

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE**  
**ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO**



**EVOLUCIÓN DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN**  
**FRUTAS CÍTRICAS FRESCAS. INCIDENCIA SOBRE LOS**  
**JUGOS CÍTRICOS CONCENTRADOS**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**Ing. Horacio José Martínez**

**Dirigida por:**

**Dr. Daniel José Vidal Brotóns**

**Dr. Hugo Rodolfo Cives**

**Valencia/Concordia, 17 de enero de 2016**

# **EVOLUCIÓN DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRUTAS CÍTRICAS FRESCAS. INCIDENCIA SOBRE LOS JUGOS CITRICOS CONCENTRADOS**

## **Resumen**

La República Argentina manifiesta un continuo crecimiento del sector cítrico tanto en frutos frescos como en procesados. La Federación Argentina de Citrus informa que el volumen de producción total estimado para naranjas en Argentina es de 1.130.074 toneladas para el año 2012. Entre Ríos, ubicado como principal provincia productora de naranjas, aporta un 46% de la producción nacional.

El rendimiento de la producción cítrica se ve continuamente afectado por organismos nocivos, siendo necesario proteger los vegetales, para evitar la disminución del rendimiento o daños a los productos, y garantizar tanto la calidad de los productos recolectados como una mayor productividad agrícola. Los productos fitosanitarios son utilizados en tratamientos pre y post-cosecha para el control de las enfermedades en cítricos y vegetales en general. Estos penetran en los tejidos de la planta, pudiéndose así encontrar residuos tanto en los productos frescos, como en productos procesados a partir de ellos. Teniendo en cuenta que la presencia de fitosanitarios en estos productos constituye un riesgo para el ser humano, debido a su toxicidad, es importante controlar los residuos de los mismos, siendo un objetivo prioritario el control en fruta entera y jugos concentrados.

La optimización de métodos adecuados de extracción, identificación y cuantificación de plaguicidas en distintas matrices, permiten tener un control de los productos fitosanitarios, lo que constituye un importante parámetro de calidad a examinar al momento de comercializar los frutos, tanto para el consumo de fruta fresca como para su empleo como materia prima en la industria cítrica dada la diversidad de agroquímicos utilizados durante la producción en campo y empaque.

Este estudio tiene como propósito contribuir a relacionar los niveles residuales de agroquímicos tanto para fruta que ingresa a la industria como para su producto jugo concentrado de naranja. A fin de establecer una correlación entre los mismos, validar metodologías analíticas para la determinación de clorpirifos, carbendazim, procloraz y

thiabendazol, utilizando técnicas analíticas de extracción en fase sólida con Cromatografía Líquida y Gaseosa acopladas a detectores de Espectrometría de Masa tipo Simple cuadrupolo y triple cuadrupolo para su detección y cuantificación.

Para ambas matrices los métodos resultaron lineales, precisos, de elevada exactitud y sensibilidad. Los límites de cuantificación, para fruta entera fueron, 0,010mg/kg para procloraz y 0,010mg/kg para carbendazim. En jugos concentrados, los límites de cuantificación fueron de 0,010mg/kg para procloraz, carbendazim, tiabendazole y clorpirifos. Para muestras reales el calibrado se realizó con muestras adicionadas para tener en cuenta el efecto matriz.

Los residuos evaluados en muestras de frutas que ingresan a la industria presentaron valores del orden de 1,46mg/kg para procloraz y 0,10mk/kg para carbendazim, en tanto que, para muestras de jugos concentrados los valores hallados fueron en el orden de 0,033mg/kg para carbendazim, 0,167mg/kg para tiabendazole, 0,36mg/kg para procloraz mientras que clorpirifos no fue detectado.

Las metodologías desarrolladas y aplicadas arrojaron resultados que permiten establecer la correlación entre los niveles residuales determinados inicialmente en frutas frescas y los niveles hallados en jugos concentrados.

Por lo antes expuesto podemos concluir que, cuando la fruta que ingresa para ser procesada en la industria presenta una carga de residuos de plaguicidas, éstos residuos pueden persistir en los productos industriales tales como el jugo concentrado, por lo que se considera de importancia efectuar los controles necesarios en la industria como un parámetro más de calidad, ya que es posible disminuir los niveles de residuos efectuando mezclas con lotes libres de plaguicidas, y lograr así preservar la salud del consumidor y mantener la competitividad en los mercados.

### **Palabras claves**

Jugos concentrados – Plaguicidas – Correlación – Cítricos

# **EVOLUTION OF PESTICIDE RESIDUES IN FRESH CITRUS FRUITS. IMPACT ON CITRUS JUICE CONCENTRATE**

## **Summary**

The Argentine Republic displays a continuous growth of the citrus sector, both in fresh and processed fruits. The Argentine Citrus Federation reported an estimated total volume of 1,130,074 t of orange production in 2012. Entre Rios is the main orange producer province with 46% of the national production.

Citrus production yield is affected by harmful organisms. Thus, protecting the plants to avoid yield decrease or product damage is of utmost importance. Furthermore, harvested product quality, as well as a higher farm productivity, must be ensured. Phytosanitary products are used in pre and post harvest treatments to control citrus fruit and plant diseases. Since these pesticides penetrate plant tissues, residues may be found in fresh produce as well as in products processed from these fruits. As the occurrence of phytosanitary products in food products is a risk for human health due to their toxicity it is important to control residues. This is a primary objective for whole fruit and juice concentrates.

The optimization of adequate pesticide extraction, identification and quantification methods in different matrices allow the control of phytosanitary products. Due to the fact that many agrochemicals are used during field production and in the packing plant, this control is an important quality parameter to be examined when fruits are marketed, both as fresh produce and in fruit that will be shipped to the industry to be used as raw material.

The objective of this study is to establish a correlation between levels of initial residues in fruits entering the plant and pesticide residue levels in orange juice concentrates. In order to reach this objective, analytical methodologies to determine chlorpyrifos, carbendazim, prochloraz and thiabendazole were validated by solid phase extraction and gas liquid chromatography tandem methods based on single and triple quadrupole were used for detection and quantification.

Results for both matrices showed linear, accurate, highly precise and sensitive methods. Quantification limits for whole fruit were 0,010mg/kg para prochloraz and 0,010mg/kg carbendazim. Quantification limits in juice concentrate were 0,010mg/kg for

chlorpyrifos, carbendazim, prochloraz and thiabendazole. Calibration for real samples was performed on samples added with in order to include the matrix effect.

Assessed residue values in fruit samples entering the processing plant were 1,46 mg/kg prochloraz, 0,10 mg/kg carbendazim; while juice concentrate samples showed the following values: 0,36 mg/kg prochloraz, 0,033 mg/kg carbendazim and 0,167 mg/kg thiabendazole. No chlorpyrifos residues were detected.

The methodology developed and applied in this study showed results that allow the correlation between residue levels initially detected in fresh fruit and those found in juice concentrates.

To conclude, it is of utmost importance to perform controls of fruit entering the processing plant in order to detect possible pesticide residues that may persist in industrially processed products, such as orange juice concentrates. Thus, a decrease of residue levels could be btained by mixing pesticide free batches of fruit to ensure consumer health and contribute to commercial competitiveness.

### **Keywords**

Juices concentrated, pesticides, correlation, citrus fruits

# **EVOLUCIO DELS SOSTRALLS DE PLAGUICIDAS EN FRUITES CITRIQUES FRESQUES. INCIDENCIA SOBRE ELS SUCS CITRICS CONCENTRATS**

## **Resum**

La Republica Argentina manifesta un continu creiximent del sector CITRÍCOLA tant en fruits frescs com en processats. La Federacio Argentina de CITRUS informa que el volum de produccio total estimat per a taronjas en Argentina es de 1.130.074 tonellades per al any 2012. Entre Rius, ubicat com principal provincia productora de taronjas, aporta un 46% de la produccio nacional.

El rendiment de la produccio citrícola se veu continuament afectat per organismes nocius, sent necessari protegir els vegetals, per a evitar la disminucio del rendiment o danys als productes, i garantir tant la qualitat dels productes recolectats com una major productivitat agricola. Els productes fitosanitaris son utilitzats en tractaments pre y post-collita per al control de les malalties en citrics i vegetals en general. Estos penetren en els teixits de la planta, podent-se aixina trobar sostralls tant en els productes frescs, com en productes processats a partir d'ells. Tenint en conte que la presencia de fitosanitaris en estos productes constitueix un risc per al ser huma, degut a la seua toxicitat, es important controlar els sostralls dels mateixos, sent un objectiu prioritario el control en fruita sancera i suc concentrats.

L'optimizacion de metodos adequats d'extraccio, identificacio i cuantificaci3n de plaguicidas en distints matrius, permeten tindre un control dels productes fitosanitaris, lo que constitueix un important parametro de qualitat a examinar al moment de comercialisar els fruits, tant per al consum de fruita fresca com per al seu ofici com materia cosina en l'industria citrica donada la diversitat d'agroquimicos utilitzats durant la produccio en camp i empaque.

Este estudi te com proposit contribuir a relacionar els nivells residuals d'agroquimicos tant per a fruita que ingressa a l'industria com per al seu producte suc concentrat de taronja. A fi d'establir una correlacio entre els mateixos, validar metodologies analitiques per a la determinacio de clorpirifos, carbendazim, procloraz i thiabendazole, utilitzant tecniques analitiques d'extraccio en fase s3lida en cromatografia Liquida i Gaseosa

acoplades a detectores d'espectrometria de Massa tipus Simple quadrupol i triple quadrupol per a la seua detecció i quantificació.

Per a ambdós matrius els mètodes resultaren llinials, precisos, d'elevada exactitud i sensibilitat. Els límits de quantificació, per a fruita sencera foren, 0,010mg/kg per a procloraz i 0,010mg/kg per a carbendazim. En suc concentrats, els límits de quantificació foren de 0,010mg/kg per a procloraz, carbendazim, tiabendazole i clorpirifos. Per a mostres reals el calibrat se realitzà en mostres adicionades per a tenir en compte l'efecte matriu.

Els sostralls valorats en mostres de fruites que ingressen a l'indústria presentaren valors de l'ordre de 1,46mg/kg per a procloraz, 0,10mg/kg per a carbendazim, en tant que, per a mostres de suc concentrats els valors trobats foren en l'ordre de 0,033mg/kg per a carbendazim, 0,167mg/kg per a tiabendazole, 0,36mg/kg per a procloraz mentre que clorpirifos no fou detectat.

Les metodologies desenvolupades i aplicades llançaren resultats que permeten establir la correlació entre els nivells residuals determinats inicialment en fruites fresques i els nivells trobats en suc concentrats.

Per lo abans exposat podem concloure que, quan la fruita que ingressa per a ser processada en l'indústria presenta una càrrega de sostralls de plaguicides, aquests sostralls poden persistir en els productes industrials tals com el suc concentrat, per lo que se considera d'importància efectuar els controls necessaris en l'indústria com un paràmetre més de qualitat, ja que es possible disminuir els nivells de sostralls efectuant barreges en lots lliures de plaguicides, i aconseguir així preservar la salut del consumidor i mantenir la competitivitat en els mercats.

### **Paraules claus**

Suc concentrats – plaguicides – Correlació – Citrics

# ÍNDICE GENERAL

## INTRODUCCIÓN

1.- <b>Historia y Distribución</b> .....	14
1.2.- El mercado mundial de jugo concentrado de naranja.....	16
1.3.- La producción argentina.....	16
1.4.- Producción nacional y regional de citrus.....	18
1.5.- Ubicación Geográfica.....	20
1.6.- Fases de la cadena citrícola en Entre Ríos.....	21
1.7.- Mercado local.....	24
1.8.- Materia Prima.....	25
1.9.- Las Empresas.....	25
1.10.- <b>Industrialización</b> .....	26
1.10.1.- Tecnologías de extracción de Jugos.....	26
1.10.2.- Tecnología FMC.....	27
1.11.- <b>Preservación en Citrus</b> .....	31
1.12.- Enfermedades en Citrus.....	32
1.12.1.- Mancha Negra de los Cítricos.....	32
1.12.2.- Mancha Grasienta.....	33
1.12.3.- Enfermedades causadas por Phytophthora.....	34
1.12.4.- Sarna de los cítricos.....	35
1.12.5.- Melanosis.....	35
1.12.6.- Antracnosis.....	35
1.12.7.- Caída prematura de frutitos.....	36
1.12.8.- Mal de los almácigos o “Damping Off”.....	36
1.12.9.- Fumagina.....	37
1.12.10.- Enfermedades de la Postcosecha.....	37
1.12.11.- Podredumbre de Frutos.....	38
1.12.12.- Podredumbres en el campo.....	39

1.12.13.- Podredumbres en el empaque.....	40
1.12.14.- Podredumbre durante la conservación y la comercialización.....	40
1.12.15.- Hongos que actúan a partir de heridas.....	41
1.12.16.- Hongos que actúan a partir de infecciones latentes.....	41
1.12.17.- Tristeza de los cítricos.....	43
1.12.18.- Grupo Psorosis.....	43
1.12.19.- Cancrosis.....	44
<b>1.13.- Plaguicidas Generalidades.....</b>	<b>45</b>
1.13.1.- Clasificación.....	46
1.13.2.- Características de plaguicidas utilizados en la citricultura.....	50
1.13.3.- Benzimidazoles.....	50
1.13.4.- Organofosforados.....	51
1.13.5.- <b>Principales características de algunos plaguicidas de interés,</b> .....	<b>52</b>
1.13.5.1.- Carbendazim.....	52
1.13.5.2.- Procloraz.....	54
1.13.5.3.- Tiabendazol.....	56
1.13.5.4.- Clorpirifos.....	57
1.14.- <b>Métodos de determinación de plaguicidas</b> .....	<b>59</b>

## **OBJETIVOS**

<b>2.-Objetivos.....</b>	<b>63</b>
2.1.- Objetivos específicos.....	64

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>3.- Reactivos y Equipamiento.....</b>	<b>66</b>
3.1.- Plan de muestreo.....	67
3.2.- Preparación de las muestras para el análisis en laboratorio.....	70
3.2.1.- Preparación de estándares.....	72
3.2.2.- Preparación de muestras adicionadas.....	72

<b>3.3.- Condiciones cromatográficas para la identificación de los plaguicidas</b> .....	73
3.3.1.- Determinación por Cromatografía Gaseosa con detector de Espectrometría de Masas.....	74
3.3.2.- Determinación por Cromatografía Gaseosa con detector de Espectrometría de Masas tipo simple cuadrupolo (CG-MSD).....	75
3.3.3.- Determinación por Cromatografía Líquida con doble detección de masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS).....	75
3.4.- Análisis estadísticos de los resultados.....	78

## **RESULTADOS**

<b>4.1.- Desarrollo y validación por Cromatografía Gaseosa con detector de Espectrometría de Masas tipo simple cuadrupolo (CG-MSD) para la determinación de procloraz en la matriz fruta entera para citrus</b> .....	82
4.1.1.- <b>Procloraz</b> .....	82
4.1.2.- Linealidad.....	83
4.1.3.- Precisión.....	85
4.1.4.- Límites de Detección y Cuantificación.....	87
<b>4.2.- Desarrollo y validación por Cromatografía Líquida con doble detección de masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS) para la determinación de carbendazim en la matriz fruta entera para citrus</b> .....	88
4.2.1.- <b>Carbendazim</b> .....	88
4.2.2.- Linealidad.....	89
4.2.3.- Precisión.....	91
4.2.4.- Límites de Detección y Cuantificación.....	94

4.3.- <b>Desarrollo y validación por Cromatografía Gaseosa con doble detección de masas tipo triple cuadrupolo (GC-MS/MS) para la determinación de clorpirifos en la matriz jugos cítricos concentrados</b> .....	94
4.3.1.- <b>Clorpirifos</b> .....	94
4.3.2.- <b>Linealidad</b> .....	95
4.3.3.- <b>Precisión</b> .....	96
4.3.4.- <b>Limites de Detección y Cuantificación</b> .....	98
4.4.- <b>Desarrollo y validación por Cromatografía Líquida con doble detección de masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS) para la determinación de procloraz, carbendazim y tiabendazole en la matriz jugos cítricos concentrados</b> .....	99
4.4.1.- <b>Procloraz</b> .....	99
4.4.2.- <b>Linealidad</b> .....	100
4.4.3.- <b>Precisión</b> .....	101
4.4.4.- <b>Limites de Detección y Cuantificación</b> .....	103
4.4.5.- <b>Carbendazim</b> .....	104
4.4.6.- <b>Linealidad</b> .....	105
4.4.7.- <b>Precisión</b> .....	106
4.4.8.- <b>Limites de Detección y Cuantificación</b> .....	108
4.4.9.- <b>Tiabendazole</b> .....	109
4.4.10.- <b>Linealidad</b> .....	109
4.4.11.- <b>Precisión</b> .....	111
4.4.12.- <b>Limites de Detección y Cuantificación</b> .....	113
4.5.- <b>Estudio y análisis de la persistencia de los residuos en frutas enteras y su incidencia en los jugos cítricos concentrados</b> .....	114
4.6.- <b>Evaluación y análisis de los resultados para la determinación de la correlación entre los niveles residuales de plaguicidas en jugos cítricos concentrados y la fruta entera de las cuales provienen</b> .....	116

## **DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES**

5.- Discusión general y conclusiones.....	119
5.1- Bibliografía.....	122

# Capítulo I

## INTRODUCCION

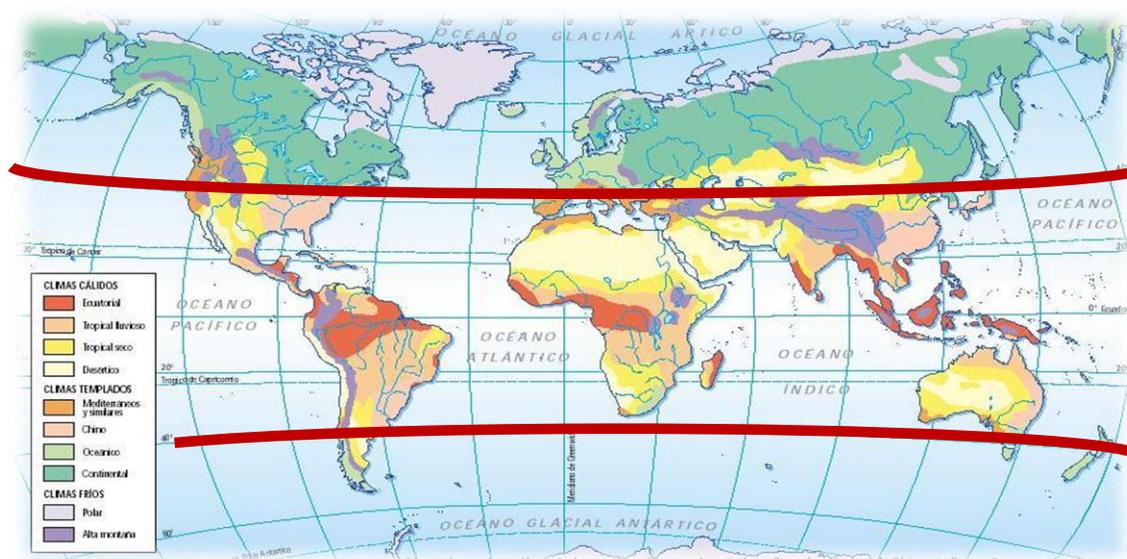
### 1.- Historia y Distribución

Los cítricos se desarrollan en casi todas las regiones del mundo dentro de la banda delimitada por la línea de 40° de latitud N y S. Las numerosas especies del género *Citrus* provienen de las zonas tropicales y subtropicales de Asia y del archipiélago Malayo; desde allí se distribuyeron a las otras regiones del mundo donde hoy se cultivan cítricos. El área comúnmente asociada a su origen está ubicada en el sudeste de Asia, incluyendo el este de Arabia, este de Filipinas y desde el Himalaya al sur hasta Indonesia. Dentro de esta gran región, el noreste de India y norte de Burma, serían las regiones más importantes, debido a la diversidad de especies encontradas recientemente en la provincia de Yunnan (centro sur de China).

Los cítricos se cultivan desde épocas remotas (más de 4000 años). Sus frutas atrajeron la atención de los pueblos primitivos, que se supone ya las cultivaban mucho tiempo antes de que aparecieran en los países europeos. Se sabe que la apariencia de la fruta y sus flores cautivaron a los primeros viajeros, que no sólo la describieron en sus memorias sino que la llevaron a otras regiones. Las primeras frutas conocidas en Europa hacia 310 (A.C.) pertenecían al grupo de las cidras (*Citrus medica* L.), originario de la región comprendida entre el sur de China e India. Las limas (*C. aurantifolia* Swingle) aparentemente se originaron en el este de la India. Desde allí fueron difundidas a través del Mar de Omán. El centro de origen de los limones (*C. limon.* Burmann), es totalmente desconocido. Se cree que son híbridos de lima y cidra. La naranja dulce (*C. sinensis* (L.) Osbeck), originaria del sudeste de China, probablemente haya sido llevada a Europa por los romanos. Sin embargo hay evidencias del cultivo de naranjas antes de la destrucción de Pompeya (ocurrida en el año 79 D.C.), según se observa en un mosaico entre las ruinas de la ciudad. Se sabe con certeza que las naranjas fueron cultivadas por varias centurias en China, antes que los europeos la conocieran y sus referencias se encuentran en manuscritos y documentos muy antiguos. La naranja agria (*C. aurantium* L.) es originaria del sudeste de Asia (posiblemente India). A partir de su dispersión desde el centro de origen, es poco lo que se conoce sobre la manera en que se han distribuido los cítricos. Desde Asia fueron llevados al norte de Africa y al

sudeste de Europa. Posteriormente fueron traídos a América por los europeos, alrededor de 1500.

La naranja de ombligo Washington se originó en Bahía, Brasil, y desde allí fue llevada a Australia, y a Florida y California en los EE.UU. El pummelo (*C. grandis* (L.) Osbeck), llamado también shaddock, se originó en el archipiélago de Malasia. Híbridos de estas primeras plantas fueron llevados a Europa y desde allí al Caribe. Probablemente los pomelos verdaderos (*C. paradisi* Macf.) se originaron por una mutación o como un híbrido de pummelo en Barbados (Indias Occidentales). A Florida (EE.UU.), productor de pomelos más importante del mundo, fueron introducidos desde el Caribe como semillas. El área de origen de las mandarinas (*C. reticulata* Blanco) probablemente esté ubicada en la región de Indochina y sur de China; desde allí habrían sido llevadas por los primeros viajeros hacia el este de la India. El lugar de producción tradicional de esta especie ha sido Asia; desde allí habrían sido transportadas a Europa mucho después que otras especies de cítricos. Por ejemplo, la mandarina Willowleaf (*C. deliciosa* Tenore) fue llevada desde China, (recién en 1805) a la región del Mediterráneo, donde pasó a ser la especie más importante. La otra especie importante de mandarinas (*C. reticulata* Blanco), fue conocida en Europa mucho después que la Willoleaf. Una vez en América y desde el Caribe y Brasil (adonde llegaron primero), los cítricos se extendieron por todo el continente llevados por misioneros de la Iglesia Católica. Especies de géneros afines a los cítricos como *Fortunella* y *Poncirus* también son originarios de la China; hoy en día se los puede encontrar en todas las regiones cítrícolas del mundo. La investigación y el mejoramiento de los cítricos se inició con las teorías de Mendel y Darwin. Los EE.UU. han sido líderes en el desarrollo de tecnología de producción cítrícola. Primero California y luego Florida, se transformaron en los principales centros de investigación y producción en todo el mundo. Así aparecieron nuevas variedades creadas por el hombre como los tangelos, los citranges y el limequat. En la actualidad, los cítricos son producidos en zonas subtropicales y tropicales, pero sus frutas son parte de la vida de cada día de millones de personas alrededor del mundo. **[01, 02, 03] figura 1.**



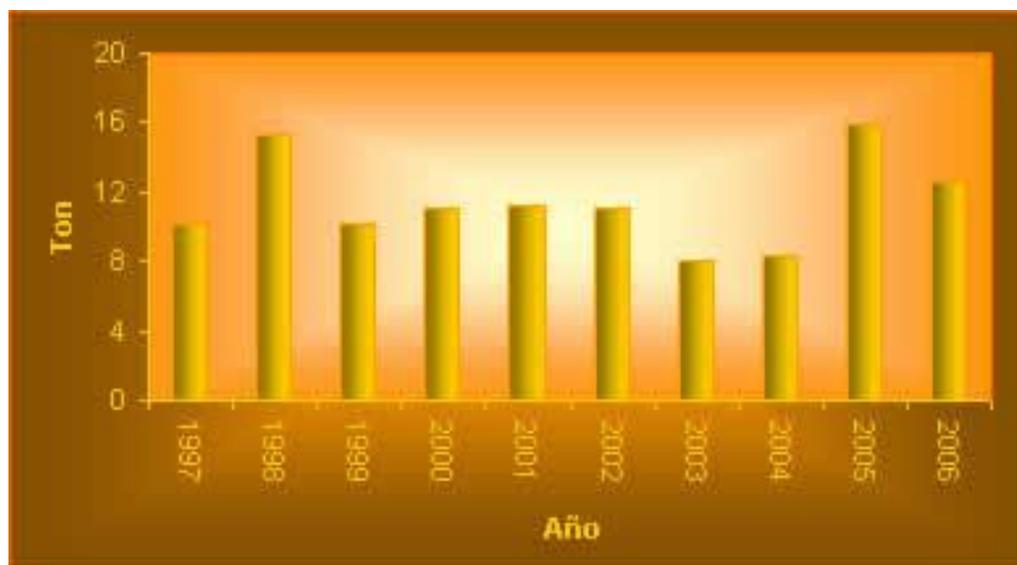
**Figura 1. Regiones cítrícolas del mundo – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Concordia**

### **1.2.- El mercado mundial de jugo concentrado de naranja**

Durante el año 2006, la producción mundial de jugo concentrado congelado de naranja fue de 2,22 millones de toneladas, con tendencia estable. La República Federativa de Brasil lidera el mercado con el 60% del volumen elaborado, seguido por EE.UU. con el 30%. Italia y España suman el 4% del total mundial mientras que la participación de Argentina es inferior al 1%. [04].

### **1.3.- La producción argentina**

En informes correspondientes a la temporada 2006, la elaboración argentina de jugo concentrado congelado de naranja fue algo inferior a las 13 mil toneladas, 20% menor al año anterior. Durante la última década, la producción de jugo concentrado creció a una tasa promedio anual de 2,5%. Sólo el 20% de la producción argentina de naranja -que promedia las 900 mil Ton- se destina a industria. El grueso de la cosecha se consume en fresco.



**Figura 2. Producción jugos en Argentina. Fuente: Dirección de Industria Alimentaria. En base a datos de la Federación Argentina de Citrus**

El jugo concentrado congelado de naranja, representa el 18% del total de jugos cítricos elaborados en Argentina. En orden de importancia, se encuentra detrás del jugo concentrado de limón, que suma el 65% del total nacional. La Figura 2 presenta su evolución.

- La Argentina produce jugos concentrados congelados de naranja con atributos de calidad tales como color, sabor, proporción de pulpa, relación sólidos solubles/acidez y mínima carga microbiológica, que posicionan ventajosamente al producto con respecto a los de otros países productores.

- La producción es estacional. El mayor volumen se elabora en el período mayo-septiembre. [05].

El Código Alimentario Argentino (CAA), define como **jugo concentrado de naranja** “*al producto obtenido por concentración del jugo a través de medios mecánicos adecuados, a partir de distintas variedades de naranja (“Citrus sinensis”) y que cumple con las exigencias del Código Alimentario Argentino. (Art. 1047 - Res 2067, 11.10.88); el CAA se refiere a jugos conservados a una temperatura máxima de -15° C en la etapa industrial, de distribución y expendio, destinado a ser consumido dentro de las 24 horas posteriores a su descongelado” [06].*

Estas disposiciones del Código Alimentario Argentino son complementadas por los siguientes elementos:

- Los jugos deben presentar una relación de concentración mínima de 3 a 1 y pueden ser conservados por métodos físicos (refrigeración o congelación) o químicos (mediante la adición de ácido benzoico, sórbico, mezcla de ambos, o sulfitación).

- Coexisten distintos tipos de jugos concentrados congelados de naranja, destacándose como dos grandes vertientes los denominados *turbios* y los *clarificados*, presentando ambos tipos diferentes grados de acidez. Pueden elaborarse asimismo productos especiales, en función de la preferencia de los clientes.

- Los jugos argentinos se caracterizan por una equilibrada relación sólidos/ solubles, nivel de acidez y una coloración más intensa de aquellos elaborados por otros países.

- Para producir 1 tonelada de jugo concentrado congelado de naranja de 65° Brix, la industria procesadora utiliza entre 12 y 15 toneladas de fruta, relación que puede variar en función de las condiciones climáticas imperantes durante el ciclo de producción [07].

#### **1.4.- Producción nacional y regional de citrus**

La Provincia de Entre Ríos, presenta una participación importante en la producción nacional de cítricos, en términos totales es la segunda provincia en cuanto al volumen de producción después de Tucumán que produce principalmente limón. Sin embargo su participación se destaca principalmente en la producción de naranja y mandarina en cuanto al peso en términos absoluto y relativo que tiene la producción provincial respecto al país.

En la provincia de Entre Ríos Durante el año 2007 se produjeron 937.222 toneladas que representaron el 28% de la producción nacional de cítricos que superó los 3 millones de toneladas. De todas formas focalizándonos en la producción provincial de mandarina y naranja las mismas representan el 66% y el 53% respectivamente, volúmenes estos que se estiman anualmente en cada una de las regiones o provincias citrícolas a través de las distintas instituciones involucradas zonalmente y luego se compendia a nivel nacional. [08].

Sobre un total de cerca de 140.000 hectáreas, Entre Ríos tiene la mayor superficie plantada representando el 30% del total con cerca de 42.000 hectáreas. Debe considerarse que la superficie del país surge de la suma de diferentes relevamientos provinciales realizados

en distinta época. En el caso de Entre Ríos el relevamiento fue realizado en 2003/4 [09] y es la más actualizada disponible por el momento.

Provincia	Limón		Mandarina		Naranja		Pomelo		Total Toneladas	%
	Toneladas	%	T	%	T	%	T	%		
Tucumán	1.328.300	88%	9.000	2%	50.000	5%	8.000	3%	1.395.300	41%
Entre Ríos	19.121	1%	320.558	66%	586.498	53%	11.045	4%	937.222	28%
Salta	85.500	6%	14.760	3%	117.000	11%	188.400	71%	405.660	12%
Corrientes	35.000	2%	50.000	10%	130.000	12%	5.000	2%	220.000	7%
Jujuy	38.440	3%	25.040	5%	114.270	10%	12.250	5%	190.000	6%
Buenos Aires	1.500	0%	11.000	2%	77.000	7%	500	0%	90.000	3%
Misiones	8.140	1%	49.471	10%	13.469	1%	7.909	3%	78.989	2%
Formosa	111	0%	150	0%	602	0%	22.971	9%	23.834	1%
Catamarca	500	0%	7.000	1%	9.000	1%	900	0%	17.400	1%
Chaco	360	0%		0%	300	0%	7.980	3%	8.640	0%
Total	1.516.972	100%	486.979	100%	1.098.139	100%	264.955	100%	3.367.045	100%

**Tabla 1. Producción de Cítricos por Provincia en 2007 (en volumen y Porcentaje) – Elaborado en base a FEDERCITRUS «La Actividad Citrícola Argentina» sobre cosecha 2007.**

Como se observa en la **tabla 1** Entre Ríos en el 2007 produjo 937.222 toneladas que representaron el 28% de la producción nacional de cítricos que superó los 3 millones de toneladas. De todas formas la producción tanto en mandarina y naranja de la provincia representa el 66% y 53% respectivamente.

