

**COMPORTAMIENTO DE LOS RESIDUOS DE
CLORPIRIFOS EN UVAS Y VINOS**

Brom. Rosanna G. Navarro

**TESIS DE GRADO PARA LA OBTENCION DEL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA**

**Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Cuyo**

2014

Tesis de grado para la obtención del título de Licenciado en Bromatología.

Título: “Comportamiento de los residuos de clorpirifos en uvas y vinos”

Autor: Brom. Rosanna Navarro

Director: MSC Ing. Agr. Violeta Becerra

Tribunal Evaluador

Presidente: Dra. Alejandra Camargo

Vocales: Ing. Agr. Susana Del Toro
Ing. Agr. Ignacio Galarraga

Suplente: MSC Jorge Nazrala

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Desarrollo de la superficie cultivada con vid en la Argentina	6
1.2. Situación en Mendoza	7
1.3. Situación fitosanitaria	8
1.4. Antecedentes del uso de clorpirifos	11
2. RESIDUOS DE PLAGUICIDAS	13
2.1. Plaguicida	13
2.2. Depósito inicial	13
2.3. Residuos de plaguicidas	13
2.4. Buenas prácticas agrícolas (BPA)	14
2.5. Periodo de carencia	14
2.6. Expresión de los residuos de plaguicidas	14
2.7. Formación y evolución de los residuos	15
2.8. Degradación de los residuos	16
2.9. Curvas de disipación de plaguicidas	18
3. NORMATIVA LEGAL	19
3.1. Límite Máximo de Residuos	19
3.1.1. Criterio toxicológico	19
3.1.2. Criterio agronómico	20
4. CARACTERÍSTICAS DEL CLORPIRIFOS	22
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVO GENERAL	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1. Ensayo en campo	25
7.1.1. Aplicación del insecticida	26
7.1.2. Toma de muestra	26
7.2. Ensayo en bodega	28
7.2.1. Toma de muestra	31
7.3. Análisis de los residuos en el laboratorio	32
7.3.1. Análisis cromatográfico	33

7.3.2. Método de extracción desarrollado	35
7.3.3. Cálculos	36
8. RESULTADOS	37
8.1 Ensayo en campo	37
8.2 Ensayo en bodega	40
9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	47
9.1 Ensayo en campo	47
9.2. Ensayo en bodega	48
10. BIBLIOGRAFÍA	50

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de distintos sectores de la Estación Experimental Mendoza de INTA.

Agradezco la ayuda recibida por:

Valeria Portillo, Daniel Puebla, Damián Porreta, Javier Torres, que realizaron las tareas de campo.

Estefanía Marchesini y Agustín Elaskar, que colaboraron en la redacción.

Norma Pieralisi, que me facilitó la bibliografía consultada.

Santiago Sari, Federico Casassa y Esteban Bolcato, que se encargaron del proceso de vinificación, realizado en la bodega experimental.

Violeta Becerra, mi directora, por guiarme en la redacción de esta tesis.

María Eugenia Turaglio y Yésica Sepúlveda, por el procesamiento y extracción de las muestras y por el apoyo que me brindaron durante todo el tiempo que llevó elaborar mi tesis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Desarrollo de la superficie cultivada con vid en la Argentina

Las primeras especies de vid (*Vitis vinifera*) llegaron a Cuzco, Perú, a mediados del Siglo XVI, de allí pasaron a Chile y a partir de 1551 fueron introducidas en la Argentina, extendiéndose por el centro, oeste y noroeste del país. En las provincias de Mendoza y San Juan se implantaron los primeros viñedos entre 1569 y 1589, lo que permitió con el transcurso del tiempo y favorecidas por las óptimas condiciones climáticas y de suelo, el desarrollo de una gran industria que transformó la aridez de esta zona, en verdes y extensos oasis.

Si bien en un inicio su desarrollo fue sostenido y el mercado interno tenía una importante demanda, entre los años 1982 y 1992 se produjo una importante erradicación de viñedos que representó el 36 % de la superficie existente en ese entonces. A partir de 1992 se inició un proceso de recuperación, implantando variedades de alta calidad enológica (INV, 2013).

El consumo per cápita de vino presentó una disminución, pasando de 80 l en la década del 70 a menos de 29,23 l en el año 2006. No obstante esto, la Argentina ha seguido siendo un gran consumidor de vinos, ocupando el séptimo lugar en el mundo y el quinto lugar como productor de vinos luego de Italia, Francia, España y Estados Unidos de América.

En el año 2013 la producción de uva en la Argentina fue de 28.717.487 quintales métricos (q) (1 quintal métrico equivale a 100 kg). Se observa un predominio de las variedades de vinificar con 27.860.566 q, que constituyen el 97,02 % del total de la producción. Las variedades de consumo en fresco, con 241.131 q, abarcan el 1,55% de la producción y las pasas el 2,14%, con 615.790 q (Gráfico 1) (INV, 2013).

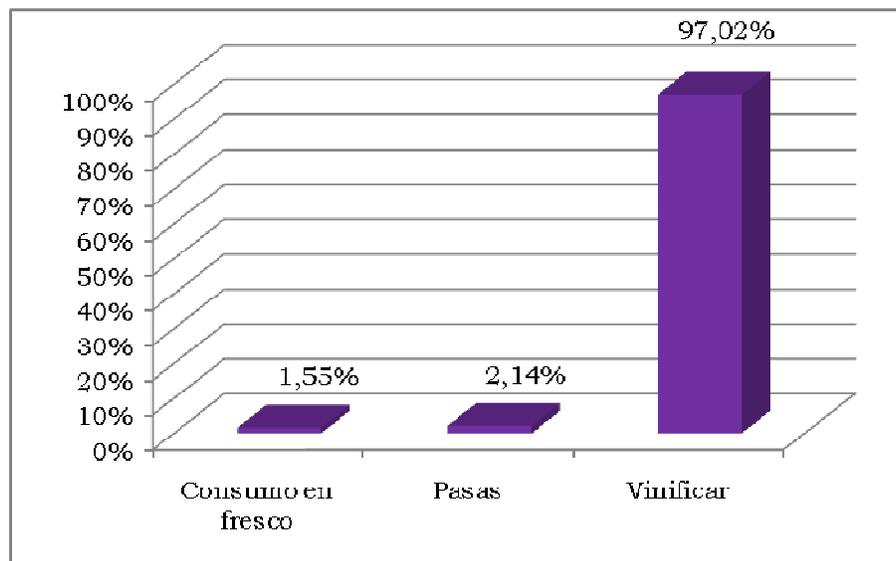


Grafico 1: Producción de uva (en porcentaje) según destino. Total del país.

Fuente INV-Año 2013

Dentro de las variedades para vinificar se observa una marcada preferencia por las tintas dentro de éstas se destaca Malbec, le siguen en importancia Bonarda, Cabernet Sauvignon y Syrah, entre otras. En las variedades rosadas se pueden mencionar la Cereza, Criolla Grande y Moscatel Rosado. En las blancas, se destacan Pedro Giménez, Torrontés Riojano, Chardonnay y Moscatel de Alejandria (INV, 2013).

1.2. Situación en Mendoza

La producción de uva en Mendoza, en el año 2013, fue de 19.974.421 q. El 99,93 % de la producción de vid en la provincia, 19.960.232 q, corresponde a variedades para vinificar, el consumo en fresco representa el 0,05 %, con 10.569 q y las uvas destinadas a pasas es de 0,02 % con 3.620 q (Gráfico 2).

La elaboración de vino es de 11.716.132 hl, vino tinto 7.700.446 hl, blanco 3.758.136 hl y rosado 257.550 hl. Entre las uvas tintas encontramos en mayor proporción las variedades Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon y Syrah. En las variedades rosadas se destacan Cereza, Criolla Grande y Moscatel Rosado y en

las blancas las variedades Pedro Giménez, Torrontés Riojano, Chardonnay, Chenín Sauvignon y Ugni Blanc.(INV, 2013)

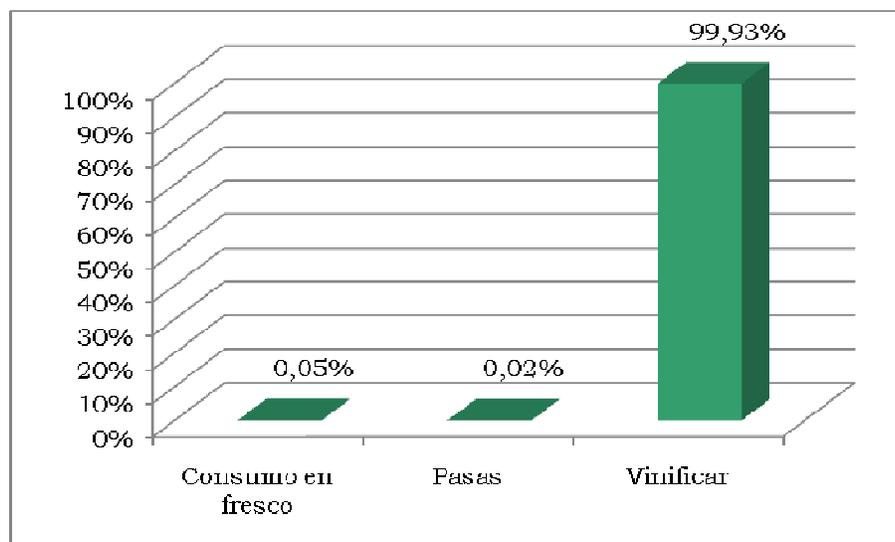


Gráfico 2: Producción de uva (en porcentaje) según destino. Provincia de Mendoza.

Fuente INV-Año 2013

1.3. Situación fitosanitaria

El control de plagas en el cultivo de la vid contribuye a aumentar los rendimientos tanto en calidad como en cantidad, ya que realizado en forma racional disminuye los daños provocados por el ataque de agentes dañinos. Sin embargo existen efectos negativos de la utilización de insecticidas, tales como contaminación del medio ambiente, desequilibrios biológicos en el agroecosistema y acumulación de residuos tóxicos para el ser humano en el producto final. Para ello es imprescindible que el uso de los mismos se haga en un contexto de control integrado de plagas, para lograr un producto final inocuo, apto para el consumo y competente en los mercados nacionales e internacionales (Becerra, 2001).

El viñedo mendocino ha sido afectado durante años por distintas enfermedades como: oidio (*Erysiphe necator* Schw.- *Oidium tuckeri* Berk); peronóspora (*Plasmopora viticola* (Berk.et Curt.) Bert. et De Toni); podredumbre gris y

podredumbre noble (*Botritis cinerea* Pers.); podredumbre de los racimos (*Botritis cinerea* Pers., *Alternaria* spp., *Aspergillus niger* Tiegh., *Cladosporium herbarum* (Pers.) Lk., *Penicillium* spp., *Rhizopus nigricans* Ehrenb); hoja de malvón (producida por un conjunto de hongos xilófagos asociados)(Cucchi y Becerra, 2009). Distintos fungicidas han sido utilizados para el control de enfermedades en vid, a excepción de hoja de malvón, que no tiene tratamiento terapéutico. Históricamente, las plagas no alcanzaban el nivel económico de daño (García, 1994), por lo que los insecticidas no eran empleados. Pero en la actualidad, se observa la presencia de dos insectos que atacan a la vid: cochinilla harinosa (*Planococcus ficus* Sign) (Cucchi y Becerra, 2009) y polilla europea de la vid (*Lobesia botrana* Den. et Schiff) (Gonzalez, 2010). Por esta razón se han comenzado a utilizar insecticidas para controlar estas plagas.

Con el nombre de “cochinillas harinosas” se designa a un grupo de insectos, pertenecientes a la familia Pseudococcidae, que atacan tanto uvas de mesa como de vinificar. Esta familia incluye especies sumamente polífagas, que se alimentan de cultivos agrícolas, forestales y ornamentales. Atacan todas las partes aéreas de la planta, afectando el tronco, los brazos, los brotes, las hojas, las inflorescencias y los frutos (Cucchi y Becerra, 2009). Causan daños de tipo directo e indirecto. Los primeros se deben a la succión de savia y la inyección de saliva fitotóxica, factores que afectan directamente al crecimiento y desarrollo normal de las plantas. Los indirectos son producidos por la gran cantidad de melaza segregada que sirve de sustrato para el desarrollo de fumagina, por la atracción de hormigas, que protegen a la cochinilla del ataque de enemigos naturales, además de ser una fuente de diseminación de la misma (Becerra, 2005) y por la vección de virus a los viñedos; en el 2002 fue citada como transmisora del virus GLRaV 3 (De Borbon, 2004).

