residuos de triazoles en los mismos

Los lotes fueron identificados según el día de producción y se efectuaron tres (3) muestreos por producción y por triplicado. El volumen de muestra se estableció en 500 ml.

Se describe brevemente a continuación el proceso de obtención de los zumos de arándano clarificado o jugos:

- 1)- Pesado
- 2)- Lavado de frutas: Los cuencos que contenían las frutas, fueron puestos bajo corriente de agua potable para eliminar materiales extraños y suciedad adherida a las frutas.
- 3)- Triturado

- 4)- Primer tratamiento enzimático
- 5)- Filtración
- 6)- Segundo Tratamiento enzimático
- 7)- Filtración
- 8)- Agregado de conservantes
- 9)- Pasteurización y envasado

Las características del jugo final, entre otras, fueron de 9,3 °Brix, acidez de 0,39 % (expresada como gramos de ácido cítrico/100ml) y un ratio (°Brix/ acidez) de 23,56.

Se evaluaron los niveles residuales sobre dos tipos de jugos, los *jugos procesados* y los identificados como *jugos naturales*, siendo estos últimos, aquellos que no fueron tratados enzimáticamente.

Indiscutiblemente para esta matriz se efectuaron ligeras modificaciones en la metodología de preparación de la muestra para el análisis en el laboratorio. Se evaluaron los parámetros estadísticos correspondientes y validó la misma, a fin de disponer de una metodología adecuada que posibilite controlar los factibles niveles residuales de los fungicidas en los jugos correspondientes (Soleas et al., 2000; Athanasopoulos et al., 2005; Trösken et al., 2005).

Submuestreo

El tratamiento previo de las muestras y la metodología de submuestreo de las muestras para el análisis en el laboratorio, se

efectúo a partir de las muestras individuales y constituyendo una *muestra única compuesta* o sencillamente *muestra compuesta*.

Según el Codex Alimentarius, la muestra primaria o la “porción de producto” extraída de un lote durante la primera fase del proceso de muestreo, constituye un elemento cuando fue tomado de un lote de productos envasados en empaque, o una “porción de muestreo” en los casos de extracciones de un lote a granel. En la medida de lo factible, las muestras primarias se tomaron en todo el lote y se identificaron las excepciones a este requisito. Con el fin de facilitar el análisis en el laboratorio, se efectuaron tomas de una cantidad suficiente de muestras primarias de tamaño parecido y se procesaron inmediatamente a su recepción en el laboratorio.

Durante la toma de muestras primarias (elementos o porciones de muestreo) y en todos los procedimientos subsiguientes, se tuvieron en cuenta las precauciones a fin de mantener la integridad de la muestra, evitar la contaminación de las muestras o cualquier otro cambio que pueda repercutir de forma negativa en la cantidad de residuos o los resultados analíticos, o que la muestra de laboratorio no sea representativa de la muestra compuesta del lote.

Muestra única compuesta

Para las frutas o bayas, se obtuvo una *muestra compuesta* combinando las muestras primarias (los elementos) de una parcela del cultivo o de un lote de productos preenvasados, o las

muestras primarias (las porciones de muestreo) de un lote a granel.

En los casos en que la muestra compuesta, fue demasiado grande, la muestra final se preparó a partir de ella mediante un método de reducción adecuado. Las disposiciones legislativas nacionales exigen que la muestra final sea subdivida en dos o más porciones para analizarlas por separado. Cada porción debe ser representativa de la muestra final.

La muestra que finalmente se denomina muestra de laboratorio, adopta la forma de la muestra final o de una porción representativa de esta última.

Las muestras de laboratorio fueron conservadas en recipientes rotulados, precintados y refrigeradas hasta su procesamiento.

Las muestras de jugos de arándanos, para el análisis en el laboratorio fueron procesadas de similar forma para obtener la muestra compuesta.

Preparación de las Muestras para el Análisis

Se ha considerado en la preparación de la muestras para el análisis en laboratorio, incluir la ***preparación de estándares***, tanto para inyección directa como para SPME.

Para la preparación las soluciones de estándares en los diferentes solventes orgánicos y en soluciones acuosas a diferentes pH y concentración salina, se procedió según condiciones específicas de la metodología analítica para este tipo de muestras.

El rango de concentraciones para los diferentes analitos en dichas soluciones se estableció en función de los límites máximos de residuos permisibles (LMR) y rango de variabilidad propuestos como aceptables en relación a estos valores de concentración de residuos en este tipo de cultivos.

Para la preparación de *muestras adicionadas* se tuvieron las mismas consideraciones, efectuándose previamente la reconstitución y homogeneización en los casos de muestras congeladas.

Para *jugos*, el submuestreo fue en una primera instancia de unidades múltiples para un posible control de fluctuación de valores entre las unidades múltiples y la variabilidad del lote. En virtud de los resultados obtenidos se adoptó el método de muestras compuestas.

El almacenaje de las submuestras se efectuó por duplicado y en función de las recomendaciones globales y específicas, tanto para el tipo de envases, como lavado o acondicionamiento previo de los mismos, temperatura, etc.

Materiales y equipamiento

Se detallan a continuación los materiales y equipamiento considerados más relevantes en el desarrollo de la presente tesis:

Reactivos

- Etilacetato calidad cromatográfica (Merck)

- Estándares certificados de Triadimefon, Penconazole, Propiconazole y Tebuconazole (Accu Standard Inc.).
- Agua grado 1 (agua calidad cromatográfica ultra pura).
- Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y cloruro de sodio, calida p.a. (Merck).
- Metanol calidad cromatográfica (Merck)
- Hexano calidad cromatográfica (Merck)
- Acetona calidad cromatográfica (Merck)
- Soluciones estándar stock de 1000 ppm en metanol de los diferentes triazoles.
- Fibras de sílica fundida recubiertas con: Polidimetilxilosano (PDMS), Poliacrilato (PA) y Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB); marca Supelco de 100, 85 y 65 μm respectivamente.

Equipamiento

- Cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard Modelo 5890 Serie II, con sistema de inyección capilar “split/splitless”, equipado con Inyector automático Hewlett Packard Modelo 6890 y Chem station o estación de trabajo HP. Versión A.03.34 y Detector de Nitrógeno-Fósforo (NPD). Columna Agilent HP – 5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 μm . Liner o inserto de 900 μl – 78,5 x 6,5 mm para inyección directa y de 0.75 mm de diámetro interno para SPME.
- Cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard GC 6890, equipado con dos sistemas de inyectores: Inyector de Vaporización con Temperatura Programada (PTV) y puerto

de inyección modo “split/splitless”. Liner o inserto de 0.75 mm de diámetro interno para SPME. Muestreador automático HP 7683, columna capilar HP5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25u m). Detector Selectivo de Masa (MSD) HP 5973. ChemStation o estación de trabajo HP. Biblioteca NIST y RTLPEst.

- Equipo E. Pure – Barnstead, utilizado para la obtención de agua grado 1
- Agitador magnético Mistral Large Magnestir II - Lab Line Mod 1170-1, con sistema aislante, para mantener la temperatura constante.
- Baño de ultrasonido NEY-Dental International con controles ajustables.
- Jeringas SPME marca Supelco, para introducir las diferentes fibras de sílica recubiertas con los polímeros específicos.
- Soporte de muestreo manual SPME para 8 viales de 4 ml y un adaptador para viales de mayor volumen, marca Supelco.
- Balanza analítica Ohaus, “Freezer” Electrolux, Centrífugas Gelec 130-D y Gelec G-142-D de 13.000 y 5.000 rpm. Procesadora semi-industrial Ultracomb.
- “Vacuum Manifold” marca Alltech, bomba de vacío regulable, con capacidad para 16 columnas o cartuchos. Cartuchos de 6 y 25 mililitros, provistos de filtros de teflón de 0,45 μ marca Alltech.

Metodologías Analíticas

Los métodos analíticos a adoptar deben tener como objetivo proporcionar una información confiable sobre la naturaleza y/o composición de las muestras sometidas al análisis.

Como es sabido, todas las mediciones muestran cierto grado de variabilidad, pero se deberá, como uno de los objetivos de garantía de calidad, mantener o lograr minimizar esta variabilidad de los resultados.

Es importante tener en cuenta que los métodos analíticos poseen ciertos atributos relevantes para su selección y además, se debe considerar que sean éstos los más apropiados para resolver un problema específico, tal como exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad, confiabilidad y aún más, practicidad.

Finalmente se debe evaluar toda la información disponible y decidir el nivel de incertidumbre que es aceptable en las diferentes situaciones particulares.

Los datos de desempeño proporcionados por un método, deben incluir la identificación del analito y su separación de las sustancias interferentes, además de establecer el nivel mínimo de concentración del analito que puede ser medido y determinar la precisión y exactitud de la medición a niveles típicos de concentración. Es decir, se requiere especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y exactitud (AOAC, 1990; Garfield, 1991; Miller y Miller, 1993; Dejaegher y Vander Heyden, 2007; Feinberg M., 2007; Hibbert et al., 2007; Masson P., 2007; Ortiz y Sarabia, 2007).

La precisión con la que se puede determinar un analito depende de numerosos factores tales como naturaleza y concentración del analito, naturaleza de la matriz y tipos de interferentes o contaminantes, límites de detección, integridad y estabilidad del analito, etc. Es evidente que a medida que decrece el contenido de analitos, estas influencias afectan más la capacidad de ser reproducido.

La aplicación de nuevas metodologías, ha tenido como objetivos fundamentales reducir el tiempo de análisis, costos, minimizar el uso de solventes orgánicos y lograr mayor sensibilidad.

Si bien el término "validación" se ha utilizado con diferentes significados, en el presente trabajo se refiere a un proceso por el cual se determinan y evalúan los atributos o figuras de mérito del método desarrollado.

Las etapas más relevantes de este proceso se detallan a continuación con un enfoque global ya que el procedimiento sólo variará en lo estrictamente específico en función de la naturaleza del o los analitos en cuestión y/o de la matriz (Arthur y Pawliszyn, 1990; Arthur et al., 1992 a; Pawliszyn, 1997; Prosen y Zupancic-Kralj 1999; Kataoka et al., 2000; Semenov et al., 2000; Pérez-Trujillo et al., 2002; Dietz et al., 2006).

Se detallan a continuación las diferentes etapas desarrolladas en la aplicación y optimización de la técnica de SPME para matrices puras o soluciones acuosas modificadas y matrices complejas:

- Selección e identificación de los analitos más relevantes. Estudio de sus características y propiedades físico-químicas.
- Establecimiento de las consideraciones teóricas e hipótesis del modelo a asumir para la dinámica de extracción.
- Selección y adopción del recubrimiento adecuado de la fibra en función de las propiedades del analito en cuestión.
- Selección del modo de extracción del analito de las muestras.
- Evaluación de los procesos de agitación y adopción de la técnica más eficiente.
- Establecimiento de los parámetros y cinéticas del proceso de extracción.
- Optimización de las condiciones cromatográficas y establecimiento de los parámetros de desorción de los analitos.
- Determinación del perfil concentración y optimización del tiempo de extracción en matriz pura o en soluciones acuosas modificadas.
- Optimización del volumen de muestra.

- Verificación del tiempo de equilibrio. Cálculo de las constantes de distribución y coeficientes de difusión analito-absorbente para determinación de la sensibilidad del método.
- Determinación del rango lineal del método y selección de la metodología de calibración.
- Optimización las condiciones de SPME para matrices acuosas heterogéneas.
- Sensibilidad, precisión, límites de detección, cuantificación del método. Validación del método.
- Aplicación y optimización de la SPME para matrices complejas, tales como frutas o bayas de arándanos y jugos procesados. Aplicación de la metodología para la determinación de otros plaguicidas.
- Aplicación y optimización de la metodología para la determinación de triazoles por espectrometría de masas GC-MSD- SPME y GC-MSD- PTV en “splits/splitless” y modo venteo de solvente.

Condiciones cromatográficas

A partir de las respuestas cromatográficas de soluciones de estándares se seleccionaron las condiciones más

adecuadas para la separación y determinación de los analitos de acuerdo a cada sistema cromatográfico utilizado. Dado que los sistemas de inyección utilizados fueron diferentes se seleccionaron el tipo, tamaño y volumen del liner o inserto en el puerto de inyección, para el modo de inyección automática directa “split/splitless”, SPME y para el PTV.

Los métodos de inyección efectuados fueron:

- Inyección directa con inyector automático en modo “split/splitless”.
- Inyección directa con inyector automático en puerto de inyección de temperatura programada (PTV).
- Exposición de la fibra (SPME) y desorción en puerto de inyección en modo “split/splitless”.

Se detallan a continuación las metodologías analíticas aplicadas:

- Determinación de Triazoles por: cromatografía gaseosa, con detector de Nitrógeno-Fósforo (GC-NPD) y método de inyección directa de soluciones mezcla de estándares de triazoles en etilacetato, mediante sistema automático de inyección.
- Determinación de Triazoles, aplicando microextracción en fase sólida (SPME) y por cromatografía gaseosa (GC-NPD).
- Determinación Triazoles por espectrometría de masas (GC-MSD - PTV en “splits/splitless” y modo venteo de solvente).

- Determinación Triazoles por: GC-MSD SPME

Análisis de los resultados

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante software Statgraphics Centurión XV, versión 15.2.06, efectuándose además revisiones bibliográficas (Dejaegher y Vander Heyden, 2007; Feinberg, 2007; Masson, 2007).

Los resultados obtenidos para las diversas matrices y metodologías analíticas aplicadas fueron procesados y se determinaron los diferentes parámetros estadísticos a fin de establecer la optimización de las respectivas técnicas.

Los criterios adoptados para determinar precisión y los límites de detección y cuantificación, se resumen a continuación:

La *precisión* se encuentra relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar (σ), estimada analíticamente por s o más comúnmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV).

Ambos estimadores permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media.

La precisión del sistema se efectuó evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar y la del método evaluando

la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea y corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestras hasta la determinación del o los analitos en el instrumento.

A partir de de los datos de las respuestas cromatográficas expresadas en alturas y áreas de pico, para $n = 10$ y $\alpha = 0.05$, en condiciones repetitivas y reproducibles y mediante test de Student se determinó el intervalo de confianza de la media. Se calculó de acuerdo a la distribución t de Student según:

$$\bar{X} - \frac{t_{v,a} S}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + \frac{t_{v,a} S}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

Donde $t_{v,a}$ es el valor de $t_{student}$ tabulado para n mediciones con $v = n-1$ grados de libertad

El método se consideró preciso cuando el coeficiente de variación porcentual no supera el 1.5 – 2 % (AOAC, 1990)

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. La *sensibilidad de calibración* correspondiente a la pendiente de la curva de calibración y la *sensibilidad analítica* correspondiente al cociente entre la sensibilidad de calibración y la desviación estándar de la medida.

Puede ocurrir que dos técnicas o la misma técnica empleada en diferentes matrices, tengan la misma sensibilidad de calibración pero diferente sensibilidad analítica, debido a factores propios como necesidad de extracción, concentración, etc.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los *Límites de detección y de cuantificación*, los cuales se estimaron a partir de la curva de regresión, para bajas concentraciones de los analitos, para $n=30$ determinaciones individuales y $\alpha= 0,05$. De dicha curva se determinó la pendiente (b) y por extrapolación a concentración cero, se obtuvo un estimado de la respuesta del blanco (Y_{bl}).

A partir de la desviación estándar correspondiente a cada concentración, se determinó la recta correspondiente y por extrapolación se estimó la desviación estándar del blanco (S_{bl}). Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las ecuaciones que se detallan a continuación y en las que se considera 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco respectivamente, para n determinaciones individuales.

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n'}} \quad (8)$$

$$\text{Límite de Cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \cdot \frac{1}{\sqrt{n'}} \quad (9)$$

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍAS ANALÍTICAS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I- Determinación de triazoles por cromatografía gaseosa, detector de nitrógeno- fósforo, método de inyección directa de soluciones mezcla de estándares

Introducción

Los objetivos de esta metodología fueron lograr la optimización de las condiciones cromatográficas para la adecuada separación e identificación de los tiempos de retención de cada analito, determinar la ecuación recta de regresión a fin de establecer la relación masa inyectada vs. respuesta cromatográfica, determinar la precisión y los límites de detección y cuantificación del sistema.

Dado que la curva de calibrado relaciona las respuestas cromatográficas con la masa inyectada, ésta puede ser utilizada para determinar la masa total absorbida por el polímero en la técnica SPME, a diferentes tiempos de exposición y en el equilibrio y poder establecer el perfil de concentración y los diferentes parámetros requeridos para la aplicación y optimización de la metodología SPME para determinar los analitos por GC-NPD en condiciones cromatográficas similares.

Materiales y Métodos

Los mismos están relacionados con las diferentes etapas a desarrollar para la optimización de dicha técnica analítica y se detallan a continuación:

Preparación de estándares

A fin de seleccionar el solvente óptimo para la determinación analítica, se utilizaron los siguientes solventes: metanol, hexano, acetona y etilacetato de calidad cromatográfica (Mastovska y Lehotay, 2004; Albero et al., 2005; Ouyang et al., 2005).

En función de las distintas respuestas cromatográficas, en alturas y áreas de picos, se seleccionó como solvente para la preparación de estándares el etilacetato.

Se prepararon soluciones individuales y mezcla de estándares triazólicos en etilacetato de: triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole, a una concentración de 5 mg/l, a fin de establecer las condiciones cromatográficas, los tiempos de retención para cada analito individualmente e identificación de picos en la mezcla. Las 10 muestras de soluciones mezcla de triazoles en etilacetato a diferentes concentraciones: 5 - 2,5 - 2,0 - 1,0 - 0,75 y 0,5 mg/l, permitieron establecer la relación entre las respuestas cromatográficas y la concentración o masa inyectada, mediante inyección directa con inyector automático.

Para la determinación de precisión del sistema se utilizaron estas soluciones, ya que se determinó precisión en todos los puntos de la curva de regresión lineal.

Los límites de detección y cuantificación fueron determinados a partir de los datos obtenidos de 10 soluciones de estándares de triazoles a bajas concentraciones: 1,0 - 0,75 y 0,5 mg/l.

Condiciones cromatográficas GC-NPD – Inyección directa (I.D.)

Se evaluaron 3 condiciones cromatográficas diferentes para la determinación de triazoles por el método de inyección directa, identificándose como método 1, 2 y 3.

Método 1

Velocidad gas portador (N₂) 1,5 ml/min, flujo del gas auxiliar (N₂) 30 ml/min, flujo de H₂ 4 ml/min y flujo de aire 100-110 ml/min, temperatura inyector 250 °C con 2 minutos de “splitless”, temperatura inicial de columna 50 °C durante 2 minutos, rampa de 55 °C/minuto hasta temperatura final de 280 °C durante 7,5 minutos, temperatura del detector NPD 300 °C. Columna Agilent HP –5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm. Liner o inserto de 0,75 mm de diámetro interno. Volumen de inyección 2 µl.

Método 2

Este método se diferencia del anterior sólo en el tipo y capacidad del liner, siendo éste de 900 µl – 78,5 x 6,5 mm. Su mayor capacidad evita la pérdida de los analitos durante el proceso de evaporización.

Velocidad gas portador (N₂) 1,5 ml/min, flujo del gas auxiliar (N₂) 30 ml/min, flujo de H₂ 4 ml/min y flujo de aire 100-110 ml/min, temperatura inyector 250 °C con 2 minutos de “splitless”, temperatura inicial de columna 50 °C durante 2 minutos, rampa de 55 °C/minuto hasta temperatura final de 280 °C durante 7,5

minutos, temperatura del detector NPD 300 °C. Columna Agilent HP –5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm.

Método 3

En este método se modificó la temperatura del inyector, el tiempo de splitless, la temperatura inicial del horno y la rampa de mismo.

Velocidad gas portador (N₂) 1,5 ml/min, flujo del gas auxiliar (N₂) 30 ml/min, flujo de H₂ 4 ml/min y flujo de aire 100-110 ml/min, temperatura inyector 270 °C con 1 minutos de “splitless”, temperatura inicial de columna 80 °C durante 1 min, rampa de 40 °C/minuto hasta temperatura final de 280 °C durante 6 min, temperatura del detector NPD 300 °C. Columna Agilent HP –5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm. Liner o inserto de 900 µl – 78,5 x 6,5 mm. Volumen de inyección 2 µl.

Entre los métodos 1 y 2, la diferencia correspondió solamente al tipo y capacidad del inserto, siendo éste de 0,75 mm de diámetro interno en el método 1 y de 900 µl – 78,5 x 6,5 mm en el método 2. Del análisis comparativo de las respuestas cromatográficas se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre el método 1 y 2, siendo el inserto más adecuado el correspondiente al utilizado en el método 2 (de 900 µl – 78,5 x 6,5 mm), tal como era de prever puesto que la mayor capacidad del liner en el puerto de inyección evita la pérdida de analitos al momento del cambio de fase, mientras que el liner de menor capacidad alcanza un estado de saturación lo que se traduce en menores respuestas y reproducibilidad de las mismas.

En el método 3 se modificaron las condiciones operativas del cromatógrafo, tales como la temperatura del inyector, el tiempo de “splitless”, la temperatura inicial del horno y la rampa del mismo en función de las respuestas cromatográficas expresadas en alturas y áreas de picos, ya que las respuestas, separación y resolución de los picos de los respectivos analitos fueron las más adecuadas, por lo que se adoptaron las condiciones establecidas en el *método 3*. Se pudieron identificar los enantiómeros del propiconazole (I y II) (Hutta et al., 2002; Zambonin et al., 2002; Toribio et al., 2004; Wang et al., 2005).

Resultados y Discusión

Establecidas las condiciones cromatográficas se identificaron los tiempos de retención para cada analito individual y en soluciones mezcla de triazoles. Tanto en solución individual como en la solución mezcla, se observaron e identificaron para los tiempos de retención (RT: 11,214 y 11,302), los dos enantiómeros, I y II, del propiconazole.

Los tiempos de retención medios, de los compuestos triazolicos fueron los siguientes: triadimefon (RT: 9,267)- penconazole (RT: 9,567)- propiconazole I (RT: 11,214)- propiconazole II (RT: 11,302) y tebuconazole (RT: 11,578).

En la figura 3 podemos observar el cromatograma correspondiente a inyección directa de 2 µl de soluciones mezcla de triazoles en etilacetato a 5 mg/l.

El análisis estadístico completo correspondientes a las respuestas cromatográficas expresados en alturas y áreas de

picos se presentan sólo para triadimefon. Los resultados de los restantes analitos se presentan en alturas vs. concentración o masa inyectada, ya que no existen diferencias significativas en los coeficientes de correlación de las ecuaciones del modelo ajustado utilizando áreas o alturas de pico.

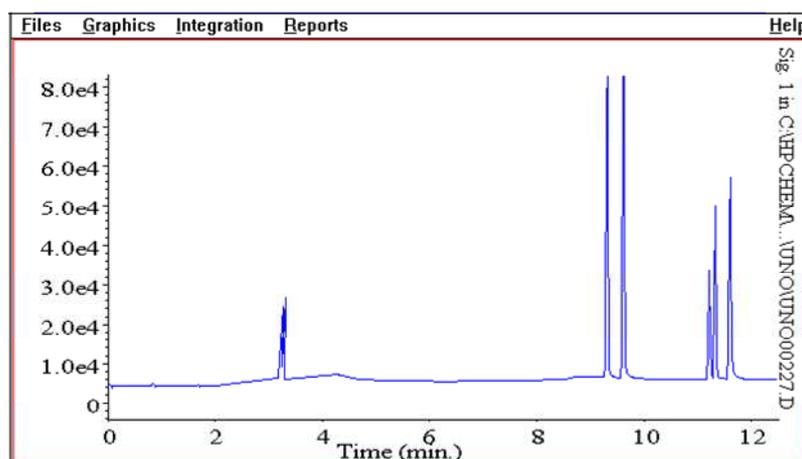


Figura 3. Cromatograma Triazoles – GC-NPD- Inyección Directa

Análisis Unidimensional y Regresión Lineal Triadimefon I.D. - GC-NPD

En la tabla 3 podemos observar los resultados y parámetros estadísticos correspondientes al análisis unidimensional efectuado, para soluciones de estándares de triadimefon. Los resultados estadísticos para concentración vs. altura y concentración vs. área, para triadimefon I.D., incluyen las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad, y medidas de forma. Los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados determinaron que las muestras proceden de una distribución

normal, ya que los valores están, en todos los casos, dentro del intervalo esperado para los datos de una distribución normal.

Los resultados del ajuste al modelo lineal describen la relación entre Altura triadimefon I.D y mg/l. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Altura Triadimefon I.D.} = -3474 + 586225^* \text{ mg/l} \quad (10)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre Altura Triadimefon I.D. y mg/l, para un nivel de confianza del 99%.

Tabla 3. Análisis unidimensional- Soluciones estándares de Triadimefon-I.D.-GC-NPD (n= 10 y $\alpha = 0,05$)

| mg/l | 5 | 2,5 | 2 | 1 | 0,75 | 0,5 |
|--|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Triadimefon- Alturas | | | | | | |
| Valores Medios | 289647 | 143023 | 113783 | 55219 | 40466 | 25822 |
| Desviación típica | 170 | 110 | 224 | 164 | 82 | 85 |
| Coefficiente variación relativo | 0,06% | 0,08% | 0,20% | 0,30% | 0,20% | 0,33% |
| Intervalo confianza | ±122 | ±79 | ±160 | ±117 | ±59 | ±61 |
| Triadimefon- Áreas | | | | | | |
| Valores Medios | 464004 | 235008 | 189232 | 97674 | 75055 | 51941 |
| Desviación típica | 72 | 54 | 136 | 34 | 68 | 122 |
| Coefficiente variación relativo | 0,02% | 0,02% | 0,17% | 0,13% | 0,19% | 0,24% |
| Intervalo confianza | ±51 | ±39 | ±97 | ±24 | ±49 | ±88 |

El estadístico R^2 indica que el modelo explica un 99,9997% de la variabilidad en Altura triadimefon I.D. El coeficiente de correlación es igual a 0,999999, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Dado que el p-valor del estadístico Durbin-Watson es superior a 0,05 no hay indicio de autocorrelación serial en los residuos. Dado que el p-valor del tests de Kolmogorov-Smirnov es igual a 0,6725, no podemos rechazar que residuos proceda de una distribución normal con un nivel de confianza de al menos un 90%.

En la figura 4 se representa la curva de regresión lineal para soluciones de estándares de triadimefon, donde las respuestas cromatográficas se expresan en áreas y alturas de pico para las diferentes concentraciones.

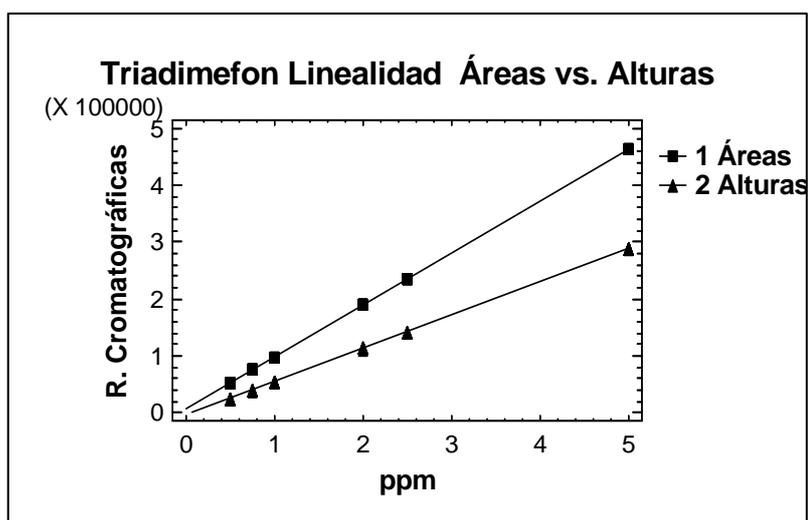


Figura 4. Regresión Lineal Triadimefon I.D. GC-NPD- (n= 10 y $\alpha = 0,05$)

Los resultados del ajuste al modelo lineal describen la relación entre Área triadimefon I.D y mg/l y la ecuación del modelo ajustado es:

Área Triadimefon I.D. = $6187 + 91554^* \text{ mg/l}$ (11)

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre Altura Triadimefon I.D. y mg/l, para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R^2 indica que el modelo explica un 99,9999% de la variabilidad en Área triadimefon I.D. El coeficiente de correlación es igual a 0,9999, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

El p-valor superior a 0,05 del estadístico Durbin-Watson (DW) indicó la independencia de los residuos. El p-valor del tests de Kolmogorov-Smirnov es igual a 0,7798, por lo que no podemos rechazar que residuos proceda de una distribución normal con un nivel de confianza de al menos un 90%.

En la tabla 4 se observan un resumen de los resultados del análisis unidimensional de las observaciones correspondiente a soluciones estándares en etilacetato de penconazole, propiconazole I y II y tebuconazole a las concentraciones previstas.

Los valores de los estadísticos del coeficiente de asimetría y curtosis estandarizado, dentro del rango de -2 a +2, indican para todas las observaciones que los datos proceden de una distribución normal.

Tabla 4. Soluciones estándares en etilacetato Penconazole, Propiconazole (I y II) y Tebuconazole- I.D- GC-NPD (n= 10 y $\alpha = 0,05$)

| (mg/l) | 5 | 2,5 | 2 | 1 | 0,75 | 0,5 |
|--|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Penconazole | | | | | | |
| Valores Medios | 334881 | 163995 | 129793 | 61486 | 44753 | 27371 |
| Desviación típica | 15 | 164 | 239 | 158 | 373 | 290 |
| Coefficiente variación relativo | 0,08% | 0,10% | 0,18% | 0,26% | 0,83% | 1,06% |
| Intervalo confianza | ±11 | ±117 | ±171 | ±113 | ±84 | ±208 |
| Propiconazole I | | | | | | |
| Valores Medios | 77074 | 37993 | 30154 | 14705 | 10475 | 6788 |
| Desviación típica | 93 | 65 | 109 | 82 | 71 | 25 |
| Coefficiente variación relativo | 0,12% | 0,17% | 0,36% | 0,56% | 0,68% | 0,37% |
| Intervalo confianza | ±66 | ±46 | ±78 | ±59 | ±51 | ±18 |
| Propiconazole II | | | | | | |
| Valores Medios | 106803 | 51773 | 40751 | 18722 | 13200 | 7753 |
| Desviación típica | 29 | 63 | 79 | 107 | 84 | 48 |
| Coefficiente variación | 0,03% | 0,12% | 0,19% | 0,57% | 0,63% | 0,62% |
| Intervalo confianza | ±21 | ±45 | ±56 | ±77 | ±60 | ±34 |
| Tebuconazole | | | | | | |
| Valores Medios | 136078 | 66574 | 52684 | 24686 | 17944 | 10892 |
| Desviación típica | 78 | 139 | 66 | 78 | 100 | 123 |
| Coefficiente variación relativo | 0,06% | 0,21% | 0,12% | 0,32% | 0,56% | 1,13% |
| Intervalo confianza | ±56 | ±99 | ±47 | ±56 | ±72 | ±88 |

Regresión Lineal Penconazole I.D.- GC-NPD

Los resultados del ajuste al modelo lineal describen la relación entre Altura penconazole I.D y mg/l. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Altura Penconazole I.D.} = -6736 + 68317^* \text{ mg/l} \quad (12)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre Altura y mg/l para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9993% de la variabilidad en Altura. El coeficiente de correlación es igual a 0,9996; indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

El p-valor del estadístico Durbin-Watson (DW) y del test de Kolmogorov-Smirnov indicaron la independencia y normalidad de los residuos con un nivel de confianza de al menos un 90%.

En la figura 5 se representa la curva de regresión lineal para soluciones de estándares de penconazole para $n= 10$ y $\alpha = 0,05$.

Regresión Lineal Propiconazole I I.D- GC-NPD

Los resultados del ajuste al modelo lineal describen la relación entre Altura propiconazole I - I.D y mg/l. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Altura propiconazole I - I.D.} = -1075 + 15629^* \text{ mg/l} \quad (13)$$

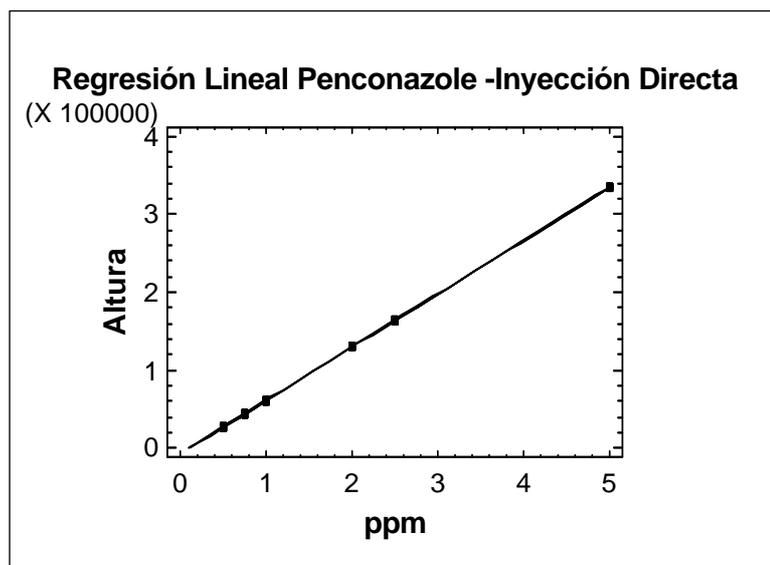


Figura 5. Regresión Lineal Penconazole I.D.- GC-NPD (n= 10 y $\alpha = 0,05$)

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre Altura y mg/l para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9974% de la variabilidad en Altura. El coeficiente de correlación es igual a 0,999987, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Dado que el p-valor del estadístico Durbin-Watson (DW) es superior a 0.05, indica la independencia de los residuos.

En la figura 6 se representa la curva de regresión lineal para soluciones de estándares de propiconazole.

De los valores predichos para *Altura propiconazole I - I.D.*, usando el modelo ajustado, se pudieron determinar los intervalos de predicción para las nuevas observaciones y de confianza para la media de muchas observaciones al 95,0%. El p -valor del tests

de Kolmogorov-Smirnov, es superior a 0,10 por lo que los residuos proceden de una distribución normal, con un nivel de confianza de al menos el 90%

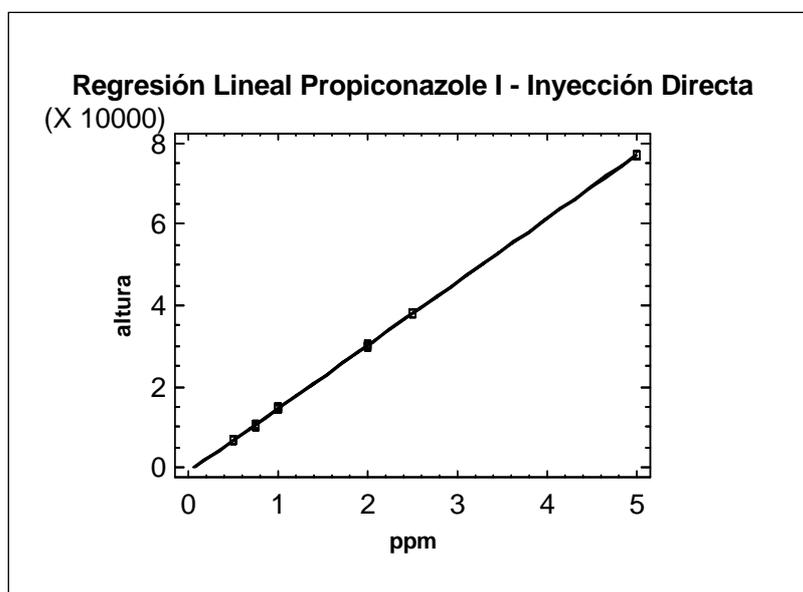


Figura 6. Regresión Lineal Propiconazole I - I.D.- GC-NPD (n= 10 y $\alpha = 0,05$)

Regresión Lineal Propiconazole II - I.D. GC-NPD

Los resultados del ajuste al modelo lineal describen la relación entre Altura propiconazole II - I.D y mg/l. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Altura propiconazole II - I.D.} = -3312 + 22025^* \text{ mg/l} \quad (14)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre Altura y mg/l para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R-cuadrado es de 99,9994% y el coeficiente de correlación es igual a 0,999997, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El p-valor del estadístico Durbin-Watson (DW) y del test de Kolmogorov-Smirnov indicaron la independencia y normalidad de los residuos para un nivel de confianza de al menos el 90%. En la figura 7 se representa la curva de regresión lineal para soluciones de estándares de propiconazole II

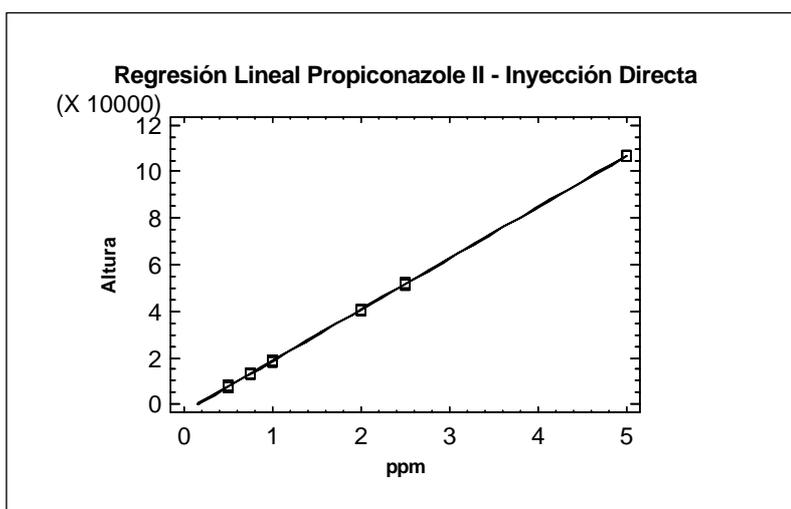


Figura 7. Regresión Lineal Propiconazole II - I.D.- GC-NPD (n= 10 y $\alpha = 0,05$)

Regresión Lineal Tebuconazole - I.D. GC-NPD

Los resultados del ajuste al modelo lineal describen la relación entre Altura tebuconazole - I.D y mg/l. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Altura Tebuconazole - I.D.} = -3007 + 27821 * \text{mg/l} \quad (15)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre Altura y mg/l para un nivel de confianza del 99%. El estadístico R-cuadrado es de 99,9992% y el coeficiente de correlación es igual a 0,999996, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Se estableció la independencia y normalidad de los residuos para el nivel de confianza establecido. Se determinaron los intervalos de predicción para las nuevas observaciones y de confianza para la media de muchas observaciones al 95,0% a partir de los valores predichos

En la figura 8 se representa la curva de regresión lineal para soluciones de estándares de propiconazole II.

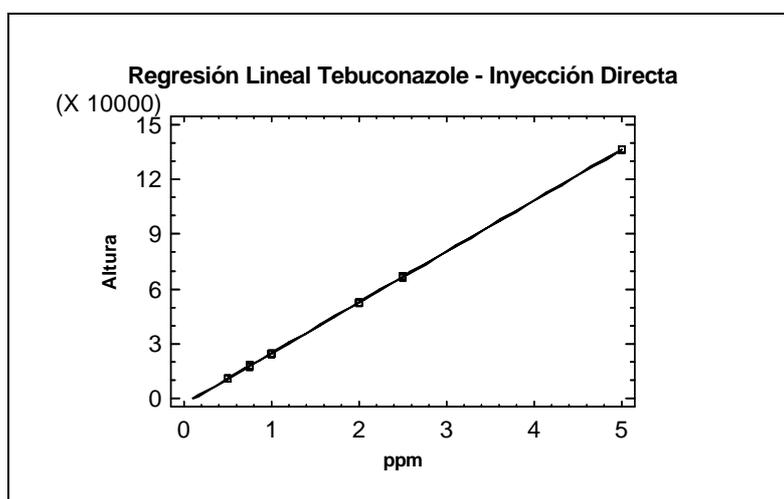


Figura 8. Regresión Lineal Tebuconazole - I.D.- GC-NPD (n= 10 y $\alpha = 0,05$)

En la figura 9 se presentan las rectas de regresión de los diferentes analitos, a las concentraciones de las soluciones de estándares en etilacetato, para el método de inyección directa de

2 μ l, en las condiciones cromatográficas establecidas, para $n = 10$ y $\alpha = 0,05$

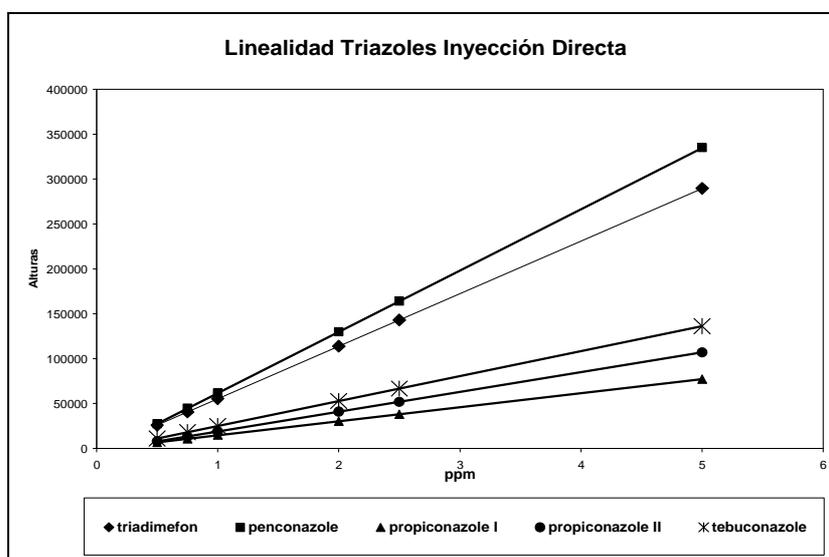


Figura 9. Regresión Lineal Triazoles GC-NPD Inyección Directa

Precisión: Método Inyección Directa

En este caso, la *precisión se determinó para el sistema* y a partir del análisis unidimensional efectuado se obtuvieron los estimadores que permitieron evaluar la incertidumbre en la estimación de la media, es decir, el error aleatorio correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media. Mediante test de Student se determinó el intervalo de confianza de la media.

La *precisión del sistema* a partir de los datos de las respuestas cromatográficas expresadas en alturas y áreas de pico, para $n = 10$ y $\alpha = 0,05$, en condiciones repetitivas y reproducibles, se consideró adecuada ya que en todos lo casos,

los coeficientes de variación porcentual no superaron el 1,5 – 2,0 % (AOAC, 1990).

Límites de detección y cuantificación- Inyección Directa

Los límites se estimaron a partir de la curva de regresión, para bajas concentraciones de los analitos, 0,5 - 0,25 y 0,10 mg/l, n= 30 determinaciones individuales y $\alpha= 0,05$. De dicha curva se determinó la pendiente (b) y por extrapolación a concentración cero, se obtuvo un estimado de la respuesta del blanco (Y_{bl}).

A partir de la desviación estándar correspondiente a cada concentración, se determinó la recta correspondiente y por extrapolación se estimó la desviación estándar del blanco (S_{bl}). Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las ecuaciones correspondientes en las que se considera 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco respectivamente, para n determinaciones individuales. En la tabla 5 se presentan los resultados, a partir de los cuales se calcularon los límites correspondientes para de las observación efectuadas, de soluciones de estándares, por inyección directa de 2 μ l, para un n=30 y $\alpha= 0,05$.

Tabla 5. Resultados previos para la determinación de los Límites - Triadimefon I.D-GC-NPD (n=30 y $\alpha= 0,05$).

| mg/l | Valores medios | Desviación estándar | Coefficiente variación relativo |
|------|----------------|---------------------|---------------------------------|
| 0,5 | 25822 | 86 | 0,33 % |
| 0,25 | 14570 | 121 | 0,83 % |
| 0,1 | 8686 | 162 | 1,86 % |

Siendo: b= 42794 $Y_{bl} = 4230$ $S_{bl} = 176$

Aplicando las ecuaciones correspondientes se determinaron los Límites de detección y cuantificación, siendo los mismos de **0,02 y 0,026 mg/l** respectivamente; con similar procedimiento se determinaron los límites de los restantes analitos (tabla 6).

Tabla 6. Límites de Detección y Cuantificación – Inyección Directa GC-NPD

| Analito | L.Detección (mg/l) | L.Cuantificación (mg/l) |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Triadimefon | 0,020 | 0,026 |
| Penconazole | 0,015 | 0,023 |
| Propiconazole I | 0,090 | 0,105 |
| Propiconazole II | 0,085 | 0,031 |
| Tebuconazole | 0,021 | 0,028 |

En función de los resultados podemos concluir que, en las condiciones establecidas, existe una estrecha correlación entre las respuestas cromatográficas y la concentración o masa inyectada, la precisión y sensibilidad del sistema son adecuadas.

II- Determinación de Triazoles en Soluciones Acuosas de Estándares por SPME Y GC-NPD

Introducción

Los fundamentos teóricos de la microextracción en fase sólida se basan en principios termodinámicos y de transferencia de masa y su adecuada aplicación requiere de la optimización de diversas variables, para lo cual se establecieron las etapas metodológicas a desarrollar en función de los tipos de matrices, en este caso las mismas corresponden a soluciones acuosas de estándares y muestras complejas, tales como frutos y jugos de arándanos. Los aspectos teóricos de dicha metodología han sido planteados por numerosos autores, los que han sido considerados a fin de aplicar y lograr optimizar la misma (Boyd-Boland et al., 1996; Pawliszyn J., 1997; Saraullo et al., 1997; Dugay et al., 1998; Beltran et al., 2000; Kataoka et al., 2000; Lambropoulou et al., 2000; Semenov et al., 2000; Poole et al., 2000; Goncalves y Alpandurada, 2002; Pérez-Trujillo et al., 2002; Kooijman et al., 2004; Albero et al., 2005; Wang et al., 2005 a-b; Dietz et al., 2006; Sauret-Szczepansky et al., 2006; Zimmermann et al., 2006; Forina y Casale, 2007; Rozet et al., 2007).

Los objetivos de la puesta a punto de esta metodología fueron determinar las condiciones del proceso extractivo en un medio donde las interferencias de la matriz sean mínimas, a fin de establecer los parámetros analíticos correspondientes y optimizar la técnica para su posterior aplicación a muestras más complejas.

Materiales y Métodos

Preparación de estándares

La preparación de estándares en un medio acuoso (agua grado 1), constituye la primera etapa de una metodología, a fin de optimizar el proceso extractivo y transferencia de los analitos al polímero de recubrimiento. Las modificaciones del medio acuoso se redujeron a variaciones de pH y grado de salinización (Zambonin et al., 2002; Pan y Ho, 2004; Sanusi et al., 2004; Ouyang et al., 2005).

a) Las soluciones acuosas de estándares de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole a 100 µg/l se prepararon a pH 5, 7 y 9.

b) A fin de evaluar la incidencia del grado de salinización del medio sobre el proceso extractivo, se adicionó a soluciones acuosas de estándares un 10, 20 y 30 % de NaCl.

Seleccionadas las condiciones óptimas del medio, se prepararon soluciones acuosas individuales y mezclas de estándares triazólicos de: triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole, a una concentración de 100 µg/l, a fin de establecer las condiciones cromatográficas, el tiempo de análisis o absorción, tiempo de desorción, tiempos de retención para cada analito individualmente e identificación de picos en la mezcla.

Para la selección del polímero de recubrimiento y optimización de las condiciones de extracción, se prepararon 10 soluciones acuosas de estándares triazólicos a 50 µg/l.

Para cada una de estas soluciones se estableció un tiempo de extracción de 10 minutos, con los diferentes polímeros de

recubrimiento: Poliacrilato de 85 μ (PA), Polidimetilsiloxano de 100 μ m (PDMS) y Cabowax/divinilbenceno de 65 μ m (CW/DVB).

Las soluciones acuosas de estándares triazólicos a 50 y 10 μ g/l se emplearon para determinar el perfil de concentración (masa absorbida vs. tiempo), masa y número total de moles absorbidos en el equilibrio, constante de distribución, volumen mínimo de muestra y coeficiente de difusión.

Se prepararon 10 muestras de soluciones acuosas mezcla de triazoles a diferentes concentraciones: 50- 25- 10- 5- 2,5 y 1,0 μ g/l a fin de trazar las curvas de linealidad respectivas y determinar la precisión para todas las concentraciones. Las soluciones acuosas mezcla de estándares a 5- 2,5 y 1,0 μ g/l; se utilizaron para determinar los límites de detección y cuantificación.

Optimización del proceso extractivo

La optimización del proceso extractivo involucró diferentes etapas, aunque cabe aclarar que varias de éstas se efectuaron simultáneamente, pero a los fines de presentar un cierto orden metodológico, se detallan a continuación.

Condiciones del medio acuoso

A fin de evaluar la incidencia del pH y la salinización del medio en el proceso de extracción se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones: intervalo de pH establecido para cada polímero de recubrimiento, propiedades fisicoquímicas de los analitos y de la matriz a la cual se aplicaría esta metodología de extracción, es decir arándanos y sus jugos procesados. Como así

también, minimizar las interferencias por adición de otros reactivos, preservar la vida útil de la fibra, etc.

En experiencias obtenidas en investigaciones previas, sobre el pretratamiento para la extracción de otros analitos en frutas y productos cítricos, que involucran homogeneización de las muestras en soluciones acuosas y posterior alcalinización, fue necesario optimizar las condiciones de extracción en un medio sencillo simulando este proceso. En el caso por ejemplo del Imazalil, que es un compuesto orgánico de comportamiento básico, la optimización del pH de la muestra debió efectuarse en función del valor del pK_a del mismo (Choudhury et al., 1996; Montti et al., 2000).

La adición de sal a las muestras acuosas generalmente incrementa la constante de distribución fibra / matriz de las moléculas orgánicas neutras. La teoría prevé un incremento en la cantidad extraída cuando se aumenta la concentración de sal. Por lo tanto, es necesario y muy importante convertir los analitos a la forma no disociada.

En el caso mencionado, un pH 8 y la adición al medio de un 10% de NaCl incrementó el proceso extractivo. Sin embargo, la formación de microcristales sobre la fibra, por efecto de la temperatura en el puerto de inyección, reduce la vida útil de la misma.

En los casos en los que la transferencia de masa es pequeña y la necesidad del agregado de sales es imperiosa, se recomienda un suave y ligero lavado de la fibra con agua grado 1, previa exposición en el inyector, ya que la experiencia indica que

prácticamente no hay pérdidas del analito si se efectúa adecuadamente este ligero lavado.

A fin de optimizar las condiciones de extracción, se efectuaron las siguientes modificaciones del medio:

a) Soluciones acuosas de estándares de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole a 100 µg/l y a pH 5- 7 y 9.

b) A fin de evaluar la incidencia del grado de salinización del medio sobre el proceso extractivo, se adicionó a soluciones acuosas de estándares un 10, 20 y 30 % de NaCl.

Dado que, este proceso debe establecerse previamente a los fines de dar continuidad a las restantes etapas de la metodología analítica, los resultados fueron analizados en función de las consideraciones ante dichas. Por lo que se estableció para el medio acuoso un valor de pH 7 y se descartó la adición de sales, ya que éstas son componentes naturales de las frutas.

Selección del recubrimiento

La selección del polímero de recubrimiento se efectuó en función de la naturaleza química de los analitos, de las características del absorbente y de los tiempos de equilibrio previstos en extracción directa desde matriz acuosa con agitación magnética.

Para la selección del polímero de recubrimiento y optimización de las condiciones de extracción, se utilizaron 10 soluciones acuosas de estándares de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole a una concentración de 50 µg/l, un tiempo de extracción de 10 minutos y agitación magnética a 2000

rpm, efectuándose ensayos con los diferentes polímeros de recubrimiento: Poliacrilato de 85 μm (PA), Polidimetilsiloxano de 100 μm (PDMS) y Cabowax/ divinilbenceno de 65 μm (CW/DVB).