El orden que presenta Entre Ríos en cuanto a superficie expresado en **tabla 2** difiere respecto a producción. Esto se debe en términos generales al mayor rendimiento por hectárea que presenta el limón, predominante en Tucumán, respecto a mandarina y naranja que predomina en Entre Ríos. Los relevamientos tienen en cuenta no solo la superficie en cantidad de plantas sino también su edad.

Provincia	Limón		Mandarina		Naranja		Pomelo		Total	%
	Sup	%	Sup	%	Sup	%	Sup	%		
Entre Ríos	996	2%	19.930	56%	20.134	41%	858	7%	41.918	30%
Tucumán	33.921	81%	251	1%	1.214	2%	156	1%	35.542	26%
Corrientes	2.102	5%	7.294	21%	12.135	24%	373	3%	21.904	16%
Salta	1.900	5%	820	2%	4.680	9%	6.280	53%	13.680	10%
Jujuy	1.440	3%	1.645	5%	4.395	9%	490	4%	7.970	6%
Misiones	1.257	3%	3.990	11%	2.800	6%	699	6%	8.746	6%
Buenos Aires	98	0%	504	1%	2.889	6%	59	0%	3.550	3%
Formosa	325	1%	9	0%	229	0%	2.402	20%	2.965	2%
Catamarca	50	0%	900	3%	1.100	2%	70	1%	2.120	2%
Chaco	45	0%	31	0%	70	0%	549	5%	695	0%
<b>Total</b>	<b>42.134</b>	<b>100%</b>	<b>35.374</b>	<b>100%</b>	<b>49.646</b>	<b>100%</b>	<b>11.936</b>	<b>100%</b>	<b>139.090</b>	<b>100%</b>

**Tabla 2. Superficie plantada de cítricos por provincia (en hectáreas y porcentaje) – Elaborado en base a FEDERCITRUS «La Actividad Citrícola Argentina» sobre cosecha 2007.**

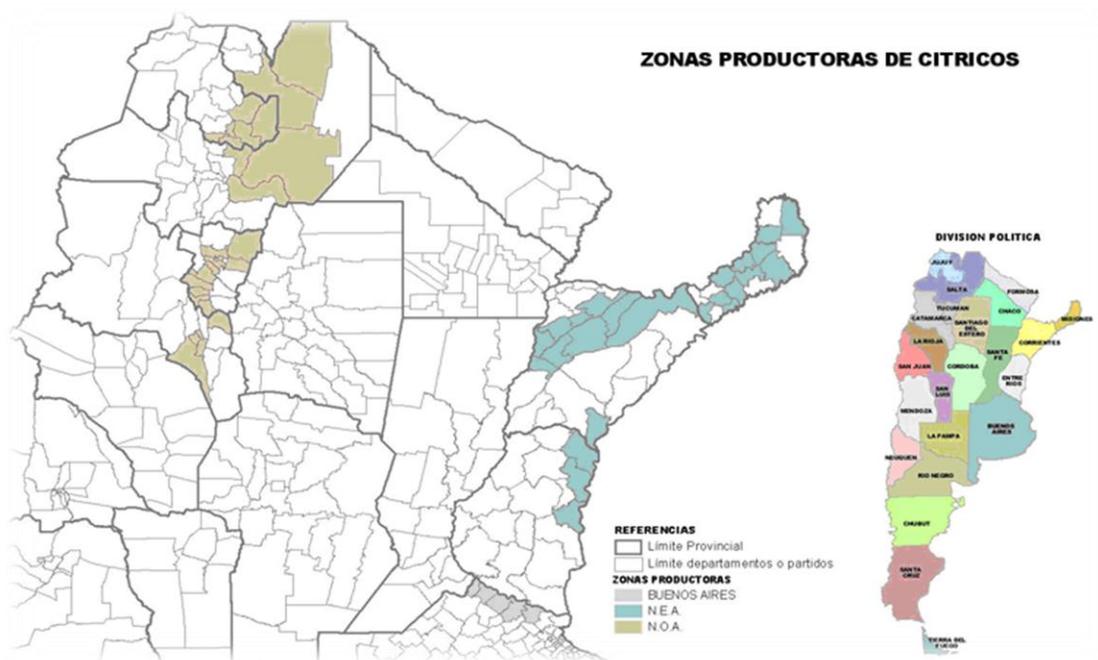
### 1.5.- Ubicación Geográfica

Su producción provoca un importante impacto socioeconómico fundamentalmente en la región del Noroeste Argentino (NOA) con la representación del 63% de la producción nacional y el resto en la región Noreste Argentino (NEA) **Figura 3.**



**Figura 3. Regiones cítricas del país – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Concordia**

La cadena citrícola regional **figura 4** incluye una región agro económica homogénea que abarca una franja de 30kilómetros (oeste – este) de suelos arenosos de la costa occidental del rio uruguay: que se inicia al norte del departamento Colón en Entre Ríos, y que se extiende hacia el norte por los departamentos Concordia y Federación, siguiendo hasta el departamento Monte Caseros en la provincia de Corrientes. En el lado oriental en la República Oriental del Uruguay en los departamentos de Salto y Paysandú también se registra actividad citrícola



**Figura 4. Zonas Productoras de Cítricos – SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca**

### 1.6.- Fases de la cadena citrícola en Entre Ríos

Cada una de las fases del proceso de producción se caracteriza por aspectos técnicos particulares, lo que las diferencia y les confiere la calidad de unidades específicas. Ellas cumplen secuencialmente el rol de eslabones de una cadena que dan cuerpo al proceso global.

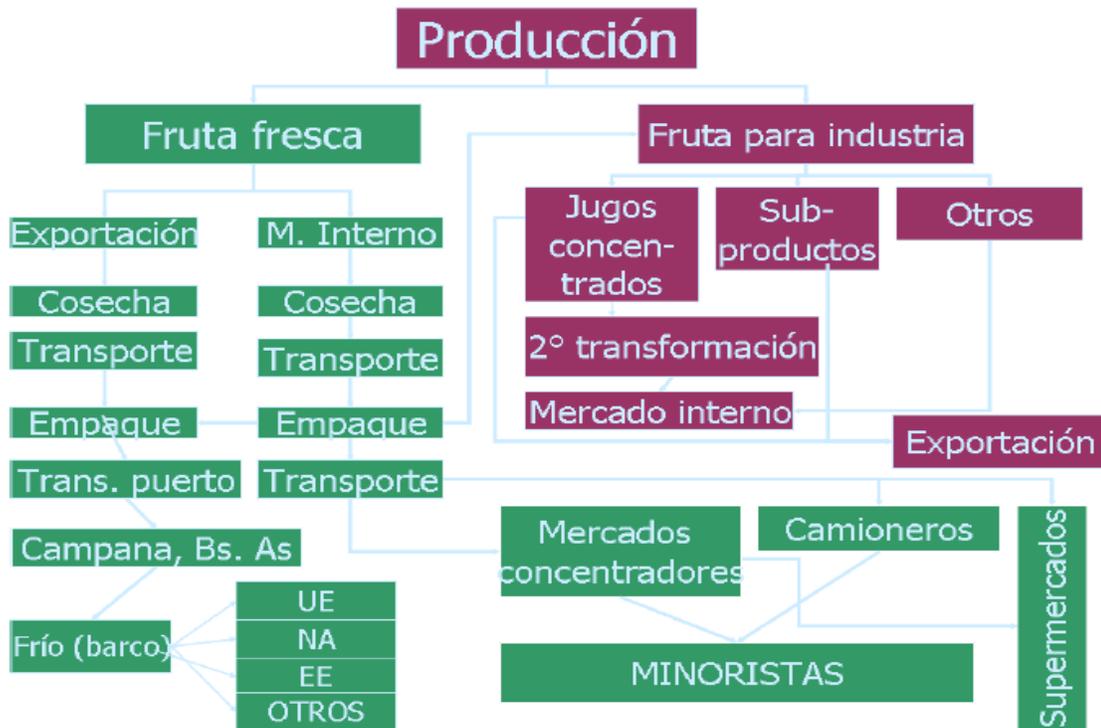
Etapa Primaria: incluye la actividad de producción primaria que va desde la plantación hasta la obtención de la fruta en condiciones de ser cosechada.

Etapa secundaria y terciaria: se puede incluir en ella la etapa de cosecha, transporte a empaque, y proceso de acondicionamiento, conservación y transporte a mercados

mayoristas o puertos. En ciertos aspectos son similares pero presentan variantes en los casos de fruta para exportación y mercado interno.

En general estas etapas se realizan dentro de la provincia. Existen quintas cítricas, empaque de mercado interno y exportación, industrias de jugos cítricos y derivados y fábricas de cremogenados. De todas formas existe intercambio con provincias cercanas. En el caso de fruta fresca también se procesa fruta procedente de corrientes y Misiones, y si bien en menor cuantía algo de procesa en Corrientes y Buenos Aires de fruta de Entre Ríos. En el caso de fruta para industria es habitual el procesamiento de fruta procedente de Corrientes.

La **figura 5** esquematiza en modo sintético los actores principales en la cadena regional los cuales serían: los viveristas, productores, empacadores (mercado interno y externo), las industrias de jugos y derivados. En otro nivel de análisis aparecen los proveedores de insumos, las empresas de servicios de cosecha y acondicionamiento, las empresas proveedoras de cámaras de desverdizado, de fumigación (por mosca de los frutos), frío y transportistas, fábricas de envases (aserraderos cajoneros). También existe un entramado institucional específico de apoyo a la cadena y entre ellos se encuentran cámaras de productores zonales y provinciales. Como Asociación de citricultores de Concordia, Asociación de citricultores y empacadores de Chajarí, Asociación de citricultores de Villa del Rosario, Asociación de citricultores y empacadores de Federación. Estas asociaciones conforman la Federación de citrus de Entre Ríos FECIER desde 1995. Desde ciencia y tecnología se cuenta con INTA EEA Concordia (y sus agencias de Extensión Rural de Chajarí y Concordia) y la Facultad de Ciencias de la Alimentación dado que la misma presenta especialización en la actividad.



**Figura 5. Esquema de la cadena de naranja y mandarina de Entre Ríos.**

En la actividad cítrica de Entre Ríos conviven tres destinos de la producción como se mencionó. En cierto sentido comprenden tres subcadenas interrelacionadas.

La gran expansión de la citricultura entrerriana se originó con miras a la producción de fruta fresca para el mercado interno en la década de 1950. Sobre todo impulsada por el crecimiento de la demanda derivada de la urbanización y las mejoras en el salario real.

A mediados de los setenta y hasta mediados de los ochenta se presentan problemas en la oferta: que incluyen aspectos productivos, sanitarios y cierta sobreproducción. A mediados de los 80 se encuentra una nueva oportunidad en la exportación. Desde entonces se percibe este destino como más remunerativo y se convierte como objetivo principal para parte considerable de los productores.

El sector industrial cuyo principal componente es la producción de jugos concentrados y derivados se expande también en los años cincuenta y sesenta. El objetivo principal de esta industria es de complementación de la actividad principal de fruta fresca. En cierto sentido cumple el rol de regulador de la oferta en cuanto a calidad y cantidad de fruta fresca. Debe considerarse que el objetivo principal de la citricultura de la provincia es

la producción de fruta para consume fresco. El destino a industria es secundario o más bien es como un subproducto. El otro punto es que en la fase de producción primaria habría una primer diferencia entre la producción para exportación y mercado interno.

En principio en el primer caso, dependiendo de la región de destino, existen diferentes requisitos de producción para poder exportar.

Por lo tanto la distinción entre un destino y otro comienza en el campo. En el gráfico anterior se puede ver como la fruta sigue una secuencia para exportación y mercado interno por vías separadas desde la cosecha. Esto es así porque los tipos de cosecha para mercado interno y exportación suelen diferir. Sin embargo existe cierta vinculación. Según los parámetros de calidad de fruta de exportación, puede existir fruta que no cumpla con las especificaciones, por lo tanto desde un empaque de exportación puede redestinarse cierta fruta hacia mercado interno o industria. Lo mismo puede suceder en el caso de la fruta procesada para mercado interno, donde parte puede redestinarse a industria, en la **tabla 3** pueden observarse estimaciones de la producción de cítricos en las campañas recientes en base a datos aportados por el INTA Estación Experimental Concordia.

Especie	Año 2010	Año 2011	Año 2012	Año 2013	2012/2011
Naranja	471.626	529.589	503.639	447.332	-11%
Mandarina	281.818	228.357	233.632	236.856	+1%
Pomelo	5.000	5.000	5.000	5.000	s/d
Limón	15.000	15.000	15.000	15.000	s/d
Total	773.443	777.946	757.271	704.188	-7%

**Tabla 3. Estimación de la producción de cítricos en las campañas de 2010 al 2013 - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Concordia.**

### 1.7.- Mercado local

Del volumen total de jugo concentrado destinado al mercado interno (4.000 toneladas) la mitad es adquirida por las fábricas de bebidas gaseosas, más del 70% de la fruta utilizada para procesar jugo concentrado congelado de naranja corresponde en nuestro país a la variedad Valencia. Otra variedad usada, en menor proporción y en especial en las provincias del norte argentino, es la Criolla.

La demanda restante está compuesta por elaboradoras de bebidas para diluir a base de jugo, bebidas saborizadas, polvos con sabores frutales y jugos puros. [10].

### **1.8.- Materia Prima**

El 60% de la naranja se produce en el NEA, correspondiendo a Entre Ríos el 43% y a Corrientes (Bella Vista y Monte Caseros) el 15% del total nacional. Esta región reúne condiciones agroclimáticas ideales para este cultivo.

El resto de la fruta se origina en Jujuy (13%), Salta (12%), Tucumán (6%), Buenos Aires (6%) y Misiones (2%) entre las provincias más relevantes. A diferencia de Brasil y EE.UU., donde las plantaciones se manejan con el objeto de proveer a la industria, en Argentina la producción está orientada hacia el mercado en fresco.

Más del 70% de la fruta utilizada para procesar jugo concentrado congelado de naranja corresponde a la variedad Valencia. Otra variedad usada en menor proporción y en las provincias del norte argentino es la Criolla.

### **1.9.- Las Empresas**

Cinco empresas producen jugo concentrado congelado de naranja. Las principales elaboradoras son: Litoral Citrus S. A. y E.C.A. S.A. (el 5% de su producción es orgánica), con plantas en Concordia (Entre Ríos) y en Bella Vista (Corrientes); Mager S.A. ubicada en Bella Vista; R.P.B (Concordia); Ingenio y Refinería San Martín del Tabacal que se halla localizada en Salta, pero elabora jugo de naranja a través de terceros en Entre Ríos; Ledesma S.A. (Jujuy), y la Cooperativa Tabacalera (Misiones).

Las plantas industriales están ubicadas en la zona de producción primaria. Presentan especialización regional.

Es elevado el nivel de integración vertical. Más del 80% de las industrias producen la materia prima, empacan, comercializan y exportan cítricos frescos. Los acuerdos para fijar volumen y precio entre la industria y los productores primarios son de palabra.

La industria argentina utiliza como tecnología de extracción la de FMC (Food Machinery Company), aunque existen diferentes marcas de origen español e italiano.

Básicamente es el mismo equipamiento que el utilizado en Brasil y EE.UU., por lo que los rendimientos industriales en Argentina se asemejan a los niveles internacionales.

Para producir 1 tonelada de jugo concentrado congelado de naranja de 65° Brix, la industria procesadora utiliza entre 12 y 15 toneladas de fruta. Esa relación varía en función de las condiciones climáticas imperantes durante el ciclo de producción. [11].

### **1.10.- Industrialización**

Las condiciones generales para los establecimientos elaboradores se especifican en el Capítulo II del Código Alimentario Argentino (Ley 18284/69, Decreto 2126/71).

Las condiciones, exigencias y características para los jugos cítricos se especifican en el Capítulo XII del Código Alimentario Argentino (Ley 18284/69, Decreto 2126/71).

La calidad y productividad en el proceso de elaboración de jugos cítricos están determinadas por las características de la fruta procesada, tales como acidez y sólidos solubles, y por la homogeneidad en el tamaño de la misma.

La fruta ingresa a la fábrica desde los empaques de fruta fresca o desde el campo, en bins o a granel. La fruta de industria se compra por peso.

En la playa de recepción se toma una muestra, para medir en laboratorio los siguientes parámetros:

- **Peso Promedio** = peso de la muestra / N° de frutas
- **% de jugo** = peso de jugo exprimido / peso de muestra.
- **Ratio** = ° Brix / % de acidez
- **% de sólidos** = ( % de jugo \* ° Brix ) / 100
- **Rendimiento** = °Brix del concentrado / % de solidos.

#### **1.10.1.- Tecnologías de extracción de Jugos**

Los extractores industriales de cítricos comenzaron a desarrollarse en los años 40 y 50, y desde entonces no han dejado de incorporar nuevas mejoras y avances tecnológicos que han permitido aumentar los rendimientos y la calidad del zumo obtenido.

Básicamente son dos las técnicas utilizadas en la industria para la extracción de zumos de cítricos: la FMC, desarrollada por la empresa norteamericana Food Machinery Company, y la Zumex, desarrollada por la empresa española Máquinas y Elementos S. A. A

continuación se detalla el funcionamiento de cada una de las máquinas de FMC, de acuerdo con lo descrito por Garza. [12].

### 1.10.2.- Tecnología FMC

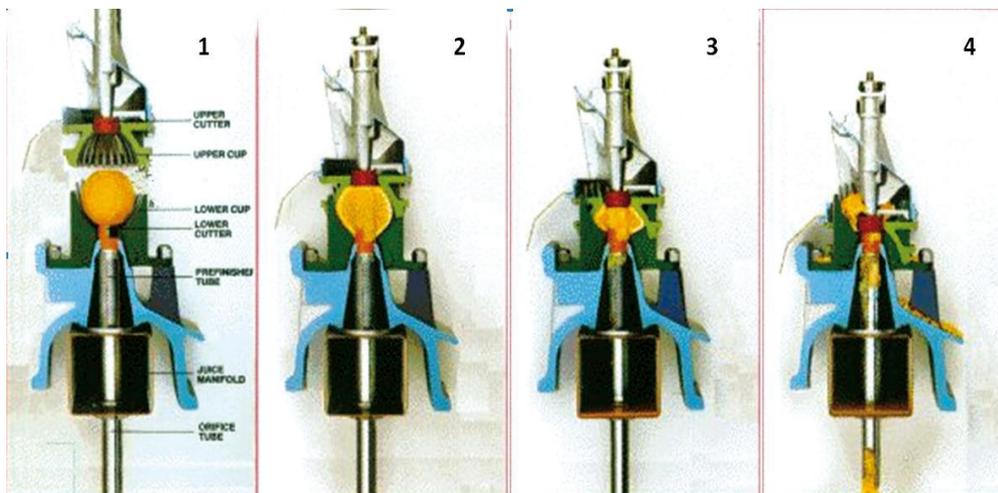
Es el tipo de extractor más utilizado a escala industrial, en la extracción de jugos de cítricos para la elaboración de concentrados.

El principio de funcionamiento se basa en la separación instantánea de los elementos constituyentes del fruto (piel, membrana, semillas y otros productos no deseables) que, de permanecer demasiado tiempo en contacto con el jugo, pueden tener una influencia adversa para la calidad final del producto. La extracción rápida evitará que pasen al jugo sustancias procedentes de las semillas, membranas y corteza que pueden producir amargor y sabores extraños. Como resultado se obtiene un jugo de gran calidad. El proceso se realiza muy rápidamente, ya que estos extractores pueden alcanzar casi 100 ciclos por minuto. La selección del tamaño de las copas se hace en función del rango de tamaños de la fruta a procesar.

En general, la fruta, previamente calibrada por tamaños, llega al extractor a través de una cinta transportadora y se posiciona automáticamente en la parte inferior de la copa. Una cuchilla de acero inoxidable situada en la parte superior (upper cutter) corta un círculo de corteza en la parte superior del cítrico, para permitir la separación de la corteza de las porciones interiores de la fruta. En la parte inferior otra cuchilla (lower cutter) corta una porción de corteza para permitir el acceso del cilindro de tamizado (prefinisher tube) al interior del fruto. La copa superior (upper cup) y la copa inferior (lower cup) sujetan el fruto durante todo el proceso de exprimido para evitar su rotura.

El cilindro de pretamizado separa los elementos internos del fruto en función de su tamaño; el jugo y la pulpa pasarán a través de los orificios del pretamizador y se depositarán en el depósito de jugo (juice mainfold), mientras que las membranas y semillas se descargarán por el tubo inferior (orifice tube).

Las etapas del proceso pueden ser descritas de la siguiente forma **figura 6**.



**Figura 6. Esquema del proceso de extracción de jugos cítrico empleando la tecnología FMC.**

Primera fase de extracción. En esta primera fase del ciclo de extracción, la copa superior se desplaza hacia abajo provocando una presión en el cítrico de forma que las cuchillas superior e inferior comienzan a cortar los extremos superior e inferior del fruto. El diseño de las copas permite que el fruto quede perfectamente sujeto, evitando que se rompa, y consigue una extracción uniforme durante todo el proceso.

Segunda fase de extracción. Cuando el ciclo de extracción continúa, los dedos de las copas se entrecruzan y el aumento de presión sobre el cítrico obliga al jugo, y a las partes interiores del fruto (zumo, pulpa, membranas y semillas) a pasar a través del fondo al cilindro tamizador, a la vez que la corteza empieza a salir por la parte superior, entre la copa y la cuchilla.

Tamizado. Una vez finalizada la extracción, las porciones interiores del cítrico se hallan localizadas en el interior del cilindro tamizador. En este momento, el tubo del orificio se mueve hacia arriba, presionando el contenido del cilindro tamizador, lo que provoca que el jugo y la pulpa pasen a través de los orificios del tamiz y pasen al depósito colector de zumo. Las partes del fruto de mayor tamaño, que no pueden atravesar el tamiz, son descargadas por un orificio en el tubo inferior y evacuadas fuera de la máquina. Las cortezas, rotas al ser forzadas a pasar a través de los dedos de las copas, se eliminan por la parte superior de la máquina y se depositan en un colector. Durante la extracción, las pieles forzadas a pasar a través de los dedos de las copas, sueltan el aceite esencial contenido en las

vesículas. Este aceite puede ser arrastrado mediante una corriente de agua y recogido por separado como una emulsión de aceite.

Las diferentes etapas del proceso general de producción de jugo de naranja, concentrado y congelado, se describen a continuación e ilustran posteriormente en **Figura 7**.

**Descarga de la fruta.** La materia prima deben ser frutos frescos de diferentes variedades recibidos directamente de campo.. La materia prima se entrega limpia, bien mantenida, y en vehículos cubiertos. La fruta fresca se transporta a la planta en camiones con capacidad de remolque de hasta 20 toneladas. El descargue puede ser relativamente simple o se pueden emplear ramblas hidráulicas para descargar la fruta por gravedad sobre cintas transportadoras. Por regla general, se hacen pruebas al azar para determinar el nivel de maduración de la fruta y su contenido de zumo. Luego se determina el nivel de azúcar y acidez, que a menudo son los criterios para la compra de la fruta y para la mezcla seleccionada de lotes, con el fin de obtener parámetros específicos de calidad.

**Almacenamiento.** Primeramente los frutos son descargados de los bins o contenedores a una fosa y de allí transportados para ser acondicionados.

**Acondicionamiento.** Los frutos se enjuagan en agua potable.

**Selección.** Los frutos son seleccionados, en esta operación es crítica la eliminación de aquellos en mal estado dado que su existencia en el producto final alteraría totalmente sus características de aceptación para ser comercializado.

**Tamaño.** Luego los frutos son calibrados y se envían a los extractores de Jugo.

**Extracción de jugo.** La pulpa es removida de la máquina extractora de jugo a través del cilindro tamizador para filtrar y homogeneizar el jugo para conseguir una emulsión estable; y el jugo es bombeado para un tanque pulmón.

**Regulación del contenido de pulpa.** El jugo que se obtiene es enviado a finisher y centrifugado para reducir el nivel de pulpa y de defectos. Seguidamente el jugo es desaireado (vacío a una temperatura de aproximadamente 60°C durante dos minutos) para eliminar el oxígeno disuelto y ocluido, y evitar así la oxidación acelerada durante la pasteurización. Un mal manejo de esta fase produce el oscurecimiento del zumo.

**Pasteurización.** Se realiza sobre todo con la finalidad de inactivar la enzima pectínesteraza en intercambiadores de placa.

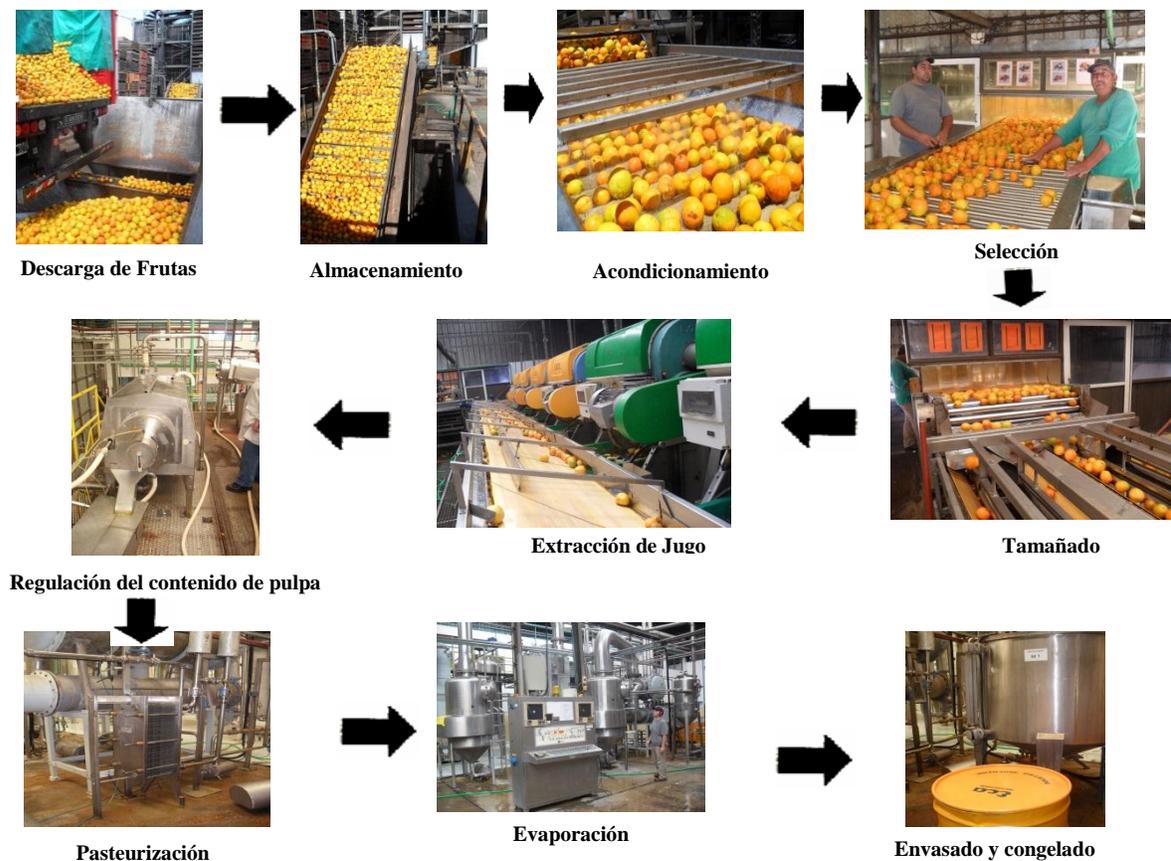
**Evaporación.** Se realiza en evaporadores de tres efectos.

Envasado y congelado Los envases más usados son los tambores de acero inoxidable de 200 litros (265 kg. netos) con pintura interior sanitaria y doble bolsa de polietileno, de las cuales la interior puede o no ser cerrada con pico de envasado.

Envases plásticos de distintas capacidades, cerrados con tapa y estériles en su interior. Los utilizan empresas elaboradoras de bebidas gaseosas, con un peso determinado y característico de cada compañía. Son de un solo uso y no tienen retorno.

El jugo es transportado a cámara y almacenado a una temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Estos productos, definen su valor en el mercado externo en función de sus propiedades y características fisicoquímicas, siendo el nivel de residuos de agroquímicos uno de los factores de calidad de fundamental importancia a considerar, al momento de la comercialización. Para sostener las exportaciones, es necesario cumplir con las rigurosas exigencias del mercado internacional, que incluyen también el control de residuos de agroquímicos.



**Figura 7. Etapas del proceso general de producción de jugo de naranja.**

Estos productos, definen su valor en el mercado externo en función de sus propiedades y características fisicoquímicas, siendo el nivel de residuos de agroquímicos uno de los factores de calidad de fundamental importancia a considerar, al momento de la comercialización. Para sostener las exportaciones, es necesario cumplir con las rigurosas exigencias del mercado internacional, que incluyen también el control de residuos de agroquímicos.

El contenido de residuos de agroquímicos en el producto, se encuentra al igual que en el jugo concentrado, en estrecha relación con los niveles residuales en la fruta utilizada como materia prima [13]. Durante el proceso de limpieza del fruto, especialmente, cuando se hace por lavado en agua con algún detergente específico y posterior cepillado con pulverización de agua, puede ocurrir una eliminación parcial de los residuos de plaguicidas que llevaba el fruto como consecuencia de los tratamientos pre y poscosechas. La proporción de residuos eliminados en este proceso de lavado depende, básicamente de tres factores, entre ellos, el tiempo transcurrido entre el tratamiento y el procedimiento de lavado, características del lavado y tipo de plaguicida y/o fungicida [14]. Para jugos cítricos extraídos se han hallado valores que demuestran que los niveles iniciales de residuos en la fruta que ingresa a la industria es eliminada parcialmente en el proceso de lavado y cepillado, pero los residuos remanentes en la fruta post lavado logran persistir en los aceites esenciales, aunque tal persistencia presenta diferencias significativas para los diversos analitos. [15].

Algunos estudios han demostrado que productos industriales pueden contener niveles elevados de plaguicidas, al derivar de frutas que han sido tratadas con fitosanitarios [16]. Por ello, es imprescindible el control de los niveles de residuos en productos obtenidos a partir de frutas en general y cítricas en particular para asegurar que los productos que resultan de la industrialización no comprometan la seguridad del producto. Algunos de los plaguicidas hallados a niveles residuales son clorpirifos, procloraz y tiabendazol, entre otros, para jugos concentrados extraídos a partir de cítricos de la variedad naranja valencia. [17].

### **1.11.- Preservación en Citrus**

Argentina posee ventajas comparativas y competitivas que le generan condiciones favorables para ubicarse como uno de los principales países de exportadores de frutas cítricas y sus productos como lo son los jugos concentrados de naranja. Sin embargo, cada vez más

hay más oferta y competencia y los países compradores se vuelven más exigentes en calidad y precio. En este sentido, todos los mercados internacionales están implementando algún tipo de requerimiento fitosanitario para la comercialización de los cítricos en sus países.

