



## Problemática en el muestreo postcosecha de arándanos para la determinación de fungicidas

**Munitz Martín Sebastián, Medina María Belén, Visciglio Silvia, Gimenez Fernando, Raviol Fabricio, Subovich Gladys, Williman Celia, González Alejandro, Evangelina Montti María Isabel**

Laboratorio de Investigación de Residuos en Alimentos (LIRA), Facultad de Ciencias de la Alimentación – Universidad Nacional de Entre Ríos. Monseñor Tavella 1450 (3200)-Concordia. Argentina.

### Resumen

Los arándanos son susceptibles a enfermedades fúngicas, utilizándose para su control fungicidas tales como: azoxystrobin, boscalid, cyprodinil, fludioxonil, penconazole, propiconazole, pyraclostrobin y tebuconazole. Algunos países requieren además, el tratamiento cuarentenario con bromuro de metilo para evitar la propagación de la mosca de la fruta. Se plantearon como objetivos evaluar los niveles residuales de estos fungicidas en empaques y el posible efecto del bromuro sobre los mismos. La metodología involucró la microextracción en fase sólida (SPME) y determinación por cromatografía gaseosa. Las muestras pertenecientes a 5 lotes distintos fueron recolectadas por personal del empaque antes y después del proceso de bromuro, y enviadas al laboratorio para su análisis. Se supuso que la trazabilidad era la indicada por el personal del empaque, por lo que las muestras luego del tratamiento deberían haber presentado residuos de los mismos fungicidas evaluados previamente y con niveles relativamente similares, ya que el tratamiento es de un corto periodo y a una temperatura de 16°C. Sin embargo, presentaron diferencias significativas, no existiendo correlación entre las muestras. Los resultados sólo indican la ocurrencia de estos fungicidas en los frutos. Factiblemente esto es debido a que la trazabilidad no era la indicada. Aunque uno de los objetivos propuestos no fue alcanzado, se concluyó la importancia de establecer un adecuado sistema de trazabilidad y prácticas de muestreos, ya que éstos son los factores que conjuntamente con la homogenización de las muestras contribuyen mayoritariamente a la variabilidad de los resultados.

**Palabras clave:** muestreo , fungicidas, arándanos, cromatografía gaseosa, bromuro de metilo

Bistua 2014 Vol12(2):48-57. Munitz MS, Medina MB, Visciglio S, Gimenez F, Raviol F, Subovich G, Williman C, González A, Evangelina Montti MI. Problemática en el muestreo postcosecha de arándanos para la determinación de fungicidas



## Abstract

Blueberries are susceptible to fungal diseases Fungicides such as azoxystrobin, boscalid, cyprodinil, fludioxonil, penconazole, propiconazole, pyraclostrobin and tebuconazole are commonly used for its control. Some countries also require quarantine treatment with methyl bromide to prevent the spread of the fruit fly. The objectives of this study were to evaluate residual levels of these fungicides in blueberry packing houses and the potential impact of methyl bromide application on them. The methodology involved a solid phase microextraction (SPME) and a gas chromatographic determination. The samples belonging to five different batches were collected by the blueberry packing house personnel before and after the process of brominated and sent to the laboratory for analysis. It was assumed that traceability was the indicated by the personnel of the packing house, so the samples after treatment should have had the same residues of fungicides that were previously found and relatively similar concentrations because of the short time of the methyl bromide treatment and low 16 °C; however, they showed significant differences, with no correlation between the samples and the results only indicate the occurrence of these fungicides in fruits. This is feasible because traceability was not correct. Although one of the objectives was not achieved, we concluded that establishing an adequate system of traceability and sampling techniques are very important, because these are the factors that together with the homogenization of the samples, contribute mainly to the variability of results.