Los resultados obtenidos para cada una de las fibras y analitos, fueron analizados estadísticamente a fin de establecer si existen aleatoriedad e independencia de las muestras, normalidad de las observaciones, homogeneidad de las varianzas y diferencias estadísticamente significativas entre las fibras (Saraullo et al., 1997; Dugay et al., 1998; Kataoka et al., 2000; Semenov et al., 2000; Goncalvez y Alpendurada, 2002 Pérez-Trujillo et al., 2002; Wang et al., 2005; Dietz et al., 2006; Sauret-Szczepansky et al., 2006, Zimmermann et al., 2006;).

Selección del modo de extracción

La selección del modo de extracción se efectuó considerando la matriz de la muestra, volatilidad de los analitos y su afinidad a la matriz. Por lo que fue posible seleccionar el modo de *extracción directa*, dado que la volatilidad del analito es baja y la matriz es acuosa. En el modo directo la fibra se inserta directamente en la muestra y los analitos son transportados desde la matriz misma a la fase de extracción o polímero de recubrimiento. Para facilitar la extracción rápida, se requiere algún nivel de agitación para transportar los analitos desde la solución a la vecindad de la fibra.

Para matrices acuosas, se requieren técnicas de agitación más eficientes, tales como flujo rápido de la muestra, movimiento rápido de la fibra o el vial, agitación magnética o sonicación. Estas condiciones son necesarias para reducir el efecto causado por la

“zona de depleción” producida justo alrededor de la fibra y los pequeños coeficientes de difusión de los analitos en las matrices líquidas.

Selección de la técnica de agitación

La *agitación magnética* es la más comúnmente usada en experiencias de SPME y la extracción es eficiente cuando se aplican velocidades rotacionales elevadas (2000 - 3300 rpm).

La sonicación es también una técnica eficiente pero, sin embargo, debe ser muy bien controlada, ya que de lo contrario se reduce notablemente la vida útil de la fibra. Además, esta técnica tiene sustanciales desventajas asociadas con la gran cantidad de energía que se introduce al sistema, lo que provoca un aumento de temperatura de la muestra y en algunos casos puede destruir el analito

El equipo de agitación magnética que se utilizó permite la selección de la velocidad de rotación de la barra magnética y dispone además de un sistema de aislamiento del plato que evita el calentamiento de las muestras durante la agitación, lo que produciría por lo contrario, un cambio en la constante de distribución y afectaría la reproducibilidad de la medida.

Pueden producirse variaciones en la velocidad rotacional de la barra magnética, lo que causaría variaciones en las condiciones de agitación durante la extracción y cambios en el tiempo de equilibrio, por lo que fue necesario disponer de barras adecuadas al diámetro y tamaño del vial. De experiencias previas y de los resultados obtenidos fue posible establecer como técnica, la de *agitación magnética*.

Optimización de las condiciones de desorción y condiciones Cromatográficas

Previamente a la optimización de las condiciones de desorción, se efectuó para cada fibra el acondicionamiento de las mismas. Al inicio de su uso, la fibra debe acondicionarse durante 60-120 minutos a 250 - 270 °C (según especificaciones técnicas), con el inyector en modo purga de válvula abierta. Se efectúan además blancos de fibra, con el fin de identificar interferencias de la misma.

Dado que la SPME no requiere solventes y la fibra se introduce directamente en el inyector, el “splits” del sistema cromatográfico se mantendrá cerrado durante la desorción, para lograr transferir todo el analito en el frente de la columna de GC y optimizar la sensibilidad (Langenfeld, et al. 1996, Montti et al., 2000; Zamboninn et al., 2002; Athanaspoulos et al., 2003).

Para estrechar las bandas de inyección en SPME, los analitos desorbidos deben removerse rápidamente del inyector, esto se logra generando una alta velocidad de flujo del gas portador alrededor del absorbente. Ya que, el flujo volumétrico está fijado a la operación óptima de la separación cromatográfica gaseosa, el modo práctico de alcanzar alto flujo lineal es reducir el diámetro del inserto del inyector, el cual debe ser tan ajustado como sea posible al diámetro externo del absorbente de la fibra.

Los insertos utilizados fueron: “split/ splitless” Liner o inserto Hewlett Packard ID 4 mm volumen 990 µl de borosilicato y con lana de vidrio silanizada y el Liner o inserto “splitless” Supelco ID 0.75 mm. Para asegurar un eficiente y reproducible calentamiento, la fibra se colocó en el centro del inserto. De esta

forma, la aguja se calienta rápidamente después de introducida en el inserto y el analito comienza a desorber desde la fibra.

Los tiempos de desorción son cortos en relación a los de absorción ya que, el coeficiente de difusión del analito en el recubrimiento se incrementa y la constante de distribución gas/absorbente disminuye rápidamente con el incremento de temperatura.

El modo más rápido de optimizar las condiciones de desorción es usar la máxima temperatura admisible por el absorbente como temperatura del inyector y luego ajustar el tiempo de desorción (Ouyang et al., 2005).

Para optimizar las condiciones de desorción se utilizaron como temperatura del inyector, la óptima recomendada para el recubrimiento de la fibra, por lo que se establecieron temperaturas de 250 a 270 °C en el inyector.

La fibra dentro de la aguja está alineada de tal forma que permite el conveniente desplazamiento de la fibra hacia adentro y fuera de la aguja sin dañar el absorbente.

Para evitar posible arrastre del "septum", con los inconvenientes que esto produciría, se usaron "septas" preperforadas.

Para la determinación del tiempo óptimo de desorción se efectuó la inmersión de la fibra en una solución acuosa de estándares triazólicos de 100 µg/l durante 10 minutos, con agitación magnética a 2000 rpm. Luego se expuso la fibra en el inyector durante 2 minutos en modo "splitless", usando el inserto de mayor diámetro interno, se evaluaron las respuestas cromatográficas repitiendo el proceso con 2 minutos adicionales

de exposición en el inyector hasta la completa desorción del analito. De igual manera se procedió para tiempos iniciales de 5 y 8 minutos respectivamente.

Para el inserto de menor diámetro interno los tiempos de exposición de la fibra en el inyector fueron de 2 minutos iniciales más 2 adicionales y de 3 minutos iniciales y 1 minuto adicional. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado para cada tipo de inserto utilizado.

La selección del tipo de inlet o inserto y el tiempo óptimo de desorción fueron efectuadas a partir de los resultados obtenidos, lo que posteriormente, permitió optimizar las demás variables metodológicas.

En función de los resultados de las respuestas cromatográficas obtenidas a partir de las soluciones acuosas de estándares triazólicos de 100 µg/l, extracción directa de 10 minutos y agitación magnética de 2000 rpm, se establecieron las siguientes **condiciones cromatográficas GC-NPD – SPME** :

Velocidad gas portador (N₂) 1.5 ml/min, flujo del gas auxiliar (N₂) 30 ml/min, flujo de H₂ 4 ml/min y flujo de aire 100-110 ml/min. Temperatura inyector 250 °C con 3 minutos de splitless. Temperatura inicial de columna 80 °C durante 3.5 minutos. Rampa de 55 °C/minuto hasta temperatura final de 280 °C durante 8.5 minutos. Temperatura del detector 300 °C. Columna Agilent HP – 5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm. Liner o inserto de 0.75 mm de diámetro interno. Tiempo de desorción del polímero en el puerto de inyección de 3 minutos.

Perfil de tiempo de extracción en soluciones acuosas de estándares

A los fines de alcanzar más rápidamente el equilibrio, la posición de la aguja en el vial deberá ser la óptima. La mayor velocidad lineal de una muestra líquida se obtiene entre el centro del vial y el final de la barra magnética, por lo que se dispondrá de un soporte especial para SPME que permite fijar tal posición.

Es necesario asegurar en el sistema una convección y temperatura constantes a fin de obtener una adecuada reproducibilidad, por lo que se acondicionó el medio a fin de minimizar la variabilidad.

Para determinar el tiempo de extracción se asume que el tiempo de equilibrio es aquel después del cual la cantidad de analito extraído permanece constante y corresponde, dentro del error experimental, a la cantidad extraída al tiempo de extracción infinito. Por lo tanto, la determinación de la cantidad extraída en el equilibrio nos permitió calcular la constante de distribución y demás parámetros de interés (Montti et al., 2000; Kooijman et al., 2004; Wang et al., 2005; Zimmermann et al., 2006).

Las experiencias se efectuaron sobre una matriz pura tal como agua grado 1, a los fines de obtener un conocimiento básico de la cinética de la transferencia de analito desde la matriz acuosa a la fibra, bajo condiciones de agitación.

El perfil del tiempo de extracción para estándares de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en soluciones acuosas de 50 y 10 µg/l, se determinó a partir de las diferentes respuestas cromatográficas obtenidas a partir de la inmersión del la fibra en viales de 50 ml, con agitación magnética

de 2000 rpm. La extracción se efectuó con el polímero de recubrimiento, en esta instancia ya seleccionado, en tiempos progresivamente más largos de: 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 480, 540, 600, y 720 minutos para cada una de ellas.

Los resultados fueron analizados estadísticamente y para cada analito se graficó la curva del perfil correspondiente en las condiciones establecidas. De los datos obtenidos de la curva masa absorbida vs. tiempo de extracción se determinaron, a partir de la curva de calibración por inyección directa, la masa y número total de moles absorbidos por el polímero de recubrimiento, la constante de distribución (K) y el volumen limitante de la muestra, mediante las ecuaciones correspondientes. De dicha curva también se determinó el tiempo en el que se considera un 95% de la masa total absorbida, a fin de calcular los coeficientes de difusión (D) de los diferentes analitos, según se detalla a continuación:

$$t_e = t_{95\%} = \frac{(b-a)^2}{2D_f} \quad (16)$$

Optimización del volumen de muestra

La sensibilidad del método SPME es proporcional al número de moles de analito, n, extraídos desde la muestra. Para un método de extracción directa está dado por:

$$n = \frac{k.V_1.V_2.C_2^0}{V_2 + k.V_1} \quad (17)$$

Cuando el volumen de muestra, V_2 , aumenta, la cantidad de analito extraído aumenta hasta que V_2 se hace mucho más grande que el producto $k.V_1$; en este punto, la sensibilidad del método no se incrementa más con posteriores incrementos del V_2 .

Por lo tanto, para establecer el volumen de muestra fue necesario determinar previamente:

Masa total absorbida-Nº total de moles del analito absorbidos n1: La fibra fue inmersa durante 12 horas en soluciones acuosas de estándares triazólicos de 50 $\mu\text{g/l}$, con agitación magnética de 2000 rpm y volumen de muestra de 50 ml. Luego se determinaron las respuestas cromatográficas correspondientes a la masa absorbida por la fibra en el equilibrio. A partir de la curva de linealidad trazada para inyección directa de soluciones estándares con inyector automático, se determinó la masa y número de moles totales del analito absorbidos en estas condiciones.

Constante de distribución polímero de recubrimiento/ agua para cada uno de los analito (k): Puesto que no se dispone de este valor, fue necesario determinarlo experimentalmente mediante la siguiente ecuación y datos bibliográficos disponibles del volumen de recubrimiento, donde n , es el número de moles del analito extraídos desde la muestra; V_1 , es el volumen del recubrimiento y V_2 es el volumen de la muestra.

$$k = \frac{n.V_2}{V_1.(C_2^0.V_2 - n)} \quad (18)$$

En la práctica el *volumen limitante* puede calcularse asumiendo el error de medida, E, y por ejemplo para un error del 5% se puede estimar:

$$V_2 = \frac{100.k.V_1}{E} \Rightarrow V_2 = 20.k.V_1 \quad (19)$$

Usando volúmenes de muestra más grandes que el valor limitante, no sólo se maximizará la sensibilidad sino que resultará una mayor precisión, ya que la variación del volumen de muestra no afecta los resultados.

Si la constante de distribución es baja y el volumen total de la muestra es alto, una buena estimación estará dada por la ecuación simplificada

$$k = \frac{n}{C_2^0.V_1} \quad (20)$$

Si se asume que la C_2^0 no cambia significativamente en la muestra después de la extracción, k se puede calcular a partir de las ecuaciones (18) y (20).

El *volumen de muestra* establecido para todas estas etapas fue de 50 ml, el cual coincidió aproximadamente con el calculado.

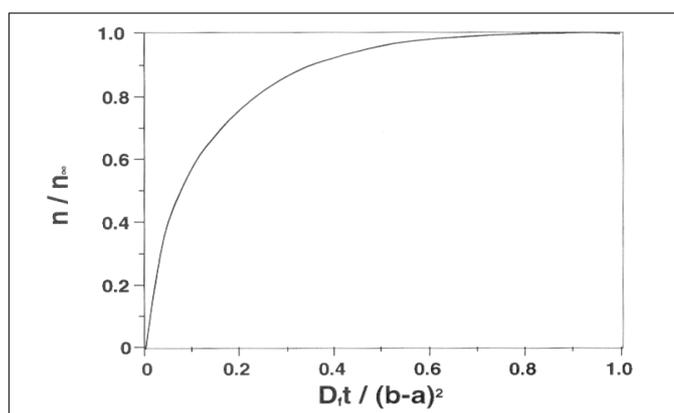
Coficiente de difusión polímero de recubrimiento/agua para cada uno de los analito (D_f):

De las curvas del perfil de extracción o concentración vs. tiempo, podemos observar que inmediatamente después de la inmersión de la fibra en la solución, hay un rápido incremento de la masa absorbida por el polímero de recubrimiento.

Luego la velocidad de incremento se hace más lenta, y eventualmente alcanza el equilibrio. La solución analítica para la extracción desde una muestra de volumen infinito y perfectamente agitada, puede ser calculada usando el método de separación de variables. Aunque la solución es analítica, los valores obtenidos son aún solamente aproximaciones, puesto que ello requiere de infinitos sumandos o adiciones. Sin embargo las series convergen, por lo que es posible obtener una buena estimación de los verdaderos valores puede ser obtenida sumando un número finito de términos, diez ó más (Choudhury et al., 1996; Pawliszyn, 1997; Sukola et al., 2001).

Un ejemplo de perfil de tiempo de extracción se presenta en la figura 10.

En esta curva, se observa que el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio es infinitamente largo. Sin embargo en la práctica, un cambio en la masa extraída puede no ser determinado si este es más pequeño que el error experimental, lo cual es aproximadamente del 5%. Por lo tanto, se asume que el tiempo de equilibrio se alcanza cuando el 95% de la cantidad de un analito en equilibrio es extraída desde la muestra.



.Figura 10. Perfil Tiempo de Extracción. Fuente: Pawlisziyn J.

$$t_e = t_{95\%} = \frac{(b-a)^2}{2D_f} \quad (21)$$

Usando esta ecuación y a partir de la gráfica, se puede estimar el coeficiente de difusión de los diferentes analitos en el absorbente (D_f), ya que el espesor del absorbente es conocido ($b - a$).

Para determinar los coeficientes de difusión de los diferentes analitos, se calcularon a partir de los datos de la curva de perfil de extracción (concentración o masa absorbida vs. tiempo)

Tiempo de análisis

Según la bibliografía, cuando se emplea un tiempo de extracción inferior al tiempo de equilibrio, se debe controlar adecuadamente el tiempo de exposición, debiéndose utilizar el tiempo de extracción más largo posible.

Cuando los tiempos de equilibrio son demasiado largos para una aplicación dada, se pueden elegir tiempos de extracción más cortos para la cuantificación, aún cuando no se alcancen las condiciones de equilibrio. Sin embargo, es necesario asegurarse en el sistema una convección y temperatura constantes, para obtener datos reproducibles.

Teniendo en cuenta las consideraciones teóricas de esta metodología y las experiencias previas, se estableció un *tiempo de análisis de 15 minutos* de inmersión de la fibra en las condiciones mencionadas. Dado que a tiempos cortos la velocidad de transferencia de los analitos al polímero desde la solución acuosa es alta, se reitera que debe controlarse perfectamente este tiempo, a fin de minimizar la variabilidad de la masa absorbida. Otros autores proponen diferentes tiempos de inmersión en función de la naturaleza del polímero de recubrimiento, matriz, etc. (Kataoka et al., 2000; Pan y Ho, 2004; Sanusi et al., 2004). Aunque nunca superan los 30 a 40 minutos como máximos.

Análisis estadístico

Regresión Lineal - Soluciones acuosas de Estándares Triazólicos-SPME

La SPME tiene típicamente un amplio intervalo lineal, ya que incluye recubrimientos de polímeros líquidos, tales como los usados como fase estacionaria en GC. En la mayoría de las aplicaciones prácticas desarrolladas, la respuesta lineal dinámica del detector, limita la respuesta lineal de los métodos SPME.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción y a fin de establecer el rango lineal del método, se efectuaron y analizaron estadísticamente las observaciones obtenidas de las respuestas cromatográficas. Dichas respuestas, fueron expresadas en áreas y alturas de pico para cada analito y cada concentración correspondiente a: 10 muestras de soluciones acuosas mezcla de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole de 50 ml, a diferentes concentraciones: 50- 25- 10- 5- 2,5 y 1,0 µg/l.

Análisis Unidimensional

Se analizaron estadísticamente los resultados de cada una de las soluciones y para cada analito, observándose las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad, medidas de forma y normalidad de las observaciones.

Regresión lineal

A partir de los resultados obtenidos del análisis unidimensional se graficó la curva de regresión lineal, intervalos de confianza, el histograma y la curva de trazas de densidad de residuos, para soluciones acuosas mezcla de estándares de triazoles.

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

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

Se estableció la ecuación de la recta y el estadístico R^2 que indica la relación entre las variables (respuestas cromatográficas vs. concentración).

Precisión - Soluciones acuosas de Estándares Triazólicos-SPME

Se adoptaron los mismos criterios, ya explicitados para el método de inyección directa, para la determinación de precisión del método SPME. Los datos analizados corresponden a soluciones acuosas mezcla de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole de 50 ml, a 50- 25- 10- 5- 2,5 y 1,0 $\mu\text{g/l}$ en las condiciones de extracción establecidas, para $n = 10$ y $\alpha = 0.05$

El método se consideró preciso cuando el coeficiente de variación porcentual no supera el 1,5 – 2 % (AOAC, 1990).

Los factores más importantes que controlan la precisión en métodos que involucran SPME son entre otros, la condición de la fibra, ya que puede haber pérdidas del polímero de recubrimiento y consecuentemente disminuye la masa de analito absorbida. El espesor del absorbente y su longitud deben monitorearse para evitar errores de consideración.

Límites de detección y cuantificación- Soluciones acuosas de Estándares- SPME

Los límites se estimaron a partir de la curva de regresión, para bajas concentraciones de los analitos, 5- 2,5- y 1,0 $\mu\text{g/l}$, $n= 30$ determinaciones individuales y $\alpha= 0,05$.

Los límites detección y cuantificación se calcularon aplicando las ecuaciones correspondientes en las que se

considera 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco respectivamente.

Exactitud - Soluciones acuosas de Estándares Triazólicos - SPME

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Matemáticamente, suele expresarse de los siguientes modos:

$$\text{Desviación: } B = \bar{X} - X^* \quad (22)$$

$$\text{Desviación Relativa: } B\% = \frac{B}{\bar{X}} 100 \quad (23)$$

$$\text{Recuperación: } R = \frac{\bar{X}}{X^*} 100 \quad (24)$$

Donde \bar{X} es el valor medio y X^* es el valor verdadero.

De todas ellas, la más utilizada es la recuperación. Si bien el valor verdadero de concentración no se conoce sino que sólo puede estimarse, es posible preparar una muestra por un procedimiento más exacto que el evaluado y utilizarla como referencia.

La exactitud de un método analítico habla de la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia. De esta forma, es posible independizarse del término "valor verdadero" usado en estadística. La exactitud o bien la

"inexactitud" debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia. Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe aproximarse al 100 %.

En el análisis de trazas, no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas y se consideran habituales valores de recuperación entre el 60 y 80 %. Como diseño habitual para la determinación de exactitud, se emplearon 4 concentraciones de los analitos, preparadas por quintuplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema.

Para determinar la recuperación del método SPME, para soluciones acuosas de estándares de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole a 50- 25- 5 y 1 µg/l, en las mismas condiciones de extracción en las que se efectuó la calibración, se analizaron los resultados obtenidos de las observaciones correspondientes, según lo explicitado anteriormente.

En este caso, el valor de t se calculó para $n= 20$ y $\alpha = 0,05$, según la siguiente ecuación, donde R es la recuperación porcentual:

$$t_{ob} = \frac{[100 - R]}{RSD\sqrt{n}} \quad (25)$$

Los valores de t_{ob} se compararon con los tabulados para el intervalo de confianza requerido con $(n - 1)$ grados de libertad ($t_{tabla} = 2,093$) y la exactitud o inexactitud se determinó para el promedio de recuperaciones de todas las concentraciones. Si $t_{ob} < t_{tabla}$, no existe diferencia significativa con el 100 % de recuperación y la exactitud es apropiada.

Resultados y Conclusiones

A partir del análisis de las respuestas cromatográficas para las soluciones acuosas de estándares de Triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole de 100 µg/l a diferentes pH y grado de salinización, se establecieron las siguientes condiciones de extracción: medio acuoso neutro, sin adición de sales, CWX/DVB como el polímero más adecuado, tiempo de análisis o inmersión de 15 minutos del polímero y agitación magnética de 2000 rpm.

Optimizado el proceso extractivo y las condiciones cromatográficas, se determinaron los tiempos de retención para cada analito, individualmente y en la mezcla.

Los resultados cromatográficos de soluciones acuosas de estándares triazólicos a 50 y 10 µg/l permitieron determinar: *el perfil de concentración vs. tiempo, la masa y número total de moles absorbidos, las constantes de distribución, el volumen mínimo de muestra y los coeficientes de difusión.*

Las curvas de linealidad respectivas y la precisión fueron determinadas a partir de los resultados obtenidos de 10 muestras de soluciones acuosas mezcla de triazoles a diferentes concentraciones: 50- 25- 10- 5- 2,5 y 1,0 µg/l.

Los límites de detección y cuantificación fueron establecidos a partir de soluciones acuosas mezcla de estándares a 5- 2,5 y 1,0 µg/l.

Los resultados correspondientes a cada etapa de optimización de esta metodología se detallan a continuación.

Selección del polímero de recubrimiento

Cada fibra al inicio de su uso fue acondicionada, según las especificaciones técnicas, con el inyector en modo purga de válvula abierta. Se efectuaron blancos de fibra, con el fin de identificar interferencias de la misma. En la tabla 7 se presentan para cada polímero de recubrimiento evaluado, los valores medios de las respuestas cromatográficas a cada analito y los parámetros correspondientes al análisis unidimensional respectivo.

Se estableció la aleatoriedad e independencia de las muestras, normalidad de las observaciones y homogeneidad de las varianzas. El contraste múltiple de rango, test de Tukey, indicó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las fibras, siendo el CWX/DVB el que logra mayor respuesta para todos los analitos.

Las recomendaciones técnicas para dicha fibra son: rango de pH 2-9, temperatura máxima 260°C e intervalo óptimo de 200-250°C. Su acondicionamiento fue de 60 minutos a 220 °C.

La fibra se introdujo directamente en el inyector, el “splits” del sistema cromatográfico se mantuvo cerrado durante la desorción, para lograr transferir todo el analito en el frente de la columna de GC y optimizar la sensibilidad (Langenfeld, et al. 1996).

Tabla 7. Comparación de polímeros (n= 10 y $\alpha =0,05$)

| Triadimefon | CWX/DVB | PDMS | PA |
|---------------------------|----------------|-------------|-----------|
| Media | 188653 | 110045 | 73994 |
| Desviación típica | 659 | 518 | 597 |
| Coefficiente de variación | 0,35% | 0,47% | 0,81% |
| Intervalo confianza | ± 471 | ± 371 | ± 427 |
| Penconazole | CWX/DVB | PDMS | PA |
| Media | 300295 | 236136 | 116723 |
| Desviación típica | 264 | 448 | 252 |
| Coefficiente de variación | 0,09% | 0,19% | 0,22% |
| Intervalo confianza ± | ± 189 | ± 321 | ± 180 |
| Propiconazole I | CWX/DVB | PDMS | PA |
| Media | 40713 | 33593 | 17213 |
| Desviación típica | 79 | 74 | 204 |
| Coefficiente de variación | 0,20% | 0,22% | 1,19% |
| Intervalo confianza ± | ± 57 | ± 53 | ± 146 |
| Propiconazole II | CWX/DVB | PDMS | PA |
| Media | 59609 | 48178 | 24132 |
| Desviación típica | 312 | 116 | 102 |
| Coefficiente de variación | 0,52% | 0,24 | 0,42% |
| Intervalo confianza ± | 223 | 83 | 73 |
| Tebuconazole | CWX/DVB | PDMS | PA |
| Media | 49804 | 21871 | 7489 |
| Desviación típica | 104 | 114 | 75 |
| Coefficiente de variación | 0,21% | 0,52 | 1,00 |
| Intervalo confianza | ± 74 | ± 82 | ± 54 |

Perfil de tiempo de extracción en soluciones acuosas de estándares

El perfil del tiempo de extracción para estándares de triadimefon, penconazole, propiconazole I, propiconazole II y tebuconazole en soluciones acuosas de 50 y 10 $\mu\text{g/l}$, se determinó a partir de las diferentes respuestas cromatográficas obtenidas del set de viales de 50 ml. La extracción se efectuó con el polímero de recubrimiento CWX/DVB, en tiempos progresivamente más largos

de: 5,10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 480, 540, 600, y 720 minutos para cada una de ellas.

Los resultados fueron analizados estadísticamente para cada analito y corresponden a los valores medios de las respuestas cromatográficas vs. masa absorbida, desviación estándar, error estándar, mínimos y máximos, coeficientes de variación relativa, intervalos de confianza, y se incluyen además, las medidas de tendencia central, de variabilidad y de forma.

Las observaciones, para todos los analitos y tiempos de extracción, proceden de una distribución normal, ya que los valores de los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados están dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

Los figuras 11, 12, 13, 14 y 15 representan el perfil de extracción para cada analito a 10 - 50 µg/l (ppb).

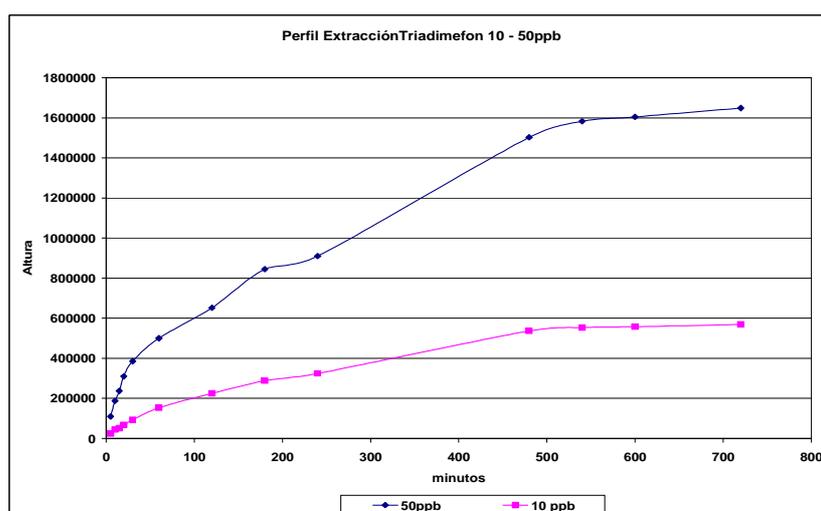


Figura 11. Perfil de extracción Triadimefon a 10 y 50 µg/l - SPME-CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)

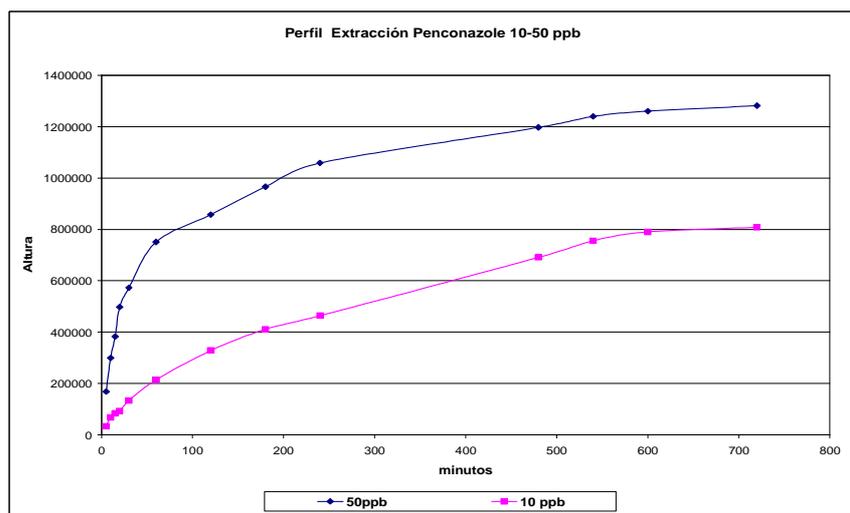


Figura 12. Perfil de extracción Penconazole a 10 y 50 $\mu\text{g/l}$ - SPME-CWX/DVB ($n=5$ y $\alpha=0,05$)

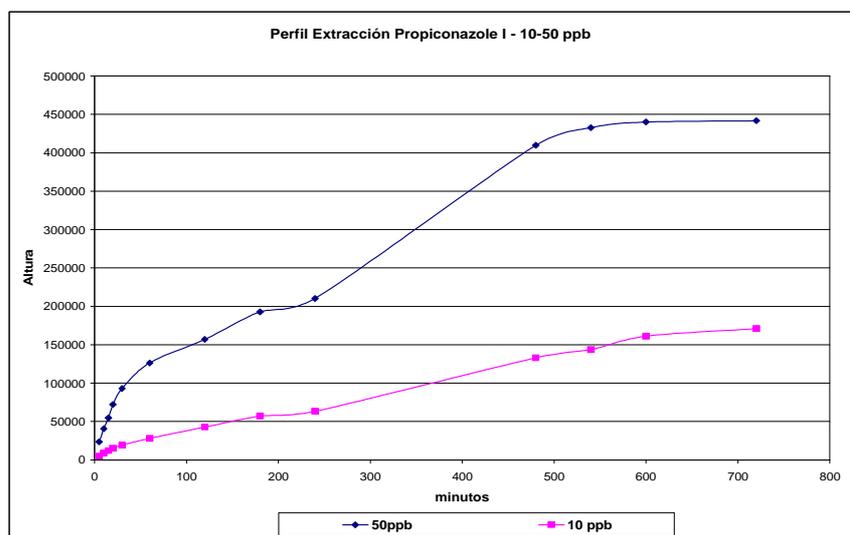


Figura 13. Perfil de extracción Propiconazole I a 10 y 50 $\mu\text{g/l}$ - SPME-CWX/DVB ($n=5$ y $\alpha=0,05$)

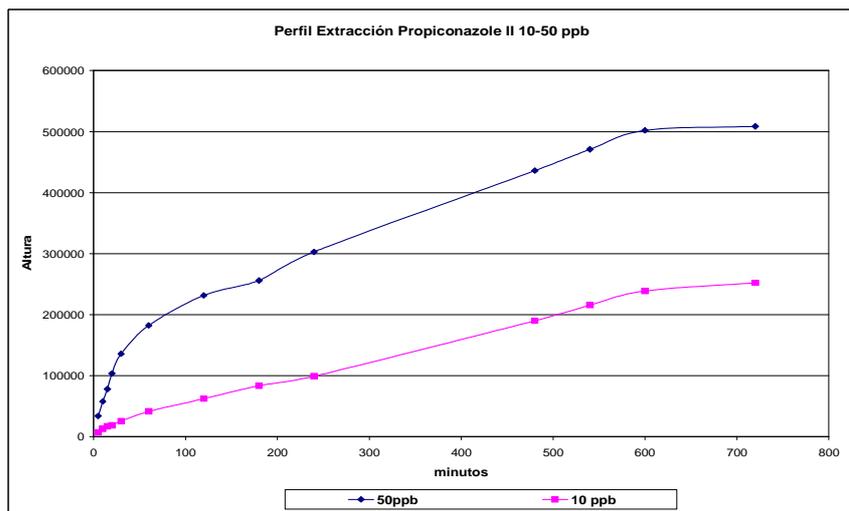


Figura 14. Perfil de extracción Propiconazole II - a 10 y 50 µg/l -SPME-CWX/DVB (n=5 y α=0,05)

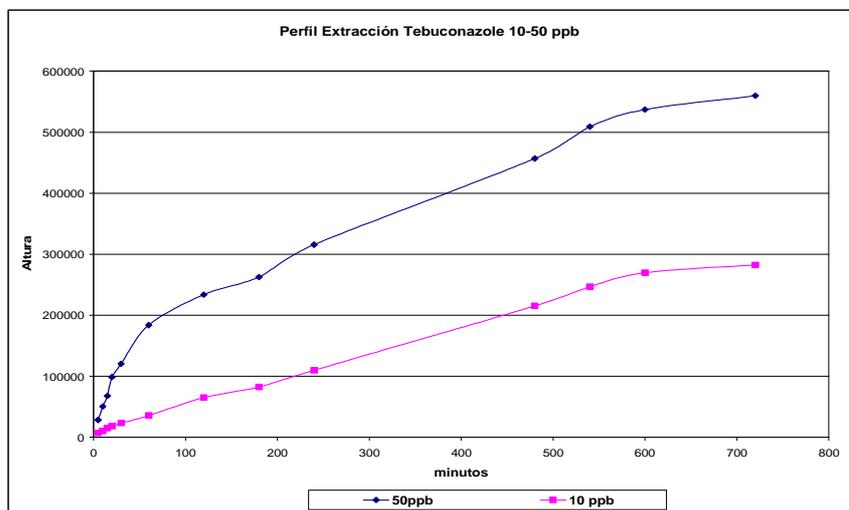


Figura 15. Perfil de extracción Tebuconazole a 10 y 50 µg/l -SPME-CWX/DVB (n=5 y α=0,05)

En la figuras 16 y 17 se representan las curvas de perfil de extracción comparativas de las soluciones estándares mezcla de triazoles a 50 y 10 µg/l (ppb).

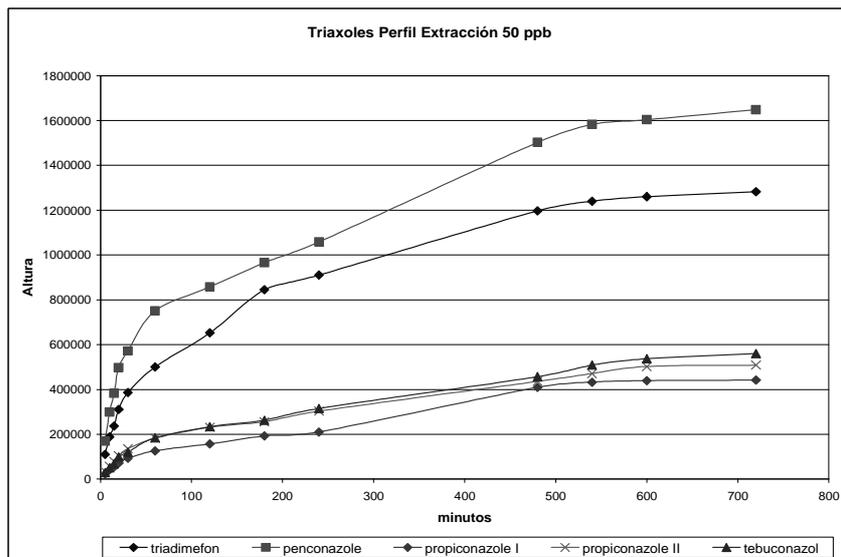


Figura 16. Perfil Extracción Triazoles a 50 µg/l -SPME-CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)

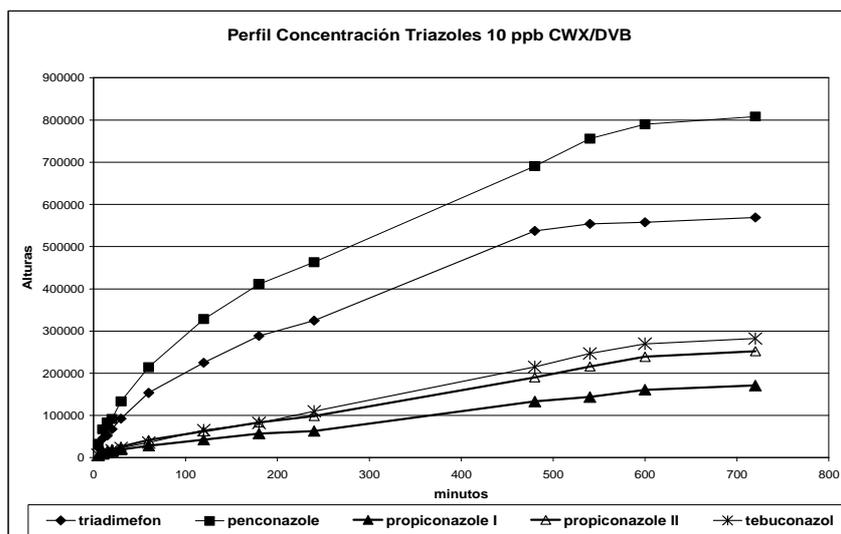


Figura 17. Perfil Extracción Triazoles 10 µg/l - SPME-CWX/DVB (n=5 y $\alpha=0,05$)

En dichos gráficos podemos observar el proceso extractivo de los analitos a dos concentraciones diferentes, la masa absorbida a diferentes tiempos de inmersión de la fibra CWX/DVB en las condiciones establecidas fue determinada a partir de las respuestas cromatográficas expresadas en alturas y áreas de pico y de la curva de calibración del sistema obtenida por inyección directa de estándares.

Se puede considerar que, a los 720 minutos se ha alcanzado el equilibrio del proceso. A partir de la curva de calibración por inyección directa se determinaron, mediante las ecuaciones correspondientes, la masa y número total de moles absorbidos por el polímero de recubrimiento, la constante de distribución (K) y el volumen limitante de la muestra.

Se establecieron para cada analito, los tiempos de extracción en los que se considera un 95% de la masa total absorbida, a fin de calcular los coeficientes de difusión (D_f) de los mismos, aplicando la siguiente ecuación:

$$t_e = t_{95\%} = \frac{(b-a)^2}{2D_f} \quad (26)$$

Teniendo en cuenta las especificaciones del CWX/DVB y los pesos moleculares de los analitos (tabla 8) se efectuaron los siguientes cálculos:

$$\text{Espesor del polímero} = (b-a) = 65\mu m = 0,0065cm$$

$$\text{Longitud del polímero de recubriendo en la fibra} = L = 1cm$$

$$\text{Volumen del recubrimiento} = V_f = \pi(b-a)^2 L = 0.13\mu l$$

Tabla 8. Pesos Moleculares

| | |
|--------------------------------|----------------------------|
| PM _{Triadimefon} | 2,938 *10 ¹¹ ng |
| PM _{Penconazole} | 2,842 *10 ¹¹ ng |
| PM _{Propiconazole I} | 3,282 *10 ¹¹ ng |
| PM _{Propiconazole II} | 3,282 *10 ¹¹ ng |
| PM _{Tebuconazole} | 3,781 *10 ¹¹ ng |

En la tabla 9 se presentan los resultados comparativos medios para SPME e inyección directa, correspondientes a soluciones acuosas de estándares a 10 µg/l y de soluciones en etilacetato a 5 mg/l. Éstos muestran la ventaja de esta metodología, para una concentración de 10 µg/l la masa absorbida e inyectada con el polímero es casi el doble a la correspondiente a una inyección de 2 µl de 5 mg/l, permitiendo alcanzar niveles de detección muchísimo más bajos.

Tabla 9. Valores medios comparativos CWX/DVB vs. Inyección Directa

| Analitos 10 µg/l | CWX/DVB 720 minutos Altura Media | Inyección 2 µl 5 mg/l Altura Media | Masa inyectada ng | Masa absorbida ng |
|---------------------|--|--|-------------------------|-------------------------|
| Triadimefon | 568958 | 289647 | 10 | 19,77 |
| Penconazole | 808197 | 334881 | 10 | 23,86 |
| Propiconazole I | 170932 | 77074 | 10 | 22,01 |
| Propiconazole II | 252149 | 106803 | 10 | 23,2 |
| Tebuconazole | 282431 | 136078 | 10 | 20,52 |

Se determinó la constante de distribución polímero de recubrimiento/agua (**k**) para cada uno de los analito; donde *n*, es el número de moles del analito extraídos desde la muestra; V₁, es

el volumen del recubrimiento, V_2 es el volumen de la muestra (50 ml). A partir de las ecuaciones (27) y (28):

$$n = \frac{k.V_1.V_2.C_2^0}{V_2 + k.V_1} \quad (27)$$

$$k = \frac{n.V_2}{V_1.(C_2^0.V_2 - n)} \quad (28)$$

En la tabla 10 se presentan los valores medios correspondientes a la masa total absorbida, números de moles y las constantes de distribución calculadas para los analitos evaluados.

Tabla 10. Constantes de distribución: **K** CWX/DVB/agua

| Analitos 10 µg/l | Masa absorbida ng | Nº total Moles absorbidos | C₂ ng/µl | K |
|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Triadimefon | 19,77 | 6,73E-11 | 3,40E-11 | 1,55E+04 |
| Penconazole | 23,86 | 8,40E-11 | 3,52E-11 | 1,89E+04 |
| Propiconazole I | 22,01 | 6,47E-11 | 2,94E-11 | 1,74E+04 |
| Propiconazole II | 23,2 | 6,82E-11 | 2,94E-11 | 1,83E+04 |
| Tebuconazole | 20,52 | 6,67E-11 | 3,25E-11 | 1,61E+04 |

En la práctica el *volumen limitante* puede calcularse asumiendo el error de medida (E), y por ejemplo para un error del 5% se puede estimar:

$$V_2 = \frac{100.k.V_1}{E} \Rightarrow V_2 = 20.k.V_1 \quad (29)$$

Coeficiente de difusión polímero de recubrimiento/agua para cada uno de los analitos (D_f)

De las curvas del perfil de extracción (concentración vs. tiempo), podemos observar que inmediatamente después de la inmersión de la fibra en la solución, hay un rápido incremento de la masa absorbida por el polímero de recubrimiento. Luego la velocidad de incremento se hace más lenta, y eventualmente alcanza el equilibrio.

A partir de los datos de dichas curvas se establecieron los tiempos en los que se considera un 95 %, por lo menos, de masa absorbida ($T_{95\%}$), a fin de determinar los coeficientes de difusión para cada analito.

En la tabla 11 podemos observar que los valores son diferentes, tal como era de prever de las curvas de perfil de extracción. Siendo los isómeros del propiconazole (I y II) los que más tarde alcanzan el equilibrio y el triadimefon es el más rápido. En cambio los volúmenes mínimos de muestra calculados, son todos muy semejantes. Respecto a los coeficientes de difusión, podemos observar similitud, aunque para Triadimefon, el valor del mismo es ligeramente mayor.

Usando volúmenes de muestra más grandes que el valor limitante, no sólo se maximizará la sensibilidad sino que resultará una mayor precisión, ya que la variación del volumen de muestra no afecta los resultados. El *volumen de muestra* establecido para todas estas etapas fue de *50 ml*, el cual coincidió aproximadamente con el calculado.

Tabla 11. Volumen mínimo y coeficientes de Difusión: CWX/DVB/ agua

| Analitos 10 µg/l | V. mínimo V₂: ml | T_{95%} minutos | D₁ (mm²/min.) | D₁ (cm²/seg.) |
|-----------------------------|--|------------------------------------|--|--|
| Triadimefon | 41 | 570 | 3,71 | 6,18E-10 |
| Penconazole | 50 | 600 | 3,52 | 5,87E-10 |
| Propiconazole I | 46 | 680 | 3,11 | 5,18E-10 |
| Propiconazole II | 49 | 670 | 3,15 | 5,25E-10 |
| Tebuconazole | 43 | 630 | 3,35 | 5,59E-10 |

Tiempo de análisis

Según la bibliografía cuando se emplea un tiempo de extracción inferior al tiempo de equilibrio, se debe controlar adecuadamente el tiempo de exposición, ya que a tiempos cortos, la velocidad de transferencia de los analitos al polímero desde la solución acuosa es alta y por lo tanto, lo será la variabilidad de la masa absorbida

Teniendo en cuenta las consideraciones teóricas de esta metodología y las experiencias previas, se estableció un *tiempo de análisis de 15 minutos* de inmersión de la fibra en las condiciones mencionadas.

Análisis Unidimensional y Regresión Lineal Soluciones acuosas de Triazoles- CWX/DVB – GC/NPD

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción y a fin de establecer el rango lineal del método, se

efectuaron y analizaron estadísticamente las observaciones obtenidas de las respuestas cromatográficas. Dichas respuestas, fueron expresadas en áreas y alturas de pico para cada analito y cada concentración correspondiente a: de 10 muestras de soluciones acuosas mezcla de triazoles de 50 ml a diferentes concentraciones: 50- 25- 10- 5- 2,5 y 1,0 $\mu\text{g/l}$, para $n=10$ y $\alpha=0,05$.

Análisis Unidimensional

Se analizaron estadísticamente los resultados de cada una de las soluciones y para cada analito, observándose las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma y para todas las observaciones el valor de los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados están dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal. Los resultados se presentan en la tabla 12.

Para concentraciones bajas algunos analitos presentan coeficientes de variación relativo (RSD) ligeramente superiores al 2%, sin embargo, son valores aceptables para esos rangos de concentración. La variabilidad puede deberse a los cambios de fibras efectuados durante todo el proceso extractivo, lo que introduce pequeñas diferencias en la capacidad extractiva del polímero, o ligeras modificaciones en las respuestas cromatográficas, variaciones pequeñas en los tiempos de inmersión y/o extracción, etc.

Tabla 12. Análisis Unidimensional - Triazoles en solución acuosa SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$)

| Triadimefon | 50 µg/l | 25 µg/l | 10 µg/l | 5 µg/l | 2,5 µg/l | 1,0 µg/l |
|------------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Media | 252300 | 126864 | 51486 | 26498 | 13890 | 6455 |
| Desviación típica | 104 | 228 | 103 | 123 | 118 | 213 |
| Coeficiente de variación | 0,04% | 0,18% | 0,20% | 0,47% | 0,85% | 3,31% |
| Intervalo confianza \pm | 74 | 163 | 74 | 163 | 74 | 88 |
| Penconazole | | | | | | |
| Media | 381221 | 190397 | 76178 | 37924 | 19042 | 7492 |
| Desviación típica | 110 | 138 | 109 | 101 | 144 | 87 |
| Coeficiente de variación | 0,03% | 0,07% | 0,14% | 0,27% | 0,75% | 1,16% |
| Intervalo confianza \pm | 79 | 99 | 78 | 72 | 103 | 62 |
| Propiconazole I | | | | | | |
| Media | 54693 | 28190 | 11696 | 6245 | 3194 | 1997 |
| Desviación típica | 38 | 11 | 93 | 59 | 54 | 60 |
| Coeficiente de variación | 0,07% | 0,04% | 0,80% | 0,95% | 1,70% | 2,99% |
| Intervalo confianza \pm | 27 | 8 | 67 | 42 | 39 | 43 |
| Propiconazole II | | | | | | |
| Media | 76191 | 38302 | 15986 | 8271 | 4486 | 2232 |
| Desviación típica | 107 | 78 | 30 | 85 | 73 | 54 |
| Coeficiente de variación | 0,14% | 0,20% | 0,19% | 1,03% | 1,62% | 2,40% |
| Intervalo confianza \pm | 76 | 56 | 21 | 61 | 52 | 38 |
| Tebuconazole | | | | | | |
| Media | 67116 | 33627 | 13618 | 6941 | 3687 | 1524 |
| Desviación típica | 89 | 105 | 99 | 157 | 36 | 54 |
| Coeficiente de variación | 0,13% | 0,31% | 0,73% | 2,27% | 0,98% | 3,52% |
| Intervalo de confianza \pm | 64 | 75 | 71 | 113 | 26 | 38 |

Regresión lineal

A partir de los resultados obtenidos del análisis

unidimensional se graficó la curva de regresión lineal, intervalos de confianza, el histograma y la curva de trazas de densidad de residuos, para soluciones acuosas mezcla de estándares de triazoles. Los parámetros estadísticos permitieron establecer la idoneidad del modelo ajustado. Se determinó la independencia de los residuos a partir del estadístico de Durbin Watson (P-valor). Mediante el test de Kolmogorov (P-valor) se determinó si los residuos proceden de una distribución normal, para un nivel de confianza de al menos un 90 %. Se estableció la ecuación de la recta y el estadístico R^2 que indica la relación entre las variables (respuestas cromatográficas vs. concentración).

El tratamiento de los resultados y gráficos completos efectuados sólo se detallan para Triadimefon, dado que similar procedimiento se efectuó para los demás analitos se presentarán únicamente para cada uno de ellos el gráfico de regresión lineal, la ecuación de la recta, el estadístico R-cuadrado y el coeficiente de correlación, ya que los demás parámetros estadísticos permitieron establecer la idoneidad del modelo ajustado, la independencia y la distribución normal de los residuos para un nivel de confianza de al menos un 90 %.

La ecuación de la recta del modelo ajustado para las soluciones acuosas de estándares, triadimefon corresponde a:

$$\text{Triadimefon Altura} = 1362 + 5018^* \mu\text{g/l} \quad (30)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre triadimefon Altura y ppb ($\mu\text{g/l}$) para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R^2 indica que el modelo explica un 99,997% de la variabilidad en triadimefon Altura. El coeficiente de correlación es igual a 0,998, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El p-valor del estadístico Durbin-Watson (DW) es superior a 0,05, por lo que no existe autocorrelación serial en los residuos.

Las curvas de regresión lineal para los diferentes analitos se representan en las siguientes figuras 18, 19, 20, 21 y 22.

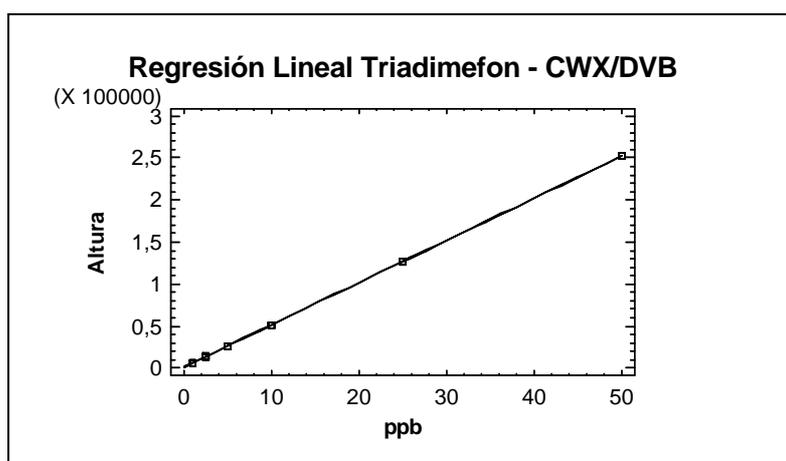


Figura 18. Regresión Lineal -Triadimefon solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$)

El p-valor = 0,996 del test de Kolmogorov-Smirnov indica una distribución normal con un nivel de confianza de al menos un 90%.