Dentro de las enfermedades y plagas cuarentenarias que limitan e impiden el acceso a los principales mercados externos de los cítricos de Argentina se pueden mencionar la canchrosis, mancha negra, sarna y mosca de la fruta. También, el HLB (ex Greening) constituye una enfermedad crítica y terminal que puede poner en riesgo la citricultura a escala nacional. La misma es producida por una bacteria, que a su vez la transmite el vector (insecto). Si bien la enfermedad aún no se ha diseminado, el vector está presente en el Litoral desde hace 20 años atrás, en el norte de Salta y Jujuy ya fue detectado (en dichas provincias tanto como en las provincias del NEA existe una planta ornamental en donde el insecto hace su ciclo). Las provincias del norte del país son las más vulnerables a esta enfermedad, ya que la misma ha sido detectada en Brasil y Paraguay.

No todas las enfermedades tienen la misma importancia. La relación comercial entre los países está condicionada principalmente por el interés y la disponibilidad para vender (oferta) y comprar (demanda). Sin embargo, existen factores que pueden obstaculizar estas acciones como por ejemplo, arancelarios, oferta o demanda limitada, políticas económicas y problemas sanitarios, entre otros. Las organizaciones nacionales o regionales de protección vegetal tienen diferentes políticas para determinar las medidas fitosanitarias para un organismo plaga. [18].

Si bien inciden en forma favorable sobre la producción, las actuales condiciones de humedad y temperatura también propician la aparición de problemas sanitarios en el cultivo.

Asimismo, dentro de los problemas sanitarios a los que se enfrentan los productores de cítricos argentinos se puede mencionar la baja calidad del material ofrecido por los viveros (material libre de enfermedades) que también afecta la competitividad del producto.

## **1.12.- Enfermedades en Citrus**

### **1.12.1.- Mancha Negra de los Cítricos**

La mancha negra de los cítricos, también conocida como moteado negro o “black spot”, es una enfermedad que ocasiona daño económico a la producción citrícola, al afectar la calidad externa de los frutos; en ataques severos también afecta los rendimientos, al

provocar caída prematura de la fruta. Es causada por el hongo *Guignardia citricarpa* Kiely (forma sexual). La forma asexual corresponde a *Phyllostictina citricarpa* (McAlp.) Petrak (hasta hace poco denominada *Phoma citricarpa* McAlp.).

Esta enfermedad ha causado daños de importancia en regiones citrícolas de Australia y Sudáfrica. En nuestro país es mencionada por Marchionatto en 1928; desde 1968-69 se la observó en Misiones, posteriormente en Corrientes. Se la conoce en el NOA desde hace años, causando daños en pomelos y naranjas en Salta y Jujuy y últimamente en limones en Tucumán. En la zona citrícola del río Uruguay su aparición es más reciente. Las primeras frutas afectadas, de naranja Valencia, fueron recolectadas en galpones de empaque durante 1987. Desde entonces se han recolectado más muestras, en su gran mayoría de naranja Valencia, aunque también en limones y naranjas de ombligo y más recientemente en mandarinas Murcott y Malvasio. [19, 20, 21].

#### 1.12.2.- Mancha Grasienta

La enfermedad se manifiesta por manchas en ambas caras de las hojas, de color amarillento translúcido, que cambian a pardo negruzco con apariencia grasa y epidermis sobre-elevada.

Es una enfermedad fúngica que afecta a plantas en producción, provocando defoliaciones intensas y prematuras en primavera. En Florida (EE.UU.) su agente causal es el hongo *Mycosphaerella citri*, encontrándose en nuestro país un hongo similar en hojas muertas en descomposición.

El hongo forma sus cuerpos fructíferos en las hojas caídas. Sus esporas son expulsadas con fuerza al aire, cada vez que estas hojas se humedecen por la lluvia o rocíos abundantes y prolongados. Las esporas son dispersadas por el viento y caen sobre las brotaciones de primavera y verano, provocando la infección. El hongo penetra a través de los estomas de las hojas; y en setiembre-octubre se observa la sintomatología descripta, comenzando la defoliación. En las hojas caídas casi deshechas se forman los cuerpos fructíferos del hongo, reanudándose el ciclo. Las variedades más susceptibles son las naranjas de ombligo y las tardías. [22, 23, 24, 25, 26].

### 1.12.3.- Enfermedades causadas por *Phytophthora*

Los hongos del género *Phytophthora* comprenden distintas especies, las mayorías endémicas del suelo, capaces de parasitar a un amplio rango de hospedantes: plantas frutales, hortícolas, forestales y ornamentales. Causan podredumbres en raíces, pero también pueden afectar la parte aérea, incluyendo tronco, ramas, hojas y frutos.

En el caso de los cítricos, tres son las enfermedades asociadas a estos hongos: la podredumbre del tronco o gomosis del tronco, la podredumbre de las raíces y la podredumbre de los frutos.

**Podredumbre del Tronco:** También llamada “podredumbre del pie”, especialmente en zonas donde se utilizan pies susceptibles, como el naranjo dulce. Ha sido el principal motivo de reemplazo del naranjo dulce como portainjerto, tanto en esta zona como en las principales regiones citrícolas del mundo. Actualmente el uso de portainjertos tolerantes ha reducido la incidencia de la enfermedad.

**Podredumbre de las raíces:** Al igual que lo descrito para la “gomosis del tronco”, el uso de portainjertos susceptibles en suelos pesados, anegadizos, favorece esta enfermedad. Actualmente la difusión de portainjertos tolerantes ha reducido la incidencia de esta podredumbre. Dado que esta enfermedad afecta sólo la parte subterránea de la planta, su diagnóstico es más difícil; los síntomas aéreos descritos para la “podredumbre del pie” no son característicos y pueden confundirse con deficiencias nutricionales, anegamiento del suelo y otras enfermedades.

**Podredumbre de los frutos:** También llamada “podredumbre marrón” (brown rot), “podredumbre morena” o “aguado de los frutos”. En períodos húmedos y lluviosos, coincidentes en nuestra zona con el comienzo del otoño, es frecuente observar fruta afectada en los empaques y a campo. Se observa en casi todas las especies cítricas comerciales, tanto en mandarinas tipo Satsuma como en frutos aún inmaduros de naranjas de ombligo, naranjas de verano y pomelos, siendo el limón particularmente susceptible. Las salpicaduras provocadas por la lluvia diseminan el hongo desde el suelo a la superficie de los frutos, contaminando especialmente aquéllos más cercanos al suelo; ante elevada humedad ambiente y agua libre se puede producir la infección, la que es favorecida por la presencia de heridas. [27, 28, 29, 30, 31].

#### 1.12.4.- Sarna de los cítricos

Existen tres tipos conocidos de sarna, cada uno de los cuales causado por una especie de hongo diferente. La **sarna del agrío** es causada por *Elsinoe fawcetti* y es la que se encuentra en nuestro país, infectando principalmente plantines de limonero rugoso en almácigos. La **sarna del dulce**, causada por *Elsinoe australis*, infecta principalmente los naranjos dulces y mandarinos y ha sido encontrada en Sudamérica. La **sarna Tryon** es causada por *Sphaceloma fawcetti* var. *Scabiosa* y ha sido identificada en limoneros en Australia. [32, 33].

#### 1.12.5.- Melanosis

La melanosis afecta los frutos y brotes de plantas cítricas. Los daños en brotaciones no suelen ser severos, dada la naturaleza del síntoma, normalmente reducido a pequeñas manchas o costras puntiformes. Sólo en caso de ataques fuertes, puede haber deformación de brotes y menor crecimiento de los mismos. En frutos la sintomatología es similar, pero el daño es más evidente, pudiendo afectar significativamente su calidad comercial. El hongo causal es *Diaporthe citri* Wolf (sinónimo: *Diaporthe medusaea* Nits.) (forma asexual: *Phomopsis citri* Fawc.), siendo la forma asexual la más frecuente y de mayor importancia en la ocurrencia de las infecciones. [34, 35, 36, 37].

#### 1.12.6.- Antracnosis

Es muy común la presencia de fructificaciones del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* sobre tejidos afectados por otros agentes bióticos o abióticos. De allí que, con frecuencia, la observación de fructificaciones de este hongo sobre partes afectadas ha llevado a concluir que el mismo es el causante del daño. Normalmente no ocurre así, sino que es un hongo con poca capacidad patogénica, pero en cambio con gran capacidad para colonizar y fructificar sobre tejidos debilitados o muertos. Es una enfermedad de poca importancia en la zona por tratarse de un patógeno débil. En realidad se lo asocia a daños causados por otros agentes primarios. Lo que ocurre es que se trata de un hongo que está presente en todos lados y es uno de los primeros en colonizar tejidos senescentes. Incluso puede estar presente en tejidos sanos sin causar síntomas, como infección latente. Puede

afectar ramitas, hojas o frutos que han sido dañados por una causa primaria como pueden ser el frío, herbicidas, u otros factores. Normalmente no se realiza control específico. [38, 39, 40].

#### 1.12.7.- Caída prematura de frutitos

En habla inglesa es conocido como “postbloom fruit drop”, es causada por ciertas razas del hongo causante de la antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz. Aún no ha sido observada en nuestra zona cítrica. Fue citada en nuestro país por primera vez por Monsted y Schwarz, en lotes cítricos cercanos a la ribera del río Paraná en Misiones, zona con prevalencia de nieblas y neblinas matinales durante la época de floración y cuaje. También bajo condiciones climáticas similares fue descripta por primera vez en América Central. La infección provoca aborto de flores y caída prematura de frutitos, quedando adheridos a la planta los pedúnculos y el cáliz, incluido el disco calicinal, los que permanecen verdes y turgentes por varios meses posteriores a la caída de los frutitos. Este síntoma y la aparición de manchas necrosadas de coloración anaranjado-castañas sobre los pétalos, contribuyen al diagnóstico. En la última década esta enfermedad ha tenido creciente importancia en otras importantes regiones citrícolas del mundo como Florida y Brasil, afectando principalmente naranjas de ombligo. El control está basado en el uso de benomyl y mancozeb. Los tratamientos con productos cúpricos no ejercen buen control. [41, 42, 43, 44].

#### 1.12.8.- Mal de los almácigos o “Damping Off”

El mal de los almácigos o “damping off” es un problema causado por un complejo de hongos. Puede producir importantes daños en caso de utilizarse plantines de portainjertos susceptibles y en suelos infestados, con exceso de humedad. La infección puede ocurrir al germinar la semilla, en preemergencia, o al estado de plántula durante la emergencia y crecimiento inicial. El síntoma típico es marchitamiento de los plantines, con podredumbre al nivel del cuello de las raíces; el extremo del tallito suele quedar doblado hacia abajo, en una posición característica. Los hongos del complejo “damping off” que comúnmente afectan a los cítricos son: *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani*. En la región de Concordia el problema no es grave, dado que el portainjerto más utilizado, el trifolio, es

tolerante a *Phytophthora* spp. El hongo más frecuentemente observado es *Rhizoctonia*. [45, 46].

#### 1.12.9.- Fumagina

Bajo la denominación de fumagina, negrilla u “hollín”, se conoce a una costra o manchado relativamente fácil de remover, negruzca, que suele observarse sobre la superficie de hojas, frutos, brotes y tallitos verdes. Esta costra está formada por el micelio o cuerpo de un hongo saprófito que coloniza y se desarrolla superficialmente. Si bien no parasita los tejidos de la planta, forma una cobertura de densidad variable que limita la llegada de luz a las hojas y frutos, interfiriendo en la fotosíntesis. Puede incluso retrasar el color de la cáscara del fruto. Generalmente desmejora la calidad externa, dado que los frutos aparecen cubiertos por una capa negruzca de micelio del hongo. Esto no es un daño irreparable, ya que en su mayoría puede desprenderse con el lavado y cepillado en la línea de empaque. Resulta más difícil su

remoción de las irregularidades de la superficie de los frutos, como ocurre con la depresión que rodea a la zona del cáliz. Son numerosos los hongos que se desarrollan en estas fumaginas. Se cita a *Capnodium* como la especie más importante, causante del denominado “sooty mold”. Suele estar presente *Cladosporium*. En condiciones de elevada humedad pueden encontrarse otros hongos del grupo de los denominados “sooty blotch” y “flyspeck”, de aspecto más tenue pero de difícil remoción. [47, 48].

#### 1.12.10.- Enfermedades de la Postcosecha

1) Enfermedades de la precosecha. Producen daños en los frutos en el campo y se mantienen durante la postcosecha. En su mayoría son problemas no evolutivos, es decir que su incidencia y severidad no aumentan a partir de la cosecha. Ejemplos: rameado, sarna, melanosis, creasing. Este último, si bien se origina en el campo, puede continuar su evolución luego de cosechada la fruta. [48].

2) Enfermedades de la postcosecha propiamente dicha. Normalmente son problemas evolutivos, es decir que su incidencia y severidad aumentan a partir de la cosecha. Ejemplos: podredumbres, daños por frío y oleocelosis, entre otras. Desde 1989 la EEA INTA Concordia ha conducido estudios de postcosecha, basados en muestreos de fruta fresca para exportación

realizados en empaques de la zona. Se llevó a cabo el seguimiento de cajas conservadas en cámaras frigoríficas, simulando las condiciones de exportación. Los estudios evidenciaron la siguiente conclusión: durante la postcosecha siguen predominando los problemas de la fruta que se originan en el campo. A ello se suman las heridas y golpes ocasionados durante la cosecha y manipuleo de la fruta.

#### 1.12.11.- Podredumbre de Frutos

Dentro de las enfermedades de postcosecha, las podredumbres constituyen un ejemplo típico de problemas evolutivos. Las podredumbres de los frutos pueden ocurrir en el campo, antes de que los frutos sean cosechados, durante los procesos de cosecha, transporte, empaque, almacenamiento y conservación en frío, y/o durante el proceso de comercialización. Una podredumbre es un proceso de alteración de tejidos con la participación de agentes parásitos y saprófitos. Como consecuencia de ello, el fruto afectado altera su aspecto y caracteres organolépticos y con ello pierde su valor comercial. Generalmente la infección primaria está a cargo de agentes con capacidad parasítica, que logran vencer la resistencia del tejido vegetal a la invasión. Una vez iniciada esta invasión por el agente causal, son muchos los microorganismos que pueden avanzar sobre esos tejidos multiplicándose a expensas de ellos, incluidos otros hongos y numerosas bacterias y levaduras. Los principales agentes de podredumbres son hongos. Estos son microorganismos heterótrofos (requieren de materia orgánica para su alimentación).

#### Clasificación de las podredumbres.

Las podredumbres se pueden clasificar según distintos criterios:

- 1) Según el modo de penetración del hongo en los tejidos del fruto.
  - a) Por heridas: requieren de la presencia de heridas de 2-3 mm de profundidad para poder infectar los tejidos.
  - b) Por penetración directa: no requieren de heridas para penetrar en los tejidos.
- 2) Según la consistencia que adquieren los tejidos afectados, aunque ello depende también de las condiciones ambientales.
  - a) Podredumbres blandas.
  - b) Podredumbres semi-blandas.

c) Podredumbres secas.

3) Según la posición de la podredumbre en el fruto.

a) Podredumbres pedunculares o “stemend- rots”: son aquellas en que la podredumbre comienza por la zona del “cabito” o pedúnculo del fruto.

b) Podredumbres estilares o “stylar-endrots”: Es frecuente observar a campo podredumbres de este tipo, especialmente en variedades con ombligo.

c) Podredumbres donde el inicio de la infección puede ser cualquier sector del fruto.

Condiciones necesarias para la ocurrencia de podredumbres.

1. Del patógeno: inóculo disponible.

2. Del fruto: tejidos susceptibles.

3. Del medio ambiente: medios de diseminación del inóculo y vías de penetración al fruto accesibles. Temperaturas y humedad elevadas. [48].

1.12.12.- Podredumbres en el campo

Las podredumbres de frutos a campo no son frecuentes; sin embargo, se pueden mencionar algunos casos: La podredumbre marrón, podredumbre morena o aguado de los frutos, causada por *Phytophthora* spp.

Las podredumbres por *Penicillium digitatum*, también frecuentes de observar en frutos aún en planta. Ello se manifiesta con cierta frecuencia en inviernos lluviosos y con elevada humedad relativa y neblinas, en frutos con heridas ocasionadas por “pinchazos” o golpes de cualquier tipo. En su estado inicial los síntomas se manifiestan como una mancha pequeña de aspecto muy húmedo (“wáter spot”), pudiendo confundirse con las podredumbres húmedas causadas por *Geotrichum* sp.; incluso se puede confundir con podredumbre inicial por *Phytophthora*, pero a la brevedad aparece la fructificación típica del moho verde o azul.

En variedades con ombligo, como el grupo de las naranjas de ombligo, se presenta a campo con cierta frecuencia una podredumbre estilar, que suele no manifestarse externamente pero que avanza por el eje central del fruto en sentido opuesto a las podredumbres pedunculares; es llamada podredumbre negra, de consistencia seca, causada por *Alternaria* sp. Las frutas afectadas pueden detectarse a campo o en el empaque, porque toman una coloración anaranjada más subida y prematura que los frutos no afectados.

Además, sobre el sector del ombligo suele observarse una podredumbre de coloración negra. En mandarinas con presencia de ombligo como la mandarina Ellendale suele observarse también esta podredumbre, pero hasta el presente es de escasa incidencia. En variedades comerciales en estado de sobremadurez comercial, dejadas en planta, con el envejecimiento propio de la fruta y la pérdida paulatina de calidad interna y externa, suelen aparecer podredumbres secas causadas por *Colletotrichum gloeosporioides*; ésto en parte es debido a la senescencia propia del fruto, con tejidos debilitados, que permiten la invasión de los tejidos por el hongo mencionado. [48].

#### 1.12.13.- Podredumbres en el empaque

Dado el escaso tiempo que media entre la cosecha y el procesamiento de la fruta en el empaque, no hay mayores diferencias en cuanto a los podridos observados; excepto el caso de lotes afectados por *Phytophthora spp.*, en que los frutos infectados continúan la incubación y se manifiestan nuevos casos durante y posteriormente al empaque. También se intensifican los podridos por *Penicillium digitatum*, especialmente por las heridas ocasionadas durante la cosecha, transporte y manipuleo de la fruta en el empaque. Además, en empaques con poca higiene suele haber gran concentración de inóculo de los mohos verde y azul y del hongo de la podredumbre amarga. Es justamente aquí donde se generan y crecen las poblaciones de razas de hongos resistentes a los productos químicos utilizados en el empaque.

#### 1.12.14.- Podredumbre durante la conservación y la comercialización

Es durante los procesos de conservación de la fruta, previo a su consumo, cuando las podredumbres adquieren mayor importancia; pueden llegar a provocar en casos extremos la pérdida completa de las partidas o alcanzar porcentajes de podridos que provoquen el rechazo de la partida o, al menos, una depreciación importante en su valor de venta con los grandes costos que ello significa. La reglamentación argentina fija como límite de tolerancia de podridos para la fruta cítrica no más del uno por ciento (1%) del total de frutas de la partida y no más del cinco por ciento (5%) del total de frutas por caja. Los hongos causantes de podredumbres pueden clasificarse, según su modo de acción, en hongos que actúan a partir de heridas, hongos que penetran en forma directa y hongos que actúan a partir de infecciones latentes. [48].

#### 1.12.15.- Hongos que actúan a partir de heridas

Son aquéllos que necesitan de una herida o lesión para poder penetrar e invadir los tejidos del fruto. Los dos ejemplos típicos son *Penicillium digitatum* o moho verde y *P. italicum* o moho azul, y el hongo causante de la podredumbre amarga o “sour rot” (*Geotrichum candidum*): **Moho verde**. Agente causal: *Penicillium digitatum*. Es el principal causante de podredumbres en la región. Es un hongo de muy amplia distribución y con gran capacidad de fructificación y de diseminación por el viento. **Moho azul**. Agente causal: *Penicillium italicum*. Menos frecuente que el moho verde, pero también de importancia en el podrido; especialmente durante la conservación frigorífica, ya que prospera mejor que el moho verde a temperaturas bajas. **Hongo de la podredumbre amarga o “sour rot”**. Agente causal: *Geotrichum candidum*. Es un hongo del suelo, también presente en todos lados. Diseminación por salpicaduras y partículas. Sin embargo presenta una débil capacidad patogénica. Sólo puede invadir los tejidos de los frutos cuando éstos envejecen. Ello ocurre naturalmente durante la conservación, por lo que partidas envejecidas pueden experimentar pérdidas importantes. Tiene gran capacidad de sintetizar enzimas pectolíticas poderosas, que degradan los tejidos produciendo prácticamente una licuefacción de los frutos. Es la podredumbre más húmeda de todas las que pueden observarse. Además, el chorreado puede contagiar frutos vecinos y provocar las denominadas infecciones en nido. En empaques con volcado en húmedo existe el riesgo de que el baño se transforme en caldo de cultivo de este hongo, si no se controla adecuadamente la concentración de desinfectante y si se permite la llegada al mismo de frutos con estado avanzado de esta podredumbre. [48].

#### 1.12.16.- Hongos que actúan a partir de infecciones latentes

Un grupo numeroso de hongos de escasa capacidad patogénica es, sin embargo, capaz de invadir los tejidos del fruto cuando éstos envejecen, durante la conservación en postcosecha. La penetración de estos hongos en los tejidos de los frutos normalmente ocurre en el campo, incluso durante el período de cuaje y formación de los frutitos. El hongo permanece latente, sin avanzar durante todo el proceso de crecimiento y maduración del fruto. Sólo después de la cosecha, con el avance del proceso de envejecimiento de la fruta, puede continuar su desarrollo en los tejidos e iniciar el proceso de podredumbre. La mayoría

de las inoculaciones de los frutos ocurre en el sector peduncular, donde se brinda un ambiente protegido, favorable para la deposición de estos hongos. Como también el proceso de envejecimiento del fruto comienza por el sector peduncular, es aquí donde el tejido debilitado es más susceptible a la invasión por el hongo. Varios hongos actúan de esta forma, produciendo las denominadas podredumbres pedunculares o “stem-end-rots”. Son podredumbres semi-blandas a secas, que se inician en la base del fruto y avanzan luego hacia el ápice por la cáscara y el eje central. Según las experiencias de conservación realizadas en la EEA INTA Concordia durante 20-30 días, estas podredumbres pedunculares no llegan a alcanzar importancia en la zona del río Uruguay. En el caso de conservaciones superiores al mes, la incidencia de las mismas podría aumentar significativamente, como lo demuestran trabajos realizados por la EEA INTA San Pedro (Bs. As.).

En la zona se han detectado los siguientes hongos causantes de podredumbres pedunculares:

*Alternaria spp.*, causante de la podredumbre negra o black rot. Además de causar podredumbres a campo en variedades con ombligo, se lo ha detectado en porcentajes significativos durante la conservación frigorífica de limones, mandarina Ellendale y mandarina Nova. Es diseminado por el viento, salpicaduras o partículas. Su control químico por parte de los principales fungicidas de postcosecha es poco eficaz. *Prevención*: es lo más importante. Evitar la cosecha de frutos sobremaduros y retrasar procesos de deshidratación y envejecimiento prematuro de los frutos. *Phomopsis sp.* Es el mismo hongo causante de la melanosis. Saprófito sobre ramas y ramitas secas, las que son la principal fuente de inóculo. Diseminación por salpicaduras de lluvia. Se deposita en la zona peduncular de los frutos. Escasa capacidad patogénica sobre tejidos nuevos, sanos. Infecciones latentes. Invade los tejidos del fruto recién cuando éstos comienzan a envejecer o a debilitarse. *Prevención*: poda y limpieza de ramas secas. Se lo ha detectado en porcentajes significativos en pomelo, en mandarina Murcott y en naranja Valencia, en conservaciones por tiempos superiores a los 20 - 30 días. *Colletotrichum sp.* Ha sido detectado durante la conservación frigorífica en pomelos y en mandarina Murcott. Recientemente se lo ha observado afectando también mandarinas Satsuma (Owari y Okitsu) con tratamientos de desverdizado. En este último caso, un inadecuado manejo de esta técnica puede provocar el envejecimiento prematuro de la cáscara y con ello la invasión y pudrición de la misma, causadas por este hongo; el desarrollo

de *Colletotrichum sp.* es además estimulado por el etileno generado durante el proceso de desverdizado. [49, 50, 51, 52, 53, 54].

#### 1.12.17.- Tristeza de los cítricos

La tristeza es probablemente la enfermedad más grave que afecta al cultivo de los cítricos; originaria de Asia, de allí se extendió a las principales regiones citrícolas del mundo causando la muerte de más de 40 millones de árboles injertados sobre naranjo agrio. En Argentina es endémica, encontrándose en todas las áreas de cultivo del país. La tristeza causó la desaparición de más de 10 millones de plantas en la década del '30, cuando el pie más usado era naranjo agrio. Esta enfermedad es causada por un virus ("Citrus Tristeza Virus" o CTV) transmitido por el uso de yemas enfermas y difundido naturalmente por varias especies de pulgones. Desde hace años se sabe que existen varias razas del virus, que difieren en la intensidad de los daños producidos en las diversas especies de cítricos y/o en su transmisibilidad por pulgones. Los síntomas varían según la especie o combinación infectada. En las plantas injertadas sobre naranjo agrio (con excepción del limón) el virus produce la muerte del floema a nivel del injerto; ésto ocasiona el decaimiento y muerte de la planta, que puede ocurrir en un corto tiempo (meses) o a lo largo de varios años, a través de un decaimiento progresivo. También puede producir, en otras combinaciones cítricas, clorosis en las nervaduras de las hojas (seedling yellows), reducción del tamaño de las hojas, reducción del tamaño de los frutos y frutos deformados y acanaladuras en la madera del tronco y ramitas (stem-pitting). [55, 56, 57].

#### 1.12.18.- Grupo Psorosis

Consiste en una serie de enfermedades con síntomas diferentes en el campo, pero que tienen en común el producir manchas o pinceladas cloróticas (flecking) en hojas de brotes jóvenes de plantas afectadas, especialmente en plantines indicadores desarrollados en condiciones de invernáculo. Las enfermedades incluidas dentro de este grupo son: psorosis A, psorosis B, Citrus ringspot, concave gum, blind pocket, impietratura y cristacortis. Hasta hace pocos años también se incluían en este grupo infectious variegation y crinkly leaf.

Los avances en las investigaciones han permitido diferenciar las distintas enfermedades, pero aún hoy el agente causal de muchas de ellas permanece sin poder ser

caracterizado, aunque exista la evidencia de su naturaleza virósica. En la actualidad se considera que las enfermedades conocidas como psorosis A, psorosis B y ringspot estarían causadas por un agente en común: un nuevo tipo de virus con razas bien diferenciadas. Tanto el ringspot descrito en Florida (EE.UU.), como la psorosis presente en Argentina, se caracterizan por poder ser transmitidos artificialmente a una herbácea, *Chenopodium quinoa*. La infectividad sobre quinoa fue asociada a una proteína, la cual podría ser parte de la estructura del virus causal de estas enfermedades. Respecto a blind pocket, concave gum, cristacortis e impietratura, permanece desconocido el agente causal, aunque se presume sea de carácter viral. [57].

#### 1.12.19.- Cancrosis

La Cancrosis de los cítricos es una enfermedad altamente contagiosa causada por la bacteria *Xanthomonas campestris pathovar citri* que produce serios efectos en los cítricos industriales alrededor del mundo.

Existen varios tipos de cancrosis causadas por distintos biotipos de la bacteria causal. El más virulento es el biotipo A, que afecta a la mayoría de los cítricos; se encuentra en Asia y en países de otros continentes. El biotipo B afecta a los limoneros; produce la llamada “falsa cancrosis” o “cancrosis sudamericana”. En 1960 se halló en Brasil el biotipo C, afectando a la lima Key. En 1981 se detectó en México la “bacteriosis de la lima Key”. Si bien al principio se atribuyó la causa a otro biotipo de la bacteria causal de cancrosis, se comprobó posteriormente que la enfermedad era producida por un hongo del género *Alternaria*. Por último, el biotipo E apareció en 1984 en Florida (EE.UU.) sobre citrumelo; la bacteria causal no es homóloga a los biotipos A, B y C y los síntomas producidos difieren de los otros tipos de cancrosis.

El uso de más de un método de detección, en forma simultánea, es la mejor opción para evitar el diagnóstico equivocado. Los métodos que actualmente se usan son serológicos, análisis de ADN (PCR) y crecimiento en cajas con medios semiselectivos. Todos deben usarse junto con tests de patogenicidad en distintas variedades.

Es causada por una bacteria, *Xanthomonas campestris pv citri*. Es gram negativa, formada por un cuerpo bacilar y un solo flagelo polar. La bacteria es aerobia; se desarrolla óptimamente a 29-30°C. En medio de cultivo forma colonias de color amarillo. Para la

identificación de los biotipos se han usado pruebas bioquímicas, serología, sensibilidad a bacteriófagos, análisis del ADN y ácidos grasos y pruebas de patogenicidad en plantines de cítricos. [58, 59, 60].

### **1.13.- Plaguicidas Generalidades**

Los plaguicidas o pesticidas son sustancias químicas empleadas por el hombre para controlar o combatir algunos seres vivos considerados como plagas (debido a que pueden estropear los campos y los frutos cultivados). A este proceso se le llama fumigación.

En la definición de plaga se incluyen insectos, hierbas, pájaros, mamíferos, moluscos, peces, nematodos, o microbios que compiten con los humanos para conseguir alimento, destruyen la propiedad, propagan enfermedades o son vectores de estas, o causan molestias. Los plaguicidas no son necesariamente venenos, pero pueden ser tóxicos para los humanos u otros animales.

Pero de acuerdo a la Convención de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes, 9 de los 12 más peligrosos y persistentes compuestos orgánicos son plaguicidas [61, 62].

El término plaguicida está más ampliamente difundido que el nombre genérico exacto: biocida (literalmente: matador de la vida). El término plaguicida sugiere que las plagas pueden ser distinguidas de los organismos no nocivos, que los plaguicidas no lo matarán, y que las plagas son totalmente indeseables [63].

Durante los años 1980, la aplicación masiva de plaguicidas fue considerada, generalmente, como una revolución de la agricultura. Eran relativamente económicos y altamente efectivos. Su aplicación llegó a ser una práctica común como medida preventiva aun sin ningún ataque visible. Desde entonces, la experiencia ha demostrado que este método no sólo perjudica el medio ambiente, sino que a la larga es también ineficaz. Donde se han utilizado los plaguicidas de manera indiscriminada, las especies de las plagas se han vuelto resistentes y difíciles o imposibles de controlar. En algunos casos se ha creado resistencia en los vectores principales de las enfermedades (p.ej. los mosquitos de la malaria), o han surgido nuevas plagas agrícolas. Por ejemplo, todos los ácaros fueron fomentados por los plaguicidas, porque no abundaban antes de su empleo. En base a esta experiencia, los especialistas en la

protección de cultivos han desarrollado un método más diversificado y duradero: el manejo integrado de plagas.

#### 1.13.1.- Clasificación

La FAO/OMS define el término plaguicida como “cualquier sustancia o mezcla de ellas utilizada para prevenir o controlar plantas o animales indeseables e incluso aquellas otras destinadas a utilizarse como regulador del crecimiento de la planta, defoliante o desecante”.