En cultivares de vinificar, cuando las poblaciones del insecto son elevadas, las uvas afectadas pueden provocar defectos en los vinos elaborados a partir de ellas.

Existen reportes de la presencia de estos fitófagos en varias zonas vitícolas del mundo, tales como Chile, Uruguay, Estados Unidos, Europa (Chipre, España, Francia, Grecia, Italia, Islas Canarias), Asia (Arabia Saudita, India, Irak, Irán, Israel, Líbano, Pakistán) y África (Egipto, Libia, Túnez, y Sudáfrica).

En viñedos de la provincia de Mendoza es probable que esta plaga se encuentre presente desde principios del siglo XX; fue citada en 1942 en Cuyo con el nombre de *Pseudococcus vitis* como causante de daños de importancia en el cultivar Almería, entre otros (Becerra, 2006). A partir del año 2000 se disemina en viñedos de los departamentos mendocinos de Lavalle, Guaymallén, Junín, San Martín, Rivadavia, Maipú y Luján de Cuyo (De Borbon, 2004).

La polilla del racimo o polilla de la uva, *Lobesia botrana*, es un microlepidóptero, de la familia Tortricidae. Es una de las principales plagas de los viñedos. Sobre *Vitis vinifera* el insecto presenta en Mendoza tres generaciones marcadas. En algunos años se han presentado hasta cuatro, la primera afecta los botones florales, las flores y los frutos recién cuajados. En la segunda y tercera generación las larvas se alimentan de las bayas verdes, en envero y maduración, es evidente la presencia de seda con excrementos colgando de las mismas y los granos se observan perforados, deshidratados y luego totalmente necrosados y vacíos. La última generación puede estar combinada con la aparición de hongos (*Botrytis*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, entre otros) que provocan podredumbres, si las condiciones predisponentes para estos hongos se presentan y también la aparición de insectos del género *Drosophila* (Gonzalez, 2010; Mendoza, 2011; Becerra, et al. 2014). En 1776 fue citada por primera vez en algunos viñedos de Austria. Desde mediados del siglo XIX a principios del XX comenzó a extenderse por los viñedos de Austria, Alemania, Rusia, Hungría, Italia, Suiza, Francia, España, Portugal y Luxemburgo, entre otros países. En América, Chile declaró la presencia del insecto en abril de 2008, luego lo hizo California en octubre de 2009.

En el año 2010, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) comenzó a controlar las regiones vitícolas argentinas por la aparición de la polilla de la vid en el país vecino. En febrero de ese año, se evidenció la presencia del insecto en Mendoza (Gonzalez, 2010).

El SENASA declaró en el año 2010 a *Lobesia botrana* como plaga cuarentenaria y a través de la Resolución SENASA 729/2010, el organismo creó el Programa nacional de prevención y erradicación del insecto.

De acuerdo a los resultados del monitoreo de la Red Oficial para la plaga *Lobesia botrana*, realizado en febrero de 2014, se establecieron 76 distritos completos de

la provincia de Mendoza como áreas cuarentenadas. Éstos se encuentran distribuidos en los departamentos de Mendoza Capital, Godoy Cruz, Guaymallén, Junín, Lavalle, Las Heras, Luján de Cuyo, Maipú, Rivadavia, San Martín, Tupungato y Tunuyán.

Existen pocos insecticidas inscriptos en SENASA para el control de cochinilla harinosa, mientras que para polilla de la vid hay un registro emergencial por Resolución SENASA 504/2010, en la cual se incluye los productos y sus marcas comerciales pero carece de Límite Máximo de Residuos (LMR).

Para el control de estos insectos y evitar las pérdidas económicas que ocasionan, en varios países utilizan, entre varios insecticidas, al clorpirifos, dicho principio se encuentra incluido en la Res. 504/2010.

1.4. Antecedentes del uso de clorpirifos

Los residuos presentes en la uva en el momento de la cosecha dependen de los plaguicidas utilizados, dosis, número de tratamientos, tiempo transcurrido desde la última aplicación y además factores climáticos (temperatura, lluvia, viento). En el proceso de vinificación puede producirse una disminución del contenido de residuos de plaguicidas por adsorción y eliminación en orujos y borras, también por hidrólisis ácida, acción de levaduras y enzimas.

El contenido de residuos en el vino depende de las características del principio activo y de su solubilidad en agua o en la mezcla agua-alcohol. Éste será menor cuando el plaguicida sea insoluble en agua, ya que quedará retenido en la fase sólida (orujo y borra), y pasará muy poco a la fase hidroalcohólica (Coscolla, 1993).

La degradación del plaguicida clorpirifos ha sido estudiada en distintos países incluyendo la Argentina.

En Chile se realizaron estudios de degradación del insecticida en uva de mesa var. Thompson Seedles, en distintas dosis. Se observó en todos los casos una acentuada degradación inicial del principio activo, variando los residuos de clorpirifos en el momento de cosecha entre 0,01 y 0,08 mg.kg⁻¹. También se efectuaron ensayos en manzanas, frutales de carozo y cítricos, obteniéndose

resultados semejantes a la uva. En limones el residuo hallado a los 73 días después de aplicación fue de $0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Gonzalez, 2002).

En Argentina, en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Mendoza de INTA se evaluó la degradación en el tiempo del insecticida clorpirifos, utilizado para el control de cochinilla harinosa de la vid. El ensayo se realizó en un cultivo de vid variedad Cabernet Sauvignon. Se utilizó $120 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ de clorpirifos 48% EC. Los muestreos se realizaron el día 0 (una vez seco el depósito), y a los 4, 7, 14, 21, 28 y 35 días desde la aplicación. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo exponencial negativo. El residuo del insecticida en cosecha (35 días después de la aplicación) fue de $0,14 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Navarro, et al. 2006).

En la EEA Mendoza del INTA, en el año 2011, se realizó otro ensayo de degradación de clorpirifos en uva variedad Cabernet Sauvignon. El depósito inicial promedio del agroquímico fue de $3,98 \text{ mg.kg}^{-1}$, mientras que el residuo promedio hallado a los 28 días después de aplicación fue de $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$. Se observó una reducción del 85 % del contenido del insecticida en el momento de cosecha (Becerra, et al. 2011).

En la EEA Concordia del INTA, se realizó un ensayo en naranjas y mandarinas, donde se aplicó clorpirifos en campo y luego se analizó la fruta con cáscara y pelada. Los resultados indicaron una buena degradación del insecticida, pero se observó la presencia de clorpirifos en fruta entera a niveles de $0,03 \text{ mg.kg}^{-1}$ después de los 120 días de aplicación, mientras que en la pulpa no hubo rastros de clorpirifos desde el día de aplicación. Esto indica que el principio activo queda retenido por los aceites esenciales de la cáscara (Kulczycki, et al. 2012).

Con respecto al comportamiento del clorpirifos durante la vinificación son escasos los estudios realizados en el mundo. Podemos considerar el efectuado en España, (Navarro, 1999) donde se estudió el comportamiento de los plaguicidas penconazole, fenarimol, vinclozolin, clorpirifos y mancozeb durante la vinificación. Se observó que los residuos de clorpirifos desaparecen luego que el vino ha sido clarificado y filtrado.

2. RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

2.1. Plaguicida

Se define como plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias, que se utilice para prevenir, controlar o destruir una plaga, incluyendo los vectores de agentes causales de enfermedades humanas o de animales y las especies no deseadas de plantas o animales que producen perjuicio o interfieren con la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y sus productos, o alimentos para animales. El término también incluye a las sustancias que se utilicen 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 que tienen como objeto proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento o transporte (FAO, 2010).

2.2. Depósito inicial

La cantidad de plaguicida que queda sobre el vegetal inmediatamente después de la aplicación constituye el depósito inicial. Se expresa en proporción al peso, como miligramo del plaguicida por kilogramos del vegetal ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). En determinados estudios, para evaluar la efectividad de la aplicación, se puede expresar como peso del plaguicida por unidad de superficie vegetal ($\text{mg}\cdot(\text{cm}^2)^{-1}$) (Coscolla, 1993).

2.3. Residuos de plaguicidas

Según el Codex Alimentarius (FAO/OMS), se entiende como residuos de plaguicida a toda sustancia presente en un producto alimenticio destinado al hombre o a los animales como consecuencia de la utilización de un plaguicida. El término incluye también a todos los metabolitos con significación tóxica,

obtenidos como productos de reacción y de conversión, del plaguicida original. También hay que considerar otros constituyentes de la formulación como diluyentes o sustancia transportadora, coadyuvantes e impurezas, que pueden presentar toxicidad propia (Coscolla, 1993).

2.4. Buenas prácticas agrícolas (BPA)

Se entiende como BPA al uso recomendado o autorizado de productos fitosanitarios, bajo condiciones prácticas y en cualquier etapa de comercialización, almacenamiento, transporte, distribución o procesamiento de alimentos o forrajes (Cucchi y Becerra, 1997).

2.5. Periodo de carencia

Es el tiempo mínimo, expresado en días, que debe transcurrir entre la última aplicación de un agroquímico y la cosecha del producto o pastoreo de animales, para garantizar que el plaguicida aplicado se haya degradado y sus residuos en el producto cosechado no superen los límites máximos permisibles (CASAFE, 2011).

2.6. Expresión de los residuos de plaguicidas

Podemos expresar los residuos de plaguicidas de tres maneras:

- Como residuos de la sustancia original, en este caso no existen metabolitos o los hay en cantidades insignificantes. También cuando existen los metabolitos, con significación toxicológica y en cantidades significativas, pero el método analítico puede determinar la sustancia original y los metabolitos, en este caso se expresará como la suma de ambos. Es el caso de los residuos de dimetoato, que pueden expresarse como la suma de dimetoato y ometoato.
- Como residuos de un metabolito concreto, si la sustancia original es convertida cuantitativamente en otra sustancia química. Es lo que sucede con el fosetil aluminio que se transforma en ácido fosforoso.

También se considera cuando existen metabolitos de importancia toxicológica y el método analítico mide el residuo total como un metabolito concreto.

- Como la sustancia original y sus metabolitos separadamente, ambos están presentes en cantidades significativas y el método analítico es capaz de medirlos separadamente.

Los residuos de plaguicidas se expresan cuantitativamente en miligramos del residuo por kilogramos del producto vegetal (mg.kg^{-1}) (Coscolla, 1993).

2.7. Formación y evolución de los residuos

Cuando se realiza una aplicación de plaguicida, una parte del mismo queda depositada sobre la planta, mientras que otra cae al suelo, otra se evapora y otra, por los efectos de la deriva contamina el aire y agua.

El depósito inicial de un plaguicida depende de varios factores:

a) Dosis de plaguicida aplicado: la dosis es la cantidad de plaguicida aplicado por unidad de superficie cultivada o volumen (gramos de materia activa por hectárea o mililitros por hectolitros.) Cuando mayor es la dosis mayor es el depósito.

b) Naturaleza de la formulación: algunas formulaciones tienen el agregado de coadyuvantes, adherentes o mojantes que aumentan la retención por la planta.

c) Características de la aplicación: el tamaño de la gota es importante en las pulverizaciones, mientras menor es, mayor es el riesgo de deriva y evaporación.

d) Morfología y naturaleza del vegetal: dos factores importantes para la formación del depósito son la naturaleza de la superficie del vegetal y la relación superficie/peso.

En los frutos con superficie pubescente como duraznos o kiwis es probable que los depósitos sean mayores que en los frutos con superficie lisa o cerosa, como manzanas o ciruelas.

Es de esperar que en los vegetales con gran superficie de exposición en relación a su peso, como lechugas, sea mayor el depósito inicial, que en vegetales de gran superficie de exposición, pero de gran peso, como las sandías (Gráfico 3).