La ecuación de la recta del modelo ajustado para las soluciones acuosas de estándares, penconazole corresponde a:

$$\text{Penconazole Altura} = -128 + 7626 * \mu\text{g/l} \quad (31)$$

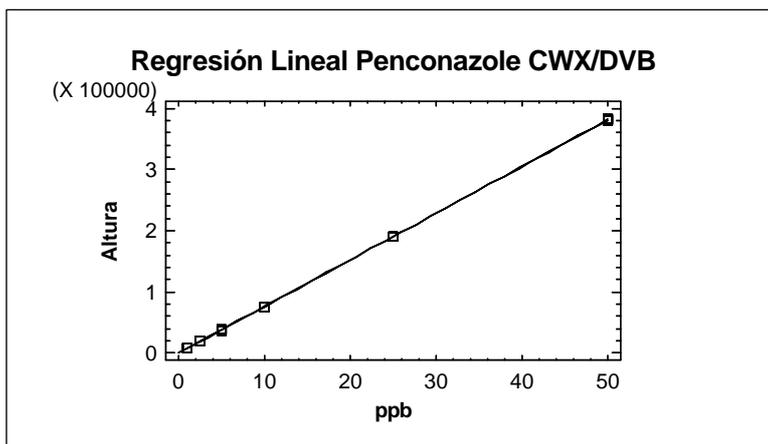


Figura 19. Regresión Lineal - Penconazole en solución acuosa - CWX/DVB (n=10 y $\alpha=0,05$)

El estadístico R^2 es de 99,99% y el coeficiente de correlación es igual a 0,9998, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

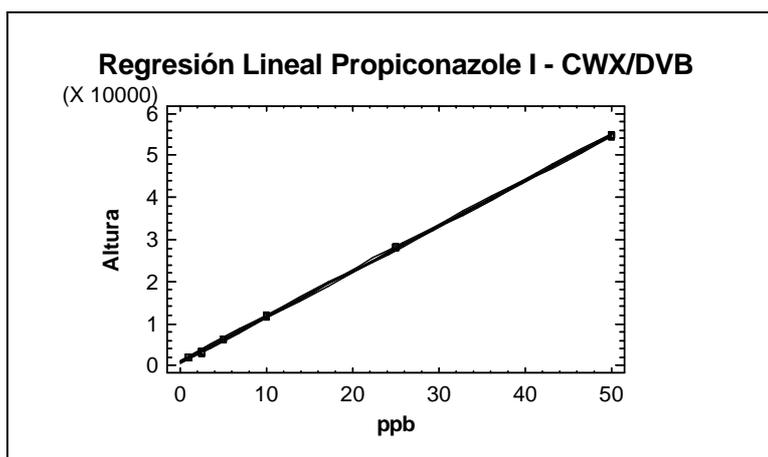


Figura 20. Regresión Lineal - Propiconazole I en solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$)

La ecuación y la recta del modelo ajustado para propiconazole I pueden observarse a continuación. El estadístico R^2 99,986% y el coeficiente de correlación igual a 0,993, indica una relación relativamente fuerte entre las variables.

$$\text{Propiconazole I Altura} = 828 + 1081 * \mu\text{g/l} \quad (32)$$

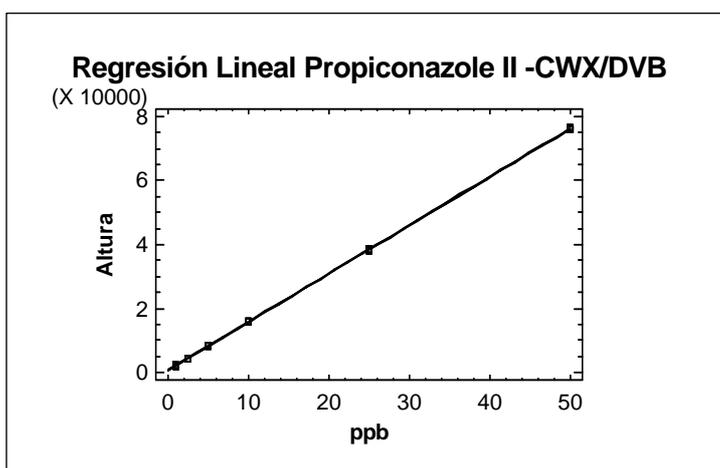


Figura 21. Regresión Lineal Propiconazole II en solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$)

La ecuación correspondiente a la recta del modelo ajustado para propiconazole II es la siguiente:

$$\text{Propiconazole II Altura} = 744 + 1508 * \mu\text{g/l} \quad (33)$$

El estadístico R^2 es de 99,998% y el coeficiente de correlación es igual a 0,9998.

La ecuación de la recta y el gráfico de regresión lineal para tebuconazole se describen a continuación. El estadístico R^2 es de 99,9975% y el coeficiente de correlación es igual a 0,99998.

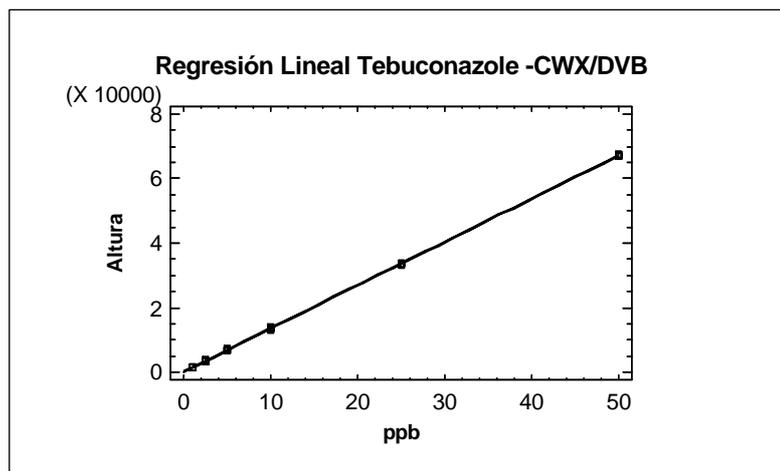


Figura 22. Regresión Lineal -Tebuconazole en solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$)

$$\text{Tebuconazole Altura} = 253 + 1337^* \mu\text{g/l} \quad (34)$$

La figura 23 representa las rectas de regresión de los diferentes analitos, correspondientes a las soluciones acuosas de mezcla de estándares a las concentraciones establecidas.

Precisión - Soluciones acuosas de Estándares Triazólicos-SPME

La precisión del método fue determinada para todas las concentraciones y teniendo en cuenta los mismos criterios que ya se han explicitado en el Método de inyección directa.

Los parámetros estadísticos requeridos fueron determinados, según consta en los análisis de las observaciones efectuadas para cada analito a las concentraciones predichas y en las condiciones establecidas.

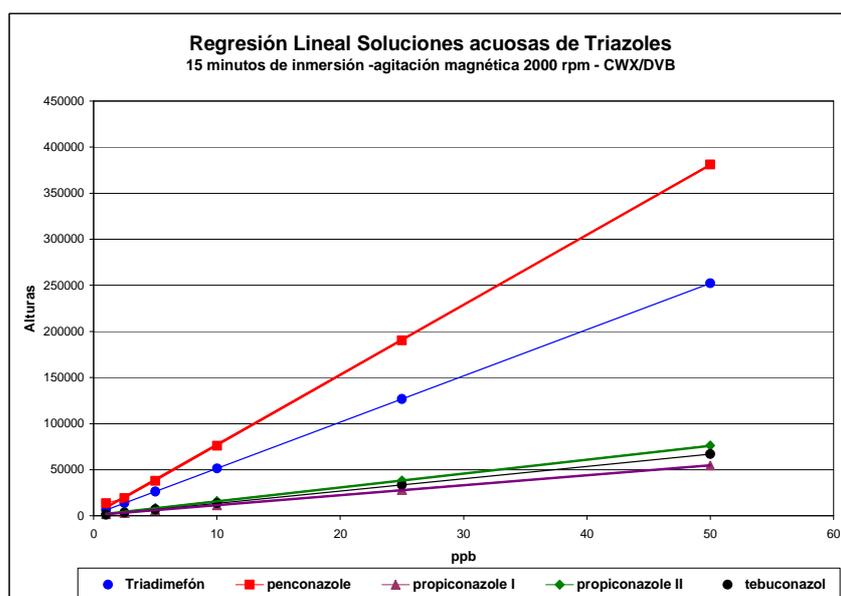


Figura 23. Regresión Lineal -Triazoles en solución acuosa - SPME-CWX/DVB-GC-NPD (n=10 y $\alpha=0,05$)

El método se consideró preciso cuando el coeficiente de variación porcentual no supera el 1,5 – 2 % (AOAC, 1990).

Los factores más importantes que controlan la precisión en métodos que involucran SPME, han sido discutidos en secciones precedentes. Aún así es importante tener en cuenta las siguientes consideraciones, tal como la condición y cambios de la fibra que se efectuaron durante el proceso.

Para algunos analitos, a bajas concentraciones, tal como 1,0 $\mu\text{g/l}$ los coeficientes de variación son algo mayores respecto al valor de referencia, pudiéndose deber esta variabilidad a los factores antes mencionados, entre otros.

Límites de Detección y Cuantificación - Soluciones acuosas de Estándares- CWX/DVB

En la tabla 13 se detallan los resultados correspondientes, estimados a partir de la curva de regresión para bajas concentraciones de los analitos: 5- 2,5- y 1,0 µg/l, n= 30 determinaciones individuales y $\alpha= 0,05$, según los criterios ya explicitados.

Tabla 13. Límites de Detección y Cuantificación Triazoles en solución acuosa -CWX/DVB (n=30 y $\alpha= 0,05$)

| Analitos | Límite Detección µg/l | Límite Cuantificación µg/l |
|-------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Triadimefon | 0,08 | 0,14 |
| Penconazole | 0,01 | 0,04 |
| Propiconazole I | 0,09 | 0,15 |
| Propiconazole II | 0,12 | 0,20 |
| Tebuconazole | 0,10 | 0,26 |

Exactitud - Soluciones acuosas de Estándares Triazólicos - SPME

Como diseño habitual para la determinación de exactitud, se emplearon 4 concentraciones de los analitos, preparadas por quintuplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema.

Para determinar la recuperación del método SPME, para soluciones acuosas de estándares de triazoles a 50- 25- 5 y 1 µg/l, en las mismas condiciones de extracción en las que se

efectuó la calibración, se analizaron los resultados obtenidos de las observaciones correspondientes, según lo explicitado anteriormente. En este caso, el valor de t se calculó para $n= 20$ y $\alpha = 0,05$ y los valores de t_{ob} se compararon con los tabulados para el intervalo de confianza requerido con $(n - 1)$ grados de libertad ($t_{tabla}= 2,093$).

La exactitud se determinó para el promedio de recuperaciones de todas las concentraciones. En la tabla 14 se observan los resultados correspondientes:

Tabla 14. Recuperación Soluciones acuosas Estándares Triazoles

| Analitos | Recuperación Media % | Desviación Estándar | RSD% | t calculado |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------|--------------------|
| Triadimefon | 98,34 | 1,03 | 1,05 | 0,36 |
| Penconazole | 99,25 | 0,79 | 0,80 | 0,21 |
| Propiconazole I | 97,80 | 1,65 | 1,69 | 0,29 |
| Propiconazole II | 98,15 | 1,50 | 1,53 | 0,27 |
| Tebuconazole | 99,20 | 0,86 | 0,87 | 0,21 |

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

En función de los resultados y de los parámetros estadísticos, podemos concluir que dicha metodología es adecuada, precisa, de elevada sensibilidad y exactitud. Por lo que, se considera factible de ser aplicada a la determinación de triazoles en muestras de agua reales, previo acondicionamiento de las muestras.

III- Determinación de Triazoles en Arándanos por SPME - GC-NPD

Introducción

Considerando el tratamiento intenso a base de fungicidas que se aplican en el cultivo de arándanos para control de enfermedades típicas ocasionadas por hongos, tales como los ya mencionados, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido el desarrollo de una metodología de análisis multiresidual para la determinación de estos fungicidas en este tipo de frutas de alto consumo y de gran potencial para su exportación.

Existen diversos métodos de análisis propuestos y en su mayoría incluyen en la etapa extractiva disolventes orgánicos, seguida de la purificación del extracto antes de su determinación cromatográfica. La extracción con solventes orgánicos es una de las técnicas de tratamiento de muestra más ampliamente utilizada y una de las variables más importante a tener en cuenta es la selección adecuada de dicho extractante, en las que se ha de considerar las propiedades fisicoquímicas del analito, su interacción con la matriz y las del propio solvente, tales como su polaridad, volatilidad y compatibilidad con la solubilidad del analito en el mismo.

Los extractos obtenidos son usualmente sometidos a diferentes procedimientos de purificación, dependiendo de la matriz y de los analitos, así como del método cromatográfico que se utilice. La extracción en fase sólida (SPE) ha sido una técnica

ampliamente utilizada para la purificación o limpieza (clean-up) y concentración de analitos en el sólido seleccionado. Existen numerosos trabajos en los que se utilizan diferentes adsorbentes para lograr retener en la fase sólida los analitos y/o las impurezas presentes en los extractos orgánicos de diversas matrices vegetales. La aplicación de esta metodología involucra numerosas etapas a optimizar, siendo la elección del adsorbente una de las más relevantes, la cual dependerá del grado de selectividad del mismo, de la naturaleza del analito y tipo de solvente orgánico utilizado. En algunos procesos extractivos es necesario colocar los cartuchos en serie a fin de optimizar el proceso de limpieza y retención o concentración en simultáneo.

Las fuerzas interactivas existentes entre el analito y la fase sólida son de diversa naturaleza y son las que permiten la retención y concentración del mismo en el sólido selectivo, pero posteriormente debe ser desadsorbido mediante el uso de uno o más solvente, el cual es seleccionado en función de su fuerza elutora, es decir que tenga la suficiente capacidad como para que un pequeño volumen de éste logre la máxima extracción del analito. Usualmente son utilizados solventes compatibles con el sistema cromatográfico de medida, pero no es una condición necesaria puesto que puede efectuarse una evaporización del mismos y luego una reconstitución de la muestra con pequeños volúmenes de otro tipo de solvente a fin de concentrar aún más la muestra. Pero cuando más etapas tenga un procedimiento extractivo, la posibilidad de perder parte de los analitos aumenta, debido a la partición de éste en las diferentes fases y por consiguiente la recuperación se verá afectada, fundamentalmente

cuando los niveles residuales en la muestra son bajos o muy bajos.

Por otra parte, los solventes utilizados tienen en mayor o menor grado cierto nivel de toxicidad y por consiguiente ser perjudiciales tanto para el operador como para el medioambiente.

Sin embargo, la aplicación de la SPE mejora las separaciones respecto a otras metodologías (líquido-líquido), logra minimizar las interferencias de la matriz y por lo tanto prolonga la vida útil de la columna cromatográfica y mejora los límites de detección, siendo numerosos los autores que han aplicado esta metodología para la determinación de plaguicidas en diversas matrices (Barker, 2000; Liska, 2000; Poole, et al., 2000; Morzycka, 2002; Navarro, et al., 2002; Otero, et al., 2003; Juan-García, et al., 2004; Sanagi, et al., 2004; Albero, et al., 2005; Juan-García, et al., 2005; Miyauchi, et al., 2005; Nozal, et al., 2005; Sharif, et al., 2006; Charlton y Jones, 2007).

El surgimiento de nuevas técnicas, tales como la utilización de fibras de sílica recubiertas con diferentes polímeros específicos que modifican sustancialmente el proceso extractivo han sido adoptadas en el presente trabajo, por lo que, una vez optimizada la metodología SPME para soluciones acuosas se plantearon como objetivos su aplicación para la determinación de triazoles en matrices complejas tales como frutas o baya de arándanos, para lo cual debieron efectuarse algunas modificaciones en el tratamiento previo y preparación de las muestras. (Navarro et al., 2002; Zambonin et al., 2002; Juan-García et al., 2004; Sanusi et al., 2004; Athanasopoulos et al., 2005; Trösken et al., 2005; Yi y Lu, 2006; Charlton y Jones, 2007).

Existen numerosas publicaciones referidas a la determinación de residuos de triazoles en diferentes ó similares matrices, aunque no se han encontrado referencias específicas para frutos y jugos de arándanos. Los métodos extractivos de mayor aplicación actualmente son aquellos que utilizan adsorbentes (SPE) ó polímeros selectivos (SPME), como así también un método denominado por las siglas QuEChERS, derivadas de su denominación en inglés (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe), el cual ha tenido una importante difusión para la determinación de plaguicidas en alimentos, aunque ha venido siendo a su vez modificado por diversos autores en función del sustrato ó naturaleza de los analitos a evaluar.

En este método se adicionan una importante cantidad de sales a la muestra y se extraen los plaguicidas con diferentes tipos de solventes orgánicos y posteriormente aplica la SPE como una etapa más del mismo.

Los siguientes autores han obtenido resultados referidos a la determinación de triazoles con aplicación de SPME ó QuEChERS modificado y por GC-NPD y GC- MSD y PTV-GC-MSD, los cuales se han tomado como referencia desde un enfoque teórico y de aplicación: Pawliszyn (1997), Poerschmann et al. (1997), Beltran et al. (2000), Kataoka et al. (2000), Pérez-Trujillo et al. (2002), Teske y Engewald (2002), Zambonin et al. (2002), Arrebola et al. (2003), Millán et al. (2003), Juan-García et al. (2004), Rial-Otero et al. (2003), Rial-Otero et al. (2004), Sanusi et al. (2004), Sjaak y Pawliszyn (2004), Juan-Garcia et al. (2005), Ouyang et al. (2005), Xiao-Gang et al. (2005), Dietz et al. (2006), Guo-Fang et al. (2006), Sauret-Szczepansky et al. (2006),

Zimmermann et al. (2006), Duran Guerrero et al. (2007), Fenoll et al. (2007), Leandro et al. (2007), Ortiz y Sarabia, (2007), Poole et al. (2007), Walorczyk et al. (2007), Lesueur et al. (2008), Nguyen et al. (2008), González- Rodríguez et al. (2008a-2008b), Stajnbaher et al. (2008), González- Rodríguez et al. (2009), Walorczyk et al. (2009), entre otros,

Materiales y Métodos

Los diversos reactivos y el equipamiento utilizado, como así mismo los aspectos metodológicos respecto al plan de muestreo son los descriptos en el ítem correspondiente a *materiales y métodos- aspectos generales* del presente trabajo.

Se describe a continuación el tratamiento previo de las muestras de frutos de la variedad O'Neal cosechadas en su estado óptimo de maduración y provenientes de las parcelas no tratadas, las cuales fueron identificadas como fruta testigo, a fin de utilizarlos como blancos de muestra y muestras adicionadas.

Las bayas se trituraron en la procesadora hasta lograr la mayor homogenización posible y la muestra compuesta fue fraccionada, rotulada y conservada en freezer hasta su posterior tratamiento para el análisis en el laboratorio.

Se efectuó la reconstitución y homogeneización de la muestra compuesta y se tomaron para el análisis porciones de ésta de aproximadamente $20 \pm 0,1$ g, Se adicionaron 25 ml de agua grado 1, y se llevó a baño ultrasónico durante 5 minutos, repitiéndose el proceso tres veces.

La mezcla se distribuye en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos. En los casos, que se requiera una mayor separación de las fases o acortar los tiempos de centrifugado, la muestra es trasvasada a tubos tipo “eppendorf” y centrifugada a 13.000 rpm. El sobrenadante se filtra a través de papel de filtro Wattman N° 1. El filtra do es llevado hasta pH 7 con NaOH 0,1N y se adiciona agua hasta un volumen final de 100 ml. Posteriormente, el volumen de muestra a ser sometida al proceso extractivo, se filtra a través de membrana de 0,45µm.

Para las muestras adicionadas, la adición de los analitos se efectuó al inicio del proceso y se prepararon por quintuplicado a 50- 25- 10- 2,5 y 1,0 µg/l de Triadimefon, Penconazole, Propiconazole y Tebuconazole.

El proceso extractivo se efectuó según la metodología ya explicitada y las condiciones cromatográficas adoptadas fueron las ya establecidas para las soluciones acuosas de estándares. Dado que la composición de la matriz es diferente se debieron optimizar los diferentes parámetros de esta metodología

El tratamiento estadístico de los resultados de las muestras de arándanos adicionados se efectuó según los criterios ya establecidos para la determinación de: *perfil de concentración, masa total absorbida en el equilibrio, constantes de distribución, volumen mínimo de la muestra y coeficientes de difusión.*

Posteriormente se obtuvieron y analizaron los resultados correspondientes a: *Comparación de perfiles de concentración y de rectas de regresión (estándares vs. muestras de arándanos adicionadas) - Análisis Unidimensional - Regresión Lineal*

Precisión - Exactitud - Límites de Detección y cuantificación del método

Resultados y Conclusiones

El perfil del tiempo de extracción para *soluciones acuosas de arándanos adicionadas* con triadimefon, penconazole, propiconazole I, propiconazole II y tebuconazole, se determinó a partir de las diferentes respuestas cromatográficas obtenidas del set de viales de 100 ml a 10 µg/l, para n=5 y $\alpha=0,05$.

La extracción se efectuó con el polímero de recubrimiento CWX/DVB, en tiempos progresivamente más largos de: 5,10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 480, 540, 600, y 720 minutos para cada una de ellas. Se analizaron estadísticamente los resultados para cada tiempo de extracción y cada analito y se obtuvieron los valores medios, desviación estándar, el error estándar, coeficientes de variación relativa, intervalos de confianza y demás parámetros estadísticos para determinar la distribución normal de todas las observaciones efectuadas (figura 24).

En dicha figura podemos observar que las curvas de perfil de extracción para cada analito son diferentes y la velocidad de absorción para alcanzar el equilibrio es relativamente baja.

En las figuras 25 a 29 se presentan las curvas de absorción comparativas de arándanos adicionados vs. soluciones acuosas de estándares.

Gráficamente las curvas son similares en cuanto a su tendencia para alcanzar el equilibrio, pero las respuestas cromatográficas indican menor masa absorbida en las muestras

de frutas adicionadas posiblemente por interferencias propias de la matriz.

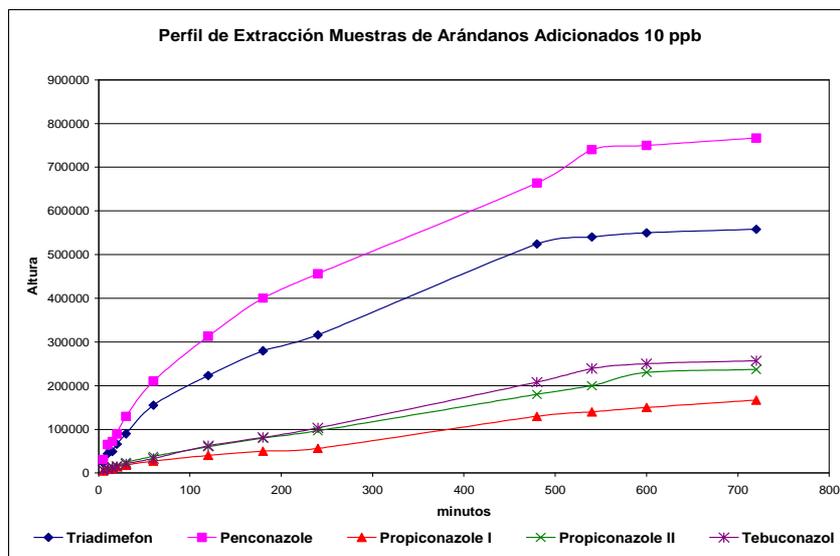


Figura 24. Perfil de Extracción Triazoles en Muestras de Arándanos adicionadas a 10 µg/l -SPME CWXDVB –GC-NPD (n=5 y α= 0,05)

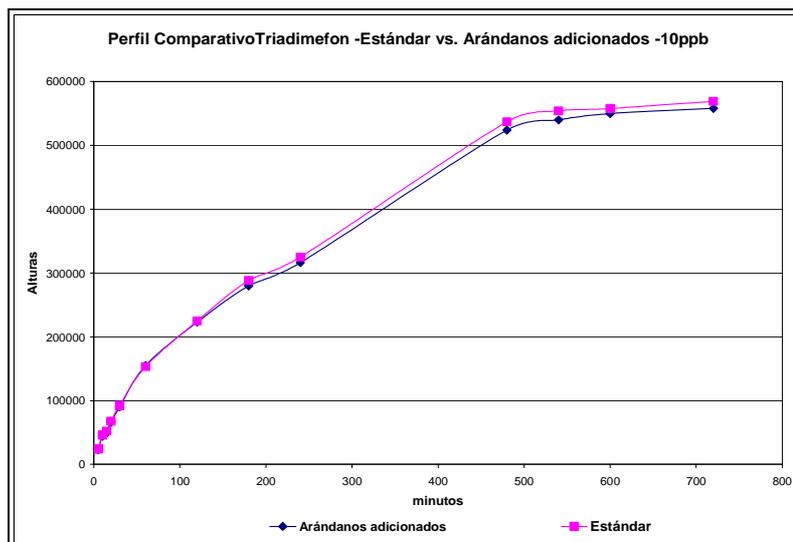


Figura 25. Perfil Comparativo Triadimefón Arándanos vs. Estándares

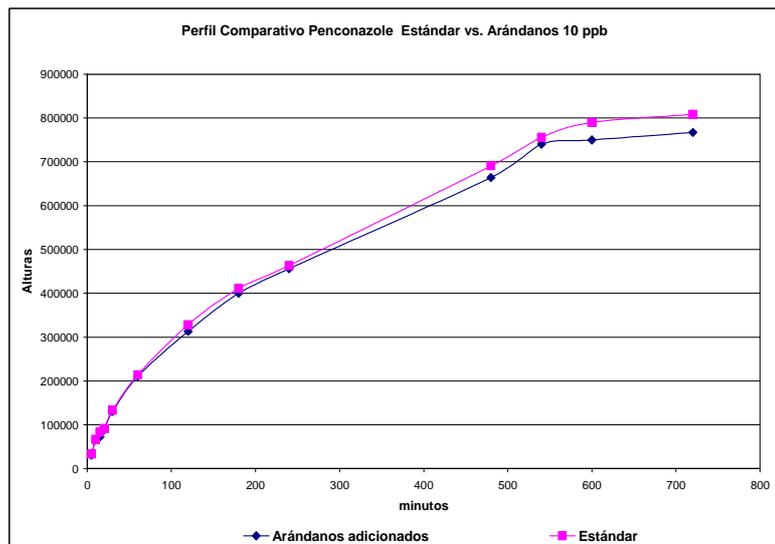


Figura 26. Perfil Comparativo Penconazole Arándanos vs Estándares a 10 µg/l

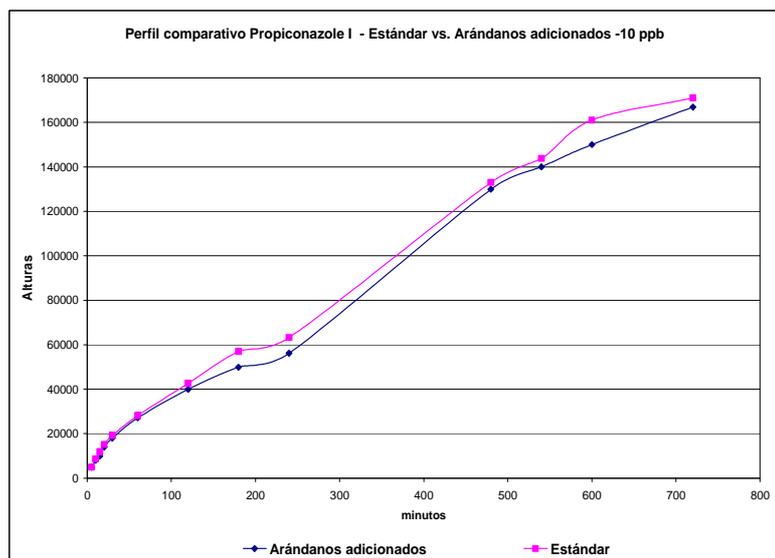


Figura 27. Perfil Comparativo Propiconazole I Arándanos vs. Estándares

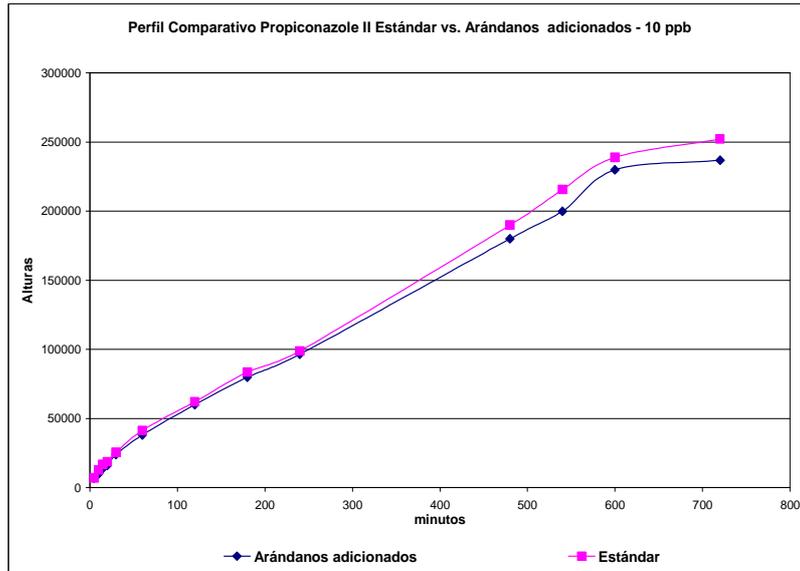


Figura 28. Perfil Comparativo Propiconazole II Arándanos vs. Estándares

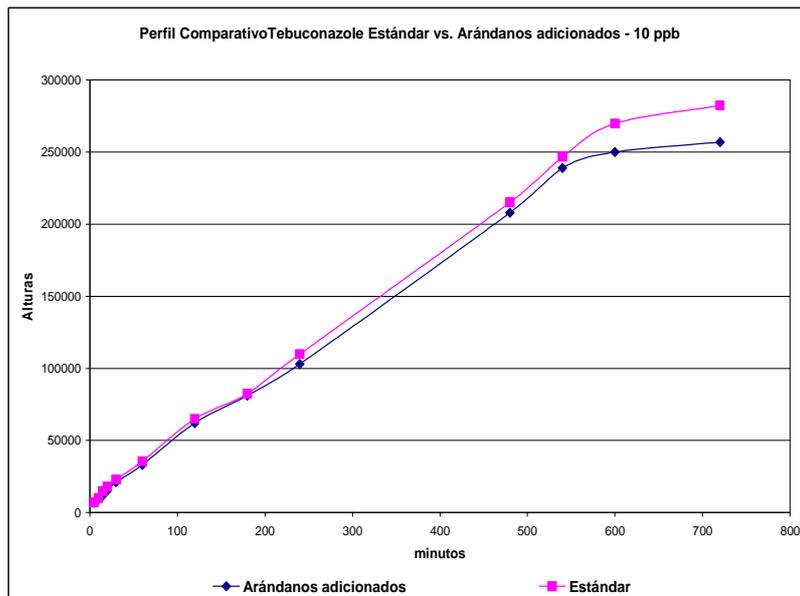


Figura 29. Perfil Comparativo Tebuconazole- Arándanos vs. Estándares

Para las muestras de arándanos adicionadas a 10 ppb se ha considerado que a los 720 minutos se ha alcanzado el equilibrio del proceso. Se determinaron a partir de la curva de calibración por inyección directa, mediante las ecuaciones correspondientes, la masa y número total de moles absorbidos por el polímero de recubrimiento, la constante de distribución (K) y el volumen limitante de la muestra. Se establecieron para cada analito, los tiempos de extracción en los que se considera un 95% de la masa total absorbida, a fin de calcular los coeficientes de difusión (D_t) de los mismos. En la tabla 15 se indican los resultados comparativos medios de las dos metodologías (SPME e inyección directa) correspondientes a soluciones acuosas de arándanos adicionados a 10 µg/l a 720 minutos de extracción y estándares en etilacetato a 5 mg/l.

Tabla 15. Valores medios comparativos SPME vs. Inyección Directa

| Analitos | CWX/DVB Altura Media | Inyección 2 µl 5 mg/l Altura Media | Masa inyectada ng | Masa absorbida ng |
|------------------|---------------------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|
| Triadimefon | 558045 | 289647 | 10 | 19,16 |
| Penconazole | 766925 | 334881 | 10 | 22,65 |
| Propiconazole I | 166925 | 77074 | 10 | 21,50 |
| Propiconazole II | 236924 | 106803 | 10 | 21,82 |
| Tebuconazole | 256965 | 136078 | 10 | 18,69 |

En dicha tabla, podemos observar que, para casi todos los analitos en muestras adicionadas, la masa absorbida a los 720 minutos, equivale a la inyección de 2 µl a una concentración de aproximadamente 10 mg/l. Se determinaron las constantes de

distribución polímero de recubrimiento/ muestra (**k**) para cada uno de los analitos (tabla 16).

Tabla 16. Constantes de distribución CWX/DVB/ Arándanos

| Analitos 10 µg/l | Masa absorbida ng | Nº total Moles absorbidos | C₂ ng/µl | K |
|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------|
| Triadimefon | 19,16 | 6,52E-11 | 3,40E-11 | 1,50E+04 |
| Penconazole | 22,65 | 7,98E-11 | 3,52E-11 | 1,79E+04 |
| Propiconazole I | 21,50 | 6,327E-11 | 2,94E-11 | 1,697E+04 |
| Propiconazole II | 21,82 | 6,42E-11 | 2,94E-11 | 1,72E+04 |
| Tebuconazole | 18,62 | 6,07E-11 | 3,25E-11 | 1,48E+04 |

El *volumen limitante* y los *coeficientes de difusión polímero de recubrimiento/ muestra (D_f)*, fueron determinados de las observaciones efectuadas de las curvas de perfil de extracción y aplicando las ecuaciones correspondientes. Los mismos se detallan en la tabla 17.

Tabla 17. Volumen mínimo y Coeficientes de Difusión CWX/DVB/ Arándanos adicionados a 10 ppb

| Analitos 10 µg/l | V. mínimo V2 : ml | Tiempo minutos | D_f (mm² /min.) | D_f (cm² /seg) |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|---|--|
| Triadimefon | 46 | 570 | 3,71 | 6,18E-10 |
| Penconazole | 50 | 610 | 3,46 | 5,77E-10 |
| Propiconazole I | 52 | 680 | 3,11 | 5,18E-10 |
| Propiconazole II | 53 | 670 | 3,15 | 5,25E-10 |
| Tebuconazole | 44 | 630 | 3,35 | 5,59E-10 |

Los resultados indicaron que el volumen limitante de muestra es menor a 60 ml por lo que usando el volumen adoptado de 100 ml es adecuado

En la tabla 18 podemos observar los resultados comparativos de las constantes de distribución y los coeficientes de difusión obtenidos para las soluciones mezcla de estándares y muestras de arándanos adicionadas a 10 µg/l en las condiciones establecidas.

Tabla 18. Valores Comparativos: Constantes y Coeficientes Difusión Estándares vs. Arándanos adicionados a 10 µg/l

| Analitos | K estándares | K arándanos | D_f estándares (cm² /seg) | D_f arándanos (cm² /seg) |
|------------------|---------------------|--------------------|---|--|
| Triadimefon | 1,55E+04 | 1,50E+04 | 6,18E-10 | 6,18E-10 |
| Penconazole | 1,89E+04 | 1,79E+04 | 5,87E-10 | <u>5,77E-10</u> |
| Propiconazole I | 1,74E+04 | 1,697E+04 | 5,18E-10 | 5,18E-10 |
| Propiconazole II | 1,83E+04 | 1,72E+04 | 5,25E-10 | 5,25E-10 |
| Tebuconazole | 1,61E+04 | 1,48E+04 | 5,59E-10 | 5,59E-10 |

Los resultados indican las diferencias existentes en las constantes de distribución, siendo ligeramente menores para las muestras de arándanos adicionados.

Respecto a los coeficientes de difusión, sólo para el penconazole, se observa una mínima disminución. Esto es debido al cambio en el tiempo, donde se considera el 95% de la masa total absorbida de la curva de perfil de extracción correspondiente

a este analito, de 600 minutos para soluciones de estándares pasa a ser en estas muestras de 610 minutos.

Una vez determinados los parámetros del proceso extractivo se procedió al análisis estadístico de los demás resultados obtenidos.

Análisis Unidimensional- Regresión lineal Muestras de arándanos

A fin de establecer el intervalo lineal del método, se efectuaron y analizaron estadísticamente las observaciones obtenidas de las respuestas cromatográficas, expresadas en áreas y alturas de pico para cada analito y cada concentración correspondiente a: quintuplicados de *soluciones acuosas frutas adicionadas* de Triadimefon, Penconazole, Propiconazole y Tebuconazole de 100 ml, a: 50- 25- 10- 2,5 y 1,0 µg/l, pH 7, agitación magnética de 2000 rpm y 15 minutos de inmersión del polímero CWX/DVB.

En las tablas 19 y 20 se presentan los resultados correspondientes al análisis unidimensional para los diferentes analitos, a las concentraciones y condiciones establecidas, para $n= 5$ y $\alpha = 0,05$.

En estas tablas podemos observar que el valor de los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados, para todas las observaciones, están dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

Tabla 19. Análisis Unidimensional Triazoles Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD -(n= 5 y $\alpha = 0,05$)

| $\mu\text{g/l}$ | 50 | 25 | 10 | 2,5 | 1 |
|-------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Triadimefon | | | | | |
| Media | 248980 | 124446 | 49852 | 12628 | 5201 |
| Desv. típica | 85 | 90 | 160 | 125 | 63 |
| Coefficiente Variación | 0,03% | 0,07% | 0,32% | 0,99% | 1,21% |
| Intervalo confianza | ± 98 | ± 103 | ± 184 | ± 143 | ± 72 |
| Penconazole | | | | | |
| Media | 353373 | 177711 | 72524 | 19767 | 9730 |
| Desv. típica | 73 | 135 | 79 | 35 | 69 |
| Coefficiente Variación | 0,02% | 0,08% | 0,11% | 0,18% | 0,71% |
| Intervalo confianza | ± 84 | ± 155 | ± 91 | ± 40 | ± 79 |

Tabla 20. Análisis Unidimensional Triazoles Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD -(n= 5 y $\alpha = 0,05$)

| $\mu\text{g/l}$ | 50 | 25 | 10 | 2,5 | 1 |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|--------------|
| Propiconazole I | | | | | |
| Media | 52015 | 26517 | 9993 | 2719 | 1416 |
| Desviación típica | 110 | 143 | 76 | 11 | 28 |
| Coefficiente variación | 0,21% | 0,54% | 0,76% | 0,41% | 1,97% |
| Intervalo confianza | ± 126 | ± 164 | ± 87 | ± 13 | ± 32 |
| Propiconazole II | | | | | |
| Media | 74615 | 37356 | 15044 | 3957 | 1703 |
| Desviación típica | 13 | 62 | 51 | 76 | 11 |
| Coefficiente variación | 0,02% | 0,17% | 0,34% | 1,92% | 0,64% |
| Intervalo confianza | ± 15 | ± 71 | ± 59 | ± 87 | ± 13 |
| Tebuconazole | | | | | |
| Media | 64450 | 32056 | 12518 | 3128 | 1180 |
| Desviación típica | 133 | 66 | 138 | 63 | 106 |
| Coefficiente variación | 0,21% | 0,21% | 1,10% | 2,00% | <u>8,96%</u> |
| Intervalo confianza | ± 153 | ± 76 | ± 158 | ± 72 | ± 122 |

Se observa además que para Tebuconazole, en muestras adicionadas a 1 µg/l, el RSD% es mayor al aceptado, factiblemente debido a la variabilidad de las respuestas a esta baja concentración, factores relacionados a la fibra u otros indeterminados, por lo que no podemos decir con rigurosidad que el método sea preciso a esta concentración.

Regresión lineal Muestras de arándanos

A partir de los resultados obtenidos del análisis unidimensional se graficó la curva de regresión lineal, intervalos de confianza, el histograma y la curva de trazas de densidad de residuos, para soluciones acuosas de frutas adicionadas con mezcla de triazoles.

Los parámetros estadísticos permitieron establecer la idoneidad del modelo ajustado. Se determinó la independencia de los residuos a partir del estadístico de Durbin Watson (P-valor). Mediante el test de Kolmogorov (P-valor) se determinó que los residuos proceden de una distribución normal, para un nivel de confianza de al menos un 90 %.

Se estableció la ecuación de la recta y el estadístico R^2 que indica la relación entre las variables (respuestas cromatográficas vs. concentración).

En las figuras 30 a 35 se observan las curvas de regresión lineal correspondientes a los diferentes analitos extraídos de muestras acuosas de arándanos adicionados a distintas concentraciones y en las mismas condiciones cromatográficas para $n = 5$ y $\alpha = 0,05$.

Las ecuaciones del modelo ajustado, el estadístico R^2 y los coeficientes de correlación fueron 0,998; 0,9998; 0,9998; 0,9997 y 0,9996 respectivamente, los cuales se presentan a continuación:

$$\text{Triadimefon Arándanos} = 158 + 4975^* \mu\text{g/l} \quad R^2 = 99,998\%$$

$$\text{Penconazole Arándanos} = 2454 + 7016^* \mu\text{g/l} \quad R^2 = 99,997\%$$

$$\text{Propiconazole I Arándanos} = 131 + 1040^* \mu\text{g/l} \quad R^2 = 99,969\%$$

$$\text{Propiconazole II Arándanos} = 201 + 1488^* \mu\text{g/l} \quad R^2 = 99,997\%$$

$$\text{Tebuconazole Arándanos} = -201 + 1292^* \mu\text{g/l} \quad R^2 = 99,996\%$$

Dado que en todos los casos, el p-valor en la tabla ANOVA ha sido inferior a 0,01, podemos establecer que existe relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99%. Los estadístico R^2 y los coeficientes de correlación indicaron la idoneidad del modelo. Se determinó la independencia y normalidad de los residuos, lo que pudo observarse en los gráficos correspondientes, dado que el p-valor del estadístico Durbin-Watson (DW) fueron superiores a 0.05 y que p-valor del test de Kolmogorov-S fueron de 0,858; 0,589; 0,690; 0,743 y 0,942 respectivamente, para un nivel de confianza de 95%. Se presentan a continuación las curvas de regresión lineal de los analitos evaluados:

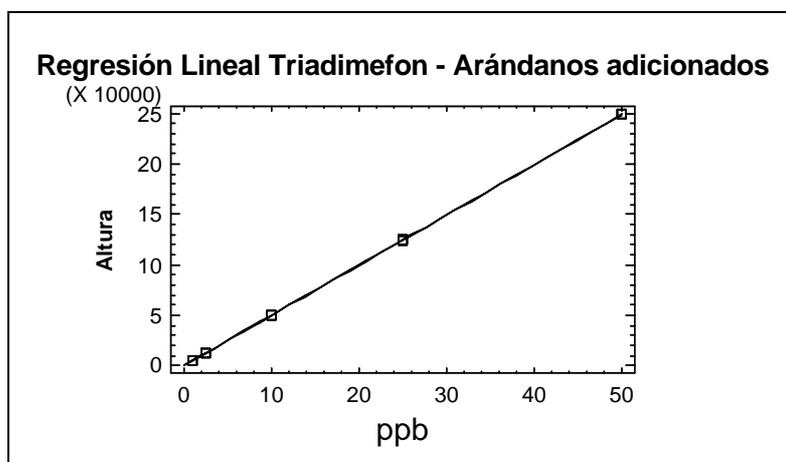


Figura 30. Regresión Lineal Triadimefon –Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$)

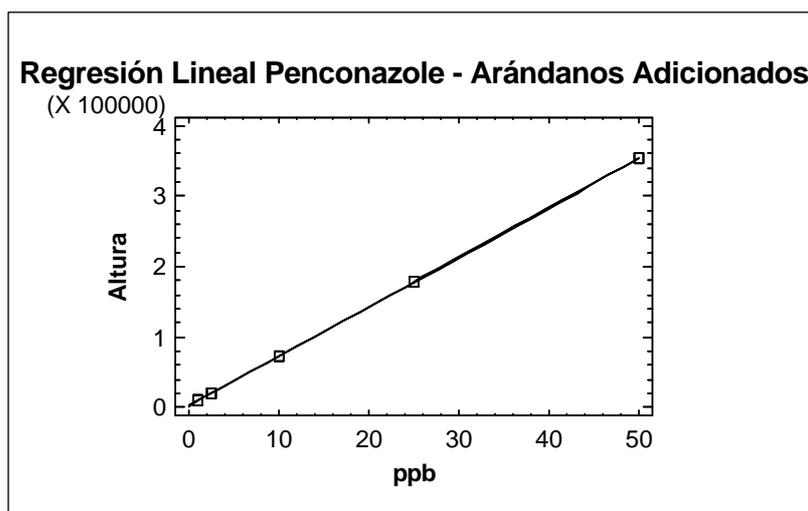


Figura 31. Regresión Lineal Penconazole – Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$)

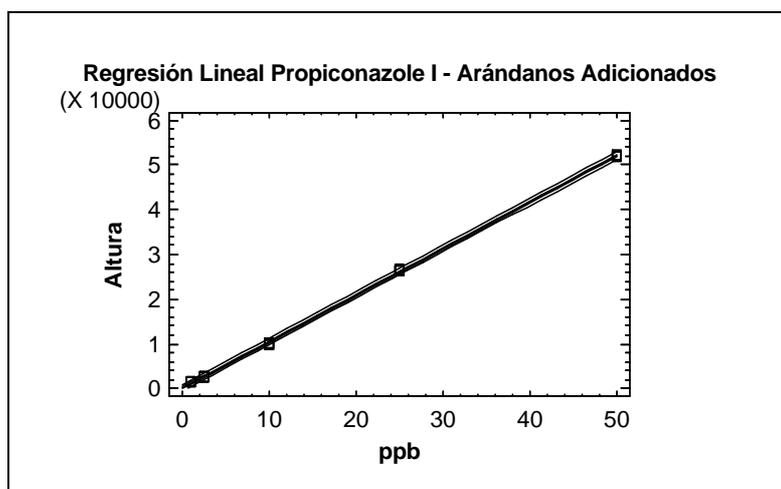


Figura 32. Regresión Lineal Propiconazole I Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD $(n= 5$ y $\alpha = 0,05$)

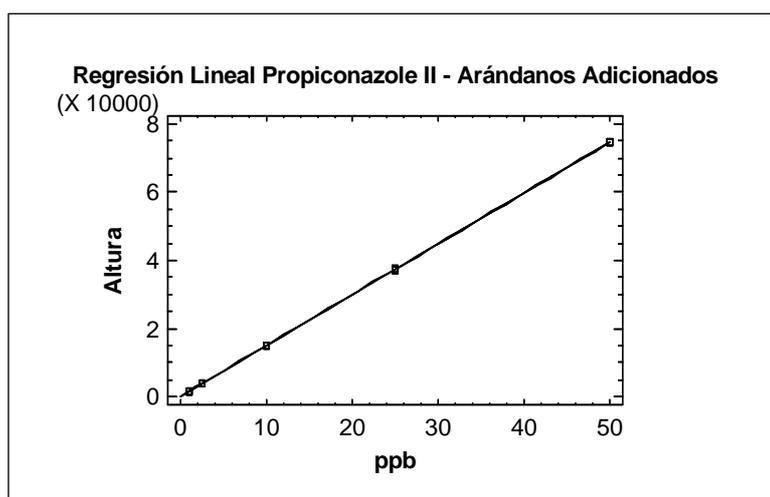


Figura 33. Regresión Lineal Propiconazole II Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD $(n= 5$ y $\alpha = 0,05$)

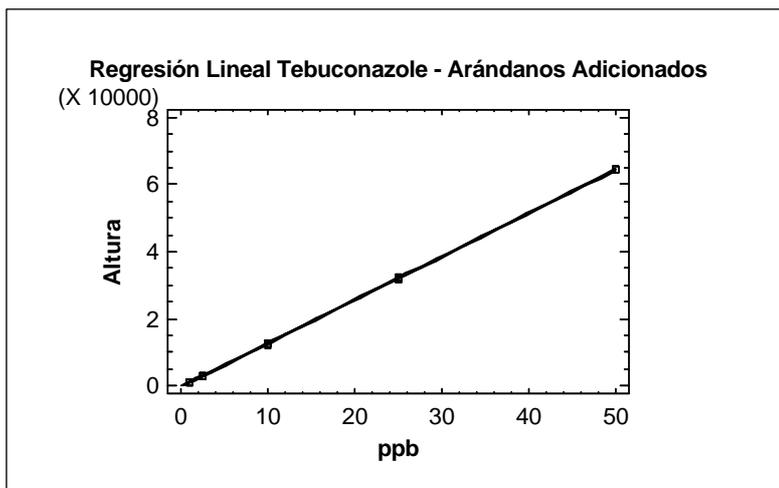


Figura 34. Regresión Lineal Tebuconazole Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD $(n= 5$ y $\alpha = 0,05$)

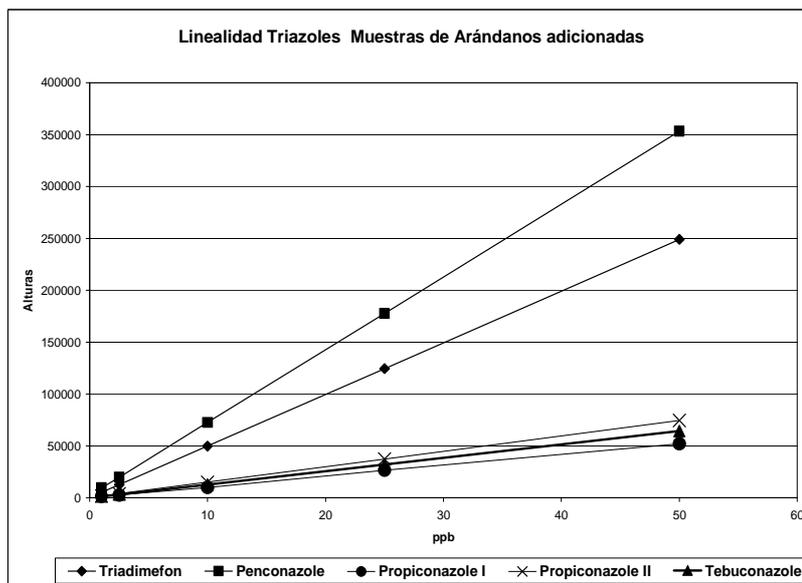


Figura 35. Regresión Lineal Triazoles- Arándanos adicionados CWX/DVB- GC-NPD $(n= 5$ y $\alpha = 0,05$)

Comparación de rectas de regresión

La comparación de los resultados de las rectas de regresión se efectuó a los efectos de determinar la existencia o no de efecto matriz y consecuentemente establecer el método de calibración para muestras reales.

El análisis estadístico fue efectuado a partir de los resultados obtenidos para *soluciones acuosas de estándares a* y *soluciones de frutas adicionadas*, a las siguientes concentraciones 50- 25- 10- 5- 2,5 y 1,0 µg/l, y en las mismas condiciones extractivas y cromatográficas. Se determinó la independenciam y normalidad de los residuos a partir de los estadísticos correspondientes. Se presenta el gráfico de la figura 36 a modo de ejemplo

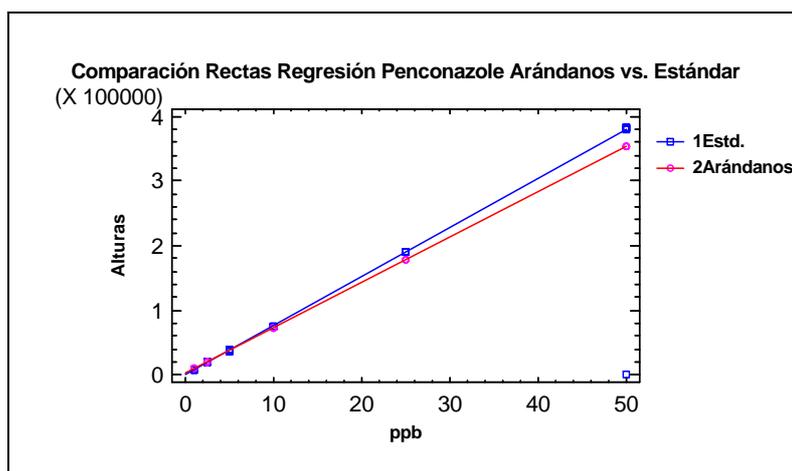


Figura 36. Comparación de Rectas de Regresión Penconazole Arándanos vs. Estándares- CWX/DVB

Mediante el p- valor del test ANOVA se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los puntos

de corte y/o pendientes para los diferentes valores, al 99 % de nivel de confianza.

