

“Degradación de imidacloprid en cultivo de lechuga y reducción de residuos por medio de lavado.”

Autora:

Brom. María Eugenia Turaglio.

Directora de Tesis:

MSc. Ing. Agr. Violeta Becerra.

Comité evaluador:

Presidente: MSc. Ing. Agr. Sergio Castellanos.

Vocales: Dra. Lic. Alejandra Camargo.

MSc. Ing. Agr. Pablo Loyola.

Suplente: Dra. Ing. Agr. Iris Peralta.

AGRADECIMIENTOS.

A mi Directora de Tesis, Violeta Becerra, por darme la posibilidad de realizar esta investigación, por compartir sus conocimientos y por su paciencia ante mis insistencias.

Al Director de la EEA INTA Mendoza, Ing. José Gudiño por permitirme realizar mis estudios en dicha Institución.

A mis compañeras, Rosanna Navarro y Yesica Sepúlveda, por brindarme su colaboración, paciencia e importantes consejos.

A Norma Pieralisi por permitirme acceder a la información y por su esfuerzo en suministrarme artículos ubicados en diferentes bibliotecas.

A Valeria Portillo, Regina Aguilera, Damián Porreta, Daniel Puebla y Javier Torres por su colaboración y compromiso durante los ensayos experimentales a campo.

A mis padres, Kity y Fito, por darme una educación, por ayudarme y sobre todo por enseñarme que con esfuerzo y dedicación todo se logra.

A mi hermanas, Lety y Silvi por sus palabras de aliento, su ayuda, su comprensión y paciencia.

A mis amigas, por darme fuerza para continuar, no bajar los brazos, y darme su amistad incondicional.

Índice

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	5
1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO EN ESTUDIO.....	6
1.1. Situación en Argentina.	6
1.2. Situación en Mendoza.	7
1.3. Plagas y enfermedades en cultivo de lechuga.....	8
1.4. Control de plagas y enfermedades.	13
2. GENERALIDADES DE PLAGUICIDAS.	15
2.1. Concepto de plaguicidas.	15
2.2. Clasificación de plaguicidas.	15
2.3. Neonicotinoides.....	16
3. RIESGOS POR LA UTILIZACIÓN DE PLAGUICIDAS	19
4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CANTIDAD DE DEPÓSITO O RESIDUOS DE PLAGUICIDAS	20
4.1. Factores propios de la aplicación.	20
4.2. Factores propios del cultivo y del medio ambiente.	20
4.3. Factores propios de la eliminación del producto.....	21
5. DISMINUCIÓN DE RESIDUOS POR TRATAMIENTOS DOMÉSTICOS.....	22
5.1. Lavado	22
5.2. Pelado	22
5.3. Cocción	22
6. NORMATIVA LEGAL SOBRE RESIDUOS DE PESTICIDAS.	23
6.1. Límite Máximo de Residuo.....	23
6.2. Tiempo de Carencia.	24
CAPITULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
1. HIPÓTESIS.....	25
2. OBJETIVOS	25
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. ENSAYO A CAMPO	26
2. ENSAYO DE LAVADO.....	28
3. METODOLOGÍA DE LABORATORIO	29
3.1. Determinación de imidacloprid.....	29

3.2. Preparación del estándar.....	34
3.3. Condiciones cromatográficas.....	34
3.4. Cálculo	35
3.5. Análisis de datos.....	36
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
1. Curva de degradación a campo.....	37
2. Ensayo de diferentes tratamientos de lavado	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN.....	43
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA.....	44

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La lechuga (*Lactuca sativa*) es uno de los vegetales en fresco más consumidos en Argentina. El cultivo de lechuga en Mendoza se ve afectado por varias plagas y enfermedades, entre ellas los pulgones, que perjudican seriamente la calidad y cantidad del producto. Por ello, el productor se ve obligado a la aplicación de fitosanitarios. Dentro de la gama de plaguicidas de uso corriente en el cultivo de lechuga, el imidacloprid es uno de los insecticidas más empleados para el control y tratamiento de pulgones.

La aplicación de productos fitosanitarios continúa siendo, en la actualidad, el medio de lucha más eficaz para prevenir y combatir los agentes dañinos que se detectan en el cultivo de frutas y hortalizas. Sin embargo existen problemas asociados con el uso de éstos, tales como: resistencia adquirida de las plagas, resurgimiento y brotes secundarios de las mismas, efectos adversos al ambiente y a la salud del hombre y residuos de pesticidas en productos a cosecha que pueden afectar la comercialización.

Es por ello que los residuos de pesticidas son motivo de preocupación en los consumidores; y además son de suma importancia debido a los controles cada vez más estrictos que se están ejerciendo en los distintos mercados, tanto nacionales como internacionales.

Las hortalizas de consumo en fresco generalmente se someten a un lavado antes de ser consumidas. Este tratamiento puede reducir el contenido de residuos de pesticidas del producto.

Por lo expuesto, en el presente trabajo se estudiará la degradación progresiva de imidacloprid en cultivo de lechuga y luego se pondrá énfasis en las acciones que podrían aminorar dichos residuos por diferentes procesos de lavado.

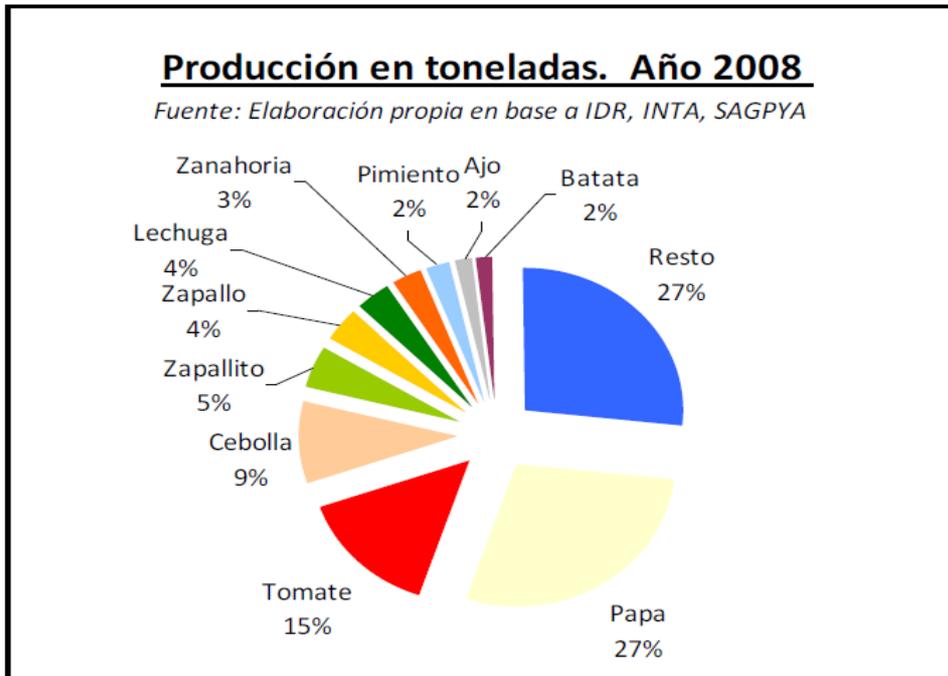
1. IMPORTANCIA DEL CULTIVO EN ESTUDIO.

1.1. Situación en Argentina.

La producción de hortalizas en Argentina se realiza en casi todo su territorio debido a la diversidad de climas que posee, sin embargo la producción comercial que abastece a los principales centros urbanos de consumo se localiza en determinadas regiones. Éstas se han desarrollado por sus condiciones agroecológicas adaptadas para cada especie hortícola y sobre la base de ventajas competitivas comerciales obtenidas a partir de su cercanía al mercado, infraestructura, tecnología disponible y la presencia de productores con conocimientos sobre la producción de estos cultivos. Las principales provincias argentinas que se destacan por su producción hortícola son: Buenos Aires, Mendoza, Córdoba, Santiago del Estero, Misiones, Santa Fe, Corrientes, Tucumán, Formosa, Salta, Chaco, Jujuy, San Juan y Río Negro.

En términos generales se estima que la producción anual de hortalizas es de alrededor de 8 a 10.000.000 t, ocupando una superficie de 450 a 500.000 hectáreas (incluyendo a las legumbres).

Las principales hortalizas cultivadas en Argentina se pueden observar en el gráfico N°1.(Gerencia de Calidad y Tecnología, 2012)



Corporación del Mercado Central de Buenos Aires

Gráfico N°1: Producción en toneladas. Año 2008.

La lechuga ocupa el cuarto lugar dentro de las hortalizas cultivadas, en Argentina. Sus distintas variedades se cultivan a lo largo del país en los cinturones verdes de los centros urbanos, con 5 centros especializados: Buenos Aires, Mar del Plata, Rosario/Santa Fe, Santiago del Estero y Mendoza.

Los principales tipos de lechuga que se comercializan en Argentina son Latina, Capuchina, Mantecosa y Lechuga de hoja; y en menor volumen LolloRossa y Hoja de Roble.

El mayor volumen que se consume en el área metropolitana proviene de la provincia de Buenos Aires, fundamentalmente del Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires. Durante los meses más cálidos tiene mayor presencia Mar del plata y durante el invierno Santa Fe, Mendoza y Santiago del Estero.

La diversidad de variedades, los altos rendimientos y la época de producción permite abastecer a diversos mercados durante todo el año. (Adlercreutz E.,2013)

1.2. Situación en Mendoza.

Mendoza, tradicionalmente productora de hortalizas, ocupa el segundo lugar en el país y constituye la tercera actividad agrícola de la provincia por superficie, después de la vid y los frutales, aunque es la primera por ocupación de mano de obra.

Según el informe de relevamiento del Instituto de Desarrollo Rural la superficie cultivada total estimada con hortalizas para la temporada 2013/2014 es de 30.902 ha, de las cuales solo el 3% corresponde al cultivo de lechuga.

