



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

Tesis Doctoral

**"Persistencia, degradación y biodisponibilidad de
inhibidores y reguladores de crecimiento de
insectos en alimentos de origen vegetal".**

**Paula Payá Peñalver
2008**





1. OBJETO Y SÍNTESIS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

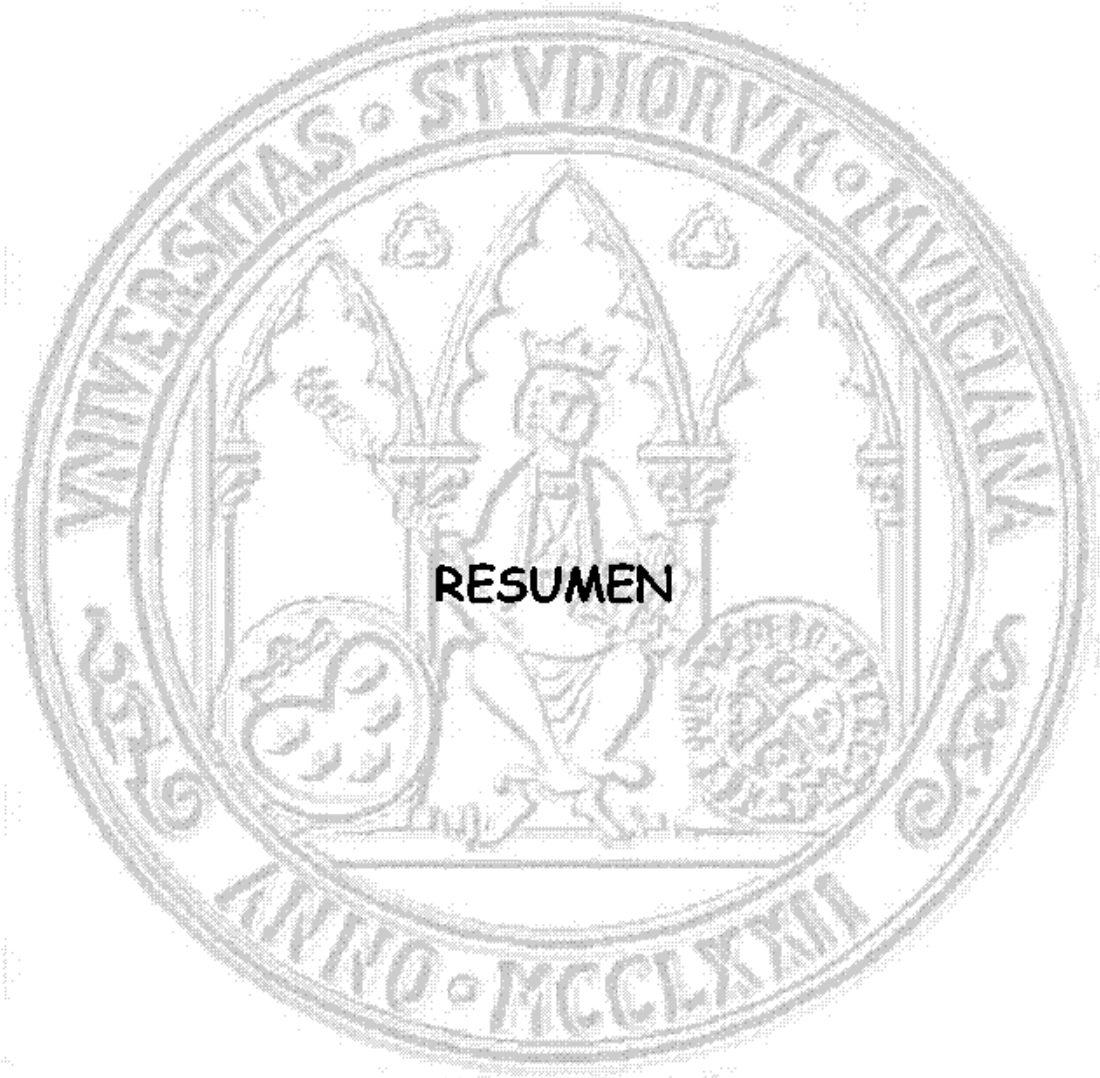




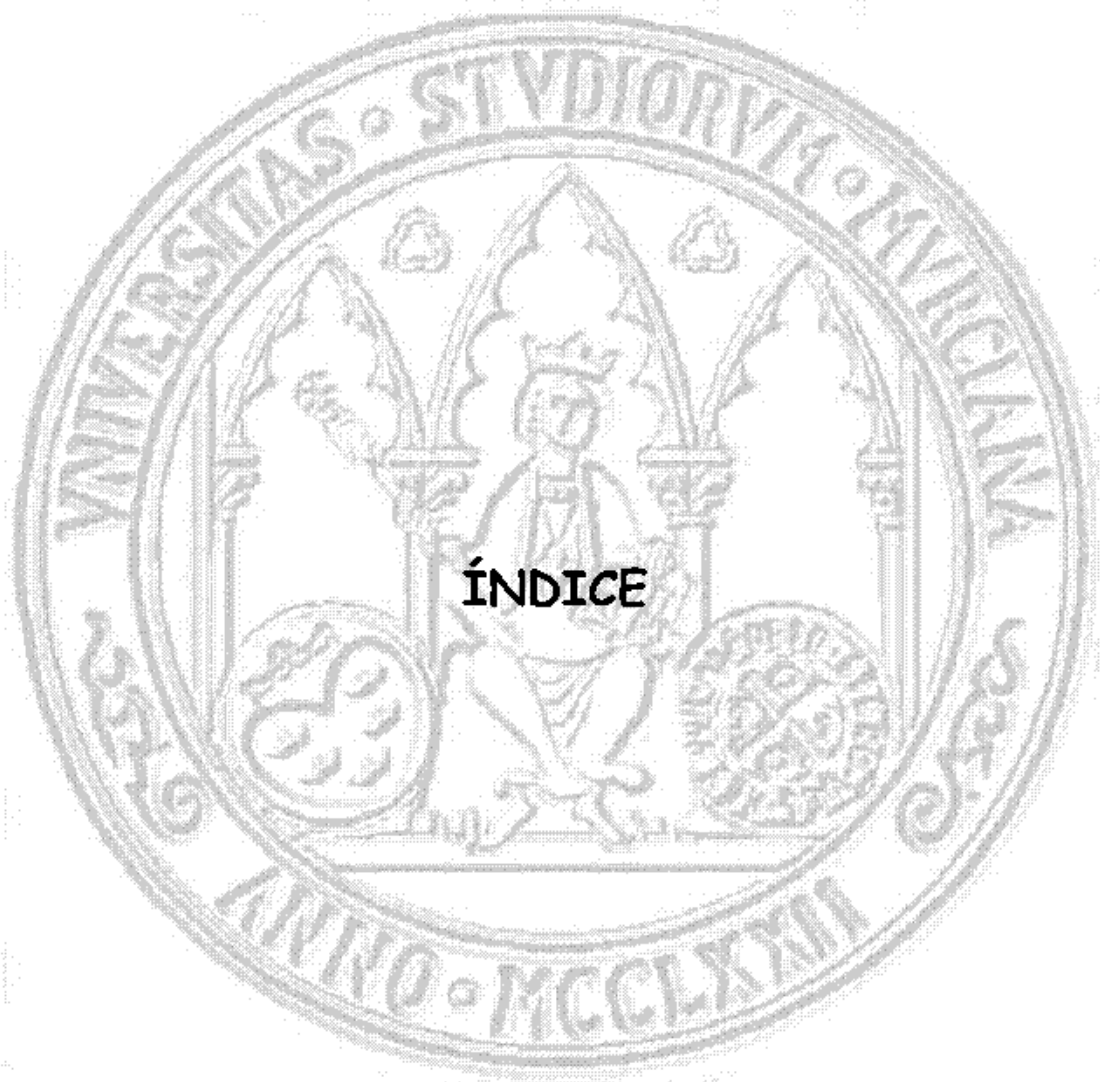
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES



6. BIBLIOGRAFÍA







ÍNDICE

A mis padres.

A Jesús.

Han sido cuatro años de trabajo apasionante e intenso. Al cerrar los ojos, los recuerdos se agolpan rápidamente. Aparecen anécdotas divertidas en las salidas al campo, risas en el laboratorio, momentos de flaqueza y desesperación, pero sobre todo, sobresalen las caras de muchas personas que, directa o indirectamente, habéis colaborado en que siguiese adelante. A la mayoría os lo he agradecido otras veces, en esta ocasión os lo digo formalmente, sin vuestra ayuda no hubiese sido posible.