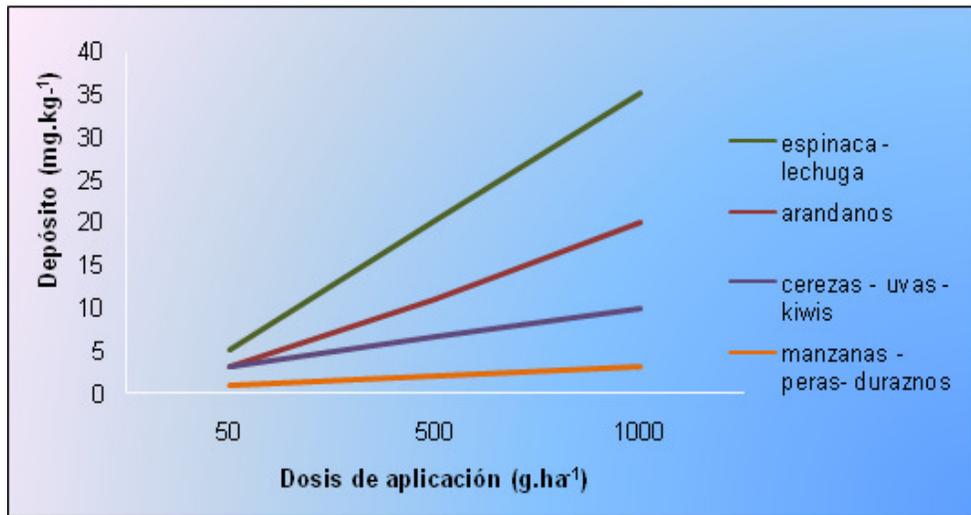


Gráfico 3: Variación de los depósitos, relacionando dosis de aplicación con el tamaño del vegetal

e) Condiciones climáticas: en el momento de la aplicación, las condiciones climáticas influyen considerablemente en la formación del depósito. A mayor velocidad del viento, será mayor la deriva y a mayor temperatura ambiental, mayor evaporación. También puede influir, en menor grado la humedad relativa y la presencia de rocío en el ambiente (Coscolla, 1993).

2.8. Degradación de los residuos

Una vez que se encuentra formado el depósito de plaguicida sobre el vegetal, éste va disminuyendo progresivamente con el transcurso del tiempo. La velocidad de degradación depende de diversos factores:

a) Factores biológicos: el crecimiento del vegetal produce una eliminación aparente de los residuos, ya que al expresar como proporción en peso: mg del plaguicida por kg del vegetal, al aumentar el peso del órgano vegetal, disminuye la cantidad de residuos proporcionalmente.

La morfología del vegetal es importante no solo para la formación del depósito inicial, sino también para la eliminación de los residuos. La eliminación sería, a la misma dosis, más lenta en las lechugas, por los recovecos que éstas poseen que en los frutos de superficie lisa. La estructura física de la epidermis del vegetal influye en la degradación, ya que ésta será mayor en frutos de superficie lisa o cerosa que en los de superficie pubescente. En el caso de frutos cítricos, los plaguicidas no polares o liposolubles, como el clorpirifos y malation, quedarán retenidos en las glándulas de aceite que se encuentran en su epidermis, aumentando la persistencia en estos frutos.

b) Factores mecánicos: la lluvia y el viento producen la eliminación mecánica de los plaguicidas aplicados.

La lluvia produce el lavado de los plaguicidas sobre la superficie del vegetal, depende de la intensidad de la precipitación y del momento que se produce, del tipo de plaguicida utilizado, del tipo de formulación, y de la naturaleza del sustrato vegetal.

La acción del viento dependerá de su velocidad y de su duración, también del tipo de plaguicida, de su formulación y de la naturaleza del vegetal.

c) Factores físicos: la eliminación de los plaguicidas se puede producir por fenómenos de solubilización y volatilización.

La volatilización es el paso del plaguicida al estado de vapor y su posterior eliminación en la atmósfera. La velocidad de este proceso depende de la tensión de vapor del plaguicida, en general los agroquímicos tienen baja tensión de vapor, a excepción de los fumigantes como el bromuro de metilo. También depende de dos factores extrínsecos como el viento o la brisa que remueve las capas de aire que rodean al vegetal facilitando la volatilización y la temperatura que favorece el proceso, aumentando la tensión de vapor (Coscolla, 1993).

d) Factores químicos: la degradación química es considerada la vía más importante de eliminación de residuos de plaguicidas. Se producen reacciones de

hidrólisis, oxidaciones, reducciones, isomerizaciones, descarboxilaciones, que originan metabolitos que pueden tener mayor o menor toxicidad que la molécula original.

La velocidad de la degradación química depende de la estabilidad química de la molécula del principio activo, y de dos factores extrínsecos: la temperatura, que interviene en la velocidad de la reacción química y la iluminación solar debido a los fenómenos de fotodescomposición de los plaguicidas que quedan en la superficie de los vegetales (Coscolla, 1993).

2.9. Curvas de disipación de plaguicidas

La evolución de las cantidades de residuos sobre los vegetales se puede representar gráficamente sobre unos ejes de coordenadas, obteniendo un gráfico de tipo exponencial negativo (Gráfico 4).

En una curva teórica de degradación de plaguicidas se diferencian tres fases, la primera representa la disipación rápida del plaguicida, debida principalmente a acciones mecánicas. La segunda fase es de eliminación más lenta, debida especialmente a factores físicos y químicos. La tercera fase es de evolución mucho más lenta, se denomina también periodo de persistencia y está determinada por el bloqueo del plaguicida en el vegetal, especialmente en las ceras o aceites del mismo (Coscolla, 1993).

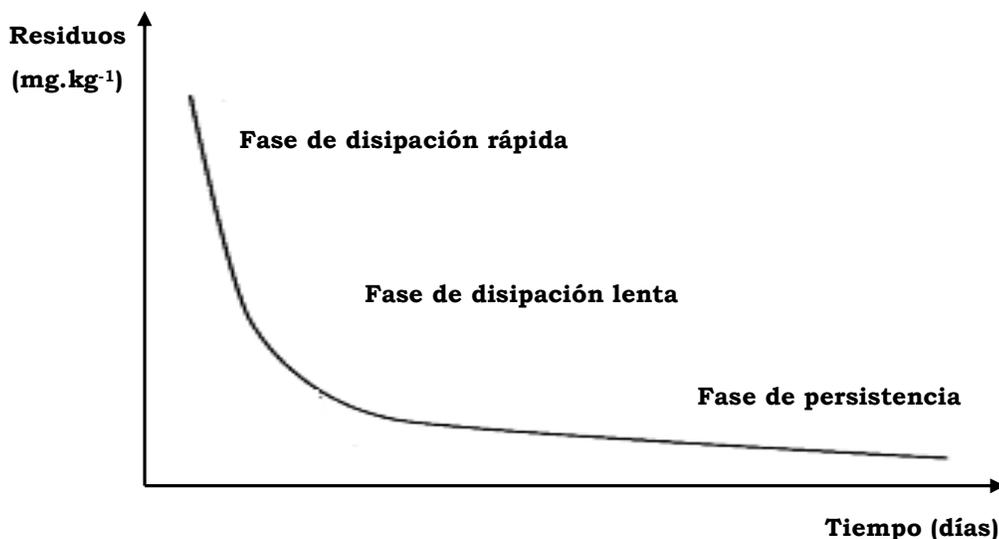


Gráfico 4: Curva teórica de disipación de residuos de plaguicidas en vegetales

3. NORMATIVA LEGAL

Las autoridades y organismos públicos de la mayoría de los países, por la posible peligrosidad que representan los residuos de plaguicidas sobre los alimentos vegetales y con objeto de proteger la salud de los consumidores, han promulgado normas que aseguran la calidad sanitaria de los alimentos. Estas normas se denominan Límites Máximos de Residuos (LMR).

3.1. Límite Máximo de Residuos

Límite Máximo de Residuos (LMR) es la concentración máxima de un determinado plaguicida aplicado sobre la superficie o en la parte interna de producto alimenticio para consumo humano y de piensos, permitida por la ley. Se expresa en miligramos del residuo de plaguicida por kilogramo del producto vegetal (mg.kg^{-1}). Los LMR se basan en datos de BPA y tienen por objeto lograr que los alimentos sean toxicológicamente aceptables (FAO, 1997).

En el proceso de determinar los LMR se considera un criterio toxicológico y otro agronómico. Desde el punto de vista toxicológico se asegura que la ingestión diaria de los residuos presentes en los vegetales no genere efectos nocivos sobre el individuo, mientras que desde el agronómico se busca lograr un efecto sobre la plaga a combatir con el menor uso de plaguicida posible (Coscolla, 1993).

3.1.1. Criterio toxicológico

La primera determinación en los estudios toxicológicos es el “nivel sin efecto tóxico” (NISETO o NOEL) de un plaguicida sobre animales (roedores, conejos) en ensayo. Es la cantidad del plaguicida, que ingerido diariamente y durante toda la vida de los animales en estudio no les provocará efectos nocivos en su salud. Técnicamente podemos definirlo como la mayor concentración del plaguicida que no causa alteración detectable en los animales. Se expresa en miligramos del plaguicida por kilogramos de peso del animal y por día (mg.kg^{-1} animal.día) (Coscolla, 1993).

El paso siguiente es extrapolar el valor de NOEL al humano. Para ello, es afectado por coeficientes de seguridad con el objetivo de obtener la “ingesta diaria admisible” (IDA). Normalmente el factor de seguridad utilizado es 100, ya que se asume que el ser humano es más sensible que los animales en condiciones de experimentación. En estos ensayos se utilizan lotes homogéneos de animales, mientras que la población humana es heterogénea y puede haber más sensibilidad en niños, ancianos o enfermos. Por lo tanto el NISETO se divide por el coeficiente 10 para pasar de animales a humanos y nuevamente por 10 teniendo en cuenta la variabilidad individual del hombre.

La IDA se expresa en miligramos del plaguicida por kilogramos de peso del hombre y por día ($\text{mg.kg}^{-1}\text{hombre.día}$) (Coscolla, 1993).

Posteriormente se calcula el “nivel permisible” del residuo para el hombre en alimentos. El mismo se obtiene multiplicando la IDA por el peso promedio del hombre, que se estima en 60 kg. Por último se divide por el “factor o coeficiente alimentario”, que representa la fracción promedio de la dieta total constituida por el alimento en consideración, teniendo en cuenta las costumbres alimentarias de cada pueblo. Se expresa en miligramos del plaguicida por kilogramo de alimento (mg.kg^{-1})(Gráfico 4).

$$\text{nivel permisible} = \frac{\text{NOEL} \cdot \text{peso cuerpo humano (60)}}{\text{factor de seguridad (100)} \cdot \text{factor alimentario}}$$

3.1.2. Criterio agronómico

Consiste en observar en campo, cuál es el comportamiento real de los residuos del plaguicida en estudio, cuando los cultivos son tratados utilizando las buenas prácticas agrícolas (BPA), se trata de controlar eficazmente la enfermedad o la plaga con la menor utilización del fitofármaco (Gráfico 4).

El nivel de residuos del plaguicida en el alimento, utilizando estas prácticas, debe ser inferior al nivel permisible, de lo contrario no podría autorizarse su uso.

En caso de ser mayor, se deben realizar los ensayos agronómicos nuevamente cambiando la dosis o el tiempo de cosecha (Coscolla, 1993).

Una vez obtenidos los estudios toxicológicos y los agronómicos del plaguicida, los mismos son presentados a SENASA, que es el organismo autorizado para fijar los LMR en Argentina.