La principal zona de siembra de lechuga es el Cinturón Verde (Maipú y Guaymallén) (Gráfico N°2)

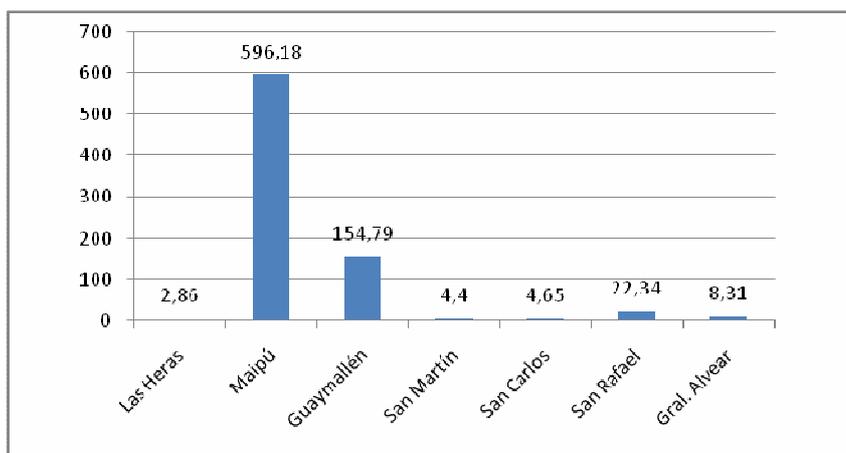


Gráfico N°2: Superficie (ha) con lechuga en Mendoza. Temporada 2013/2014

La lechuga disminuyó su superficie cultivada con respecto de la temporada anterior, en un 13%.(Tabla N°1)

Tabla N°1: Variación de superficie de la principal zona de cultivo de lechuga.

Superficie(Ha) 2012/2013	Superficie(Ha) 2013/2014	Porcentaje relativo de disminución	Principal zona de producción
911	794	13	Cinturón Verde

1.3. Plagas y enfermedades en cultivo de lechuga.

De acuerdo a lo citado por Ferratto, Jorge A.; et al., en el 2010 se presentan a continuación las principales plagas y enfermedades en cultivo de lechuga.

1.3.1. Enfermedades causadas por hongos.

1.3.1.1. *Bremialactucae* (Mildiu velloso)

Esta enfermedad es de importancia en los almácigos y en el campo en condiciones de temperatura frescas, alta humedad y baja luminosidad. Generalmente aparece a fines de otoño y principios de primavera. Se observan áreas irregulares en el haz de las hojas, de color verde claro y luego amarillas y necróticas limitadas por las venas de las hojas. Los primeros síntomas aparecen en las hojas viejas. Se observa el crecimiento de un moho blanco lanoso en la parte inferior de las mismas. En condiciones de alta humedad y escasa luminosidad, puede aparecer también en el haz de la hoja. En infecciones severas, el follaje toma un color marrón y muere. Puede atacar a la lechuga a lo largo de todo su desarrollo. Los ataques suelen manifestarse a partir de que empieza a formarse el cogollo, apareciendo primero en las hojas externas.

1.3.1.2. *Peronospora farinosa* (DownyMildew)

Los síntomas iniciales consisten en áreas amarillas, indefinidas en el haz de las hojas. En correspondencia con ellas en el envés se observa una eflorescencia gris a violácea. Las áreas afectadas se tornan oscuras y mueren.

1.3.1.3. *Erysiphecichoracearum* (Powderymildew)

Esta enfermedad puede causar una disminución en el rendimiento y la calidad, principalmente en condiciones ambientales secas. Este hongo se reconoce por el polvo blanco que se acumula en las superficies de las hojas. Las cuales van cambiando de verde pálido a amarillo, luego marrón y finalmente mueren.

1.3.1.4. *Botrytis cinerea* (Moho gris de la hoja)

Causa muerte del tejido afectando todas las partes aéreas de la planta. Su desarrollo se favorece en condiciones frescas y húmedas. El follaje se observa blando, acuoso y cubierto de moho gris.

1.3.1.5. *Sclerotinia sclerotiorum* y *minor* (Caída o marchitamiento)

Los síntomas son similares en ambas enfermedades y pueden atacar los cultivos en distintos estados de desarrollo. Sin embargo los mayores ataques se producen en cultivos cercanos a la madurez comercial.

Se caracteriza por la presencia de plantas marchitas en forma aislada o en manchones. Condiciones de alta humedad y frío favorecen el ataque.

El hongo produce una podredumbre blanda y húmeda. Sobre el tejido se observa micelio blanco y esclerotos de color oscuro. Finalmente toda la planta se pudre y desintegra quedando sobre el suelo.

1.3.1.6. *Cercospora beticola* (Mancha foliar)

En la hojas produce manchas aisladas y confluentes, redondeadas de color pardo a pardo grisáceo con borde rojizo o pardo oscuro. Con frecuencia el centro de la mancha necrosada se desprende. Las hojas muy atacadas se secan.

1.3.1.7. *Marssonina panattoniana* (Antracnosis)

Es un hongo que provoca lesiones en las hojas que comienza con pequeños puntos amarillos agrandándose hasta formar manchas circulares o angulares húmedas de color pardo, finalmente se seca el tejido dañado y quedan agujeros en las hojas. Las infecciones comienzan por las hojas externas.

1.3.1.8. *Septoria lactucae* (Mancha foliar por Septoria)

Los síntomas iniciales son manchas cloróticas pequeñas e irregulares.

Estas manchas van tomando forma elíptica y color oliváceo y pueden estar rodeadas por una zona clorótica. En infecciones severas el follaje se observa necrótico y se marchita.

1.3.1.9. *Albugo* sp. (Roya blanca)

Causa deformaciones y úlceras en las plantas. Se presenta en forma de ampollas blancas en la cara superior de las hojas y pústulas eflorescentes blancas en la cara inferior.

1.3.1.10. *Pythium* spp. (Enanismo)

Las plantas atacadas quedan mucho más pequeñas y las hojas exteriores amarillean y mueren. Las raíces están aparentemente en buen estado, pero al

seccionar longitudinalmente el cuello, se observa una coloración parduzca clara en los vasos.

1.3.2. Enfermedades causadas por bacterias.

1.3.2.1. *Pseudomonascichorii* (Tizón bacteriano)

Síntomas de necrosis de color marrón oscuro en los bordes de las hojas. Ataca exclusivamente plantas fisiológicamente maduras.

1.3.3. Enfermedades causadas por virus.

1.3.3.1. Peste negra.

Se produce un moteado necrótico sobre las hojas y las nervaduras, crecimiento asimétrico de las hojas, amarillamiento, marchites y muerte de las plantas. Este virus es transmitido por trips y sobrevive en plantas anuales y perennes.

1.3.3.2. Virus del mosaico del pepino (CucumberMosaic Virus-CMV)

Los síntomas incluyen enanismo, moteado amarillo, distorsión y manchas necróticas en las hojas. Los síntomas son muy parecidos a los producidos por el Virus del Mosaico de la lechuga. Es transmitido por más de 60 especies de áfidos.

1.3.3.3. Virus del Mosaico de la Lechuga (LettuceMosaic Virus-LMV)

Es una de las enfermedades más comunes y dañinas de la lechuga. Las hojas de plantas jóvenes muestran un moteado verde claro o mosaico. Otros síntomas son aclaración en las venas, rayado necrótico, reducción del crecimiento de la planta y distorsión. Este virus se transmite en la semilla y por áfidos como el pulgón verde, *Myzuspersicae* y *Aphisgossypii*.

1.3.3.4. Big Vein (LBVV)

Se la denomina vulgarmente como la enfermedad de las venas grandes de la lechuga.

Los síntomas son engrosamiento y clorosis de la nervadura principal y de las secundarias, ampollado, encrespamiento y reducción del tamaño de las plantas, en algunos casos llegando a no formar la cabeza.

Otro síntoma ocurre en la raíz principal, la cual amarillea, perdiendo capacidad de absorción y en respuesta a esto comienza a emitir raíces secundarias que también amarillean.

El vector es un hongo de suelo llamado *Olpidiumbrassicae*.

1.3.4. Plagas.

1.3.4.1. Trips occidental *Frankliniella occidentalis*:

Los trips se alimentan destruyendo las paredes de las células de la epidermis con su única mandíbula, perforan las células con los estiletes maxilares y chupan la savia que es exudada. La alimentación de los trips hace que las hojas crezcan más lentamente, se arruguen y se deformen, sin embargo, este daño puede ser de poca importancia si las temperaturas y la nutrición de las plantas favorecen su rápido crecimiento con lo que se compensaría el daño.

La alimentación también causa cicatrices de color marrón o plateado en las hojas, dándoles una apariencia pecosa o quemada que disminuye el valor comercial. En plantas jóvenes, hojas severamente dañadas se pueden secar y caer.

Dada la posibilidad de transmisión de enfermedades los umbrales de acción son muy bajos, siendo recomendable la realización de controles al observarse los primeros individuos.

Daños directos: destrucción del tejido superficial, disminución del área foliar y fotosintética, deformaciones por daño a tejidos de crecimiento. Estos daños están directamente relacionados al nivel de la población de la plaga.

Daños indirectos: disminución de la calidad comercial. Transmisión de virus y otros patógenos (virus del bronceado del tomate-TSWV).

1.3.4.2. Minador de la hoja: *Liriomyza* spp.

Es un díptero cuyas larvas pequeñas se desarrollan en el interior de las hojas, cavando galerías largas y tortuosas. Las especies más difundidas son *L. trifolii*, *L. sativa*, *L. huidobrensis* y *L. strigata*.

Daños directos: disminución del rendimiento por pérdida de área foliar. Cuando las poblaciones son altas, las plantas pueden morir o sufrir estrés, siendo más propensas a la aparición de enfermedades. Los minadores de la hoja también pueden causar daño después de la cosecha.

Daños indirectos: están relacionados fundamentalmente a la pérdida de calidad comercial, tanto por la aparición de galerías como por punteados en las hojas. Este efecto es muy importante en lechuga mantecosa. En algunas especies vegetales se han encontrado indicios de transmisión de enfermedades virósicas (Mosaico del apio) y aumento de la incidencia de fúngicas (*Alternaria*).

1.3.4.3. Pulgones.

Grupo de insectos constituidos por un gran número de especies entre las que se destacan el pulgón del duraznero (*Myzus persicae Sulzer*), el pulgón de la lechuga (*Hyperomyzuslactucae*), *Nasanoviaribisnegri* Mesley, entre otros.

Los áfidos o pulgones (Homóptera, Afididae) constituyen uno de los grupos de plagas de hortalizas más importantes a nivel mundial. Poseen una distribución geográfica muy amplia y atacan a numerosas especies, ocupando un lugar destacado entre las plagas por su alto nivel de adaptación a la mayoría de ecosistemas del mundo.