Las ecuaciones de las rectas correspondientes son las siguientes:

$$\text{Triadimefon Arándanos Alturas} = 158 + 4975^* \mu\text{g/l} \quad (35)$$

$$\text{Triadimefon Estándares Alturas} = 1362 + 5018^* \mu\text{g/l} \quad (36)$$

$$\text{Penconazole Arándanos Alturas} = 1362 + 5018^* \mu\text{g/l} \quad (37)$$

$$\text{Penconazole Estándares Alturas} = 2409 + 7017^* \mu\text{g/l} \quad (38)$$

$$\text{Propiconazole I Arándanos Alturas} = 989 + 1076^* \mu\text{g/l} \quad (39)$$

$$\text{Propiconazole I Estándares Alturas} = 131 + 1039^* \mu\text{g/l} \quad (40)$$

$$\text{Propiconazole II Arándanos Alturas} = 743 + 1508^* \mu\text{g/l} \quad (41)$$

$$\text{Propiconazole II Estándares Alturas} = 201 + 1488^* \mu\text{g/l} \quad (42)$$

$$\text{Tebuconazole Arándanos Alturas} = 253 + 1337^* \mu\text{g/l} \quad (43)$$

$$\text{Tebuconazole Estándares Alturas} = -201 + 1292^* \mu\text{g/l} \quad (44)$$

A partir de los resultados obtenidos para *soluciones acuosas de estándares y soluciones de frutas adicionadas*, podemos concluir que existe efecto matriz dado que el análisis de

regresión múltiple y los parámetros estadísticos para todos los analitos, indicaron que existen diferencias estadísticamente significativas entre los puntos de corte y las pendientes para los diferentes valores, al 99 % de nivel de confianza (Feinberg, 2007; Forina et al., 2007; Ortiz y Sarabia, 2007; Poole C, 2007).

De lo explicitado se deduce que, para la determinación de cualquiera de estos analitos en muestras de frutas es necesario efectuar previamente la curva de calibración con muestras de arándanos adicionadas en las condiciones antedichas.

Precisión Muestras de arándanos

La precisión del método fue determinada para cada concentración y analito a partir de quintuplicados de *soluciones de frutas adicionadas* de triazoles a 50 ml, a: 50- 25- 10- 2,5 y 1,0 $\mu\text{g/l}$, $n=5$ y $\alpha=0,05$; adoptándose los mismos criterios explicitados en el método SPME para soluciones acuosas de estándares.

Se determinaron los siguientes parámetros: la desviación estándar, la desviación estándar relativa (RSD%) o coeficiente de variación (CV), ya que ambos estimadores permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la media

Para cada concentración se determinó el intervalo de confianza de la medida de acuerdo a la distribución t de Student. En la tabla 21 se presentan los resultados de precisión correspondientes a las observaciones para la concentración de 10 $\mu\text{g/l}$, a modo de ejemplificación, ya que los demás datos, se encuentran detallados en los análisis unidimensionales respectivos.

Tabla 21. Precisión Arándanos adicionados 10 µg/l - CWX/DVB- GC-NPD –(n= 5 y $\alpha = 0,05$)

| Analitos | Altura Media | Desviación Estándar | RSD | Intervalo confianza |
|------------------|--------------|---------------------|-------|---------------------|
| Triadimefon | 49852 | 160 | 0,32% | ±199 |
| Penconazole | 72524 | 79 | 0,11% | ±98 |
| Propiconazole I | 9993 | 76 | 0,76% | ±94 |
| Propiconazole II | 15044 | 51 | 0,34% | ±64 |
| Tebuconazole | 12518 | 138 | 1,10% | ±171 |

El método se consideró preciso ya que los coeficientes de variación porcentual no superan el 1,5–2,0% (AOAC, 1990).

Límites de detección y cuantificación para Muestras de arándanos

Los límites se estimaron a partir de la *curva de regresión de muestras de frutas adicionadas*, a bajas concentraciones de los analitos (10; 2,5 y 1,0 µg/l) para n= 30 determinaciones individuales y $\alpha = 0,05$.

Con similar procedimiento a los planteados para soluciones de estándares, se determinaron los parámetros: b (pendiente), Y_{bl} (estimación del blanco) y S_b (desviación estándar del blanco)

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las ecuaciones correspondientes, en las que se considera 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco respectivamente, para n determinaciones individuales (tabla 22).

Tabla 22. Límites de Detección y Cuantificación Muestras de Arándanos adicionados - CWX/DVB- GC-NPD-($n=30$ y $\alpha=0,05$)

| Analitos | Límite Detección $\mu\text{g/l}$ | Límite Cuantificación $\mu\text{g/l}$ |
|-------------------------|--|---|
| Triadimefon | 0,09 | 0,18 |
| Penconazole | 0,08 | 0,12 |
| Propiconazole I | 0,21 | 0,49 |
| Propiconazole II | 0,16 | 0,22 |
| Tebuconazole | 0,16 | 0,48 |

Exactitud Muestras de arándanos

Para la determinación de exactitud, se emplearon 4 concentraciones de los analitos, preparadas por quintuplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema.

La recuperación del método SPME se determinó para *soluciones acuosas de frutas adicionadas* de triazoles a 50- 10- 2,5 y 1 $\mu\text{g/l}$, en las mismas condiciones de extracción y a partir de las curvas de calibración respectivas.

Se determinaron los valores medios de recuperación, la desviación estándar y coeficiente de variación o desviación relativa (RSD%).

En este caso, el valor de t se calculó para $n=20$ y $\alpha=0,05$. Los valores de t_{ob} se compararon con los tabulados para el intervalo de confianza requerido con $(n-1)$ grados de libertad ($t_{\text{tabla}}=2,093$) y la exactitud o inexactitud se determinó para el

promedio de recuperaciones de todas las concentraciones. En la tabla 23 se observan los resultados correspondientes.

Tabla 23. Recuperación Triazoles - Arándanos adicionados a 50- 10- 2,5 y 1 µg/l - CWX/DVB- GC-NPD-(n= 20 y $\alpha = 0,05$)

| Analitos | Recuperación Media % | Desviación Estándar | RSD | t calculado |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|------------|--------------------|
| Triadimefon | 98,00 | 0,78 | 0,79% | 0,36 |
| Penconazole | 95,90 | 0,82 | 0,86% | 0,38 |
| Propiconazole I | 97,40 | 1,72 | 1,77% | 0,80 |
| Propiconazole II | 97,90 | 1,40 | 1,43% | 0,66 |
| Tebuconazole | 98,90 | 0,95 | 0,96% | 0,44 |

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

Si bien la puesta a punto del proceso extractivo requiere de numerosos ensayos previos, una vez optimizada la SPME es una técnica analítica adecuada y rápida para la determinación de estos fungicidas en muestras de arándanos.

Minimiza la contaminación y pérdidas de analitos tales como las existentes en los procesos tradicionales de extracción líquido-líquido, ya que elimina el uso de solventes orgánicos y el proceso es sólo la transferencia de masa desde la solución acuosa al polímero de recubrimiento y por consiguiente, la muestra inyectada es directamente la masa absorbida. El método es lineal en el intervalo de concentraciones previstas, de

adecuada precisión y exactitud, de alta sensibilidad, de relativo bajo costo analítico y tiempos de análisis cortos.

De la curva de perfil de concentración se han podido determinar: los coeficientes de difusión (C_f) y las constantes de distribución (K) de estos analitos, datos que no constan en bibliografía ya que sólo pueden obtenerse experimentalmente y en determinadas condiciones. A partir de las respuestas cromatográficas (curva de calibrado) se ha podido establecer la masa total absorbida por el polímero de recubrimiento a diferentes tiempos de inmersión y en el equilibrio, datos necesarios para poder establecer el volumen mínimo o limitante de muestra y además el tiempo de análisis adecuado. Así mismo, cuando se deben determinar residuos de plaguicidas a niveles trazas o cuando los LMRs exigen determinar niveles muy bajos de residuos, disponer de la curva masa vs tiempo nos permite establecer el tiempo de inmersión en el que se logra incrementar la masa inyectada y por lo tanto la lograr mayor sensibilidad del método, independiente de la sensibilidad del sistema cromatográfico.

Los resultados estadísticos de comparación de rectas de regresión estándares vs. muestras adicionadas de arándanos indicaron la existencia de efecto matriz, por lo que, para la aplicación de esta metodología a muestras reales debe utilizarse el método de calibración de muestras o matriz adicionadas en el rango de concentraciones que involucren el LMRs correspondientes para dichos analitos (Feinberg, 2007; Forina et al., 2007; Ortiz y Sarabia, 2007; Poole, 2007; Rozet et al., 2007).

Aplicación de la Metodología SPME a Muestras de Arándanos Provenientes de Empaques

A fin de aplicar la metodología a muestras incógnitas y además, satisfacer la demanda cada vez mayor de los productores respecto al control de residuos en los frutos como un parámetro más de calidad para lograr competitividad en los mercados e incrementar la exportación de su producción se efectuaron muestreos al azar de frutos frescos. Dado que existen en la región numerosos empaques que exportan diferente variedades de arándanos frescos se seleccionaron aquellos de mayor volumen de producción y en los que era factible disponer de muestras de la variedad evaluada (O'Neal).

El muestreo de bayas en empaques se efectuó en las diferentes temporadas de producción (2006-2007 y 2008) de lotes de productos envasados, cuya calidad se supone garantizada ya que corresponden a productos de exportación, se establecieron tres (3) muestreos, en tres (3) empaques, de veinticinco (25) muestras por triplicado y tamaño muestral de 100 gr.

Se detallan en tablas 24 a 29 los resultados obtenidos, los que indicaron la presencia de residuos de algunos de los fungicidas estudiados en las muestras identificadas para cada empaque y cosecha, por ejemplo Empaque 1/2006 - (M.Nº.1).

Los mismos se expresan en concentración de las muestras acuosas de frutas $\mu\text{g/l}$, luego éstos son referidos al contenido de residuos en fruta y expresados en microgramos por kilogramo de fruta ($\mu\text{g/ kg}$), para $n=3$ y $\alpha= 0,05$.

El término N.D. indica que no se han detectado cromatográficamente residuos de estos plaguicidas en la muestra.

Tabla 24. Muestras de Arándanos - Empaque 1/2006

| Empaque 1/2006 | M. Nº 1 | M.Nº3 | M.Nº 6 | M.Nº 10 | M.Nº 24 |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Propiconazole I y II | | | | | |
| Valor medio $\mu\text{g/l}$ | N.D | 4,9 | N.D | 1,9 | N.D |
| Desviación Estándar | | 0,31 | | 0,26 | |
| RSD | | 6,28% | | 13,93% | |
| Intervalo confianza | | $\pm 0,76$ | | $\pm 0,66$ | |
| Tebuconazole | | | | | |
| Valor medio $\mu\text{g/l}$ | 12,2 | 7,9 | 6,8 | 4,7 | 3,4 |
| Desviación Estándar | 0,66 | 0,21 | 0,40 | 0,25 | 0,26 |
| RSD | 5,37% | 2,65% | 5,88% | 5,39% | 7,78% |
| Intervalo confianza | $\pm 0,66$ | $\pm 1,54$ | $\pm 1,78$ | $\pm 0,99$ | $\pm 0,72$ |

Tabla 25. Valores medios expresados en $\mu\text{g/ kg}$ fruta - Empaque 1/2006

| Empaque 1/2006 | M.Nº 1 | M.Nº3 | M.Nº 6 | M.Nº 10 | M.Nº 24 |
|-----------------------------|-----------|-------|--------|---------|---------|
| Propiconazole I y II | | | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | N.D | 24,5 | N.D | 9,5 | N.D |
| Tebuconazole | | | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | <u>61</u> | 39,5 | 34 | 23,5 | 17 |

Tabla 26. Muestras de Arándanos - Empaque 2/2006

| Empaque 2/2006 | M.Nº 3 | M.Nº5 | M.Nº 9 | M.Nº 10 | M.Nº 20 |
|-----------------------------|--------|------------|--------|------------|------------|
| Propiconazole I y II | | | | | |
| Valor medio $\mu\text{g/l}$ | N.D | 1,97 | N.D | 4,97 | 3,10 |
| Desviación Estándar | | 0,21 | | 0,21 | 0,36 |
| RSD | | 10,58% | | 4,19% | 11,63% |
| Intervalo confianza | | $\pm 0,52$ | | $\pm 0,52$ | $\pm 0,90$ |

Tabla 26. Muestras de Arándanos - Empaque 2/2006 (Continuación)

| Empaque 2/2006 | M.Nº 3 | M.Nº5 | M.Nº 9 | M.Nº 10 | M.Nº 20 |
|------------------------|--------|-------|--------|---------|---------|
| Tebuconazole | | | | | |
| Valor medio µg/l | 2,77 | N.D | 4,60 | N.D | N.D |
| Desviación Estándar | 0,25 | | 0,26 | | |
| RSD | 9,10% | | 5,75% | | |
| Intervalo confianza | ±0,63 | | ±0,60 | | |

Tabla 27. Valores medios expresados en µg/ kg fruta Empaque 2/2006

| Empaque 2/2006 | M.Nº 3 | M.Nº5 | M.Nº 9 | M.Nº 10 | M.Nº 20 |
|-----------------------------|--------|-------|--------|---------|---------|
| Propiconazole I y II | | | | | |
| µg/ kg fruta | N.D | 10 | N.D | 25 | 15,5 |
| Tebuconazole | | | | | |
| µg/ kg fruta | 13,8 | N.D | 27 | N.D | N.D |

Tabla 28. Muestras de Arándanos - Empaque 3/2006

| Empaque 3/2006 | M.Nº 2 | M.Nº 4 | M.Nº 9 | M.Nº 14 | M.Nº 21 |
|-----------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|
| Propiconazole I y II | | | | | |
| µg/l | 5,07 | 4,67 | 3,20 | 5,13 | N.D |
| Desviación Estándar | 0,25 | 0,31 | 0,26 | 0,21 | |
| RSD | 4,97% | 6,55% | 8,27% | 4,06% | |
| Intervalo confianza | ±0,63 | ±0,76 | ±0,66 | ±0,52 | |
| Tebuconazole | | | | | |
| µg/l | 7,03 | 8,83 | 15,83 | N.D | 6,40 |
| Desviación Estándar | 0,31 | 0,32 | 0,25 | | 0,30 |
| RSD | 4,34% | 3,64% | 1,52% | | 4,69% |
| Intervalo confianza ± | ±0,76 | ±0,80 | ±0,63 | | ±0,75 |

Tabla 29. Valores medios expresados en $\mu\text{g/ kg}$ fruta - Empaque 3/2006

| Empaque 3/2006 | M.Nº 2 | M.Nº 4 | M.Nº 9 | M.Nº 14 | M.Nº 21 |
|-----------------------------|--------|--------|-----------|---------|---------|
| Propiconazole I y II | | | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | 25 | 23,4 | 16 | 26 | N.D |
| Tebuconazole | | | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | 35 | 44 | <u>79</u> | N.D | 32 |

Respecto a los muestreos de la temporada 2007 y 2008, si bien se efectuaron los mismos procedimientos analíticos y metodológicos, sólo se expresan en las tablas 30 a 34 los correspondientes a los resultados expresados en $\mu\text{g/ kg}$ fruta.

Tabla 30. Valores medios expresados en $\mu\text{g/ kg}$ fruta - Empaque 1/2007.

| Empaque 1/2007 | M.Nº 5 | M.Nº 6 | M.Nº 20 |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|--------------|
| Propiconazole I y II | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | ND | 10 \pm 0,75 | ND |
| Tebuconazole | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | <u>109</u> \pm 2,5 | <u>88,5</u> \pm 1,9 | 29 \pm 1,3 |

Tabla 31. Valores medios expresados en $\mu\text{g/ kg}$ fruta - Empaque 2/2007

| Empaque 2/2007 | M.Nº 7 | M.Nº 8 | M.Nº 9 | M.Nº 14 | M.Nº 21 |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|-----------------------|
| Propiconazole I y II | | | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | N.D | ND | N.D | N.D | <u>98,5</u> \pm 2,7 |
| Tebuconazole | | | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | <u>108</u> \pm 3,5 | <u>125</u> \pm 4,2 | <u>145</u> \pm 4,7 | 25 \pm 1,5 | N.D |

Tabla 32. Valores medios expresados en $\mu\text{g/ kg}$ fruta - Empaque 3/2007

| Empaque 3/2007 | M.Nº 7 | M.Nº 11 |
|---|----------------|----------------|
| Propiconazole I y II | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | 45 \pm 2,1 | ND |
| Tebuconazole | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | 27,5 \pm 1,8 | 15 \pm 1,3 |

Tabla 33. Valores medios expresados en $\mu\text{g/ kg}$ fruta - Empaque 1/2008

| Empaque 1/2008 | M.Nº 2 |
|---|---------------|
| Propiconazole I y II | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | ND |
| Tebuconazole | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | 20 \pm 2,1 |

Tabla 34. Valores medios expresados en $\mu\text{g/ kg}$ fruta - Empaque 2/2008

| Empaque 2/2008 | M.Nº 2 | M.Nº 17 | M.Nº 19 |
|---|----------------|----------------|----------------|
| Propiconazole I y II | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | ND | 5 \pm 0,9 | ND |
| Tebuconazole | | | |
| $\mu\text{g/ kg}$ fruta | 31,5 \pm 2,4 | N.D | 6 \pm 0,9 |

En las 25 muestras correspondientes al Empaque 3-Cosecha 2008, no se detectaron niveles residuales de estos analitos.

Por cada temporada de cosecha se analizaron 75 muestras, de las cuales se ha informado las consideradas como positivas. En la tabla 35 se presenta un resumen de cada cosecha, agrupados según cumplan o estén en un rango superior a los LMR (50 $\mu\text{g/ kg}$ ó 0,050 mg/kg).

Tabla 35. Número de Muestras de Empaques positivas. Comparación con los Límites Máximos de Residuos- Resolución SENASA N°619/05

| Cosechas 06-07-08 | Nº de Muestras Positivas | |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| | < 50 µg/ kg fruta | 50 < X <150 µg/ kg fruta |
| Total Muestras: 225 | | |
| 2006 | 18 | 2 |
| 2007 | 2 | 8 |
| 2008 | 4 | 0 |
| Total | 24 | 10 |

Los resultados de las diferentes cosechas presentan en su mayoría niveles aceptables y/o libres de estos residuos.

Podemos observar ciertas diferencias en las temporadas agrícolas, no sólo en el número de muestras que presentan residuos, sino además en los valores medios de los niveles. Respecto a la variabilidad de los resultados, si bien, se observan RSD% relativamente altos, los mismos están considerablemente por debajo del intervalo de valores establecidos para este tipo de muestras.

En las 225 muestras analizadas durante las tres cosechas, podemos observar un bajo porcentaje de muestras con la presencia de sólo dos de estos analitos, Propiconazole y Tebuconazole.

Generalmente las muestras contienen uno u otro de estos plaguicidas, salvo en el caso del Empaque 3/ 2006 en el que se encontraron varias muestras con los dos analitos. Esto posiblemente se deba a diversos factores, tales como, prácticas agrícolas de refuerzo en las aplicaciones, lotes mezclados en el empaque previo al muestreo, etc.

Por otro lado, en la cosecha 2008 es donde se observó la menor cantidad de muestras con niveles residuales, fundamentalmente si la comparamos con la del 2006. Esto evidencia un posible mejoramiento en las prácticas agrícolas, cumplimiento de los tiempos de carencia, calidad de la producción debido a exigencias de los mercados, etc.

Los niveles residuales de las frutas, en general, están por debajo de 50 µg/kg fruta, sin embargo, algunas muestras sobrepasan este valor, y muy pocas contienen niveles entre 50 y 150 µg/ kg fruta. Sin embargo, esto no deja de ser relevante ya que estos productos no cumplen con la legislación y por lo tanto no pueden ser comercializados.

En Argentina, los límites máximos de residuos, expresados en mg/kg de fruta (LMR) para estos analitos, se encuentran regulados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería Pesca y Alimentos- Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos- Dirección Nacional de Alimentos- SENASA. La Resolución SENASA N° 619/05, es la que establece como LMR: 0,050 mg/kg ó 50 µg/kg arándanos.

La exportación de arándanos frescos ha tendido un auge muy importante en estos últimos años, y la producción necesariamente debió acompañar esos cambios a fin de lograr competitividad en los mercados. Las exigencias de éstos respecto a niveles residuales de cualquier plaguicida son cada vez mayores y por lo tanto el control de la producción es de suma relevancia.

IV- Estudio de la Evolución de los Residuos en Muestras de Arándanos Envasados en Atmósferas Modificadas

Introducción

En el envasado en atmósfera modificada de vegetales frescos y mínimamente procesados se combinan un volumen de O₂ y una proporción de CO₂, además de N₂. La concentración de estos gases en el espacio de cabeza del paquete varía debido al metabolismo respiratorio de estos productos. En este caso, los cambios se compensan con la difusión de gases a través del material de envasado hasta establecer una atmósfera en equilibrio.

Se usan las coberturas enteras de las cajas o pallets y una película plástica para los envases pequeños, las cuales son resistentes a las bajas temperaturas y a las agresiones mecánicas, a fin de contener los gases. Los productos así envasados deben ser enfriados inmediatamente antes de modificar la atmósfera.

La mezcla de gases y la refrigeración tienen como objetivo disminuir la tasa de respiración y retrasar la velocidad de las reacciones responsables de la maduración y la senescencia. Cada especie vegetal presenta una tolerancia diferente a los gases.

Mediante el uso de estas tecnologías se consigue reducir la respiración de la fruta y por lo tanto, retrasar la maduración y deprimir el metabolismo en general, inclusive el de los

microorganismos (Ceponis y Cappelini, 1983; Ceponis y Cappelini 1985; Spotts et al., 2002; Yommi y Godoy, 2002; Srivastava et al., 2007; Fenoll et al., 2008).

Concentraciones de O₂ entre 8% y 10% y de CO₂ entre 10% y 13% han logrado mantener la calidad de los arándanos entre 5 y 8 semanas a 0-1°C, considerando un período adicional de 3 días a 18-20°C. A su vez, concentraciones de CO₂ de 15% reducirían la incidencia de podredumbres

Se ha demostrado que los arándanos responden positivamente al uso de atmósferas controladas, pero uno de los inconvenientes que presenta el uso de esta tecnología es su alto costo y además representa un problema operativo real.

El uso de estas tecnologías se ha incrementado en los últimos años en los países desarrollados, pero los empaques existentes en la región no disponen del equipamiento necesario para su aplicación, por lo que, el estudio de la evolución de los residuos durante su almacenamiento en cámaras se vio dificultado, ya que no se pudieron efectuar adecuadamente los muestreos.

Materiales y Métodos

Las muestras fueron suministradas por colaboración de productores que aportaron los arándanos envasados con atmósferas modificadas. Éstas ya habían permanecido una semana almacenadas en cámaras, por lo que se estableció como día cero (D₀), la fecha de la recepción de las muestras, las cuales fueron conservadas en cámaras refrigeradas y cada 5 días se

efectuaron los muestreos.

La escasa disponibilidad en la región de muestras con estas características de envasado fue un factor de importancia al momento de obtener un mayor número de datos para estimar la disipación de los residuos, ya que su número era acotado a 60 envases, de 4 lotes diferentes de la variedad, O'Neal. Esto condicionó el muestreo y el número de determinaciones. Además, los resultados de los triplicados de las muestras del Lote 1, Lote 3 y Lote 4 no indicaron presencia de estos fungicidas, por lo que sólo se pudo determinar la evolución de los residuos de tebuconazole presentes en el Lote 2. Se efectuaron los muestreos por triplicado y se identificaron los valores medios de los residuos como: R_0 , R_5 , R_{10} , R_{15} y R_{20} .

Para la determinación de los residuos se aplicó la metodología analítica SPME-CWX/DVB y GC-NPD.

Resultados y Conclusiones

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 36, donde podemos observar que los residuos en estas condiciones de almacenamiento tienen una disipación muy lenta.

Dado que el muestreo es destructivo y se disponía de escasos envases de frutas, los datos obtenidos no pueden ser considerados suficientes para arribar a conclusiones finales, éstas sólo son parciales y para este ensayo. Sin embargo los mismos nos permiten estimar relativamente que los niveles de residuos tienen una evolución lenta, tal como era previsto, dado las condiciones de envasado y almacenamiento a bajas temperaturas,

lo cual retarda la degradación producida por los procesos enzimáticos y químicos propios de la continua evolución de los frutos hasta su senescencia.

Tabla 36. Evolución de los residuos de Tebuconazole- Arándanos en Atmósferas Modificadas

| Tebuconazole | R₀ | R₅ | R₁₀ | R₁₅ | R₂₀ |
|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| µg/kg | 22,43 | 19,75 | 17,3 | 15,5 | 15,0 |
| Desviación Estándar | 1,66 | 0,64 | 1,18 | 0,74 | 1,00 |
| RSD | 7,38% | 3,22± | 6,81± | 4,77± | 6,67% |
| Intervalo confianza | ±4,12 | ±1,58 | ±2,93 | ±1,83 | ±2,49 |

En la figura 37 se representa la curva de evolución de los residuos de tebuconazole, en la que podemos observar una baja velocidad de disipación.

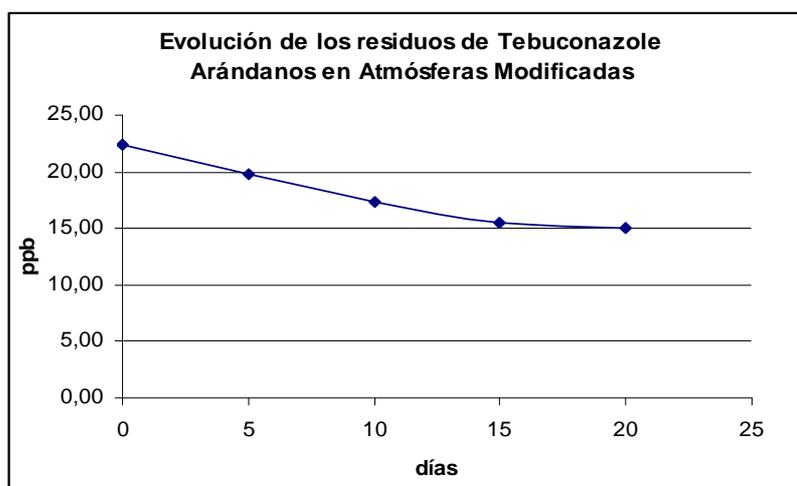


Figura 37. Curva de Evolución de los residuos de Tebuconazole- Arándanos en Atmósferas Modificadas

A partir del día 20 (D_{20}) de almacenamiento las muestras restantes presentaron alteraciones en su calidad, por lo que el muestreo fue suspendido dado que el objetivo del ensayo era evaluar la disipación hasta la pérdida de calidad por deterioro normal del fruto.

Los resultados comparativos con muestras en envases tradicionales no fueron suficientes para arribar a compulsiones finales, ya que en éstas el muestreo se suspendió a los 10 días por deterioro de los frutos. Se considera relevante continuar estos estudios, pero sería necesario disponer de un número suficiente de muestras, como así también de empaques en la región con las condiciones tecnológicas para el envasado en atmósferas modificadas y control adecuado de las muestras.

V- Curvas de Disipación

Introducción

Tal como se ha explicitado en ítems anteriores, la cantidad de plaguicida que queda sobre el vegetal inmediatamente después de un tratamiento o aplicación, la distribución en el tejido vegetal y la evolución de estos residuos en los frutos es compleja y dependen de las condiciones ambientales, del sustrato vegetal, de la relación superficie/peso y naturaleza del plaguicida, entre otros múltiples factores.

Al efectuar una aplicación en un cultivo, una parte o un porcentaje es interceptada por la planta y el depósito formado está fundamentalmente relacionado con la dosis y concentración del plaguicida, además, la variabilidad en los depósitos se incrementa cuando el tamaño de los frutos no es homogéneo, esto involucra que algunos resultados presenten coeficientes de variación altos (RSD% mayores a 35%), sin embargo, éstos se encuentran dentro de los valores que la bibliografía indica para estudios de residuos en cultivos de campo.

Los fungicidas utilizados fueron los de mayor uso en esas temporadas para los cultivos de nuestra región y las aplicaciones de propiconazole y tebuconazole se efectuaron en floración y cuaje de acuerdo a las metodologías tradicionales, es decir, por aspersión automatizada, a una concentración del principio activo de 250 mg/l y a una dosis de 500 ml/ ha. Los *tiempos de aplicación* se establecieron al momento de la floración y del cuaje

de los frutos teniendo en cuenta la situación de mayor riesgo al momento de cosecha, por los tiempos relativos de carencia.

Se utilizaron termonebulizadores a bajo a bajo volumen, ya que se reduce la cantidad de depósito, y con dosis biológicamente posible para el control adecuado de las enfermedades (dosis mínima de control). En general, se tiende a mejorar las técnicas de aplicación tratando de lograr una mejor distribución del producto, consumiendo menor cantidad, mayor eficacia y menor contaminación.

Respecto al Propiconazole, que fue el más aplicado en esas temporadas agrícolas, cuya denominación comercial como producto técnico es TILT, de 25% de principio activo y las técnicas tradicionales de aplicación son en floración y este fungicida tiene propiedades sistémicas, actúa preventiva y curativamente sobre un gran número de hongos (Oidium, Royas, etc.). El producto es absorbido por las hojas y tallos verdes, dependiendo de las condiciones climáticas y del desarrollo del cultivo. Es trasladado en forma ascendente y el movimiento sistémico asegura la distribución dentro de toda la planta.

Para lograr determinar la factible degradación o dinámica de disipación de los fungicidas aplicados en los cultivos para el control de plagas, se establecieron estrechas vinculaciones con el sector. Se requirió disponer de la información y control adecuado, ya que los resultados deben representar lo mejor posible el proceso. Las parcelas y/o lotes, dosis, concentraciones y momentos de la aplicación de los fungicidas, fueron establecidas por los profesionales a cargo de la plantación a fin de estandarizar

las mismas y minimizar la variabilidad respecto a los depósitos. Se identificaron los diferentes lotes y las condiciones de muestreo.

Se efectuó una sola aplicación de propiconazole y tebuconazole para el momento de floración y cuaje. Además, en un lote al inicio del cuaje, se efectuaron tres aplicaciones de tebuconazole, como caso extremo de dosis, a fin de evaluar la situación de máximo contenido de residuos en las bayas.

La *eliminación aparente* de los residuos se da por el crecimiento del vegetal, en este caso en especial, de los frutos, siendo aparentemente alta para un crecimiento rápido de los mismos. Esta eliminación aparente es simplemente explicada por la variación en la relación superficie/peso según pudo observarse en la curva de crecimiento del sustrato vegetal, la eliminación real sin embargo es más compleja y deben considerarse otras causas, tal como los factores climáticos (luz, viento, lluvia, etc.) que aceleran la eliminación de los mismos.

Diversos autores han evaluado la degradación de ciertos triazoles en diferentes matrices y condiciones, los cuales han sido considerados para el desarrollo del presente estudio (Thom et al., 1997; Athanasopoulos et al., 2000; Salvestrini et al., 2001; Guillard et al., 2002; Da Silva et al., 2003; Athanasopoulos et al., 2003; Pei et al., 2004; Athanasopoulos et al., 2005; Kyriakidis et al., 2005; Juan-Poce et al., 2006; Yi y Lu 2006; Lhome et al., 2007; Matthies et al., 2008; Stenrod et al., 2008; González-Rodríguez et al., 2009).

Materiales y Métodos

Los aspectos metodológicos, correspondientes a la determinación de las curvas de disipación de los fungicidas Propiconazole y Tebuconazole involucraron diferentes etapas, las cuales se describen a continuación:

- *Plan de muestreo*
- *Tratamiento previo de las muestras, aplicación de la metodología extractiva SPME y condiciones cromatográficas establecidas para la determinación de triazoles en arándanos (SPME y GC-NPD).*
- *Curvas de disipación y cinética de degradación.*
- *Análisis estadístico de las observaciones*

Plan de muestreo

Si bien los momentos de aplicación de los fungicidas fueron diferentes, el inicio del muestreo es a partir del cuaje de los frutos o bayas, el plan es similar es decir una combinación de aleatorio, sistemático y selectivo, en función de los objetivos del mismo.

La variabilidad fue según lo previsto elevada para muestras de frutas de los lotes de las parcelas tratadas, por lo que se tomaron 5 muestras por lote, fundamentalmente en cuaje, ya que el tamaño de los frutos no es muy homogéneo.

El muestreo *en campo*, el tamaño muestral fue de 300 frutas de diferentes lugares (10 arbustos de altura alta, media y baja y orientación norte, sur, este y oeste) y aproximadamente de un peso de 0,50 a 0,75 kg de muestra.

Tiempos de muestreo

Se estableció como “D₀” o **día 0** “al inicio del cuaje de las bayas, el cual se produce aproximadamente entre los 15 a 18 días posteriores a la floración, teniendo un tamaño de 1,5 a 2 mm. Los intervalos de muestreo fueron establecidos según la estabilidad prevista para dichos analitos y corresponden a los días identificados como: D₀ – D₅ D₁₀ –D₁₅– D₂₀ – D₂₅ y D₃₀

En el caso de aplicaciones en campo al **momento de cuaje**, el muestreo se inicia a las 24 horas postaplicación y los tiempos de muestreos son los mismos. En ambas situaciones, si se observase al día 30 presencia aún de residuos y/o existe retardo en la maduración de los frutos, se continua el muestreo hasta la finalización de la cosecha.

Submuestreo o preparación de las muestras para el análisis en el laboratorio

La metodología aplicada para este tipo de matrices fue el de muestra compuesta a partir de muestras simples o primarias. Se efectuó la homogenización de las bayas y se conservaron congeladas a -20 °C, hasta su reconstitución al momento de ser procesadas analíticamente, para evitar que la degradación continúe. Sin embargo se recomienda su procesamiento inmediatamente de recogidas las muestras.

En el caso, de la determinación de *curvas de degradación de residuos* en frutas envasadas en empaques y destinadas a la exportación, éstas deben ser conservadas en similares condiciones controladas de temperatura, humedad relativa, tipos

de envases, etc., a las que son sometidas durante el transporte hasta el consumidor.

Tratamiento previo de las muestras, condiciones de extracción y cromatográficas

Para el tratamiento previo de las muestras, las condiciones de extracción y cromatográficas, se aplicaron las metodologías analíticas desarrolladas para las muestras de arándanos. Es decir preparación de las muestras en soluciones acuosas de frutas a pH 7, volumen de muestra de 100 ml, agitación magnética de 2000 rpm, 15 minutos de inmersión de la fibra CWX/DVB de 65 μ , y determinación de los analitos por GC-NPD.

Sin embargo, es de destacar que la matriz posee ciertas diferencias de acuerdo al grado de madurez y la relación superficie/peso de los frutos, lo que se debe tener en cuenta en el momento de discusión de los resultados y al arribo de conclusiones al respecto.

El *método de calibración* utilizado fue a partir de soluciones acuosas de frutas adicionadas, tal como se ha expresado para muestras de empaques.

De las respuestas cromatográficas expresadas en áreas y alturas de pico y de la curva de calibración se obtuvieron los resultados expresados en mg/kg de fruta para cada día de muestreo. Estos fueron analizados estadísticamente a fin de establecer las curvas de disipación correspondientes y observar la cinética de degradación.

Análisis estadístico

- Análisis unidimensional de las observaciones.
- Determinación de las curvas de disipación de los residuos de los fungicidas aplicados en floración y cuaje de los frutos. Persistencia relativa de los residuos.
- Determinación de la cinética de degradación y vida media residual.
- Curvas de regresión y análisis de los parámetros estadísticos correspondientes.

Resultados y Conclusiones

A fin de establecer la dinámica del proceso, se determinó simultáneamente la curva de crecimiento del sustrato vegetal y evaluó la disipación progresiva de los residuos. En este proceso de disipación los mecanismos más importantes son: la eliminación por agentes físicos, eliminación aparente por crecimiento de los frutos y la degradación química.

Los frutos o bayas de arándanos tienen al momento de cuaje un tamaño muy pequeño, de 1 a 1,5 mm de diámetro, alcanzando para la variedad O`Neal, un valor de 14 a 15 mm al momento de maduración completa. Su velocidad de crecimiento hasta la madurez es relativamente alta, aproximadamente de 18 a 35 días, según las condiciones climáticas; además la maduración en la planta no es homogénea, requiriéndose recolectar los frutos, 8 veces por planta en cada temporada de cosecha, produciéndose una importante variabilidad en los residuos.

Los resultados de las curvas de crecimiento de los frutos, de la variedad O`Neal, se obtuvieron a partir de la variación del diámetro ecuatorial de las bayas, desde el cuaje de los frutos considerado día cero (D_0), hasta su maduración óptima, el cual es un tiempo muy variable y de aproximadamente 18 y hasta 35 días. Se detallan a continuación los resultados de los diferentes muestreos efectuados durante las temporadas agrícolas correspondientes (tabla 37 y figura 38):

Tabla 37. Variación del Tamaño de las bayas - Diámetro ecuatorial Promedio expresado en mm - ($n= 120$ y $\alpha= 0,05$)

| Días Muestreo | D_0 | D_5 | D_{10} | D_{15} | D_{20} | D_{25} | D_{30} | D_{35} |
|-------------------------|-------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Diámetro Promedio en mm | 1,78 | 3,4 | 5,58 | 10,78 | 13,34 | 14,34 | 15,2 | 15,56 |
| Desviación Estándar | 0,19 | 0,16 | 0,19 | 0,19 | 0,24 | 0,24 | 0,16 | 0,23 |
| RSD% | 10,81 | 4,65 | 3,45 | 1,78 | 1,81 | 1,68 | 1,04 | 1,48 |

En cada muestreo, según lo planificado, se tomaron 300 frutos pero sólo al 40% ($n= 120$) se le efectuaron las mediciones de su diámetro ecuatorial. En la figura 38 se observan las curvas de crecimiento de las bayas de cinco muestreos.

Dichas curvas muestran que la velocidad de crecimiento es variable, en las que se distinguen tres etapas. La primera etapa corresponde a la variación de tamaño desde el cuaje hasta el día 10, seguida de otra etapa de crecimiento rápida hasta el día 20. En esta etapa los frutos tienen aproximadamente un tamaño de

13 mm y algunos frutos presentaron la pigmentación característica de maduración parcial.

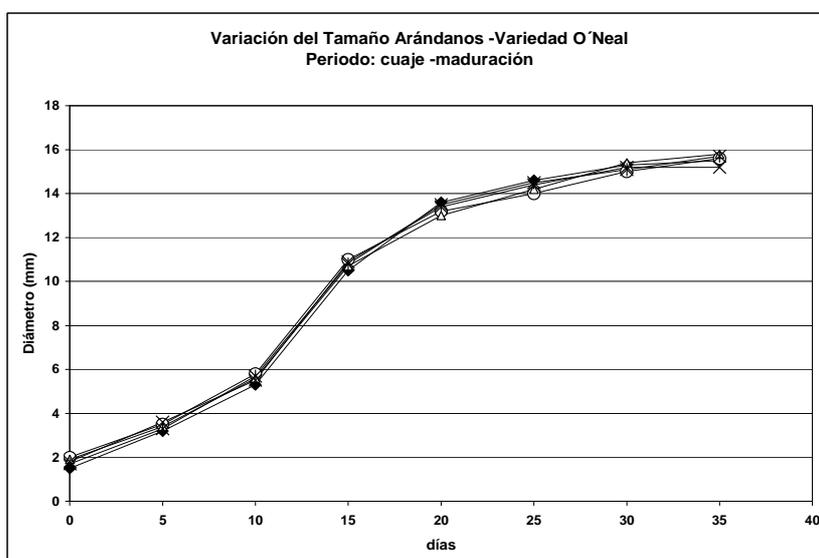


Figura 38. Curva de crecimiento -Diámetro ecuatorial bayas (mm.)

En la tercera etapa, podemos observar que la velocidad decrece, los frutos tienen el grado de madurez muy próximo al óptimo y en muchos casos ya se ha alcanzado. Es por este motivo que se efectúan 8 cosechas en cada temporada, a fin de evitar pérdidas por sobremadurez de los frutos. El tamaño final de los arándanos de esta variedad, osciló en un intervalo de 13,5 a 15,5 mm de diámetro ecuatorial.

Los resultados corresponden a la evolución de los residuos en los frutos, desde el cuaje hasta su cosecha o maduración óptima, independientemente del momento de aplicación, fueron analizados estadísticamente y los mismos se presentan a continuación.

Curvas de Degradación de los plaguicidas aplicados en floración

En las tablas 38 y 39, y figura 39 se pueden observar los resultados correspondientes a la disipación del Propiconazole I y II, expresados los residuos en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fruta.

Tabla 38. Evolución de los Residuos de Propiconazole I en Arándanos - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Días | R ₀ | R ₅ | R ₁₀ | R ₁₅ | R ₂₀ | R ₂₅ |
|---|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Promedio Residuos $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta | 322 | 168 | 92 | 23,2 | 12 | 5 |
| Desviación Estándar | 34,9 | 41,5 | 19,2 | 5,6 | 3,5 | 1,6 |
| RSD % | 10,85 | 24,69 | 20,91 | 24,27 | 29,46 | 31,62 |
| Intervalo confianza | ± 40 | $\pm 47,7$ | $\pm 22,1$ | $\pm 6,5$ | $\pm 4,1$ | $\pm 1,8$ |

Tabla 39. Evolución de los Residuos de Propiconazole II en Arándanos - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Días | R ₀ | R ₅ | R ₁₀ | R ₁₅ | R ₂₀ | R ₂₅ | R ₃₀ |
|---|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Promedio Residuos $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta | 536 | 214 | 60,8 | 25,6 | 15,8 | 8,8 | 2,3 |
| Desviación Estándar | 45,1 | 30,5 | 13 | 5,4 | 3,1 | 2,6 | 0,5 |
| RSD % | 8,41 | 14,25 | 21,32 | 21,14 | 19,71 | 29,41 | 19,61 |
| Intervalo confianza | $\pm 51,8$ | $\pm 35,1$ | $\pm 14,9$ | $\pm 6,2$ | $\pm 3,6$ | ± 3 | $\pm 0,5$ |

Se observa que para el isómero Propiconazole II, los residuos aún persisten al día 30, aunque el valor medio es muy

bajo. Los coeficientes de variación, si bien, son en algunos casos altos, están dentro de los rangos esperados y aceptados por la bibliografía para este tipo de muestras.

Se considera relevante recordar que, si bien se han presentado los resultados en forma independiente para los isómeros del Propiconazole, los residuos representativos de la aplicación de este fungicida corresponden a la suma de los valores medios de ambos isómeros, sin embargo, los valores medios finales en el momento de cosecha son aún menores a los LMR establecidos.

La evolución de los residuos para Tebuconazole se presenta en la tabla 40.

Tabla 40. Evolución de los Residuos de Tebuconazole en Arándanos - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Días | R ₀ | R ₅ | R ₁₀ | R ₁₅ | R ₂₀ | R ₂₅ |
|----------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Promedio µg/ kg fruta | 681 | 286 | 82,6 | 32 | 20 | 4,0 |
| Desviación Estándar | 15,2 | 6,5 | 13,3 | 7,1 | 5,2 | 1,6 |
| RSD % | 2,23 | 22,20 | 16,05 | 22,32 | 26,22 | 39,53 |
| Intervalo confianza | ±17,4 | ±73,0 | ±15,2 | ±8,2 | ±6,0 | ±1,8 |

De las curvas de degradación comparativas para los analitos evaluados en la siguiente figura, podemos observar que la velocidad de degradación es diferente, aún para los isómeros del Propiconazole.

En la primera etapa, desde el día 0 hasta 10 a 15 días, ésta es muy rápida para todos, pero es el Tebuconazole el de mayor pendiente y el Propiconazole el de más lenta velocidad.

Sin embargo, en la etapa final o fase lenta del proceso de disipación, es el Propiconazole II el de mayor persistencia.

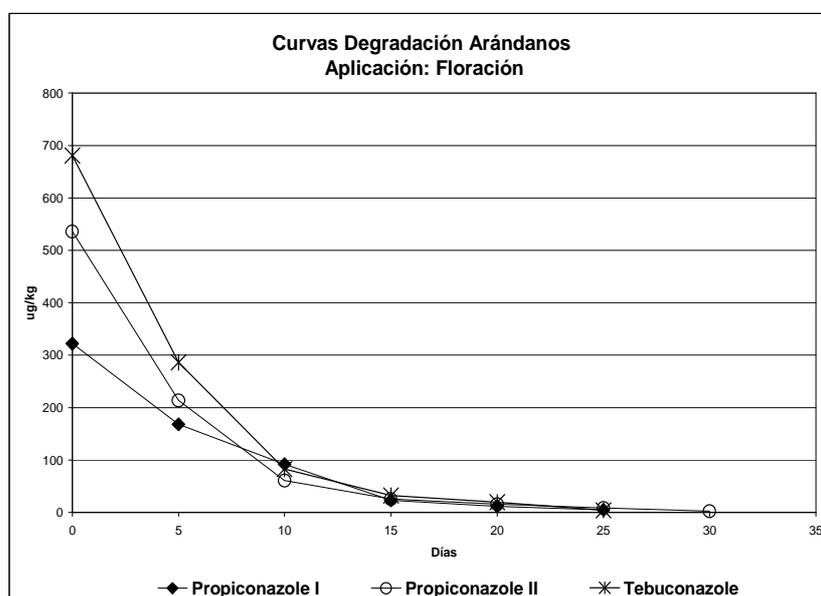


Figura 39. Curvas de Degradación Propiconazole y Tebuconazole - Aplicación: floración CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

Los niveles residuales o carga inicial (R_0), expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fruta, difieren para los analitos en cuestión, siendo las causas muy diversas. Las aplicaciones se efectuaron al momento de la floración y el muestreo comienza cuando se produce el cuaje de los frutos; el tiempo transcurrido es aproximadamente de 10 a 15 días y evidentemente todos los factores han actuado sobre los residuos y la degradación se ha iniciado.

Al día 15 los valores medios de residuos de los analitos prácticamente son semejantes, sin embargo, esta comparación no es correcta puesto que si analizamos la persistencia relativa, es decir la persistencia respecto a la carga inicial de residuos a ese

tiempo, los porcentajes son diferentes. Existiendo en realidad, semejanzas para Propiconazole II y Tebuconazole a R_{15} . En la tabla 41 se puede observar la persistencia relativa de los residuos de los analitos respecto a la carga inicial en los frutos.

Tabla 41. Persistencia Relativa - Propiconazole I - II y Tebuconazole
Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Analitos | Carga inicial Residuos $\mu\text{g/Kg}$ | % de Persistencia | | | | | |
|------------------|---|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | R_0 | R_5 | R_{10} | R_{15} | R_{20} | R_{25} | R_{30} |
| Propiconazole I | 322 | 52,2 | 28,6 | 7,2 | 3,7 | 1,6 | 0 |
| Propiconazole II | 536 | 39,9 | 11,3 | 4,8 | 2,9 | 1,6 | 0,4 |
| Tebuconazole | 681 | 42,0 | 12,1 | 4,7 | 2,9 | 0,6 | 0 |

Se puede observar que el depósito del plaguicida sobre el vegetal, a partir del momento de la aplicación y a lo largo del tiempo va disminuyendo progresivamente por la acción de varias causas y éstas a su vez, influenciadas por distintos factores. El conjunto de unos y otros determinan el modelo y velocidad de disipación del plaguicida y la cantidad de residuos en un momento dado.

En general las reacciones de disipación son de primer orden lo cual debe verificarse experimentalmente y determinar la constante (k) específica de la velocidad de reacción según las ecuaciones ya planteadas

$$\text{Velocidad de reacción} = \frac{-d[R]}{dt} = k[R] \quad (45)$$

$$-\int_{R_0}^{R_t} \frac{dR}{[R]} = \int_0^t k dt \quad (46)$$

$$\text{aplicando } \ln \frac{[R_0]}{[R_t]} = k t \quad (47)$$

Es decir que conociendo k podemos predecir el valor de los Residuos a un tiempo determinado (R_t) dentro del período considerado, partiendo de un nivel residual a tiempo cero igual a R_0 . En general, si graficamos la cantidad de residuos en el vegetal en función del tiempo, se observa la evolución de los mismos en una curva de tipo aproximadamente exponencial y la expresión analítica de estas curvas corresponde a una ecuación del tipo:

$$R_t = R_0 e^{-kt} \quad (48)$$

A fin de no utilizar ecuaciones exponenciales se suele efectuar una transformación a través de una regresión lineal semilogarítmica y así la curva se transforma en una recta del tipo:

$$\ln R_t = \ln R_0 - K t \quad (49)$$

es decir:

$$\ln R_t = A - K t \quad (50)$$

donde $A = \ln R_0$ y K representa la pendiente de la recta afectada de signo negativo, pues es decreciente. De esta forma A y K son las constantes, mientras que t y R_t son las variables, la segunda dependiente de la primera.

Se efectuó la representación gráfica de los valores de los residuos en función del tiempo en ejes semilogarítmicos y los resultados se analizaron estadísticamente. Las curvas fueron determinadas graficando $\ln R$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de fruta) vs. tiempo.

En las figuras 40, 41 y 42 se presentan los resultados para los diferentes analitos. La ecuación del modelo ajustado para Propiconazole I es la siguiente:

$$\ln R (\mu\text{g}/\text{kg}) \text{ Propiconazole I} = 5,91956 - 0,173447 \cdot \text{días} \quad (51)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99%. El estadístico R^2 es igual a 96,5416% y el coeficiente de correlación es igual a -0,982556, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Puesto que, del estadístico Durbin-Watson (DW) el p-valor es superior a 0,05, no hay indicio de autocorrelación serial en los residuos.

Se determinaron los predichos usando el modelo ajustado y de tabla se determinaron los intervalos de predicción para las nuevas observaciones y los intervalos de confianza para la media de muchas observaciones con un 95% de nivel de confianza. Dado que p-valor (Kolmogorov-Smirnov) es igual a 0,9725,

podemos establecer que los residuos proceden de una distribución normal con un nivel de confianza de al menos un 90%

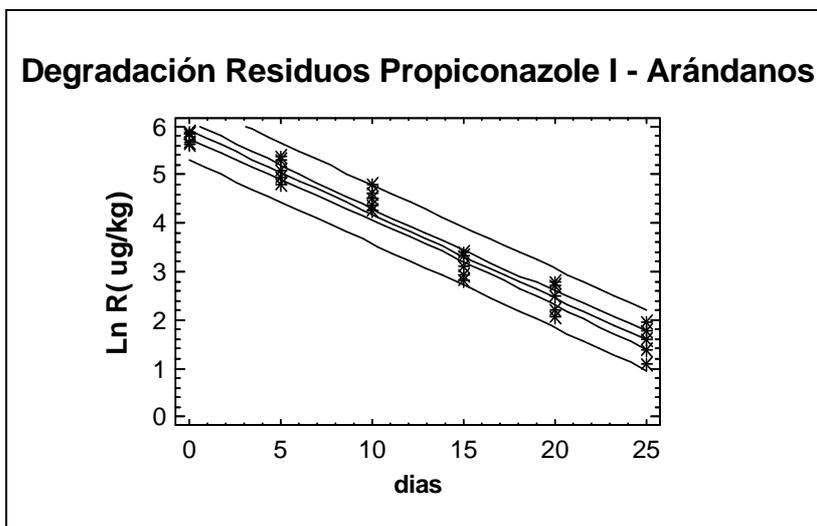


Figura 40. Curva de Regresión - Disipación de Propiconazole I - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

$$\ln R (\mu\text{g/kg}) \text{ Propiconazole II} = 6,11058 - 0,172564 \cdot \text{Dias} \quad (52)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0.01, existe relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R^2 es de 97,18 % y el coeficiente de correlación es igual a -0,9858. Se estableció la independencia y normalidad de los residuos.