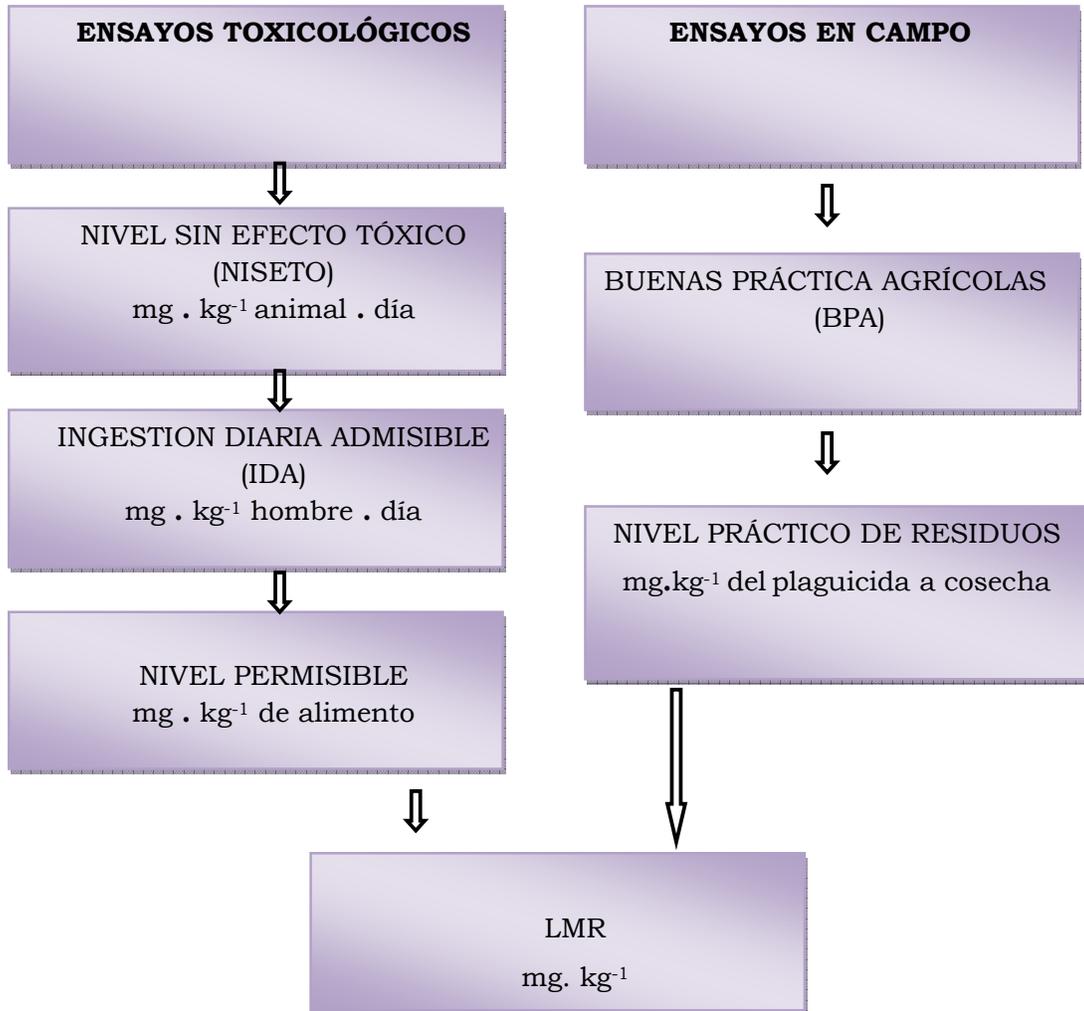


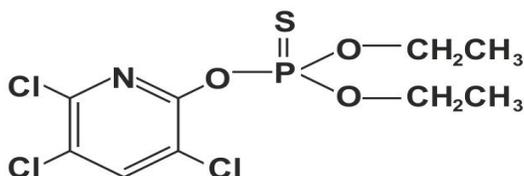
Grafico 4: Esquema de la determinación de los LMR

4. CARACTERÍSTICAS DEL CLORPIRIFOS

Uso: insecticida

Grupo químico: organofosforado (tionofosfato)

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



Acción toxicológica sobre los insectos: es un insecticida de amplio espectro que controla activamente insectos chupadores y masticadores en numerosos cultivos. Actúa por contacto, ingestión e inhalación (Cucchi y Becerra, 2009).

Farmacodinamia en el cultivo: es un fitosanitario únicamente de cobertura, no es sistémico, por lo tanto en la planta no se absorbe por los tejidos aéreos ni por la raíz.

En agua tiene una vida media (DT₅₀) a pH 8 y 25°C de 1,5 días, pero si está en solución de buffer fosfato a pH 7 y 15 °C puede llegar a 100 días. En los suelos y a condiciones de campo, la (DT₅₀), cuando el producto es incorporado, es de 33 a 56 días, si se realizan aplicaciones superficiales es de 7 a 15 días.

La molécula de este fitofármaco se degrada en varios metabolitos cuyos compuestos finales son: organoclorados y anhídrido carbónico.

Características físico-químicas: es un cristal incoloro con débil olor a mercaptano, tiene una alta presión de vapor (2,7 mPa a 25 °C) por esta razón puede sublimar con relativa facilidad. Es muy poco soluble en agua: 1,4 mg.l⁻¹ a

25 °C. Es muy soluble en solventes orgánicos: benceno (7900 g.kg⁻¹), acetona (6500 g.kg⁻¹), cloroformo (6300 g.kg⁻¹), disulfuro de carbono (5900 g.kg⁻¹).

El coeficiente de partición n-octanol/agua (log K_{wo}) del insecticida es de 4,7. Este valor indica que tiene una alta afinidad por los lípidos.

Su hidrólisis aumenta al incrementarse el pH y puede formar quelatos en presencia de cobre y otros metales pesados.

Compatibilidad: se puede mezclar, en aplicaciones foliares, con otros productos con excepción de los que tienen reacción alcalina, tal como polisulfuro de calcio.

Fitotoxicidad: no es fitotóxico a las dosis y técnicas de aplicación recomendadas (Cucchi y Becerra, 2009).

5. HIPÓTESIS

Hipótesis 1

El insecticida clorpirifos aplicado sobre un viñedo se degrada con el transcurso del tiempo.

Hipótesis 2

En vinos elaborados con uvas tratadas con clorpirifos, éste es eliminado en las distintas etapas de vinificación, no encontrándose residuos del plaguicida detectables en los vinos.

6. OBJETIVO GENERAL

Analizar la degradación del insecticida clorpirifos aplicado sobre el viñedo y determinar los residuos presentes en los vinos, obtenidos con uvas tratadas con el plaguicida.

6.1. Objetivos particulares

- Determinar la degradación del clorpirifos, con el transcurso del tiempo, en uvas tratadas con el insecticida 15 y 30 días antes de la cosecha.
- Comprobar la presencia de residuos del plaguicida al momento de cosecha, en uvas tratadas con el agroquímico 1, 15 y 30 días antes de cosecha.
- Analizar si el proceso de vinificación disminuye el contenido de residuos de clorpirifos.

7. MATERIALES Y METÓDOS

7.1. Ensayo en campo

El ensayo se realizó en una parcela de vid cultivar Cabernet Sauvignon, conducido en espaldero de 2,5 m por 2,5 m, ubicada en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Mendoza-INTA, del departamento Luján de Cuyo.

Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorizado, con tres tratamientos y tres repeticiones distribuidos al azar en 9 parcelas. Cada parcela estaba constituida por una hilera de 10 plantas. Se dejaron 2 hileras entre cada parcela y dos plantas en cada extremo como bordura.

Se realizó la aplicación foliar del insecticida clorpirifos etil 48 % EC (concentrado emulsionable) con una mochila neumática Stihl 420 SR, en una dosis de 120 ml.hl⁻¹ con un gasto aproximado de 600 l.ha⁻¹ (Foto 1).



Foto 1: Personal de INTA pulverizando los viñedos con clorpirifos

7.1.1. Aplicación del insecticida

Las aplicaciones se realizaron en tres momentos diferentes:

Tratamiento A: 19/03/2013 (30 días antes de cosecha)

Tratamiento B: 03/04/2013 (15 días antes de cosecha)

Tratamiento C: 17/04/2013 (1 día antes de cosecha)

Como no existe LMR y período de carencia del clorpirifos en uva en la legislación argentina, la dosis y las fechas de aplicación se ubicaron de acuerdo a los períodos de carencia de frutales de carozo y pepita (30 y 15 días antes de cosecha). Se pulverizó el agroquímico un día antes de cosecha, debido a que los productores podrían aplicar el insecticida cerca de la fecha de recolección de las uvas.

7.1.2. Toma de muestra

Las evaluaciones durante el ciclo vegetativo de la planta se realizaron tomando dos racimos por planta, de las seis plantas centrales de cada parcela, en forma aleatoria. Se extrajo aproximadamente 2 kg de uva por cada tratamiento.

La toma de muestras se realizó en los tratamientos A y B cuatro horas después a la aplicación del insecticida, para asegurar que el depósito estuviera seco sobre la superficie de las bayas y evitar el desprendimiento del plaguicida por la manipulación de las uvas. Posteriormente se extrajo en el tratamiento A, a los, 7, 14, 21 y 30 días después de aplicación (DDA) ; en el tratamiento B a los 7 y 15 DDA; en el tratamiento C al día siguiente de la aplicación.

Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, identificadas con el tratamiento, repetición y fecha del muestreo.

Posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Fitofarmacia de la EEA Mendoza, donde cada una de las muestras fue molida en una procesadora eléctrica (Foto 2), previa eliminación del pedúnculo. Se tomó una submuestra, de aproximadamente 200 g, de la pasta homogeneizada de cada una de las muestras y se la colocó en vasos de polietileno, identificados con el tratamiento y repetición (Foto 3). Todos los tarros se guardaron en freezer, a una temperatura de aproximadamente - 20 °C, hasta el momento de ser analizados.



Foto 2: Personal del Laboratorio procesando las muestras de uva



Foto 3: Recipientes que contienen las muestras procesadas

7.2. Ensayo en bodega

El 18 de abril de 2013 se realizó la cosecha a mano de la uva de todos los tratamientos. Se llenaron siete cajas con uva, llegando a un peso aproximado de 90 kg por cada tratamiento. Se transportaron a la planta piloto de la bodega experimental de la EEA Mendoza, donde se dejaron hasta el día siguiente en cámara de frío.

Previo a la molienda, se realizó una observación ocular, en la cual se determinó el buen estado sanitario de la materia prima. También se le determinó a las uvas de cada variante: contenido azucarino (°Brix), acidez total y pH por métodos oficiales argentinos.

Se realizó la molienda de la uva de los tres tratamientos utilizando una descobajadora-moledora a escala piloto (Fotos 4-5).



Foto 4: Descobajadora-moledora a escala piloto.
Bodega experimental de la EEA Mendoza



Foto 5: Interior de la descobajadora-moledora a escala piloto
Bodega experimental de la EEA Mendoza

Los mostos se colocaron en tanques de acero inoxidable, de una capacidad de 100 litros (Foto 6). En el momento del encubado se realizó un sulfitado, en dosis de 50 mg.l^{-1} y se corrigió la acidez total a $6,50 \text{ g.l}^{-1}$ con ácido tartárico. Posteriormente fueron sembrados con levaduras secas comerciales seleccionadas, en dosis de 20 g.hl^{-1} , se agregó activadores de la fermentación, en dosis de 30 g.hl^{-1} . Se incorporó a la mitad de la fermentación un suplemento nutritivo a base de fosfato de amonio y cáscaras de levaduras secas en dosis de 20 g.hl^{-1} . Los mostos fueron fermentados a una temperatura de entre 23 y $25 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta rastros de azúcar. Se efectuaron en todos los casos dos remontajes diarios y el tiempo de maceración fue de 15 días aproximadamente.



Foto 6: Tanques de acero inoxidable donde se produjo fermentación alcohólica
Bodega experimental de la EEA Mendoza

El 5 de mayo de 2013, terminada la fermentación alcohólica, los vinos fueron descubados. Éstos se colocaron de damajuanas de 20 y 10 litros (Foto 7) y fueron mantenidos sobre borras hasta la conclusión de la fermentación maloláctica, la que fue monitoreada por cromatografía sobre papel y análisis enzimáticos hasta rastros. Posteriormente se estabilizaron con SO_2 hasta llevarlo a valores cercanos a 35 mg.l^{-1} de SO_2 libre.



Foto 7: Damajuanas donde se produjo fermentación maloláctica
Bodega experimental de la EEA Mendoza

A fines de julio de 2013 los vinos se llevaron a cámara de frío durante 3 semanas a una temperatura de 2-3 °C para la estabilización tartárica. El 19 de agosto de 2013, previo desborre estático por gravedad y luego de ajustar a 35 mg.l⁻¹ de SO₂ libre, los vinos fueron embotellados.

7.2.1. Toma de muestra

En recipientes de plástico de aproximadamente 200 g, identificados con la letra del tratamiento y fecha correspondiente, se tomaron muestras del mosto posterior a la molienda, del vino y orujo posterior a la fermentación alcohólica, de las borras obtenidas posteriormente a la fermentación maloláctica. Además se tomó una botella del vino envasado de cada tratamiento. Se llevaron todas las

muestras al laboratorio de Fitofarmacia y se conservaron en freezer a una temperatura de aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis.