Desde el punto de vista de su estructura química existe una gran variedad, pudiéndose clasificar como [64].

##### Insecticidas y acaricidas

Los insecticidas son sustancias que con mayor o menor especificidad eliminan insectos. Es común tanto el uso rural como doméstico de los insecticidas, siendo necesario conocer cuáles son sus efectos, para ser conscientes acerca de los riesgos de su uso.

Según su forma de acción se clasifican en insecticidas de contacto e insecticidas sistémicos. Los insecticidas de contacto actúan por penetración a través del tegumento, por ingestión o por inhalación. Los insecticidas sistémicos actúan penetrando en un vegetal, llegando a todas las partes de la planta y manifestando su efecto al ser devorada.

Según su composición química pueden ser:

- ✓ Organoclorados: Derivados ciclodiénicos (aldrin, dieldrin, endosulfan, mirex), derivados del 2,2-difeniletano (DDT, dicofol), derivados del ciclohexano (lindano), policloroterpenos.
- ✓ Organofosforados: Esteres fosfóricos: ortofosfaftos, pirofosfatos (TEPP, diclorvos), ésteres tiofosfóricos: fosfotionatos, fosfotiolatos (paratio, fenitrotion), ésteres diotiofosfóricos (dimetoato, metidation, malarion), amidas del ácido ortofosfórico, amidas del ácido pirofosfórico, fosfonatos (triclorfon), tiofosfinatos.
- ✓ Organosulfurados (tetradifon, clorfenson).
- ✓ Carbamatos: N-metil carbamatos (carbaril, aldicarb), N,N-dimetil carbamatos (dimetan, pirolan).

- ✓ Otros grupos: Formamidas (amitraz), dinitrofenoles (dinocap), tiocianatos orgánicos (lethane, thanite), organoestánicos (cixexatin, fenbutestan), compuestos de flúor (fluoruro sódico), insecticidas naturales (botánicos) (piretrinas, nicotina), piretroides sintéticos (fenvalerato, cipermetrina, deltametrina), compuestos inorgánicos (azufre, arseniatos).

### Herbicidas

Los herbicidas son sustancias que se utilizan para eliminar las malezas que pueden competir con los cultivos. En general, los que se utilizan tienen cierta especificidad para determinado grupo de plantas.

Existen herbicidas residuales, que quedan en el suelo. Estos pueden ser los más riesgosos, pues no se conocen los efectos luego de varios años de usarlos.

Otros herbicidas son hormonales, los cuales son metabolizados por las plantas mientras viven, con poco efecto residual. Por ello, serían menos impactantes en el medio.

Se ha detectado como un problema de los herbicidas los solventes utilizados en la formulación de los mismos.

Según su composición química se pueden clasificar en:

- ✓ Inorgánicos (sulfamato amónico, boratos)
- ✓ Orgánicos: Aceites derivados del petróleo, derivados organoarsenicales (DSMA, MSMA), ácidos fenoxialifáticos (2,4-D, MCPA), amidas sustituidas (propanil), nitroanilinas (trifluralin), ureas sustituidas (diuron, linuron), carbamatos (profam, carbyne), tiocarbamatos (EPTC, metm sodio), heterociclos con nitrógeno: triazinas, triazoles, derivados de la piridina, uracilos sustituidos (atrazina, simazina, amitrol, bromacilo, picloram), ácidos alifáticos (dalapon), ácidos aril alifáticos (dicamba), derivados fenólicos (PCP), nitrilos sustituidos (ioxinil, bromoxinil), bipyridilios (paraquat, diquat).

### Fungicidas

- ✓ Inorgánicos: Azufre, cobre, mercurio
- ✓ Orgánicos: Ditiocarbamatos (maneb, zineb), tiazoles (etridiazol), triazinas (anilazina), aromáticos sustituidos (HCB, dicloran), dicarboxiimidazidas

(sulfenimidias) (captan, folpet), dinitrofenoles (dinocap), quinonas (cloranil), organoestánicos.

Las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas utilizados y la naturaleza del tejido vegetal son, entre otros, los factores de mayor importancia a considerar. En este sentido, cobra especial interés disponer de la información correcta respecto al grupo de clasificación al cual pertenecen los fitosanitarios utilizados en los tratamientos, ámbito de aplicación y la forma en que se depositan, la penetración y persistencia en el tejido vegetal, entre otros aspectos. También es interesante conocer si es posible la disminución o eliminación de los residuos por causas diversas y/o durante los procesos tecnológicos a los que son sometidos los frutos, tanto en quintas, empaques, industria, etc.

Se define “residuos de plaguicidas” como a la cantidad (ppm = miligramos/kg.) del producto, a veces también de sustancias derivadas de su degradación, que quedan sobre el producto cosechado y que pueden afectar al consumidor. Se relaciona con la toxicidad, ya sea agudo como crónica [65]. La denominación de residuo de plaguicida se refiere a cualquier sustancia presente en el medio (suelos, corrientes de agua), en los productos agrícolas o en los alimentos destinados al consumo humano o animal como consecuencia del empleo de un plaguicida. Esta definición no se limita al compuesto activo original. También incluye todas las moléculas derivadas del mismo por acción de los factores ambientales o biológicos (metabolitos secundarios, productos de conversión, de degradación) con propiedades tóxicas, [66]. Los residuos de plaguicidas son importantes desde el punto de vista de la salud del consumidor, pero también tienen una notable influencia en las transacciones comerciales, ya que su presencia constituye una barrera que limita la comercialización de productos en los mercados internacionales. De este modo, se han convertido en uno de los problemas ambientales y sanitarios que más interés despierta entre los consumidores de todo el mundo y actualmente recibe un gran esfuerzo investigador en todos los campos. En consecuencia, los organismos oficiales internacionales deben regular las concentraciones máximas admisibles de plaguicidas en los productos agroalimentarios y también en las aguas, especialmente en las superficiales y subterráneas, puesto que son las que más se utilizan para el consumo humano. Los permanentes cambios deben ser analizados por todos los actores vinculados al sector productivo para conocer el impacto de las reformas y establecer las estrategias de control fitosanitario más adecuadas. En este sentido, el *Codex Alimentarius*

define también el límite máximo de residuos (LMR) como “la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg) para que se permita legalmente su uso en la superficie o en la parte interna de los productos alimenticios para consumo humano y de piensos”. Los LMRs se basan en datos de buenas prácticas agrícolas (BPA) en el uso de plaguicidas, por tanto, tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a sus respectivos LMRs sean toxicológicamente aceptables. En definitiva, estos valores permiten controlar el uso de plaguicidas, facilitar el comercio y proteger al consumidor.

Por todo ello, es necesario llevar a cabo controles periódicos con implementación de programas de monitorización del contenido de plaguicidas y sus residuos de los productos agroalimentarios y de las aguas naturales destinadas al consumo humano y animal, con la finalidad de verificar que estén exentos de los mismos o bien que la concentración de estos compuestos sea inferior al LMR establecido por las distintas legislaciones, con objeto de incrementar la seguridad alimentaria. La importancia que se asigna en la actualidad a los residuos de plaguicidas en productos frescos y procesados hace necesario el control y evolución de los mismos [67].

En la industria cítrica la fruta que ingresa puede tener diferentes procedencias y es en esta instancia donde cobra relevancia la trazabilidad para el control de la producción cítrica. Además, la corteza de los cítricos presenta una capa lipofílica y una importante densidad de glándulas o vesículas de aceites esenciales que favorecen el bloqueo de plaguicidas liposolubles, ofreciendo allí un medio donde son relativamente estables, lo que contribuye notablemente a su mayor persistencia. Es predecible que la eliminación de estos residuos será problemática, incluso durante las distintas etapas que conforman los procesos de industrialización de las frutas a la entrada en la línea de extracción, por lo que también es necesario verificar que los niveles residuales en los aceites esenciales obtenidos sean inferiores al LMR para estos productos.

La necesidad de preservar los frutos cítricos destinados, tanto para la comercialización en fresco como para industria, hace necesario la utilización de plaguicidas. Estos frutos necesitan tratamientos específicos en la etapa de producción en campo para preservarlos de las plagas que atacan tanto a la planta como a los frutos. Además, en la etapa

de post-cosecha son tratados para preservarlos de las enfermedades fúngicas que puedan padecer durante el almacenamiento, transporte y comercialización.

### **1.13.2.- Características de plaguicidas utilizados en la citricultura**

La fruta cítrica que ingresa a la industria puede tener diferentes procedencias y es en esta instancia donde cobra relevancia la trazabilidad de la producción citrícola. Los frutos cítricos orgánicos tienen en nuestro país un bajo volumen de producción, la mayoría, de los citricultores aplican la metodología tradicional para el control de plagas. Por lo que las frutas podrán tener una carga residual de plaguicidas de precosecha, a la que se adicionarán los residuos provenientes de las aplicaciones en el drencher y/o los de los diferentes tratamientos en empaques. La eliminación de los residuos de plaguicidas presentes en los frutos dependerá de los procesos que se efectúen en la industria, fundamentalmente en la etapa de lavado y la eliminación o degradación por los procesos extractivos, enzimáticos, etc.

Los fungicidas orgánicos empleados en las distintas etapas de los procesos productivos, pueden dividirse en dos grandes grupos, según se comporten una vez en contacto con el tejido vegetal. Los no sistémicos, también fungistáticos o de contacto y los sistémicos [68], que se absorben por el vegetal, se incorporan a la savia y son traslocados ejerciendo su acción contra las enfermedades criptogamitas.

La permanencia de estos residuos en los productos cítricos industrializados, puede persistir aún después de los procesos tecnológicos de extracción.

Las mayores exigencias en cuanto a límites de tolerancia de residuos de agroquímicos en los productos, hacen necesario el desarrollo de metodologías analíticas teniendo a la determinación de contenidos residuales a niveles traza con adecuado rigor científico, a fin de brindar al sector productivo las herramientas de control analítico necesarias para promover la adecuada inserción de sus productos en el mercado [69].

### **1.13.3.- Benzimidazoles**

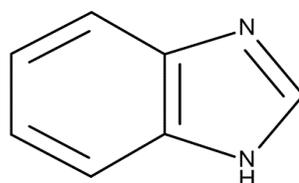
Los fungicidas pertenecientes a este grupo son sistémicos, es decir que atraviesan la cutícula y translocan vía floema hacia otros puntos distantes de la planta.

Estos controlan hongos endófitos o de crecimiento interno como: Fusarium, Monilia, Botritis, etc. (Ascomicetes). [70, 71, 72, 73, 74, 75]

Este grupo de fungicidas tienen poco efecto inhibitorio en la germinación de esporas de hongos sensibles, pero dependiendo de la concentración y del medio de cultivo, alteran el desarrollo del tubo germinativo, la multiplicación celular e inhiben fuertemente el crecimiento de las hifas y de los haustorios de los hongos sensibles.

Su estructura química se caracteriza por presentar en conjunto la unión de un benceno a un anillo imidazol conteniendo nitrógenos, ácidos y básicos respectivamente. [76, 77, 78]

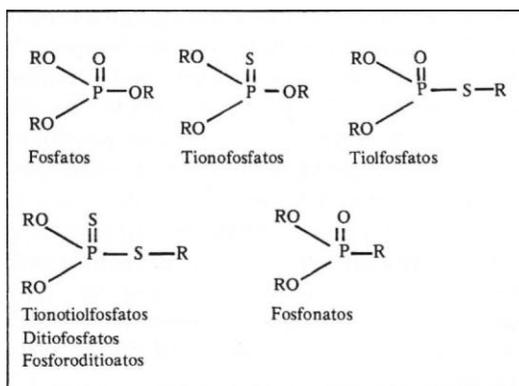
Su estructura química puede verse representada en la **figura 8**.



**Figura 8. Estructura química del benzimidazol**

#### 1.13.4.- Organofosforados

Los compuestos organofosforados se definen como derivados ésteres, amidas o tioles de los ácidos fosfórico, fosfónico, fosfortioico o fosforditioico. Presentan alta reactividad química y se degradan con relativa facilidad, bien mediante reacciones de hidrólisis, que dan lugar a productos inocuos para el medio ambiente, o por reacciones de oxidación, que conducen a metabolitos hidrolizables de mayor o menor toxicidad. A continuación en la **figura 9** se detalla la estructura básica de un organofosforado.



**Figura 9. Estructura básica de un organofosforado**

Estos plaguicidas se caracterizan por tener un átomo de fósforo pentavalente unido por un enlace simple a tres sustituyentes orgánicos (frecuentemente a través de un oxígeno) y por un enlace covalente coordinado (doble enlace) a un oxígeno o un azufre. Uno de los sustituyentes se denomina “grupo saliente” debido a que está unido a través del enlace menos estable de los tres enlaces simples, y es el sustituyente que se elimina cuando el compuesto fosforila la enzima o cuando el compuesto es hidrolizado o se escinde oxidativamente.

Estos insecticidas son por lo general, solubles en disolventes orgánicos, especialmente en los aromáticos como benceno o xileno y menos en alifáticos como hexano y pentano. Poseen un coeficiente de partición octanol/agua muy alto además de una presión de vapor muy baja. En general, todos presentan una baja volatilidad, salvo el diclorvos.

Muchos de ellos son formulados como concentrados en aceite o emulsionables en xileno, en disolventes miscibles con agua, como el etilenglicol monometil éter, o son absorbidos sobre los gránulos de material inerte para aplicación directa o después de dispersión en agua. [76, 77, 78]

### **1.13.5.- Principales características de algunos plaguicidas de interés**

#### **1.13.5.1.- Carbendazim**

Familia química: Benzimidazol

Nombre químico (IUPAC): Metil benzimidazol-2-ylcarbamate

Sinónimos y nombres comerciales para Argentina: Afin, Bavistin, Biocarben, Carben, Carbendazim, Cozaid, Crizeb, Crotonox, Curacarb, Delsene, Derosal, Eminol, Fedecoop Carbendazina, Ficarbem, Karbenzim Plus, Luxazim, Pandazim, Pillarstin, Serinale, Zundazim.

Fórmula empírica:  $C_9H_9N_3O_2$

Peso molecular: 191.2 g

Nº CAS: 10605-21-7

Clase: Fungicida químico uso agrícola

Toxicidad: III Medianamente tóxico

En la figura 10 se representa su estructura química desarrollada.



**Figura 10. Fórmula estructural del Carbendazim**

Propiedades físicas y químicas:

Aspecto físico: Líquido.

Densidad: 1,137g/ml (a 20°C, ambiente)

pH: 6,2

Presión de vapor: 0.09mPa (20°C).

Punto de fusión: 302°C-307°C (ingrediente activo).

Punto de ebullición: > 100°C.

Solubilidad en agua a 20°C: 29 mg/l (pH4) ,8mg/l (pH7), 7mg/l (pH 8) a 24°C (ingrediente activo).

Temperatura de descomposición: El Carbendazim se descompone por encima de los 300°C.

Suspensibilidad (ambiente): 93,7% p/p

En condiciones normales de almacenamiento, el producto es estable por un periodo mínimo de dos años. No se debe almacenar con productos corrosivos o explosivos.

Información Toxicológica

Toxicología Aguda en Mamíferos

Oral DL50 rata: > 5000 mg/kg

Dermal DL50 conejo: > 5000 mg/kg

Inhalatoria CL50 rata: > 22.7 mg/l de aire/hora

Uso Agronómico: Fungicida sistémico protectante y erradicante, actúa inhibiendo el desarrollo de los tubos germinativos de los hongos.

Forma de acción: Se absorbe a través de raíces y tejido verde con translocación acropetal, en hojas existe translocación local. Actúa por inhibición de la mitosis afectando el desarrollo del tubo germinativo.

Cultivos a Proteger: Aguacate, Ajo, Apio, Arroz, Ayote, Banano, Berenjena, Brócoli, Café, café en almácigo, Cebolla, Chile, Cítricos, coliflor, Espárrago, Fresa, Frijol, Lechuga, Macadamia, Mango, Maní, Melón, Ornamentales, Papa, Papaya, Pepino, Piña, Plátano, Remolacha, Repollo, Sandía, Soya, Tomate, Zanahoria.

Enfermedades a Controlar: Mancha Negra *Cercospora purpurea*, Antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides*, Fusariosis *Fusarium sp*, *Cercospora oryzae*, Tizon de la hoja *Pericularia oryzae*, Quema de la Hoja *Rynchosporium oryzae*, *Helminthosporium Helminthosporium oryzae*, Sigatoka Negra *Mycosphaerella fijiensis var difformis*, Siagtoka Amarilla *Mycosphaerella musicola*, Chasparria *Cercospora coffeicola*, sarna de los cítricos *Sphaceloma fawcetti*, Antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides*, Antracnosis *Colletotrichum spp*, Mancha de la Hoja *Cercospora spp*, Mancha Angular *Mycosphaerella brassisicola*, Fusarium *Fusarium roseum*, Mal de Talluelo *Rhizoctonia spp*, Antracnosis *Colletotrichum spp*.

### **1.13.5.2- Procloraz**

Nombre químico (IUPAC): N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)etil]imidazol-1-carboxamida.

Nombres comerciales para argentina: Mirage 45 Ce, 31.250, Concentrado Emulsionable; Sportak 45 C.E., 42.100, Concentrado Emulsionable; Sportak 45 Ce, 42.100, Concentrado Emulsionable.

Peso molecular: 375.5

Nº CAS: 67747-09-5.

Grupo químico: conazol, clorado.

Nombres comerciales: Alfán, Flash, Mirage, Octave, Sportak.

Fórmula:  $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ .

Tipo de plaguicida: Fungicida.

Clasificación: Imidazol

Propiedades físicas y químicas

Sólido cristalino incoloro e inodoro.

Su punto de fusión se encuentra entre los 46.5 y 49.3 °C.

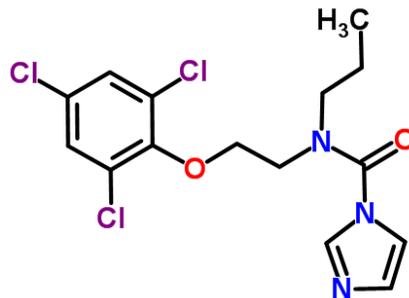
Punto de ebullición 210 °C.

Tiene una presión de vapor igual a  $1.5 \times 10^{-1}$  mPa a 25 °C.

Su solubilidad en agua es de 34.4 g/l a 20 °C. Es soluble en keroseno, cloroformo, xileno, dietil éter, tolueno y acetona.

Esta sustancia se descompone durante el calentamiento prolongado a temperaturas mayores a 200 °C.

En la figura 11 se representa su estructura química desarrollada.



**Figura 11. Estructura química del Prochloraz**

Su persistencia en suelo su vida media varía entre 120 y 130 días y en agua es igual a 14 días. En los sistemas terrestres su movilidad es baja, pero muestra un alto potencial de lixiviación. En este medio es susceptible a la fotólisis y a la hidrólisis. La hidrólisis ocurre bajo condiciones básicas (pH 9) con una vida media igual a 78.9 días. Los principales productos de degradación del Prochloraz en suelo son el 2,4,6 triclorofenol y la N-propil-N 2-(2,4,6-triclorofenoxi) etilamina. La volatilización no es un destino ambiental importante para este plaguicida.

Toxicidad Aguda: DL50 Oral Aguda

Ratas 1600-2400 mg/kg

Ratón 2400 mg/kg

DL50 Dérmica Aguda

Ratas > 2100 mg/kg

Conejos > 3000 mg/kg

Acción fitosanitaria: Es un fungicida sistémico translaminar protectante y curativo para el control de enfermedades producidas por hongos deuteromicetos. Especialmente recomendado en tratamientos postcosecha.

Ratón 2400 mg/kg

DL50 Dérmica Aguda

Ratas > 2100 mg/kg

Conejos > 3000 mg/kg

Acción fitosanitaria: Es un fungicida sistémico translaminar protectante y curativo para el control de enfermedades producidas por hongos deuteromicetos. Especialmente recomendado en tratamientos postcosecha.

### **1.13.5.3.- Tiabendazol**

Nombre químico (IUPAC): 2-(tiazol-4-il) benzimidazol

Sinónimos y nombres comerciales para argentina: 2-(1,3-tiazol-4-il) benzimidazol; 2-(4-tiazolil)-benzimidazol; 2-(4 tiazolil)-1H-benzimidazol; 4-(2- benzimidazolil)tiazol; Apl-Luster; Arbotect; Biogard; Bovizole; Captan T; Eprofil; Equizole; Lombristop; Mertec; Mertect; Metasol TK; Mintesol; Minzolum; Mycozol; Nemapan; Omnizole; Polival; Rival; RPH; TBDZ; Tebuzate; Tecto; Thiaben; Thiabendazol; Tiabenda; Tobaz; Triasox.

Fórmula química:  $C_{10}H_7N_3S$

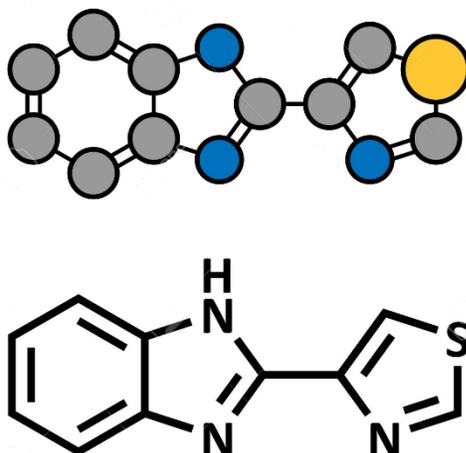
Peso molecular: 201.25

CAS N°: 148-79-8

Clasificación: Benzimidazol

Tipo de plaguicida: Fungicida

Propiedades físicas y químicas: Cristales incoloros, sin olor ni sabor. Su punto de fusión es igual a 305 °C. Su solubilidad en agua es igual a 50 mg/L a 25 °C. Es muy soluble en ácidos o bases diluidos, pero ligeramente soluble en alcoholes, ésteres e hidrocarburos clorados. Su presión de vapor es igual a  $4 \times 10^{-9}$  mm Hg a 25 °C. Esta sustancia no es higroscópica y sublima al ser calentada a 310 °C. En la **figura 12** podemos ver su estructura química.



**Figura 12. Fórmula estructural del Tiabendazol**

La Unión Europea homologó a partir del año 2008 el uso de plaguicidas en todos sus países miembros y además estableció un Límite Máximo de Residuo de Plaguicidas (LMRs) para los mismos.

El fungicida poscosecha Tiabendazole, tiene autorización de uso en la poscosecha de los cítricos por parte de la UE. Dicho producto también está autorizado por el Senasa de Argentina, aunque su tolerancia en el LMRs local es mayor fijándose en 10mg/kg.

#### **1.13.5.4.- Clorpirifos**

Nombre químico: Clorpirifos

IUPAC: O,O-dietilfosforotioato de 0-3,5,6-tricloro-2-piridilo ó O,O dietil 0-(3,5,6 tricloro-2- piridil)fosforotioato

Fórmula química es  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$

Masa atómica: 350,6 g/mol.

Grupo químico: Organofosforado

CAS N°: 2921-88-2

Propiedades físicas y químicas

Es un sólido blanquecino-cristalino con un olor penetrante. Tiene un punto de fusión de 43° C y aunque es insoluble en agua, solubilidad en agua a 20°: para el ia.: 2 ppm a 20°C, emulsionablese disuelve bien en disolvente orgánicos.

Punto de fusión: 41-43.5°C

Densidad relativa del líquido (agua =1 g/ml): 1.398 a 43.5°C

Solubilidad en agua: Ninguna.

Presión de vapor (Pa a 25° C): 0.0025

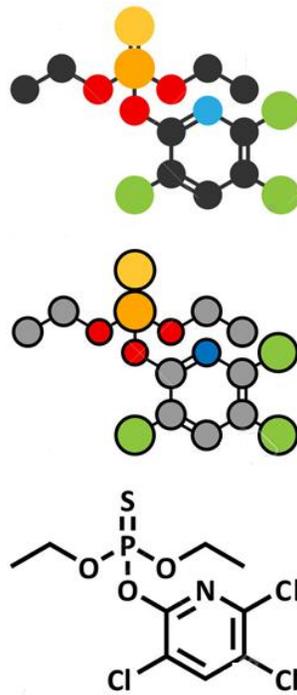
Olor: A Mercaptano

Presión de vapor: 46 mm Hg a 20°C

Punto de ebullición: 143°C

Temperatura de descomposición: No se informa.

En la figura 12 se representa su estructura química desarrollada.



**Figura 12. Estructura química del Clorpirifos**

Es un producto moderadamente peligroso, Clase II.

Toxicidad aguda:

Oral LD 50: 238 mg/kg

Dermal DL 50: > 2000 mg/kg

Inhalación CL50: > 2000 mg/kg

Irritación de la piel: Índice de Irritación Primaria: 0.2

Sensibilización de la piel: Potencial Leve

Irritación para los ojos: ligeramente irritante dermal.

Toxicidad crónica: Exposición prolongada o repetida a organofosforados pueden resultar en los mismo efectos de una exposición aguda, incluyendo síntomas retardados.

Uso: Insecticida recomendado para el control de insectos chupadores y masticadores. En cítricos es utilizado para el control de cochinilla acanalada, cochinilla algodonosa y otras cochinillas, mosca bl, pulgones y prays.

#### **1.14.- Métodos de determinación de plaguicidas**

Los contaminantes orgánicos, como los plaguicidas (pesticidas), son determinados en alimentos, frutas o verduras, entre otros, por medio de una serie de etapas analíticas conocidas como proceso de medida químico. En este proceso, la muestra es sometida a un conjunto de operaciones que permiten aislar el compuesto de interés (analito) desde la matriz por medio de una extracción y otras etapas necesarias para su posterior cuantificación.

Para determinar la presencia de estos compuestos se suele recurrir a las técnicas cromatográficas las cuales permiten separar los compuestos de interés presentes en la muestra. Comúnmente, dependiendo de las características químicas del analito, se utiliza cromatografía líquida de alta resolución HPLC o cromatografía gaseosa GC. Posterior a la separación de estos compuestos, tiene lugar la etapa de cuantificación. Para ello, es necesario utilizar alguna propiedad química que posean los analitos, de tal forma que esta pueda ser interpretada en forma de concentración. En este proceso, es necesario confirmar la identidad del analito comparando sus características químicas utilizadas en la cuantificación con un estándar de referencia.

Cabe destacar, que existen varios tipos de detectores que permiten cuantificar estos compuestos. Cada uno de éstos tienen distintos fundamentos empleados para la detección de compuestos orgánicos. Como ejemplos se pueden mencionar: el detector por ionización por llama (FID) y captura electrónica (ECD) para GC y detectores de ultravioleta (UV) y fluorescencia para HPLC. Sin embargo, el empleo de detectores tradicionales como UV-visible, captura electrónica o fluorescencia, presentan una incertidumbre importante en los datos que generan. La incerteza de estos, se exagera a bajos niveles de concentración, aumentando el riesgo de falsos positivos y negativos. Además, estos detectores no son confirmatorios para afirmar la presencia de pesticidas u otros compuestos. Por otro lado,

existen detectores de masas para ambas cromatografías constituyendo lo más avanzado. [79, 80, 81, 82].

En este contexto, para evaluar la distribución global, movilidad y el destino final de estos compuestos en el medio ambiente o en alimentos, es necesario contar con métodos analíticos sensibles, confiables y reproducibles. En este sentido, el acoplamiento de un detector de masas a un sistema de separación cromatográfica permite confirmar la presencia o ausencia de estos compuestos, siendo este sistema de detección altamente confiable y robusto.

Los sistemas de cromatografía asociados a detectores de masas, funcionan a través de una interfase que “conecta” el sistema cromatográfico con el detector. En cuanto a GC no presenta problemas, siendo una técnica de rutina en laboratorios para compuestos volátiles y apolares. En el caso de la cromatografía líquida, el acoplamiento a masas a tenido diversos avances en los últimos años. Para este caso, se ha observado un alto desarrollo de la tecnología posibilitado una rápida determinación de sustancias más polares o termolábiles.

En cuanto a la técnica de análisis, la detección por espectrometría de masas está basada en el distinto comportamiento de los iones al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Así, los iones son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) y detectados posteriormente. [83, 84, 85]

Una vez separados los compuestos en el cromatógrafo, es necesario producir la ionización de los analitos y generar iones en fase gaseosa. Para la cromatografía líquida, la ionización no se puede realizar por impacto electrónico, ya que los compuestos se encuentran en estado líquido, y no gaseoso, por ello la forma más utilizada de producir la ionización y llevar la molécula a un estado gaseoso es la ionización por electrospray (ESI), técnica de ionización que hoy en día es la más utilizada en sistemas de cromatografía líquida acoplada a detector de masa.

En este sentido y gracias a que un detector de masas puede analizar moléculas cargadas y generar una señal analítica en función de su masa (espectrometría de masas), es posible obtener información fidedigna de la presencia y/o ausencia de cualquier analito que se desee medir, esto debido a que cada compuesto es único en su estructura química y en su masa, permitiendo relacionar los iones analizados en el detector a un compuesto en particular.

Este hecho permite que la espectrometría de masas sea una poderosa herramienta para análisis de rutina y de investigación. **[86, 87, 88]**

Por esta razón, utilizar un detector de masa constituye un avance sustancial en el análisis de residuos de pesticidas en alimentos o detectar compuestos tan peligrosos como las dioxinas de forma segura y confiable. Los detectores de masa poseen un bajo nivel de falsos negativos y positivos en relación a otros detectores tradicionales como captura electrónica o arreglo de diodos. Los detectores de masa, además, constituyen sistemas altamente robustos y sensibles, siendo el único detector de tipo confirmatorio. **[89, 90, 91, 92]**

En definitiva, el desarrollo e investigación, en el ámbito analítico, tiene como objetivo aportar herramientas tecnológicas que permitan mejorar las capacidad de detección y cuantificación de compuestos orgánicos, en alimentos o matrices ambientales. Estos avances, se asociarán directamente a la producción de alimentos libres de plagas, amables con el medio ambiente y seguros para la población.

# Capítulo III

## 2.- OBJETIVOS

Los sectores agropecuarios en general, en sus producciones, requieren del uso de productos fitosanitarios para el control y tratamiento de las enfermedades causales de importantes pérdidas en los cultivos y en poscosecha. En el sector citrícola de la región del Noreste Argentino, es muy común el uso de carbendazím y procloraz, entre otros.

En la actualidad existe la tendencia al control integrado de plagas, no sólo para el cuidado de la producción, sino también para la protección del medioambiente, lo que permite lograr competitividad en los mercados. Esto consecuentemente tiene un impacto socioeconómico y un aporte en la mejora de la calidad de vida poblacional.

Las aplicaciones de los diferentes tipos de plaguicidas utilizados en los cultivos son efectuadas generalmente en forma preventiva en los diferentes estadios de desarrollo de la fruta. En la bibliografía consultada no se evidencian estudios sobre la probable correlación entre los niveles residuales de los diversos fitosanitarios aplicados en la producción, cosecha y poscosecha de la fruta que ingresa a la industria y los productos que allí se obtienen, entre ellos los jugos cítricos concentrados.

Desde el sector empresarial citrícola se llevan a cabo estrategias para responder a la demanda creciente de productos de alta calidad con todas las garantías higiénico-sanitarias, lo que se traduce en la preocupación por conocer las probables correlaciones entre los niveles de los agroquímicos en materia prima y los productos industriales de las cuales provienen. Esta preocupación hace necesaria la aplicación de nuevas tecnologías analíticas para la determinación de niveles trazas de los residuos en dichos productos.