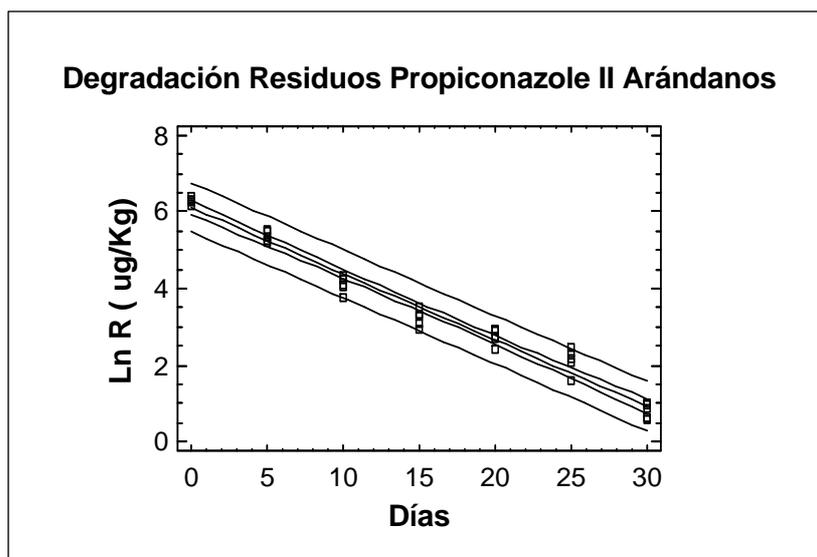


Figura 41. Curva de Regresión - Disipación de Propiconazole II - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

Los resultados que muestran la evolución de los residuos de Tebuconazole en las muestras de arándanos se detallan en la figura 42, donde se grafica la variación de $\ln R(\mu\text{g/kg}$ de fruta) en función de los días. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\ln R (\mu\text{g/kg}) \text{ Tebuconazole} = 6,54846 - 0,200017 \cdot \text{días} \quad (53)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99%. El estadístico R^2 es de 96,75% y el coeficiente de correlación es igual a -0,984. Del p-valor del estadístico Durbin-Watson (DW) y de Kolmogorov-Smirnov se estableció la independencia y normalidad de los residuos.

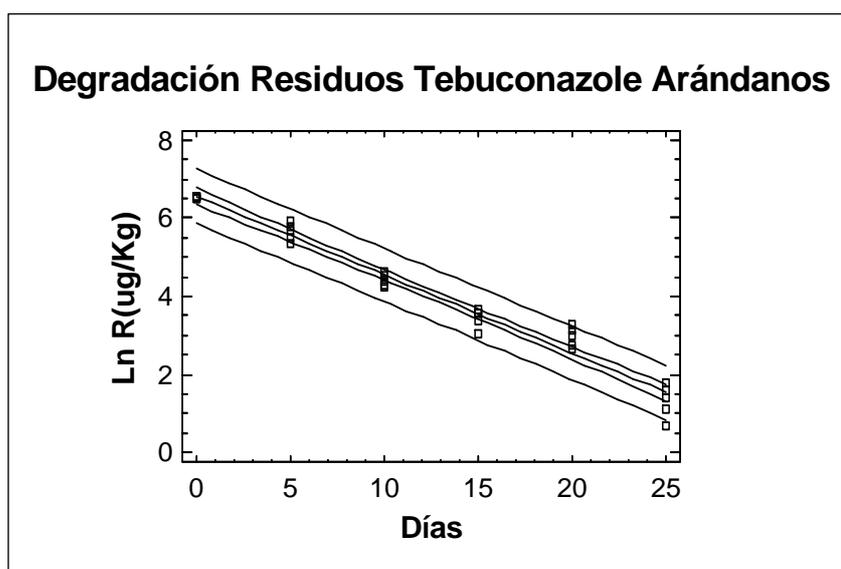


Figura 42. Curva Regresión – Disipación de Tebuconazole - Aplicación: Floración - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

Las ecuaciones de las curvas nos permiten establecer que existen diferencias en la disipación de los residuos para los diferentes analitos pero en todos los casos corresponden a una cinética de primer orden.

$$\ln R (\mu\text{g/kg}) \text{ Propiconazole I} = 5,91956 - 0,173447 \cdot \text{días} \quad (54)$$

$$\ln R (\mu\text{g/kg}) \text{ Propiconazole II} = 6,11058 - 0,172564 \cdot \text{Días} \quad (55)$$

$$\ln R (\mu\text{g/kg}) \text{ Tebuconazole} = 6,54846 - 0,200017 \cdot \text{días} \quad (56)$$

En función de las curvas de disipación se han podido predecir los niveles residuales a un tiempo determinado de

aplicación, verificándose además la concordancia con los obtenidos experimentalmente.

La vida residual media (VR_{50}) es una medida cuantitativa de la persistencia de los residuos y fue calculada a partir de la curva de disipación, ya que basta tomar en ordenadas el valor de residuo correspondiente al 50% del depósito inicial y determinar en el eje de abscisas cuantos días han transcurrido desde la aplicación.

De las ecuaciones puede deducirse y ser expresada como el valor de vida residual media: $T = \frac{\ln 0.5}{-k} = \frac{0.693}{k}$

De dicha ecuación, podemos observar que es independiente de la cantidad inicial de residuo.

Aplicando esta ecuación y a partir los resultados obtenidos podemos comprobar, tal como se puede observarse en los datos de persistencia relativa, los valores de VR_{50} para los analitos es aproximadamente de **4 a 5 días (R_5)**. Pero se reitera que, ya ha transcurrido un tiempo (18 días promedio) desde la aplicación (al momento de floración) hasta el cuaje de los frutos, y por lo tanto ésta sólo se refiere a la reducción del 50% de los residuos a partir del muestreo. Esta reducción relativamente alta puede deberse a una *eliminación aparente* de los residuos, ya que el crecimiento de las bayas es rápido, alcanzando un tamaño tres veces mayor al inicial. La relación superficie/peso cambia y esto se traduce en una disminución aparente de los valores de residuos expresados en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de fruta.

Por otro lado, el sistema de riego en el cultivo, pudo ser

otro factor de incidencia en la eliminación, ya que el mismo se efectuaba por aspersión. El agua sobre los residuos tiene una acción física por arrastre y química, por disolución de los residuos presentes en la superficie de los frutos.

La estimación del valor de la vida residual media en este caso corresponde a una sola recta de regresión, pero cuando hay dos o tres dinámicas de disipación, representadas por sus respectivas rectas, de distinta pendiente, la vida media puede calcularse bien en conjunto, o bien para cada una de las dos o tres rectas que representan la curva de disipación del producto.

La vida media de un plaguicida sobre un cultivo concreto, puede tener una variación relativamente amplia. Puede ser considerado un valor práctico y es un valor orientativo, útil para comparaciones relativas, especialmente cuando los factores que influyen en la disipación del plaguicida son relativamente constantes.

Es importante destacar que la legislación (SENASA), para arándanos no especifica los tiempos de carencias para estos plaguicidas, y las referencias son para otros cultivos. Por ejemplo, en bananas es de 1 día y para trigo, cebada, centeno y arroz es de 30 días; pero para poroto y maní, el mismo es de 15 días. Esta variabilidad en los tiempos de carencia posiblemente está relacionada con el tipo de sustrato vegetal, aplicaciones, etc.

La discusión de los distintos factores incidentes sobre la persistencia o degradación de los residuos fue planteada en ítems anteriores, sin embargo, se reiteran algunos, tales como la presencia de ceras en la superficie de los frutos (*pruina*), que favorecen la estabilidad de los residuos, carácter sistémico de los

plaguicidas, estabilidad química, temperatura, actividad enzimática, luz solar, etc.

Dentro del tejido vegetal, la degradación es menos afectada por los factores climáticos, aunque si por la temperatura. Esta degradación es más compleja y la velocidad de metabolización interna es muy variable y está determinada por acciones enzimáticas, propias del tejido vegetal.

La disipación de los plaguicidas sobre o en el interior de los vegetales se debe a diversas causas, cada una de ellas a su vez influenciada por distintos factores que pueden tener influencias múltiples y además interaccionan entre sí, por lo que el proceso es en realidad muy complejo y variable.

Es indiscutible que un alimento libre de plaguicidas es, desde todo punto de vista el más adecuado para el consumidor. Sin embargo, las tecnologías de insumo son las más tradicionales; es decir, la aplicación de fungicidas sigue siendo necesaria para el productor.

La transferencia de los resultados al sector agroindustrial, permite la toma de decisiones preventivas, estableciendo pautas sobre la transformación a efectuar en los diferentes procesos tecnológicos de producción, a fin de minimizar las dosis para control de plagas.

Curvas de Degradación: Aplicación de los plaguicidas al momento del cuaje de los frutos

La fundamental diferencia respecto a las curvas de disipación anteriormente analizadas, es el momento de aplicación de los plaguicidas, lo cual necesariamente influye en la formación

de los depósitos y por ende, en la carga inicial de residuos en los frutos y en la disipación de los mismos. En este caso los plaguicidas son directamente aplicados sobre las bayas ya formadas, con un tamaño de aproximadamente 1,5 a 2,0 mm de diámetro ecuatorial.

Se reitera que se seleccionaron dos lotes específicos para la evaluación de los residuos de tebuconazole, un lote A y un lote B, en el primero se efectuó una sola aplicación y en el lote B se efectuaron 3 aplicaciones, como caso extremo de dosis y situación de máximo riesgo respecto al cumplimiento de los LMRs al momento de la cosecha.

La metodología analítica y el tratamiento estadístico de los resultados son similares a lo ya explicitado. La disipación de los residuos de Tebuconazole en los frutos correspondientes al muestreo del lote B puede observarse en las figuras 43 y 44, donde se grafica ppb o $\mu\text{g}/\text{kg}$ fruta y $\ln R$ en función del tiempo (en días).

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\ln R (\mu\text{g}/\text{kg}) \text{ Tebuconazole} = 7,42789 - 0,055683 \cdot \text{días} \quad (57)$$

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99%. El estadístico R^2 es de 98,63% y el coeficiente de correlación es igual a -0,993. El p-valor superior a 0.05 del estadístico Durbin-Watson y P-Valor = 0,559 de Kolmogorov-Smirnov indicaron la independencia y normalidad de los residuos

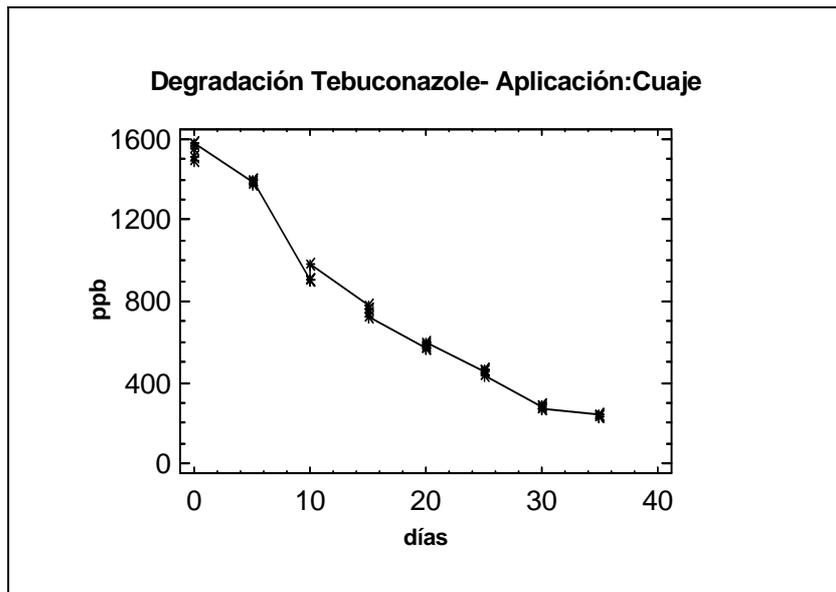


Figura 43. Evolución de los Residuos de Tebuconazole en Arándanos – 3 Aplicaciones- Cuaje - Lote B- CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

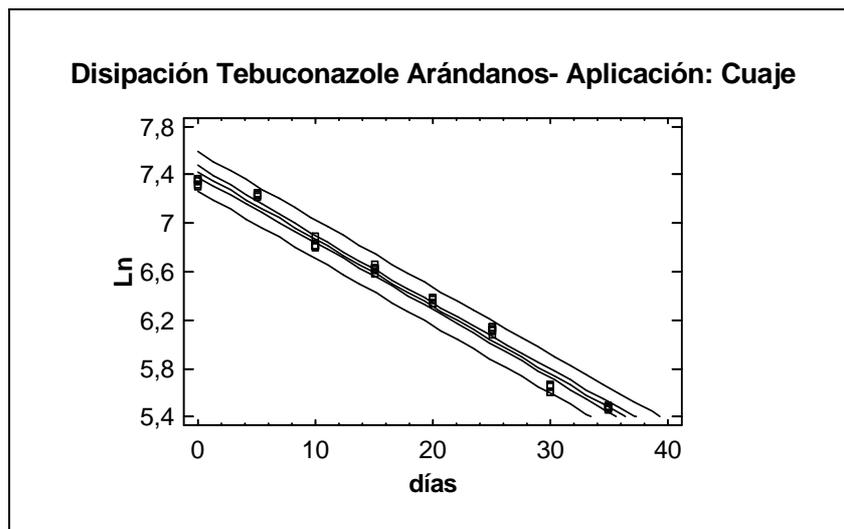


Figura 44. Curva Regresión - Disipación Tebuconazole – 3 Aplicaciones: Cuaje Lote B - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

En las tablas 42 y 43 se presentan los resultados correspondientes a los valores medios de las observaciones y la persistencia relativa en función de la carga inicial de residuos de Tebuconazole en los frutos.

Tabla 42. Evolución Valores Medios Residuos de Tebuconazole – 3 Aplicaciones: Cuaje – Lote B - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Días | R ₀ | R ₅ | R ₁₀ | R ₁₅ | R ₂₀ | R ₂₅ | R ₃₀ | R ₃₅ |
|---|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Valores Medios $\mu\text{g/kg}$ fruta | 1541 | 1388 | 921 | 754 | 580 | 456 | 282 | 239 |
| Desviación estándar | 40 | 10 | 33 | 20 | 12 | 11 | 9 | 2 |
| RSD % | 2,61 | 0,73 | 3,55 | 2,66 | 2,00 | 2,36 | 3,11 | 0,80 |
| Intervalo confianza \pm | 46 | 12 | 38 | 23 | 13 | 12 | 10 | 2 |

Tabla 43. Persistencia Relativa -Residuos de Tebuconazole – 3 Aplicaciones: Cuaje – Lote B- CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Carga inicial R ₀ = 1541 $\mu\text{g/kg}$ | Tebuconazole Aplicación Cuaje | | | | | | |
|---|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | R ₅ | R ₁₀ | R ₁₅ | R ₂₀ | R ₂₅ | R ₃₀ | R ₃₅ |
| % Persistencia | 90,1 | 59,7 | 48,9 | 37,6 | 29,6 | 18,3 | 15,5 |

La evolución de los residuos en este caso, es algo diferente a la disipación cuando se efectúa la aplicación en el momento de la floración. De las curvas respectiva, podemos

observar que se produce la reducción del 50% de los residuos entre los días 12 y 13, ya que la **$V R_{50} = 12,5$** .

Podemos observar, que el nivel o carga inicial de los residuos en los frutos, al día posterior de la aplicación (R_0) es alta. El crecimiento y maduración de las bayas finaliza aproximadamente a los 30 a 35 días y la degradación en este periodo, no logra niveles de residuos aceptables en los frutos.

Resolver adecuadamente el control de plagas al momento de cuaje es realmente compleja, ya que con las dosis y concentraciones tradicionales, los residuos presentes al momento de la cosecha son superiores a los LMR establecidos.

Es evidente que debe modificarse la práctica agrícola, bajando dosis y concentración de este plaguicida cuando es aplicado en el cultivo al momento del cuaje de los frutos. La relevancia de disponer de datos orientativos, como curvas de degradación y vida residual media, permite prever relativamente estas situaciones, sin embargo, la realidad supera a veces las expectativas.

En virtud de los resultados observados y frente a una posible situación de descarte de los frutos cosechados, las alternativas factibles y la toma de decisiones deben efectuarse en los empaques. Esto involucra, como último recurso, mezclar estos lotes con altos niveles residuales con otros libres de plaguicidas, logrando así, reducir el promedio de los residuos en la partida final.

Para una sola aplicación, a la misma concentración, los valores medios de las observaciones, al día posterior a la aplicación, fueron de **$172 (\pm 5,7) \mu\text{g/kg frutos}$** , la curva de

degradación permitió determinar que al momento de la cosecha los residuos en las bayas maduras no superaron los LMR. La importancia de los resultados es la transferencia al sector, el cual, a través de sus profesionales, pueden disponer de una información orientativa para la toma de decisiones correctivas en sus prácticas agrícolas.

Respecto a Propiconazole fue efectuada una sola aplicación, al momento de cuaje de los frutos, a las condiciones ya especificadas. Los resultados correspondientes a la evolución de los residuos se presentan para cada isómero en cuestión (figuras 45 y 46).

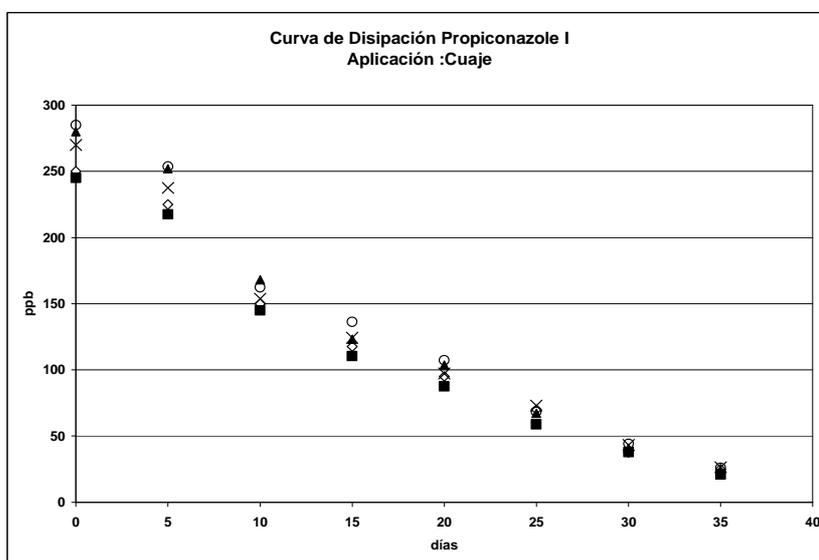


Figura 45. Curva Disipación Propiconazole I ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vs. días) - Aplicación: Cuaje – Lote A - CWX/DVB ($n=5$ y $\alpha = 0,05$)

La ecuación del modelo ajustado de la curva de disipación es:

(58)

$\ln R$ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Propiconazole I = $5,75145 - 0,0672908 \cdot \text{días}$

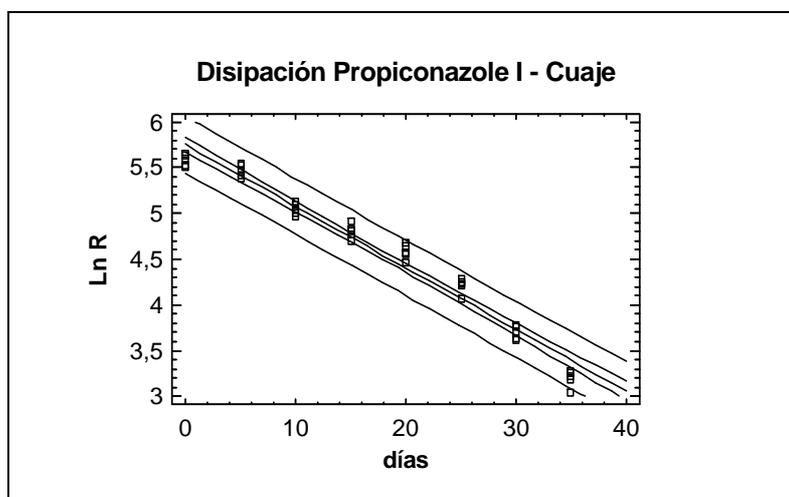


Figura 46. Curva Disipación Propiconazole I ($\ln R$ vs. días)- Aplicación: Cuaje –Lote A - CWX/DVB ($n=5$ y $\alpha = 0,05$)

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99%. El estadístico R^2 es de 96,64% y el coeficiente de correlación es igual a -0,983. El p-valor del estadístico Durbin-Watson (DW) y Kolmogorov-Smirnov indicaron la independencia y normalidad de los residuos

En la tabla 44 y 45 se presentan los resultados correspondientes a los valores medios de las observaciones y de la persistencia relativa, en función de la carga inicial de los residuos de Propiconazole I en los frutos.

A partir de la curva de disipación se determinó la vida media V_{50} para Propiconazole I aplicado al momento del cuaje de las bayas, siendo la misma de aproximadamente de **11 días**.

Tabla 44. Evolución de los Residuos de Propiconazole I - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Días | R ₀ | R ₅ | R ₁₀ | R ₁₅ | R ₂₀ | R ₂₅ | R ₃₀ | R ₃₅ |
|---|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Valores Medios $\mu\text{g/kg}$ fruta | 266 | 237 | 156 | 122 | 98 | 67 | 41 | 24 |
| Desviación estándar | 18 | 16 | 9 | 10 | 8 | 5 | 3 | 2 |
| RSD % | 6,70 | 6,76 | 5,97 | 7,81 | 7,86 | 7,84 | 7,49 | 8,81 |
| Intervalo confianza | ± 20 | ± 18 | ± 11 | ± 11 | ± 9 | ± 6 | ± 4 | ± 2 |

Tabla 45. Persistencia Relativa -Residuos de Propiconazole I - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Carga inicial R₀ = 266 $\mu\text{g/kg}$ | Propiconazole I - Aplicación Cuaje | | | | | | |
|--|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | R₅ | R₁₀ | R₁₅ | R₂₀ | R₂₅ | R₃₀ | R₃₅ |
| % Persistencia | 89,2 | 58,6 | 46,0 | 36,9 | 25,3 | 15,3 | 9,2 |

Los resultados correspondientes a la degradación de los residuos de Propiconazole II se detallan en figuras (47 y 48), tablas (46 y 47).

Siendo la ecuación del modelo ajustado:

$$\ln R \text{ Propiconazole II} = 5,89362 - 0,0606566 \cdot \text{días} \quad (59)$$

El estadístico R^2 es igual a 97,836% y el coeficiente de correlación de -0,989, indicando una relación relativamente fuerte

entre las variables. Los estadísticos Durbin-Watson y Kolmogorov, indicaron la independencia y normalidad de los residuos

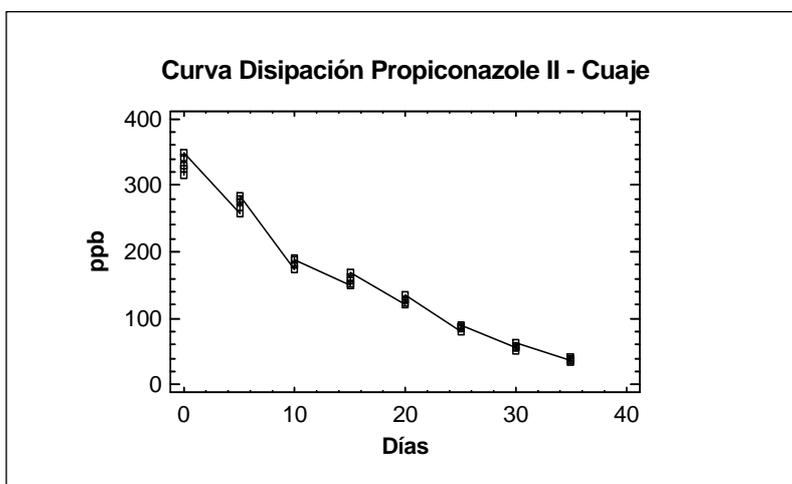


Figura 47. Curva Disipación Propiconazole II (ppb vs. días) -Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

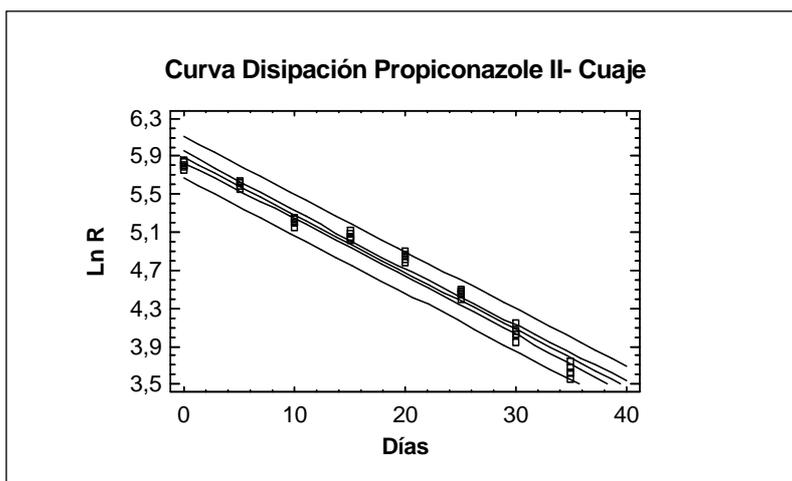


Figura 48. Curva Disipación Propiconazole II (ln R vs. días) - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

Tabla 46. Evolución de los Residuos de Propiconazole II - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Días | R ₀ | R ₅ | R ₁₀ | R ₁₅ | R ₂₀ | R ₂₅ | R ₃₀ | R ₃₅ |
|---------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Valores Medios $\mu\text{g/kg}$ fruta | 332 | 272 | 170 | 163 | 132 | 100 | 57 | 38 |
| Desviación estándar | 14 | 10 | 6 | 5 | 5 | 7 | 4 | 3 |
| RSD % | 4,16 | 3,60 | 3,75 | 3,28 | 3,54 | 6,86 | 7,19 | 7,26 |
| Intervalo confianza | ± 16 | ± 11 | ± 7 | ± 6 | ± 5 | ± 8 | ± 5 | ± 3 |

Tabla 47. Persistencia Relativa -Residuos de Propiconazole II - Aplicación: Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

| Carga inicial R ₀ = 332 $\mu\text{g/kg}$ | Propiconazole II - Aplicación Cuaje | | | | | | |
|--|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | R ₅ | R ₁₀ | R ₁₅ | R ₂₀ | R ₂₅ | R ₃₀ | R ₃₅ |
| % Persistencia | 81,9 | 51,1 | 49,0 | 39,7 | 30,1 | 17,1 | 11,5 |

De los resultados de persistencia podemos observar que los residuos logran, al momento de la cosecha de los frutos, estar por debajo de los LMR requeridos, pero debe tenerse en cuenta que los niveles residuales de Propiconazole en los frutos es la

suma de los dos isómeros, siendo ésta de 62 µg/kg de fruta. Por lo que se sobrepasa ligeramente el LMR de 50 µg/kg.

La bibliografía establece que para rechazar un producto por el no cumplimiento de los LMR, los residuos pueden tener un 50% de variabilidad respecto al mismo, es decir 50 ± 25 ppb. Este concepto se trató en las mesas de discusión en el 2nd Latin American Pesticide Residue Workshop-LAPRW 2009, según los criterios de la Comunidad Europea. Sin embargo, muchas veces los mercados imponen sus propias reglas al respecto y estas consideraciones son dejadas de lado o utilizadas como barreras en la comercialización.

La V_{50} calculada es de 11,5 días, siendo ésta, ligeramente mayor a la de su otro isómero, puesto que el mismo tiene una V_{50} de 10,3 días. La comparación de la evolución de los residuos a tiempos diferentes de aplicación (floración y cuaje), es observada en las curvas de disipación de figura 49.

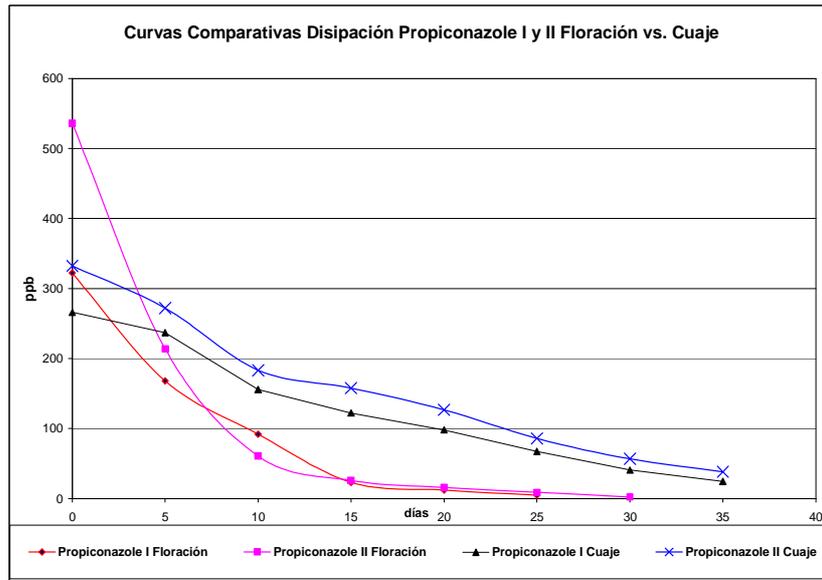


Figura 49. Curvas comparativas Disipación Propiconazole I y II - Floración vs. Cuaje - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

Respecto a la evolución comparativa de los residuos de Tebuconazole aplicado en el momento de floración y cuajes de las bayas, las curvas se presentan en la figura 50.

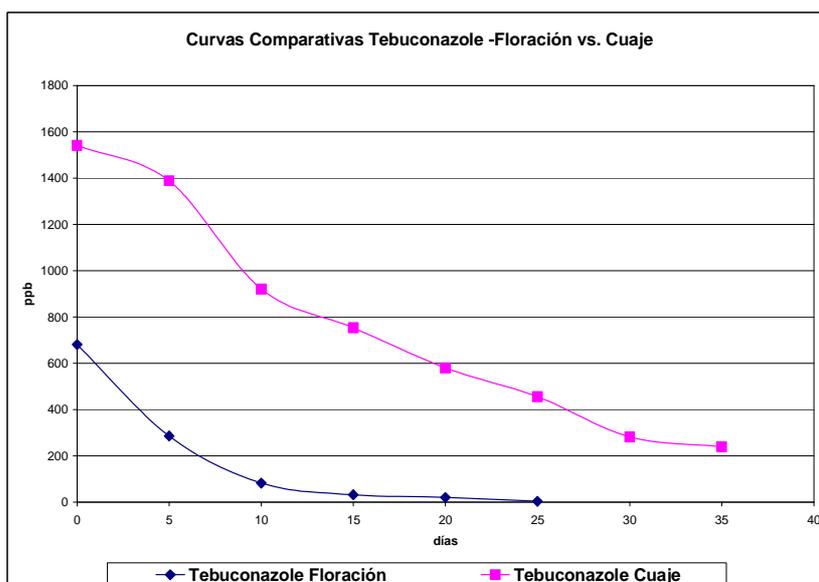


Figura 50. Curvas comparativas Disipación Tebuconazole - Floración vs. Cuaje (Lote B) - CWX/DVB (n=5 y $\alpha = 0,05$)

De las curvas respectivas podemos observar que la evolución de los residuos es diferente, siendo más lenta cuando éstos son aplicados al momento de cuaje de las bayas. Las causas factibles están relacionadas fundamentalmente a factores climáticos, siendo la temperatura el de mayor incidencia.

Desde la floración hasta el cuaje, transcurre un tiempo en el que, las propiedades sistémicas de los fungicidas aplicados hacen que las bayas muestreadas contengan niveles de residuos diferentes. El crecimiento de los frutos es rápido y la relación superficie/ peso incide fundamentalmente en los primeros días del muestreo.

Los niveles de residuos más elevados observados en las bayas, corresponden a Tebuconazole cuando éste es aplicado al momento de cuaje, esta diferencia es notable y debida a las tres

aplicaciones efectuadas. Aunque este fungicida, según las especificaciones del producto, puede ser aplicado hasta tres veces en los cultivos, no se considera recomendable efectuarlas en esta situación, dado que el riesgo es importante.

En varios lotes incógnitas de otros cultivos seleccionados al azar, también se han observado niveles altos de Tebuconazole en frutos postcosecha, esto puede ser debido a factores ambientales, metodologías de aplicación, sobredosis del producto técnico, aplicaciones previas no registradas, error en la preparación, entre otros.

Cuando se evaluaron los lotes en los que sólo se efectuó una aplicación, a la misma concentración, los valores medios de las observaciones fueron de **172 µg/kg frutos**, muy inferior a los anteriores, tal como era de prever. Para esta carga inicial de residuos en los frutos, la curva de degradación permitió determinar que al momento de la cosecha los residuos en las bayas maduras no superaron los LMRs.

Podemos concluir que si se efectúan adecuadas prácticas agrícolas, la utilización de estos fungicidas permite al productor el control de ciertos hongos patógenos, en el marco del cumplimiento de las reglamentaciones vigentes. Sin embargo la realidad es mucho más compleja ya que el ataque a los cultivos es una variable no controlable, aunque pueden efectuarse prevenciones, no siempre son efectivas y se requiere de otras dosis y/o aplicaciones.

VI- Determinación de Triazoles por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masa. Optimización del Sistema PTV en Modo Splits/Splitless y Venteo de Solvente

Introducción

Surge en los últimos años, el desarrollo de nuevos tipos de inyectores acoplados al sistema cromatográfico, tal como el inyector de vaporización de temperatura programada (PTV), a los fines de lograr incrementar la sensibilidad en cromatografía gaseosa y espectrometría de masa. Este inyector en modo de inyección “splitless” (con división) en frío con venteo de solvente tiene dos importantes áreas de aplicación, ya que puede usarse para introducir grandes volúmenes de muestras y para eliminar el solvente, aún con volúmenes normales de inyección en los casos en que el solvente interfiera con la columna o la especificidad del detector (Bosboom et al., 1996; Grob y Biedermann, 1996; Sasano et al., 2000; Sjaak de Koning et al., 2004).

La introducción de un gran volumen de muestra permite mejorar los límites de detección, de gran ventaja para la determinación de plaguicidas a niveles traza. Sin embargo es necesario establecer y optimizar algunas de las múltiples variables que inciden sobre la eficiencia de la vaporización de los pesticidas, detección e identificación cromatográfica (Mol et al., 1996; Stan y Linkerhägner, 1996; Wilson et al., 1997; Wylie, 1997; Engewald et al., 1999; Van Hout et al., 1999; Hada et al., 2000;

Heiden et al., 2001; Zrostlíková et al., 2001; Concha-Graña et al., 2002; Teske y Engewald, 2002; Smith, R., 2003; Stajnbaher et al., 2008; Björklund et al., 2004; Duran Guerrero et al., 2007; González-Rodríguez et al., 2008; De Souza et al., 2009).

El PTV tiene entre otras, la ventaja de concentrar en el inserto del sistema una alta masa de los analitos, que luego son transferidos a la columna. La introducción de un mayor volumen de muestra y múltiples inyecciones permitió reducir los límites de detección y por lo tanto, es de gran ventaja para la determinación de plaguicidas a niveles traza. Sin embargo fue necesario establecer y optimizar algunas de las múltiples variables que inciden sobre la eficiencia de la vaporización de los pesticidas, detección e identificación cromatográfica.

Materiales y Métodos

El equipamiento utilizado fue un cromatógrafo Hewlett Packard 6890, con detector de microcaptura de electrones (μ -ECD), inyector automático e inyector de vaporización con temperatura programada (PTV). Columna capilar HP5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Detector Selectivo de Masa HP 5973. ChemStation HP. Biblioteca NIST y RTLPEst. Los parámetros de control para la programación de la temperatura del PTV son los mismos que para el horno y la columna.

Las inyecciones múltiples se efectuaron programando el muestreador automático acoplado al PTV y controlado desde la ChemStation o estación de trabajo.

Los estándares y reactivos utilizados para la aplicación y optimización de estas metodologías son los ya descritos en otros ítems del presente trabajo.

Resultados y Conclusiones

Se establecieron condiciones cromatográficas previas, a fin de optimizar los parámetros del inyector en modo venteo de solvente, tales como el flujo de venteo del solvente, tiempo de purga, velocidad de calentamiento, volumen de muestra por inyección y número de inyecciones en un programa de inyecciones múltiples. Para tal fin, se utilizaron triplicados de soluciones de estándares de Triadimefon, Penconazole, Propiconazole y Tebuconazole a 1 mg/l en acetato de etilo.

Se pudo observar que las respuestas cromatográficas son máximas para todos los analitos individuales, con una velocidad de calentamiento del inyector de 300 °C/min. Por lo cual, tratándose de un análisis multiresiduos, se estableció dicha velocidad como óptima en el presente trabajo. Optimizada la rampa de temperatura del inyector y del análisis de las curvas obtenidas a diferentes velocidades de flujo de venteo de solvente, se estableció un flujo óptimo de venteo de 180 ml/min.

Para determinar volumen, número e intervalo de inyección en el programa de inyecciones múltiples, fue necesario establecer ciertas consideraciones respecto a la capacidad del volumen del inserto, ya que volúmenes elevados en cada inyección podrían saturar al mismo; además el número elevado de inyecciones en el modo de venteo de solvente, puede producir pérdidas de los

analitos por arrastre y consecuentemente, en ambos casos, una menor respuesta cromatográfica.

El intervalo entre inyecciones se vincula con las características fisicoquímicas del solvente, la retención de los analitos en el inserto y del venteo del solvente. Esto implica que el intervalo debe ser tal que asegure un adecuado venteo sin pérdida de analitos entre cada inyección.

El programa de inyecciones múltiples se estableció inyectando 6 veces un volumen de muestra de 7,5 µl con un intervalo de 6 segundos. Los resultados preliminares de las respuestas cromatográficas obtenidos a partir de los ensayos efectuados, permitieron establecer finalmente las condiciones más adecuadas para la determinación de estos analitos.

Condiciones cromatográficas GC-MSD – PTV en modo “split/splitless”

Cromatógrafo Gaseoso HP 6890N.

Inyector automático Agilent 7683.

Detector selectivo de masa HP5973N.

Temperatura de interfase 280 °C.

Temperatura de cuadrupolo 150 °C.

Fuente de iones 230 °C.

Energía de ionización 70 e.V.

“Solvent delay” o retraso de solvente: 9,8 minutos.

Modo SCAN entre 40 a 550 m/z con 0,2 segundos de “SCAN” o escaneo total de iones. Modo SIM o monitoreo selectivo de iones, para cuantificación.

Columna Agilent HP – 5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm.

Modo: flujo constante. Velocidad de flujo: 1 ml / min.
Presión 7,64 psi.

Gas carrier o portador: Helio 99,9995 % de pureza que previamente pasa a través de trampa de humedad e hidrocarburos.

Condiciones del horno: Temperatura inicial: 80 °C durante 1 minutos. Rampa: a 40 °C / min hasta 280 °C durante 7 minutos.

Sistema del inyector de vaporización con temperatura programada (PTV) en modo "split/splitless"

Modo de inyector "Split/splitless". Volumen de inyección: 1 µl. Tiempo de splitless 1 minutos. Temperatura del inyector: 270 °C. Flujo de purga: 50 ml/min. Tiempo de purga 2 minutos. Flujo de "splitless": 1 ml/min. Tiempo de "splitless": 1,05 min. Tiempo transferencia: 2 min. Flujo de ahorro: 20 ml/min. Tiempo de ahorro: 2 minutos (flujo y tiempo de ahorro: al finalizar el análisis o corrida cromatográfica se programa el flujo a un tiempo determinado para reducir o ahorrar el consumo de gases)

Condiciones cromatográficas GC-MSD – PTV en modo venteo de solvente

Cromatógrafo Gaseoso HP 6890N.
Inyector automático Agilent 7683.
Detector selectivo de masa HP5973N.
Temperatura de interfase 280 °C.
Temperatura de cuadrupolo 150 °C.
Fuente de iones 230 °C.
Energía de ionización 70 e.V.

“Solvent delay” (retraso del solvente): 5 minutos.

Modo SCAN entre 40 a 550 m/z con 0,2 segundos de escaneo. Modo SIM.

Columna Agilent HP – 5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm.

Modo: flujo constante. Velocidad de flujo: 1 ml / min. Presión 7,64 psi.

Gas portador: Helio 99,9995 % de pureza que previamente pasa a través de trampa de humedad e hidrocarburos.

Condiciones del horno: Temperatura inicial: 50 °C durante 1,5 minutos. Rampa: a 25 °C / min hasta 265 °C durante 4 minutos.

Sistema de inyector de vaporización con temperatura programada (PTV) en modo venteo de solvente

Programa de temperatura del inyector: Temperatura inicial 95 °C durante 1,05 minutos. Rampa: a 300 °C / min hasta 270 °C. Flujo de purga: 50 ml/min. Tiempo de purga 2 minutos.

Flujo de venteo: 180 ml/min. Tiempo de venteo: 1,05 min. Tiempo transferencia: 2,5 min. Flujo de ahorro: 20 ml/min. Tiempo de ahorro 2 minutos. Volumen de inyección 7,5 µl. Número de inyecciones: 6, cada 6 segundos.

Previo a las experiencias en modo “SCAN”, se obtuvieron los datos espectroscópicos de los analitos testeados a partir de la información disponible en el “software” de la biblioteca NIST y RTLPEst, a fin de comparar éstos con los datos a obtener experimentalmente.

Se determinaron los tiempos de retención (RT) de los analitos y se seleccionaron los iones característicos para cada

compuesto, identificándose los “target ión” o ión principal, generalmente el de mayor abundancia, y los iones “qualifiers” o calificadores o de diagnóstico.

Los *iones* “qualifiers” se seleccionaron desde el espectro de masa del compuesto, ya que la incorporación de estos iones otorga mayor información al software, al comparar las cantidades relativas de los mismos respecto al “target ion”, logrando una mejor identificación del compuesto.

Los mismos se determinaron a partir de soluciones de estándares en acetato de etilo a 10 ppm, inyección de 2 µl, cromatografía gaseosa y espectrometría de masas (en modo SCAN y PTV en modo “splits/splitless”). En la siguiente tabla se detallan los mismos:

Tabla 48. Triazoles - GC-MSD - PTV en modo split/splitless

| Analito | Grupo | Ion “target” (m/z) | Iones “qualifiers” (m/z) | RT |
|------------------|-------|--------------------------|--------------------------------|--------|
| Triadimefon | 1 | 208,0 | 181 – 128 | 10,331 |
| Penconazole | 2 | 158,9 | 161 – 248 – 250 | 10,640 |
| Propiconazole I | 3 | 172,9 | 259 – 261 – 175 | 12,148 |
| Propiconazole II | 4 | 172,9 | 259 – 261 – 175 | 12,228 |
| Tebuconazol | 5 | 124,9 | 126,9 – 250 | 12,588 |

La identificación de de los analitos permitió la continuidad del desarrollo metodológico para la optimización de las condiciones y cuantificación por *GC-MSD-PTV en modo venteo de solvente*. Los resultados obtenidos fueron procesados y discutidos según la metodología general. Es decir, se cumplieron las etapas correspondientes a la optimización de las técnicas

analíticas y al análisis estadístico (análisis unidimensional de las observaciones, regresión lineal, precisión y límites de detección y cuantificación).

Los ensayos de optimización se llevaron a cabo utilizando quintuplicado de soluciones estándares de triazoles en etilacetato y a diferentes concentraciones.

Los resultados de las observaciones, fueron obtenidos para los distintos analitos en las condiciones cromatográfica establecidas (GC-MSD-PTV) en modo de venteo de solvente, volumen de inyección fue de 7,5 μ l y 6 inyecciones a intervalos de 6 segundos.

Se determinaron los valores medios de las respuestas cromatográfica, la desviación estándar, coeficientes de variación relativa, intervalos de confianza y demás parámetros estadísticos. Los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados indicaron que la muestra procede de una distribución normal, para todas las concentraciones: 1000, 750, 500, 250, 100, 50 y 10 μ g/l en etilacetato de los diferentes analitos, para $n= 5$ y $\alpha= 0,05$.

A partir de los resultados obtenidos del análisis unidimensional y para todos los analitos, se determinó la independencia y normalidad de los residuos para el nivel de confianza establecido. Se establecieron las ecuaciones de las rectas, el estadístico $R^2 = 99,997\%$ indica la relación entre las variables y graficaron las curvas de regresión lineal para soluciones mezcla de estándares de triazoles y los parámetros estadísticos que permitieron establecer la idoneidad del modelo ajustado. En la figura 51 se presentan las gráficas correspondientes.

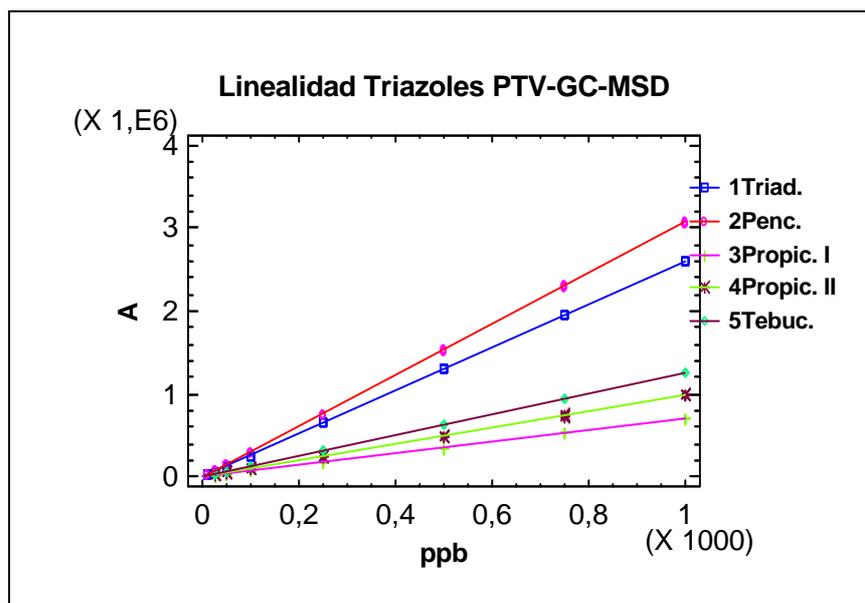


Figura 51. Linealidad Triazoles - PTV-GC/MSD-7,5 μ l – 6 inyecciones - (n = 5 y α = 0,05)

Los parámetros estadísticos requeridos para determinar la precisión del sistema, se han obtenido a partir de los resultados expresados en el análisis unidimensional de las observaciones. En los que se han incluido los intervalos de confianza de la medida, de acuerdo a la distribución *t* de Student, para n= 5 mediciones individuales con $v = n-1$ grados de libertad y $\alpha = 0,05$ y para cada concentración de los analitos.

Podemos observar que la precisión es adecuada, para casi todas las concentraciones de los analitos. Sin embargo para Propiconazole I y II a 25 μ g/l, los RSD son ligeramente superiores, según los criterios establecidos (RSD no mayor a 1,5-2,0 %), ya que los mismos son de 2,40 y 2,70% respectivamente.

Límites de detección y cuantificación

Los límites *de detección* y *de cuantificación* se estimaron a partir de la curva de regresión, para tres bajas concentraciones de los analitos, $n = 30$ determinaciones individuales y $\alpha = 0,05$.

Se calcularon a partir de las ecuaciones en las que se considera 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco respectivamente, para n determinaciones individuales (tabla 49).

Tabla 49. Límites de Detección y Cuantificación Triazoles PTV-GC/MSD-7,5 μ l – 6 inyecciones ($n = 30$ y $\alpha = 0,05$)

| Analitos | Límite de Detección | Límite de Cuantificación |
|-------------------------|---------------------|--------------------------|
| | μ g/l | μ g/l |
| Triadimefon | 2,65 | 2,88 |
| Penconazole | 2,22 | 2,71 |
| Propiconazole I | 3,05 | 3,78 |
| Propiconazole II | 3,41 | 3,95 |
| Tebuconazole | 2,33 | 2,55 |

La utilización optimizada del puerto de inyección (PTV), ha permitido incorporar volúmenes de nuestras elevados y al ventear el solvente, los analitos se concentran en el inserto resultando por consiguiente que la masa total inyectada sea superior.

Los resultados indican que la sensibilidad del sistema en las condiciones establecidas es adecuada.

Ambas metodologías, SPME y GC-MSD-PTV, en modo venteo de solvente, poseen ventajas relevantes respecto a las metodologías tradicionales, ya que se logra incrementar

notablemente la sensibilidad en la determinación a niveles traza de los analitos en cuestión.

Los valores medios de de las respuestas cromatográficas de los estándares, expresados en alturas, áreas y/o abundancia de los picos, obtenidos a partir de la aplicación de las diferentes técnicas analíticas, nos permiten observar las diferencias existentes entre las mismas, relacionadas fundamentalmente a la diferencia de masa inyectada en cada una de ellas y la mayor o menor sensibilidad y especificidad del detector.

Si bien, las concentraciones de las muestras son distintas, los valores en las respuestas nos permiten observar las ventajas de las metodologías y establecer que, la SPME, es la técnica que presenta los mejores resultados comparativos.

El inyector PTV en modo de venteo de solvente, tiene también ventajas importantes para la determinación de estos analitos a niveles trazas, cuando es acoplado al sistema GC/MSD, ya que incrementa la sensibilidad de detección. En la tabla 50 se presentan los resultados comparativos de las metodologías mencionadas, correspondientes a estándares.

Tabla 50. Comparación de Técnicas Cromatográficas - Triazoles

| Condiciones Cromatográficas | GC/NPD | GC/NPD | GC/MSD |
|-----------------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | Inyección Directa (2µl) | SPME | PTV (45 µl) |
| µg/l | 500 | 50 | 50 |
| Triadimefon | 25822 ± 61 | 252300 ± 74 | 127448 ± 627 |
| Penconazole | 27371 ± 208 | 381221± 79 | 147015 ± 436 |
| Propiconazole I | 6788 ± 498 | 54693 ± 27 | 34114 ± 290 |
| Propiconazole II | 7753 ± 34 | 76191± 76 | 46547 ± 793 |
| Tebuconazole | 10892 ±88 | 67116 ±64 | 59327 ±481 |

Respecto a la extracción y optimización del proceso para *muestras de fruta y jugos y determinación de triazoles por GC/MSD- PTV*, se efectuaron dos métodos de preparación de la muestra, ya que debió efectuarse una extracción previa de los analitos desde la matriz.

El método 1 involucró una extracción con acetonitrilo de los analitos desde las frutas homogeneizadas, aproximadamente 10 g, seguida de sonicación de 10 min, repitiéndose el proceso dos veces consecutivas, a fin de lograr la mayor extracción posible. El extracto es llevado a un volumen final de 25 ml con acetonitrilo. Para lograr muestras más limpias, se efectuó un clean up in situ, adicionando a una alícuota del extracto, 0,5 gramos de adsorbente C₁₈, a fin de retener los componente no polares que puedan estar presente en la misma, tales como las ceras naturales de las bayas, etc. Posteriormente se filtra a través de filtro de teflón de 0,45 micras, para su posterior determinación cromatográfica.

Los resultados preliminares presentaron recuperaciones y respuestas cromatográficas adecuadas para estos analitos.

En el método 2 se introdujeron modificaciones en el proceso extractivo, adoptando el método de QuEChERS, el cual consta de dos etapas: extracción y “clean up”. Las muestras fueron pesadas, aproximadamente 10 g, se adicionan 5 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl, se agita vigorosamente y posteriormente se extraen los analitos con acetonitrilo, con similar procedimiento al método anterior y hasta un volumen de 25 ml. La etapa de “clean up” se efectuó con 0,5 gr de adsorbente C₁₈, activado previamente con 2 ml de metanol y 2 ml de agua. Una vez eluida

la muestra ésta se redujo por evaporación bajo vacío y corriente de nitrógeno a 10 ml finales.

Del análisis comparativo de los resultados se pudo concluir que las mejores recuperaciones se logran mediante este último procedimiento, adoptándose el mismo para la determinación de estos analitos en dichas matrices por PTV-GC-MSD.

Identificación de Triazoles por GC/ MSD - SPME

Para la identificación de los analitos por cromatografía gaseosa con espectrometría de masas (GC/MSD) y microextracción en fase sólida (SPME), utilizando como polímero de recubrimiento el CWX/DVB, se procedió metodológicamente según lo ya explicitado en otros ítems del presente trabajo, fundamentalmente en la preparación de las muestras y el proceso extractivo.