**Key words:** sampling, fungicides, blueberries, gas chromatography, methyl bromide

\*Para citar este artículo: Munitz et al. Problemática en el muestreo postcosecha de arándanos para la determinación de fungicidas..Bistua.2014.12(2):48-57

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Laboratorio de Investigación de Residuos en Alimentos (LIRA), Facultad de Ciencias de la Alimentación – Universidad Nacional de Entre Ríos. Monseñor Tavella 1450 (3200)-Concordia. Argentina .email: munitzm@fcal.uner.edu.ar

Recibido: Diciembre 05 de 2013 Aceptado: Julio 06 de 2014

49

Bistua 2014 Vol12(2):48-57. Munitz MS, Medina MB, Visciglio S, Gimenez F, Raviol F, Subovich G, Williman C, González A, Evangelina Montti MI.Problemática en el muestreo postcosecha de arándanos para la determinación de fungicidas

## Introducción

En Argentina las prácticas agrícolas son las tradicionales, es decir que para el control de las diversas enfermedades y/o plagas en los cultivos se aplican diferentes plaguicidas. En los cultivos de arándanos, los principalmente utilizados son los fungicidas, ya que los arándanos son susceptibles a numerosas enfermedades fúngicas, las cuales son favorecidas por las condiciones climáticas de nuestra región (Cline, 1997; Ellis et al., 2004; Ellis et al., 2008). Es factible que estas aplicaciones generen residuos en los frutos, ya que su disipación y/o eliminación nunca es total. Estos residuos pueden tener repercusiones en los rendimientos productivos y crear dificultades a la exportación, por lo que, la determinación de los niveles residuales de plaguicidas en los frutos debe considerarse como un parámetro más de calidad. Por otro lado, la región mesopotámica no es considerada zona libre de mosca de los frutos, *Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus*, por lo que las exportaciones fruti hortícolas hospederas de este complejo de especies deben ser sometidas a un “tratamiento cuarentenario” (Leesch et al., 2008; Molina et al., 2010), tal como lo establecen los mercados consumidores de frutas como es el

caso de EEUU, uno de los más importantes compradores de arándanos (Mayfield et al., 2012; Walse et al., 2012). El mejoramiento de las técnicas de bromurado generará una serie de ventajas técnicas, económicas y comerciales que tendrán un efecto positivo inmediato, particularmente al comienzo de la cosecha, momento en el cual se verifica la demanda más firme y con mejores precios. En varias oportunidades, debido a algunas operaciones relacionadas con el diseño de la cámara y con el proceso de bromurado realizado incorrectamente, se generan importantes modificaciones en la textura de la fruta, dificultando la llegada en buenas condiciones de conservación y pudiendo ser causales de rechazo. Por lo que, para lograr prolongar el período de aptitud de la fruta garantizando el arribo a destino con calidad adecuada para su comercialización, se efectuaron modificaciones en el proceso de bromurado.

Las muestras fueron tratadas con el nuevo protocolo de Bromurado que difiere del anterior únicamente en la temperatura utilizada para el tratamiento (antes 21°C, ahora 15,6°C ó más). En este caso las condiciones fueron las siguientes: temperatura entre 16°C y 19°C,



51

durante 210 minutos y dosis de bromuro de metilo de 32 gramos /metro cúbico. Cuando se trata de evaluar parámetros de calidad de las frutas postcosecha, debemos recordar que, el muestreo y la homogenización adecuada de la muestra, son los factores de mayor aporte en la incertidumbre asociada a los resultados. Establecer un adecuado plan de muestreo involucra tener en cuenta diversas consideraciones tales como sus objetivos y alcance del mismo, como así también disponer de la información adecuada de: origen, ubicación, tipo y tamaño del lote; puntos de muestreos del lote; cantidad de muestra por puntos de muestreos y cantidad total de muestra.

Para la determinación de niveles residuales de plaguicidas en frutas de empaque, se requiere además, disponer de la información o trazabilidad de las aplicaciones de plaguicidas pre y postcosecha (si las hubiese), es decir, el tipo, dosis, concentración del o los plaguicidas utilizados, momento de las aplicaciones y tiempo de cosecha. Es relevante también saber si existen cultivos aledaños al lote muestreado, ya que es factible que, por acción de los vientos (efecto deriva) se

depositen en los frutos y generen residuos los plaguicidas aplicados en estos cultivos, tal como se ha demostrado en investigaciones previas. (Montti, 2011).