Se plantearon como objetivos generales de la presente tesis doctoral, la determinación de los contenidos de carbendazim y procloraz en frutas entera al ingreso de la línea de producción y en jugos cítricos concentrados carbendazim, procloraz, tiobendazol y clorpirifos obtenidos a partir de las mismas.

## 2.1.- Objetivos específicos

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

- Validar a través de estudios de los parámetros analíticos de linealidad precisión exactitud límites de detección y cuantificación la determinación de residuos de:

Carbendazim y procloraz en *naranjas dulces de variedad valencia*.

Carbendazim, procloraz, tiobendazol y clorpirifos en *jugos cítricos concentrados de naranjas dulces de variedad valencia* mediante la aplicación de extracción en fase sólida y cromatografía gaseosa y líquida.

- Establecer y desarrollar el plan de muestreo: determinar los puntos de muestreo, frecuencia y tamaño de la muestra.

- Evaluación de la persistencia de los residuos en las frutas y su incidencia en jugos cítricos concentrados.

- Analizar los datos obtenidos y determinar la probable correlación entre los niveles de los analitos en los productos y materia prima de la cual provienen.

# Capítulo III

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente apartado pone de manifiesto el equipamiento y los reactivos utilizados para las actividades extractivas y análisis químico llevadas adelante en la presente tesis. Así también se detallan el diseño del plan de muestreo, la preparación y tratamiento de las muestras junto al tratamiento estadístico de los resultados.

### 3.- Reactivos y Equipamiento

Se detallan a continuación los reactivos y equipamiento utilizados en el desarrollo de la presente tesis:

#### Reactivos

- Acetato de etilo grado plaguicida (Merck)
- Estándares certificados de carbendazim, procloraz, tiobendazol y clorpirifos (Accu Standard Inc.)
- Agua grado 1 (agua calidad cromatográfica ultra pura).
- Hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de sodio, sulfato de magnesio y sulfato de sodio calidad 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 analitos.
- PSA (cartuchos para extracción)

#### Equipamiento

- Cromatógrafo Gaseoso con detector de Espectrometría de Masas tipo simple cuadrupolo (CG-MSD), marca Agilent Technologies, modelo GC 6850 y MSD 5973 Network. Columna ZB-5MS Guardian (5% Polysilarylene- 95% Polydimetilsiloxano) de 30m x 0,25 mm (di) x 0,25 µm de espesor de film, con 5 m de precolumna. Helio como gas carrier.
- Cromatógrafo Gaseoso Agilent Technologies 7890A con detector tipo triple cuadrupolo modelo 7000 con software QQQ Quantitative Analysis Mass Hunter. Columna ZB-5MS Guardian (5% Polysilarylene- 95% Polydimetilsiloxano) de 30m

x 0,25 mm (di) x 0,25 µm de espesor de film, con 5 m de precolumna con Helio como gas carrier.

- Cromatógrafo líquido con doble detector de masas triple cuadrupolo, marca Shimadzu, modelo Nexera con detector AB SCIEX triple cuadrupolo modelo 5500. Columna marca Phenomenex modelo Sinergi 4u Fusión RP-80 de 100 mm de longitud y 2mm de diámetro interno, con relleno de fase reversa C18. Polaridad: positiva. Fuente de Iones: Turbo spray.
- 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.
- 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 m marca Alltech.

### **3.1.- Plan de muestreo**

Los plaguicidas son parte importante de los sistemas de producción agrícolas modernos. Su adecuada utilización contribuye a la producción de alimentos de calidad y además, a un bajo costo. Sin embargo, dada su naturaleza, ellos presentan riesgos tanto para la salud de las personas, como para la vida silvestre y los ecosistemas. Existen efectos no evaluados en la utilización de plaguicidas que han llevado a prohibir o restringir el uso de algunos compuestos considerados riesgosos. Con esto se previene que el inadecuado uso de los plaguicidas.

La concentración de plaguicidas en diferentes matrices ambientales se estima en base a muestreos basados en métodos estadísticos. En general, debido a la gran variabilidad espacial de las concentraciones de los distintos plaguicidas en el medio, los valores obtenidos en un muestreo sólo son una aproximación a la realidad. Por lo tanto, el mayor o menor grado de certeza en la obtención de los datos colectados y su interpretación depende en gran medida de un adecuado muestreo, de la recolección de la muestra y de la preservación de éstas. Es

decir, para obtener datos representativos, la planificación de un muestreo debe considerar la aplicación de un apropiado diseño estadístico el cual generará información sobre el mínimo número de muestras con un nivel de confianza y un margen de error técnicamente aceptable.

El uso de materiales y equipos no apropiados puede ocasionar una disminución de la concentración o la transformación del plaguicida y por tanto, los resultados obtenidos no serán representativos de la concentración del producto existente en la matriz a la cual queremos analizar, en la presente tesis el diseño de muestreo de las diferentes matrices cítricas se consideraron las normas establecidas por FAO/OMS y el Codex Alimentarius. [93]

Las muestras estuvieron constituidas por naranjas de la variedad valencia y también por sus jugos concentrados después de haber sufrido un proceso de extracción y concentración.

Las muestras fueron recolectadas durante tres temporadas cítricas a intervalos de una semana, correspondiente al mes de octubre y a los años 2012, 2013 y 2014.

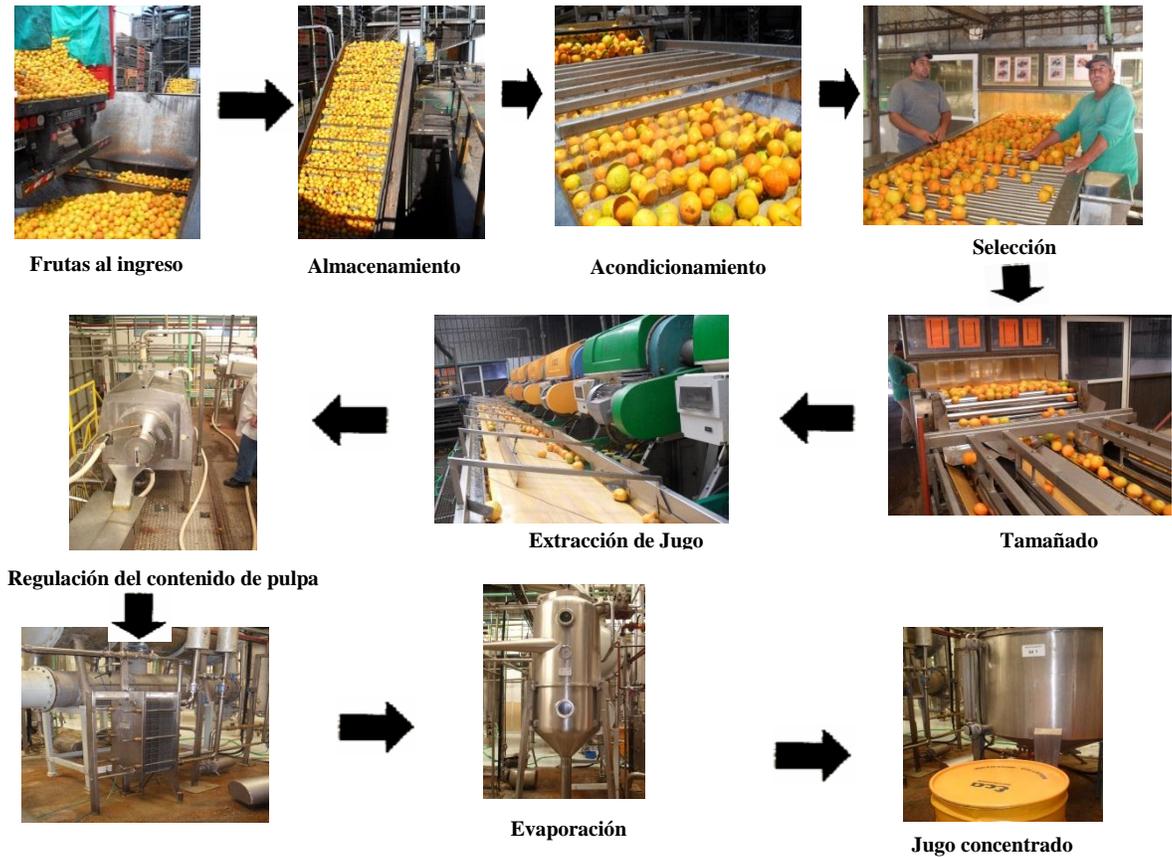
Se seleccionaron los puntos de muestreo inicial y final considerando las diferentes etapas del proceso en la industria, ver en **figura 13**. Según este criterio las muestras fueron identificadas de la siguiente manera:

*Frutas de ingreso* (al ingreso de la línea)

*Jugo concentrado* (a la salida del evaporador de triple efecto)

Para el muestreo de la fruta, se consideró que la misma llega por camión a granel, por lo que se consideró los lotes a procesar los camiones que llegan por cada turno de ocho horas.

Se utilizó un plan de muestreo simple teniendo en cuenta que se debería tomar un porcentaje correspondiente al 1% de la fruta total de cada camión considerando un total de veinte toneladas para cada rodado, realizando un muestreo geométrico que contemple su parte superior, media e inferior. A su vez obtenida esta muestra se procedió a realizar un submuestreo de la misma al quedarnos con solo un 10% del total de sus unidades. Es así que se obtuvieron en total 10 muestras por cada día de muestreo, al durar 12 días en total el plan de muestreo tuvimos un total de 120 muestras.



**Figura 13. Diagrama del proceso general de producción de jugo de naranja – elaboración propia**

Para *Jugos concentrados* el plan de muestreo se realizó en la modalidad de producción-tiempo, ya que se tomaron directamente sobre la línea de producción a intervalos de tiempos iguales aproximadamente 45 minutos, correspondientes al tiempo de procesamiento de la fruta de cada camión volcado, según se observa en **figura 14**. Las mismas se extrajeron a la salida del concentrador hasta alcanzar un volumen total de 500mL de jugo, para cada una de las muestras, recolectándose un total de 120 muestras.

Los jugos concentrados fueron conservados en recipientes de plástico blanco con tapa y contratapa de teflón o aluminio a temperaturas de  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Los blancos de muestra para las diferentes matrices se obtuvieron y conservaron de igual manera.



**Figura 14. Recolección y acondicionamiento de muestras de jugos cítricos concentrados**

### **3.2.- Preparación de las muestras para el análisis en laboratorio**

#### **Submuestreo**

La fruta que llega a laboratorio se sometió a un submuestreo, combinando todas ella en una mezcla homogénea a partir de su tratamiento en procesadora industrial, conservándose en freezer para posteriormente tomar porciones de esta y homogeneizarlas antes de su análisis. El mismo puede verse en sus diferentes etapas en la **figura 15**.



**Figura 15. Preparación y procesamiento de muestras de frutas enteras**

Para las muestras de jugos concentrados no se realizaron tratamientos previos de ya que las mismas fueron enviadas al laboratorio para su análisis en las condiciones que fueron tomadas en la industria.

Todas las muestras incluyendo las de jugos concentrados, fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de plaguicidas de la Sección Química de la Estación Experimental Agroindustrial “Obispo Colombres” (EEAOC), en la ciudad de San Miguel de Tucumán. En un trabajo compartido con personal de dicho laboratorio se procedió a la extracción de los principios activos y cuantificación de carbendazim, procloraz, tiabendazol y clorpirifos.

### **Procedimiento de extracción. Frutas cítricas y jugos concentrados**

El método de extracción para ambos principios activos, fue la de *extracción en fase sólida (SPE)*, en su variante denominada QuEChERS.

Para la extracción de procloraz y clorpirifos se utilizó 10g de muestra, adicionada de hidróxido de sodio hasta llegar a pH = 9 aproximadamente. Posteriormente se adicionó 10ml de acetato de etilo agitando vigorosamente durante un minuto para posteriormente añadir sulfato de magnesio y acetato de sodio y nuevamente se agito durante otro minuto. Posteriormente se centrifugó a 4500rpm recojiéndose el sobrenadante luego de unos cinco minutos.

Para la extracción de carbendazim y tiabendazol se utilizaron 10g de muestra que posteriormente se sometieron a una mezcla de acetonitrilo y ácido acético al 1%. Se adicionaron sulfato de magnesio y acetato de sodio y posteriormente se agitó para homogeneizar durante un minuto. Para clarificar el extracto se centrifugó a 4000rpm durante cinco minutos. Para finalizar la clarificación del extracto se lo sometió a un pasaje por octadecilsilano y aminas primarias y secundarias. En la **figura 16** pueden verse las etapas de dichos procedimientos.



**Figura 16. Procedimiento de extracción de carbendazim y procloraz**

### 3.2.1.- Preparación de estándares

La preparación de las diferentes soluciones patrón involucró contar no solamente con estándares de plaguicidas de marcas reconocidas y certificadas sino también considerar la calidad del solvente empleado que fue acetonitrilo tanto para los estándares de carbendazim como los de procloraz, tiabendazol y carbendazim.

Las concentraciones expresadas en mg por litro fueron.

Para carbendazim y tiabendazol: 0,005; 0,006; 0,007; 0,008; 0,009 y 0,010ppm respectivamente.

Para procloraz: 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 y 0,10ppm respectivamente

Para clorpirifos: 0,025; 0,030; 0,035; 0,040; 0,045 y 0,050 ppm respectivamente

### 3.2.2.- Preparación de muestras adicionadas

Utilizando muestras de frutas enteras y jugos concentrados, cuya trazabilidad y control analítico permitía considerarlos como blancos de muestra, se prepararon las muestras adicionadas a diferentes concentraciones de carbendazim y procloraz.

Se identificaron como *fruta pre adicionada*, a las muestras a las cuales, la adición de los analitos, fue previa al procesamiento de extracción aplicado. Las concentraciones correspondientes fueron:

Para carbendazim: 0,007; 0,008; 0,009; 0,010; 0,020 y 0,050 ppm.

Para procloraz: 0,075; 0,100; 0,150; 0,200; 0,250 ppm.

Las muestras de *fruta post-adicionada* corresponden a aquellas en las que, la adición de los analitos se efectuó al extracto obtenido al final del proceso extractivo, estando las mismas en concentraciones de:

Para carbendazim: 0,005; 0,006; 0,007; 0,008; 0,009 y 0,010ppm.

Para procloraz: 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 y 0,10ppm

Las *muestras adicionadas de jugos* fueron previamente adicionadas, a las siguientes concentraciones:

0,025; 0,075; 0,1; 0,5; 0,75 y 1 ppm para carbendazim, procloraz, tiabendazol y clorpirifos.

Para *muestras post-adicionadas de jugos*, se trabajó en el siguiente intervalo de concentraciones:

0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 y 0,25 ppm para carbendazim

0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3 ppm para procloraz

0,025; 0,075; 0,1; 0,5; 0,75 y 1 ppm para tiabendazol y clorpirifos.

### **3.3.- Condiciones cromatográficas para la identificación de los plaguicidas**

A fin de establecer una metodología adecuada para el análisis cromatográfico, se llevaron adelante numerosas pruebas con la finalidad de lograr las condiciones óptimas de la misma.

Las modificaciones en las distintas pruebas realizadas se basaron fundamentalmente en las temperaturas del inyector y rampas de temperaturas del horno, a fin de obtener la mayor separación de los analitos y adecuadas respuestas cromatográficas.

Establecidas las condiciones cromatográficas, el desarrollo metodológico implicó la determinación de la curva de regresión lineal, intervalos de confianza, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación.

### **3.3.1.- Determinación por Cromatografía Gaseosa con detector de Espectrometría de Masas**

#### Introducción

La cromatografía de gases y su acoplamiento con la espectrometría de masas, ha cobrado en la actualidad una gran relevancia en la consideración de la misma como una técnica que constituye una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas [86].

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas ( $M^+$ ).

El analizador cuadrupolar está formado por cuatro barras metálicas de secciones circulares o hiperbólicas, exactamente rectas y paralelas y dispuestas con gran precisión sobre una circunferencia, de tal forma que el haz de iones procedente de la fuente incida sobre el centro del dispositivo. Sobre estas barras, por pares alternos, se aplica un potencial constante  $V$ , y un potencial alterno de radiofrecuencia superpuestos. Ninguno de estos dos campos eléctricos tienen efecto sobre el movimiento longitudinal de los iones, pero la combinación de los dos campos originan un movimiento lateral complejo.

En consecuencia, la combinación de ambas técnicas, GC y MS, da lugar a la separación e identificación de mezclas complejas. En principio una mezcla de compuestos es inyectada al cromatógrafo de gases y es separada en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de sus componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su espectro de masas.

### 3.3.2.- Determinación por Cromatografía Gaseosa con detector de Espectrometría de Masas tipo simple cuadrupolo (CG-MSD)

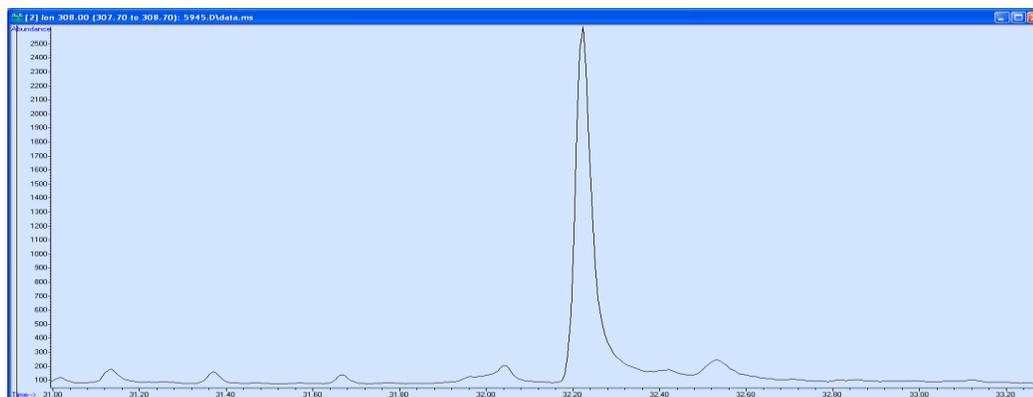
Teniendo en cuenta las características propias de las técnicas combinadas de GC-MS y las características fisicoquímicas de los compuestos en estudio, se seleccionó esta técnica para la separación y cuantificación de procloraz en la matriz fruta entera.

Las condiciones cromatográficas que se establecieron para la determinación de Procloraz fueron las siguientes: temperatura del inyector 280°C en modo splitless, volumen de inyección 1,00 microlitros, gas carrier Helio a 1,0 ml/min, temperatura inicial del horno 70°C por 2min, temperaturas de rampas: 25°C/min hasta 150°C, 3°C/min hasta 200°C, 8°C/min hasta 280°C, permanece en esta temperatura 10min. Modo: Flujo constante. Analizador: Single Monitoring Mode (SIM).

Establecidas las condiciones cromatográficas se identificaron los tiempos de retención para cada analito bajo las condiciones establecidas, resultando:

- Procloraz: monitorea desde los 30 minutos, los iones de m/z 180, 266, 308, 310.

Se cuantifica con el ion de m/z 308. **Figura 17.**



**Figura 17. Identificación de Procloraz por GC-MS**

### 3.3.3.- Determinación por Cromatografía Líquida con doble detección de masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS)

#### Introducción

La cromatografía de líquidos es la técnica de separación más comúnmente utilizada para llevar a cabo la separación y determinación de los plaguicidas en matrices alimentarias, ya

que a diferencia de la cromatografía de gases no requiere una etapa de derivatización previa a su inyección en el sistema cromatográfico. Si se combina la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas el resultado es una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad. En las últimas décadas ha sido una de las técnicas analíticas que más se ha extendido en el campo de la química analítica aplicada al medio ambiente, alimentos y salud. La MS se ha presentado como la posibilidad analítica de alcanzar una elevadísima sensibilidad, incluso hasta niveles de picogramos/Litro, debido a su altísima especificidad. Además, presenta la habilidad única de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación. Incluso, ha sido posible aplicar todas esas cualidades en muestras de alta complejidad.

Se seleccionó esta técnica para la separación y cuantificación de Prochloraz y Carbendazim en la matriz jugos concentrados; Carbendazim en fruta entera. Para ello se establecieron las condiciones, según se detalla a continuación: Temperatura del horno 40°C, composición de la fase móvil: A, agua/metanol (90:10) + 5mM formiato de amonio) y B, metanol/agua (90:10) + 5mM formiato de amonio. Flujo total: 0,4 ml/min. En la **tabla 5** se puede observar el programa diseñado para el trabajo de bomba y la dosificación de la fase móvil.

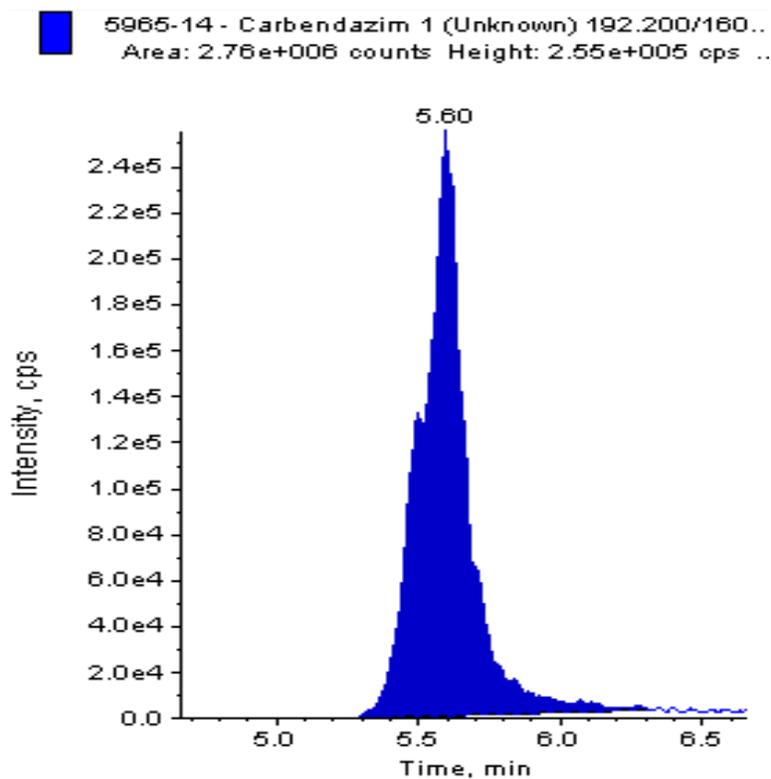
Tiempo	Evento	Concentración (%)
0.01	Bomba Fase B	0.0
1.00	Bomba Fase B	0.0
15.00	Bomba Fase B	100
18.00	Bomba Fase B	100
18.05	Bomba Fase B	0.0
20.00	Bomba Fase B	0.0
20.01	Stop	

**Tabla 5. Programa de fase móvil**

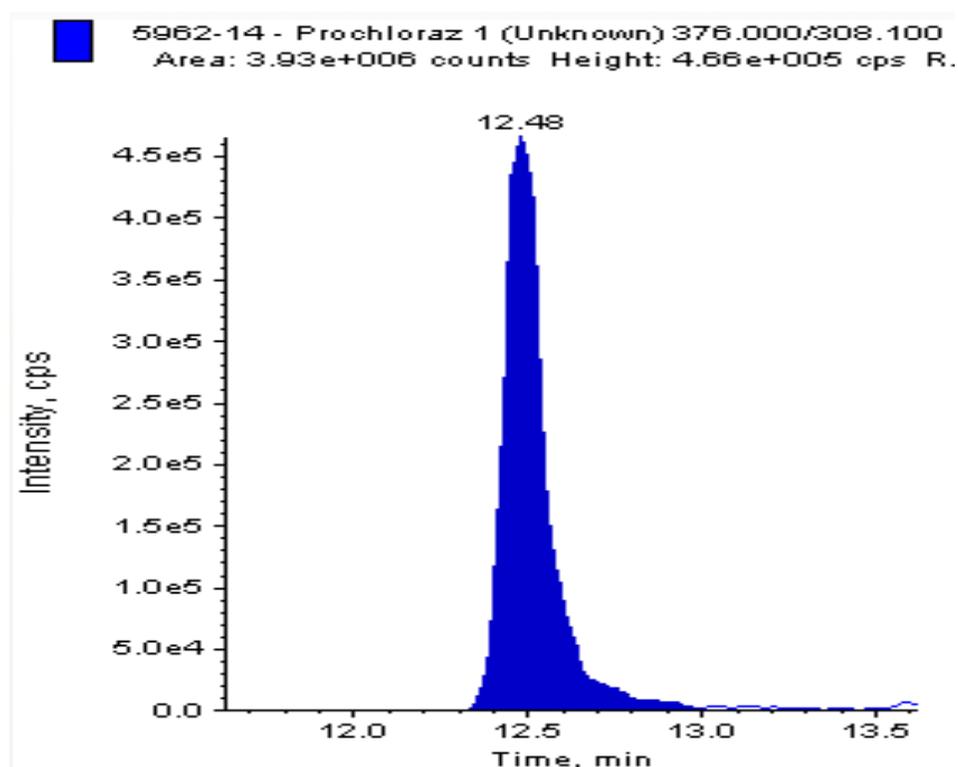
Establecidas las condiciones cromatográficas, los analitos se identificaron según detalla a continuación en **tabla 6. Figuras 18 y 19 respectivamente.**

Compuesto	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Tiempo (min)	Parámetro	Valor
Carbendazim1	192.2	160.2	5.7	DP	76
				EP	4,5
				CE	27
				CXP	4
Carbendazim2	192.2	132.1	5.7	DP	76
				EP	4,5
				CE	41
				CXP	4
Prochloraz1	376	308.1	12.3	DP	64
				EP	7,5
				CE	17
				CXP	6
Prochloraz2	376	69.9	12.3	DP	64
				EP	7,5
				CE	43
				CXP	4
				CE	35
				CXP	4

**Tabla 6. Características de identificación para Prochloraz y Carbendazim por (LC-MS/MS) - DP: Declustering Potential- EP: Entrance Potential- CE: Collision Energy- CXP: Collision Cell Exit Potential**



**Figura 18. Identificación por (LC-MS/MS): Carbendazim**



**Figura 19. Identificación por (LC-MS/MS): Prochloraz**

### 3.4.- Análisis estadísticos de los resultados

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante software Statgraphics Centurión XV, versión 15.2.06 [94, 95]. Los datos proporcionados por el método adoptado permiten la identificación de los analitos y su separación de las sustancias interferentes, además de lograr establecer el nivel mínimo de concentración de cada analito que puede ser medido y determinar la precisión y exactitud de la medición. [96, 95]

Al aplicar el análisis de regresión lineal se determinó la independencia y normalidad de los residuos a partir de los estadísticos Durbin Watson y Kolmogorov para un nivel de confianza del 95 %.

Se establecieron la ecuación de la recta y el estadístico  $R^2$  indicando la relación entre las variables (respuestas cromatográficas vs. concentración).

La precisión del sistema evaluó la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar y para la del método se analizó la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. [97]

Los parámetros que evaluaron la sensibilidad de los métodos son los Límites de detección y de cuantificación, los cuales se estimaron a partir de las curvas de regresión, para bajas concentraciones de los analitos, para  $n=30$  determinaciones individuales y  $\alpha=0,05$ . De dichas curvas se determinó la pendiente y por extrapolación a concentración cero, se obtuvo un estimado de las respuestas del blanco.

# Capítulo III

## RESULTADOS

Esta metodología tuvo como objetivo desarrollar técnicas cromatográficas para la identificación y cuantificación de los diferentes plaguicidas, las mismas arrojaron datos para su adecuada validación. Para ello se procedió al análisis estadístico de todos los resultados obtenidos para las diferentes matrices a través del software Statgraphics Centurión XV.

Se determinaron los parámetros estadísticos correspondientes, los cuales incluyen las medidas de tendencia central, medidas de variabilidad, y medidas de forma, los coeficientes de asimetría y curtosis estandarizados para determinar si la muestra procede de una distribución normal. Los valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican alejamiento significativo de normalidad que tendería a invalidar cualquier test estadístico con respecto a la desviación normal. En todos los casos, el valor del coeficiente de asimetría estandarizado y del coeficiente de curtosis obtenido está dentro del rango esperado para los datos de una distribución normal.

La evaluación de linealidad se realizó tanto con soluciones patrón como con muestras fortificadas. Las concentraciones obtenidas fueron contrastadas con el valor de concentración a la cual fue realizada la fortificación. En cada caso se aplicó la regresión lineal y se determinaron la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación. En todos los casos se considero el p-valor en la tabla ANOVA, inferior a 0,05, lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre la respuesta cromatográfica expresada en área de pico y la concentración del estándar y/o muestras fortificadas para un nivel de confianza del 95%. Para todos los casos, se determinó la independencia de los residuos, a partir del estadístico Darwin Watson con un P-valor menor a 0,05 y del test de Kolmogorov con un P- valor mayor a 0,05, se considera la distribución normal de los mismos, para un nivel de 95% de confianza. A este nivel de confianza podemos concluir que existe una correlación lineal entre las concentraciones y las respuestas cromatográficas expresadas como áreas.

La estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad se baso en un esquema de solución de estándar y de muestras fortificadas con diez repeticiones. Todas las repeticiones fueron procesadas por un analista el mismo día y en idénticas condiciones cromatográficas. Para evaluar la precisión, se calcularon los valores de desviación estándar y de coeficiente de variación porcentual. Se informan los valores del sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada para evaluar si los datos provienen de una distribución normal.

El desarrollo de las técnicas cromatográficas permitieron, además, evaluar la persistencia de los residuos de plaguicidas y analizar la posible correlación resultante entre los niveles residuales de plaguicidas obtenidos a partir de frutas enteras que ingresan a la industria y de jugos concentrados obtenidos a partir de las mismas.

A continuación se detallan el desarrollo de cada una de las técnicas cromatográficas, tanto para la matriz fruta entera de citrus como para la matriz jugos cítricos concentrados.

#### 4.1.- Desarrollo y validación por Cromatografía Gaseosa con detector de Espectrometría de Masas tipo simple cuadrupolo (CG-MSD) para la determinación de procloraz en la matriz fruta entera para citrus.

##### 4.1.1.- Procloraz

Determinación de parámetros estadísticos

Los resultados del análisis unidimensional para soluciones de estándares y de muestras de frutas preadicionadas y posadicionadas con procloraz se detallan en las tablas 11, 12 y 13, respectivamente:

Estándares (mg/kg)	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
Área Media	2517	3045	3505	3970	4480	5034
Desviación típica	67,77	48,88	57,53	97,97	83,66	50,38
Mínimo	2407	2980	3440	3850	4400	5000
Máximo	2610	3105	3590	4080	4620	5130
Rango	203	125	150	230	220	130
Coef. de variación	2,69 %	1,60 %	1,64 %	2,46 %	1,86 %	1,00%

Tabla 11. Análisis estadístico unidimensional Soluciones de estándares.