Respecto a las condiciones del GC/MSD, se procedió, en el otro puerto de inyección disponible en el cromatógrafo, al cambio del inserto adecuado para esta metodología. Las condiciones cromatográficas son similares a las establecidas, pero con cambios relativos, ya que debe efectuarse la desorción de los analitos desde la fibra en el inyector y por lo tanto, el tiempo de “splitless” y la temperatura inicial del horno deben ajustarse a tal fin. Se resumen a continuación las mismas.

Condiciones cromatográficas GC-MSD – SPME

Cromatógrafo Gaseoso HP 6890N.

Inyector automático Agilent 7683.

Detector selectivo de masa HP5973N.

Temperatura de interfase 280 °C.

Temperatura de cuadrupolo 150 °C.

Fuente de iones 230 °C.

Energía de ionización 70 e.V.

“Solvent delay” (retardo del solvente): 9,8 minutos.

Modo SCAN entre 40 a 550 m/z con 0,2 segundos de escaneo. Modo SIM para cuantificación.

Columna Agilent HP – 5MS 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm.

Modo: flujo constante. Velocidad de flujo: 1 ml / min.

Presión 7,64 psi.

Gas “carrier”: Helio 99,9995 % de pureza que previamente pasa a través de trampa de humedad e hidrocarburos.

Condiciones del horno: Temperatura inicial: 80 °C durante 3,5 min. Rampa: a 40 °C / min hasta 280 °C durante 7 min.

Tiempo de “splitless” 3 min. Temperatura del inyector: 270 °C. Flujo de purga: 50 ml/min. Tiempo de purga 2 minutos.

Flujo de “splitless”: 1 ml/min.

“Inlet Liner splitless” Supelco ID 0,75 mm.

La preparación de soluciones acuosas de estándares individuales y mezcla de triazoles y las muestras de arándanos adicionadas, se efectuó según el procedimiento detallado en la metodología analítica. Dado que el objetivo de la misma fue fundamentalmente el análisis cualitativo de los analitos por espectrometría de masas, sólo se prepararon muestras por triplicado de estándares y frutas adicionadas a tres concentraciones diferentes, 100, 50 y 25 µg/l, pH 7 y volumen de

muestra de 50 ml. Las condiciones de extracción con la fibra CWX/DVB, fueron las mismas a las optimizadas previamente.

Los ensayos se efectuaron teniendo en cuenta los datos obtenidos previamente en la metodología de GC/MSD- PTV, respecto al ión “target” e iones “qualifiers” de cada analito en cuestión. Los resultados obtenidos corresponden a la determinación cualitativa y cuantitativa de dichos analitos en muestras adicionadas y muestras incógnitas. La identificación de los mismos en las diferentes muestras, aplicando SPME y espectrometría de masas, se presentan en las siguientes figuras 46 b, 47, 48, 49, 50 y 51.

Podemos observar las respectivas respuestas expresadas en abundancia de pico, obtenidas a partir de soluciones acuosas de estándares a 100 µg/l, pH 7, 15 min de inmersión CWX/DVB y agitación magnética de 3000 rpm. La separación y resolución es adecuada, fundamentalmente para los isómeros del Propiconazole. Siendo los tiempos de retención (RT) de: 11,05 – 11,32 – 12,72 – 12,81 y 13,01 para Triadimefon, Penconazole, Propiconazole I - II y Tebuconazole respectivamente.

En las figuras 52(a) y 52(b) podemos observar comparativamente las respuestas cromatográficas correspondientes a la determinación de triazoles aplicando SPME por GC-MSD y GC-NPD.

A partir de los espectros correspondientes a cada analito se identificaron los iones “target” e iones “qualifiers”, los cuales se detallan en la tabla 51. Los mismos fueron contrastados con espectros disponibles en la biblioteca incorporada en el programa del instrumento. Esto permite además, a partir de las respectivas

respuestas, programar la cuantificación de los analitos en las muestras con adecuada sensibilidad y confirmación de los resultados.

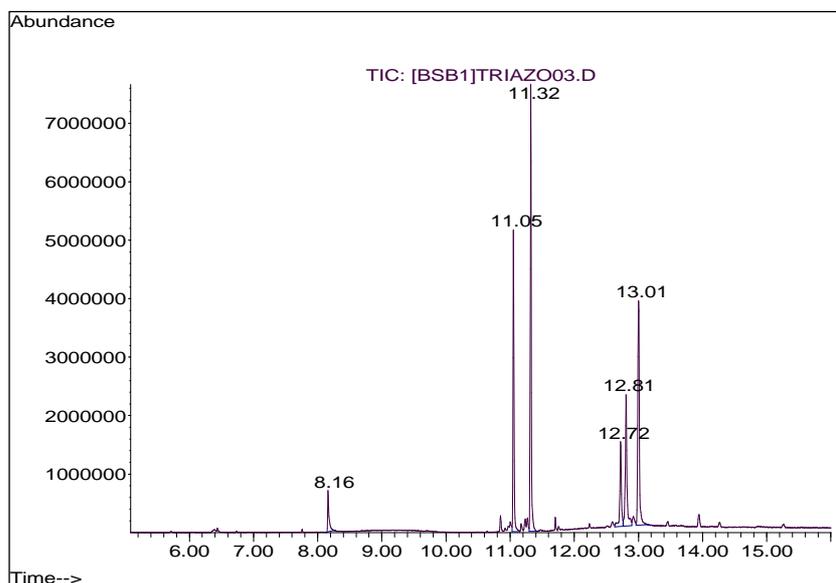


Figura 52- a. Cromatograma de Triazoles - GC-MSD – SPME (modo SCAN)

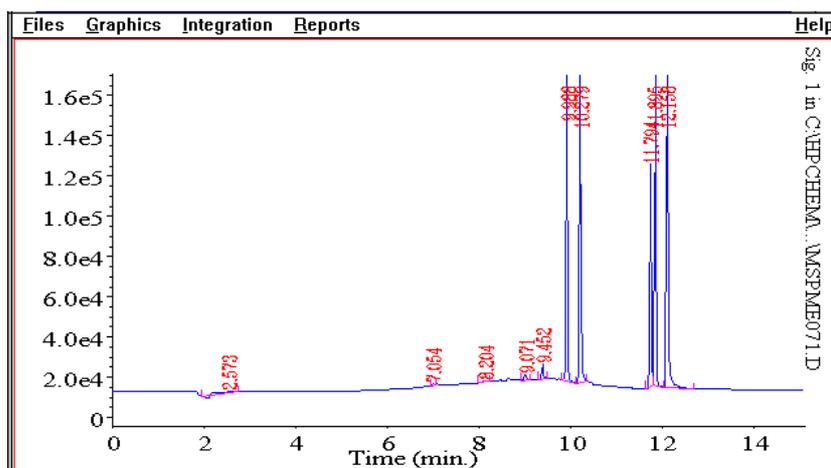


Figura 52-b. Cromatograma de Triazoles SPME - GC-NPD - 10 µg/l - 720 min. CWX/DVB

Tabla 51. Triazoles - GC-MSD - PTV en modo split/splitless

| Analito | Grupo | Ion "target" (m/z) | Iones "qualifiers" (m/z) |
|------------------|-------|--------------------|--------------------------|
| Triadimefon | 1 | 208,0 | 181 – 128 |
| Penconazole | 2 | 158,9 | 161 – 248 – 250 |
| Propiconazole I | 3 | 172,9 | 259 – 261 – 175 |
| Propiconazole II | 4 | 172,9 | 259 – 261 – 175 |
| Tebuconazole | 5 | 124,9 | 126.9 – 250 |

En las figuras 53 a 57 se pueden observar los espectros correspondientes a los diferentes analitos, obtenidos a partir de muestras de arándanos adicionadas a 10 ppb y aplicando como metodología extractiva SPME- CWX/DVB.

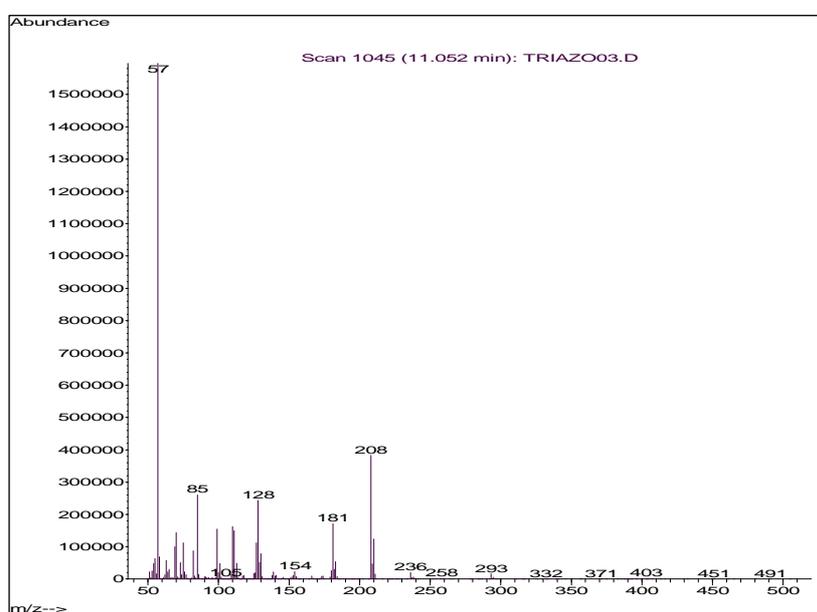


Figura 53. Espectro de masa/z Triadimefon - GC-MSD – SPME Arándanos 10 µg/l

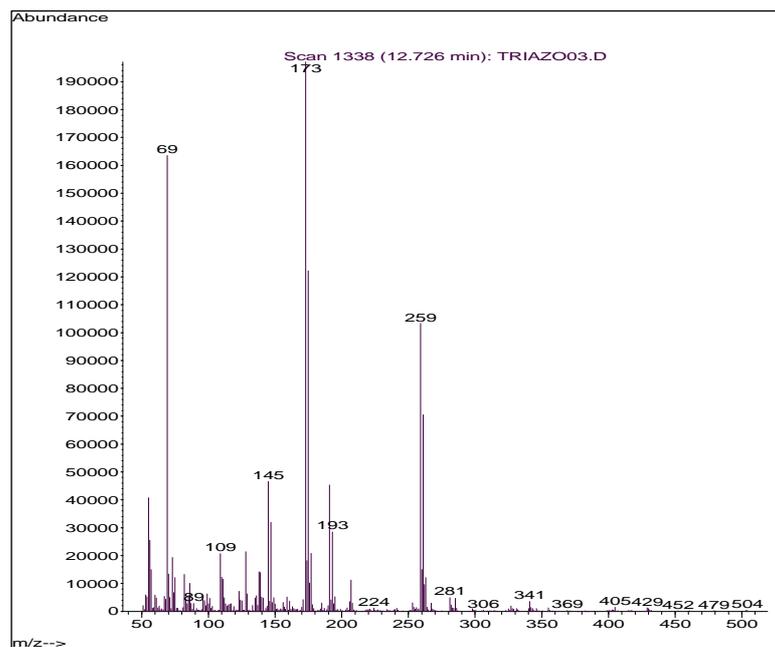


Figura 54. Espectro de masa/z - Penconazole - GC-MSD – SPME Arándanos 10 µg/l

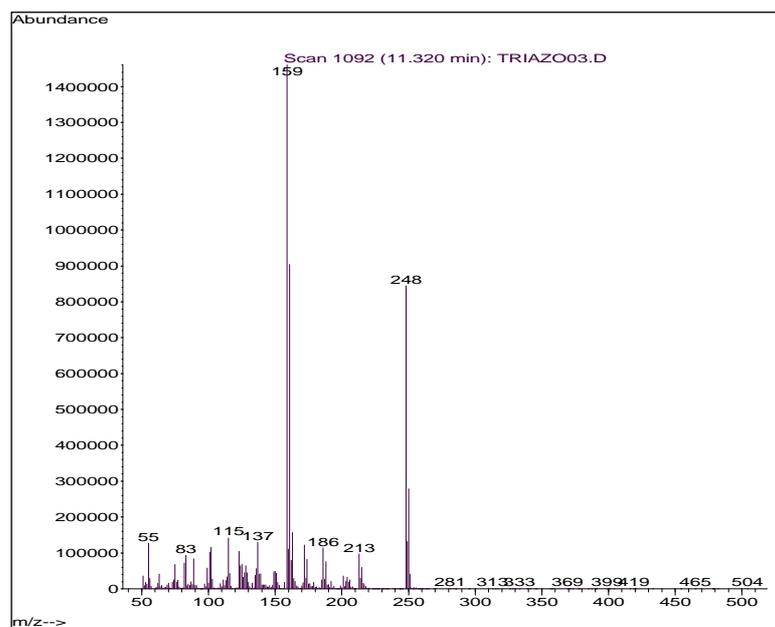


Figura 55. Espectro de masa/z - Propiconazole II - GC-MSD – SPME Arándanos 10 µg/l

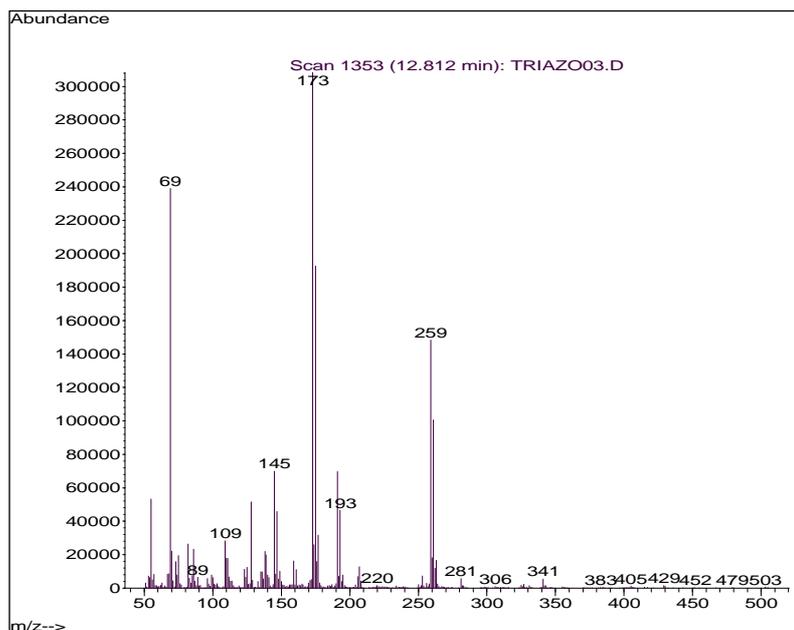


Figura 56. Espectro de masa/z - Propiconazole I - GC-MSD –SPME Arándanos 10 µg/l

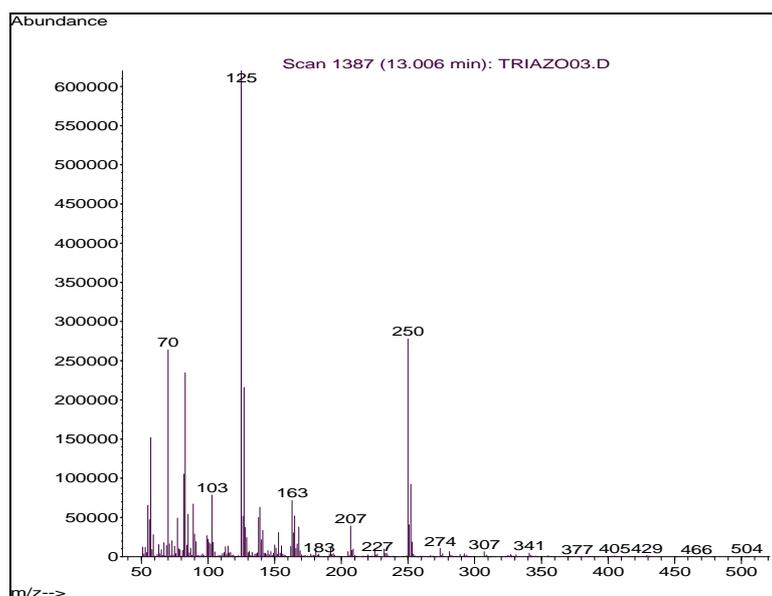


Figura 57. Espectro de masa/z - Tebuconazole - GC-MSD – SPME Arándanos 10 µg/l

Respecto a las muestras de jugos de arándanos adicionados y/o muestras incógnitas, se procedió con similar metodología, lográndose la identificación y cuantificación de triazoles en este tipo de matrices. Los resultados fueron analizados estadísticamente y los parámetros correspondientes indicaron que la técnica analítica es precisa, de adecuada recuperación y alta sensibilidad. La metodología para la determinación de estos fungicidas en muestras incógnitas se realiza a partir de la curva de calibrado con muestras adicionadas.

Como ya se ha observado, una de las ventajas de la microextracción en fase sólida, es incrementar la sensibilidad de detección, que acoplada al GC/MSD. Podemos concluir que, en ambas metodologías de introducción de la muestra en el puerto de inyección, SPMS y PTV, logran incrementar notablemente la masa de analito que ingresa al sistema cromatográfico. Cada una de ellas con sus ventajas características. La comparación de los resultados indica que, la de mayor eficiencia sobre la sensibilidad del método es la SPME, ya que al no utilizar solvente y dependiendo del tiempo de inmersión, sólo aumentando éste se logra incrementar la masa absorbida y por ende la sensibilidad de detección.

En el caso de múltiples inyecciones de grandes volúmenes de muestra, PTV con venteo de solvente, la metodología es obviamente mejor respecto a la inyección tradicional de 1 o 2 μ l. Sin embargo para muestras reales de frutas o jugos, la preparación y *clean up* o limpieza de la muestras es una etapa muy crítica, ya que las interferencias de la matriz causan serios

inconvenientes en el sistema cromatográfico y por ende en los resultados obtenidos. Para lo cual se debieron, en ambos casos, modificar el volumen y número de inyecciones de las muestras. Una vez optimizada las condiciones de inyección el procedimiento es similar.

Los resultados de la validación para la determinación de triazoles en frutas y jugos de arándanos permitió la aplicación de la misma a muestras incógnitas. Sin embargo, la SPME es más rápida, de menor costo, libre de solventes orgánicos, mayor sensibilidad y además modificando los tiempos de absorción del polímero seleccionado se incrementa notablemente la detección de estos residuos.

Independientemente de la masa inyectada, en la determinación de estos residuos por GC/MSD, sin embargo podemos indicar que la identificación es mejor cuando se escanean todos los iones (modo SCAN) y se compara el espectro de masas de la muestra con los del patrón de referencia. Aunque esto causa una relativa pérdida de la sensibilidad, por lo cual, generalmente, para la determinación cuantitativa de residuos se utiliza la monitorización selectiva de iones (modo SIM).

A partir de los espectros de masas de cada uno de los compuestos obtenidos para muestras de estándares en modo SCAN, se seleccionaron los iones (m/z) para cada analito en estudio. Los datos obtenidos en modo SIM presentan cromatogramas más limpios y es un método más selectivo. Sin embargo, a pesar de las ventajas en cuanto a sensibilidad y selectividad, el modo SIM reduce la capacidad de identificación de

un método al no registrar el espectro completo del analito, sino sólo los iones seleccionados.

Con el fin de establecer un balance entre sensibilidad y capacidad de identificación, se han tratado de seleccionar tres iones de diagnóstico para cada compuesto, siempre que esto sea posible. Se ha considerado como la más eficiente para este tipo de muestras, la metodología SPME-GC/MSD.

La permanente interacción con los sectores agroproductores, permite contribuir al desarrollo regional, ya que se dispone de metodologías analíticas de adecuado rigor científico, de bajo costo y tiempos cortos de análisis para el control de calidad de los productos. Ello redundará en beneficio y/o a la factible toma de decisiones preventivas al momento de la comercialización y así lograr una mayor competitividad en los mercados.

VII- Determinación de Triazoles en Jugos Procesados de Arándanos por SPME - GC-NPD

Introducción

La producción industrial de jugos de arándanos se ha desarrollado recientemente en la región y surge como una necesidad del sector arandanero que intenta incrementar el valor agregado de su producción, como así también por el interés de comercializar nuevos productos por parte del sector industrial. Numerosos factores han incidido en este desarrollo, entre los que podemos mencionar, el notable crecimiento de la producción, el importante número de nuevas plantaciones de variedades de maduración temprana que podrían llegar a los mercados con mejores precios y lograr mayor rentabilidad.

Los cultivos son principalmente de la variedad O'Neal y no muy numerosos los de Misty como variedad temprana (Seidán, 2008); estas primeras plantaciones fueron efectuadas sin un adecuado estudio o asesoramiento profesional sobre la selección de las variedades a implantar, ya que pocos productores lo hicieron en función de la mejor adaptabilidad de las plantaciones en la región, de las características fisiológicas como ser la mayor resistencia a sufrir daños poscosecha, mayor turgencia, tiempos de maduración óptimos, etc., a fin de enfocar correctamente el inicio del cultivo y lograr correlacionar directamente la producción al momento de la exportación con precios más altos en los mercados y tener mayor posibilidad de ganar nuevos nichos de

comercialización. Además, existe una escasa factibilidad de ubicar volúmenes importantes de la producción en el mercado interno, ya que por razones culturales y/o altos precios no se consumen, a pesar de ser frutos de gran valor nutritivo y antioxidantes.

Teniendo en cuenta que los frutos maduran de forma no homogénea y son cosechados a diferentes tiempos, se genera un continuo manipuleo de las plantas con el consiguiente daño y/o contaminación de los cultivos, esto además, genera un incremento de frutas que deben ser enfriadas rápidamente en los diferentes empaques, los cuales no siempre disponen de la capacidad para su conservación en cámaras o son empaques de infraestructuras pequeñas; por otro lado además, al ser frutos climatéricos que alcanzan rápidamente la sobremadurez y susceptibles al desarrollo de enfermedades fúngicas, existe un porcentaje relativamente alto de la producción que no tiene la suficiente calidad para exportar, produciendo importantes pérdidas sino son controladas.

Sin embargo, el cultivo del arándano es de alta rentabilidad siempre y cuando se efectúen adecuadas prácticas agrícolas, con un buen soporte técnico y comercial, sin incidir negativamente en el mercado con sobreproducción y estableciendo estrategias tecnológicas para lograr mayor valor agregado. A fin de hacer más rentable la producción, se han desarrollado en la región nuevos establecimientos industriales que procesan un volumen importante de frutas remanentes de las mesas de empaques y/o de los cultivos para la obtención de jugos, frutas deshidratadas, mermeladas, jaleas, vinos, vinagres, etc.

El alto valor nutritivo y propiedades antioxidantes del fruto son transferidos en su mayoría a los productos industriales, fundamentalmente a los jugos. Sin embargo, tratamientos enzimáticos y térmicos a los que estos productos son sometidos en los procesos industriales producen modificaciones en sus contenidos naturales, tales como antocianinas, en el perfil de flavonoides y otros compuestos fenólicos. Se han encontrado pérdidas significativas de estos compuestos en el procesamiento de arándanos, como así también cuando son sometidos a largos períodos de almacenamiento (Skrede et al., 2000; Lee et al., 2002; Rossi et al., 2003; Srivastava et al., 2007; Brambilla et al., 2008; Brownmiller et al., 2008; Cisse et al., 2009; Pereira Kechinski et al., 2010).

Por otra parte, los residuos de plaguicidas presentes en las frutas pueden ser transferidos a los jugos y la disipación de éstos dependerá, entre otros factores, del lavado de la fruta al ingreso de la línea, de los tratamientos térmicos y enzimáticos a los que fuesen sometidos, entre otros. La suma de todos estos factores evidentemente afectan a la calidad de dichos productos, tanto como frutos frescos como para los procesados (Clifford, M., 2000; Raffer, J., 2002; Arakelian, J., 2005).

En el marco del control de calidad de estos productos, surge la necesidad de disponer de técnicas analíticas adecuadas para la determinación de fungicidas triazólicos en los jugos procesados y naturales de arándanos (Albero et al., 2005; Dietz, et al., 2006; Trösken, et al., 2005; Yang et al., 2006; Charlton y Jones, 2007).

Materiales y Métodos

Para la determinación de triazoles en jugos procesados de arándanos se aplicó la metodología SPME optimizada para frutas, utilizándose los mismos reactivos, y condiciones cromatográficas, efectuándose sólo modificaciones en el tratamiento previo y preparación de las muestras (Navarro et al., 2002; Zambonin et al., 2002; Juan-García et al., 2004; Sanusi et al., 2004; Athanasopoulos et al., 2005; Nozal et al., 2005; Trösken et al., 2005).

Los jugos se muestrearon en la primera etapa del proceso, es decir, antes del tratamiento enzimático de extracción de las antocianinas presentes en la corteza de los frutos (*jugos naturales*) y al final del mismo (*jugos procesados*). Para cada muestra única compuesta, se pesan exactamente aproximadamente 20 g de jugo procesado de arándanos a 9,6 °Brix y se adiciona agua Grado 1 hasta un volumen final de 100 ml. Se agita vigorosamente y sonica durante 5 min. Posteriormente la mezcla se filtra a través de papel de filtro Wattman N° 1. El filtrado se lleva a un volumen final de 100 ml ajustando el pH a 7 con solución de NaOH 0,1 N. Finalmente el volumen de muestra a ser sometida al proceso extractivo se filtra a través de membrana de 0,45 µm.

Los jugos procedentes de frutas no tratadas se identificaron como blancos y muestras adicionadas. Éstas se adicionaron al inicio del proceso y preparándose por quintuplicado a las siguientes concentraciones de triadimefon, penconazole,

propiconazole y tebuconazole: 50- 25- 10- 2,5 y 1,0 $\mu\text{g/l}$ (Beltran et al., 2000; Smith, 2003).

El perfil del tiempo de extracción para *soluciones acuosas de jugos adicionadas* de triazoles de 50 ppb, se determinó a partir de las diferentes respuestas cromatográficas obtenidas del set de viales de 100 ml, según la metodología ya explicitada. La extracción se efectuó con el polímero de recubrimiento, CWX/DVB, en tiempos progresivamente más largos de: 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 480, 540, 600, y 720 min para cada una de ellas.

Se graficó la curva de perfil de concentración para las muestras adicionadas y a partir de la curva de calibración por inyección directa, se determinaron la masa y número total de moles absorbidos por el polímero de recubrimiento, la constante de distribución (K) y el volumen limitante de la muestra, mediante las ecuaciones correspondientes. De dicha curva, también se estableció el tiempo en el que se considera un 95% de la masa total absorbida, a fin de calcular los coeficientes de difusión (D_i) de los diferentes analitos. El volumen de muestra utilizado para todas estas etapas fue de *100 ml*, el cual coincidió aproximadamente con el calculado.

A fin de observar si existen o no diferencias entre las muestras, se efectuó la comparación de los diferentes perfiles de concentración para los analitos. El análisis estadístico correspondiente a la comparación de dos muestras, permitió establecer si las muestras proceden de una distribución normal.

El test de comparación de las medias, también establece los intervalos de confianza o los límites para cada media y para la

diferencia entre las medias. De particular interés está el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias y si existen diferencia estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 95%. La comparación de desviaciones típicas establece los intervalos de confianza y el cociente o ratio de varianzas. Esto permite establecer si existen diferencias significativas entre las desviaciones típicas de las dos muestras, para un $\alpha = 0,05$.

El análisis estadístico efectuado para muestras jugos de arándanos adicionados se detalla a continuación: *Análisis Unidimensional - Regresión Lineal - Comparación de rectas de regresión - Precisión - Exactitud - Límites de Detección y cuantificación del método.*

Resultados y Conclusiones

A fin de establecer el intervalo lineal del método, se efectuaron y analizaron estadísticamente las observaciones obtenidas de las respuestas cromatográficas, expresadas en áreas y alturas de pico para cada analito y cada concentración correspondiente a quintuplicados de *soluciones acuosas de jugos de arándanos adicionados* de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole de 100 ml, a: 50- 25- 10- 2,5 y 1,0 $\mu\text{g/l}$. Los procedimientos metodológicos y el análisis estadístico de los resultados fueron los ya aplicados. Las tablas 52 a 56 detallan los resultados correspondientes al análisis unidimensional de las diferentes observaciones:

Tabla 52. Análisis Unidimensional - Triadimefon Jugos de Arándanos- CWX/DVB- GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$)

| Triadimefon | 50 µg/l | 25 µg/l | 10 µg/l | 2,5 µg/l | 1 µg/l |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| Media | 166195 | 85025 | 35553 | 10966 | 5967 |
| Desviación típica | 137 | 128 | 75 | 55 | 283 |
| Coeficiente de variación % | 0,08 | 0,15 | 0,21 | 0,50 | <u>4,75</u> |
| Intervalo confianza \pm | 98 | 103 | 184 | 143 | 72 |

Tabla 53. Análisis Unidimensional Penconazole –Jugos de Arándanos CWX/DVB- GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$)

| Penconazole | 50 µg/l | 25 µg/l | 10 µg/l | 2,5 µg/l | 1 µg/l |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| Media | 251166 | 127671 | 53456 | 16381 | 8864 |
| Desviación típica | 210 | 338 | 82 | 434 | 331 |
| Coeficiente de Variación % | 0,08 | 0,27 | 0,15 | 2,65 | 3,74 |
| Intervalo confianza \pm | 241 | 388 | 94 | 498 | 380 |

Tabla 54. Análisis Unidimensional Propiconazole I - Jugos de Arándanos CWX/DVB – GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$)

| Propiconazole I | 50 µg/l | 25 µg/l | 10 µg/l | 2,5 µg/l | 1 µg/l |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| Media | 37730 | 19739 | 7783 | 2395 | 1132 |
| Desviación típica | 83 | 62 | 204 | 77 | 111 |
| Coeficiente de variación % | 0,22 | 0,31 | 2,63 | 3,22 | 9,85 |
| Intervalo confianza \pm | 95 | 71 | 234 | 88 | 127 |

Tabla 55. Análisis Unidimensional Propiconazole II -Jugos de Arándanos CWX/DVB- GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$)

| Propiconazole II | 50 µg/l | 25 µg/l | 10 µg/l | 2,5 µg/l | 1 µg/l |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| Media | 53572 | 27349 | 11526 | 3458 | 1948 |
| Desviación típica | 151 | 75 | 153 | 148 | 285 |
| Coefficiente de Variación % | 0,28 | 0,27 | 1,33 | 4,28 | 14,62 |
| Intervalo confianza \pm | 173 | 86 | 176 | 170 | 327 |

Tabla 56. Análisis Unidimensional Tebuconazole –Jugos de Arándanos CWX/DVB – GC-NPD (n=5 y $\alpha= 0,05$)

| Tebuconazole | 50 µg/l | 25 µg/l | 10 µg/l | 2,5 µg/l | 1 µg/l |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| Media | 47214 | 24286 | 9650 | 2701 | 1828 |
| Desviación típica | 84 | 119 | 254 | 277 | 76 |
| Coefficiente de Variación % | 0,18% | 0,49% | 2,63% | 10,24% | 4,13% |
| Intervalo confianza \pm | 96 | 137 | 291 | 318 | 87 |

El valor de los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados, para todas las observaciones, están dentro del intervalo esperado para los datos de una distribución normal. A partir de los resultados obtenidos en el análisis unidimensional se graficó la curva de regresión lineal, intervalos de confianza, el histograma y la curva de trazas de densidad de residuos, para soluciones acuosas de jugos procesados de arándanos adicionadas (figura 58). Los resultados corresponden a los diferentes analitos extraídos de muestras acuosas de Jugos de arándanos adicionados a distintas concentraciones, para $n = 5$ y $\alpha= 0,05$.

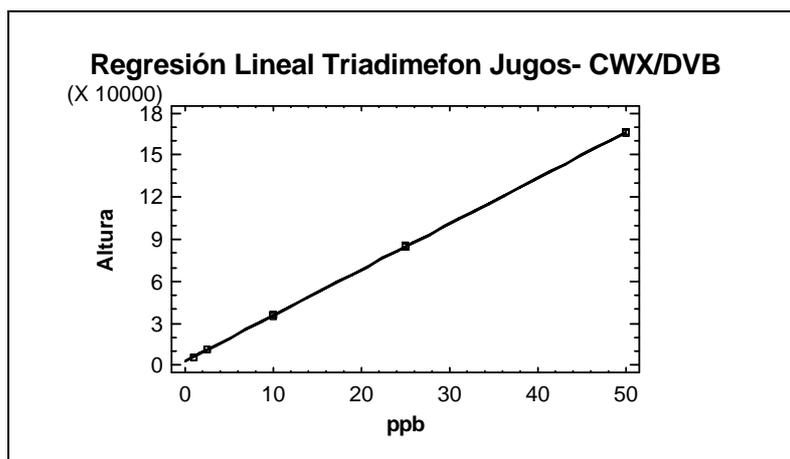


Figura 58. Regresión Lineal Triadimefon Jugos de Arándanos CWX/DVB- GC-NPD (n = 5 y $\alpha = 0,05$)

Los parámetros estadísticos permitieron establecer la idoneidad del modelo ajustado. Se determinó la independencia de los residuos a partir del estadístico de Durbin Watson (P-valor). Mediante el test de Kolmogorov (P-valor) se determinó si los residuos proceden de una distribución normal, para un nivel de confianza de al menos un 90 %. Se estableció la ecuación de la recta y el estadístico R^2 que indicó adecuada relación entre las variables (respuestas cromatográficas vs. concentración).

En la comparación de rectas de regresión para jugos procesados de arándanos vs. estándares, los estadísticos del test ANOVA indicaron en todos los casos que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y puntos de corte para los diferentes valores con un 99 % de nivel de confianza. Se presentan a continuación las ecuaciones de las rectas de regresión y gráficas correspondientes (figuras 59 a 63).

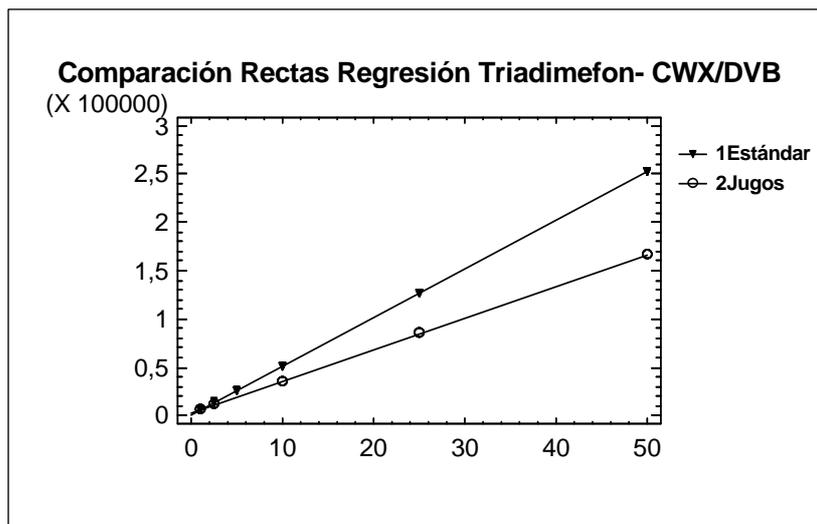


Figura 59. Comparación Rectas Regresión Triadimefon - CWX/DVB- GC-NPD Jugos Arándanos vs. Estándares

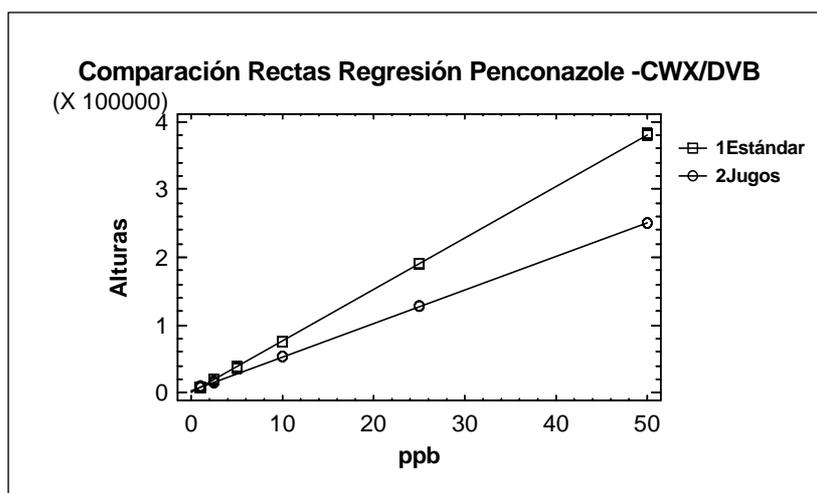


Figura 60. Comparación Rectas Regresión Penconazole - CWX/DVB – GC-NPD-Jugos Arándanos vs. Estándares

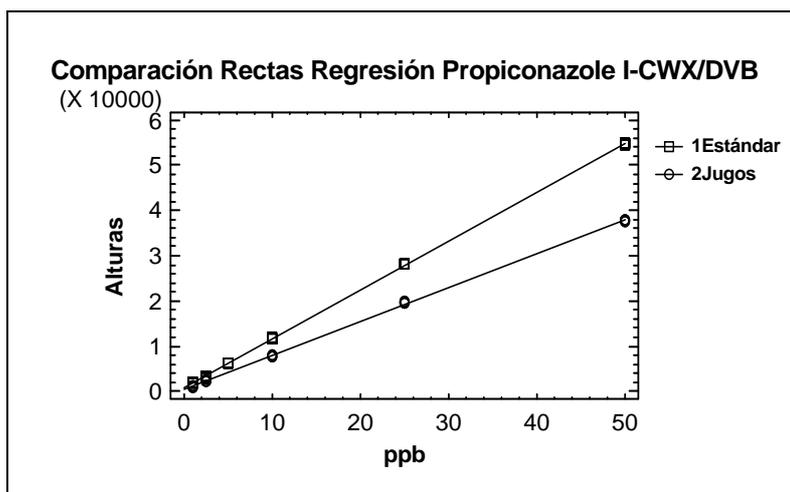


Figura 61. Comparación Rectas Regresión Propiconazole I - CWX/DVB- GC-NPD -Jugos Arándanos vs. Estándares

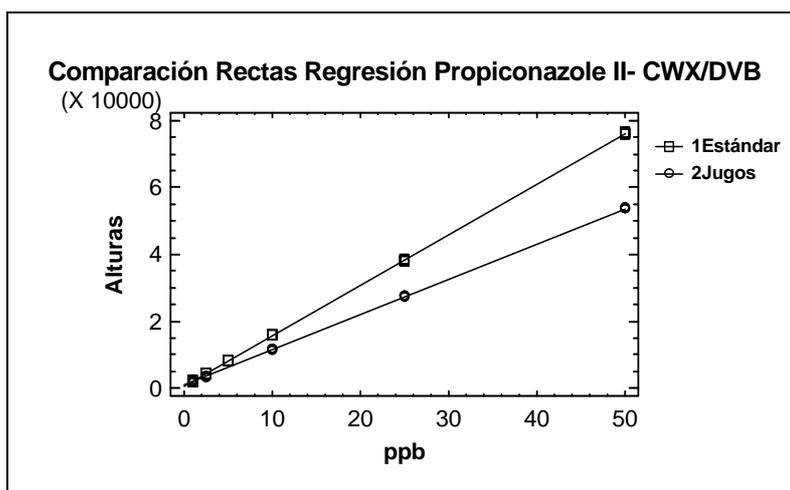


Figura 62. Comparación Rectas Regresión Propiconazole II- CWX/DVB- GC-NPD Jugos Arándanos vs. Estándares

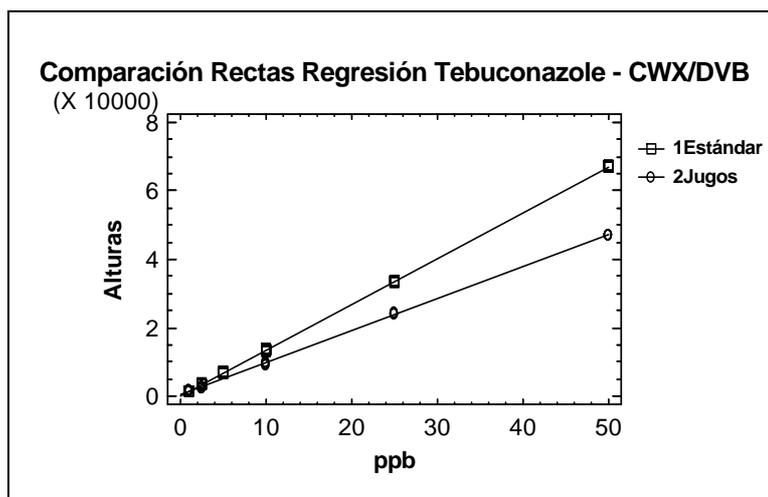


Figura 63. Comparación Rectas Regresión Tebuconazole - CWX/DVB-GC-NPD Jugos Arándanos vs. Estándares

$$\text{Alturas Jugos Triadimefon} = 2845,51 + 3270,93^* \mu\text{g/l} \quad (59)$$

$$\text{Alturas Estándar Triadimefon} = 1362,2 + 5018,2^* \mu\text{g/l} \quad (60)$$

$$\text{Alturas Estándar Penconazole} = -127,59 + 7625,89^* \mu\text{g/l} \quad (61)$$

$$\text{Alturas Jugos Penconazole} = 3995,3 + 4944,19^* \mu\text{g/l} \quad (62)$$

$$\text{Alturas Estándar Propiconazole I} = 828,05 + 1080,7^* \mu\text{g/l} \quad (63)$$

$$\text{Alturas Jugos Propiconazole I} = 500,27 + 748,90^* \mu\text{g/l} \quad (64)$$

$$\text{Alturas Estándar Propiconazole II} = 743,32 + 1508,11^* \mu\text{g/l} \quad (65)$$

$$\text{Alturas Jugos Propiconazole II} = 910,24 + 1054,26^* \mu\text{g/l} \quad (66)$$

$$\text{Alturas Estándar Tebuconazole} = 252,78 + 1336,86^* \mu\text{g/l} \quad (67)$$

$$\text{Alturas Jugos Tebuconazole} = 598,49 + 934,33^* \mu\text{g/l} \quad (68)$$

Se puede concluir que existe efecto matriz para todos los analitos evaluados y por lo tanto, para la determinación de muestras reales de jugos de arándanos es necesario efectuar la calibración con muestras adicionadas.

La precisión del método fue determinada para cada concentración y analito, a partir de *soluciones de jugos procesados de arándanos adicionados* para todas las concentraciones en las condiciones antes mencionadas. Para cada concentración se determinó el intervalo de confianza de la medida de acuerdo a la distribución *t* de Student para $n = 5$ mediciones individuales con $v = n - 1$ grados de libertad y $\alpha = 0,05$.

En las tablas 57 y 58 se presentan los resultados de precisión para dos concentraciones a modo de ejemplificación, los demás datos para $10 \mu\text{g/l}$ se pueden observar en las tablas de análisis unidimensional.

Los coeficientes de variación relativos, para bajas concentraciones de propiconazole I y tebuconazole son ligeramente mayores, sin embargo están en un intervalo aceptable para este tipo de muestras.

Tabla 57. Precisión Jugos de Arándanos 25 µg/l –CWX/D-GC-NPD (n=5 α=0,05)

| Analitos | Altura Media | Desviación Estándar | RSD% | Intervalo confianza ± |
|------------------|--------------|---------------------|------|-----------------------|
| Triadimefon | 85025 | 128 | 0,15 | 103 |
| Penconazole | 127671 | 338 | 0,27 | 388 |
| Propiconazole I | 19739 | 62 | 0,31 | 71 |
| Propiconazole II | 27349 | 75 | 0,27 | 86 |
| Tebuconazole | 24286 | 119 | 0,49 | 137 |

Tabla 58. Precisión Jugos de Arándanos 10 µg/l –CWX/DVB-GC-NPD (n=5 α=0,05)

| Analitos | Altura Media | Desviación Estándar | RSD% | Intervalo confianza ± |
|------------------|--------------|---------------------|-------------|-----------------------|
| Triadimefon | 35553 | 75 | 0,21 | 184 |
| Penconazole | 53456 | 82 | 0,15 | 94 |
| Propiconazole I | 7783 | 204 | <u>2,63</u> | 234 |
| Propiconazole II | 11523 | 153 | 1,33 | 176 |
| Tebuconazole | 9650 | 254 | <u>2,63</u> | 291 |

Los cambios de fibra se efectuaron varias veces durante el desarrollo de la metodología y esto hace factible que la variabilidad en las respuestas cromatográficas puede incrementarse. A fin de subsanar estos inconvenientes se repitieron los ensayos incrementando el número de determinaciones a **n= 10** para estas matrices. Se detalla en tabla 59 los nuevos resultados obtenidos en estas condiciones:

Tabla 59. Precisión Jugos de Arándanos 10 µg/l –CWX/DVB- GC-NPD (n= 10 y α= 0,05)

| Analitos | Altura Media | Desviación Estándar | RSD% | Intervalo confianza ± |
|------------------|---------------------|----------------------------|-------------|------------------------------|
| Triadimefon | 35620 | 66 | 0,19 | 47 |
| Penconazole | 53710 | 78 | 0,15 | 56 |
| Propiconazole I | 7715 | 135 | 1,75 | 97 |
| Propiconazole II | 11596 | 104 | 0,90 | 74 |
| Tebuconazole | 9680 | 113 | 1,17 | 81 |

El método pudo ser considerado preciso ya que, todos los coeficientes de variación porcentual para todas las concentraciones, no superaron el 1,5 – 2,0 % (AOAC, 1990).

Los límites de detección y cuantificación se estimaron a partir de la *curva de regresión de soluciones acuosas de jugos procesados de arándanos adicionadas*, a bajas concentraciones de los analitos 10 - 2,5- y 1,0 µg/l, n= 30 determinaciones individuales y α= 0,05, aplicando los procedimientos y criterios explicitados, dichos resultados se muestran en la tabla 60.

La recuperación del método se determinó para *soluciones acuosas de jugos procesados de arándanos adicionadas* de Triadimefon, Penconazole, Propiconazole y Tebuconazole a 50-10- 2,5 y 1 µg/l, en las mismas condiciones de extracción y a partir de las curvas de calibración respectivas. Los resultados se pueden observar en la tabla 61.

Tabla 60. Límites de Detección y Cuantificación Jugos de Arándanos CWX/DVB –GC-NPD (n=30 y $\alpha= 0,05$)

| Analitos | Límite Detección µg/l | Límite Cuantificación µg/l |
|------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Triadimefon | 0,18 | 0,25 |
| Penconazole | 0,19 | 0,26 |
| Propiconazole I | 0,21 | 0,38 |
| Propiconazole II | 0,23 | 0,43 |
| Tebuconazole | 0,26 | 0,49 |

Tabla 61. Recuperación- Jugos de Arándanos Triazoles CWX/DVB- GC-NPD (n=20 $\alpha= 0,05$)

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

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

Jugos naturales de arándanos

Teniendo en cuenta la posibilidad de que los jugos sean

obtenidos por el consumidor mediante un simple proceso de licuado y filtrado, se consideró necesario efectuar en la línea de producción un muestreo de jugos de arándanos sin el tratamiento enzimático de extracción de las antocianinas. La fruta al ingreso de la línea es lavada y posteriormente triturada y en esa etapa se muestreó el denominado *jugo natural*, el cual fue filtrado y adicionado con estándares y luego se efectuaron los ensayos correspondientes a fin de evaluar el proceso extractivo SPME. Los resultados de las respuestas cromatográficas indicaron diferencias en la masa absorbida para iguales concentraciones y tiempos de inmersión de la fibra, siendo menor para las muestras de jugos naturales. Las curvas de regresión para los dos tipos de jugos se presentan en figuras 64 y 65 y tabla 62.

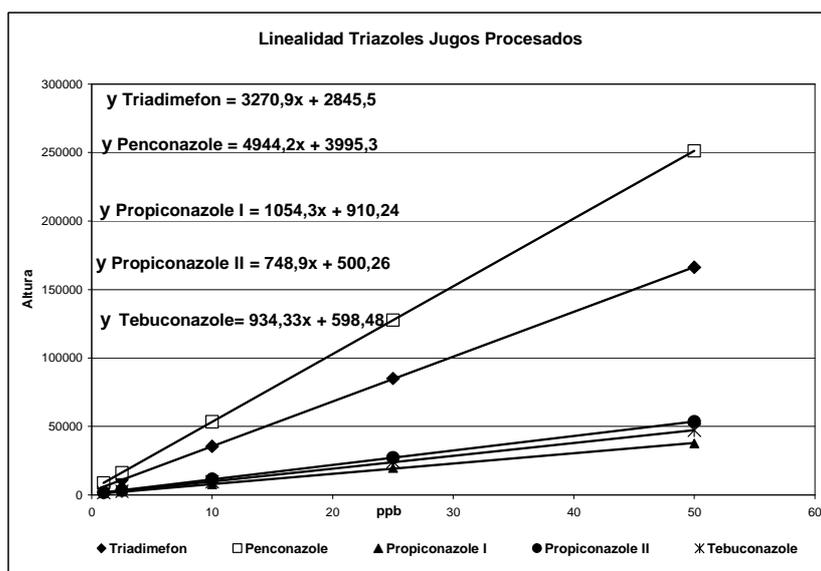


Figura 64. Regresión Lineal Triazoles Jugos Procesados- CWX/DVB-GC-NPD

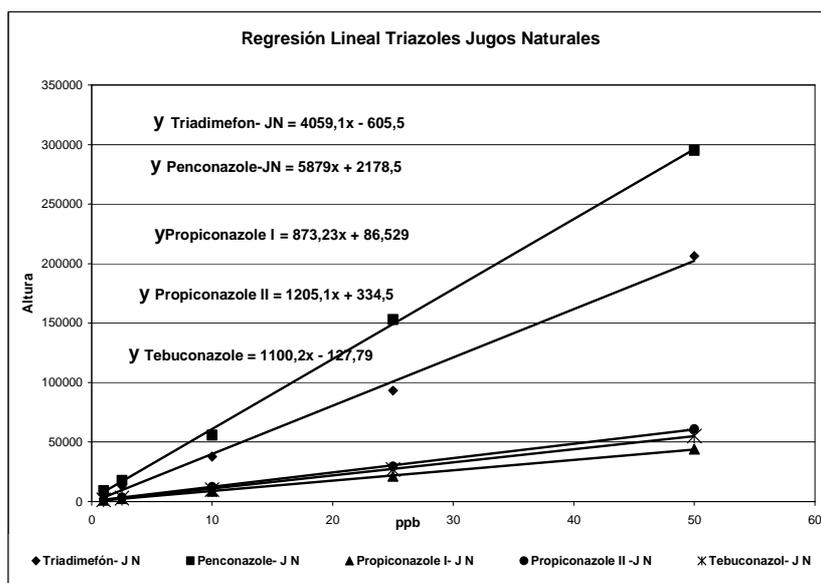


Figura 65. Regresión Lineal Triazoles Jugos Naturales- CWX/DVB -GC-NPD

Tabla 62. Ecuaciones Regresión Lineal Triazoles Jugos - CWX/DVB-GC-NPD

| Analitos | Jugos Procesados | Jugos Naturales |
|-------------------------|------------------|-------------------|
| Triadimefón | Y = 2845 + 3271x | Y = + 605 + 4059x |
| Penconazole | Y = 3995 + 4944x | Y = 2178 + 5879x |
| Propiconazole I | Y = 910 + 1054x | Y = 86 + 873x |
| Propiconazole II | Y = 500 + 749x | Y = 334 + 1205x |
| Tebuconazole | Y = + 598 + 934x | Y = 128 + 1100x |

El análisis comparativo de las curvas de regresión lineal correspondientes a jugos procesados y jugos naturales de arándanos, permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas entre las mismas. El tratamiento estadístico de los resultados indicó que existe efecto matriz por lo que, en la determinación de estos analitos en muestras incógnitas la calibración debe efectuarse utilizando blancos de muestra y muestras adicionadas. Para jugos procesados de arándanos la diferencia en todos los analitos es más marcada; esto puede ser debido, además de la naturaleza misma de la matriz, al proceso enzimático al que fueron sometidos los jugos en planta, a su composición final y a otros factores indeterminados.