Las frutas que ingresan a la línea de empaque pueden provenir de lotes de una misma quinta, de lotes diferentes de una misma quinta y/o de lotes de quintas diferentes; por lo que, la trazabilidad de las frutas cobra relevancia al momento de conformar un pallet de “clamshells” (cajas de embalaje), ya que éstas deberían contener sólo muestras de igual procedencia, es decir cuya calidad se suponga garantizada, puesto que corresponden a productos de exportación.

Por otro lado, la maduración de las bayas no es homogénea y a fin de lograr la adecuada calidad o grado de maduración óptima para las exportaciones, se efectúan diversos ingresos a los lotes de los cultivos; pudiendo tener la muestra final una variabilidad importante.

El proceso de envasado es prácticamente continuo en época de cosecha y es factible que los “clamshells” en la línea del empaque y/o los que conforman los pallets puedan diferir en función de los diferentes factores anteriormente explicitados, sin tener en cuenta el



52

error humano en el proceso de identificación y rotulado de los mismos.

El objetivo principal de un muestreo es lograr que las muestras sean representativas del universo muestreado, sin embargo, la experiencia nos ha demostrado que, lograr una participación efectiva y profesional de los diversos agentes participantes en los procesos de muestreos en los empaques no siempre es sencillo, dada la complejidad para lograr una adecuada coordinación y respetabilidad de la información o trazabilidad garantizada de las muestras.

Cuando se pretende evaluar el efecto de un proceso de postcosecha sobre los niveles residuales de plaguicidas, la temática se complica aún más, ya que se requiere la evaluación de estos residuos, previa y posteriormente al proceso a aplicar y por lo tanto, las muestras deben tener igual trazabilidad. Para lo cual, se selecciona un lote y en función de su tamaño ( $n^{\circ}$  de clamshells ó por peso total) se muestrea por duplicado la cantidad de "clamshells" necesarios para conformar dos muestras representativas del mismo, ya que cada una de ellas se utilizarán para efectuar los ensayos

correspondientes y así, evaluar la incidencia del proceso sobre la dinámica o cinética de disipación de los residuos, si la hubiese. Se plantearon como objetivos, evaluar los niveles residuales de azoxystrobin, boscalid, cyprodinil, fludioxonil, penconazole, propiconazole, pyraclostrobin y tebuconazole en empaques, y el posible efecto del bromurado sobre los mismos.

## MATERIALES Y REACTIVOS

Se utilizó un cromatógrafo gaseoso GC (Agilent Technologies 6890N- 2), equipado con dos tipos de detectores selectivos, NPD (Detector de Nitrógeno-Fósforo) y  $\mu$ -ECD (detector de microcaptura de electrones). Equipo E-Pure (Barnstead). Agitador magnético (Mistral) con sistema aislante. Jeringas SPME (Supelco) con polímero de recubrimiento de PDMS (polidemetilsiloxano) de 100  $\mu$ m. Balanza analítica (Ohaus). Procesadora semi industrial (Metvisa). Estándares certificados (Accu Standard) y agua Grado 1.

## METODOLOGÍA

### Plan de muestreo



53

Se entiende por plan de muestreo al procedimiento determinado para la selección, extracción, preservación, transporte y preparación de las porciones a ser tomadas de una población a los fines que la muestra sea representativa de dicha población. Para la determinación de residuos de plaguicidas de un lote de frutas de empaques, dispuestas en clamshells de 125 g, agrupados en cajas de 12 clamshells cada una, cuyo contenido neto total es de 1,5 kg, se adoptaron los criterios recomendados en el Codex Cac/GI 33-1999 y la Comunidad Europea: Directiva 2002/63/Ce; estableciéndose el detallado en la Tabla 1.

Toda las muestras primarias correspondientes a cada lote son colocadas en bolsas de polietileno (PE) virgen, debidamente rotulada para su identificación inequívoca, perfectamente legibles e indelebles.

Las muestras son preservadas en frío, enviadas al laboratorio y procesadas a la brevedad posible, caso contrario son conservadas en freezer a -18°C.

Cabe destacar que en el presente trabajo el muestreo fue efectuado por personal del empaque, al cual se le brindó esta información para su ejecución.