Adiciones (mg/kg)	0,075	0,1	0,15	0,2	0,25
Área Media	5527	6847	10789	14375	17975
Desviación típica	8,42	12,55	6,92	16,08	15,92
Mínimo	5518	7160	10777	14355	17950
Máximo	5538	7192	10796	14390	17990
Rango	20	32	19	35	40
Coef. de variación	0,15 %	0,17 %	0,06 %	0,11 %	0,08%

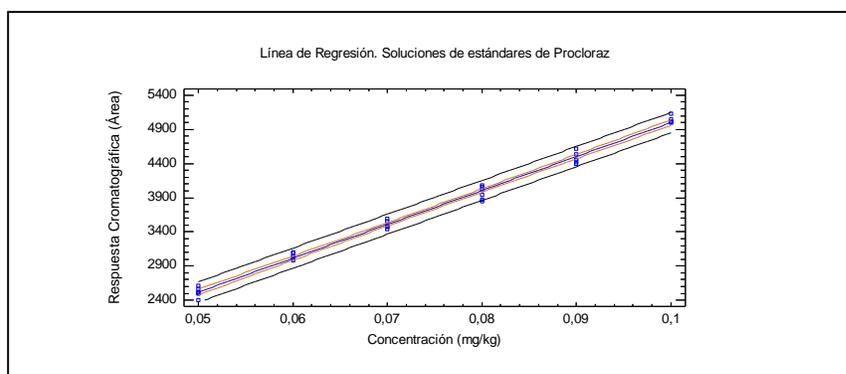
Tabla 12. Análisis estadístico unidimensional-Fruta preadicionada.

<b>Adiciones (mg/kg)</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b>0,1</b>
<b>Área Media</b>	2767	3145	3939	4820	5533	6338
<b>Desviación típica</b>	5,08	33,47	30,62	35,81	1,83	25,09
<b>Mínimo</b>	2763	3084	3910	4803	5531	6326
<b>Máximo</b>	2777	3185	3995	4893	5536	6389
<b>Rango</b>	14	101	85	90	5	63
<b>Coef. de variación</b>	0,18 %	1,06 %	0,77 %	0,74 %	0,03 %	0,39 %

**Tabla 13.** Análisis estadístico unidimensional-Fruta posadicionada.

#### 4.1.2.- Linealidad

En la figura 31 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en soluciones de estándares de procloraz.



**Figura 31.** Regresión Lineal solución de estándar

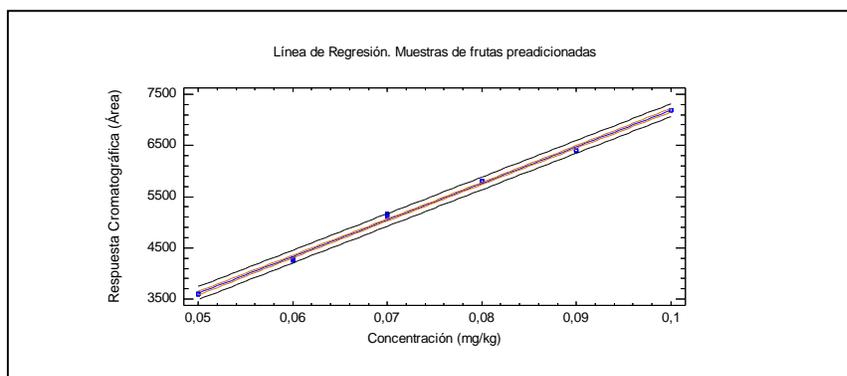
La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 39,5714 + 49585,7 * \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (4)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,34 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,996695, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 71,025.

En la figura 32 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en soluciones de muestras preadicionadas con procloraz.



**Figura 32.** Regresión Lineal muestra de fruta entera preadicionada

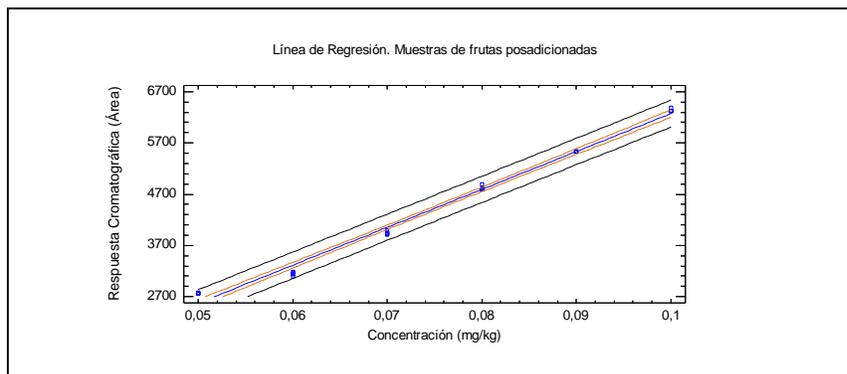
La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 46,7619 + 71397,6 * \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (5)$$

Dónde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,7736 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,998867, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 59,7738.

En la figura 33 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en soluciones de muestras preadicionadas con procloraz.



**Figura 33.** Regresión Lineal muestra de fruta entera posadicionada

La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = -1125,37 + 73988,6 * \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (6)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

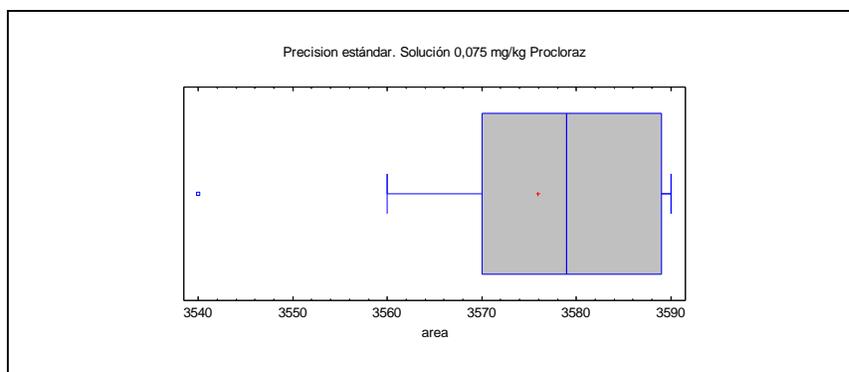
El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,0992 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,995486, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 123,962.

#### 4.1.3.- Precisión

Se determino para soluciones de estándares, muestras de fruta preadicionadas y posadicionadas, se detallan en tabla 14.

	<b>Solucion e estándar de procloraz 0,075 mg/kg</b>	<b>Muestra fruta preadicionada 0,1 mg/kg</b>	<b>Muestra fruta posadicionada 0,075 mg/kg</b>
<b>Frecuencia</b>	10	10	10
<b>Área Media</b>	3575	7183	3981
<b>Desviación típica</b>	15,95	11,07	13,18
<b>Mínimo</b>	3540	7160	3958
<b>Máximo</b>	3590	7192	3995
<b>Rango</b>	50	32	37
<b>Coefficiente de variación</b>	0,45 %	0,15 %	0,33 %
<b>Sesgo Estandarizado</b>	-1,81877	-1,63125	-0,994906
<b>Curtosis Estandarizada</b>	1,22185	0,387806	-0,526929

**Tabla 14.** Precisión de estándar y muestras de frutas adicionadas

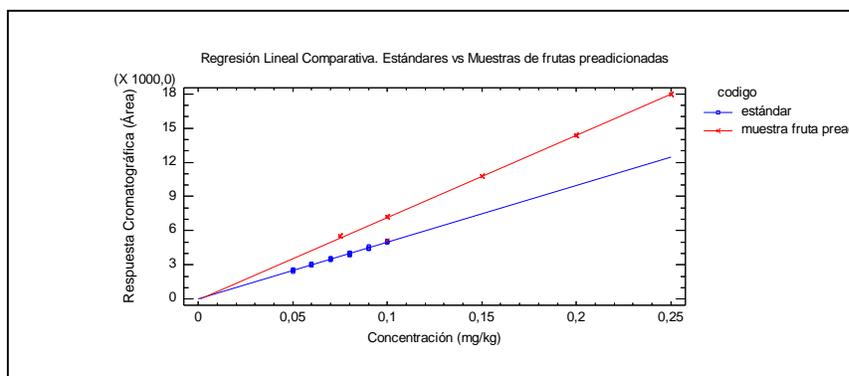


**Figura 34.** Precisión procloraz

### Comparación de líneas de regresión

A partir de las curvas de regresión determinadas para soluciones de estándares y muestras de frutas pre y pos adicionadas, se representa en las figuras 35 y 36 las comparaciones respectivas.

Las ecuaciones 4 y 5 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 35.



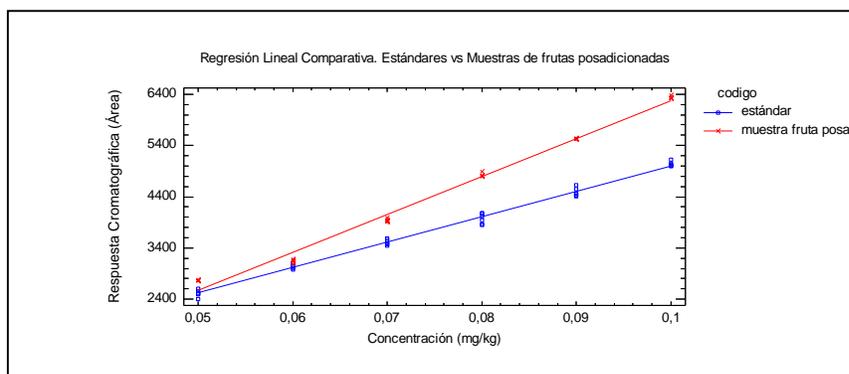
**Figura 35.** Rectas de regresión Estándares vs. Muestras de frutas preadionadas

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,7135 % de la variabilidad en áreas. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,6997 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 268,081.

Dado que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el valor-P para las pendientes y para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de soluciones de estándares y muestras de frutas preadicionadas con un nivel de confianza del 99%.

Las ecuaciones 4 y 6 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 36.



**Figura 36.** Rectas de regresión Estándares vs. Muestras de frutas posadicionadas

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,2453 % de la variabilidad en áreas. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,212 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 101,023.

Dado que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el valor-P para las pendientes y para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de soluciones de estándares y muestras de frutas preadicionadas con un nivel de confianza del 99%.

#### 4.1.4.- Límites de Detección y Cuantificación

A partir de las curvas de regresión para frutas adicionadas a bajas concentraciones,  $\alpha = 0.05$  y  $n = 5$ , se determinaron los límites de detección y cuantificación, siendo los mismos de 0,005 y 0,010 mg/kg respectivamente.

Del análisis estadístico de los resultados antes detallados, podemos concluir que el método es factible de ser aplicado a las muestras procedentes de la industria, a fin de determinar la carga inicial de residuos de procloraz en la fruta que ingresa a la línea de producción.

#### 4.2.- Desarrollo y validación por Cromatografía Líquida con doble detección de masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS) para la determinación de carbendazim en la matriz fruta entera para citrus.

##### 4.2.1.- Carbendazim

Determinación de parámetros estadísticos.

Los resultados del análisis unidimensional para soluciones de estándares y de muestras de frutas preadicionadas y posadicionadas de carbendazim se detallan en las tablas 15, 16 y 17, respectivamente.

Estándares (mg/kg)	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,01
Área Media	1004500	1219390	1419600	1626031	1827000	2032500
Desviación típica	852,50	4,91	210,43	4,27	4919,35	1126,05
Mínimo	1003445	1219387	1419430	1626027	1817200	2030500
Máximo	1005975	1219400	1420000	1626039	1830300	2033700
Rango	2530	13	570	12	13100	3200
Coef. de variación	0,08 %	0,0004 %	0,015 %	0,0003 %	0,27 %	0,05 %

**Tabla 15.** Análisis estadístico unidimensional. Soluciones de estándares.

Adiciones (mg/kg)	0,007	0,008	0,009	0,01	0,02	0,05
Área Media	2032358	2321887	2612426	2904119	5807049	14517515
Desviación típica	1085,52	1851,05	1415,48	920,94	539,77	1171,17
Mínimo	2031217	2319667	2610346	2902650	5806530	14516330
Máximo	2033663	2324017	2614370	2904724	5807576	14519350
Rango	2446	4350	4024	2074	1046	3020
Coef. de variación	0,053 %	0,079 %	0,054 %	0,032 %	0,009 %	0,008 %

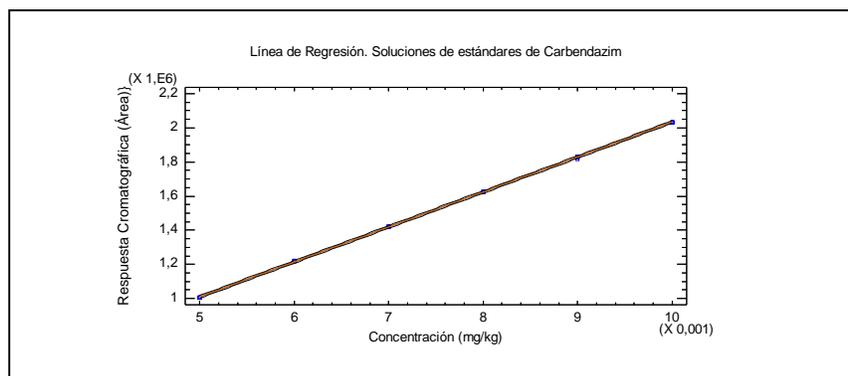
**Tabla 16.** Análisis estadístico unidimensional. Fruta preadicionada.

Adiciones (mg/kg)	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,01
Área Media	1375797	1656899	1932923	2207258	2488738	2762606
Desviación típica	4488,45	1458,39	1211,06	1169,04	5915,27	1474,27
Mínimo	1370918	1655081	1931256	2205425	2482590	2760799
Máximo	1381800	1659033	1934256	2208425	2496590	2764789
Rango	10882	3952	3000	3000	14000	3990
Coef. de variación	0,33 %	0,09 %	0,06 %	0,05 %	0,23 %	0,05 %

**Tabla 17.** Análisis estadístico unidimensional. Fruta posadicionada.

#### 4.2.2.- Linealidad

En la figura 37 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en soluciones de estándares de carbendazim.



**Figura 37.** Regresión Lineal solución de estándar

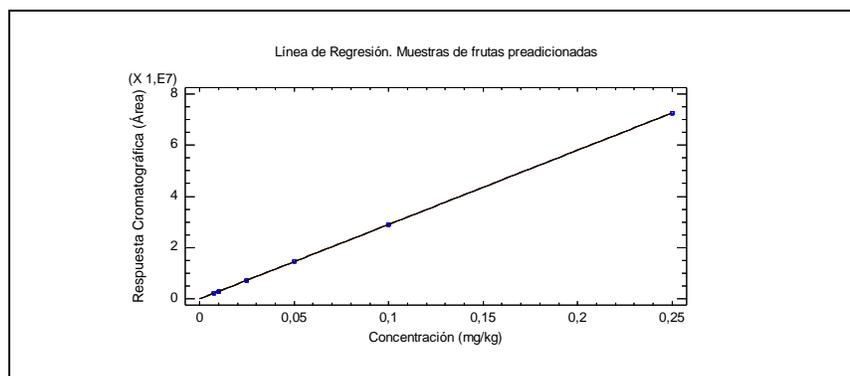
La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = -14766,6 + 2,04836E8 * \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (7)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9889 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,999945, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 3790,84.

En la figura 38 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de frutas preadicionadas con carbendazim.



**Figura 38.** Regresión Lineal muestra de fruta entera preadicionada

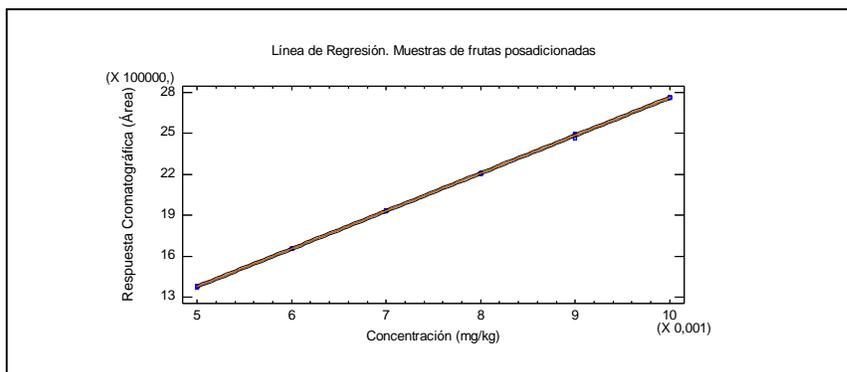
La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 8967,82 + 2,90302E8 * \text{concentración muestra de fruta preadicionada (mg/kg)} \quad (8)$$

Dónde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9999 % de la variabilidad en altura. El coeficiente de correlación es igual a 1,0, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 23353,7.

En la figura 39 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de frutas posadicionadas con carbendazim.



**Figura 39.** Regresión Lineal muestra de fruta entera posadicionada

La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = -6163,74 + 2,76797E8 * \text{concentración muestra de fruta posadicionada (mg/kg)} \quad (9)$$

Dónde y representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9863 % de la variabilidad en altura. El coeficiente de correlación es igual a 0,999932, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 5689,62.

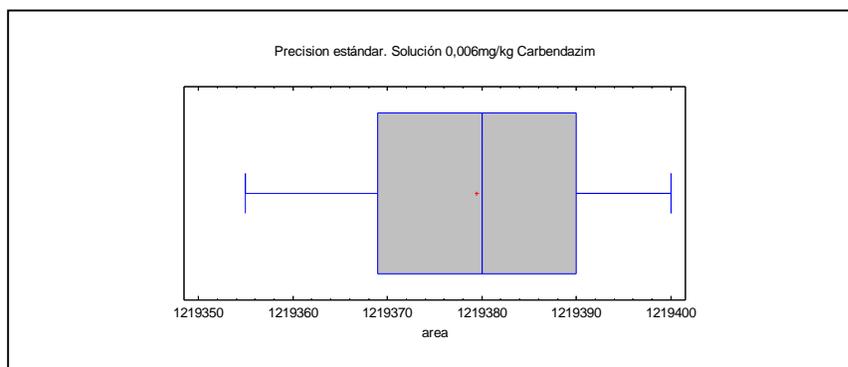
#### 4.2.3.- Precisión

Se determino para soluciones de estándares, muestras de fruta preadicionadas y posadicionadas, se detallan en tabla 18.

	<b>Solucion estandar de carbendazim 0,006 mg/kg</b>	<b>Muestra fruta preadicionada 0,05 mg/kg</b>	<b>Muestra fruta posadicionada 0,006 mg/kg</b>
<b>Frecuencia</b>	10	10	10
<b>Área Media</b>	1219379	14517277	1656574
<b>Desviación típica</b>	14,01	568,87	1164,92
<b>Mínimo</b>	1219355	14516330	1655081
<b>Máximo</b>	1219400	14517865	1659033
<b>Rango</b>	46	1535	3952
<b>Coefficiente de variación</b>	0,001 %	0,004 %	0,07 %
<b>Sesgo Estandarizado</b>	-0,259692	-1,21355	1,61551
<b>Curtosis Estandarizada</b>	-0,423591	-0,372197	0,783915

**Tabla 18.** Precisión de estándar y muestras de frutas adicionadas

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal.

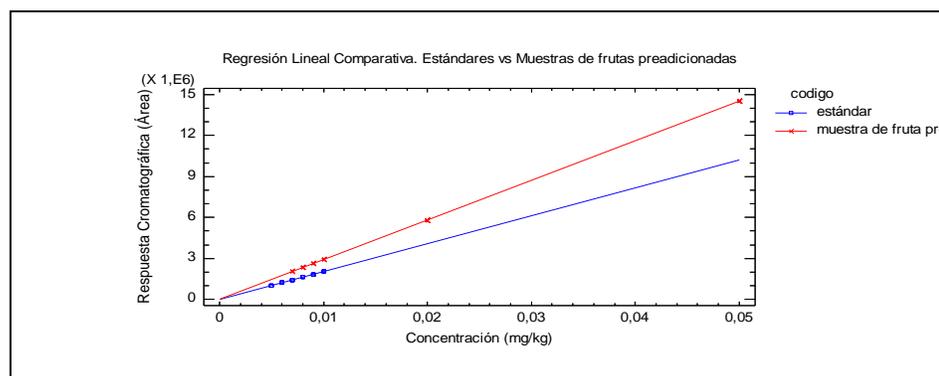


**Figura 40.** Precisión carbendazim

#### Comparación de líneas de regresión

A partir de las curvas de regresión determinadas para soluciones de estándares y muestras de frutas pre y pos adicionadas, se representa en las figuras 41 y 42 las comparaciones respectivas.

Las ecuaciones 10 y 11 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 41.



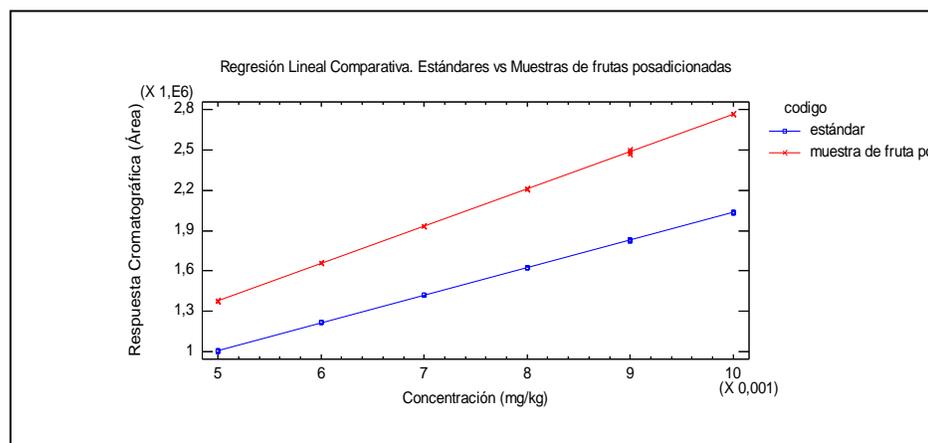
**Figura 41.** Rectas de regresión Estándares vs. Muestras de frutas preadicionadas

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,999 % de la variabilidad en áreas. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,998 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 2625,84.

Dado que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el valor-P para las pendientes y para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de soluciones de estándares y muestras de frutas preadicionadas con un nivel de confianza del 99%.

Las ecuaciones 12 y 13 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 42.



**Figura 42.** Rectas de regresión Estándares vs. Muestras de frutas posadicionadas

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,9911 % de la variabilidad en áreas. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,9907 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 4834,37.

Dado que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el valor-P para las pendientes y para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de soluciones de estándares y muestras de frutas preadicionadas con un nivel de confianza del 99%.

El efecto matriz es significativo, según podemos observar, lo que implica que, en la determinación de carbendazim en muestras reales de frutas, es necesario efectuar un blanco de muestra y muestras adicionadas a fin de establecer la curva de linealidad correspondiente.

#### 4.2.4.- Límites de Detección y Cuantificación

A partir de las curvas de regresión para frutas adicionadas a bajas concentraciones,  $\alpha = 0.05$  y  $n = 5$ , se determinaron los límites de detección y cuantificación, siendo los mismos de 0,005 y 0,010 mg/kg respectivamente.

Del análisis estadístico de los resultados antes detallados, podemos concluir que el método es factible de ser aplicado a las muestras procedentes de la industria, a fin de determinar la carga inicial de residuos de carbendazim en la fruta que ingresa a la línea de producción.

### 4.3.- Desarrollo y validación por Cromatografía Gaseosa con doble detección de masas tipo triple cuadrupolo (GC-MS/MS) para la determinación de clorpirifos en la matriz jugos cítricos concentrados.

#### 4.3.1.- Clorpirifos

Determinación de parámetros estadísticos.

Los resultados del análisis unidimensional para soluciones de estándares y de muestras de jugos cítricos concentrados adicionadas con clorpirifos se detallan en las tablas 23 y 24, respectivamente.

Estándares (mg/kg)	0,025	0,03	0,035	0,04	0,045	0,05
Área Media	1450	1700	2005	2242	2507	2844
Desviación típica	32	31,78	38,21	30,44	42,52	30,53
Mínimo	1400	1650	1950	2200	2450	2797
Máximo	1480	1730	2055	2280	2572	2873
Rango	80	80	105	80	122	76
Coef. de variación	2,19 %	1,87 %	1,90 %	1,35 %	1,70 %	1,07%

**Tabla 23.** Análisis estadístico unidimensional. Soluciones de estándares.

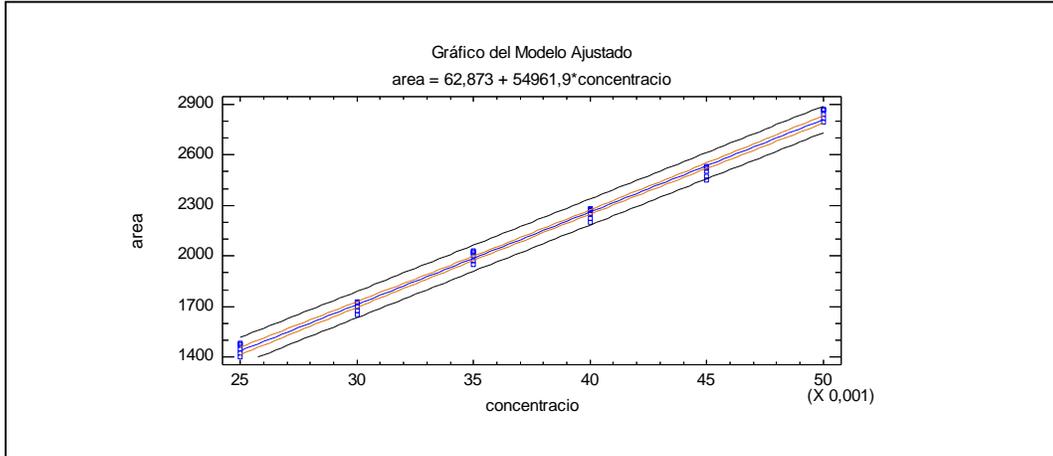
Adiciones (mg/kg)	0,035	0,04	0,045	0,05	0,07	0,1
Área Media	2177	2498	2803	3161	4273	6121
Desviación típica	62,03	53,85	64,15	66,97	9,42	6,14
Mínimo	2077	2423	2700	3059	4258	6112
Máximo	2233	2577	2878	3234	4282	6130

<b>Rango</b>	156	154	178	175	24	18
<b>Coef. de variación</b>	2,85 %	2,15 %	2,28 %	2,11 %	0,22 %	0,10%

**Tabla 24.** Análisis estadístico unidimensional. Muestras de jugos adicionadas.

#### 4.3.2.- Linealidad

En la figura 48 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en soluciones de estándares de clorpirifos.



**Figura 48.** Regresión Lineal solución de estándar

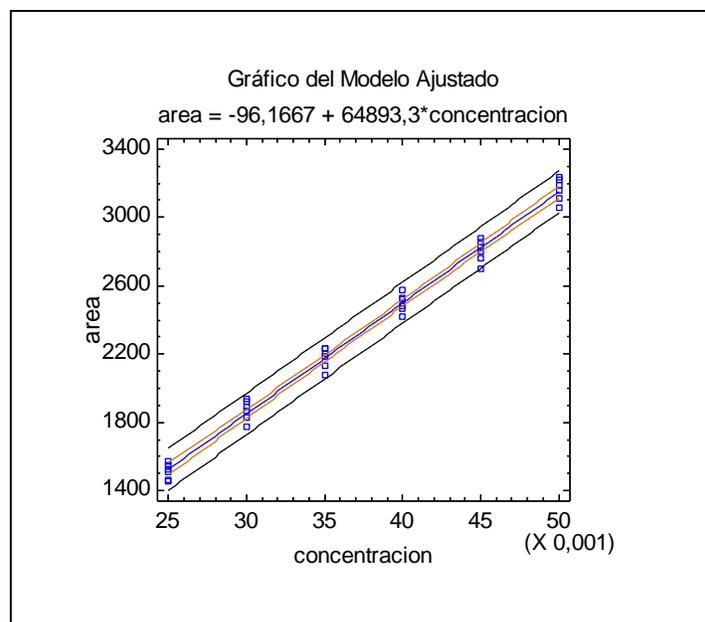
La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 62,873 + 54961,9 * \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (20)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,3997 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,996994, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 37,5285.

En la figura 49 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de jugos concentrados adicionadas con clorpirifos.



**Figura 49.** Regresión Lineal muestra de jugo adicionada

La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = -96,1667 + 64893,3 \cdot \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (21)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 98,9717 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,994845, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 58,1209.

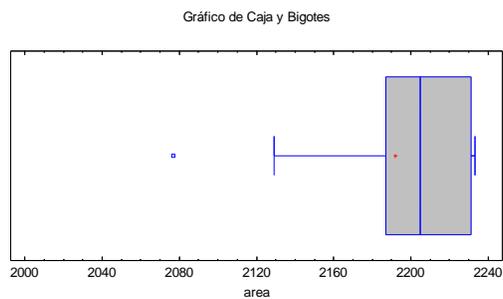
#### 4.3.3.- Precisión

Se determinó para soluciones de estándares y muestras de aceites adicionadas, se detallan en tabla 24.

	<b>Solucion estandar de clorpirifos 0,03 mg/kg</b>	<b>Muestra jugo adicionada 0,035 mg/kg</b>
<b>Frecuencia</b>	10	10
<b>Área Media</b>	13594	2191
<b>Desviación típica</b>	242,25	51,62
<b>Mínimo</b>	13289	2077
<b>Máximo</b>	13866	2233
<b>Rango</b>	577	156
<b>Coefficiente de variación</b>	1,78 %	2,35 %
<b>Sesgo Estandarizado</b>	-0,00607494	-1,94955
<b>Curtosis Estandarizada</b>	-1,504	1,16187

**Tabla 24.** Precisión de estándar y muestras de jugo adicionadas

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal.

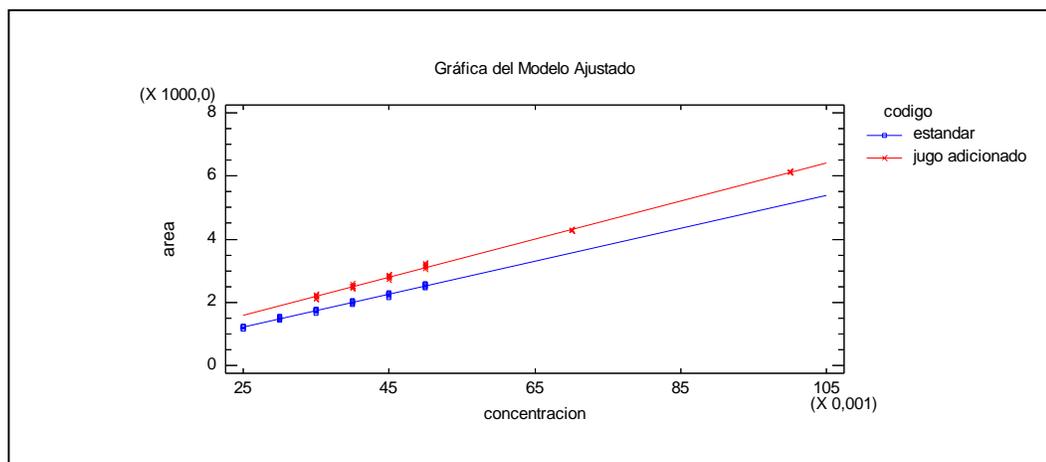


**Figura 50.** Precisión clorpirifos

### Comparación de líneas de regresión

A partir de las curvas de regresión determinadas para soluciones de estándares y muestras de jugos adicionadas, se representa en la figura 51 las comparaciones respectivas.

Las ecuaciones 22 y 23 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 51.