Teniendo en cuenta que la clarificación enzimática de jugos es generalmente utilizada en la industria, necesariamente estas muestras representan el producto comercial, el cual deberá reunir los atributos de calidad adecuados. El control de calidad de frutas y jugos de arándanos respecto a los factibles niveles residuales de estos plaguicidas hacen relevante la aplicación de esta metodología para la determinación de estos analitos al momento de su comercialización, ya que se ha podido observar que la SPME aplicada a soluciones acuosas y matrices complejas, tales como frutas y jugos procesados de arándanos, es de adecuada precisión, alta sensibilidad y exactitud. Las figuras 66 a 70 muestran la comparación de las rectas de regresión para las tres matrices analizadas y para cada analito en cuestión.

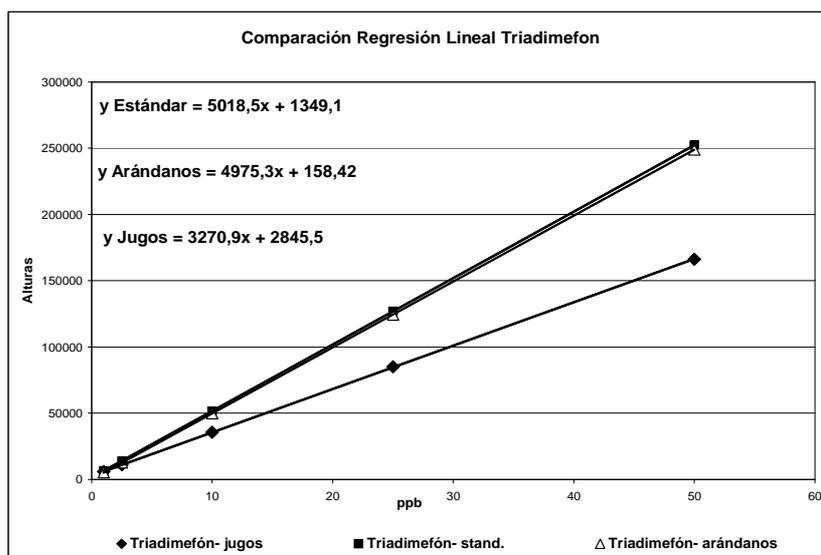


Figura 66. Comparación Rectas de Regresión Triadimefon - CWX/DVB-GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos procesados de Arándanos

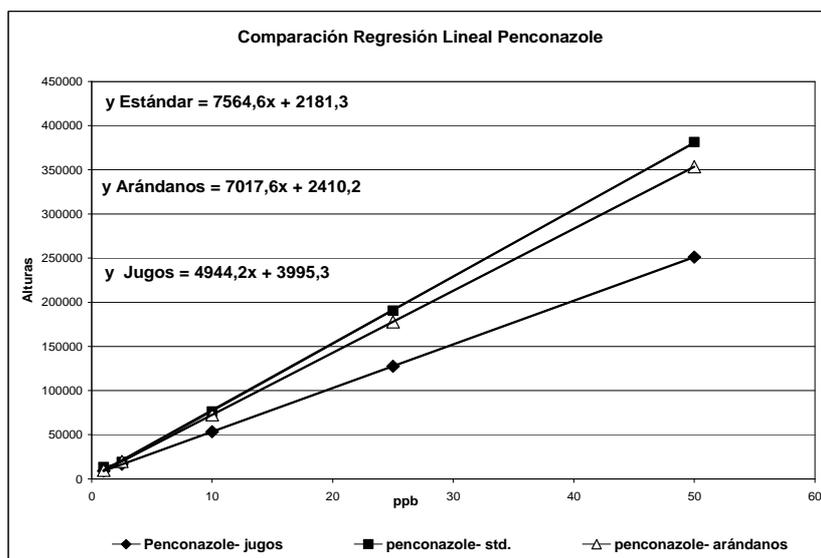


Figura 67. Comparación Rectas de Regresión Penconazole- CWX/DVB-GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos de Arándanos

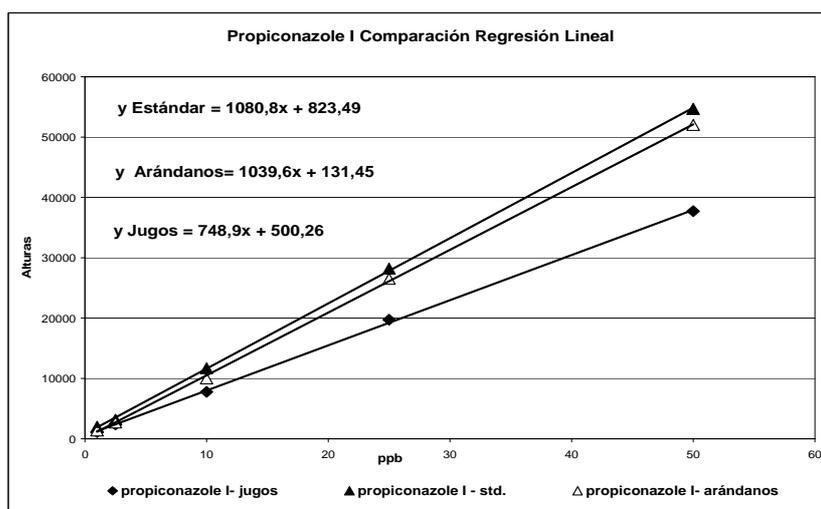


Figura 68. Comparación Rectas Regresión Propiconazole I CWX/DVB - GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos de Arándanos

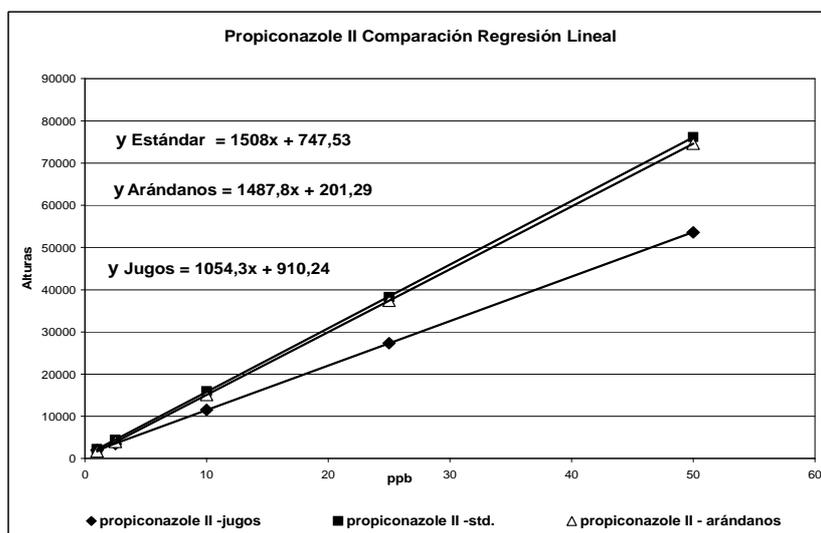


Figura 69. Comparación Rectas Regresión Propiconazole II CWX/DVB - GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos de Arándanos

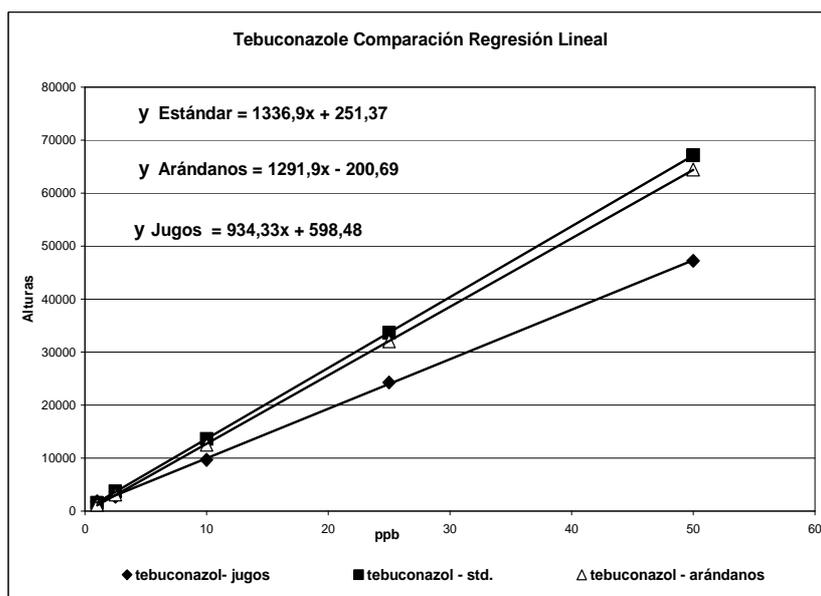


Figura 70. Comparación Rectas Regresión Tebuconazole - CWX/DVB -- GC-NPD Estándares vs. Arándanos vs. Jugos de Arándanos

Se puede concluir que existen diferencias significativas entre todas las rectas de regresión correspondientes a las diferentes matrices evaluadas. Éstas pueden deberse a diversos factores, pero fundamentalmente a las fuerzas de interacción entre el analito y la matriz y a la presencia de interferencias, dependiendo de la naturaleza de la matriz, propiedades químicas de los analitos y a la posible partición de los analitos en las ceras naturales de las bayas y cuya presencia en los jugos es factible, debido a que el lavado no logra eliminarlas totalmente de las mismas, como así también a la selectividad del polímero para lograr una mayor transferencia de masa desde la solución acuosa de la matriz.

Persistencia de los Residuos en Jugos Naturales y Procesados

Las frutas tratadas en los cultivos pueden contener residuos de plaguicidas al momento de ingresar a la línea de producción y ser transferidos a los jugos, por lo que se plantearon como objetivos evaluar la incidencia de los procesos tecnológicos en la persistencia de los residuos en dichos productos

Para lo cual, se establecieron cuatro puntos de muestreos en la línea: *fruta al ingreso*, *fruta postlavado*, *jugos naturales* y *jugos procesados*. En dos temporadas agrícolas se efectuaron 5 muestreos de tres lotes diferentes por cada jornada de producción, con un total de treinta muestras, las cuales se procesaron por triplicado.

Se aplicaron las mismas condiciones extractivas y cromatográficas para la determinación de triazoles en este tipo de matrices y determinaron los parámetros estadísticos correspondientes.

Se evaluó la persistencia de los residuos de propiconazole, triadimefon y tebuconazole ya que, del total de los muestreos sólo se detectaron estos fungicidas en muestras de frutas al ingreso de la línea. Los resultados correspondientes a los tres lotes que presentaron diferentes niveles residuales de propiconazole se resumen en las tablas 63 a 65, informándose los valores medios como la suma de los dos isómeros de dicho analito y los lotes fueron identificados por temporada de producción.

Tabla 63. Persistencia de residuos de Propiconazole- Muestreo N° 3 - Lote 2 -2007 (n= 3 y $\alpha = 0,05$)

| Propiconazole I-II | Fruta ingreso | Fruta postlavado | Jugo natural | Jugo procesado |
|--|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| Promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 49,80 | 25,30 | 17,23 | 9,53 |
| Desviación Estándar | 2,71 | 1,49 | 1,34 | 1,05 |
| RSD% | 5,43 | 5,90 | 7,79 | 11,02 |
| Intervalo confianza | $\pm 6,73$ | $\pm 3,71$ | $\pm 3,34$ | $\pm 2,61$ |
| Persistencia % | 100,00 | 50,80 | 34,61 | 19,14 |

Tabla 64. Persistencia de residuos de Propiconazole-Muestreo N° 5 - Lote 3 -2007 (n= 3 y $\alpha = 0,05$)

| Propiconazole I-II | Fruta ingreso | Fruta postlavado | Jugo natural | Jugo procesado |
|--|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| Promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 15,63 | 7,93 | 5,43 | 2,97 |
| Desviación Estándar | 0,95 | 0,93 | 0,91 | 0,47 |
| RSD | 6,05% | 11,71% | 16,70% | 15,93% |
| Intervalo confianza | $\pm 2,35$ | $\pm 2,31$ | $\pm 2,26$ | $\pm 1,18$ |
| Persistencia Relativa | 100,00% | 50,75% | 34,75% | 18,98% |

Tabla 65. Persistencia de residuos de Propiconazole -Muestreo N° 4- Lote1 -2008 (n= 3 y $\alpha = 0,05$)

| Propiconazole I-II | Fruta ingreso | Fruta postlavado | Jugo natural | Jugo procesado |
|--|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| Promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 67,77 | 32,80 | 20,27 | 6,43 |
| Desviación Estándar | 2,55 | 1,47 | 1,74 | 1,07 |
| RSD | 3,76% | 4,49% | 8,58% | 16,62% |
| Intervalo confianza | $\pm 6,34$ | $\pm 3,66$ | $\pm 4,32$ | $\pm 2,66$ |
| Persistencia Relativa | 100,00% | 48,40% | 29,9% | 19,61% |

Los resultados indican que el lavado de la fruta logra eliminar aproximadamente el 50% de los residuos, pero evidentemente, dado el carácter sistémico del fungicida, éste ha penetrado en el interior del fruto y consecuentemente su presencia es detectada en los jugos naturales y procesados, donde la persistencia aproximada de los residuos respecto a la carga inicial es del 34% y 19 % respectivamente. El tratamiento enzimático logra reducir en un 80% los residuos.

En el lote1-2008 los niveles iniciales en fruta sobrepasaron los LMRs, los residuos en jugos son relativamente bajos, aunque no existe en nuestro país legislación para estos fungicidas en jugos de arándanos y son las exigencias de los mercados internacionales las que rigen las exportaciones, que establecen para numerosos plaguicidas valores en jugos de aproximadamente de 10 µg/kg. En las figuras 71 y 72 se puede observar la evolución de los residuos de propiconazole y tebuconazole en la línea de obtención de jugos de arándanos.

Respecto al tebuconazole, podemos observar que la persistencia en jugos procesados es ligeramente inferior en relación a los otros fungicidas, causada posiblemente a una degradación enzimática más efectiva de dichos residuos. Los resultados obtenidos en los diferentes muestreos se pueden ver en las tablas 66 a 68.

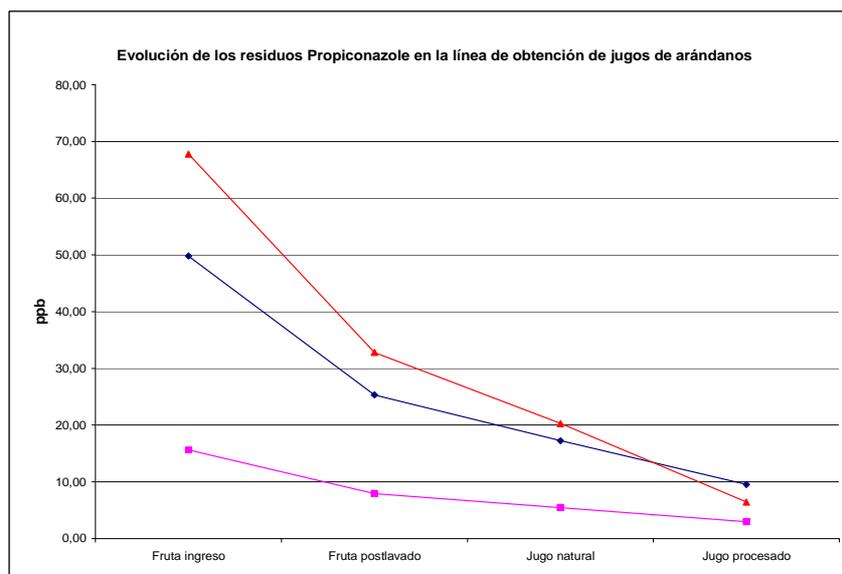


Figura 71. Evolución de los residuos de Propiconazole en la línea de obtención de Jugos Muestreo N° 3 - Lote 2 -2007- Muestreo N° 5 - Lote 3 -2007 - Muestreo N° 4- Lote1 -2008 (n= 3 y $\alpha =0.05$)

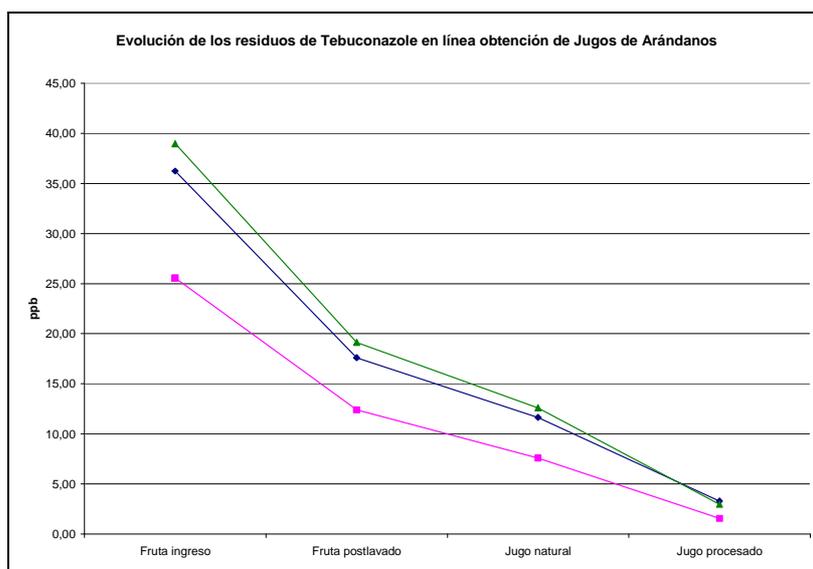


Figura 72. Evolución de los residuos de Tebuconazole en la línea de obtención de Jugos- Muestreo N° 5- Lote 3 -2008 - Muestreo N° 2- Lote2 -2008- Muestreo N° 4- Lote3 -2008 (n= 3 y $\alpha =0.05$)

Tabla 66. Persistencia de residuos de Tebuconazole - Muestreo N° 5- Lote 3 -2008 (n= 3 y $\alpha =0,05$)

| Tebuconazole | Fruta ingreso | Fruta postlavado | Jugo natural | Jugo procesado |
|--|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| Promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 36,2 | 17,6 | 11,6 | 3,3 |
| Desviación Estándar | 0,86 | 0,89 | 0,70 | 0,70 |
| RSD | 2,38% | 5,05% | 6,04% | 21,21% |
| Intervalo confianza | $\pm 2,14$ | $\pm 2,21$ | $\pm 1,75$ | $\pm 1,74$ |
| Persistencia Relativa | 100% | 48,57% | 32,11% | 18,75% |

Tabla 67. Persistencia de residuos de Tebuconazole - Muestreo N° 2- Lote2 -2008 (n= 3 y $\alpha =0,05$)

| Tebuconazole | Fruta ingreso | Fruta postlavado | Jugo natural | Jugo procesado |
|--|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| Promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 25,57 | 12,40 | 7,60 | 1,57 |
| Desviación Estándar | 1,86 | 1,06 | 0,82 | 0,46 |
| RSD | 7,28% | 8,53% | 10,77% | 29,48% |
| Intervalo confianza | $\pm 4,63$ | $\pm 2,63$ | $\pm 2,04$ | $\pm 1,15$ |
| Persistencia Relativa | 100,00% | 48,50% | 29,73% | 12,63% |

Tabla 68. Persistencia de residuos de Tebuconazole - Muestreo N° 4- Lote3 -2008 (n= 3 y $\alpha =0,05$)

| Tebuconazole | Fruta ingreso | Fruta postlavado | Jugo natural | Jugo procesado |
|--|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| Promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 38,97 | 19,13 | 12,60 | 2,97 |
| Desviación Estándar | 2,21 | 1,07 | 0,92 | 0,21 |
| RSD | 5,68% | 5,59% | 7,27% | 7,02% |
| Intervalo confianza | $\pm 5,50$ | $\pm 2,66$ | $\pm 2,28$ | $\pm 0,52$ |
| Persistencia Relativa | 100,00% | 49,10% | 32,34% | 15,51% |

El fungicida triadimefon fue detectado sólo en un lote de frutas de la variedad Mysti en la temporada 2007 y con niveles en las bayas más bajos, su evolución puede observarse en la tabla 69.

Tabla 69. Persistencia de residuos de Triadimefon - Muestreo N° 1- Lote1 -2007 (n= 3 y $\alpha =0,05$)

| Triadimefon | Fruta ingreso | Fruta postlavado | Jugo natural | Jugo procesado |
|--|----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| Promedio $\mu\text{g}/\text{kg}$ | 17,3 | 8,4 | 4,6 | 1,4 |
| Desviación Estándar | 1,23 | 0,86 | 0,65 | 0,47 |
| RSD | 7,15% | 10,22% | 14,25% | 34,58% |
| Intervalo confianza | $\pm 3,07$ | $\pm 2,14$ | $\pm 1,62$ | $\pm 1,18$ |
| Persistencia Relativa | 100% | 48,84% | 26,45% | 16,21% |

Existe una ligera disminución de la persistencia de este fungicida tanto en jugos naturales como en los procesados, esto posiblemente sea causado por un menor grado de penetración del triadimefon en los frutos y/o a la naturaleza de la variedad evaluada. La curva de degradación es similar a los demás fungicidas, sin embargo estos resultados no son concluyentes ya que no se encontraron otros lotes con niveles iniciales de triadimefon en frutos y los datos disponibles son escasos.

En la figura 73 se ha graficado la evolución de los residuos expresados en valores medios ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de los diferentes fungicidas evaluados en el proceso de obtención de jugos de arándanos a escala planta piloto.

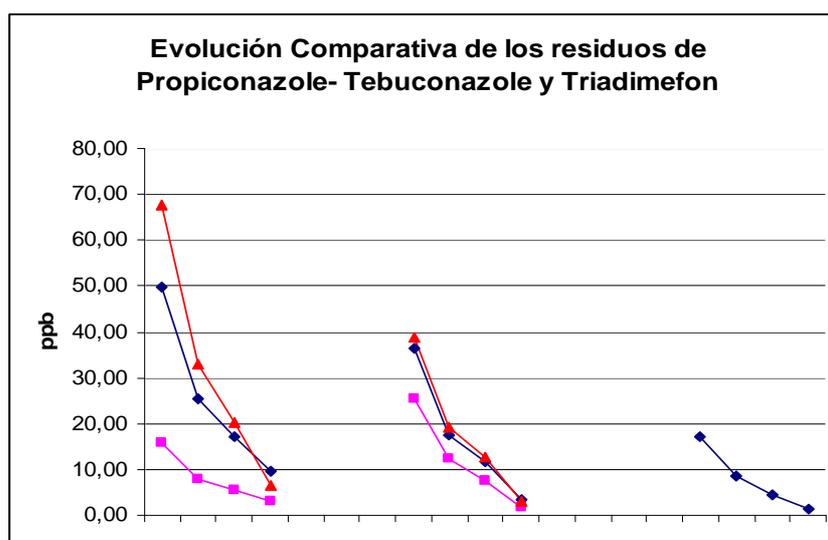


Figura 73. Evolución de los Residuos de Propiconazole, Tebuconazole y Triadimefon en la línea de obtención de Jugos- Muestreo 2007 y 2008 (n= 3 y $\alpha=0,05$).

Sin embargo, es necesario indicar que las prácticas a nivel industrial pueden ser algo diferentes, tal como lo proponen algunos autores en diversas metodologías de procesamiento, que difieren en el tratamiento inicial de las frutas, temperatura de escaldado, agregado de anhídrido sulfuroso, etc. Estas tecnologías evidentemente incidirán en la disipación de los residuos de forma diferente y consecuentemente la persistencia relativa de los mismos pueden ser también variables.

La temperatura en el proceso es uno de los factores más relevantes a considerar, ya que la fruta es almacenada congelada para evitar su deterioro y al momento de comenzar el proceso de elaboración se descongela hasta alcanzar los 5°C aproximadamente (Skrede et al., 2000; Lee et al., 2002; Rossi et

al., 2003; Cisse et al., 2009; Brambilla et al., 2008). Una vez alcanzada la temperatura deseada y previa a la trituración de la fruta, algunos investigadores proponen realizar un proceso de escaldado o sulfitado para favorecer la inactivación de enzimas, principalmente de la polifenoloxidasa, causantes de la destrucción de antocianinas y otros compuestos fenólicos de importancia para la calidad y valor nutricional del producto terminado.

El tratamiento térmico también incrementaría la permeabilidad de las células del pericarpio de la fruta con lo que ayudaría a la extracción de antocianinas y flavonoles. El escaldado se realiza a 85 °C durante 3 minutos en túneles donde se inyecta vapor y luego se enfría con agua (Rossi et al., 2003; Brambilla et al., 2008).

Otra posibilidad, según Lee et al. (2002), es realizar el escaldado a 95 °C durante 2 min y luego enfriar rápidamente hasta 38°C. Estos autores experimentaron también un proceso de sulfitado (100 ppm SO₂) en lugar del tratamiento térmico, para lo cual adicionaron metabisulfito de potasio en dos etapas, la primera antes de la trituración y la segunda luego de la misma. Brownmiller et al. (2008) proponen escaldar a 95°C durante 3 min, enfriando luego hasta 40 °C. A continuación se lleva a cabo la trituración de la fruta pudiéndose emplear para ello distinta clase de equipamiento.

Luego se procede a la despectinización mediante la adición de enzimas comerciales y la concentración de enzimas a agregar, la temperatura óptima de trabajo, así como el tiempo de proceso, dependerá del "pool" comercial empleado. Una vez completada la despectinización se procede a la extracción del

jugo en una etapa de prensado. Los rendimientos de extracción dependen mucho de las condiciones de operación y fundamentalmente de la variedad de arándano debido a que poseen distinto contenido de agua, sólidos solubles, etc., pero a pesar de estas diferencias los rendimientos oscilan entre 75 y 83%.

La etapa siguiente en el proceso de elaboración es la pasteurización mediante un sistema de HTST (alta temperatura – corto tiempo) por ejemplo 90°C durante 1 minuto. Una vez finalizada la misma, el jugo puede ser filtrado y embotellado para ser comercializado como tal. Sin embargo, muchas industrias realizan posteriormente una concentración del jugo desde alrededor de 10 a 15 Brix iniciales hasta valores del orden de los 74 Brix, con lo cual se da por finalizado el proceso.

Una vez obtenido el jugo de arándano, debe ser almacenado en condiciones adecuadas para su conservación, comparado con un jugo pasteurizado, el jugo sin pasteurizar, sufre una disminución del contenido de antocianinas durante el almacenamiento, con pérdidas del 20%, 52% y 68% observadas durante 1, 3 y 6 meses de almacenamiento respectivamente. Transcurridos 60 días a 23°C se han reportado sólo un 50% de las antocianinas presentes en la fruta fresca y a los 6 meses de almacenamiento, el jugo sólo retuvo 23% del contenido inicial, dichas pérdidas pueden deberse a la polimerización de las antocianinas (Srivastava et al., 2007; Brownmiller et al., 2008; Pereira et al., 2010; Wang et al., 2007).

Como puede observarse, existen numerosos cambios en el contenido natural de los frutos durante el proceso industrial de

obtención de los jugos, lo que hace suponer que la cinética de disipación de los residuos también puede estar influenciada por factores diferentes, siendo uno de los más importantes la temperatura y la acción enzimática.

VIII- Aplicación de la SPME para la Determinación de otros Plaguicidas en Muestras de Arándanos

Introducción

Teniendo en cuenta la importancia que cobra en el marco de calidad de los productos agroindustriales, la trazabilidad de la materia prima, fundamentalmente a lo referido a los residuos de plaguicidas, es necesario considerar la problemática desde la perspectiva del productor, que necesariamente debe preservar su cultivo, lograr comercializar su producción como frutos frescos que cumplan con las exigencias de los mercados internacionales y desde el enfoque industrial a partir de los productos que dan valor agregado a la producción, tales como los jugos, pasas, mermeladas, etc.

El control de plagas en los cultivos se efectúa en nuestra región según las prácticas agrícolas tradicionales, lo que involucra el uso de diversos plaguicidas, los cuales son aplicados en diferentes momentos del desarrollo del cultivo y presentan una gran diversidad de situaciones, en las cuales los factores ambientales, naturaleza del sustrato vegetal, propiedades fisicoquímicas del principio activo y tiempos de aplicación son las variables más importantes que inciden en el contenido de residuos en los frutos al momento de su cosecha. Los tiempos de carencia muchas veces no son los estipulados en el rótulo del producto comercial, por lo que se han evaluado algunos plaguicidas, considerados como críticos al momento de la

comercialización, tales como ciertos herbicidas, insecticidas y fundamentalmente otros fungicidas de aplicación más recientes a los evaluados. Estos plaguicidas tienen diferentes principios activos y su clasificación química es muy variada, ya que podemos citar entre otros, organofosforados, fosfitos, piretroides, estrobilurinas, ditiocarbamatos, triazoles, etc.

En capítulos anteriores se ha evaluado la evolución de algunos fungicidas en la que la degradación química ha sido la vía esencial de la eliminación de los residuos pero, teniendo en cuenta que la velocidad de disipación depende fundamentalmente de la estructura química del sustrato vegetal, del plaguicida, de la temperatura e iluminación solar, la aplicación en los cultivos de otros plaguicidas cuya estructura les confiere una mayor o menor estabilidad química la velocidad de degradación difiere notablemente y los residuos pueden estar presentes en los frutos frescos, lo que hace necesario el control y evolución de los mismos y se consideró importante ampliar el espectro de aplicación de la metodología desarrollada SPME para la determinación de otros plaguicidas por GC-NPD y GC- μ ECD (Detector de micro captura de electrones)

Se describen a continuación algunos de los principios activos que han sido determinados por esta técnica analítica: Paration, Diazinon, Malation, Fenitrothion y Metil Paration, Clorpirifos, Cipermetrina, de acción fundamentalmente insecticida y los fungicidas Clorotalonil, Boscalid, Ciprodinil, Miclobutanil, Fludioxonil, Ciproconazole y Trifloxistrobil

Materiales y Métodos

Los reactivos, el equipamiento, la preparación de blancos y muestras, adicionadas, condiciones del proceso extractivo, selección del polímero de recubrimiento más adecuado, procedimientos metodológicos y el análisis estadísticos de los resultados, etc. son similares a los ya descritos para la determinación de los fungicidas triazólicos evaluados.

Se efectuaron ensayos previos para determinar las óptimas condiciones cromatográficas y determinar los tiempos de retención de cada uno de los analitos, a partir de muestras de frutas adicionadas a 0,5 mg/l y pH 7, se seleccionó el recubrimiento más adecuado y las soluciones se mantuvieron en agitación de 3.000 rpm durante 10 minutos de inmersión (Pawliszyn, 1997; Magdic et al., 1996).

Dado que la metodología tiende a efectuar determinaciones multiresiduos y las características químicas de los analitos son diferentes fue necesario introducir cambios en la programación de la rampa de temperatura del horno. Se estableció un tiempo de desorción de la fibra en el inserto de 3 min y la temperatura inicial del horno a 80°C durante 3,5 minutos, una rampa de 55 °/min hasta 260 °C durante 2 min y a 10°C/min hasta 280°C durante 4 min, a fin de lograr separar y resolver adecuadamente los cromatogramas correspondientes a muestras de frutas y jugos de arándanos adicionados con soluciones de estándares individuales y mezcla.

Se efectuaron inyecciones directas de estándares a fin de establecer la relación entre masa inyectada y respuestas

cromatográfica y mediante la curva de calibración se determinaron los perfiles de concentración, masa total absorbida, constantes de distribución, coeficientes de difusión y volumen de muestra.

Para determinar la linealidad, precisión, recuperación y límites de detección y cuantificación se prepararon muestras adicionadas con clorotalonil, boscalid, ciprodinil, miclobutanil, fludioxonil, ciproconazole y triflucistrobin a diferentes concentraciones.

Los insecticidas clorpirifos y cipermetrina que pueden llegar a estar presentes en los frutos también fueron evaluados, pero se efectuaron ensayos independientes puesto que se observó que los tiempos de retención del malatión y del clorpirifos se superponen con algunos de los plaguicidas antes mencionados y además, la cipermetrina no es detectada adecuadamente por este método (Barberá, C. 1989; Choudhury et al., 1996; Magdic et al., 1996; Cabras et al., 1997; Pawliszyn, 1997; Rial Otero et al., 2002; Basa Cesnik et al., 2003; Walorczyk, S., 2007; Basa Cesnik et al., 2008; Vaquero Fernández et al., 2008; Bourgin et al., 2009; De Souza Pinheiro y Andrade, 2009; Li, et al., 2009).

A fin de solucionar estos inconvenientes, se determinó dimetoato, metil paration, malation y paratión en muestras de arándanos adicionadas pero, utilizando como polímero de recubrimiento de la fibra el PDMS y a otras condiciones cromatográficas, en las que se modifica la rampa de temperatura del horno, según el método optimizado para la determinación de organofosforados por GC-NPD.

Por otra parte, por experiencias previas en otras matrices, tales como frutas y productos cítricos, se dispone de métodos

optimizados para la determinación simultánea de clorpirifos y cipermetrina por GC- μ ECD, por lo que se adoptó el mismo método extractivo (CWX/DVB) y las condiciones cromatográficas de esta metodología a fin de lograr la adecuada separación y resolución de los picos, fundamentalmente de los 4 isómeros de la cipermetrina.

El análisis de los resultados y la determinación de los diferentes parámetros estadísticos se efectuaron adoptando similar criterio y utilizando el mismo programa.

Resultados y Conclusiones

A partir de soluciones mezcla de dimetoato, metil paratión, malatión y paratión 5, 50 y 100 μ l/l con tiempos de exposición de 5, 10, 15, 20, 30, 60 y 900 minutos se determinó el perfil de concentración. La selección del polímero se estableció a partir del análisis estadístico de los resultados obtenidos a partir de muestras adicionadas de arándanos a 100 μ l/l de diazinon, metil paratión, fenitrotion, malatión y paratión, utilizando PDMS, CWX/DVB y PA, 10 min de inmersión y agitación a 3000 rpm. Se estableció la aleatoriedad e independencia de las muestras, normalidad de las observaciones y homogeneidad de las varianzas. El contraste múltiple de rango, test de Tukey, indicó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las fibras, siendo el PDMS el que logra mayor respuesta para la mayoría de los analitos. Sin embargo, el CWX/DVB logra incrementar la absorción del metil paratión y malatión en esas

condiciones, y por lo tanto puede ser adecuado para la determinación individual de estos plaguicidas.

Se graficaron las curvas de masa absorbida vs tiempo, se determinaron las constantes de distribución absorbente/agua (K) y los coeficientes de difusión (Df) para cada uno de los analitos, los valores medios se expresan a continuación:

Dimetoato: $K = 589$ y $Df = 1.10 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$; Metil paratión: $K = 2476$ y $Df = 6.4 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$; Malatión: $K = 2338$ y $Df = 4.6 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$; Paratión: $K = 13533$ y $Df = 4.9 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ respectivamente

Se puede observar que la afinidad con el recubrimiento y la velocidad de absorción del metil paratión, malatión y paratión son muy altas y en 20 min aproximadamente se alcanza a absorber el 90% de la masa total. Dicha masa absorbida equivale a respuestas cromatográficas de una inyección directa de 2 μl a 131; 125 y 390 $\text{ng}/\mu\text{l}$ respectivamente. Ello evidencia la elevada sensibilidad del método. En cambio, el dimetoato recién lo logra a los 600 min de inmersión, según puede observarse en las siguientes curvas de perfil de concentración de la figura 74.

Los valores de masa absorbida fueron determinados a partir de las curvas de regresión lineal por inyección directa de soluciones de estándares a diferentes concentraciones, según lo indica la bibliografía (Pawliszyn, 1997).

A partir de muestras de arándanos adicionadas a 100, 50, 25, 10, 5 y 1 $\mu\text{l/l}$ se obtuvieron los valores medios de de las respuestas cromatográficas expresados en áreas y alturas de picos, la desviación estándar, coeficientes de variación relativa, intervalos de confianza y demás parámetros estadístico que permitieron determinar las curvas de regresión lineal, la precisión,

exactitud y los límites de detección del método.

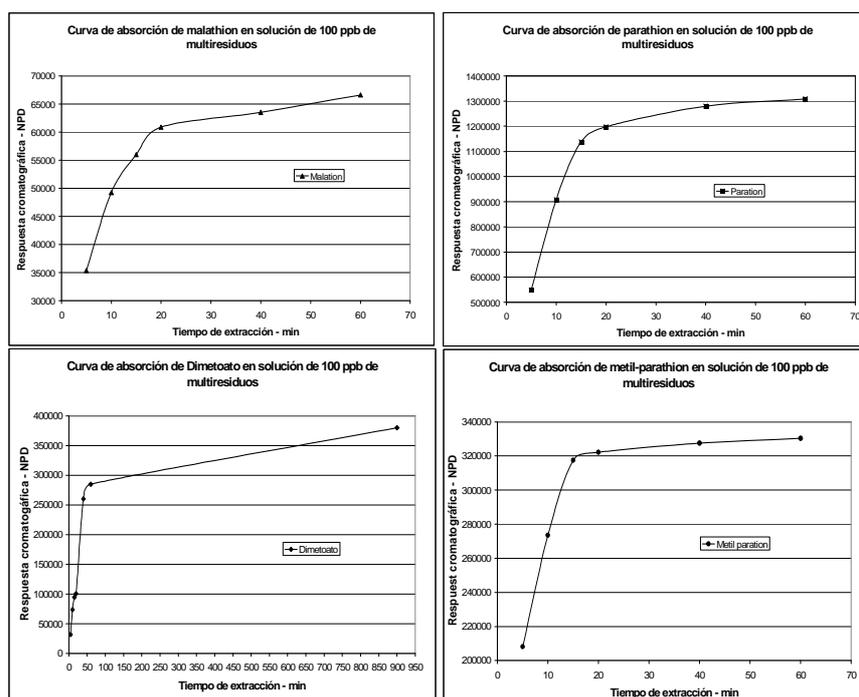


Figura 74. Curvas de absorción – Muestras multiresiduos a 100 µl/l de Dimetoato, Metil Paratión, Malatión y Paratión- PDMS- GC-NPD (n=3 y $\alpha=0,05$)

Se pudo observar que para determinar específicamente el dimetoato es necesario utilizar mayores tiempos de inmersión del polímero, dado que su velocidad de absorción es muy baja comparada con la de los demás analitos y además, para concentraciones muy bajas los picos no se resuelven adecuadamente y presentan una deriva o cola “tailing” relativamente importante. Los resultados obtenidos indicaron que el método tiene una adecuada precisión y las recuperaciones son del orden del 96,8 a 98,7 %, sin embargo para dimetoato a concentraciones entre 5 y 1 µl/l éste no es muy preciso y la

recuperación sólo es del 80,2, ya que presenta dificultades en la resolución cromatográfica.

En ensayos posteriores se incorporaron dos organofosforados a las muestras, diazinon y fenitotrión, ya que en esa temporada agrícola se estaban aplicando en cultivos aledaños y podrían ser causales de la presencia de residuos en los frutos provenientes de plantas cercanas a dichos sitios, fundamentalmente en aquellas en las que no existen cortinas arbóreas protectoras de las derivas.

A fin de identificar adecuadamente los analitos evaluados por esta metodología, se efectuaron determinaciones cromatográficas por GC-MSD en modo SCAN y SIM y se determinaron los espectros de masa correspondientes, seleccionándose los iones para la cuantificación de los mismos. En la figura 75 se presenta un cromatograma en condiciones operativas en que se aceleró la rampa de calentamiento del horno a fin de acortar la corrida y el tiempo de análisis; correspondiente a muestras de arándanos adicionadas a 50 µl/l. Los tiempos de retención (RT) para los analitos son: Diazinon (RT: 9,996), Metil Paratión (RT:10,839), Fenitrotión (RT: 11,949), Malatión (RT:12,586) y Paratión (RT:12,698) (figura 75).

La metodología fue aplicada a muestras de arándanos de empaques y los resultados presentaron una importante variabilidad según la procedencia de las frutas, debido a posibles contaminaciones por deriva de las aplicaciones en cultivos aledaños, fundamentalmente de cítricos, en los cuales el uso de insecticidas es mayor debido a la necesidad de controlar la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata*), causante de pérdidas muy

importantes para el sector. Los insecticidas mayormente usados son el clorpirifos, malatión y cipermetrina.

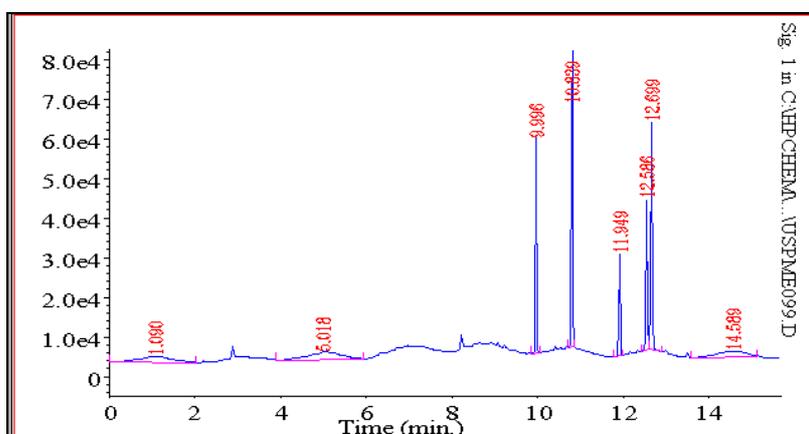


Figura 75. Cromatograma PDMS- GC-NPD. Muestra de arándanos adicionada con Diazinon, Metil Paratión, Fenitroton, Malatión y Paratión a 50 µl/l.

El plan de muestreo se estableció en función de asumir una situación de mayor riesgo de contaminación de los frutos, para lo cual el momento de muestreo fue seleccionado teniendo en cuenta las horas transcurridas después de las aplicaciones y el grado de maduración de los frutos. Dado que esta planificación no puede ser adecuadamente controlada, sólo se pudieron efectuar los muestreos en los siguientes escenarios: a 48 horas de aplicados los plaguicidas en los cultivos y frutos próximos a su maduración óptima.

Se efectuaron 5 muestreos por triplicado en 2 cultivos considerados como críticos e identificados como A y B (C_A y C_B), el momento de recolección se efectuó a las 48 horas después de las aplicaciones en los cultivos cítricos y se seleccionaron las muestras de los 3 lotes linderos, a fin de observar la mayor

factibilidad de riesgo por contaminación de los frutos, cuyo grado de maduración era próximo a la cosecha. Los resultados de dichos muestreos pueden observarse en la tabla 70.

Tabla 70. Valores medios de Clorpirifos y Malatión en Arándanos. Evaluación de la contaminación por deriva de las aplicaciones en cultivos aledaños.

| Clorpirifos | C A - Lote 1- A | C A - Lote 2-A | C A - Lote 3-A |
|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| µg/kg | 12,50 | 5,17 | N.D* |
| Desviación estándar | 1,71 | 0,85 | * No detectado |
| Coeficiente variación | 13,67 % | 16,46 % | |
| Intervalo confianza | ± 4,25 | ± 2,12 | |
| Malatión | C B - Lote1-B | C B - Lote 2-B | C B - Lote 3-B |
| µg/kg | 21,00 | 31,27 | 15,93 |
| Desviación estándar | 1,49 | 1,86 | 1,52 |
| Coeficiente variación | 7,11 % | 5,95 % | 9,53 % |
| Intervalo confianza | ± 3,71 | ± 4,63 | ± 3,77 |

En ninguno de los lotes fueron detectados residuos de cipermetrina en frutos. Podemos indicar que la contaminación es factible, aunque los valores medios para ambos insecticidas se encuentran por debajo de los LMRs según lo establecido para nuestro país es de 50 µg/kg (R Senasa N° 619/05), Estados Unidos de América (USA): 2 ppm, Unión Europea (UE): 50 µg/kg y Japón: 1 mg/kg. Sin embargo, el malatión en arándanos está restringidos en Argentina, aunque si lo permiten los países antes mencionados con LMRS de 50 µg/kg. Por lo que, la exportación de estos frutos no tendría inconvenientes en cuanto al cumplimiento de las legislaciones vigentes.

La aplicación de la SPME para la determinación de otros fungicidas en arándanos, tales como, Clorotalonil, Boscalid, Ciprodinil, Miclobutanil, Fludioxonil, Ciproconazole y Trifloxistrobin

fue optimizada según la metodología descrita y los resultados obtenidos indicaron que el método es de adecuado para la extracción con CWX/DVB y su determinación por GC-NPD en muestras de arándanos adicionadas.

Los resultados de los cromatogramas multiresiduos de muestras de arándanos adicionadas indicaron que los tiempos de retención del miclobutanil y el fludioxanil se superponen y no se logró su adecuada separación, tal como puede observarse en la figura 76, a RT: 10,936.

A partir de las muestras de arándanos adicionadas a 100, 50, 25, 10, 5 y 1 µg/l a pH 7, utilizando CWX/DVB como polímero selectivo, 3000 rpm de agitación y GC-NPD en las condiciones establecidas, se obtuvieron los valores medios de las respuestas cromatográficas expresados en áreas y alturas de picos, la desviación estándar, coeficientes de variación relativa, intervalos de confianza y demás parámetros estadístico que permitieron determinar las curvas de regresión lineal, la precisión, exactitud y los límites de detección del método. Se pudo concluir que el método es adecuado, preciso, de alta sensibilidad y recuperaciones apropiadas.

El análisis estadístico de los resultados permitió concluir que el método es de adecuada precisión, las recuperaciones fueron del 96,2 a 98,5 % y alta sensibilidad

Dado que existen productos comerciales formulados en base a más de un principio activo, tales como las mezclas de Boscalid +Piraclostrobin y Tebuconazole + Trifloxistrobin, la presencia simultánea de estos residuos en los frutos es factible, y

los resultados obtenidos deben expresarse como la suma de ambos.

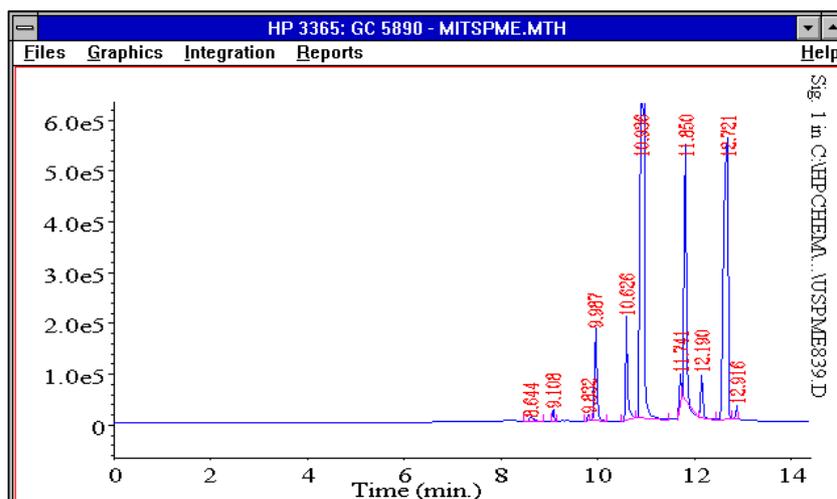


Figura 76. Cromatograma CWX/DVB-GC-NPD. Muestra de arándanos adicionada a 100 µg/l Clorotalonil (RT: 9,997), Boscalid (RT: 10,626), Fludioxonil (RT: 10,936), Ciproconazole (RT: 11,850) y Trifloxistrobin (RT: 12,721).

En las temporadas agrícolas 2008 y 2009 se efectuaron 8 muestreos por triplicado de dos empaques, identificados como E₁ y E₂. Los niveles residuales encontrados fueron de tebuconazole y trifloxistrobin, clorotalonil, fludioxonil y boscalid, y la identificación de los espectros de masa se determinó por SPME y GC-MSD. Los valores medios de los residuos evaluados se detallan en las tablas 71 a 74.

Tabla 71. Valores Medios de Residuos de Tebuconazole+ Trifloxistrobin, Clorotalonil, Fludioxonil y Boscalid en Muestras de Arándanos expresados $\mu\text{g}/\text{kg}$ - E 1/2008 -

| E ₁ /2008 | Lote Nº 1 | Lote Nº2 | Lote Nº 5 | Nº 6 |
|--------------------------------------|------------|-----------|------------|-----------|
| Tebuconazole +Trifloxistrobin | N.D | 58± 3,55 | N.D | ND |
| Clorotalonil | 8 ± 0,95 | N.D | N.D | ND |
| Fludioxonil | 39,5 ± 2,4 | N.D | 44,7 ± 3,7 | 13,9 ±1,4 |
| Boscalid | ND | 145 ± 7,7 | 224± 8,5 | 266± 9,4 |

N.D* No detectado

Tabla 72. Valores Medios de Residuos de Ciprodinil y Boscalid en Muestras de Arándanos expresados $\mu\text{g}/\text{kg}$ - E 2 /2008

| E ₂ /2008 | Lote Nº 3 | Lote Nº4 | Lote Nº 7 | Nº 8 |
|----------------------|-----------|----------|-----------|------|
| Ciprodinil | N.D | 18± 2,55 | 23 ± 3,5 | ND |
| Boscalid | 28 ± 1,75 | N.D | N.D | ND |

N.D* No detectado

Tabla 73. Valores Medios de Residuos de Tebuconazole+ Trifloxistrobin, Clorotalonil y Fludioxonil en Muestras de Arándanos expresados $\mu\text{g}/\text{kg}$

| E ₁ /2009 | Lote Nº 4 | Lote Nº5 | Lote Nº 7 | Nº 8 |
|--------------------------------------|------------|----------|------------|-----------|
| Tebuconazole +Trifloxistrobin | 44± 2,7 | 58± 3,55 | N.D | ND |
| Clorotalonil | 10 ± 0,25 | N.D | N.D | ND |
| Fludioxonil | 39,5 ± 2,4 | N.D | 44,7 ± 3.7 | 13,9 ±1,4 |

N.D* No detectado

Tabla 74. Valores Medios de Residuos de Ciprodinil, boscalid y Tebuconazole +Trifloxistrobin en Muestras de Arándanos expresados $\mu\text{g}/\text{kg}$ - E2 /2009

| E ₂ /2009 | Lote Nº 3 | Lote Nº6 | Lote Nº 7 |
|--------------------------------------|-----------|------------|-----------|
| Ciprodinil | N.D | 17± 2,2 | 21 ± 2,5 |
| Boscalid | ND | 39,5 ± 3,5 | N.D |
| Tebuconazole +Trifloxistrobin | | 50,2 ± 5,2 | |

N.D* No detectado

Los niveles residuales evaluados están en su mayoría dentro de los LMRs de las legislaciones vigentes, a excepción del Boscalid en lotes del E₁/2008, cuyos valores fueron $145 \pm 7,7$; $224 \pm 8,5$ y de $266 \pm 9,4$ µg/kg, ya que no cumplen con nuestra legislación vigente (R.S. SENASA ° 619/2005 y 803/2005), pero en caso de ser exportados a otros países no existirían problemas al respecto, tal como puede observarse en la tabla 75.

Tabla 75. Límites Máximos de Residuos expresados en mg/ kg

| LMRs | Argentina | UE | USA | Japón | Canadá | Codex |
|------------------------|-----------|--------------------|------|-------|--------|-------|
| Tebuconazole | 0,050 | 2 | 3 | 3 | RST | 3 |
| Trifloxistrobin | 0,020 | 0,020 | | | | |
| Fludioxonil | 0,050 | N.A (1 a 0,50) | 2 | 2 | RST | 2 |
| Boscalid | 3,50 | N.A (0,50) | 3,50 | 3,50 | N.R | 5 |
| Clorotalonil | 0,010 | 2 | 1 | 1 | 0,60 | 1 |
| Ciprodinil | 0,020 | N.A (0,02 a 2) | 3 | 3 | RST | 0,50 |

N.R: no registrado

RST: registrado pero sin tolerancia

N.A: no armonizado, sujeto a las regulaciones de cada país

La aplicación de la metodología a otras matrices, tales como frutas y productos cítricos cobra importancia ya que casi todos los plaguicidas antes evaluados son aplicados en cultivos y empaques, fundamentalmente los fungicidas.