7.3. Análisis de los residuos en el laboratorio

El estudio de los residuos de clorpirifos se realizó utilizando una técnica de extracción basada en el método de Luke (Luke, 1975), validada por el laboratorio ante el Organismo Argentino de Acreditación (OAA), bajo la Norma 17025 (CEF, 2005). El método se basa en la extracción del pesticida, bajo campana, con los solventes (grado plaguicida), acetona, diclorometano y éter de petróleo, etapa en que los mismos pasan desde la matriz a la fase orgánica (Fotos 8 y 9). Luego de ser evaporada la fase orgánica en concentrador al vacío, el pesticida se recuperó con 5 ml de acetona.



Foto 8: Extracción de residuos, separación de fases.
Laboratorio de Fitofarmacia de la EEA Mendoza



Foto 9: Extracción de residuos, trasvase de fase orgánica a matraz de evaporación. Laboratorio de Fitofarmacia de la EEA Mendoza

7.3.1. Análisis cromatográfico

Los residuos de clorpirifos se analizaron en un cromatógrafo de fase gaseosa Hewlett Packard 5890 Serie II (Foto 10), con detector fotométrico de llama (FPD), equipado con una columna capilar de sílice fundida DB 608, de 30 m de largo, con un diámetro interno de 0,53 mm y la película de la fase estacionaria de 0,50 μm . Se utilizó nitrógeno como fase móvil, con un flujo de 40 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Se inyectó 1 μl del extracto de acetona en un inyector para columnas empaquetadas. La temperatura del inyector fue de 200 $^{\circ}\text{C}$, la del detector 240 $^{\circ}\text{C}$. La temperatura del horno fue programada de la siguiente forma: 80 $^{\circ}\text{C}$ (1 min.); 30 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 180 $^{\circ}\text{C}$ (0 min.); 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 240 $^{\circ}\text{C}$ (0 min.); 28 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 280 $^{\circ}\text{C}$ (5 min.).



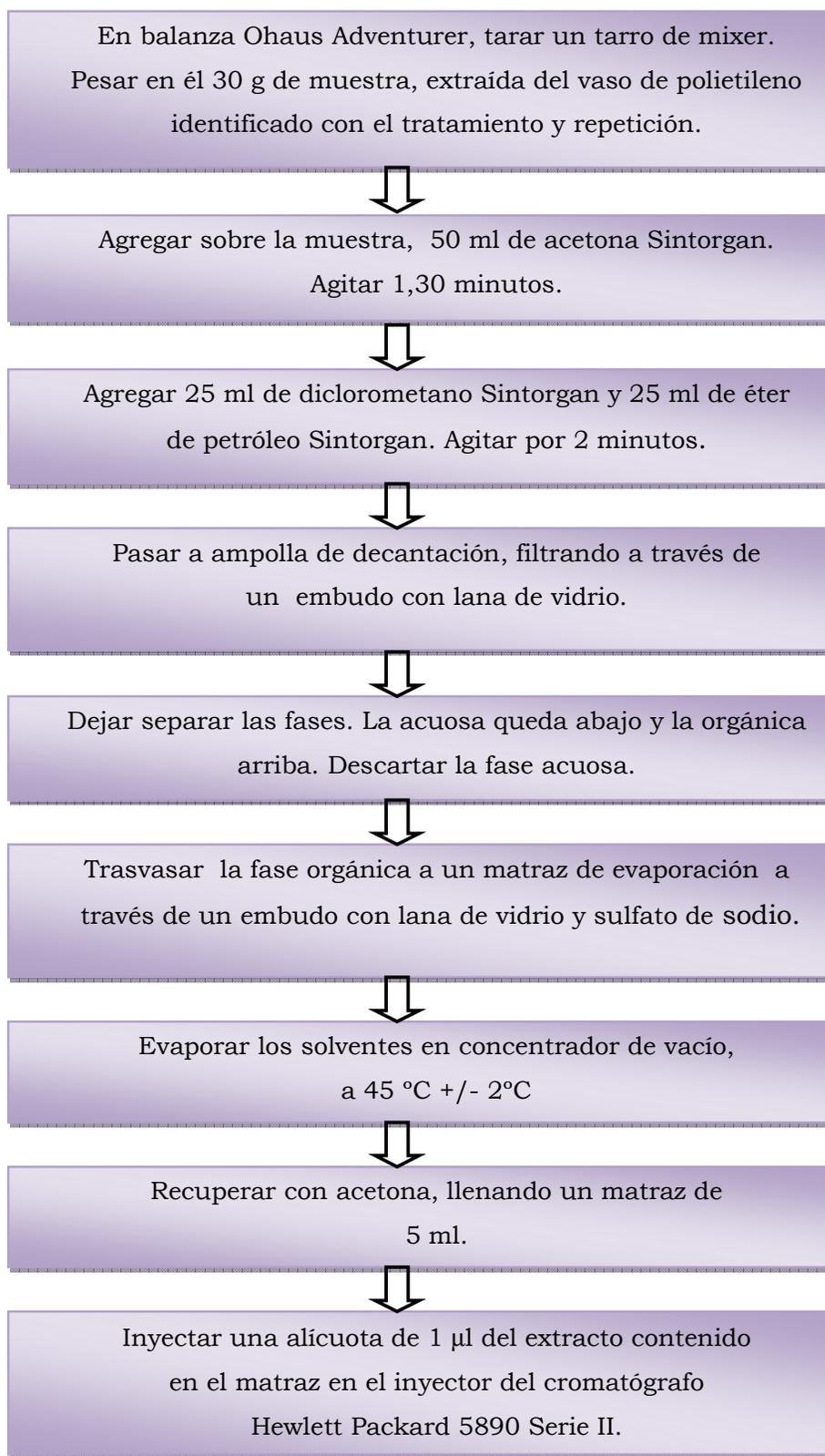
Foto 10: Cromatógrafo Hewlett Packard 5890 Serie II.
Laboratorio de Fitofarmacia de la EEA Mendoza

Para el análisis cromatográfico se utilizó un estándar de clorpirifos etil marca Sigma Aldrich, de 99,9 % de pureza. Para la identificación y cuantificación del insecticida en las muestras, se compararon las áreas de los picos de las soluciones estándares del plaguicida de 0,07 y 1,78 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, preparadas con acetona (grado plaguicida), con las áreas de los picos de las muestras.

La recuperación del método se obtuvo fortificando con clorpirifos muestras blanco, en cuatro niveles de concentración y cinco repeticiones en cada nivel. El porcentaje de recuperación del método validado por el laboratorio y utilizado para el análisis de clorpirifos en uva es de 90%. (CEF, 2010).

El Límite de Detección (LD) del método para la determinación del agroquímico es de 0,01 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y el Límite de Cuantificación (LC) es de 0,03 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Siendo el LD la mínima cantidad de una sustancia que corresponde a una respuesta y es igual a tres veces la magnitud de la señal de ruido del equipo, mientras que el LC es tres veces el LD.

7.3.2. Método de extracción desarrollado



7.3.3. Cálculos

Para el cálculo de la concentración de los residuos de clorpirifos se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Conc. plaguicida} = \frac{AM}{AP} \cdot CP \cdot \frac{VRF}{GM}$$

Conc. plaguicida: concentración del plaguicida en la muestra ($\mu\text{g.gr}^{-1} = \text{mg.kg}^{-1}$)

AM: área del pico de la muestra

AP: área del pico del estándar

CP: concentración de la solución estándar ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)

GM: peso de la muestra (g)

VRF: volumen recuperación final (ml)

8. RESULTADOS

8.1 Ensayo en campo

Los residuos de clorpirifos en uva tratada con el insecticida 30 días antes de cosecha (DAC) (tratamiento A) y 15 DAC (tratamiento B), se muestran en las tablas 1 y 2 respectivamente y en los gráficos 5 y 6. En ambos tratamientos se observa una degradación del plaguicida.

Los residuos de clorpirifos aplicado en la uva 1 DAC (tratamiento C) se pueden observar en la tabla 3.

Tabla 1: Resultados de residuos de clorpirifos en uva variedad Cabernet Sauvignon, tratamiento A (30 DAC)

Fecha	Repetición	Concentración (mg.kg⁻¹)	Media	Desviación estándar	CV %
0 DAC	1	1,11	1,20	0,085	7,107
	2	1,28			
	3	1,20			
7 DAC	1	0,49	0,54	0,050	9,259
	2	0,59			
	3	0,54			
14 DAC	1	0,15	0,13	0,015	11,456
	2	0,13			
	3	0,11			
21 DAC	1	0,05	0,06	0,010	16,667
	2	0,07			
	3	0,06			
30 DAC	1	0,07	0,07	0,010	14,286
	2	0,06			
	3	0,08			

Tabla 2: Resultados de residuos de clorpirifos en uva variedad Cabernet Sauvignon, tratamiento B (15 DAC)

Fecha	Repetición	Concentración (mg.kg ⁻¹)	Media	Desviación estándar	CV %
0 DAC	1	0,95	0,87	0,080	9,195
	2	0,79			
	3	0,87			
7 DAC	1	0,26	0,28	0,035	12,372
	2	0,32			
	3	0,26			
15 DAC	1	0,12	0,10	0,015	14,783
	2	0,09			
	3	0,10			

Tabla 3: Resultados de residuos de clorpirifos en uva variedad Cabernet Sauvignon, tratamiento C (1 DAC)

Fecha	Repetición	Concentración (mg.kg ⁻¹)	Media	Desviación estándar	CV %
1 DAC	1	1,03	0,97	0,049	5,068
	2	0,95			
	3	0,94			

Los coeficientes de variación porcentuales obtenidos en los ensayos, se encuentran dentro de los parámetros de reproducibilidad de la Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis (CAC/GL 40-1993, Rev.1-2003) del Codex Alimentarius (Tabla 4).

Tabla 4: Valores de reproducibilidad, según concentración del plaguicida en la muestra

Concentración	Reproducibilidad (CV%)
1µg.kg ⁻¹ ≤ 0,01 mg.kg ⁻¹	45
> 0,01 mg.kg ⁻¹ ≤ 0,1 mg.kg ⁻¹	35
> 0,1 mg.kg ⁻¹ ≤ 1 mg.kg ⁻¹	25
> 1 mg.kg ⁻¹	20

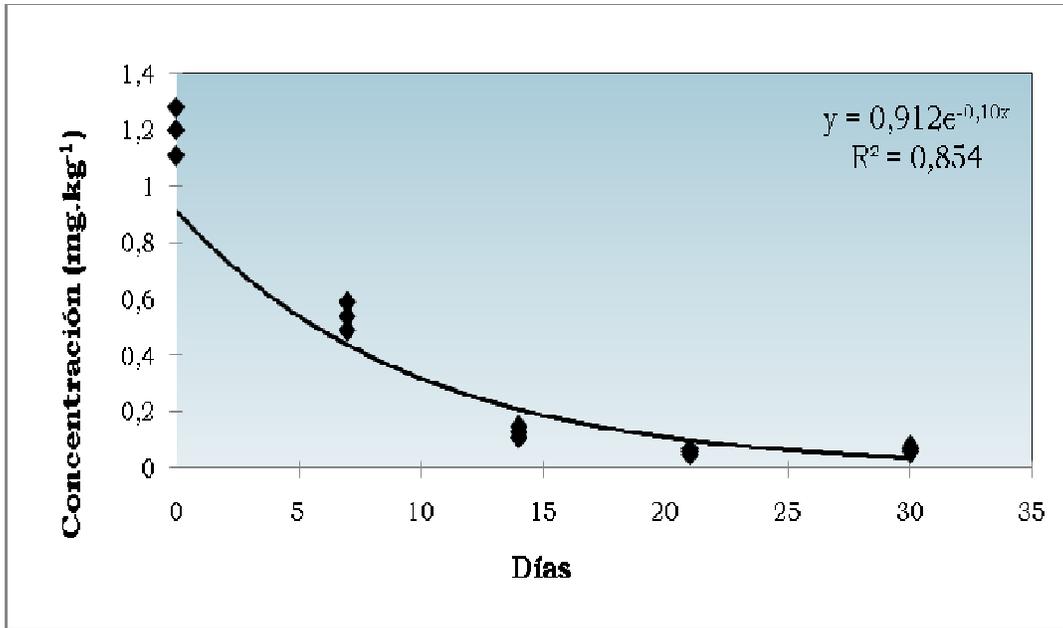


Gráfico 5: Curva degradación de clorpirifos en uva variedad Cabernet Sauvignon, tratamiento A (30 DAC)