Entre los aspectos más destacados de su bioecología que influyen favoreciendo su adaptación y diseminación podemos nombrar:

-Elevado potencial biótico: determinado por su reproducción partenogenética y vivípara.

-Polimorfismo: que les permite el aumento de la población de formas especializadas en la reproducción asexual, en la reproducción sexual, en la migración (formas aladas), que garantizan el desarrollo de la especie aún en condiciones ambientales adversas.

-Alternancia de huéspedes: posibilidad de desarrollar sus ciclos completos en gran cantidad de especies vegetales cultivadas y silvestres.

-Gran capacidad de migración y dispersión: Por medio de las formas aladas y caminando en la misma hoja, hojas contiguas o de planta en planta.

Daños directos: succión de savia a partir de floema y la inyección de saliva tóxica, ocasionando debilitamiento de la planta, deformaciones del órgano afectado y achaparramiento, en estado de plántula. Poblaciones muy altas de la plaga, pueden ocasionar la muerte.

Daños indirectos: potencial transmisión de virus (55% de las transmitidas por artrópodos son a causa pulgones). La producción de melaza y posterior desarrollo de fumagina ocasiona pérdida en el acondicionamiento de poscosecha o en la calidad comercial. (Ferratto, Jorge A.; et al., 2010)

Son los adultos alados los que infectan. Al alimentarse o al intentar hacerlo en un tejido infectado, las partículas víricas se adhieren al estilete y al volver a alimentarse en un tejido sano, las partículas quedan en la herida iniciándose el proceso de infección de la planta sana. El tiempo de adquisición es muy corto y el que el insecto permanece infectivo es de algunas horas. (Strassera María Eugenia, 2013)

En España se recomienda realizar un tratamiento químico a inicio de acogollado si, se detecta un áptero vivo por cada 25 piezas. En la fase de roseta la tolerancia es muy superior.

No es aconsejable realizar un control químico cuando el cultivo es muy denso o las plantas son muy grandes con gran cantidad de hojas, donde la llegada del producto a la plaga es difícil.

1.3.4.4. Otras plagas.

-Mosca blanca

-Gusanos cortadores

-Coleópteros desfoliadores

-Isoca militar temprana

-Caracoles y babosas.(Ferratto, Jorge A.; et al., 2010)

1.4. Control de plagas y enfermedades.

Para disminuir los daños producidos por plagas y enfermedades los agricultores cuentan con diversos métodos. Entre ellas podemos mencionar: control biológico, etológico, cultural, mecánico, físico, genético y químico.

1.4.1. Control biológico.

La Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) define el control biológico como “la utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos”. En esta definición se incluyen no solo los parasitoides, depredadores y patógenos de insectos y ácaros, sino también el de fitófagos y patógenos de malezas. (Ferratto, Jorge A.; et al., 2010)

1.4.2. Control etológico.

Se entiende como la utilización de métodos de represión de plagas que aprovechan, las reacciones del comportamiento de los insectos.

Estos métodos incluyen la utilización de feromonas, de atrayentes en trampas y cebos, de repelentes, etc.(Noé Pino, Cesar A., 1986).

1.4.3. Control cultural.

Consiste en la utilización de las prácticas agrícolas, o algunas modificaciones de ellas, con el propósito de contribuir a prevenir los ataques de los organismos perjudiciales, hacer el ambiente menos favorable para su desarrollo, destruirlos, o disminuir sus daños.

Algunas pueden ser: partir de semillas sanas y suelo limpio, manejo de la fecha de siembra y plantación, rotaciones de cultivo, destrucción de maleza y limpieza de los bordes de lotes y campo, utilización de variedades resistentes, etc.(Ferratto, Jorge A.; et al., 2010)

1.4.4. Control mecánico

Estas técnicas consisten en la remoción y destrucción de los insectos, malezas y órganos infestados de las plantas. También se incluye la exclusión de los insectos u otros animales por medio de barreras y otros dispositivos. La aplicación de estas técnicas demanda mucha mano de obra.

Entre las diversas técnicas se pueden mencionar la recolección de insectos, la trituración de los mismos, la recolección de órganos infectados, la exclusión de insectos, o sea, el uso de métodos que imposibiliten el acceso de insectos dañinos.(Noé Pino, Cesar A., 1986).

1.4.5. Control físico.

Consiste en la utilización de algún agente físico como temperatura, humedad, insolación, fotoperiodos y radiaciones electromagnéticas en intensidades que resulten letales para los insectos.(Noé Pino, Cesar A., 1986)

1.4.6. Control genético.

El único caso efectivo y conocido de esta forma de control es la técnica de insectos estériles. Éstos compiten en apareamiento con los insectos normales.(Noé Pino, Cesar A., 1986)

1.4.7. Control químico.

Dentro del modo de producción y del desarrollo tecnológico de la actualidad, el control químico es la herramienta más valiosa para el manejo de plagas.

Los plaguicidas son los únicos instrumentos de control de plagas confiables para acciones de emergencia, para cuando los niveles poblacionales se aproximan o superan el umbral de daño económico, por tal motivo constituyen el núcleo del plan de control integrado.

Son altamente eficaces, de acción curativa rápida, adaptable a la mayoría de las situaciones de producción, y desde el punto de vista económico relativamente rentable.

A pesar de estas características muchos productores realizan numerosas aplicaciones innecesarias, con el consiguiente riesgo de contaminación de las personas, del ambiente y de los alimentos, como así también el surgimiento de poblaciones resistentes y plagas secundarias, las cuales se tratan de combatir con

las mismas herramientas y criterios que les dieron origen.(Ferratto, Jorge A.; et al., 2010)

2. GENERALIDADES DE PLAGUICIDAS.

2.1. Concepto de plaguicidas.

Según el artículo 2° del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (FAO, 1990) los plaguicidas son *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte”*. (Disponible en:<http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>)

2.2. Clasificación de plaguicidas.

La clasificación más común de los plaguicidas es la que los separa de acuerdo a la plaga que combaten:

- Insecticidas
- Herbicidas
- Fungicidas
- Acaricidas
- Nematicidas, etc.

Otra forma de clasificarlos es según su composición química:

- Organofosforados
- Carbamatos
- Organoclorados
- Piretroides

- Neonicotinoides

Este trabajo se centra en el estudio del comportamiento de imidacloprid que es un insecticida perteneciente a la familia química de los neonicotinoides, clase toxicológica II, muy utilizado para el control de pulgones por lo que solo se hará referencia a ese insecticida.

2.3. Neonicotinoides.

Son compuestos que tienen una estructura similar a la acetilcolina por lo que compiten con ella por los receptores en la membrana post-sináptica de la unión neuromuscular, para transmitir el impulso nervioso. La principal diferencia entre éstos es la forma de unirse, la acetilcolina se une de manera reversible al receptor, ya que la acetilcolinesterasa anula este fenómeno, mientras que los neonicotinoides lo hacen de manera irreversible. Por lo tanto la actividad de estos tóxicos ocasiona la generación de impulsos nerviosos permanentes, que provocan contracciones espasmódicas, convulsionantes y finalmente la muerte.

En los mamíferos, no presentan elevada toxicidad, ya que interactúan mal con los receptores acetilcolínicos, en el sistema nervioso central y periférico (Arregui, M. Cristina; Puricelli, Eduardo. 2008). Contrariamente un estudio realizado en el 2012 sugirió que la excitación y/o la desensibilización de los receptores nicotínicos de la acetilcolina por neonicotinoides (imidacloprid y acetamiprid) podrían afectar el desarrollo de los del sistema nervioso de los mamíferos. Frente a esto, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en febrero de 2014 publicó una opinión sobre el potencial de desarrollo de neurotoxicidad (DNT) de los insecticidas neonicotinoides. Ésta concluye que ambos compuestos pueden afectar el desarrollo y la función neuronal, aunque se han identificado varias limitaciones metodológicas por lo que se necesitan más estudios para lograr datos más robustos (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues. 2013).

Además, el empleo masivo de neonicotinoides ha sido vinculado a la desaparición de abejas obreras, este fenómeno se lo denomina “trastorno por colapso de colonia” (Colony Collapse Disorder).

Entre los insecticidas neonicotinoides se encuentran: acetamiprid, imidacloprid, tiacloprid, tiametoxam, etc.

A continuación se presentan las principales características del insecticida utilizado en dicha tesis, según el Manual de Tratamientos Fitosanitarios para Cultivos de Clima Templado Bajo Riego de Cucchi, Nello; Becerra, Violeta.

2.3.1. Imidacloprid.

Uso: insecticida.

Grupo químico: neonicotinoide (cloronicotinoide, cloronicotinilo, nitroguanidina)

Fórmula: (E)-1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilideneamina.



Marca	Formulación	Tipo de preparado	Empresa
Confidor 200 O-TEQ	20% OD	Dispersión oleosa	Bayer S.A
Confidor 35 SC	35% SC	Suspensión concentrada	Bayer S.A
Confidor 70 WG	70% WG	Gránulos dispersables	Bayer S.A
Confidor Forte 20 SL	20% SL	Líquido soluble	Bayer S.A
Gaucho 60 FS*	60% FS	Concentrado floable	Bayer S.A
Gaucho 70 WS*	70% WS	Dispersable en agua	Bayer S.A
Punto 70 WP	70% WP	Polvos mojables	Gleba S.A
Warrant	35% SC	Suspensión concentrada	Cheminova

*Terápico para semilla

2.3.1.1. Farmacodinamia del producto en el cultivo:

El imidacloprid es un producto sistémico, de translocación acrópeta, que se aplica frecuentemente con el riego por goteo. La molécula activa se traslada por la corriente xilemática ascendente de la raíz a las hojas y a los tejidos en crecimiento. Allí el insecticida alcanza una concentración elevada, que sobrepasa la dosis letal del agente perjudicial. Se aplica también por pulverización a la copa de la planta en cuyo caso es absorbido por la cutícula foliar, con acción citotrópica y translaminar, aunque la translocación desde las hojas tratadas a otras partes de la planta es limitada. De esta manera, la parte no alcanzada por el pulverizado o que nace o crece con posterioridad a la intervención fitosanitaria no resulta debidamente protegida. Allí, generalmente, la cantidad de principio activo transportado no alcanza la dosis letal para el insecto.