**Figura 51.** Rectas de regresión Estándares vs. Muestras de jugo adicionadas

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,8491% de la variabilidad en áreas. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,8424 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 51,675.

Dado que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el valor-P para las pendientes y para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de soluciones de estándares y muestras de jugo preadicionadas con un nivel de confianza del 99%.

#### 4.3.4.- Límites de Detección y Cuantificación

A partir de las curvas de regresión para muestras de jugos concentrados adicionadas a bajas concentraciones,  $\alpha = 0.05$  y  $n = 5$ , se determinaron los límites de detección y cuantificación, siendo los mismos de 0,005 y 0,010 mg/kg respectivamente.

Del análisis estadístico de los resultados antes detallados, podemos concluir que el método es factible de ser aplicado a las muestras procedentes de la industria, a fin de determinar la carga inicial de residuos de clorpirifos en los jugos cítricos concentrados obtenido en la línea de producción.

#### **4.4.-Desarrollo y validación por Cromatografía Líquida con doble detección de masas tipo triple cuadrupolo (LC-MS/MS) para la determinación de procloraz, carbendazim y tiabendazole en la matriz jugos cítricos concentrados.**

##### 4.4.1.- Procloraz

Determinación de parámetros estadísticos.

Los resultados del análisis unidimensional para soluciones de estándares y de muestras de jugos concentrados adicionadas con procloraz se detallan en las tablas 25 y 26, respectivamente.

<b>Estándares (mg/kg)</b>	<b>0,005</b>	<b>0,006</b>	<b>0,007</b>	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,01</b>
<b>Área Media</b>	656198	797508	918771	1049884	1161243	1312489
<b>Desviación típica</b>	23005,45	23010,61	23043,61	23010,70	22993,25	23089,14
<b>Mínimo</b>	621288	762532	883750	1014905	1126282	1277433
<b>Máximo</b>	686122	827475	948849	1079850	1191190	1342499
<b>Rango</b>	64834	64943	65099	64945	64908	65066
<b>Coef. de variación</b>	3,50 %	2,88 %	2,50 %	2,19 %	1,98 %	1,76 %

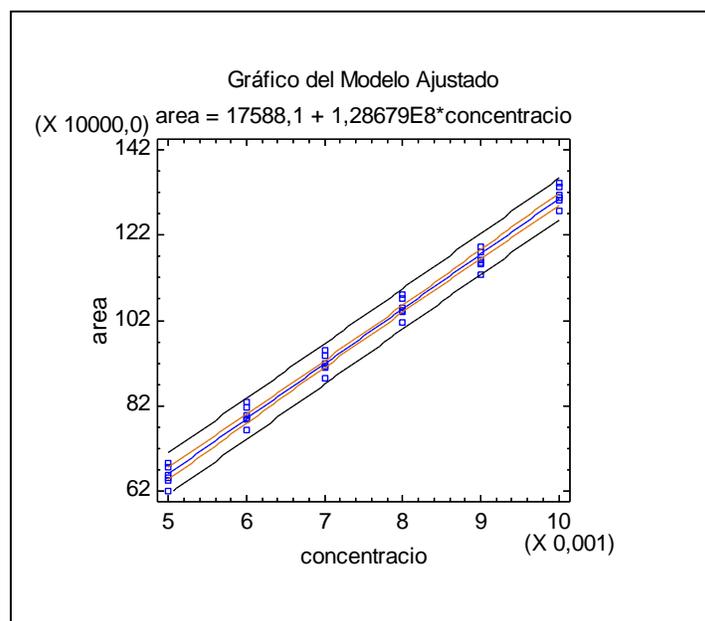
**Tabla 25.** Análisis estadístico unidimensional. Soluciones de estándares.

<b>Adiciones (mg/kg)</b>	<b>0,007</b>	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,010</b>	<b>0,020</b>	<b>0,050</b>
<b>Área Media</b>	1020833	1196545	1312527	1498317	2981649	7215645
<b>Desviación típica</b>	24313,82	24417,15	24307,07	24259,12	48275,59	91049,51
<b>Mínimo</b>	980768	1156503	1272500	1458379	2902174	7055631
<b>Máximo</b>	1045878	1221980	1337510	1523309	3031384	7276431
<b>Rango</b>	65110	65477	65010	64930	129210	220800
<b>Coef. de variación</b>	2,38 %	2,04 %	1,85 %	1,62 %	1,62 %	1,26 %

**Tabla 26.** Análisis estadístico unidimensional. Muestras de jugos adicionadas.

#### 4.4.2.- Linealidad

En la figura 52 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en soluciones de estándares de procloraz.



**Figura 52.** Regresión Lineal solución de estándar

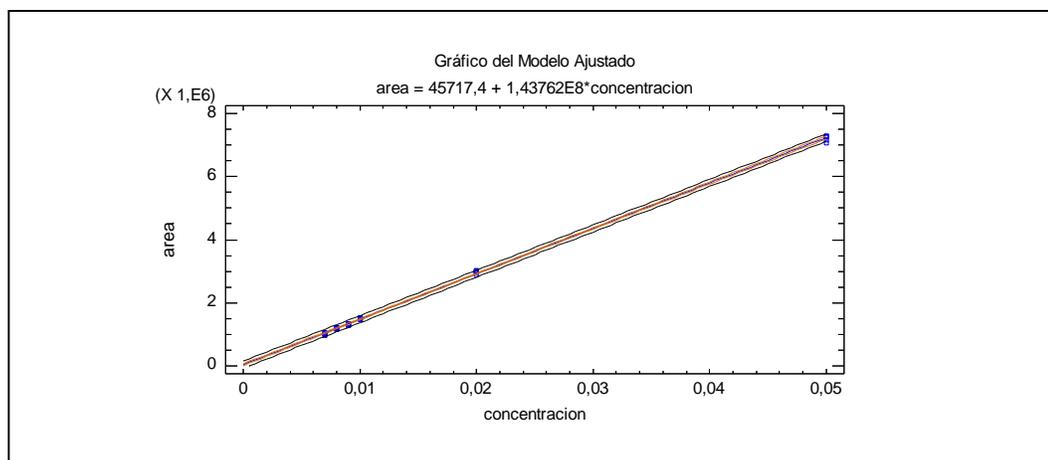
La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 17588,1 + 1,28679E8 * \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (22)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 98,9691% de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,994832, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 23079,6.

En la figura 53 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de jugos cítricos concentrados adicionadas con procloraz.



**Figura 53.** Regresión Lineal muestra de jugos adicionada

La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 45717,4 + 1,43762E8 \cdot \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (23)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,9417 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,999709, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 54396,6.

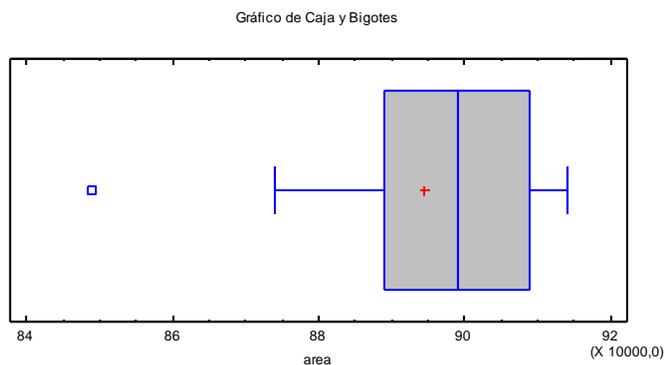
#### 4.4.3.- Precisión

Se determinó para soluciones de estándares y muestras jugos concentrados adicionadas, se detallan en tabla 27.

	<b>Solucion estandar de procloraz 0,006 mg/kg</b>	<b>Muestra jugo adicionada 0,01 mg/kg</b>
<b>Frecuencia</b>	10	10
<b>Área Media</b>	894572	1503808
<b>Desviación típica</b>	20480,31	20450,18
<b>Mínimo</b>	849000	1458379
<b>Máximo</b>	914077	1523309
<b>Rango</b>	65077	64930
<b>Coefficiente de variación</b>	2,29 %	1,36 %
<b>Sesgo Estandarizado</b>	-1,72146	-1,71069
<b>Curtosis Estandarizada</b>	1,09702	1,0776

**Tabla 27.** Precisión de estándar y muestras de jugos adicionadas

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal.

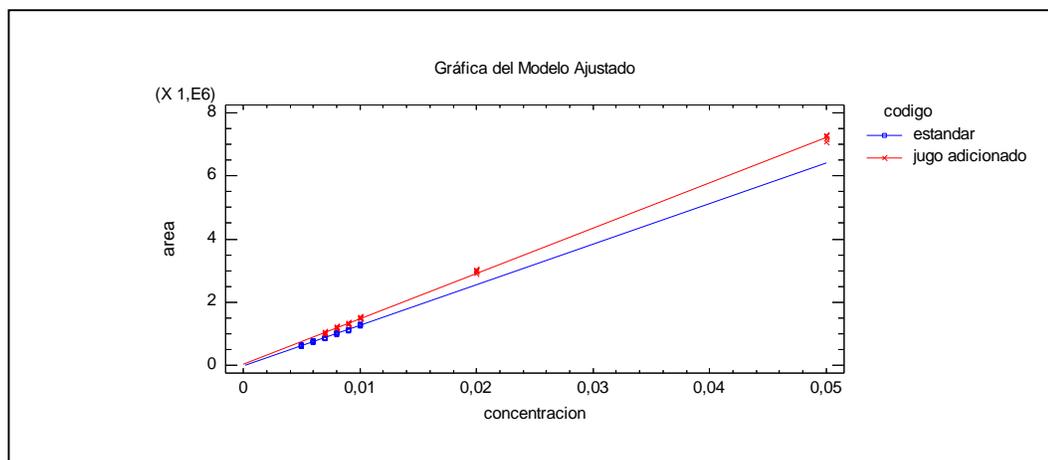


**Figura 54.** Precisión Procloraz

### Comparación de líneas de regresión

A partir de las curvas de regresión determinadas para soluciones de estándares y muestras de jugo concentrado adicionadas, se representa en la figura 55 las comparaciones respectivas.

Las ecuaciones 24 y 25 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 55.



**Figura 55.** Rectas de regresión Estándares vs. Muestras de jugo adicionadas

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,9465% de la variabilidad en áreas. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,9441%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 41622,2.

Dado que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el valor-P para las pendientes y para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de soluciones de estándares y muestras de jugos concentrados adicionadas con un nivel de confianza del 99%.

#### 4.4.4.- Límites de Detección y Cuantificación

A partir de las curvas de regresión para muestras de jugos concentrados adicionadas a bajas concentraciones,  $\alpha = 0.05$  y  $n = 5$ , se determinaron los límites de detección y cuantificación, siendo los mismos de 0,005 y 0,010 mg/kg respectivamente.

Del análisis estadístico de los resultados antes detallados, podemos concluir que el método es factible de ser aplicado a las muestras procedentes de la industria, a fin de determinar la carga inicial de residuos de procloraz en jugos cítricos concentrados obtenido en la línea de producción.

#### 4.4.5.- Carbendazim

Determinación de parámetros estadísticos.

Los resultados del análisis unidimensional para soluciones de estándares y de muestras de jugo concentrado adicionadas con carbendazim se detallan en las tablas 28 y 29, respectivamente.

Estándares (mg/kg)	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,010
Área Media	1333625	1670337	1879366	2169824	2419822	2687218
Desviación típica	75838,31	75830,933	75841,28	75813,19	75839,57	75832,33
Mínimo	1233600	1570320	1779365	2069877	2319845	2587212
Máximo	1433636	1770322	1979390	2269805	2519844	2787270
Rango	200036	200002	200025	199928	199999	200058
Coef. de variación	5,68 %	4,54 %	4,03 %	3,49 %	3,13 %	2,82 %

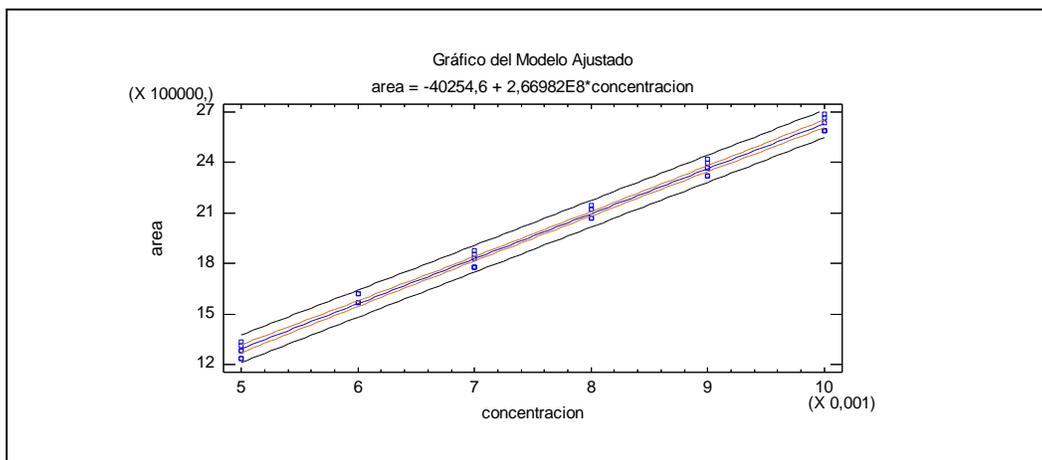
**Tabla 28.** Análisis estadístico unidimensional. Soluciones de estándares.

Adiciones (mg/kg)	0,007	0,008	0,009	0,010	0,020	0,050
Área Media	2074529	2360918	2687266	2993635	5957333	13701868
Desviación típica	89388,79	65179,21	65187,96	65199,09	129746,10	298416,16
Mínimo	1914541	2260919	2587285	2893641	5758345	13244194
Máximo	2161548	2435900	2762301	3068705	6106722	14045462
Rango	247007	174981	175016	175064	348377	801268
Coef. de variación	4,31 %	2,76 %	2,42 %	2,17 %	2,16 %	2,15 %

**Tabla 29.** Análisis estadístico unidimensional. Muestras de jugo adicionadas.

#### 4.4.6.- Linealidad

En la figura 56 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en soluciones de estándares de carbendazim.



**Figura 56.** Regresión Lineal solución de estándar

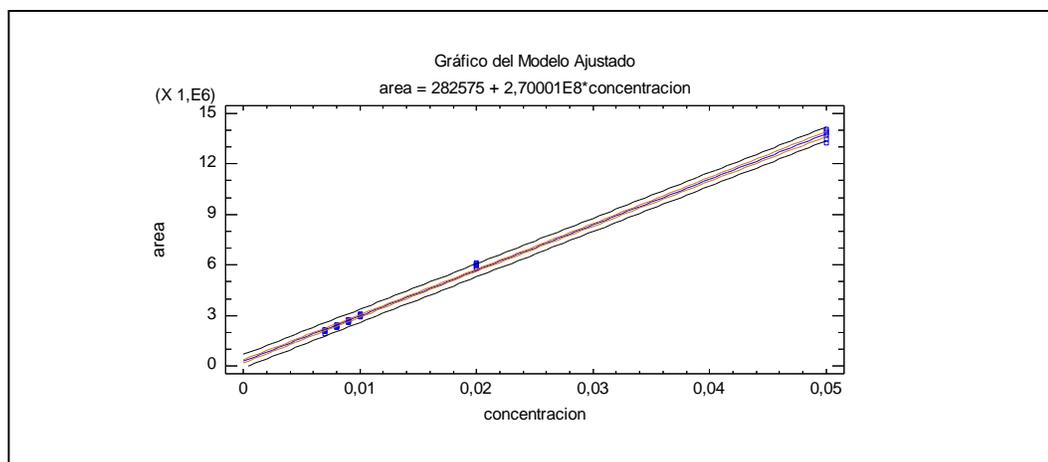
La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = -40254,6 + 2,66982E8 * \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (26)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,3285 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,996637, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 38576,1.

En la figura 57 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de jugo adicionadas con carbendazim.



**Figura 57.** Regresión Lineal muestra de jugo adicionada

La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 282575 + 2,70001E8 \cdot \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (27)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,7987 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,998993, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 190002.

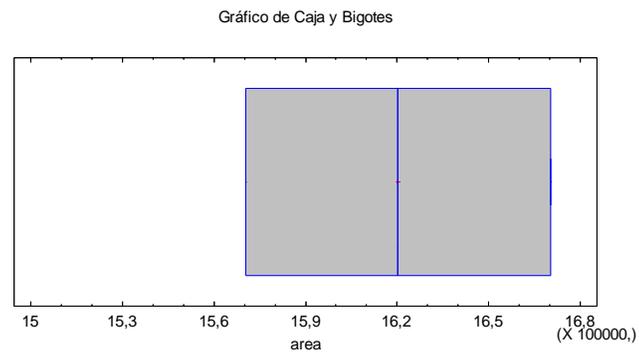
#### 4.4.7.- Precisión

Se determinó para soluciones de estándares y muestras de jugos adicionadas, se detallan en tabla 30.

	<b>Solucion estandar de carbendazim 0,006 mg/kg</b>	<b>Muestra jugo adicionada 0,010 mg/kg</b>
<b>Frecuencia</b>	10	10
<b>Área Media</b>	1620359	3008634,7
<b>Desviación típica</b>	40856,67	55538,38
<b>Mínimo</b>	1570320	2893641
<b>Máximo</b>	1670398	3068705
<b>Rango</b>	100078	175064
<b>Coefficiente de variación</b>	2,52 %	1,84 %
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0,0	-1,3407
<b>Curtosis Estandarizada</b>	-0,899085	0,484328

**Tabla 30.** Precisión de estándar y muestras de jugo adicionadas

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal.

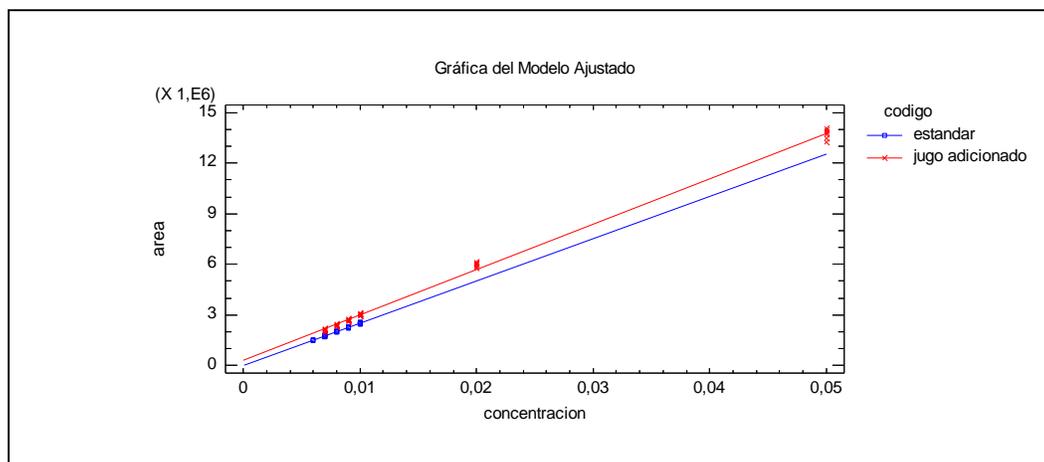


**Figura 58.** Precisión carbendazim

### Comparación de líneas de regresión

A partir de las curvas de regresión determinadas para soluciones de estándares y muestras de jugos concentrados adicionadas, se representa en la figura 59 las comparaciones respectivas.

Las ecuaciones 28 y 29 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 59.



**Figura 59.** Rectas de regresión Estándares vs. Muestras de jugo adicionadas

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,8293 % de la variabilidad en áreas. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,8205 %. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 147451.

Dado que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el valor-P para las pendientes y para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de soluciones de estándares y muestras de jugos concentrados adicionados con un nivel de confianza del 99%.

#### 4.4.8.- Límites de Detección y Cuantificación

A partir de las curvas de regresión para muestras de jugos concentrados adicionadas a bajas concentraciones,  $\alpha = 0.05$  y  $n = 5$ , se determinaron los límites de detección y cuantificación, siendo los mismos de 0,005 y 0,010 mg/kg respectivamente.

Del análisis estadístico de los resultados antes detallados, podemos concluir que el método es factible de ser aplicado a las muestras procedentes de la industria, a fin de determinar la carga inicial de residuos de carbendazim en jugos cítricos concentrados obtenido en la línea de producción.

#### 4.4.9.- Tiabendazole

Determinación de parámetros estadísticos.

Los resultados del análisis unidimensional para soluciones de estándares y de muestras de jugos concentrados con tiabendazole se detallan en las tablas 31 y 32, respectivamente.

Estándares (mg/kg)	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,010
Área Media	517508	631321	724481	828079	921580	1035225
Desviación típica	23024,82	23150,31	23067,73	23057,96	22958,71	22999,84
Mínimo	482488	596000	689420	793000	886685	1000100
Máximo	547500	661025	754512	858099	951555	1065232
Rango	65012	65025	65092	65099	64870	65132
Coef. de variación	4,45 %	3,66 %	3,18 %	2,78 %	2,49 %	2,22 %

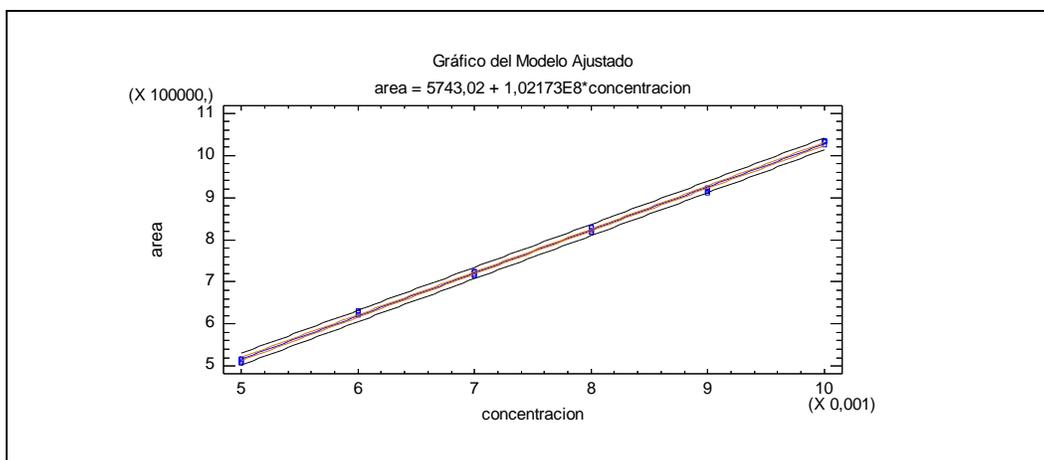
**Tabla 31.** Análisis estadístico unidimensional. Soluciones de estándares.

Adiciones (mg/kg)	0,007	0,008	0,009	0,010	0,020	0,050
Área Media	805125	928040	1035081	1190353	2356899	5656557
Desviación típica	24260,21	24310,99	24313,93	24527,45	48564,39	116554,62
Mínimo	765078	888000	995000	1150011	2277021	5464850
Máximo	830011	953111	1060011	1215022	2405743	5773783
Rango	64933	65111	65011	65011	128722	308933
Coef. de variación	3,01 %	2,62 %	2,35 %	2,06 %	2,05 %	2,05 %

**Tabla 32.** Análisis estadístico unidimensional. Muestras de jugo adicionadas.

#### 4.4.10.- Linealidad

En la figura 60 se detallan los resultados obtenidos para el cálculo de linealidad en soluciones de estándares de tiabendazole.



**Figura 60.** Regresión Lineal solución de estándar

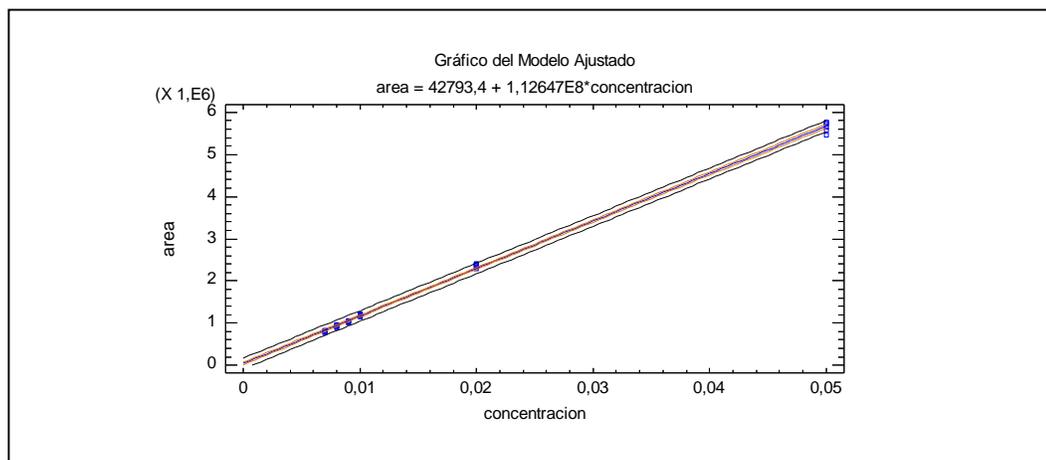
La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 5743,02 + 1,02173E8 \cdot \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (30)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,8672 % de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,999336, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 6546,57.

En la figura 61 se detallan los resultados para la obtención de la curva de linealidad en muestras de jugos concentrados adicionadas con tiabendazole.



**Figura 61.** Regresión Lineal muestra de jugo adicionada

La ecuación del modelo ajustado correspondiente resulta:

$$y = 42793,4 + 1,12647E8 * \text{concentración estándar (mg/kg)} \quad (31)$$

Dónde  $y$  representa la respuesta cromatográfica expresada en área de pico.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 99,8801% de la variabilidad en respuesta cromatográfica expresada en área de pico. El coeficiente de correlación es igual a 0,9994, lo que indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación muestra la desviación típica de los residuos que es 61162,8.

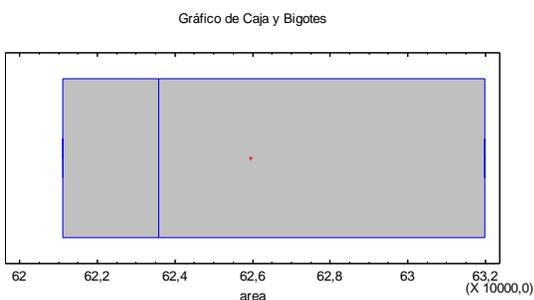
#### 4.4.11.- Precisión

Se determinó para soluciones de estándares y muestras de jugos concentrados adicionadas, se detallan en tabla 33.

	<b>Solucion estándar de tiabendazole 0,006 mg/kg</b>	<b>Muestra aceite adicionada 0,010 mg/kg</b>
<b>Frecuencia</b>	10	10
<b>Área Media</b>	625956	1195917
<b>Desviación típica</b>	5405,93	20668,72
<b>Mínimo</b>	621110	1150011
<b>Máximo</b>	631989	1215022
<b>Rango</b>	10879	65011
<b>Coefficiente de variación</b>	0,86 %	1,73 %
<b>Sesgo Estandarizado</b>	0,350982	-1,72932
<b>Curtosis Estandarizada</b>	-1,47204	1,06209

**Tabla 33.** Precisión de estándar y muestras de jugo adicionadas

El valor del sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal.

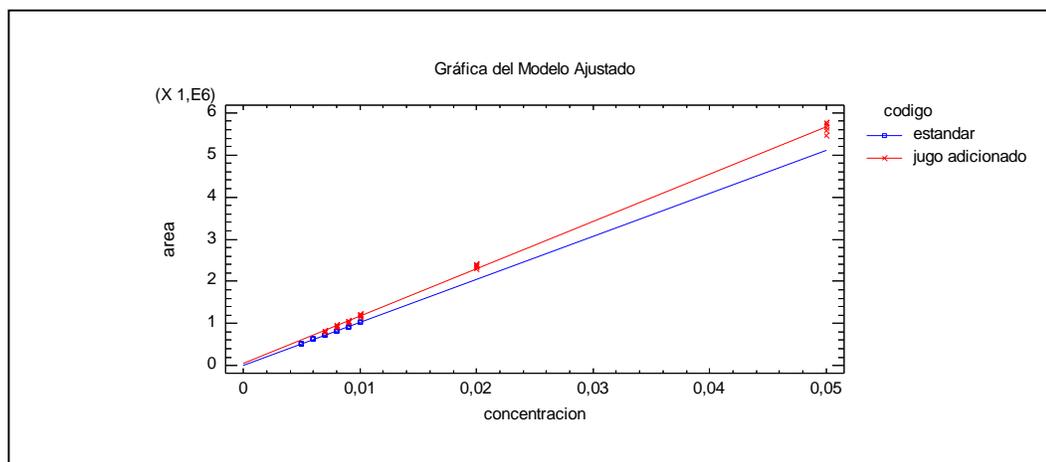


**Figura 62.** Precisión Tiabendazole

### Comparación de líneas de regresión

A partir de las curvas de regresión determinadas para soluciones de estándares y muestras de jugos concentrados adicionadas, se representa en la figura 63 las comparaciones respectivas.

Las ecuaciones 32 y 33 corresponden a las líneas de regresión comparativas indicadas en la figura 63.



**Figura 63.** Rectas de regresión Estándares vs. Muestras de jugo adicionadas

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,9041% de la variabilidad en áreas. El estadístico R-Cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes es 99,8998%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 43495,7.

Dado que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05, hay una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 99%.

Debido a que el valor-P para las pendientes y para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y entre los interceptos para los distintos valores de soluciones de estándares y muestras de jugo adicionadas con un nivel de confianza del 99%.

#### 4.4.12.- Límites de Detección y Cuantificación

A partir de las curvas de regresión para muestras de jugos concentrados adicionadas a bajas concentraciones,  $\alpha = 0.05$  y  $n = 5$ , se determinaron los límites de detección y cuantificación, siendo los mismos de 0,005 y 0,010 mg/kg respectivamente.

Del análisis estadístico de los resultados antes detallados, podemos concluir que el método es factible de ser aplicado a las muestras procedentes de la industria, a fin de determinar la carga inicial de residuos de tiabendazole en jugos cítricos concentrados obtenidos en la línea de producción.

#### **4.5.- Estudio y análisis de la persistencia de los residuos en frutas enteras y su incidencia en los jugos cítricos concentrados.**

Los resultados obtenidos en los diferentes muestreos, en las tres temporadas de producción consideradas, indicaron la presencia de los plaguicidas estudiados, es decir, que presentaron niveles residuales de clorpirifos, carbendazim, procloraz y tiabendazole.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos decir que la procedencia de la fruta que ingresa a la industria es muy variada, por lo que los niveles residuales de plaguicidas hallados presentan una considerada variabilidad entre los diferentes lotes muestreados, por este motivo los resultados se expresan en valores medios para cada uno de ellos. Para el cálculo de la persistencia relativa de los residuos en jugos cítricos concentrados se ha considerado que en la línea de producción por cada 13 a 14 toneladas de fruta que ingresa a la industria se obtienen 1 tonelada de jugo concentrado a 65°Brix, lo que representa entre un 6 a 8 %, considerándose un valor medio de 7 %. En la tabla 34 se detallan los valores medios de los niveles residuales expresados en mg/kg y de persistencia porcentual para cada uno de los plaguicidas en fruta entera y en jugos cítricos concentrados de Naranja Valencia, correspondiente a los 12 lotes muestreados.