Los resultados de los ensayos efectuados para fruta y jugos cítricos han sido satisfactorios y con las ventajas inherentes de esta técnica. Respecto a aceites esenciales, la SPME requiere

del uso de otros polímeros de recubrimientos, no disponibles aún en nuestro laboratorio de investigación, por lo que se deberá continuar en el desarrollo y la optimización de la misma para este tipo de matrices.

Teniendo en cuenta además que, la optimización de los parámetros del proceso extractivo se efectúa en muestras acuosas, es posible también concluir que dicha metodología es aplicable a muestras de agua, previo tratamiento de las muestras según la procedencia de las mismas.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En las técnicas analíticas para la determinación de residuos de plaguicidas a niveles trazas en alimentos, uno de los factores de mayor complejidad a resolver es el método más adecuado de preparación de la muestra, es decir, lograr extraer de la matriz la mayor masa del o los analitos a evaluar, para su posterior resolución, identificación y cuantificación, en este caso por cromatografía gaseosa, con adecuada precisión, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y alta sensibilidad analítica.

Si bien todas las etapas de una metodología analítica son importantes, la selección del proceso extractivo y el sistema de detección han sido considerados de relevancia, ya que junto con otros parámetros previos a establecer, una vez optimizados posibilitan la obtención de resultados con adecuado rigor científico.

Las referencias bibliográficas consultadas han demostrado que para similares o iguales analitos o matrices, se presentan diferentes procedimientos de extracción, el equipamiento utilizado, las condiciones cromatográficas, las recuperaciones y los límites de detección y cuantificación cambian, fundamentalmente cuando se efectúan determinaciones de multiresiduos

Diversos autores han propuesto y aplicado numerosos métodos tendientes mejorar las condiciones extractivas, siendo los más recientes aquellos que utilizan adsorbentes (SPE) ó polímeros selectivos (SPME), como así también un método

denominado por las siguientes siglas QuEChERS, derivadas de su denominación en inglés, desarrollado por el departamento de Agricultura de Estados Unidos de Norteamérica y aprobado por la AOAC (método 2007.01; en Europa bajo prEN-15662), el cual ha tenido una importante difusión para la determinación de plaguicidas en alimentos, aunque ha venido siendo a su vez modificado por diversos autores en función del sustrato ó naturaleza de los analitos a evaluar. Estos métodos presentan y demuestran atributos, sobre los cuales podemos centrar el enfoque de las discusiones generales de las diferentes etapas desarrolladas en la presente tesis doctoral.

Respecto al proceso extractivo aplicando SPME para la determinación de plaguicidas en agua, frutas y jugos, vegetales y diversas matrices, se ha observado que numerosos autores han adoptado esta metodología, con escasas modificaciones respecto al tratamiento previo de la muestra y utilizando polímeros similares a los ensayados. Se ha observado además que la SPE ha tenido una disminución en sus aplicaciones, sin embargo, publicaciones más recientes han incorporado la utilización de adsorbentes selectivos para el “clean up” y/o concentración de los analitos como una etapa del método QuEChERS.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y referidos a la determinación de triazoles con aplicación de SPME ó QuEChERS modificado y por GC-NPD y GC- MSD y PTV-GC-MSD, han sido comparados desde un enfoque teórico y de aplicación, a fin de plantear la discusión general, fundamentalmente con aquellos autores que han utilizados matrices similares (muestras de agua, frutos, jugos y vino), para lo

cual se citan alguno de ellos: Pawliszyn (1997), Beltran et al. (2000), Kataoka et al. (2000), Pérez-Trujillo et al. (2002), Teske y Engewald (2002), Zambonin et al. (2002), Millán et al. (2003), Stajnbaher et al. (2003), Juan-García et al. (2004), Sanusi et al. (2004), Sjaak y Pawliszyn (2004), Ouyang et al. (2005), Juan-García et al. (2005), Xiao-Gang et al. (2005), Dietz et al. (2006), Guo-Fang et al. (2006), Sauret-Szczepansky et al. (2006), Zimmermann et al. (2006), Duran Guerrero et al. (2007), Fenoll et al. (2007), Leandro et al. (2007), Ortiz y Sarabia, (2007), Poole et al. (2007), Walorczyk et al. (2007), Lesueur et al. (2008), Nguyen et al. (2008), González-Rodríguez et al. (2008a-2008b), González- Rodríguez et al. (2009), Walorczyk et al. (2009), entre otros.

Desde un enfoque teórico se pudo observar que las metodologías aplicadas concuerdan con los conceptos y parámetros optimizados por Pawliszyn (1997), autor de la metodología SPME, las ventajas de la misma son destacadas por Dietz et al., (2006), Pérez-Trujillo et al. (2002) y Zimmermann et al. (2006) efectúan similares procedimientos para comparar la eficiencia de los diferentes tipos de fibras, destacando el efecto del proceso extractivo en los coeficientes de partición (K) de los analitos y la importancia que tiene la determinación de éstos para interpretar la cinética del proceso.

Los resultados de las investigaciones efectuadas por Sauret-Szczepansky et al. (2006), referidas a la utilización y comparación de PDMS, PA y CWX/DVB para la determinación de plaguicidas en agua, son comparables con los obtenidos, además

la sensibilidad del método es aproximadamente del mismo orden que la de dichos autores.

Al adoptar metodologías de calibración se concordó con lo planteado por Ouyang et al. (2005), es decir, efectuar por inyección directa la optimización de las condiciones cromatográficas para establecer la correlación entre masa inyectada y respuestas, a partir de la cual se determinan las masas absorbidas por el polímero seleccionado a los diferentes tiempos de inmersión. Así mismo en la selección y ventajas del tipo de inserto o liner utilizado en el puerto de inyección para lograr la mayor transferencia de la masa inyectada a la cabeza de la columna y obtener una adecuada resolución de los picos en los cromatogramas.

En la optimización de los parámetros y utilización del PTV para la determinación por GC-MSD, el procedimiento adoptado fue sido similar al desarrollado por Stajnbaher et al. (2003). Se ha procedido o planteado una metodología concordante en varios aspectos pero, difiriendo en el tipo de inserto en el PTV y utilizando otra metodología de inyección. Sin embargo se considera factible compartir sus conclusiones respecto a utilizar menor número de inyecciones, ya que el mismo aumenta el efecto matriz. Otros autores que utilizan este tipo de inyector para la determinación de residuos de plaguicidas en matrices similares (Teske y Engewald, 2002; Sjaak y Pawliszyn, 2004; Duran Guerrero et al., 2007; Leandro et al., 2007; González -Rodríguez et al., 2008), en general se ha podido observar que al establecer el intervalo de concentraciones de las soluciones de estándares o muestras adicionadas para la determinación de los diferentes

parámetros de linealidad, precisión exactitud, reproducibilidad y sensibilidad del método, se han adoptado criterios similares, teniendo en cuenta los LMRs correspondientes a cada analito en cuestión y muchas veces a lo establecido por la legislación vigente del país donde se pretende comercializar la producción. No se han observado diferencias significativas en los coeficientes de correlación de las ecuaciones del modelo ajustado determinados en el presente estudio, con los presentados en las distintas publicaciones. El efecto matriz es observable, por lo cual en todas las técnicas se utilizan las curvas correspondientes a muestras fortificadas, como método de calibración para la determinación de los analitos en muestras reales.

Los valores medios comparativos de los niveles residuales de estos analitos en de muestras reales presentan diferencias muy importantes, puesto que los factores que inciden en los mismos son muy numerosos y complejos de evaluar en las diferentes situaciones.

Las recuperaciones observadas en la bibliografía son variables según los procedimientos y técnicas de detección, pero en general están dentro de un intervalo aproximado entre 70 y 101%. De forma similar ocurre con los límites de detección y cuantificación, aunque éstos presentan aún mayor variabilidad. Los valores medios de recuperación de los analitos en el intervalo de concentraciones establecidas en el presente trabajo, son comparables a los de los diferentes autores de referencia y con valores de detección similares a los de diversos autores (Trösken et al., 2005; Duran Guerrero et al., 2007; Fenoll et al. 2007; González-Rodríguez et al., 2009). Respecto a la sensibilidad del

método optimizado se ha observado en algunos casos valores de un orden o mayor a los citados.

Diversos autores han evaluado la degradación de ciertos triazoles en diferentes matrices y condiciones, tales como Guillard et al. (2002), Da Silva et al. (2003), Pei et al. (2004), Poce-Juan et al. (2006), Yi y Lu (2006), Lhome et al. (2007), Matthies et al., (2008), y en la evaluación de la disipación de los residuos en las diferentes situaciones y tipos de muestras, con cierta amplitud de criterio para la comparación de los resultados, se ha observado similitud en las curvas de degradación y en todos los casos la cinética de disipación es de primer orden. Los valores de V_{50} encontrados en este estudio son discretamente similares a los obtenidos por otros autores (Athanasopoulos et al., 2003; Fenoll, 2009).

Finalmente, es de destacar que si bien las aplicaciones de estas metodologías analíticas sobre matrices de origen vegetal son numerosas, no se ha observado en la bibliografía consultada técnicas específicas para la determinación de triazoles en frutos y jugos de arándanos, por lo que se considera importante el aporte de estos resultados a la comunidad científica y al sector productivo.

En función de los objetivos planteados en la presente tesis doctoral, se analizaron en cada una de las actividades desarrolladas los resultados obtenidos y evaluaron los parámetros estadísticos, lo cual permitió alcanzar las siguientes las conclusiones generales:

- La optimización del sistema para la determinación de triazoles por cromatografía gaseosa con detector de Nitrógeno-Fósforo e inyección directa, logrando establecer las bases para la continuidad del desarrollo metodológico, dado que las curvas de regresión lineal permitieron determinar la correlación entre masa inyectada y respuestas cromatográficas con adecuada precisión y sensibilidad.
- La aplicación y optimización de la metodología de microextracción en fase sólida, permitió establecer parámetros del proceso tales como la selección del polímero de recubrimiento, la dinámica de extracción, el modo de agitación, el tiempo de análisis, pH del medio acuoso, alcanzándose una muy buena extracción de los analitos de las soluciones acuosas. El tiempo de desorción en el puerto de inyección adoptado logró la completa desorción de la masa absorbida por el polímero y las respuestas cromatográficas obtenidas fueron de adecuada resolución, permitiendo la identificación y cuantificación de los picos correspondientes a los analitos evaluados.
- Las curvas de perfiles de concentración de los analitos en soluciones acuosas de estándares y matrices complejas permitieron: establecer el tiempo de equilibrio, la masa total absorbida, el volumen de muestra limitante, la determinación de constantes de distribución y los coeficientes de difusión de los analitos, a fin de evaluar la dinámica del proceso extractivo. La información obtenida reviste importancia,

haciendo posible un notable incremento de la sensibilidad de detección con el incremento del tiempo de inmersión, fundamentalmente en los casos en que los niveles residuales presentes en las muestras o los LMRs son muy bajos.

- La aplicación y optimización de metodología analítica permitió la determinación e identificación por GC-NPD y GC-MSD de residuos de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en arándanos y jugos de arándanos adicionados y en muestras reales con adecuada precisión, elevada recuperación y sensibilidad. Para todas las muestras el método de calibración adoptado fue a partir de muestras adicionadas, ya que existe efecto matriz. Los niveles de detección y cuantificación determinados fueron aproximadamente dos órdenes por debajo de los valores aceptables para dichos analitos y comparables a los observados en publicaciones bibliográficas. Se puede concluir que la metodología adoptada tiene ventajas importantes respecto a las técnicas extractivas tradicionales, ya que elimina el uso de solventes orgánicos, simplifica las etapas analíticas, mejora la sensibilidad y precisión, reduce el tiempo de análisis, disminuyendo costos analíticos. Puede considerarse además que la metodología tiene un amplio intervalo de aplicación para el control de residuos, en el marco de calidad de la producción regional, logrando satisfacer las demandas del sector.

- Los residuos evaluados en muestras de empaques variaron en las distintas temporadas, siendo el total de muestras positivas relativamente bajo, del orden del 12% con niveles inferiores a los límites máximos permitidos y sólo un 5% de las muestras superaron estos valores.
- Se efectuaron satisfactoriamente otras aplicaciones de la metodología optimizada a muestras de arándanos adicionales y de empaques, utilizando como polímeros de recubrimiento el polidimeilsiloxano y cambios en las condiciones cromatográficas para la determinación de otros plaguicidas, tales como paration, diazinon, malatión (permitido su uso en cultivos cítricos), fenitrotion y metil paration, clorpirifos, cipermetrina, de acción fundamentalmente insecticida y los fungicidas clorotalonil, boscalid, ciprodinil, miclobutanil, fludioxonil, ciproconazole y trifloxistrobin. En los diferentes muestreos se detectaron y cuantificaron en muestras reales residuos de malatión, clorpirifos, tebuconazole y trifloxistrobin, clorotalonil, fludioxonil y boscalid.
- Las contaminaciones por deriva de las aplicaciones de los insecticidas clorpirifos, malatión y cipermetrina en cultivos aledaños fueron evaluadas y los resultados indicaron la presencia de malatión y clorpirifos en las bayas de los lotes seleccionados como críticos o de riesgo, por lo que se pudo concluir que la contaminación es factible, aunque los valores medios para clorpirifos se encuentran por debajo de los LMRs según lo establecido para nuestro país, Estados Unidos de América, Unión Europea y Japón. Sin embargo, los residuos

de malatión en arándanos están restringidos en Argentina, aunque si lo permiten los países antes mencionados, por lo que la exportación de estos frutos no tendría inconvenientes en cuanto al cumplimiento de las legislaciones vigentes.

- En función de los resultados obtenidos, se ha observado que los procesos tecnológicos inciden en los niveles residuales de plaguicidas en jugos naturales y procesados. El proceso de lavado logra la mayor disminución de los residuos presentes en los frutos, determinando una persistencia relativa menor en los jugos procesados, posiblemente debido a los tratamientos enzimáticos y térmicos a los que éstos son sometidos.
- Se efectuaron las curvas de degradación de los plaguicidas aplicados sobre diferentes estadios de los cultivos y en condiciones controladas, lo cual permitió establecer la dinámica y cinética de disipación, observándose que las reacciones son de primer orden. Se determinó la constante específica de la velocidad de reacción para cada fungicida y se calculó la vida media residual, la cual varía según los analitos y momento de aplicación. Sin embargo, estos datos deben ser considerados orientativos, ya que las condiciones no son repetibles en el tiempo, aún para un mismo tipo de cultivo o una misma región geográfica.
- Se optimizaron las diferentes variables del inyector PTV a fin de adoptar esta metodología, que permite la introducción de grandes volúmenes de muestra por múltiples inyecciones en

modo venteo de solvente. Se determinaron e identificaron los espectros de masa/z respectivos por GC-MSD y se evaluaron los residuos de triadimefon, penconazole, propiconazole y tebuconazole en muestras adicionadas y reales de arándanos y en jugos de arándanos, alcanzándose adecuada precisión y elevada recuperación. Los límites de detección y cuantificación están por debajo de los valores aceptables para dichos analitos y de los alcanzados por otras técnicas analíticas, por lo que la sensibilidad del método se consideró adecuada.

- Los resultados comparativos de las respuestas cromatográficas o la masa inyectada obtenidos por estas dos técnicas (SPME-GC-NPD ó MSD y PTV- GC-MSD) indicaron que la metodología más eficiente resultó ser la microextracción en fase sólida. En los casos que se requiere extraer los analitos mediante solventes orgánicos, la metodología de inyecciones múltiples con venteo de solvente es más adecuada y de mayor sensibilidad que las técnicas tradicionales de inyección.
- El estudio de la evolución de los residuos en muestras de arándanos envasados en atmósferas modificadas y el almacenamiento en cámaras se vio dificultado, debido a la escasa disponibilidad en la región de muestras con estas características, siendo un factor de importancia al momento de obtener un elevado número de datos para estimar adecuadamente la disipación. Sin embargo se obtuvieron

datos, en los que se observó una lenta disipación de los residuos de tebuconazole, siendo en los frutos la persistencia relativa aproximadamente del 70% al día 20 de almacenamiento en cámara.

- Finalmente se puede concluir que las técnicas analíticas optimizadas son comparables a las observadas en las publicaciones bibliográficas, factibles de satisfacer las demandas y aportar al control eficiente de la producción del sector arandano de la región; posibilitando la toma de decisiones preventivas que logren preservar la calidad con mayor rentabilidad, protegiendo además la salud de potenciales consumidores y contribuyendo a minimizar la contaminación ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrícola Santa Blanca Limitada. Cosecha y postcosecha de arándanos (2007).
<http://www.arandanoschile.com/index_archivos/Page420.htm
> Consulta 2008.

Albero, B.; Sánchez-Brunete, C. & Tadeo, J.L. (2005). Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 66, 917-924.

Anahí, Fabián. Manejo integrado del cultivo de arándano (2003).
<<http://www.agroinnova.gov.ar/agroinnova/pdfs/Panel%203%20-20Nichos%20de%20mercado/3.11.pdf>> Consulta 2005.

Anderson C. y Vera L. (2008). ARANDANO.
<<http://www.abc1digital.com.ar/spip.php?article386>>Consulta, 2008

APROA – Agrimed – Universidad de Chile. (2008). Plagas y enfermedades en los arándanos.
<<http://www.aproa.cl/aproa/1531/fo-article-67875.pdf>>Consulta, 2008.

Arakelián, J.P. (2005). Aspectos generales de la producción y comercialización de arándanos.
<<http://www.agroalternativo.com.ar/docs/arandanos.htm>> Consulta 2006.

Arrebola, F. J., Martínez Vidal, J. L., Mateu-Sánchez, M. & Álvarez-Castellón, F. J. (2003) Determination of 81 multiclass pesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography-chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 484, 167-180.

- Arthur, C and Pawliszyn, J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145.
- Arthur, C.L.; Killam, L.; Buchholz, K.; Pawliszyn, J. (1992a). Automations and Optimization of Solid Phase Microextraction. *Anal. Chem.* 64, 1960.
- Arthur, C.L.; Potter, D.; Buchholz, K.; Motlagh, S. Pawliszyn, J. (1992b). Solid Phase Microextraction for the Direct Analysis of Water: Theory and Practice. *LC-GC* 10, 656.
- Athanasopoulos, P. E.; Pappas, C.; Kyriakidis, N. V. & Thanos, A. (2005). Degradation of methamidophos on sultantina grapes on the vines and during refrigerated storage. *Food Chemistry* 91, 235-240.
- Athanasopoulos, P.E.; Pappas, C. (2000). Effects of fruit acidity and storage conditions on the rate of degradation of azinphos methyl on apples and lemons. *Food Chemistry* 69, 69-72.
- Athanasopoulos, P.E.; Pappas, C.; Nikolaos, J.; Kyriakidis, V. (2003). Decomposition of myclobutanil and triadimefon in grapes on the vines and during refrigerated storage. *Food Chemistry* 82, 367–371
- Barberá, C. (1989). *Pesticidas Agrícolas*. 4^o Edic. Editorial Omega. Barcelona.
- Barker, S. A. (2000a). Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 63-68.
- Barker, S. A. (2000b). Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885, 115-127.
- Basa Česnik, H., Gregorcic, A. & Cus, F. (2008) Pesticide residues in grapes from vineyards included in integrated pest management in Slovenia. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25, 438-443.

- Basa Česnik, H. & Gregorcik, A. (2003) Multiresidual analytical method for the determination of pesticide residues in fruit and vegetables.
- Bavcon Kralj, M.; Franko, M.; Trebse, P. (2007). Photodegradation of organophosphorus insecticides – Investigations of products and their toxicity using gas chromatography–mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. *Chemosphere* 67 (2007) 99–107
- Belardi, R. and Pawlinszyn, J. (1989). The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibres in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and their Rapid Transfer to Capillary Columns. *Water Pollut. Res. J. Can.* 24,179.
- Beltran, J.; López, F.J. & Hernández, F. (2000). Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 885, 389-404.
- Beltran, J.; López, F.J.; Forcada M.; Henández, F. (1997). Microextration procedures combined with large volume injection in capillary gas chromatography for the determination of pesticide residues in environmental aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*.356, 125-133.
- Björklund, J.; Tollbäck, P.; Hiärne, C.; Dyremark, E. & Östman, C. (2004). Influence of the injection technique and the column system on gas chromatographic determination of polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Chromatography A*, 1041, 201-210.
- Bosboom, J.C.; Janssen, H.G.; Mol, H.G.J. & Cramers, C.A. (1996). Large-volume injection in capillary gas chromatography using a programmed-temperature vaporizing injector in the on-column or solvent-vent injection mode. *Journal of Chromatography A*, 724, 384-391.
- Boyd-Boland, A. A.; Magdic, S.; Pawlinszyn, J. (1996). Simultaneous Determination of 60 Pesticides in Water Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography – Mass Spectrometry. *The Analyst*; 121, 929-937.

- Brambilla, A., Lo Scalzo, R., Bertolo, G., Torreggiani, D. (2008). Steam-blanching highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice: Phenolic profile and antioxidant capacity in relation to cultivar selection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2643-2648
- Brownmiller, C., Howard, L., Prior, R. (2008). Processing and Storage Effects on Monomeric Anthocyanins, Percent Polymeric Color, and Antioxidant Capacity of Processed Blueberry Products. *Journal of Food Science*, 73, 72-79.
- Bruzzone, I. I. (2007). Informe de coyuntura mensual. Arándanos. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/frutas/Informes_mensuales/IM_Arandano_Noviembre.pdf> Consulta, 2008
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L. & Meselli, E. V. (1997) Gas Chromatographic Determination of Cyprodinil, Fludioxonil, Pyrimethanil, and Tebuconazole in Grapes, Must, and Wine. *Journal of AOAC International*, 80, 867-870.
- Caruso, F.L. and D.C. Ramsdell. (1995). *Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases*. APSPress. USA. 87 pp.
- Ceponis M. y Capellini R. (1983). Control of postharvest decays of blueberries by carbon dioxide-enriched atmospheres. *Plant disease* 67, pp.169-171.
- Ceponis M. y Capellini R. (1985). Reducing decays in fresh blueberries with controlled atmospheres. *HortScience* 20, pp. 228-229.
- Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Claudie, D.-M., Dornier, M. (2009). Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the arrhenius, eyring, and ball models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6285-6291.
- Charlton, A.J.A. & Jones, A. (2007). Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1141, 117-122.

- Cheheid, A.L.; Wright, E.R. y Rodríguez Codazzi, A.M. (1997). Mancha foliar y del tallo de híbridos del arándano (*Vaccinium* sp.) ocasionada por *Alternaria tenuissima* en Buenos Aires. XX Congreso Argentino de Horticultura, Bahía Blanca.
- Choudhury, T.; Gerhart, K.; Mawhinney, T. (1996). Solid-Phase Microextraction of Nitrogen-and Phosphorus-Containing Pesticides from Water and Gas Chromatographic Analysis. *Environmental Sci. Technol.*, 30:3259-3265.
- Clifford, M.N. (2000). Anthocyanins: Nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 80:1063-1072.
- Cobelo, L. (2008). El sector frutícola: manzanas, peras, limones, uvas, arándanos y frutillas encabezan el ranking exportador. El 2008, con una fruta bajo el brazo. (Enero 2008). <<http://www.clarin.com/suplementos/rural/2008/01/05/r-01577922.htm>> Consulta, 2008.
- Codex Alimentarius. Normas Alimentarias FAO/OMS. (1999). Métodos de muestreo recomendados para la determinación de residuos de plaguicidas a efectos del cumplimiento de los LMR. CAC/GL 33.
- Codex Alimentarius. Normas Alimentarias FAO/OMS. Límites Máximos de Residuos (LMR) de Plaguicidas en Alimentos. <http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_qs.jsp> Consulta, 2008.
- Community Reference Laboratories for Residues of Pesticides, 2009. “<http://www.crl-pesticides-datapool.eu>”. Consultada: Octubre 2009
- Concha-Graña, E.; Turnes-Carou, M. I.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Fernández-Fernández, E. & Prada-Rodríguez, D. (2002). Optimization of a programmed split-splitless injector in the chromatographic-mass spectrometric determination of organochlorine pesticides. *Journal of Chromatography A*, 958, 17-24.
- Cornet, P. L. (2008). Entrevista: Arándano: Un cultivo que crece a pasos agigantados.

<http://www.produccion.com.ar/2008/08feb_07.htm>Consulta, 2008.

Coscolla, R. (1993). Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

Da Silva, J.P.; Vieira Ferreira, L.F. & Da Silva, A.M. (2003). Aqueous photochemistry of pesticides triadimefon and triadimenol. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 154, 293-298.

Dal Bello; G. and A. Perelló. (1998). First report of Leaf Rust Caused by *Pucciniastrum vaccinii* in Argentina. *Plant Disease* 82,1062.

Dejaegher, B. & Vander Heyden, Y. (2007). Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, 1158, 138-157.

De Souza Pinheiro, A. and J. B. de Andrade (2009). "Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water." *Talanta* 79(5): 1354-1359.

Dietz, C.; Sanz, J & Cámara, C. (2006). Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1103, 183-192.

Dugay, J.; Miége, C. & Hennion, M. C. (1998). Effect of the various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 795, 27-42.

Duran Guerrero, E., Castro Mejías, R., Marín, R. N. & Barroso, C. G. (2007) Optimization of stir bar sorptive extraction applied to the determination of pesticides in vinegars. *Journal of Chromatography A*, 1165, 144-150.

Engewald, W.; Teske, J. & Efer, J. (1999). Programmed temperature vaporisers-based large volume injection in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 842, 143-161.

- Feinberg, M. (2007). Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *Journal of Chromatography A*, 1158, 174-183.
- Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C. M., Miguel, M. & Flores, P. (2007) Multiresidue method for analysis of pesticides in pepper and tomato by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Food Chemistry*, 105, 711-719.
- Fenoll, J.; Ruiz, E.; Hellín, P. Lacasa, A.; Flores, Pilar. (2009) Dissipation rates of insecticides and fungicides in peppers grown in greenhouse and under cold storage conditions. *Food Chemistry*. Accepted 3 August 2008.
- Footprint, 2009. University of Hertfordshire - Agriculture & Environment Research Unit- Footprint - Pesticide Properties Database. "<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>". Consultada: Octubre 2009
- Forina, M.; Lanteri, S. & Casale, M. (2007). Multivariate calibration. *Journal of Chromatography A*, 1158, 61-93.
- Garfield, F. (1991). *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories*. AOAC International. USA.
- Garland, S. M.; Menary, R. C. & Davies, N.W. (1999). Dissipation of Propiconazole and Tebuconazole in Peppermint Crops (*Mentha piperita* (Labiatae)) and Their Residues in Distilled Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 294-298.
- Gerard, J.; Montti, M.; Chaulet, M.; Raviol, F.; Garavello, F.; Subovich, G. (2000). Penetración y Persistencia del Thiabendazole en Naranja Valencia. *Series de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Investigación El Postgrado del IAD-DTA*. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. Vol. II – I.S.B.N. N° 84-9705-013-4 – p.p. 241-252.
- Goncalves, C.& Alpendurada, M.F. (2002). Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency. *Journal of Chromatography A*, 963, 19-26.

- González Rodríguez, R. M., Rial Otero, R., Cancho Grande, B. & Simal Gándara, J. (2008a) Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *Journal of Chromatography A*, 1196-1197, 100-109.
- González Rodríguez, R. M., Rial Otero, R., Cancho Grande, B. & Simal Gándara, J. (2008b) Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. *Food Chemistry*, 107, 1342-1347.
- González Rodríguez, Cancho Grande, B., Torrado-Agrasar, J., Mazaira-Pérez, J. (2009) Evolution of tebuconazole residues through the winemaking process. *Food Chemistry*, 117, 529-537.
- Guo-Fang. P., Cao, Y.-Z., Zhang, J.-J., Fan, C.-L., Liu, Y.-M., Li, X.-M., Jia, G.-Q., Li, Z.-Y., Shi, Y.-Q., Wu, Y.-P. & Guo, T.-T. (2006) Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1125, 1-30.
- Grob, K. & Biedermann, M. (1996). Vaporising systems for large volume injection or on-line transfer into gas chromatography: classification, critical remarks and suggestions. *Journal of Chromatography A*, 750, 11-23.
- Groenewoud, K.M.; Davies, N. W. & Menary, R. C. (1995). Determination of Propiconazole Residue in Boronia Extract (Concrete). *J. Agric. Food Chem.* 43, 1230-1232.
- Guillard, C.; Horikoshi, S.; Watanabe, N.; Hidaka, H. & Pichat, P. (2002). Photocatalytic degradation mechanism for heterocyclic derivatives of triazolidine and triazole. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 149, 155-168.
- Hada, M.; Takino, M.; Yamagami, T.; Daishima, S. & Yamaguchi, K. (2000). Trace analysis of pesticide residues in water by high-speed narrow-bore capillary gas chromatography-mass

- spectrometry with programmable temperature vaporizer. *Journal of Chromatography A*, 874, 81-90.
- Heiden, A. C.; Kolahgar, B. & Pfannkoch, E. (2001). Benefits of Using Programmed Temperature Vaporizers (PTVs) instead of Hot Split/Splitless Inlets for Measurements of Volatiles by Liquid, Headspace, and Solid Phase MicroExtraction (SPME) Techniques.
- Hetz, E.; Saavedra, M.; Venegas, A. & López, M. (2004). Ventanas de aplicación de plaguicidas en huertos de arándanos (*Vaccinium* sp.) de la zona de Los Ángeles, Chile. *Agricultura Técnica* 64(4): 375-387.
- Hibbert, D. B. (2007). Systematic errors in analytical measurement results. *Journal of Chromatography A*, 1158, 25-32.
- Hutta, M.; Rybár, I. & Chalányová, M. (2002). Liquid chromatographic method development for determination of fungicide epoxiconazole enantiomers by achiral and chiral column switching technique in water and soil. *Journal of Chromatography A*, 959, 143-152.
- Jayasena, K. W.; Loughman, R. & Majewski, J. (2002). Evaluation of fungicides in control of spot-type net blotch on barley. *Crop Protection* 21, 63-69.
- Juan-García, A.; Mañes, J.; Font, G. & Picó, Y. (2004). Evaluation of solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction for the determination of fungicide residues at low- $\mu\text{g kg}^{-1}$ levels in grapes by liquid chromatography-mass spectrometry.
- Juan-Garcia, A.; Picó, Y. & Font, G. (2005). Capillary electrophoresis for analyzing pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, 1073, 229-236.
- Juraske R.; Antón A.; Castells F. (2008) Estimating half-lives of pesticides in/on vegetation for use in multimedia fate and exposure models. Department of Chemical Engineering. ETSEQ, Universitat Rovira i Virgili. Av. Països Catalans 26, 43007 Tarragona. Spain.

- Kataoka, H.; Lord, H.L. & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 35-62.
- Kooijman, S.A.L.M.; Jager, T. & Kooi, B. W. (2004). The relationship between elimination rates and partition coefficients. *Chemosphere* 57, 745-753.
- Kyriakidis, N.V.; Pappas, C. & Athanasopoulos, P. (2005). Degradation of fenthion and fenthion sulfoxide on grapes on the vines and during refrigerated storage. *Food Chemistry* 91, 241-245.
- Lambropoulou, D. A.; Konstantinou, I. K. & Albanis, T. A. (2000). Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 893, 143-156.
- Langenfeld, J.J.; Hawthorne, S.B.; Miller, D. J. (1996). Optimizing Split/Splitless Injection Port Parameters for Solid-Phase Microextraction. *J. Chromatogr. A* 740 (1), 139-145.
- Larraín Samhueza, P., Salas Figueroa C. y Graña Sarmiento F. (2007). Plagas del arándano presentes en la región de Coquimbo. Informativo INIA Nº 29. <<http://www.inia.cl/link.cgi/Intihuasi/QuienesSomos/Personal/3581>>. Consulta, 2008.
- Leandro, C. C., Hancock, P., Fussell, R. J. & Keely, B. J. (2007) Quantification and screening of pesticide residues in food by gas chromatography-exact mass time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1166, 152-162.
- Lee, J., Durst, R.W. & Wrolstad, R.E. (2002). Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments. *Journal of Food Science*, 67, 1660-1667.
- León, Alejandro. (2007). Cultivo de arándanos. Guía Frutihortícola 8va Edición. <<http://arandanos.guiadelemprendedor.com.ar>> Consulta 2008.

- Lesueur, C., Knittl, P., Gartner, M., Mentler, A. & Fuerhacker, M. (2008) Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control*, 19, 906-914.
- Lhomme, L.; Brosillon, S. & Wolbert, D. (2007). Photocatalytic degradation of a triazole pesticide, cyproconazole, in water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 188, 34-42.
- Li, C. and Kader A.A. (1989). Residual effects of controlled atmospheres on postharvest physiology and quality of strawberries. *Journal of American Society for Horticultural Sciences* 114, pp. 405-407.
- Li, H.-P., C.-H. Lin, et al. (2009). "Analysis of aqueous pyrethroid residuals by one-step microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection." *Talanta* 79(2): 466-471
- Li, W.; Qiu, S.P.; Wu, Y.J. (2008). Triazophos residues and dissipation rates in wheat crops and soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 312–316.
- Liska, I. (2000). Fifty years of solid-phase extraction in water analysis-historical development and overview. *Journal of Chromatography A*, 885, 3-16.
- Magdic, S.; Boyd-Boland, K; Jinno, K; Pawliszyn, J. 1996. Analysis of Organophosphorus Insecticides from Enviromental Samples Using Solid-Phase Microextraction. *J. Chromatogr. A* 736,219. *Mass Spectrometry. Analyst* (Cambridge, U.K.) 121,929.
- Masson, P. (2007). Quality control techniques for routine analysis with liquid chromatography in laboratories. *Journal of Chromtography A*, 1158, 168-173.
- Mastovska, K. & Lehotay, S. J. (2004). Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, 1040, 259-272.

- Matthies, M.; Witt, J.; Klasmeier, J. (2008). Determination of soil biodegradation half-lives from simulation testing under aerobic laboratory conditions: A kinetic model approach. *Environmental Pollution* 156, 99-105.
- Millán, S.; Sampedro, M.C.; Unceta, N.; Goicolea, M.A.; Rodríguez, E. & Barrio, R.J. (2003). Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. *Journal of Chromatography A*, 995. 135-142.
- Miller, J. C.; Miller, J. N. (1993). *Estadística para Química Analítica*. Addison-Wesley Iberoamerican S.A. Wilmington, Delaware.
- Miyauchi, T.; Mori, M. & Ito, K. (2005). Application of solid-phase extraction to quantitatively determine cyproconazole and tebuconazole in treated wood using liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1063, 137-141.
- Mol, H. G. J.; Janssen, H. G.; Cramers, C. A. & Brinkman, U. A. Th. (1996). Large-volume injection in gas chromatographic trace analysis using temperature-programmable (PTV) injectors. *Trends in analytical chemistry*, vol. 15, nº4.
- Montti, M.T.; Gerard, J.; Chaulet, M.; (1998). "Penetración y Persistencia del Thiabendazole en Naranja Valencia y Jugos Concentrados. Estratto da *Essenze - Derivati Agrumari - Anno LXVIII n.2*, 124-139.
- Montti, M.T.; Chaulet, M.; Garavello, F.; Gerard, J. (2000). Determinación de Imazalil en Soluciones Acuosas por Microextracción en Fase Sólida. *Series de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Investigación El Postgrado del IAD-DTA*. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. Vol. II – I.S.B.N. N°84-9705-013-4 – p.p. 441- 460.
- Morzycka, B. (2002). Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 982, 267-273

- Navarro, S.; Barba, A.; Navarro, N; Vela, N. & Oliva, J. (2000). Multiresidue method for the rapid determination - in grape, must and wine - of fungicides frequently used on vineyards. *Journal of Chromatography A*, 882, 221-229.
- Navarro, M.; Picó, R.; Marín, R. & Mañes, J. (2002). Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 968, 201-209.
- Nguyen, T. D., Yu, J. E., Lee, D. M. & Lee, G.-H. (2008) A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry*, 110, 207-213.
- NIDETEC. (2006). El cultivo del arándano.
<<http://www.nidetec.com/sites/nidetec/documentos/EL%20CULTIVO%20DE%20ARANDANOS.pdf>> Consulta 2006.
- Nozal, M.J.; Bernal, J.L.; Jimenez, J.J.; Martín, M.T. & Bernal, J. (2005). Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1076, 90-96.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists - AOAC. (1990). *Agricultural Chemicals Contaminants and Drugs*. Vol. I. 15 th Edition.
- Oliva, J.; Navarro, S.; Barba, A. & Navarro, G.(1999). Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 833, 43-51.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (OMS). Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias (2007). *Manual de Procedimientos*. Comisión del Codex Alimentarius. 17 Ed., p. 46.

- <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1472s/a1472s01.pdf>>Consulta, 2007.
- Ortiz, M. C. & Sarabia, L. (2007). Quantitative determination in chromatographic analysis based on n-way calibration strategies. *Journal of Chromatography A*, 1158, 94-110.
- Osman Khaled A., Ibrahim Gamal H., Askar Ahmad I., Abdul Rahman A, Alkhail Aba. (2008) Biodegradation kinetics of dicofol by selected microorganisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 91 (2008) 180–185.
- Ouyang, G.; Chen, Y.; Setkova, L. & Pawliszyn, J. (2005). Calibration of solid-phase microextraction for quantitative analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1097, 9-16.
- Palanti, S. & Susco, D. (2004). A new wood preservative based on heated oil treatment combined with triazole fungicides developed for above-ground conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 337-342.
- Pan, H.J. & Ho, W.H. (2004). Determination of fungicides in water using liquid phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *Analytica Chimica Acta* 527, 61-67.
- Pawliszyn, Janusz. (1997). *Solid Phase Microextraction. Theory and Practique*. Ed. Wiley-VCH. Canadá.
- Pei, Z.; Yitong, L.; Baofeng, L. & Gan, J. J. (2004). Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. *Chemosphere* 57, 1691-1696.
- Pereira Kechinski, C., Ramos Guimarães, P., Zapata Noreña, C., Tessaro, I., Ferreira Marczak, L. (2010). Degradation kinetics of anthocyanins in blueberry juice during thermal treatment. *Journal of Food Science*, 75, 173-176.
- Pérez-Trujillo, J. P.; Frías, S.; Conde, J. E. & Rodríguez-Delgado, M. A. (2002). Comparison of different coatings in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine

- pesticides in ground water. *Journal of Chromatography A*, 963, 95-105.
- Poerschmann, J.; Zhang, Z.; Kopinke, F.; Pawliszyn, J. 1997. SPME for Determining the Distribution of Chemicals in Aqueous Matrices. *Anal. Chem.* 69, 597 - 600.
- Poole, C. F.; Gunatilleka, A. D. & Sethuraman, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885, 17-39.
- Poole, C. F. (2007). Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1158, 241-250.
- Popp, P.; Mothes S.; Brueggemann. 1995. Determination of Pesticides in Water by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *Vm Wasser*. 85,229.
- Pose-Juan, E.; Cancho-Grande, B.; Rial-Otero, R. & Simal-Gándara, J. (2006). The dissipation rates of cyprodinil, fludioxonil, procymidone and vinclozoline during storage of grape juice. *Food Control* 17, 1012-1017.
- Prosen, H. & Zupancic-kralj, L. (1999). Solid-phase microextraction. *Trends in analytical chemistry*, vol. 18, N°4.
- Raffer J. (2002). Scientific basis of biomarkers and benefits of functional foods for reduction of disease risk: cancer. *Br J Nutr.* 88:219S-2245S with paper dividers. *Journal of Horticultural Science* 69, 299-304.
- Ramirez M. L.; Chulze, S. & Magan, N. (2004). Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxinivalenol production by *Fusarium Graminearum* isolates from Argentinian Wheat. *Crop Protection* 23, 117-125.
- Rial Otero, R.; Cancho Grande, B. & Simal Gándara, J. (2003). Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 992, 121-131.

- Rial Otero, R., González-Rodríguez, R. M., Cancho-Grande, B. & Simal-Gándara, J. (2004) Parameters affecting extraction of selected fungicides from vineyard soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7227-7234.
- Rial Otero, R., Yagüe Ruiz, C., Cancho Grande, B. & Simal Gándara, J. (2002) Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wines. *Journal of Chromatography A*, 942, 41-52.
- Rodríguez Codazzi, A.M.; Wright, E.R.; Cheheid, A.L.; Rivera, M.C. y Grijalba, P.E. (1997). Muerte de esquejes y marchitamiento del arándano *Vaccinium* sp.) producidos por *Phytophthora* sp. Y *Fusarium solani* en Buenos Aires. XX Congreso Argentino de Horticultura, Bahía Blanca.
- Rossi, M., Giussani, E., Morelli, R., Lo Scalzo, R., Nani, R.C., Torreggiani, D. (2003). Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, 36, 999-1005.
- Rozet, E.; Hubert, C.; Ceccato, A.; Dewé, W.; Ziemons, E.; Moonen, F.; Michail, K.; Wintersteiger, R.; Streeel, B.; Boulanger, B. & Hubert, P. (2007). Using tolerance intervals in pre-study validation of analytical methods to predict in-study results. The fit-for-future-purpose concept. *Journal of Chromatography A*, 1158, 126-137.
- Sakkas V., Lambropoulou D., Sakellarides T., Albanis T., (2002). Application of solid-phase microextraction for monitoring the photocatalytic decomposition of fenthion and parathion in aqueous TiO₂ suspensions. *Analytica Chimica Acta* 467, 233–243.
- Salvestrini, S.; Di Cerbo, P.; Capasso, S. (2002). Kinetics of the chemical degradation of diuron. *Chemosphere* 48, 69–73.
- Sanagi, M.M.; See, H.H.; Ibrahim, W.A.W. & Naim, A.A. (2004). High temperature liquid chromatography of triazole fungicides on polybutadiene-coated zirconia stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 1059, 95-101.

- Sannino, A.; Bolzoni, L. & Bandini, M. (2004). Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1036, 161-169.
- Sanusi, A.; Guillet, V. & Montury, M. (2004). Advanced method using microwaves and solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pyrethroid residues in strawberries. *Journal of Chromatography A*, 1046, 35-40.
- Saraullo, A.; Martos, P. Pawliszyn, J. 1997. Water Analysis by SPME based on Physical chemical Properties of the Coating. *Anal. Chem.* 69, 1992 - 1998.
- Sasano, R.; Hamada, T.; Kurano, M.; Furuno, M. (2000). On-line coupling of solid-phase extraction to gas chromatography with fast solvent vaporization and concentration in an open injector liner. Analysis of pesticides in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 896, 41-49.
- Sauret-Szczepanski, N., Mirabel, P. & Wortham, H. (2006). Development of an SPME-GC-MS/MS method for the determination of pesticides in rainwater: Laboratory and field experiments. *Environmental Pollution*, 139, 133-142.
- Seidán, F. (2008). Entrevista: Arándano un cultivo que crece a pasos agigantados.
<www.produccion.com.ar/2008/08feb_07.htm>. Consulta, 2008.
- Semenov, S. N.; Koziel, J. A. & Pawliszyn, J. (2000). Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm. *Journal of Chromatography A*, 873, 39-51.
- Skrede, G., Wrolstad, R.E., Durst, R.W. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 65, 357-364.

- Sharif, Z.; Bin Che Man, Y.; Sheikh Abdul Hamid, N. & Cheow Keat, C. (2006). Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. *Journal of Chromatography A*, 1127, 254-261.
- Shurmer, B.; Pawliszyn, J. 2000. Determination of Distribution Constants between a liquid polymeric Coating and water by a SPME Technique with a flow-Through Standard Water System. *Anal. Chem.* 72,3660-3664.
- Sjaak de Koning, S.; Kirano, M.; Janssen, H. G. & Brinkman, U. A. Th. (2004). AT-column, a novel concentrating technique for large-volume injections in gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1023, 165-174.
- Smith, R. M. (2003). Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000, 3-27.
- Soleas, G.J.; Yan, J.; Hom, K. & Goldberg, D.M. (2000). Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection. *Journal of Chromatography A*, 882, 205-212.
- Spotts, R. A.; Cervantes, L. A. & Timothy, J. F. (2002). Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packaging, and storage temperature. *Postharvest Biology and Technology* 24, 251-257.
- Srivastava, A., Akoh, C., Yi, W., Fischer, J., Krewer G. (2007). Effect of Storage Conditions on the Biological Activity of Phenolic Compounds of Blueberry Extract Packed in Glass Bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2705-2713.
- Stajnbaher, D. & Zupancic-Kralj, L. (2003) Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1015, 185-198

- Stan, H.J. & Linkerhägner, M. (1996). Large-volume injection in residue analysis with capillary gas chromatography using a conventional autosampler and injection by programmed-temperature vaporization with solvent venting. *Journal of Chromatography A*, 727, 275-289.
- Stenrod, M.; Perceval, J.; Benoit, P.; Almvik, M.; Bolli, R.I.; Eklo, O.M.; Sveistrup, T.E.; Kværner, J. (2008). Cold climatic conditions: Effects on bioavailability and leaching of the mobile pesticide metribuzin in a silt loam soil in Norway. *Cold Regions Science and Technology* 53, 4–15.
- Sukola, K.; Kosiel, J.; Augusto, F.; Pawliszyn, J. 2001. Diffusion-Based Calibration for SPME Analysis of Aqueous Samples. *Anal. Chem.*, 73, 13-18.
- Tariq, M.I.; Afzal, S.; Hussain, I. (2006). Degradation and persistence of cotton pesticides in sandy loam soils from Punjab, Pakistan. *Environmental Research* 100, 184–196.
- Teske, J. & Engewald, W. (2002). Methods for, and applications of, large-volume injection in capillary gas chromatography. *Trends in analytical chemistry*, vol. 21, N°9+10.
- Teske, J.; Putzbach, K.; Engewald, W. & Müller, R. K. (2002). Determination of cannabinoids by gas chromatography-mass spectrometry and large-volume programmed-temperature vaporizer injection using 25 µl of biological fluid. *Journal of Chromatography B*, 772, 299-306.
- Thom, E.; Ottow, J.C.G. & Benckiser, G. (1997). Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. *Environmental Pollution*, Vol. 96, N°3. pp 409-414.
- Toribio, L.; del Nozal, M.J.; Bernal, J.L.; Jiménez, J.J & Alonso, C. (2004). Charal separation of some triazole pesticides by supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1046, 249-253.
- Trösken, E.R.; Bittner, N. & Völkel, W. (2005). Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-

- tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1083, 113-119.
- Valcárcel, M.; Cárdenas, S.; Simonet, B. M. & Carrillo-Carrión, C. (2007). Principles of qualitative analysis in the chromatographic context. *Journal of Chromatography A*, 1158, 234-240.
- Van Hout, M.W.J.; de Zeeuw, R.A.; Franke, J.P. & de Jong, G.J. (1999). Evaluation of the programmed temperature vaporizer for large-volume injection of biological samples in gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 729, 199-210.
- Vander Heyden, Y. & Smeyers-Verbeke, J. (2007). Set-up and evaluation of interlaboratory studies. *Journal of Chromatography A*, 1158, 158-167.
- Vaquero Fernández, L., Sáenz-Hernández, A., Sanz Asensio, J., Fernández Zurbano, P., Sainz Ramírez, M., Pons Jubera, B., López Alonso, M., Epifanio Fernández, S. I. & Martínez Soria, M. T. (2008) Determination of cyprodinil and fludioxonil in the fermentative process of must by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1943-1948.
- Vuarant, Carlos Omar; Lesa, Claudia; Zapata, Marina; Montti, Maria Tatiana; Paz, José Maria; Carbonell, José. (2010). Estudio de Parámetros de Calidad en Pasas de Arándanos en un Proceso de Deshidratación por Infrarrojos. En: *Avances Científicos-Tecnológicos en la Región de Salto Grande*. Universidad Nacional de Entre Ríos. 1ª Ed. 109-124.
- Walorczyk, S. (2007) Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1165, 200-212.
- Walorczyk, S. & Gnusowski, B. (2009) Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas

- chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6522-6531.
- Walter, M.; Harris-Virgin, P.; Morgan, C.; Stanley, J.; Boyd-Wilson, K.S.H.; Langford, G.I. & Moore, M.S. (2005). Fungicides for control of flower and berry infections of *Botrytis cinerea* in boysenberry. *Crop Protection* 24, 625-631.
- Wang, P.; Jiang, S.; Liu, D.; Wang, P. & Zhou, Z. (2005a). Direct enantiomeric resolutions of chiral triazole pesticides by high-performance liquid chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* 62, 219-230.
- Wang, Y.; O'Reilly, J.; Chen, Y. & Pawlinszyn, J. (2005b). Equilibrium in-fibre standardization technique for solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1072, 13-17.
- Wang, W.-D., Xu, S.-Y. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82, 271-275
- Wei Li, Shao-Ping Qiu, Yi-Jun Wu. (2008). Triazophos residues and dissipation rates in wheat crops and soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69 (2008) 312–316.
- Wilson, B.; Wylie, P.L. & Klee, M.S. (1997). Large Volume Injection for Gas Chromatography Using a PTV Inlet. *Gas Chromatography*.
- Wright, E. R.; Rivera, M.C.; Rodríguez Codazzi, A.M.; Cheheid, A.L. y Grijalba, P.E. (1998a). Enfermedades del arándano (*Vaccinium* spp.) en los alrededores de Buenos Aires, República Argentina. *Fitopatología* 33 (1): 55.
- Wright, E.R. y Cotta, A.G. (1996). Atizonamiento del arándano (*Vaccinium corymbosum*) ocasionado por *Fusarium* spp. VIII Congreso Latinoamericano de Horticultura, Montevideo, Uruguay. Acta de resúmenes pag 124.
- Wright, E.R. y M.C. Rivera. (1997). Enfermedades detectadas en cultivos de arándano de la provincia de Buenos Aires. *Produciendo. Actualidad frutihortícola*. V(31):69-72.

- Wright, E.R.; M.C. Rivera y M.J. Flynn. (1998b). First report of *Pestalotiopsis guepini* and *Glomerella cingulata* on blueberry in Buenos Aires (Argentina). *Bulletin OEPP/EPPO* 28:219-220.
- Wright, E. & Rivera, C. Enfermedades detectadas en cultivos de arándano en la República Argentina. (2003).
<<http://www.agroalternativo.com.ar/docs/EnfermedadesArandanos.zip>> Consulta, 2005.
- Wu, Y.S.; Lee, H.K. & Li, S.F.Y. (2001). High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulfated β -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 912, 171-179.
- Wylie, P.L. (1997). Trace Level Pesticide Analysis by GC/MS Using Large-Volume Injection. *Gas Chromatography*.
- Xiao-Gang, C., Xiao-Zhong, H., Hui-Yuan Y. (2005) Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. *Journal of Chromatography A*, 1063, 201-210.
- Yang, G., Liu, H., Wang, M., Liu, S. & Chen, Y. (2006). Chromatographic characterization and solid-phase extraction on diniconazole-imprinted polymers stationary phase. *Reactive & Functional Polymers*, 66, 579-583.
- Yi, X. & Lu, Y. (2006). Residues and dynamics of probenazole in rice field ecosystem. *Chemosphere* 65, 639-643.
- Yommi A. y Godoy C. Arándanos. Fisiología y tecnologías de postcosecha. (Agosto 2002).
<<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/posco/fruyhort/arandano.htm>> Consulta, 2008.
- Zambonin, C.G.; Cilenti, A. & Palmisano, F. (2002). Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of triazole residues in wine and strawberries. *Journal of Chromatography A*, 967, 255-260.
- Zheng Y., Zhenfeng Y. and Xuehong C. (2008) Effect of high oxygen atmospheres on fruit decay and quality in Chinese bayberries, strawberries and blueberries. *College of Food*

Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, PR China.

Zimmermann, T, Ensinger, W. J., Schmidt, T. C. (2006). Depletion solid-phase microextraction for the evaluation of fiber-sample partition coefficients of pesticides. *Journal of Chromatography A*, 1102, 51-59.

Zrostlíková, J.; Hajslová, J.; Godula, M. & Mastovská, K. (2001). Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. *Journal of Chromatography A*, 937, 73-86.