2.3.1.2. Principales características físico-químicas:

El principio activo es un cristal incoloro, con un olor característico y una muy baja presión de vapor, $4 \cdot 10^{-7}$ mPa a 20 °C, por lo que no sublima en condiciones normales. Es extremadamente soluble en agua, $6,1 \cdot 10^2$ mg L⁻¹ a 20 °C. Su coeficiente de partición octanol/agua KowlogP es 0,57 a 21 °C. La suspensión acuosa de este producto es estable a pH de 5 a 11. La actividad microbiana, la luz

y la humedad son factores importantes en la degradación del principio activo. Por otra parte, el imidacloprid se degrada por oxidación del anillo imidazolidínico, reducción o pérdida del radical nitro o hidrólisis al ácido 6-cloronicotínico, los que luego se mineralizan.

En la planta el principio activo se metaboliza por pérdida del grupo nitro, hidroxilación del anillo imidazolidínico e hidrólisis al ácido 6-cloronicotínico, que luego se conjugan con otros radicales.

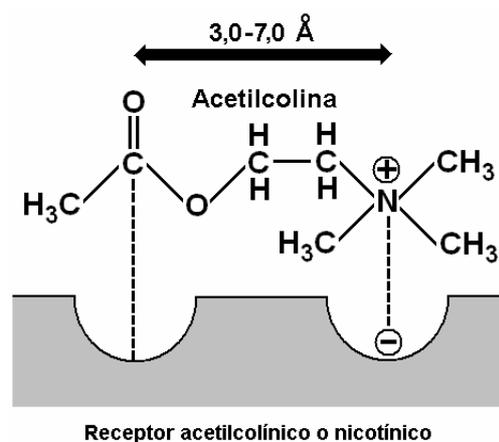
En el suelo es medianamente adsorbido por los coloides edáficos. La lixiviación de la molécula original y sus metabolitos es limitada, ya que no llegan a las capas profundas si se ha aplicado la dosis recomendada.

2.3.1.3. Modo de acción:

El imidacloprid actúa por **contacto e ingestión**. Tiene un amplio espectro de acción sobre insectos aleuródidos (mosca blanca), cochinillas, áfidos, lepidópteros, gusanos minadores, entre otros. Escapan a su acción nematodos y ácaros (eriófidos).

2.3.1.4. Mecanismo de acción:

La molécula de imidacloprid se une de manera permanente a receptores nicotínicos específicos, glicoproteínas de las membranas plasmáticas de las células nerviosas postsinápticas. Además, la molécula del insecticida no es hidrolizada por la acetilcolinesterasa, como ocurre con la acetilcolina, ni por otras enzimas. De esta manera, el insecticida mantiene el síndrome específico de excitación permanente en el insecto, que deja de alimentarse y termina con su muerte (Cucchi, Nello J. A.; Becerra, Violeta C. 2009).



3. RIESGOS POR LA UTILIZACIÓN DE PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son biocidas, es decir actúan sobre seres vivos, por ello su utilización supone un riesgo para el aplicador, para el medio ambiente y para el consumidor. Este trabajo se centrará solo en el riesgo para el consumidor.

Los riesgos de los residuos de plaguicidas están determinados por diversos factores, entre los que podemos considerar:

- Toxicidad del plaguicida:

Para determinar la toxicidad de un plaguicida se calcula la dosis letal media de la sustancia (DL_{50}). La DL_{50} se define como la cantidad mínima de un tóxico, generalmente expresada en mg/kg, que es capaz de matar al 50% de una población de animales de prueba expuestos a dicha sustancia. Los valores de la DL_{50} se extrapolan a los humanos y sirven de base para la clasificación de las sustancias por su toxicidad aguda o a corto plazo. Pero esta toxicidad aguda solo ocurre normalmente por error, accidente, ignorancia o suicidio. Por eso, desde el punto de vista de los residuos tienen mayor importancia la toxicidad a mediano plazo (toxicidad subcrónica) y sobre todo a largo plazo (toxicidad crónica). Para ello se realizan ensayos con animales, a través de la administración repetida y diaria del tóxico, utilizando lotes de animales con distintas dietas. El objetivo de éstos es conocer si dichas sustancias producen efectos cancerígenos, mutágenos, teratógenos o alteraciones en la reproducción, neurotoxicidad, etc.

- Grado o probabilidad de exposición del hombre a esos residuos: depende de los tratamientos que efectúen los agricultores y, de la composición de la dieta alimentaria media en la zona geográfica considerada

- Acumulación a través de la cadena alimenticia: el hombre puede ingerir residuos de plaguicidas no sólo al consumir vegetales tratados, sino también alimentos de origen animal, donde se hayan podido acumular estos residuos. Por ejemplo el alimentarse de carne o tomar leche de ganado alimentado con forrajes tratados con plaguicidas organoclorados y que ha ido concentrando los residuos en sus grasas o vísceras.

- Transformaciones metabólicas: la posibilidad de que los residuos sean o se transformen cuando penetran en los tejidos vegetales o animales, en otras sustancias más tóxicas que el plaguicida original.

- Potenciación por asociación con otras sustancias: en algunos casos la asociación de un plaguicida con otra sustancia, sea o no plaguicida, puede exaltar su toxicidad. (Coscolla, 1993).

4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CANTIDAD DE DEPÓSITO O RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

La cantidad de residuos en los vegetales depende de la cantidad de plaguicida depositada en la aplicación y de la eliminación de sus residuos en los vegetales antes de ser cosechados.

4.1. Factores propios de la aplicación.

4.1.1. Tipo de aplicación:

Cuanto mayor sea el tamaño de partícula en el caso de espolvoreo o tamaño de gota en pulverizaciones, mayor será el riesgo de deriva y evaporación.

Los depósitos procedentes de pulverizaciones líquidas son más tenaces que los procedentes de espolvoreos. Dentro de las aplicaciones líquidas, generalmente los plaguicidas formulados como emulsiones concentradas o líquidos emulsionables son más persistentes que los formulados como polvos mojables.

Además, si la aplicación es aérea, las pérdidas serán mayores que en tratamientos terrestres. (Coscolla, 1993).

4.1.2. Formulación de plaguicidas:

Además hay que tener en cuenta que los coadyuvantes que contienen ciertas formulaciones (mojantes, adherentes, etc.), que sirven para aumentar la eficacia biológica del plaguicida o la duración de dicha eficacia, pueden también aumentar la persistencia de sus residuos. (Coscolla, 1993).

4.1.3. Tipo de plaguicida: hay productos que por su estructura molecular son más fácilmente retenidos que otros. (Coscolla, 1993).

4.1.4. Dosis: a mayor dosis, mayor depósito. (Coscolla, 1993).

4.2. Factores propios del cultivo y del medio ambiente.

4.2.1. Morfología del vegetal: las características de la planta tratada influyen notablemente en la evolución de los residuos sobre la misma. Dentro de éstas, podemos mencionar la relación superficie/peso, el tamaño, la forma, la estructura física de su epidermis (rugosidad, pilosidad, etc.), como su composición química (recubrimiento céreo, etc.).

Por ejemplo para una dosis de plaguicidas, el depósito podría ser 20 veces superior en las lechugas que en los melones (por la mayor relación superficie/peso), además la eliminación podría ser más lenta en las lechugas por poseer recovecos que protegen los residuos y aumentan su persistencia. (Coscolla, 1993).

4.2.2. Distancia entre líneas: cuanto mayor sea la distancia, menor riesgo de deriva.

4.2.3. Condiciones climáticas: las altas temperaturas y el viento incrementan la evaporación y la deriva. (Coscolla, 1993).

4.3. Factores propios de la eliminación del producto.

4.3.1. Mecánicos: puede producirse por la acción de arrastre de la lluvia y el viento. Esta acción es más importante, cuanto más próxima este de la aplicación, cuando el depósito no está aún seco o bien adherido al vegetal. (Coscolla, 1993).

4.3.2. Físicos: volatilización y solubilización en agua.

En el caso de la volatilización, el paso del plaguicida al estado de vapor y por lo tanto su posterior eliminación a la atmósfera, es función de la tensión de vapor del plaguicida.

Además de la tensión de vapor, existen otros dos factores extrínsecos: el viento y la temperatura. El viento actúa renovando las capas de aire en torno a las plantas y en consecuencia, favoreciendo la volatilización, al impedir que se saturen estas capas de aire del vapor del plaguicida. En cuanto a la temperatura cuando ésta se incrementa, aumenta la tensión de vapor lo cual favorece la volatilización.

La solubilidad en agua es otra causa física a considerar no por su acción mecánica, sino que el plaguicida se disuelve parcialmente en el agua de lluvia y es eliminado con ella. (Coscolla, 1993).

4.3.3. Químicos: la estructura química de la materia activa determina su estabilidad, es decir sus mayores o menores posibilidades de ruptura o modificación.

La degradación química puede deberse a reacciones químicas simples como hidrólisis, oxidaciones, reducciones, isomerizaciones, decarboxilaciones, etc., o bien a reacciones más o menos complejas en las que intervienen procesos enzimáticos. (Coscolla, 1993).

4.3.4. Biológicos: el crecimiento del vegetal no supone una eliminación de residuos sino más bien una dilución de éstos, ya que al aumentar el peso del órgano vegetal, disminuye la cantidad de residuos. (Coscolla, 1993).

5. DISMINUCIÓN DE RESIDUOS POR TRATAMIENTOS DOMÉSTICOS.

Los productos vegetales generalmente se someten a un tratamiento doméstico (lavado, pelado, cocción, etc.). Éstos pueden disminuir el contenido de residuos de plaguicidas, dependiendo del tipo de plaguicida, de su localización en el alimento, del tipo de alimento y de la naturaleza e intensidad del tratamiento.(Coscolla, 1993).