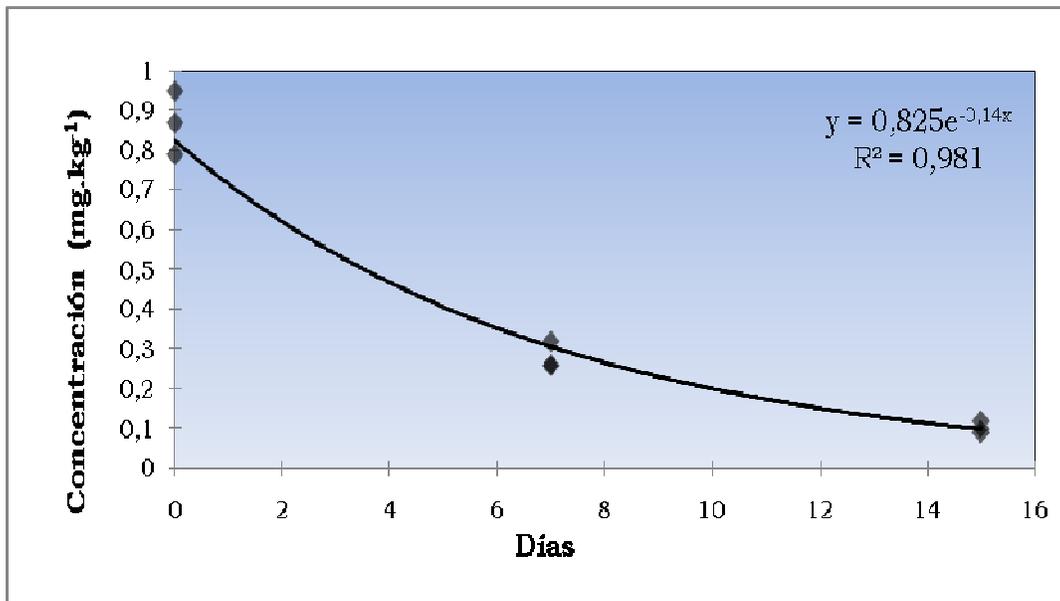


Gráfico 6: Curva degradación de clorpirifos en uva variedad Cabernet Sauvignon, tratamiento B (15 DAC)

En ambos gráficos se puede observar que el insecticida clorpirifos se ha degradado, respondiendo a un modelo exponencial negativo. La degradación es más acentuada en los primeros siete días, debido a las acciones mecánicas, como el viento y la lluvia que producen una disminución rápida de los residuos, luego esta disminución es más lenta debido a las causas físicas y químicas.

En el tratamiento A, el depósito promedio es de 1,20 mg.kg⁻¹ y el residuo hallado al momento de cosecha es de 0,07 mg.kg⁻¹, siendo la reducción del plaguicida del 94 %. En el tratamiento B, el depósito es de 0,87 mg.kg⁻¹ y el residuo a cosecha es de 0,10 mg.kg⁻¹, con una disminución del insecticida del 89 %.

Con respecto al residuo del insecticida encontrado en el momento de cosecha, en el tratamiento A (30 DAC) es de 0,07 mg.kg⁻¹ (Tabla 1), en el tratamiento B (15 DAC) es de 0,10 mg.kg⁻¹ (Tabla 2), y en el tratamiento C (1 DAC) es de 0,97 mg.kg⁻¹ (Tabla 3). Podemos observar que en los tratamientos A y B los residuos son similares a pesar que en el tratamiento A las uvas han estado expuestas a los factores ambientales 15 días más que en el B. Esto significa que a partir de una determinada fecha posterior a la aplicación, los residuos del insecticida se mantienen estables probablemente debido a la liposolubilidad del clorpirifos, en la capa cerosa de las bayas. Como se ha indicado anteriormente correspondería a la fase de persistencia de la curva.

8.2 Ensayo en bodega

Los resultados de residuos de clorpirifos en mosto, orujo, vino posterior a la fermentación alcohólica, borras y vinos terminados se muestran en la tabla 5 y en los gráficos 7 al 15.

Tabla 5: Resultados de residuos de clorpirifos las distintas etapas de la vinificación, resultados expresados en mg.kg⁻¹

	mosto molienda	orujo	vino posterior fermentación alcohólica	borra	vino terminado
Tratamiento A	0,05	0,13	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Tratamiento B	0,06	0,23	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Tratamiento C	1,21	3,47	0,05	0,52	< 0,01

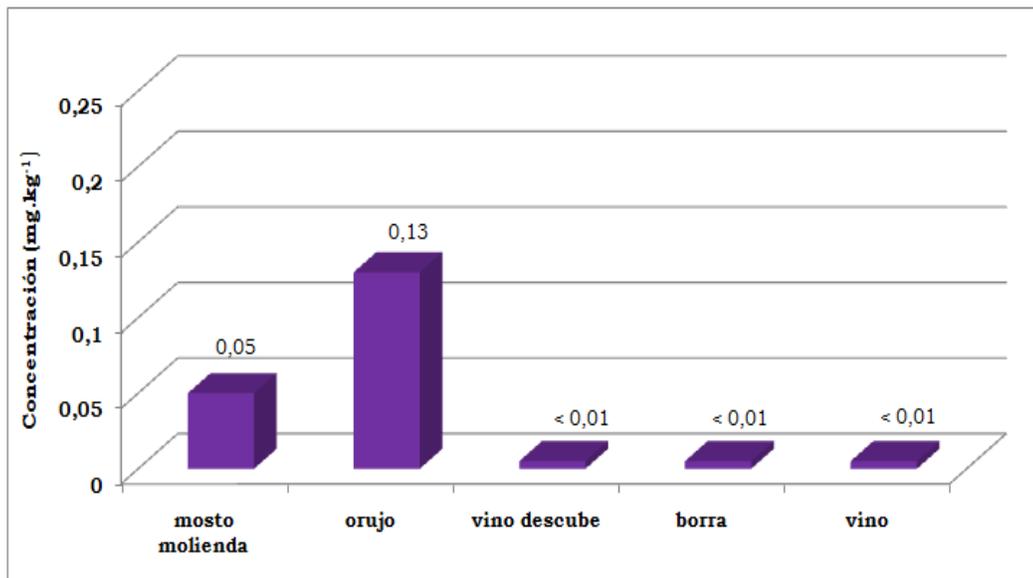


Gráfico 7: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos.
 Tratamiento A – 30 días antes de cosecha. LD clorpirifos 0,01 mg.kg⁻¹

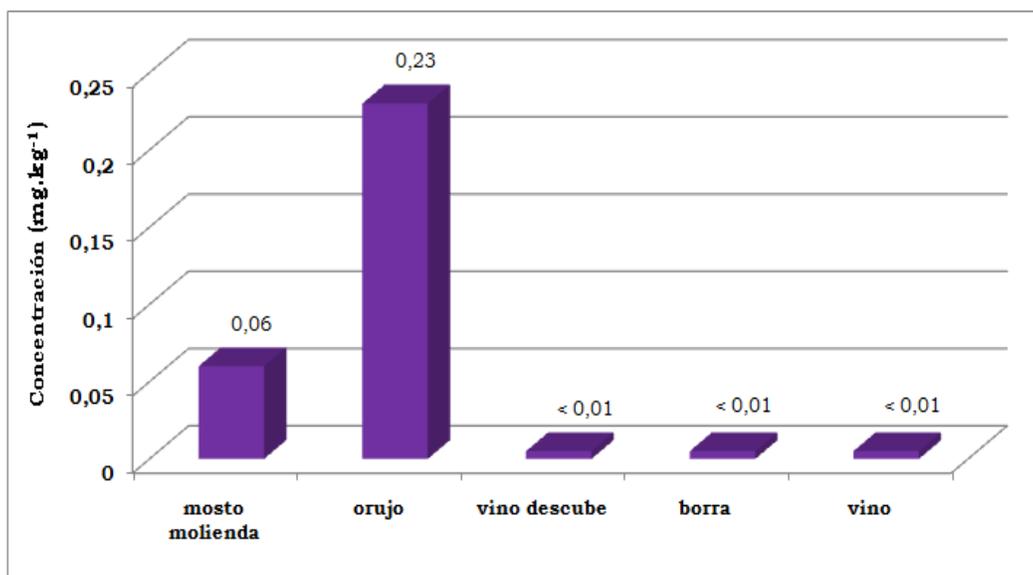


Gráfico 8: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos.
 Tratamiento B – 15 días antes de cosecha. LD clorpirifos 0,01 mg.kg⁻¹

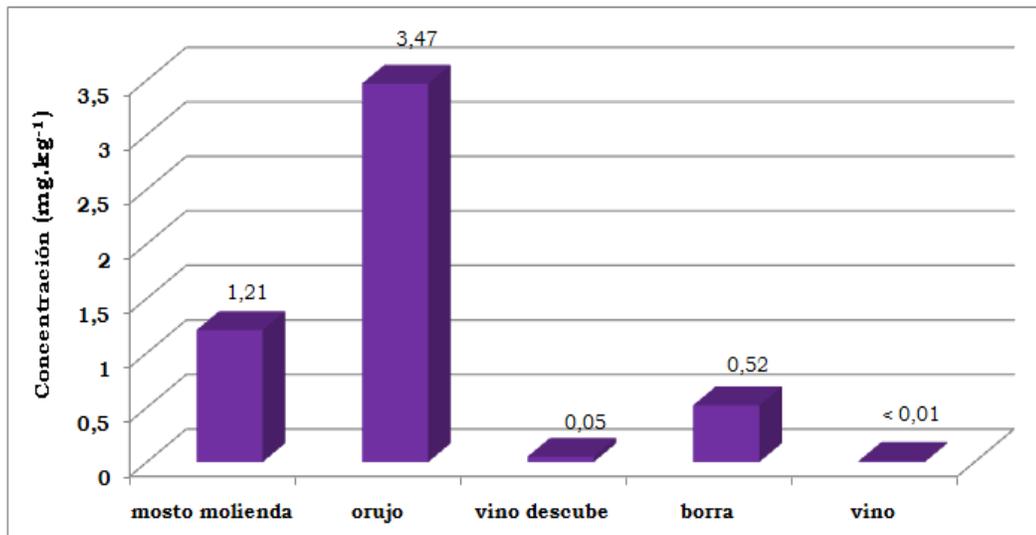


Gráfico 9: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos.
 Tratamiento C - 1 día antes de cosecha. LD clorpirifos 0,01 mg.kg⁻¹

En los gráficos 7, 8 y 9 se puede observar la distribución que tiene el insecticida clorpirifos en la vinificación.

En el gráfico 7, correspondiente al tratamiento A, hay una acumulación de los residuos en orujos de 0,13 mg.kg⁻¹; con respecto a la cantidad del insecticida que existía en el mosto, se hallaron 0,05 mg.kg⁻¹. En el vino de descube, obtenido después de la fermentación alcohólica, en las borras y en el vino terminado no se detecta la presencia del insecticida.

En el gráfico 8, correspondiente al tratamiento B, el mosto tiene un residuo de clorpirifos de 0,06 mg.kg⁻¹ y ese valor se cuadruplica en el orujo. Tampoco se detecta la presencia del insecticida en vino de descube, en borras y en vino terminado.

El gráfico 9, indica lo sucedido con el tratamiento C, en el mismo se parte de un mosto con un contenido de 1,21 mg.kg⁻¹ de clorpirifos, debido a que el insecticida fue aplicado el día anterior a la cosecha. El orujo tiene aproximadamente tres veces más residuos que el mosto y se observa la presencia del insecticida en el vino de descube en una concentración de 0,05 mg.kg⁻¹. Las borras presentan una concentración 10 veces mayor a la del vino de descube, pero no se detecta el plaguicida en el vino embotellado.

La mayor concentración del insecticida en orujos y borras puede explicarse, ya que como se dijo anteriormente, el residuo es expresado como mg del plaguicida por kg de sustrato y toda modificación en la masa durante el proceso de vinificación modificará el residuo concentrándolo, en este caso, debido a las características lipofílicas del fitofármaco.