**Submuestreo:** Las unidades contenidas en los 30 clamshells (3,750 kg) son procesadas como una única muestra compuesta, se fraccionan alícuotas rotuladas y son preservadas en freezer hasta su posterior análisis.

### **Tratamiento previo de la muestra**

Las muestras de arándanos remitidas al laboratorio fueron procesadas en una procesadora semi-industrial, hasta lograr una adecuada homogenización de la matriz.

Una alícuota de aproximadamente 5 g fueron pesadas exactamente en un tubo de centrífuga de 50 ml de capacidad, se adicionaron 15 ml de agua Grado I y se ajustó el valor del pH a 7 con una solución de hidróxido de sodio. Se agitó en vórtex durante 1 minuto para facilitar la extracción de los analitos por la fase acuosa, y luego se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 3000 rpm. El procedimiento extractivo se llevó a cabo por triplicado.

Una vez finalizada la etapa de centrifugación, se procedió a filtrar bajo vacío, a través de un filtro de teflón ("Fritz") de 0,45  $\mu\text{m}$  en el "vacuum manifold".

Luego, se repitió el procedimiento de extracción, con la adición de 10 ml de



54

agua deionizada en el tubo de centrífuga que contenía los restos sólidos de la muestra, se repitió la agitación en vórtex durante 1 minuto y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones antes mencionadas y se filtró. Se llevó a un volumen final de 25 ml.

Se prepararon estándares en solución acuosa de los diferentes analitos a evaluar, blancos de muestras y muestras adicionadas a diferentes concentraciones a fin de verificar la linealidad y recuperación del método previamente validado (Montti, 2011; Munitz et al., 2013 a, b).

#### **Proceso extractivo SPME**

En base a experiencias previas (Montti, 2011; Munitz et al., 2013a, b), se adoptó como polímero selectivo de recubrimiento el PDMS (polidimetilsiloxano) de 100  $\mu\text{m}$ . Se estableció en 8 ml el volumen mínimo de muestra, el tiempo de inmersión de la fibra en las muestras fue de 10 minutos y la agitación magnética a 2000 rpm.

#### **Condiciones cromatográficas**

Las condiciones cromatográficas se establecieron a partir de las soluciones acuosas de estándares individuales y multiresiduos.

Para la determinación por  $\mu\text{-ECD}$  de azoxystrobin, boscalid y pyraclostrobin, las condiciones fueron: la temperatura del inyector y detector se establecieron en 250°C y 330°C, respectivamente. La programación del horno fue de 80°C durante 6 min, y posteriormente una rampa de temperatura de 80°C/min hasta 280°C y se mantuvo durante 10 min. El tiempo de desorción de la fibra en el puerto de inyección fue de 6 min.

Para la determinación por NPD de triadimefon, penconazole, propiconazole, tebuconazole, cyprodinil y fludioxonil, las condiciones fueron: la temperatura del inyector y detector se establecieron en 250°C y 290°C, respectivamente. La programación del horno fue de 80°C durante 5,3 min y posteriormente una rampa de temperatura de 55°C/min hasta 260°C durante 2 min y un incremento de 10°C/min hasta alcanzar una temperatura final de 280°C, la cual se mantuvo durante 4 min. El tiempo de desorción se estableció en 5,3 min.

La determinación del tiempo óptimo de desorción permite que la fibra esté expuesta a la temperatura del puerto de inyección el tiempo suficiente para lograr que todos los analitos sean arrastrados por el gas carrier hacia la



55

cabeza de columna, y prolongar además la vida útil de la fibra.

### Referencias Bibliograficas

CODEX CAC/GL 33-1999-Métodos de Muestreo recomendados para la determinación de residuos de plaguicidas a efectos del cumplimiento de los LMR.

[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/361/CXG\\_033s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/361/CXG_033s.pdf)

COMUNIDAD EUROPEA:  
DIRECTIVA 2002/63/CE DE LA COMISIÓN por la que se establecen los métodos comunitarios de muestreo para el control oficial de residuos de plaguicidas en los productos de origen vegetal y animal.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:187:0030:0043:ES:PDF>

Cline WO (1997). Fruit rot diseases of blueberry. Plant Pathology Extension. North Carolina State University.

“<http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/Fruit/blueberryinfo/berryrots.htm>”.  
Consultada: 2013.