5.1. Lavado

Los factores que determinan la eficiencia del lavado son:

- Tipo de plaguicida: cuanto más hidrosolubles, más fácilmente serán eliminados. Por ejemplo, el lavado en coliflores produjo una notable disminución de residuos de quinalfos y malatión que tienen una relativa solubilidad en agua, sin embargo fue menor para el fenitrotion y endosulfan que son casi insolubles.
- Tipo de formulación: adherentes u coadyuvantes aumentan la persistencia y disminuyen el grado de eliminación.
- Tipo de vegetal: la forma física del vegetal (recovecos en lechuga y alcachofa, etc.) y la composición química de su superficie (ceras, etc.) aumentan la retención del residuos.
- Tiempo transcurrido desde la aplicación: cuanto más tiempo, más difícil será eliminar el residuo, debido a su penetración parcial en tejido del vegetal.
- Tipo e intensidad de lavado: grado de agitación mecánica, pH, temperaturas, tiempo de lavado, etc. (Coscolla, 1993).

5.2. Pelado

Es muy eficaz para eliminar los residuos de pesticidas que quedan en la superficie del vegetal, no así para los pesticidas sistémicos.

El los frutos cítricos el pelado produce una eliminación total de los residuos de plaguicidas, ya que éstos penetran por su liposolubilidad en las celdillas de aceites esenciales, presentes en la corteza.

En general los residuos de plaguicidas se localizan en la superficie o en las primeras capas del tejido vegetal, por lo que este tratamiento puede eliminar entre un 70-90% de los residuos.(Coscolla, 1993).

5.3. Cocción.

El tratamiento por calor acelera la degradación de residuos de plaguicidas, es decir su transformación en compuestos más simples y menos tóxicos.

Sin embargo hay excepciones, por ejemplo los residuos de etilenbisditiocarbamatos al ser sometidos a una cocción se transforman en un metabolito más tóxico que la molécula original.(Coscolla, 1993).

6. NORMATIVA LEGAL SOBRE RESIDUOS DE PESTICIDAS.

Aunque algunos plaguicidas están prohibidos o restringidos por su elevada toxicidad, persistencia o efectos acumulativos, otros se hallan autorizados estableciendo previamente límites máximos de residuos (LMRs) en frutas y hortalizas. (Coscolla, 1993).

6.1. Límite Máximo de Residuo.

El límite máximo de residuo es la cantidad máxima de residuo de un determinado plaguicida sobre un determinado producto agrícola permitida por la Ley. Se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso del alimento fresco (mg/kg).

Para fijar los LMRs se consideran dos criterios, uno toxicológico y otro agronómico.(Coscolla, 1993).

6.1.1. Criterio toxicológico.

El primer parámetro que se calcula es el “nivel sin efecto” (NOEL o NISETO) que representa la cantidad de plaguicida que, ingerido diariamente durante toda la vida de los animales en experimentación, no les provoca efectos nocivos. Se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso del animal y día (mg/kg y día).

El siguiente paso es extrapolar el valor del NOEL, a la especie humana. Para ello se divide el nivel sin efecto por el coeficiente de seguridad, que generalmente es 100, con el fin de obtener la “ingesta diaria admisible” (IDA). El valor del coeficiente de seguridad se debe a que, se considera que el hombre es más sensible que los animales en experimentación, hasta 10 veces más (variedad interespecífica) y otro coeficiente de seguridad 10 es porque también se tiene en cuenta la sensibilidad individual en el ser humano (variedad intraespecífica), ya que puede haber mayor sensibilidad en niños, ancianos, enfermos, etc. La IDA se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo de peso del hombre y día.

Luego se calcula el “nivel permisible” de residuos para el hombre en alimentos., para ello se multiplica el IDA por el peso promedio del hombre, que se estima 60kg, y se divide por un factor alimentario, expresado en kilogramos y representa el consumo per cápita del alimento.

$$\text{nivel permisible} = \frac{\text{NOEL} \times \text{pesocuerpo humano}(60\text{kg})}{\text{Factor seguridad}(100) \times \text{factor alimentario}}$$

El nivel permisible se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramo de alimento (mg/kg o ppm).(Coscolla, 1993).

6.1.2. Criterio agronómico.

Se efectúan ensayos a campo con el objetivo de conocer el residuo real del plaguicida en estudio que queda sobre los alimentos, estos se realizan sobre la base de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).Se utiliza un plaguicida para combatir la plaga de forma efectiva, de manera que al aplicarlo el residuo que deje, tenga la concentración mínima posible. Los residuos que queden a cosecha no deben superar la IDA.(Coscolla, 1993).

En nuestro país la autoridad responsable de que estos límites se cumplan es el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agropecuaria (SENASA).

6.2. Tiempo de Carencia.

Los residuos de plaguicidas tienen un tiempo de degradación diferente, que varía en función del tipo de compuesto químico y las condiciones climáticas.

Dentro de los requisitos exigidos por SENASA para la inscripción de los productos fitosanitarios y/o ampliaciones de uso para nuevos cultivos es el análisis de los tiempos de degradación de los residuos en la naturaleza. De este análisis surgen los "Tiempos de carencia".

El Tiempo de carencia se define como: *la cantidad de días que deben transcurrir entre la última aplicación de un producto fitosanitario y la cosecha o pastoreo de animales. En el caso de aplicaciones postcosecha se refiere al intervalo entre la última aplicación y el consumo del producto vegetal.*

Es fundamental que estos tiempos se respeten, ya permiten obtener vegetales que a cosecha cumplan con los requisitos de inocuidad establecidos para su consumo además evita rechazos de exportaciones por incumplimiento de los límites de residuos exigidos internacionalmente (CASAFE, 2013).

CAPITULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Hipótesis 1:

Los residuos de imidacloprid aplicado en cultivo de lechuga disminuyen a través del tiempo.

Hipótesis 2:

Los residuos de imidacloprid aplicado en lechuga disminuyen mediante tratamientos de lavado doméstico, siendo mayor la reducción por inmersión que por lavado manual.

2. OBJETIVOS

Objetivos generales:

- Estudiar degradación de imidacloprid en cultivo de lechuga.
- Determinar el porcentaje de reducción de imidacloprid mediante tratamientos de lavado doméstico.

Objetivos particulares:

- Evaluar el nivel de residuos de imidacloprid luego de 0-3-7 días posteriores a la primera aplicación, en *Lactuca sativavar. capitata* en Maipú, Mendoza.
- Evaluar el nivel de residuos de imidacloprid luego de 0-7-14 días posteriores a la segunda aplicación, en *Lactuca sativavar. capitata* en Maipú, Mendoza.
- Determinar el porcentaje de reducción de imidacloprid mediante lavado doméstico por inmersión.
- Determinar el porcentaje de eliminación de imidacloprid mediante lavado en forma manual.

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

1. ENSAYO A CAMPO: Obtención de modelo de comportamiento de imidacloprid a campo.

El ensayo se llevó a cabo en la finca perteneciente al Sr. Roberto Scaiola localizado en la calle Belgrano del distrito de Coquimbito, Maipú. El cultivo de lechuga poseía tela antigranizo y riego superficial por surcos. Las plantas fueron trasplantadas el 13 de diciembre de 2013.

El ensayo se llevó a cabo en una parcela de seis surcos de 70m de largo, con 700 plantas cada uno, distanciados 0.5m entre ellos. Se dejaron de bordura, dos surcos consecutivos de los extremos de cada lado. En la parte central de la parcela, se usaron 2 hileras, cada una dividida en tres repeticiones, la primera (ubicada más al oeste) para realizar el ensayo de curva de degradación del insecticida y la segunda para el ensayo de lavado.

La primera aplicación se realizó el día 3 de enero de 2014 con imidacloprid OD 20 % en una dosis de 90 cm³ /hl según la Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, con un gasto de 500 litros por hectárea. Se aplicó con una mochila a motor Stihl calibrada con un gasto de 1L por minuto. Es importante aclarar que esta aplicación fue planeada en diciembre pero no se pudo realizar por inclemencias del tiempo (numerosas lluvias). La segunda aplicación se realizó el

17 de enero. La razón por la que se realizó más de una aplicación es porque a través de entrevistas a productores se pudo ver que ellos en la práctica aplican cada 10 días. Como la lechuga en verano tiene un ciclo de aproximadamente 45 días, se decidió realizar 2 aplicaciones para poder observar el comportamiento del insecticida a través del tiempo y a su vez observar si existe acumulación del residuo cuando se realizan 2 aplicaciones cada 15 días.

Las muestras para la realización de la curva de degradación de la primera aplicación se tomaron el día cero, tres, siete, y para la curva de degradación de la segunda aplicación, el día cero, siete y catorce. Para el ensayo de lavado, las muestras fueron tomadas el 17 de enero de 2014, día en el que se realizó la segunda aplicación utilizando la misma dosis y condiciones que en la primera. La razón por la cual se realizó en esta fecha, es porque el insecticida utilizado tiene un periodo de carencia de 3 días y además para evitar el riesgo de que las elevadas temperaturas producidas durante dicho mes, estimularan la subida de la flor. La floración prematura o "bolting" consiste en el alargamiento del tallo floral antes de llegar al momento óptimo de cosecha (efecto indeseable).

En ambos ensayos el muestreo fue sistemático con arranque aleatorio, es decir se escogió aleatoriamente un número entre 1 y 9, se tomó la primera planta y luego cada 15 plantas se tomó otra, el total de la muestra por repetición fue de 6 plantas por repetición. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno identificadas con la fecha de muestreo y el número de repetición. Posteriormente se llevaron al laboratorio de pesticidas.



2. ENSAYO DE LAVADO.

Las hortalizas de consumo en fresco generalmente se someten a un lavado antes de ser consumidas. En la actualidad el lavado de hortalizas se realiza en ocasiones manualmente bajo el agua para eliminar la suciedad que pudieran permanecer en la superficie, aunque en algunos utilizan recipientes para sumergirlas, luego las sacan y escurren. Es por ello, que en este trabajo se procedió a realizar estos dos tipos de tratamientos para comparar cuál de ellos producía una mayor reducción en el contenido de residuos de pesticidas del producto

En el tratamiento llamado LA, se lavó cada hoja de las muestras de lechuga con las manos bajo el agua de grifo.



En el tratamiento llamado LB, el lavado se realizó por inmersión. Las muestras de lechuga se colocaron en recipientes con 3 litros de agua a 25°C, durante 5 minutos.

Además se dejó un testigo (LE) al que no se le realizó ningún tipo de lavado.

3. METODOLOGÍA DE LABORATORIO

La muestra que llega al laboratorio debe ser representativa del total del lote por lo que la muestra en general era de 2 kg. Luego se procede al cuarteo de la misma para mantenerla representatividad de la muestra analítica.