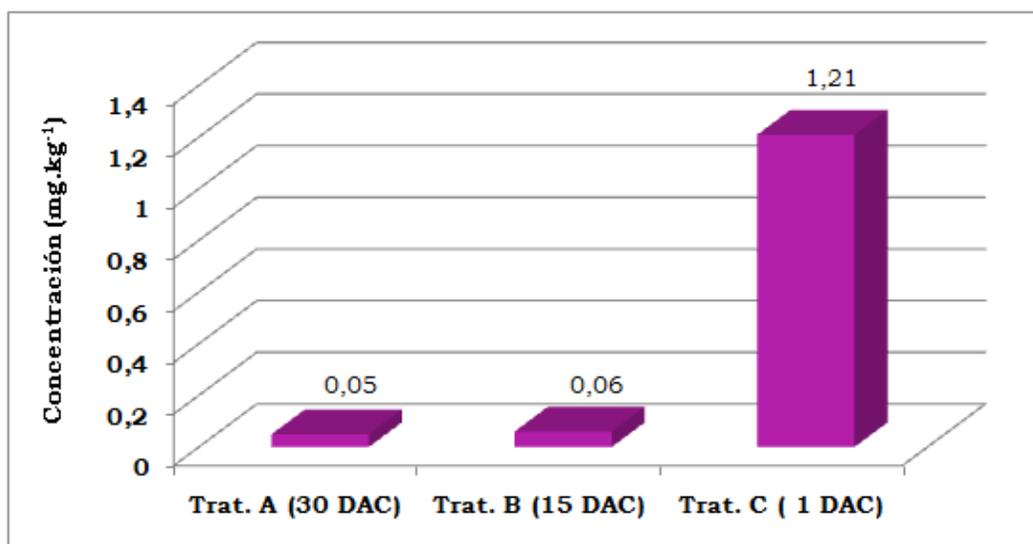


Gráfico 10: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos. Mosto molienda – Comparación entre los 3 tratamientos. LD clorpirifos 0,01 mg.kg⁻¹

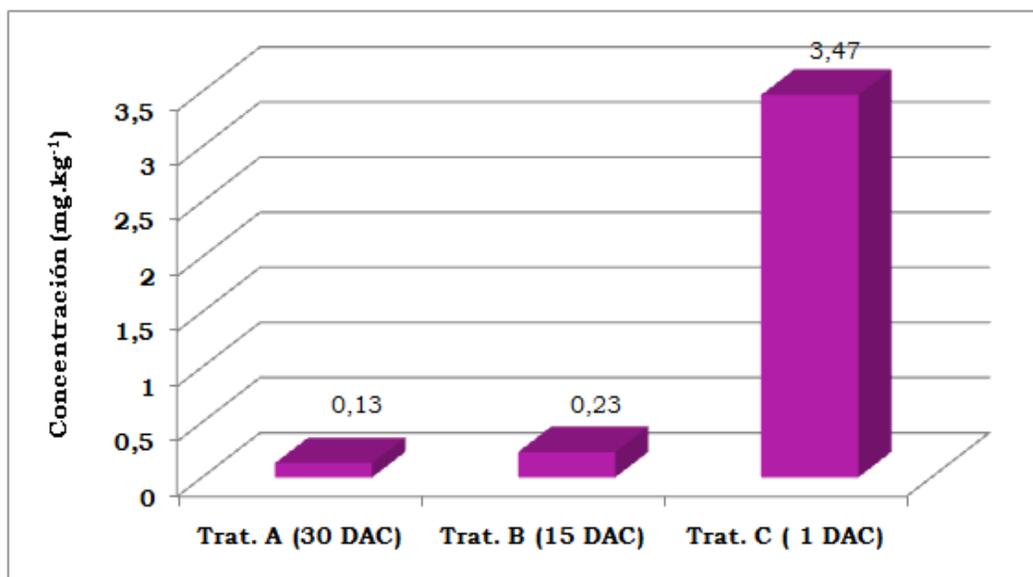


Gráfico 11: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos. Orujo – Comparación entre los 3 tratamientos. LD clorpirifos 0,01 mg.kg⁻¹

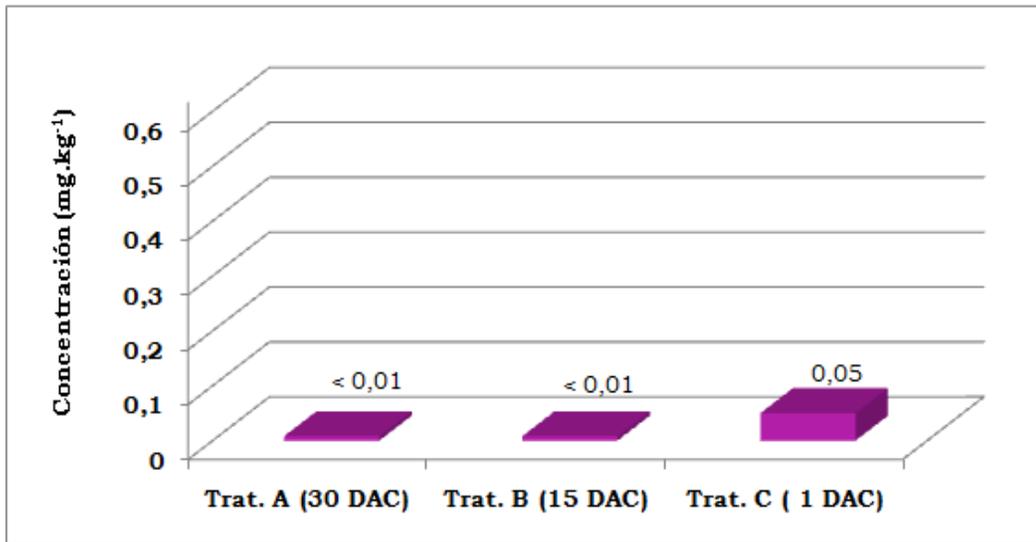


Gráfico 12: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos. Vino después de fermentación alcohólica - Comparación entre los 3 tratamientos. LD clorpirifos 0,01 mg.kg⁻¹

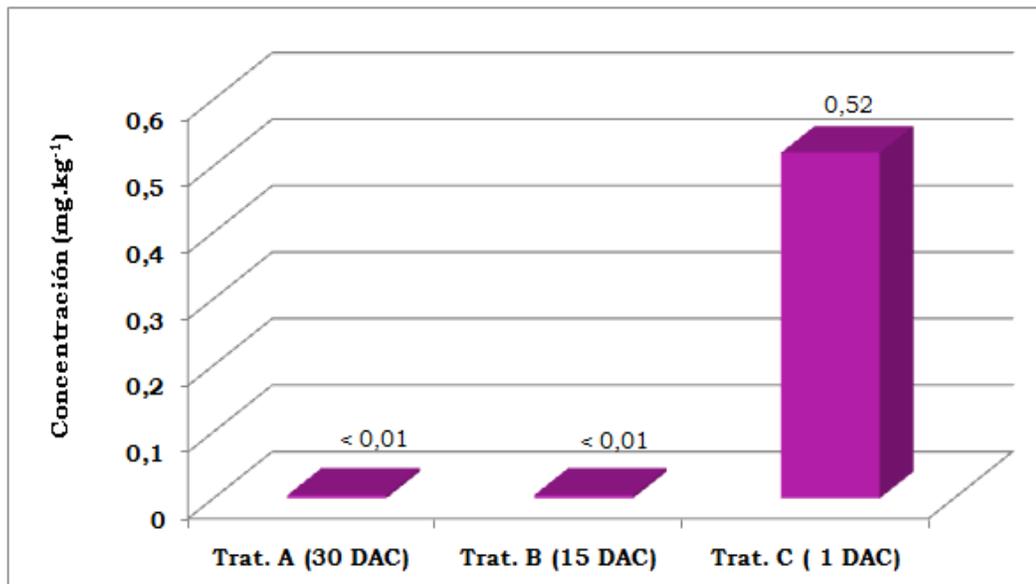


Gráfico 13: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos. Borrás - Comparación entre los 3 tratamientos. LD clorpirifos 0,01 mg.kg⁻¹

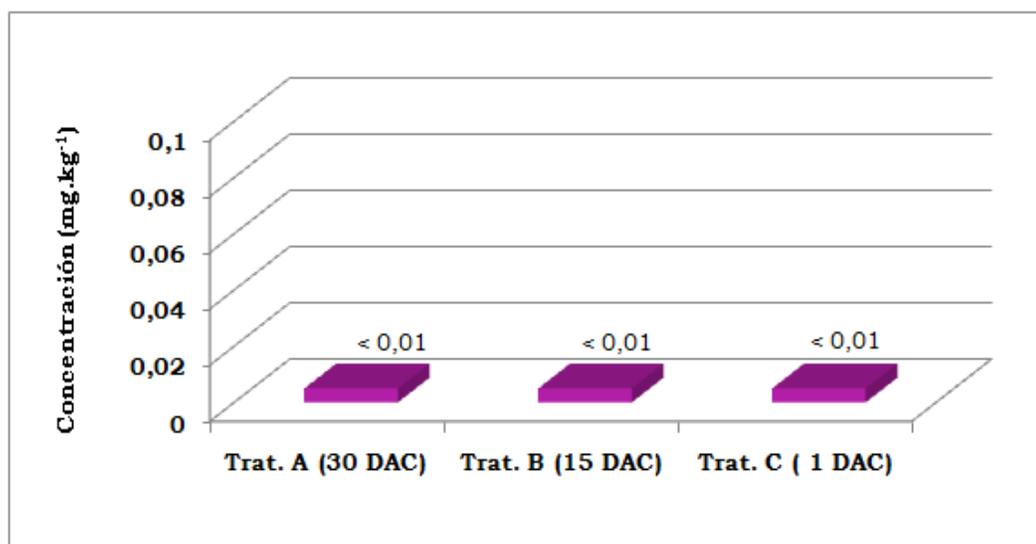


Gráfico 14: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos.
Vino terminado - Comparación entre los 3 tratamientos. LD clorpirifos 0,01 mg.kg⁻¹

En los gráficos 10, 11, 12, 13 y 14 se puede comparar los tres tratamientos en las distintas etapas de la vinificación.

El gráfico 10, correspondiente a los mostos, el tratamiento C tiene aproximadamente 20 veces más residuo de clorpirifos que los tratamientos A y B. El gráfico 11, indica que los orujos de los tres tratamientos contienen el insecticida, pero los del tratamiento C poseen entre 26 y 15 veces más que los de A y B, respectivamente.

En el gráfico 12 se puede observar lo sucedido con los vinos de descube, no se detecta la presencia del plaguicida en los tratamientos A y B, si es detectado en el tratamiento C en una concentración de 0,05 mg.kg⁻¹.

El gráfico 13 correspondiente a las borras, el insecticida no es detectado en las mismas en los tratamientos A y B, pero las del tratamiento C contienen residuos de clorpirifos en una concentración de 0,52 mg.kg⁻¹.

El gráfico 14 indica lo que sucede con los vinos terminados, no se detecta la presencia del plaguicida en ninguno de los tratamientos.

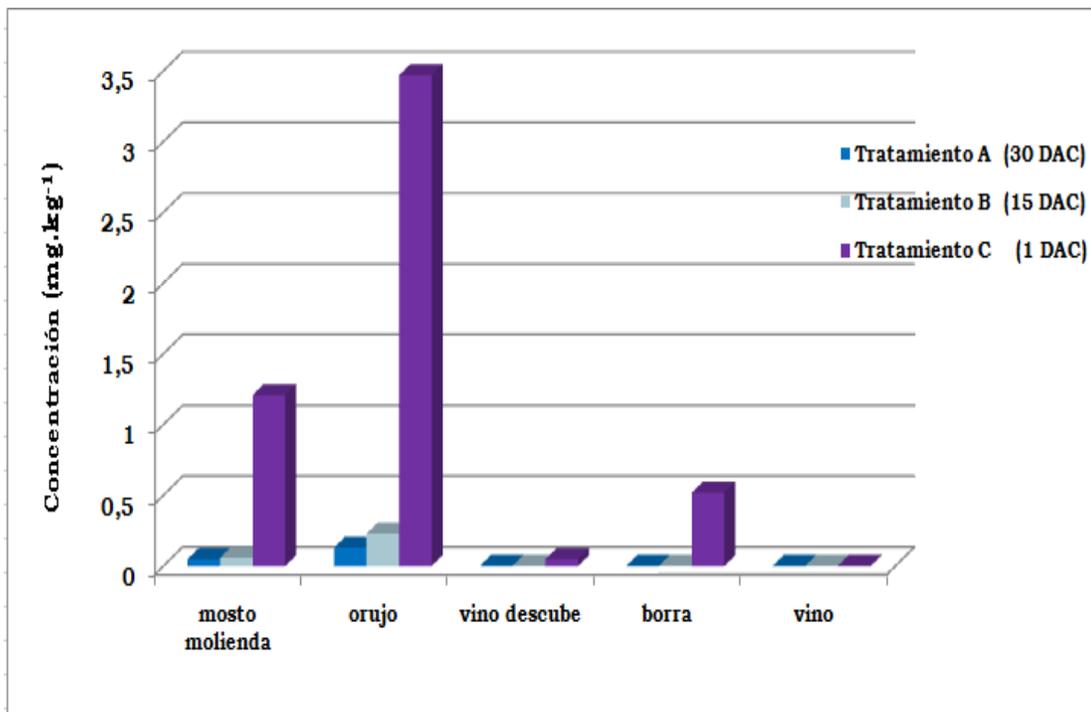


Gráfico 15: Concentraciones (mg.kg⁻¹) de residuos de clorpirifos. Comparación entre los 3 tratamientos y los distintos productos de la vinificación

En el gráfico 15 se presentan los resultados de los tres tratamientos y de las distintas etapas del proceso de vinificación.