Se puede observar, que del total de los lotes muestreados, sólo uno de ellos no indica presencia de ninguno de los plaguicidas, lo que manifiesta que la fruta ingresada correspondiente a dicho lote proviene de una quinta con producción orgánica. En fruta sólo dos lotes no indican presencia residual de clorpirifos, tres para carbendazim y sólo uno para tiabendazole. Para todos estos lotes mencionados no se procedió al análisis de la persistencia relativa como tampoco al análisis de correlación correspondiente.

Los máximos valores medios de niveles residuales hallados en fruta al ingreso a la industria y jugos cítricos concentrados fueron respectivamente, 1,46 mg/kg y 0,1185 mg/kg para procloraz, 0,076 mg/kg en fruta para clorpirifos, 0,1 mg/kg y 0,026 mg/kg para carbendazim, 0,29 mg/kg y 0,1188 mg/kg para tiabendazole. Los valores máximos de persistencia relativa obtenidos fueron 2,04 % para procloraz, 5,05 % para carbendazim y 82,32% para tiabendazole.

<b>PROCLORAZ</b>				
AÑO	Nº DE LOTE	FRUTA DE INGRESO	JUGO CONCENTRADO	% DE PERSISTENCIA
2012	A	1,46	0,1185	0,56
	B	1,42	0,0174	0,08
	C	0,086	0,0246	2,00
	D	0,56	0,0054	0,06
2013	E	0,06	0,0070	0,81
	F	0,13	0,0106	0,57
	G	0,05	0,0146	2,04
	H	0,60	0,0107	0,12
2014	I	0,98	0,0096	0,06
	J	ND	ND	-----
	K	0,27	0,0032	0,08
	L	0,1725	ND	-----
<b>CLORPIRIFOS</b>				
AÑO	Nº DE LOTE	FRUTA DE INGRESO	JUGO CONCENTRADO	% DE PERSISTENCIA
2012	A	ND	ND	-----
	B	0,045	ND	-----
	C	0,055	ND	-----
	D	0,076	ND	-----
2013	E	0,071	ND	-----
	F	0,025	ND	-----
	G	0,065	ND	-----
	H	0,050	ND	-----
2014	I	0,061	ND	-----
	J	ND	ND	-----
	K	0,034	ND	-----
	L	ND	ND	-----
<b>CARBENDAZIM</b>				
AÑO	Nº DE LOTE	FRUTA DE INGRESO	JUGO CONCENTRADO	% DE PERSISTENCIA
2012	A	ND	ND	-----
	B	ND	0,003	-----
	C	ND	ND	-----
	D	0,036	0,026	5,05
2013	E	0,100	0,015	1,05
	F	0,006	ND	-----
	G	0,060	0,009	1,05
	H	0,038	0,014	2,57
2014	I	0,024	0,010	2,91
	J	ND	ND	-----
	K	0,015	0,010	4,66
	L	0,098	0,008	0,57
<b>TIABENDAZOLE</b>				
AÑO	Nº DE LOTE	FRUTA DE INGRESO	JUGO CONCENTRADO	% DE PERSISTENCIA
2012	A	0,082	ND	-----
	B	0,012	ND	-----
	C	0,005	0,0588	82,32
	D	0,006	0,0084	9,8
2013	E	0,030	0,1188	27,72
	F	0,095	ND	-----
	G	0,026	0,1039	27,97
	H	0,297	0,0857	2,01
2014	I	0,007	0,0365	36,50
	J	ND	ND	-----
	K	0,014	0,036	18,00
	L	ND	0,007	-----

**Tabla 34.** Valores medios de niveles residuales expresados en mg/kg correspondientes a 12 lotes de Naranja Valencia. Temporada 2012, 2013 y 2014. (\*)

Los mínimos valores medios de niveles residuales hallados en fruta al ingreso a la industria y aceites descerados fueron respectivamente, 0,05 mg/kg y 0,0032 mg/kg para procloraz, 0,025 mg/kg en fruta para clorpirifos, 0,006 mg/kg y 0,003 mg/kg para carbendazim, 0,005 mg/kg y 0,007 mg/kg para tiabendazole. Los valores mínimos de persistencia relativa obtenidos fueron 0,06% para procloraz, 0,57% para carbendazim y 2,01 % para tiabendazole.

*\*Cabe aclarar que los datos pertenecientes a los niveles de clorpirifos y tiabendazole en frutas cítricas volcados a continuación en tabla 34 fueron obtenidos de la tesis y facilitados por Hilda Fabiana Rousserie dirigida por la Dra. Isabel Fernández Segovia perteneciente a la Universidad Politécnica de Valencia que ha sido presentada en enero de 2016, para su pronta defensa.*

#### **4.6.- Evaluación y análisis de los resultados para la determinación de la correlación entre los niveles residuales de plaguicidas en jugos cítricos concentrados y la fruta entera de las cuales provienen.**

A partir de los resultados obtenidos para un total de 12 lotes muestreados, correspondientes a tres temporadas de producción, se realizó un análisis de comparación de dos muestras pareadas para evaluar las diferencias significativas entre los niveles residuales de plaguicidas obtenidos en frutas enteras y el nivel residual obtenido en el jugo cítrico concentrado colectado como su pareja.

El resumen estadístico para cada una de las muestras pareadas incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma. Los valores obtenidos del sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, son utilizados para determinar si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar.

De acuerdo al análisis realizado anteriormente para cada uno de los plaguicidas, se observa que los niveles residuales de plaguicidas presentan una considerada variabilidad

entre los diferentes lotes muestreados, por lo que se procedió a determinar el coeficiente de correlación para cada uno de los lotes por separado y para cada uno de los plaguicidas.

Los coeficientes de correlación obtenidos para cada caso se detallan a continuación en la tabla 35.

AÑO	PROCLORAZ		CLORPIRIFOS	CARBENDAZIM	TIABENDAZOLE
	Nº DE LOTE	CORRELACION	CORRELACION	CORRELACION	CORRELACION
2012	A	0,12	-----	-----	-----
	B	0,58	-----	-----	-----
	C	0,83	-----	-----	0,98
	D	0,82	-----	0,14	0,77
2013	E	1,00	-----	0,36	0,90
	F	-1,13	-----	-----	-----
	G	0,27	-----	0,66	0,98
	H	0,13	-----	0,53	0,41
2014	I	-0,41	-----	0,55	0,97
	J	-----	-----	-----	-----
	K	-0,07	-----	0,27	-0,07
	L	-----	-----	0,45	0,90

**Tabla 35.** Coeficientes de correlación hallados entre los niveles residuales de plaguicidas de la fruta entera y los jugos concentrados de Naranja Valencia. Temporadas 2012, 2013 y 2014.

Aquellos lotes que no indicaron presencia de niveles residuales de plaguicidas fueron desestimados para la determinación del coeficiente de correlación, sólo se consideraron aquellos que manifestaron presencia de residuos en fruta entera y jugos cítricos concentrados, pudiéndose así conformar el par muestral para que sea factible la correlación.

En aquellos lotes que se determinó el coeficiente de correlación, se puede observar que para todos los casos existe una alta dispersión con excepción del tiabendazole que en la mayoría de sus lotes presentó una elevada correlación.

# Capítulo Ⅲ

## DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Considerando que exigencias cada vez mayores de los organismos reguladores y los mercados importadores, respecto a los niveles de detección y cuantificación de los residuos de plaguicidas en frutos cítricos frescos y sus jugos concentrados, se establecieron como objetivos aplicar y optimizar diversas metodologías analíticas a fin de lograr la adecuada determinación de los mismos.

En la revisión bibliográfica se pudo observar una marcada tendencia al análisis de multiresiduos de plaguicidas, hecho que se compatibiliza con la necesidad de reducir costos, tiempo de análisis y uso de solventes tóxicos. Para la mayoría de los autores utilizan técnicas extractivas y métodos cromatográficos similares a los aplicados en el presente trabajo para la identificación y cuantificación de estos analitos, aunque se observan algunas modificaciones en las diferentes etapas del proceso metodológico, lo cual también es aplicable para los métodos cromatográficos de cuantificación. [98, 99,100, 101, 102, 103, 104]

Los fundamentos teóricos que sustentan las metodologías adoptadas han sido propuestos y aplicados por numerosos autores, siendo los más recientes aquellos que utilizan adsorbentes específicos para retener los analitos extraídos de la muestra y/o eliminar las impurezas, como la SPE y el método QuEChERS.

Las publicaciones de los diferentes autores citados, aportaron información relevante que fue utilizada en distintas etapas del desarrollo metodológico de la presente tesis doctoral, brindando un marco referencial importante para el análisis de los resultados obtenidos.

Se determinaron las curvas de regresión lineal a partir de las respuestas cromatográficas obtenidas para muestras adicionadas. Se realizó el análisis unidimensional correspondiente y se determinó en cada caso la desviación estándar, coeficiente de variación e intervalo de confianza. A partir de las respuestas cromatográficas obtenidas en alturas de pico y las curvas de calibración correspondientes, se determinaron los valores de concentración de los analitos en las muestras de fruta entera y jugos concentrados sometidas al proceso extractivo. [105, 106]

En todos los casos el análisis unidimensional de los datos obtenidos indicó una distribución normal, encontrándose los coeficientes de variación dentro de los valores

esperados para el tipo de muestras analizadas. Los resultados fueron concordantes con los datos de trazabilidad, respecto a las frutas de ingreso en línea de producción.

La diferencia en los niveles residuales en los jugos, es debida posiblemente al origen de las frutas al ingreso de la línea en la industria.

Esto ocurre habitualmente ya que muchas veces se procesan en las industrias frutas que han sido tratadas en el “drencher” o en la línea de empaque con diferentes dosis y concentraciones de fungicidas, lo que genera una diferencia en la carga inicial de residuos en frutas que ingresan en la línea de producción de jugos, así también el lavado, como etapa en la línea de proceso en la industria que tiende a disminuir la carga inicial en fruta, no alcanza a eliminar la totalidad de los residuos, generando un contenido residual variable en productos industriales. [107]

En virtud de lo explicitado, surge la posibilidad de que los niveles detectados en jugos concentrados tengan cierta correlación con las diferentes cargas iniciales de residuos en las frutas procesadas en la industria. [108]

Teniendo en cuenta los límites máximos establecidos por la legislación para:

Tiabendazole: Límite Máximo de Residuos en Argentina para fruta cítrica entera 10 ppm (mg/kg) (SENASA, 2015), mientras que en la Unión Europea es de 5 mg/kg (European Commission, 2015).

Carbendazim: En Argentina, la legislación (SENASA, 2015) establece como LMR para frutas un valor de 5 mg/kg, mientras que en la UE se establecen valores de 0,2 y 0,7 mg/kg para naranjas y mandarinas, respectivamente (European Commission, 2015). [109]

Clorpirifos: En Argentina, la legislación (SENASA, 2015) establece como LMR para frutas un valor de 0,3 mg/kg, mientras que en la UE se establecen valores de 0,3 y 2 mg/kg para naranjas y mandarinas, respectivamente (European Commission, 2015).

Procloraz: En Argentina, la legislación (SENASA) establece como LMR para frutas un valor de 5 mg/kg, mientras que en la UE se establecen valores para la suma de procloraz y de sus metabolitos que contengan la fracción 2,4,6-triclorofenólica, expresados en procloraz de 10 mg/kg para cítricos (European Commission, 2015).

Sin embargo es necesario destacar que en la industria los volúmenes de muestras procesadas diariamente son grandes y sucede habitualmente que se mezclen diferentes lotes

de la misma variedad, generando una gran variabilidad de los resultados en los jugos cítricos concentrados.

Finalmente es importante mencionar que la mezcla de lotes de jugos concentrados con diferentes contenidos residuales de plaguicidas, constituye una práctica industrial destinada a ajustar los niveles de sus productos a los límites permitidos por la legislación tanto nacional como internacional.

## 5.1.- Bibliografía

- [01] - DAVIS, F.S. y L.G. ALBRIGO (eds). 1994. Citrus. 1-10, Cab Intern., UK.
- [02] - GMITTER, F.G. y X. HU, 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). *Economy Botany* 44:267-277.
- [03] REUTHER, W. L.D. BATCHELOR y H.J.WEBER (eds.). 1967. The Citrus Industry. Vol I:1-37. Univ. of California Press, USA.
- [04] – FEDERACIÓN DEL CITRUS DE ENTRE RÍOS, “Censo Citrícola Provincial 2003/4, Concordia 2004.
- [05] – AMALIE, A. 2012. El Mercado de Jugo Concentrado de Naranja. Área de Sectores Agroalimentarios. Dirección de Promoción de la Calidad de Productos Agrícolas y Forestales. Dirección Nacional de Transformación y Comercialización de Productos Agrícolas y Forestales. Subsecretaría de Agricultura. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina.
- [06] - [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa\\_calidad](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad). 2015.
- [07] - [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r\\_37/cadenas/Frutas\\_jugo\\_concent\\_coge\\_naranja.htm](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_37/cadenas/Frutas_jugo_concent_coge_naranja.htm). 2015.
- [08] - Se realizan anualmente trabajos en las distintas regiones publicados bajo el título “Informes Regionales” INTA-FEDERCITRUS. Luego se realiza una síntesis estadística a cargo de FEDERCITRUS que se publica en el trabajo “La Actividad Citrícola Argentina”.
- [09] – FEDERACIÓN DEL CITRUS DE ENTRE RÍOS. 2004. “Censo Citrícola Provincial 2003/4, Concordia.
- [10] – [http://www.fecier.org.ar/pagina\\_c/5](http://www.fecier.org.ar/pagina_c/5). 2015. Federación del citrus de Entre Ríos.
- [11] – <http://www.fecier.org.ar/>. 2015. Federación del citrus de Entre Ríos.
- [12] – GARZA, S. Industrias de zumos de frutas y derivados: tecnología de la extracción de zumos. Universidad de Lleida, Guías Docentes. Disponible en la web <http://web.udl.es/usuaris/a1743621/Temas/tema5.html>.
- [13] – BLASCO, C; FONT, G; PICO, Y. 2006. Evaluation of 10 pesticide residues in oranges and tangerines from Valencia. *Food Control*; 17(11):841–846.

- [14] – COSCOLLÁ, R. 1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- [15] – MONTTI, MARÍA I.; VISCIGLIO, SILVIA B.; RAVIOL, FABRICIO H.; SUBOVICH, GLADYS E.; MUNITZ, MARTÍN S. 2015. Incidencia de la carga inicial de pesticidas en fruta sobre los niveles residuales en aceites esenciales cítricos.
- [16] – GARCÍA-REYES ET AL. 2008. Food Analysis by HPLC, Third Edition.
- [17] – MONTTI, M.; MARTÍNEZ, H.; 2005. Optimización de la determinación de thiabendazole en jugos cítricos concentrados. Clicap.
- [18] – <http://www.eeaoc.org.ar/upload/publicaciones/archivos/29/20120207185614000000>. 2012. pdf. Informe fitopatológico realizado por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres.
- [19] - KOTZE, J.M. 1988. Black spot. En: Compendium of Citrus Diseases. J. O. Whiteside, S.M. Garnsey y L.W. Timmer (eds.). APS Press. 80 pp.
- [20] - CONTRERAS, Jesús del V. 1988. Mancha negra de los citrus en la provincia de Misiones. Citrusmisiones, Boletín N°21: 15 - 23.
- [21] - KOTZE, J.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. Plant Disease. 65: 945 - 960.
- [22] - MARCO, G. y VAZQUEZ, D. 1987. Mancha grasienta. Sintomatología. Carpeta de Información Citrícola. EEA INTA Concordia. G.8.
- [23] - MARCO, G.M. y J.O. WHITESIDE. 1986. A disease similar to greasy spot but of unknown etiology on citrus leaves in Argentina. Plant Disease 70:1074.
- [24] -VALSANGIACOMO, F. 1987. Control de sarna y de mancha grasienta de los cítricos. Carpeta de Información Citrícola EEA INTA Concordia. G.9.
- [25] -VALSANGIACOMO, F., N. VACCARO, M. RAGONE, G. BANFI y D. VAZQUEZ. 1986. Guía de pulverizaciones en los cítricos. Carpeta de Información Citrícola. EEA INTA Concordia. G.7.
- [26] -WHITESIDE, J.O. 1988. Greasy-spot-like diseases. En: Compendium of Citrus Diseases. J.O. Whiteside, S.M. Garnsey y L.W. Timmer (eds.). APS Press. 80 pp.
- [27] - CONTRERAS, J. 1989. Patogenicidad de PHYTOPHTORA en cultivos cítricos de la Provincia de Misiones. Citrusmisiones No. 19: 5-8.

[28] - GRAHAM, J.M. 1995. Root Regeneration and Tolerance of Citrus Rootstocks to Root Rot Caused by *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology* 85:111-117.

[29] - FREZZI, M.J. 1950. Las especies de *PHYTOPHTORA* en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas*. Tomo IV (1): 47- 133.

[30] - SCHUTTE, G.C. 1994. The timing of fosetyl-Al (Aliette) treatments for phytophthora root rot control in the summer rainfall region. *Outspan International*. *Citrus Journal* 4:20-21.

[31] - TIMMER, L.W., J.P. AGOSTINI, J.M. GRAHAM y W.S. CASTLE. 1991. Relationship of Citrus Rootstocks to *Phytophthora* Root Rot and Populations of *Phytophthora parasitica*. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 104:173-178.

[32] - DANOS, E., S.M. GARRAN y E. BLANCO. 1994. Cuidado con la sarna resistente. *Campo y Tecnología* 3(14):60-63.

[33] - RODRIGUEZ, V., S. MAZZA de GAIAD y P. GAUNA. 1995. Diferentes momentos de control de sarna de los citrus (*Elsinoe* sp.) en mandarina Satsuma Okitsu (*Citrus unshiu* Marc.). Res. XVIII Congreso Horticultura. Termas de Río Hondo. Santiago del Estero, p. 112.

[34] - ARIMOTA, Y., Y. HOMMA y T. MISATO. 1981. Studies on Citrus Melanose and Citrus Stem-end rot by *Diaporthe citri* (Fawc.) Wolf. Part 3- Mode of reaction in citrus fruit and leaf against infection of *D. citri*. *Annals Phytopathological Society of Japan*.

[35] - CANTEROS, Blanca Y. 1993. Guía de Pulverizaciones para Control de Enfermedades de los Citrus en Corrientes. 1993-1994. EEA INTA Bella Vista, Corrientes. R. Argentina. 17 pp.

[36] - VALSANGIACOMO, F., N. VACCARO, M. RAGONE, G. BANFI y D. VAZQUEZ. 1986. Guía de Pulverizaciones en los Cítricos. Carpeta de Información Citrícola. EEA INTA Concordia. G7.

[37] - KUCHARÉK, T., J.O. WHITESIDE, and E. BROWN. Melanose and Phomopsis Stem-End Rot of Citrus. Plant Pathology Fact Sheet. Florida Cooperative Extension Service. I.F.A.S. University of Florida. 4 pp.

[38] - ALIPPI, H. E. 1971. Un caso atípico de Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Citrus en Concordia, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía* (3ra. época) XLVII (1) La Plata. Bs. As. R. Argentina. Pág. 19-29.

[39] - WHITESIDE, J.O. 1988. Anthracnose. En: Compendium of Citrus Diseases (Whiteside, J.O., Garnsey, S.M. y L.W. Timmer eds.). The American Phytopathological Society Press. 80 pp.

[40] - WHITESIDE, J.O. 1988. Symptomless and Quiescent Infections by Fungi. En: Compendium of Citrus Diseases (Whiteside, J.O., Garnsey, S.M. y W. Timmer eds.). The American Phytopathological Society Press. 80 pp.

[41] - AGOSTINI, J.P. 1995. Caída prematura de frutitos, una creciente y seria enfermedad de los cítricos en América. Citrusmisiones. Boletín Informativo del Departamento Frutales. Est. Exp. Agrop. Montecarlo. Misiones. Pág. 21 - 33.

[42] - FAGAN, H.J. 1984. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: I. Disease epidemiology. Turrialba 34:173 - 177.

[43] - LIYANAGE, H.D, R.T. MCMILLAN Jr., y H.C. KISTLER. 1992. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology*. 82: 1371 - 1376.

[44] - TIMMER, L. W., J. P. AGOSTINI, S.E. ZITKO y M. ZULFIQAR. 1994. Post-bloom Fruit Drop: an Increasingly Prevalent Disease of Citrus in the Americas. *Plant Disease*. 78(4): 329-334 pp.

[45] - CANTEROS, B. I. 1993. Guía de Pulverizaciones para el Control de Enfermedades de los Citrus en Corrientes. 1993- 1994. INTA Bella Vista. Corrientes. 18 pp.

[46] - WHITESIDE, J.O., GARNSEY, S.M. y TIMMER, L.W. 1988. Compendium of Citrus Diseases. APS. 80 pp.

[47] - FERNANDEZ VALIELLA, M.V. 1978. Introducción a la Fitopatología. Hongos. Vol. III: 725-728. Colección Científica. INTA.

[48] - WHITESIDE, J.O., S.M. GARNSEY y L.W. TIMMER (eds.). 1988. Compendium of Citrus Diseases, p. 28. APS.

[49] - ECKERT, Joseph W. e Irving L. EAKS. 1989. Postharvest Disorders and Diseases of Citrus Fruits. Chapter 3. En: The Citrus Industry. Vol. 5 (Reuther, W., E.C. Calavan, y G.E. Carman, eds.). University of California. Division of Agriculture and Natural Resources.

[50] - FAWCETT, Howard S. 1936. Citrus Diseases and their Control. McGraw-Hill Book Company Inc. New York and London. 656 pp.

[51] - TORRES LEAL, G. 1994. Ensayo de control de *Geotrichum candidum*. Jornadas de Actualización en Sanidad Citrícola. Tucumán.

[52] - TORRES LEAL, G. y N.V. DE RAMALLO. 1994. Monitoreo de suelo y fruta para determinar *Geotrichum* sp. Jornadas de actualización en Sanidad Citrícola. Tucumán.

[53] - TUSET, J.J. 1987. Podredumbres de los frutos cítricos. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Generalitat Valenciana. Conselleria D'Agricultura y Pesca. 206 pp.

[54] - WHITESIDE, J.O., S.M. GARNSEY, y L.W. TIMMER. (eds.) 1988. Compendium of Citrus Diseases. The American Phytopathological Society Press. 80 pp.

[55] - FAO/IBPGR. 1991. Technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm. E.A. Frison y M.M. Tber (eds.). 50pp.

[56] - MORENO, Pedro y C. ROISTACHER. 1990. Las enfermedades de los cítricos transmisibles por injerto: una puesta al día. I. Tristeza. *Phytoma España* no. 20: 29-36 (junio julio 1990).

[57] - MORENO, Pedro, N. DURAN-VILA y C. ROISTACHER. 1990. Las enfermedades de los cítricos transmisibles por injerto: una puesta al día. II. Enfermedades asociadas a otros virus y viroides. *Phytoma España*. no. 21:16-26 (agosto-septiembre 1990).

[58] - MESSINA, M.A. 1992. Hipótesis sobre la eliminación mediante control biológico de la bacteria que origina la cancrrosis en una zona donde es endémica. INTA EEA Concordia. Serie Notas Técnicas N° 27.

[59] - SCHOULTIES, C.L., E.L. CIVEROLO, J.W. MILLER, R.E. STALL, C.J. KRASS, S.R. POE y E.P. DUCHARME. 1987. Citrus canker in Florida. *Plant Disease*. 71(5):388-395.

[60] - VALSAN GIACOMO, F., M.A. MESSINA y S.M. GARRAN. 1991. Cancrosis de los citrus: control integrado y prevención. Carpeta de Información Citrícola. INTA EEA Concordia.

[61] - [http://www.pops.int/documents/guidance/beg\\_guide.pdf](http://www.pops.int/documents/guidance/beg_guide.pdf). 2015

[62] - GILDEN RC, HUFFLING K, SATTTLER B (January de 2010). «Pesticides and health risks». *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* **39** (1): 103–10.

[63] - MILLER GT. 2004. *Sustaining the Earth*, 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California. Chapter 9, Pages 211-216.

- [64] - WARE, 1983; GARCÍA Y HERNANZ, 1987
- [65] - <http://www.pv.fagro.edu.uy/cursos/pvh/DocsPVH/C-QUIMICO.pdf>. 2015
- [66] - COSCOLLÁ, 1993; GONZÁLEZ RUMAYOR ET AL. 2005
- [67] - MILAN, R.; CELMA, E. (1984). Regulación de los residuos de plaguicidas en productos agrarios. I Sympouim Nacional de Agroquímicos. Sevilla.
- [68] - CREMLYN, R. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. 1995.
- [69] - INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA. 2012. Manual para productores de naranja y mandarina de la Región del Río Uruguay. Capitulo XI. Sitio internet: <http://inta.gob.ar/documentos/manual-para-productores-de-naranja-y-mandarina-de-la-region-del-rio-uruguay/>.
- [70] - DANAHER, M.; DE RUYCK, H.; Crooks, S.R.H.; Dowling G.; O’Keeffe, M. 2007. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, **845**, 1–37.
- [71] - ITO, YUKO; IKAI, YOSHITOMO; OKA, HISAO; HAYAKAWA, JUNKO; KAGAMI, TADAAKI. 1998. Application of ion-exchange cartridge cleanup in food analysis I. Simultaneous determination of thiabendazole and imazalil in citrus fruit and banana using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, **810**, 81–87.
- [72] - VENEZIANO, A.; VACCA, G.; ARANA, S.; DE SIMONE, F. & RASTRELLI, L. 2004. Determination of carbendazim, thiabendazole and thiophanate-methyl in banana (*Musa acuminata*) simples imported to Italy. *Food Chemistry*, **87**, 383-386.
- [73] - Wu, Q .; Li, Y .; Wang, C .; Liu, Z .; Zang, X .; Zhou, X. y Wang, Z. 2009. Dispersiva de liquidez microextracción líquido combinada con cromatografía de líquido de alto rendimiento detección de fluorescencia para la determinación de carbendazim y tiabendazol en muestras ambientales. *Analytica Chimica Acta* , 638 (2), 139-145, ISSN 0003 a 2.670 <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/12392.pdf>.
- [74] - BARBERÁ, C. 1989. Pesticidas Agrícolas. 4º Edic. Editorial Omega. Barcelona.
- [75] - DANAHER, M.; DE RUYCK, H.; CROOKS, S.R.H.; DOWLING G.; O’KEEFFE, M. 2007. Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, **845**, 1–37.

[76] - KATAGI, T. 1990. Ab initio structures of trimethyl and dimethyl phenyl phosphorothioates. *Theochem.* 68, 61-67.

[77] - CREMLYN, R. 1995. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica.

[78] - CASIDA, J.E. AND QUISTAD, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu.Rev.Entomol.* 43:1-16.

[79] - GARRIDO FRENICH, A.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L. 2014. Veinte años de análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas. *Boletín GRASEQA Seguridad Alimentaria.* Vol. N°7, pág. 3.

[80] - DOCUMENTO N° SANCO 12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures.

[81] - GARRIDO FRENICH, A.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L. 2014. Veinte años de análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas. *Boletín GRASEQA Seguridad Alimentaria.* Vol. N°7, pág. 3 [http://www.seqa.es/graseqa2012/boletin\\_graseqa\\_7\\_2014.pdf](http://www.seqa.es/graseqa2012/boletin_graseqa_7_2014.pdf)

[82] - GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J.F. ; MOLINA-DÍAZ, A. 2009. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review, *Talanta* 79. 109-128.

[83] – CORTÉS-AGUADO, S.; SÁNCHEZ-MORITO, N.; ARREBOLA, F.J.; FRENICH, A. G. & VIDAL, J. L. M. 2008. Fast screening of pesticide residues in fruit juice by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 107, 1314–1325

[84] - KNEZEVIC, Z Y SERDAR, M. 2009. Screening of fresh fruit and vegetables for pesticides residues on Croatian market *Food Control*, 20:419-422

[85] – ROUVIERE, F., BULETE, A., CREN-OLIVE, C., Y ARNAUDGUILHEM, C. 2012. «Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction». En: *Talanta*, 93, pp. 336-344.

[86] – STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. 2011. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica* 2011; 3(1):25-49

[87] – RIDGWAY, K.; LALLJIE, S.P.D.; SMITH, R.M. 2009. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods *J. Chromatogr. A.*; 1153: 36-53.

[88] – LAMBROPOULOU, D.A.; ALBANIS, T.A. 2007. Methods of sample preparation for determination of pesticide residue in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review *Anal. Bioanal. Chem.*; 389: 1663-1683.

[89] – FRITZ, J.S. 1999. *Analytical Solid-Phase Extraction*. Wiley-VCH, New York.

[90] – AYSAL P, AMBRUS Á, LEHOTAY SJ, CANNAVAN A. 2007. Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *J Environ Sci Health, Part B.*; 42 :481–490.

[91] – [http://www.cromlab.es/EFS\\_HS\\_QUECHERS.htm](http://www.cromlab.es/EFS_HS_QUECHERS.htm). 2015

[92] – 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.

[93] – ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). 2015. Guía para Muestreo de Alimentos. <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/mod/resource/view.php?id=9724>.

[94] – DEJAEGHER, B. & VANDER HEYDEN, Y. 2007. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A*, 1158, 138-157.

[95] – MASSON, P. 2007. Quality control techniques for routine analysis with

[96] – LIQUID CHROMATOGRAPHY IN LABORATORIES. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, 1158, 168-173. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Edited by Kenneth Helrich. 15<sup>th</sup> Edition. Volumen one.

[97] – QUATTROCCHI OSCAR A., ALBELAIRA SARA, LABA RAÚL F. 1992. *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Artes Gráficas Farro S.A. Buenos Aires.

[98] – Montti M., 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.

[99] – Gerard, J.; Montti, M.; Chaulet, M.; Raviol, F.; Garavello, F.; Subovich, G. 2000. Penetracion y Persistencia del Thiabendazole en Naranja Valencia. Series de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Investigación El Postgrado del IADDTA. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. Vol. II – I.S.B.N. N° 84-9705-013 4 – p.p. 241-252.

[100] – Blasco, C.; Font, G. & Picó, Y. 2002. Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **970**, 201-212.

[101] – 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.

[102] – Ortelli, D.; Edder, P. & Corvi, C. 2004. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography-electrospray - tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **520**, 33-45.

[103] – Jansson; C.; Pihlström, T.; Österdahl, B.; Markides, K. 2004. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1023**, 93–104.

[104] – Bogialli S.; Di Corcia A. 2007. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 163–179.

[105] – Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Mezcua, M.; Ramos-Martos, N.; Fernández-Alba, A.R.; Molina-Díaz, A. 2010. Multi-residue determination of pesticides in fruit-based soft drinks by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Talanta*, **81**, 1310–1321.

[106] – Guo, B.; Huang, Z.; Wang, M.; Wang, X.; Zhang, Y.; Chen, B.; Li, Y.; Yan, H.; Yao, S. 2010. Simultaneous direct analysis of benzimidazole fungicides and relevant metabolites in agricultural products based on multifunction dispersive solidphase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1217**, 4796 – 4807.

[107] – Visciglio, S. 2011. Tesis Doctoral: “Desarrollo de metodologías alternativas para el análisis de fungicidas benzimidazólicos en matrices cítricas”. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos.

[108] – Montti M., 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.

[109] – European Commission, 2015. Pesticides database.  
[http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database-redirect/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database-redirect/index_en.htm))