En el laboratorio se realizó los distintos tipos de lavado (lavado manual e inmersión) y se procesaron las muestras tanto de la curva de degradación como las del ensayo de lavado, luego éstas se colocaron en tarros con su correspondiente identificación y se conservaron en freezer hasta el momento del análisis. La extracción de todos los residuos de pesticidas se realizaron utilizando el método de Luke modificado por el laboratorio. El análisis cromatográfico se hizo por UPLC MS MS.

3.1. Determinación de imidacloprid

3.1.1. Reactivos y equipos.

- Solventes: acetona, éter de petróleo y diclorometano de calidad cromatográfica; agua y acetonitrilo de calidad HPLC.
- Lana de vidrio previamente enjuagada con acetona.

- HomogenizadorOmniMixer.
- Campana y extractor.
- RotavaporBucchi.
- Matraces de 5ml.
- Probeta de 100ml
- Ampolla de decantación de 500ml.
- Embudos.
- Matraz de evaporación de 500ml.
- Sulfato de sodio anhidro.
- Balanza granatariaOhausAdventurer
- Cromatógrafo líquido MS/MS

3.1.2. Descripción de la determinación de imidacloprid

Para la extracción de imidacloprid, se realizará el método de Luke modificado por el laboratorio de Análisis de pesticidas de la EEA MENDOZA de INTA, que consiste en, mezclar la muestra con acetona, diclorometano y éter de petróleo de esta manera el pesticida es transferido de la fase acuosa a la fase orgánica. Éstas al ser inmiscibles se separan, por lo que se procede a eliminar el agua y el resto se evapora hasta la sequedad, luego el insecticida se recupera con una solución acetonitrilo.

El método ha sido validado, para ello se evaluaron los siguientes parámetros:

- **Recuperación:** se realizó un estudio de exactitud de imidacloprid en muestras de lechuga. Para ello se dejó muestras de control, para corroborar que no hubieran residuos del insecticida en estudio en la muestra utilizada y se realizaron fortificaciones en tres niveles, cada una con 5 repeticiones. Posteriormente se realizó la extracción y luego se inyectaron en el cromatógrafo líquido. Se obtuvieron recuperaciones de 80-93% de imidacloprid en lechuga, aceptables para el compuesto en estudio.
- **Precisión:** se llevó a cabo calculando la media, desviación estándar y coeficiente de variación (CV%) para cada nivel de fortificación.

- **Linealidad:** se realizó la inyección del estándar en tres puntos de concentración creciente, con un número de tres réplicas por nivel evaluado. Posteriormente se hizo el estudio de regresión lineal entre el área (respuesta del detector) y la concentración hallada (mg/kg). Dicha relación se representó gráficamente a través de la ecuación de la recta $Y = a + b X$.
- **Límite de detección (LD):** se determinó a partir de la ecuación de la recta. El LD para imidacloprid en lechuga es de 0,01ppm.
- **Límite de cuantificación (LC):** se consideró tres veces el límite de detección. El LC para este método es de 0,03ppm.

El método se detalla a continuación.

1. Pesar 30 g de muestra en un tarro del mixer previamente tarado e identificado con el número de muestra, adicionar (bajo campana) 40 ml de acetona medidos con probeta de 100 ml, mezclar en el mixer por un tiempo aproximado de 1,5 minutos.
2. Agregar (bajo campana), 20 ml de diclorometano y 20 ml de éter de petróleo medidos con probeta de 100 ml, y agitar por 2 minutos aproximadamente.
3. Pasar a ampolla de decantación, filtrando en un embudo con lana de vidrio que previamente ha sido enjuagada con acetona (bajo campana).
4. Dejar separar en fases. La fase orgánica queda en la parte superior y la acuosa en la inferior. El residuo sólido con lana de vidrio y la fase acuosa son volcados nuevamente al tarro de mixer. La fase orgánica que queda en la ampolla, es pasada al matraz de evaporación a través del embudo con lana de vidrio y 5 g de sulfato de sodio anhidro
5. Al contenido del mixer (residuo sólido y fase acuosa) se le agregan 20 ml de diclorometano y se mezclan durante aproximadamente 1,5 minutos. Luego se vuelcan nuevamente a la ampolla a través del embudo con lana de vidrio enjuagada con acetona. Se enjuaga una vez más el tarro del mixer con 10 ml de diclorometano y se vuelca en la ampolla con lana de vidrio enjuagada con acetona.
6. Repetir la separación de fases. La fase acuosa queda en la parte superior y la fase orgánica en la inferior. La fase orgánica pasa al matraz para evaporación de 500 ml que ya tenía el solvente del paso 5 (identificado con el número de muestra) y la fase acuosa se elimina

7. Agregar 10 ml de diclorometano medido con probeta de 50 ml a la ampolla dedecantación, para enjuagar las paredes y volcar al matraz. Los residuos sólidos generados se eliminan.

8. Evaporar en rotavapor, con vacío entre una presión de -10 y -20 mm Hg, a 45 °C +/- 2 °C, asegurando que no llegue a sequedad.

9. Recuperar con solución acetonitrilo (enjuagando bien todas las paredes del mismo), y llevar a 5 ml en un matraz.

10. Traspasar a un vial el extracto y disolver con agua grado HPLC (1:1)

11. Inyectar en UPLC MS MS.

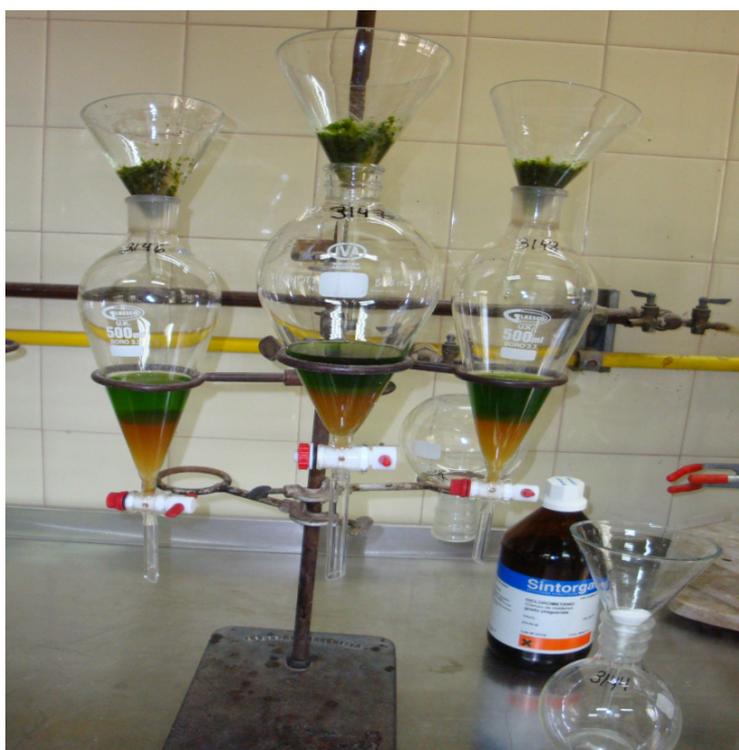


Foto N°3: Pesada de muestra en tarro mixer.

Foto N°4: Separación de fases en ampolla



Foto N°5: Evaporación en rotavapor.

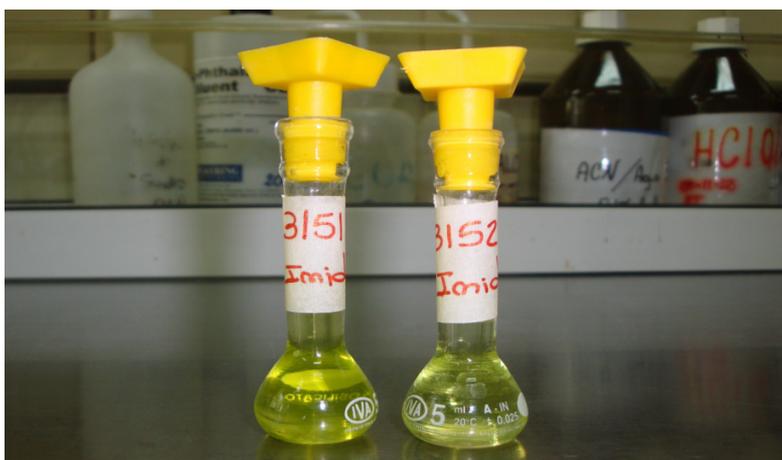


Foto N°6: Recuperación con acetonitrilo en matraz de 5 ml

Una vez extraídos los residuos, se realizó la determinación cuantitativa por cromatografía líquida MS/MS.



Foto N°7: UPLC MS/MS

3.2. Preparación del estándar.

Preparación de solución madre del plaguicida.

Se realizó por método gravimétrico en una balanza Ohaus Pioneer, se colocó en un matraz de 50ml, 13,2mg del estándar con una pureza de 99,9%, luego se agregó acetonitrilo hasta llegar a un peso de 47,5661g. Obteniendo una concentración de 277ppm de imidacloprid.

Preparación de solución de trabajo del plaguicida.

Se hicieron diluciones sucesivas hasta obtener un estándar de 1,21ppm. Para inyectar el estándar en el UPLC MS MS se realizó otra dilución en un vial agregando 600µl de del estándar de trabajo y 600µl de agua grado HPLC.

3.3. Condiciones cromatográficas.

Condiciones CL:

Sistema: WatersAcquity UPLC H-Class.

Columna: BEH C18 (100 x 2.1 mm, partículas de 1.7 µm).

Temperatura de columna: 40 °C.

Fase móvil A: Agua 0,1% de ácido fórmico.

Fase móvil B: Metanol 0,1% de ácido fórmico.

Elución: gradiente.

Tiempo (min.)	%A	%B
inicial	75.0	25.0
0.25	75.0	25.0
7.75	5.0	95.0
8.50	0.0	100.0
10.50	75.0	25.0
11.00	75.0	25.0

Caudal:0,3 ml/min.

Inyección:10 µL.

Condiciones MS:

Sistema Masa: Xevo TQD

Modo de Ionización: ESI (+)

Voltaje Capilar:3,0 kV

Temperatura desolvatación: 500°C.

Temperatura de la fuente: 150 °C.

Gas de colisión: Argón.