Ellis MA, Doohan D, Bordelon B, Welty C, Williams RN, Funt RC, Brown M (2004). Midwest Small Fruit Pest Management Handbook. Bulletin 861. Chapter 4: Highbush Blueberries, 102-121. The Ohio State University.

“<http://ohiolini.osu.edu/b861/pdf/ch04.pdf>”. Consultada: 2014.

Ellis MA, Nita M (2008). Organic Small Fruit Disease Management Guidelines. Integrated Management of Blueberry Diseases. Department of Plant Pathology at the Ohio State University/OARDC.

“<http://www.oardc.ohio-state.edu/fruitpathology>”. Consultada: 2014.

Leesch JG, Smilanick, JL, Tebbets JS (2008). Methyl bromide fumigation of packed table grapes: Effect of shipping box on gas concentrations and phytotoxicity. Postharvest Biol Tec, **49**:283–286.

Mayfield EN, Norman CS (2012). Moving away from methyl bromide: Political economy of pesticide transition for California strawberries since 2004. J Environ Manage, **106**:93-101.



56

Molina N, Taiariol D, Delssin E, Serial C (2010). Proyecto Regional Hortícola. Proyecto Regional Alternativas Productivas. Producción de Arándanos en Corrientes. Análisis técnico y económico. INTA - EEA Bella Vista. Publicación Técnica N°38. “<http://www.inta.gov.ar/bellavista/info/documentos/otros/ST38.pdf>”. Consultada: 2014.

Montti, MIT (2011). Tesis Doctoral: “Desarrollo de Nuevas Metodologías para el Análisis de Fungicidas Triazólicos en Arándanos”. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos.

Munitz, MS, Resnik SL, Montti MIT (2013a). Method development and validation for boscalid in blueberries by solid-phase microextraction gas chromatography, and their degradation kinetics. Food Chem, **136**:1399–1404.

Munitz MS, Resnik SL, Montti MIT (2013b). Method development and validation for cyprodinil and fludioxonil in blueberries by solid-phase microextraction gas chromatography,

and their degradation kinetics. Food Add Contam A, **30-7**:1299-1307.

Walse SS, Krugner R, Tebbets JS (2012). Postharvest treatment of strawberries with methyl bromide to control spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*. Journal of Asia-Pacific Entomology, **15**:451–456.

Tabla 1.- Plan de muestreo

Nº cajas del lote	Nº cajas	Nº clamshells / caja	Nº total de clamshells
≤ 100	10	3	30
101 - 1000	20	2	40
1001 - 2000	30	2	60
>2000	35	2	70



57

Tabla 2.- Niveles medios de plaguicidas en arándanos expresados en µg/kg

(n=3; α=

0,05)

PLAGUICIDA	Lote1-1A	Lote1-2B	Lote1-3D	Lote1-4E	Lote2-1C
Triadimefon	10	7	4	2	6
Penconazole	0,15	0,18	25,9	0,43	0,25
Cyprodinil	0,50	0,86	0,88	0,84	0,98
Tebuconazole	N.D	N.D	N.D	N.D	3,6
Fludioxonil	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Propiconazole I	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Propiconazole II	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Azoxystrobin	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Boscalid	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Fludioxonil	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Pyraclostrobin	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D. (No

Detecta)

Tabla 3.- Niveles medios de plaguicidas en arándanos

post bromurados

expresados en µg/kg

(n=3; á= 0,05)

PLAGUICIDA	Lote1-1A	Lote1-2B	Lote1-3D	Lote1-4E	Lote2-1C
Triadimefon	450	196	145	225	155
Penconazole	1,65	1,8	1,6	1,5	1,5
Cyprodinil	73,7	51,4	26,6	97,2	13,2
Tebuconazole	141,3	39,9	16,9	13,3	23,8
Fludioxonil	173,6	182,2	64,2	167,3	56
Propiconazole I	71,7	12,4	12,8	11,8	26,5
Propiconazole II	13,6	7,1	2,5	2,6	2,9
Azoxystrobin	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Boscalid	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Fludioxonil	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Pyraclostrobin	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D. (No

Detecta)