9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

9.1 Ensayo en campo

La presencia en los viñedos mendocinos de dos insectos: cochinilla harinosa y polilla europea de la vid llevó al productor a usar insecticidas como el clorpirifos para controlar estas plagas y disminuir daños económicos. Para evitar los efectos negativos de la utilización de este insecticida, tales como contaminación del medio ambiente, desequilibrios biológicos en el agroecosistema, acumulación de residuos tóxicos para el ser humano en el producto final, como así también posibles rechazos en la comercialización de los productos (uva, mostos o vinos) por exceso de residuos sobre las tolerancias nacionales e internacionales, se llevó a cabo el presente trabajo de investigación.

Para demostrar que **el insecticida clorpirifos se degrada con el transcurso del tiempo, primera hipótesis de este trabajo**, se realizaron dos curvas de degradación en un cultivo de vid variedad Cabernet Sauvignon, una aplicando el insecticida 30 días antes de cosecha (tratamiento A) y la otra 15 días antes de cosecha (tratamiento B), en ellas podemos apreciar que el insecticida clorpirifos etil 48 % EC (concentrado emulsionable), se degradó siguiendo un modelo exponencial negativo. En los dos tratamientos hubo una importante degradación de los residuos en la primera semana y en las semanas posteriores la disminución fue más lenta, siendo la fase de persistencia similar en ambos tratamientos. La concentración media de residuos de clorpirifos hallados en el momento de cosecha en el tratamiento A fue de 0,07 mg.kg⁻¹ y en el tratamiento B de 0,10 mg.kg⁻¹. Se observó una similitud con el estudio realizado con clorpirifos en uva de mesa variedad Thompson Seedles, por Gonzalez (2002), donde se apreció una acentuada degradación inicial del principio activo, variando los residuos del insecticida en el momento de cosecha entre 0,01 y 0,08 mg.kg⁻¹ y con los ensayos de degradación realizados en INTA por Navarro (2006) y Becerra (2011) en cultivo de vid variedad Cabernet Sauvignon donde los datos obtenidos se ajustaron a un modelo exponencial negativo y los residuos del insecticida en cosecha fueron de 0,14 mg.kg⁻¹ y 0,6 mg.kg⁻¹ respectivamente.

El clorpirifos se encuentra incluido en la Resolución 504/2010 de SENASA, en la cual figuran los productos y sus marcas comerciales, pero carece todavía de Límite Máximo de Residuos (LMR) para uva. Con el objeto de asegurar que el producto obtenido de los ensayos de degradación es inocuo para la salud del consumidor, se comparó las concentraciones de los residuos hallados al momento de cosecha en los dos tratamientos (0,07 mg.kg⁻¹ y 0,10 mg.kg⁻¹) con el LMR de clorpirifos en uva que figura en el Codex Alimentarius, el cual es de 0,5 mg.kg⁻¹, siendo los valores obtenidos en el presente trabajo menores que el límite fijado internacionalmente.

Con estos resultados se concluye que el insecticida clorpirifos puede controlar dos importantes plagas que afectan los viñedos mendocinos y los residuos del plaguicida presentes en las uvas se degradan por las características físico – químicas propias del mismo, como también por la acción de los factores ambientales, como el viento, lluvia y temperatura, confirmando la primera hipótesis.

9.2. Ensayo en bodega

El ensayo de vinificación en bodega se realizó con uvas tratadas con clorpirifos. Los residuos del insecticida en la uva, en el momento de la cosecha, en los tratamientos A y B, fueron de 0,07 y 0,10 mg.kg⁻¹ respectivamente; mientras que en el tratamiento C, ensayo donde el insecticida fue aplicado un día antes de cosecha, la concentración hallada fue de 0,97 mg.kg⁻¹.

Puede observarse en los gráficos 7 y 8 que indican la distribución del insecticida en las distintas etapas de vinificación y que corresponden a los tratamientos A y B, que el insecticida no fue detectado en los vinos de descube.

En el gráfico 9, correspondiente al tratamiento C, puede observarse como afecta el proceso de vinificación a los residuos del plaguicida. El mosto contiene 1,21 mg.kg⁻¹ de clorpirifos, pero esta concentración disminuye considerablemente en el vino de descube y el insecticida no es detectado en el vino terminado. En borras y orujos se encuentra una mayor cantidad del insecticida (3,47 y 0,52 mg.kg⁻¹ respectivamente). Por el comportamiento mostrado se puede decir que el insecticida clorpirifos al ser insoluble en agua quedó retenido por los orujos y borras, y pasó en menor proporción a los mostos y no se detectó en los vinos.

La distribución del plaguicida en el proceso de vinificación coincide con lo expuesto por Coscolla (1993), que dice que el contenido de residuos en el vino depende de las características del principio activo y de su solubilidad en agua o en la mezcla agua-alcohol. Éste será menor cuando el plaguicida sea insoluble en agua, ya que quedará retenido en la fase sólida (orujo y borra) y pasará muy poco a la fase hidroalcohólica.

Los resultados de este trabajo son similares a los obtenidos por Navarro (1999), en España, donde se estudió el comportamiento del plaguicida clorpirifos durante la vinificación y se observó que los residuos del insecticida desaparecían luego que el vino fue clarificado y filtrado.

Con esta evidencia se puede confirmar que **en vinos elaborados con uvas tratadas con clorpirifos, éste es eliminado en las distintas etapas de vinificación, no encontrándose residuos del plaguicida detectables en los vinos**, segunda hipótesis de este trabajo.

Se puede concluir que cuando se elabora vinos con uvas que contienen residuos de clorpirifos, la correcta realización de los procesos de vinificación (maceración, decantación, clarificación y filtración) influyen de una manera decisiva en la eliminación de los residuos del plaguicida, por lo tanto, es muy poco probable que después de una apropiada elaboración, encontremos niveles de residuos del insecticida nocivos para la salud.

Por último, la importancia de los resultados obtenidos radica en la utilidad de los mismos para registrar el insecticida clorpirifos etil ante SENASA, para el control de cochinilla harinosa y polilla de la vid en uvas y establecer su LMR y periodo de carencia.

10. BIBLIOGRAFÍA

BECERRA, Violeta. 2001. Residuos de pesticidas en el cultivo de la vid. IDA XXI (1): 57-59.

BECERRA, Violeta.; HERRERA, M. Eugenia.; GONZALEZ, Marcela; LANATI, Silvio.; MIANO, José. 2005. Se investiga el manejo de la cochinilla harinosa de la vid. En Ruralis; 1 (4): 8 – 11.

BECERRA, Violeta; GONZALEZ, Marcela; HERRERA, M. Eugenia; MIANO, José. 2006. Dinámica poblacional de *Planococcus ficus* Sign.(hemíptera-Pseudococcidae) - en viñedos . Mendoza (Argentina). En Rev. FCA UNCuyo; 38 (1): 1-6.

BECERRA, Violeta; NAVARRO, Rosana, MIANO, José; GOMEZ, Mario. 2011. Informe interno INTA -Programa Nacional Frutales (PNFRU) 52841. 2009-2012. (Inédito)

BECERRA, Violeta; PORTILLO, Valeria; MENDOZA, Graciela; TORRES, Javier; PUEBLA, Daniel; PORRETA, Damián. 2014. Cuantificación de los daños ocasionados en vid por *Lobesia botrana* Den. et Schiff y medición de la pérdida de producción generada por podredumbres. segundo simposio argentino de viticultura y enología (SAVE 2014). San Juan. Argentina.

CUCCHI, Nello y BECERRA, Violeta. 2009. Manual de Tratamientos Fitosanitarios para cultivos de clima templado bajo riego. Sección III: Vid. Ediciones INTA. Centro Regional Mendoza-San Juan. Mendoza. Argentina. 2 t.

COSCOLLA, R. 1993. Residuos de Plaguicidas en Alimentos Vegetales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.

DE BORBON, Carlos; GRACIA, Olga; GOMEZ TALQUENCA, G. S. 2004. Mealybugs and Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 in Vineyards of Mendoza, Argentina. En: American Journal of Enology and Viticulture, 55 (3): 283-285

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Código Internacional de Conducta sobre la Distribución y Utilización de Plaguicidas Directrices sobre publicidad de plaguicidas. Marzo 2010:5.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Límites máximos del Codex para residuos de plaguicidas. Definiciones. 1997. www.fao.org (agosto 2014)

GARCIA, Manuel. 1994. Plagas del viñedo mendocino. III Congreso Latinoamericano de la Vid y el Vino. Santiago de Chile.

GONZALEZ, Marcela. 2010. *Lobesia botrana*: polilla de la uva. En Revista Enología, 7 (2)

GONZALEZ, Roberto. 2002. Degradación de residuos de plaguicidas en huertos frutales en Chile. Universidad de Chile, Serie Ciencias Agronómicas – N° 4.

CASAFE - Cámara de Sanidad agropecuaria y fertilizantes - Guía de productos fitosanitarios 2011. Tomo I.

INV – Instituto Nacional de Vitivinicultura. Vitivinicultura Argentina. Reseña Histórica. www.inv.gov.ar/vitiv_arg.php (junio 2014).

INV – Instituto Nacional de Vitivinicultura. Estadísticas. Destino de las uvas ingresadas a establecimientos. www.inv.gov.ar (agosto 2014).

KULCZYCKI, Cecilia; NAVARRO, Rosanna; TURAGLIO M. Eugenia; BECERRA Violeta; SOSA, Alexis. 2012. Cinética de degradación y persistencia de clorpirifós en mandarinas y naranjas del Noreste argentino (NEA). En RIA Vol 38 (3): 282-288

Laboratorio de Fitofarmacia EEA Mendoza. Sistema de Gestión de la Calidad, Procedimiento Operativo del Laboratorio de Pesticidas- Determinación de residuos de pesticidas clorados, fosforados, piretroides y nitrogenados: CEF-PO-LP-05. 2005.

Laboratorio de Fitofarmacia EEA Mendoza. Sistema de Gestión de la Calidad, Procedimiento Operativo del Laboratorio de Pesticidas- Validación: CEF-PO-LP-15. 2010.

LUKE, M A; FROBERQ, J E; MASUMOTO, H T. 1975. Extraction and clean up of organochlorine, organophosphate and hidrocarbon pesticides in produce for determination by gas/liquid chromatography. Journal of AOAC. 58, (5): 1020 – 1026.

MENDOZA, Graciela. Daños producidos por *Lobesia botrana* en los viñedos mendocinos. Primer simposio argentino de viticultura y enología (SAVE 2011). Mendoza. Argentina: 125.

NAVARRO, S.; BARBA, A.; OLIVA, J.; NAVARRO, G.; PARDO, F. 1999. Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance. J. Agricultural Food Chemical. 47: 264-270.

NAVARRO, Rosanna; BECERRA, Violeta; MIANO, José; GOMEZ, Mario. 2006. Comportamiento temporal de los residuos de insecticidas utilizados para el control de *Planococcus ficus* Sign. "Cochinilla harinosa de la vid". XII Jornadas fitosanitarias argentinas. Catamarca.