3.4. Cálculo

Para el cálculo de la concentración de residuos, se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Concentración} \left(\frac{mg}{kg} \right) = \frac{AM}{AP} \times CP \times \frac{VRF}{m}$$

AM: Área de muestra

AP: Área de patrón

CP: Concentración de patrón (mg/kg)

VRF: Volumen de recuperación final (ml)

m: peso de muestra (g)

3.5. Análisis de datos.

En el caso de las curvas de degradación a campo, para determinar el mejor ajuste de los datos se probaron diferentes modelos (Regresión lineal, exponencial y potencial), con Excel 2010. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo exponencial negativo.

Para el ensayo de lavado, los datos obtenidos fueron objeto de análisis estadístico, usando Análisis de la Varianza (ADEVA) y Pruebas de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. Para ello se usó InfoStat Versión Estudiantil.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Curva de degradación a campo.

Los resultados obtenidos durante la primera y segunda aplicación de imidacloprid en el cultivo de lechuga se encuentran en las tablas N°1 y N°2.

Tabla N°1: Residuos de imidacloprid en las muestras extraídas durante la primera aplicación.

1° APLICACIÓN						
Día de muestreo	Días después de aplicación(DDA)	Repeticiones	Residuos de imidacloprid en ppm	Media	Desviación estándar	CV%
03/01/2014	0	R1	0,95	0,92	0,04	4,10
		R2	0,94			
		R3	0,88			
06/01/2014	3	R1	0,07	0,09	0,03	38,75
		R2	0,13			
		R3	0,07			
10/01/2014	7	R1	0,03	0,04	0,01	32,63
		R2	0,04			
		R3	0,06			

Tabla N°2: Residuos de imidacloprid en las muestras extraídas durante la segunda aplicación.

2° APLICACIÓN						
Día de muestreo	Días después de aplicación(DDA)	Repeticiones	Residuos de imidacloprid en ppm	Media	Desviación estándar	CV%
17/01/2014	0	R1	0,60	0,61	0,05	8,39
		R2	0,57			
		R3	0,67			

24/01/2014	7	R1	0,01	0,02	0,01	33,54
		R2	<0,01			
		R3	0,02			
31/01/2014	14	R1	<0,01	-	-	-
		R2	<0,01			
		R3	<0,01			

Los resultados obtenidos de la primera y segunda aplicación, se encuentran dentro de los parámetros de reproducibilidad que acepta el Laboratorio de Pesticidas para sus validaciones de métodos, excepto el día 6 de enero, que tuvo un Coeficiente de Variación de 38,75%. Dichos parámetros se basan en la Guideline on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis (CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003) del Codex Alimentario.

Concentración	Reproducibilidad (CV %)
1 µg/kg ≤ 0,01 mg/kg	46
> 0,01 mg/kg ≤ 0,1 mg/kg	34
> 0,1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	25
> 1 mg/kg	19

Se puede observar que el depósito inicial en ambas aplicaciones, se encuentra por debajo del Límite Máximo de Residuo de imidacloprid para Argentina, previsto en la Resolución SENASA 608/12, y para otros países, ver tabla N° 3

Tabla N°3: Límites Máximos de Residuos de imidacloprid en lechuga establecidos por diferentes países.

Argentina	Canadá	Japón	Unión europea	USA	Codex
3	3,5	3	2	3,5	2

Las curvas de degradación de la primera y segunda aplicación pueden observarse en las Figuras 1 y 2.

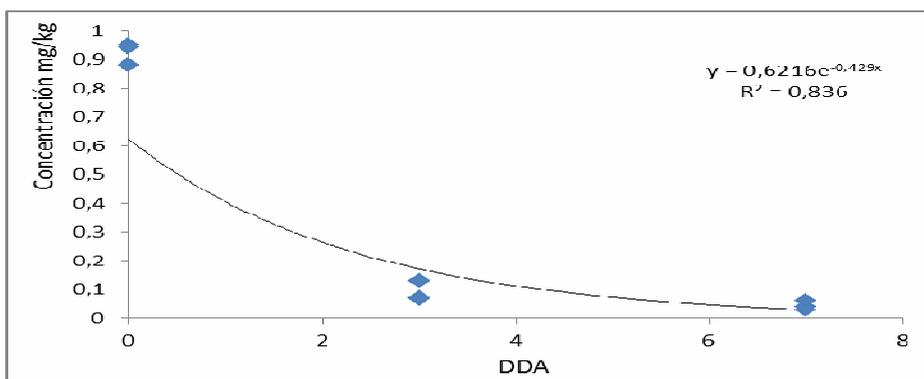


Figura N°1: Curva de degradación de imidacloprid en lechuga morada durante la primera aplicación, en la localidad de Maipú, Mendoza.

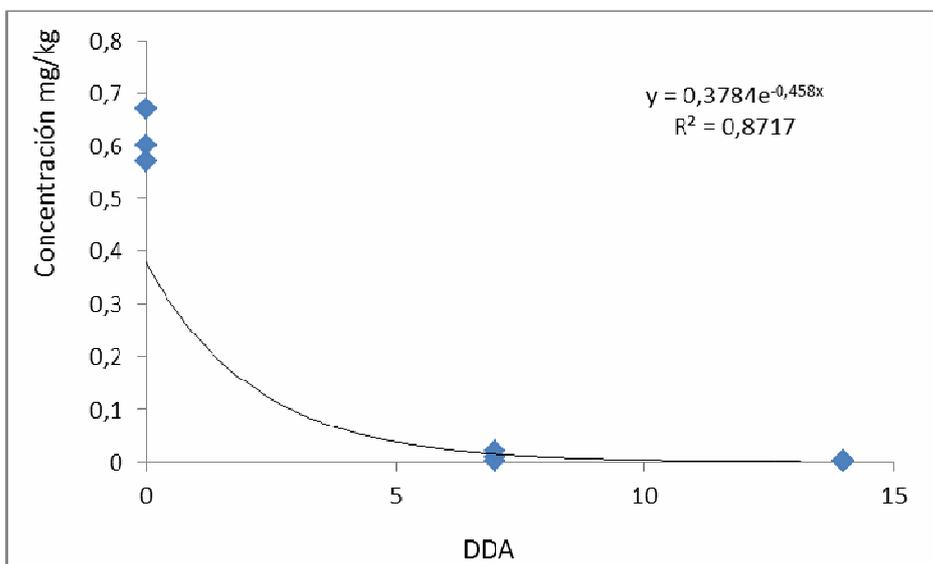


Figura N°2: Curva de degradación de imidacloprid en lechuga morada durante la segunda aplicación, en la localidad de Maipú, Mendoza.

Observando las curvas de degradación del insecticida en estudio, vemos que tuvo una disminución muy importante de su concentración durante los primeros 7 días de la aplicación, posteriormente la degradación es más lenta. Por lo que se confirma la primera hipótesis planteada.

En la temporada 2005/2006, INTA EEA Mendoza, realizó un ensayo de “curvas de degradación de pesticidas e influencia en la vinificación”, donde se aplicaron imidacloprid y otros pesticidas, obteniendo una fuerte caída de los niveles de residuos después del tratamiento, luego continuó una etapa de degradación media y finalmente la curva se mantuvo estable, con un bajo grado de declinación

(Becerra, 2006). Dicho comportamiento concuerda con el descrito en los resultados obtenidos en este estudio.

Además se observó que no hubo acumulación de residuos luego de la segunda aplicación ya que a partir de los 7 días los 2 tratamientos resultaron con residuos similarmente bajos.

Frank V. Sances publicó un trabajo sobre múltiples tratamientos de mevinfos, metomil y permetrina aplicados en lechuga y además comparó si había acumulación aplicando dichos plaguicidas a intervalos de 2, 4 y 8 días. Solo las aplicaciones sucesivas cada 2 y 4 días mostraron una gran acumulación de los residuos, mientras que cada 8 días solo la permetrina sufrió un incremento, el resto no. (Sances, Frank V. et al. 1993). Más allá de que los insecticidas empleados no sean el que se utilizó en este ensayo podemos decir en líneas generales que intervalos de 14 días no producen acumulación de residuos.

2. Ensayo de diferentes tratamientos de lavado

En la tabla N°4, se encuentran las concentraciones de imidacloprid obtenidos en lechuga, antes y después de ser sometidos a los diferentes lavados, manual (LA) e inmersión (LB) junto con los valores de media, desviación estándar y los coeficientes de variación expresados en porcentaje (%CV).

Tabla N°4: Concentración en mg/kg de los residuos de imidacloprid en lechuga obtenidos antes y después de ser sometida a los diferentes tipos de lavado.

Tratamiento	Repetición	Concentración ppm	Media	Desviación estándar	%CV
LA	R1	0,5	0,41	0,04	9,22
	R2	0,44			
	R3	0,43			
LB	R1	0,3	0,31	0,03	8,55
	R2	0,34			
	R3	0,29			
LE(Tgo)	R1	0,63	0,64	0,02	3,27
	R2	0,62			
	R3	0,66			

Los resultados obtenidos del ensayo de lavado, se encuentran dentro de los parámetros de reproducibilidad según los criterios de validación propuestos por el

Codex alimentarius en su informe sobre Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas

Los residuos de imidacloprid obtenidos en los diferentes tratamientos y su reducción, a partir de los diferentes lavados (manual e inmersión), expresada en porcentaje se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla N°5: Concentración en mg/kg de los residuos de imidacloprid en lechuga obtenidos antes y después de ser sometida a los diferentes tipos de lavado, manual e inmersión, y sus respectivos porcentajes de reducción.

Repeticiones	Tratamientos			Porcentaje de reducción	
	LA	LB	LE(Tgo.)	%RA	%RB
R1	0,5	0,3	0,63	20,63	52,38
R2	0,44	0,34	0,62	29,03	45,16
R3	0,43	0,29	0,66	34,85	56,06

LA: Lavado manual.

LB: Lavado por inmersión

LE: Testigo (no se le realizó ningún tipo de lavado)

%RA: Porcentaje de reducción después de lavado manual.

%RB: Porcentaje de reducción después de lavado por inmersión.

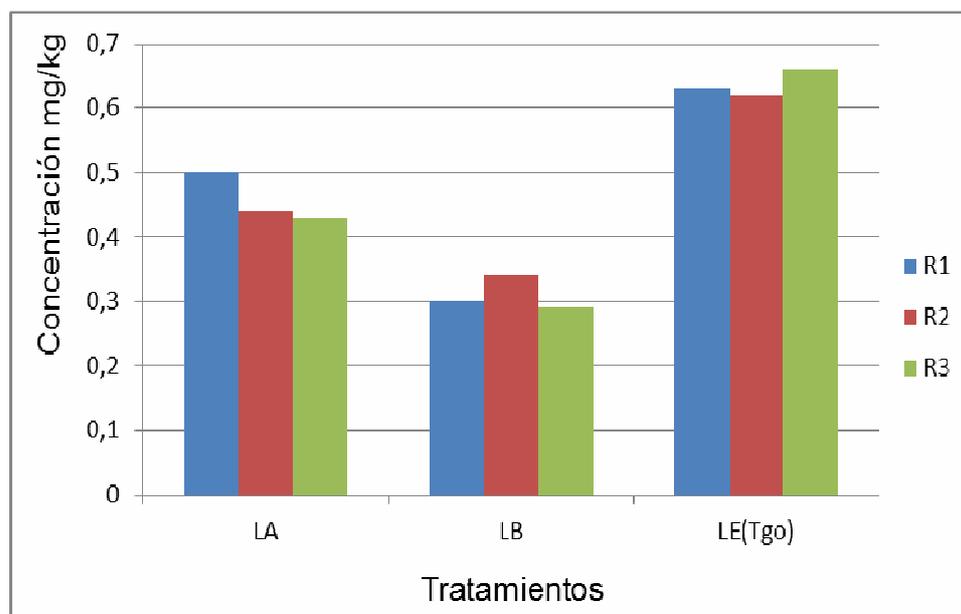


Figura N°3: Concentraciones de imidacloprid (mg/kg) en lechuga morada obtenidas antes y después de los distintos tipos de lavado.

Según la tabla N°5, las concentraciones de imidacloprid presentes antes y después de someterse a los tratamientos de lavado con agua presentan estadísticamente diferencias significativas, por lo que se confirma la segunda hipótesis de que los residuos del insecticida disminuyen mediante tratamientos de lavado doméstico, siendo más efectivo el tratamiento por inmersión.

Tabla N°5: Medias de residuos imidacloprid por tratamientos y su reducción por lavado manual y por inmersión.

TRATAMIENTOS	Medias	Reducción (%)
LA	0,46± 0,02a	28,17
LB	0,31± 0,02b	51,20
LE(Tgo)	0,64± 0,02c	N/A

*Media (mg/kg) ± error estándar (n = 3). Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (Tukey HSD, p <0,05). Letras minúsculas (a, b, c) son utilizadas para comparar los tratamientos.

Investigadores del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos en Pakistán realizaron un ensayo sobre la minimización de residuos de imidacloprid en pepino y pimiento, a través de lavado con soluciones de ácido cítrico y soluciones de ácido acético a 1,5, 3, 6 y 9% y una combinación de ambos (50:50) durante 5 min. Además se dejó un testigo al que solo se le realizó un lavado manual con agua de grifo (Muhammad AtifRandhawa, et al. 2014). El lavado por inmersión con ácidos orgánicos redujo el contenido de imidacloprid hasta un 80% en el pepino y el pimiento. Sin embargo las muestras sometidas a un lavado manual no produjeron reducción en los residuos de imidacloprid, a diferencia de los resultados obtenidos en esta tesis donde sí se observa una disminución de los residuos (20-35% aproximadamente). Con respecto al tratamiento por inmersión, corroborando esta información con nuestro resultado, podemos decir que es mucho más efectivo, aunque podría lograrse mayor reducción en soluciones acidas.

En el 2003 se publicó una investigación acerca de la distribución de múltiples residuos de plaguicidas en manzana después de ser sometidos a lavado, almacenamiento, ebullición y pelado. Los pesticidas en estudio fueron clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, diazinon, endosulfan, endosulfan sulfato, fenitrotion, fenpropatin, iprodiona, cresoxim metilo, lambdacialotrina, quinalfos, tolifluanida y vinclozolin. Los resultados mostraron que al pelar las manzanas los residuos se redujeron significativamente, mientras que con simple lavado ninguno de los residuos disminuyeron significativamente. Almacenar redujo en un 25 a 69% los residuos de clorpirifos, fenitrotión, cresoxim metilo y tolifluanida, pero el endosulfan

sulfato se incrementó en un 34%. El hervido redujo los residuos de fenitrotión y tolifluanida en un 32 y 81% respectivamente. (Rasmussen RR. et al.,2003). Los insecticidas y fungicidas de dicho trabajo son insolubles en agua. Por lo que podemos decir que la disminución de residuos durante el lavado, presenta una estrecha relación con la solubilidad en agua de los principios activos.

Un estudio del efecto de residuos del insecticida imidacloprid en la bioquímica de papas, dice que al someter a las mismas a un lavado con agua de grifo y a cocción durante 20 minutos, hubo una disminución de los residuos hasta un 33% y 80%, respectivamente.(Shailendra S. Chauhan et al.,2013.). En lo referente al tratamiento de lavado, los resultados son similares a los hallados en esta investigación, a pesar de tratarse de dos hortalizas muy diferentes.

CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN

De acuerdo a lo planteado en la primera hipótesis de la presente tesis de grado, se ha confirmado mediante los resultados obtenidos durante el ensayo a campo, una disminución significativa de los residuos de imidacloprid aplicados en el cultivo de lechuga; ya que las curvas de degradación de imidacloprid tanto en la primera como en la segunda aplicación, mostraron una disminución importante de su concentración durante los primeros 7 días de la aplicación. En la primera la disminución fue del 95,7% mientras que en la segunda fue del 96,7%. Además, respetando la dosis según Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, el producto presentó residuos por debajo del LMR previstos en la Resolución SENASA 608/12, aún el mismo día de aplicación.

Asimismo se observó que no hubo acumulación de residuos luego de realizar una segunda aplicación en un intervalo de 15 días.

El ensayo de lavado, permitió confirmar la segunda hipótesis de que los residuos de imidacloprid aplicados en lechuga disminuyen mediante tratamiento doméstico, siendo mayor la reducción por inmersión que por lavado manual. Los resultados obtenidos mostraron que el lavado por inmersión redujo significativamente los residuos de imidacloprid en aproximadamente 51,2%, mientras que el lavado manual redujo solo el 28,17%. Por lo que se ha demostrado que el lavado por inmersión es más efectivo en la disminución de los niveles de imidacloprid.

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA

Adlercreutz E., Carmona D., Huarte D., Melegari A., Szczesny A., Tulli M.C., Viglianchino L., 2013. "Protocolo para la producción integrada de lechuga en el sudeste de la provincia de Buenos Aires". Ed. INTA. 79p. Pág. 1.

Arregui, M. Cristina; Puricelli, Eduardo. 2008. "Mecanismo de acción de plaguicidas" Dow AgroSciences Argentina S.A., Argentina. pp. 45-48. ISBN:978-987-05-4191-2.

Becerra, Violeta, 2006. "Curvas de degradación de pesticidas e influencia en la vinificación y en la calidad final del vino". PROYECTO PNV 520510. Informes 2006 INTA EEA Mendoza, Argentina. Pág. 1-5. Inédito.

CASAFE, 2013. Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina. Edición 2013/2015. Editada por: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Pág. XXIX.

Coscolla, R.1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales". Ed. Mundi-Prensa-Madrid-España. 205p. Pág. 39-49, 73-80, 84-89, 133-135.

Cucchi, Nello J. A.; Becerra, Violeta C. 2009. "Manual de Tratamientos Fitosanitarios para Cultivos de Clima Templado Bajo Riego". Sección III: Vid. Tomo II. Ediciones INTA, Mendoza, Argentina. Pág. 613-615.

EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). 2013. Scientific Opinion on the developmental neurotoxicity potential on acetamiprid and imidacloprid. En: EFSA Journal, 11 (12): 3471, 47 p. (Last updated: 21 February 2014. This version replaces the previous one/s.)(Disponibile en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3471.htm>) [Consulta: 15 de junio, 2014]

FAO, 2002. "Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas". Pág. 5 (Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>) [Consulta: 10 de octubre, 2014]

Ferratto, Jorge A.; Mondino, M. Cristina; Grasso, Rodolfo; Ortiz Mackinson, Mauricio; Longo, Alejandro; Carrancio, Luis; Firpo, Inés Teresa; Rotondo, Roxana; Zembo, Juan Carlos; Castro, Guillermo; García, Matías; Rodríguez Fazzone, Marcos. 2010. "Buenas Prácticas Agrícolas para la Agricultura Familiar. Cadena de las principales hortalizas de hojas en Argentina". 533p. Pág. 271-292.

Gerencia de Calidad y Tecnología. Año 2012. "La Producción de Hortalizas en Argentina". Pág.2-3.

Instituto de Desarrollo Rural, 2014. Estimación de la superficie cultivada con hortalizas en Mendoza. Temporada 2013-2014. Pág. 4-6.

Muhammad AtifRandhawa, Muhammad NaveedAnjum, MasoodSadiqButt, Muhammad Yasin& Muhammad Imran. 2014. Minimization of imidacloprid residues in cucumber and bell pepper through washing with citric acid and acetic acid solutions and their dietary intake assessment. International Journal of Food Properties Volume 17, Issue 5, 2014, pages 978-986

NoéPino Cesar A., 1986. "Control integrado de plagas". (Disponible en: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/eco/003106/03106-07-A1.pdf>) [Consulta: 27 de setiembre, 2014]

Rasmussen RR, Poulsen ME, Hansen HC. 2003. Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing. Food AdditContam. 2003 Nov;20(11):1044-63.

Sances, Frank V.; Gaston, Lyle K.; Campos, Ricardo; Dusch, Maggie; Toscano, Nick C. 1993. Multiple Insecticide Treatments Affect Harvest Residues of Lettuce. Journal of Economic Entomology, Volume 86, Number 6, December 1993, pp. 1781-1785(5).

Shailendra S. Chauhan, SanjeevAgrawal, AnjanaSrivastava. 2013. Effect of imidacloprid insecticide residue on biochemical parameters in potatoes and

estimation by HPLC. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, Volume 6, Suppl. 3, 2013. pp. 114-117

Strassera María Eugenia, 2013. "Sanidad en cultivos intensivos 2013". Ed. INTA. 110p. Pág.68.