A mis directores de tesis, los Drs. Alberto Barba y José Oliva. Por aceptar dirigirme, por formarme, por guiarme con buena brújula. Habéis sido unos verdaderos maestros.

A mis padres. Quizás porque ya lo vivimos juntos, quizás porque la universidad ha estado siempre muy presente, porque me inculcasteis los valores necesarios, lo cierto es que lo tuve muy claro y me apoyasteis incondicionalmente. Sin vosotros, imposible.

A Jesús. Mi pareja, mi compañero infatigable. Con tu paciencia, tu generosidad, tu optimismo y tu buen humor crecían mis fuerzas. Gracias por aceptar mis largas horas en el ordenador, por cubrirme en casa, por comprenderme, por estar a mi lado siempre.

A mis hermanas, a mis tías. Parte de un matriarcado muy especial que transmite unidad, afán de superación y sentido común.

A Mari Luz, a Rodri, a Feli. Por esos descansos llenos de risas, ese cigarrito a hurtadillas, por vuestra ayuda con los bidones de agua, el minitab o los residuos, y por tantas charlas compartiendo ideas sobre la universidad, los becarios de investigación, etc.

A los directores de mi trabajo en el CVUA-Stuttgart y el CSL de York y a mis compañeros de allí. Mis estancias de investigación fueron realmente enriquecedoras. Descubrí centros de investigación excelentes, integrados por grandes profesionales, acogedores y encantadores.

A mis amigos, que afortunadamente sois muchos. Por animarme, por reconocer este trabajo, por poder contar con vosotros.

Especialmente, a la Agencia Regional de Ciencia y Tecnología- Fundación Séneca de la Región de Murcia, por financiar mi beca predoctoral, parte de este trabajo y mis estancias externas; al Centro Tecnológico Nacional de la Conserva de la Región, por prestarme sus instalaciones para los análisis por masas y la elaboración de las conservas; al personal del Departamento de Nutrición de la Universidad Católica San Antonio, por su colaboración en la parte de biodisponibilidad y encuestas; a la Bodega San Isidro, por posibilitar la vinificación; a Nicolás y Fernando, de Syngenta, por su ayuda en los tratamientos fitosanitarios y en la búsqueda de las parcelas; al Dr. Miguel Ángel Cámara y al resto de personal de mi Departamento, por su colaboración en el proceso de esta tesis.

ÍNDICE

1. OBJETO Y SÍNTESIS.	1
2. INTRODUCCIÓN.	7
2.1. Implicaciones de la agricultura sostenible en la alimentación	10
2.2. Integración de los plaguicidas en la agricultura sostenible	15
2.2.1. Control químico de plagas y producción agrícola integrada	17
2.2.2. Aparición de los inhibidores y reguladores del crecimiento de insectos	28
2.3. Riesgos de los residuos de plaguicidas	36
2.3.1. Seguridad alimentaria	38
2.3.2. Análisis de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas	42
2.4. Persistencia y degradación en la cadena agroalimentaria	48
2.4.1. Persistencia y disipación en los cultivos	50
2.4.2. Persistencia y disipación en la transformación y almacenamiento de los productos agrícolas	58
2.5. Determinación de la exposición	65
2.5.1. Biodisponibilidad de los residuos en los alimentos	67
2.5.2. Ingesta de residuos de plaguicidas con los alimentos	73
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	79
3.1. Materiales	81
3.1.1. Plaguicidas estudiados	81
3.1.1.1. Reguladores del crecimiento de insectos	81
3.1.1.1.1. Fenoxicarb	82
3.1.1.1.2. Piriproxifen	84
3.1.1.2. Inhibidores del crecimiento de insectos	85
3.1.1.2.1. Flufenoxuron	86

3.1.1.2.2. Lufenuron.....	87
3.1.2. Alimentos agrícolas estudiados.....	89
3.1.2.1. Hortalizas.....	90
3.1.2.1.1. Calabacín (<i>Cucurbita pepo</i>).....	90
3.1.2.1.2. Lechuga romana (<i>Lactuca sativa</i>).....	92
3.1.2.1.3. Pepino español (<i>Cucumis sativus</i>).....	95
3.1.2.1.4. Pimiento morrón verde (<i>Capsicum annuum</i>).....	97
3.1.2.2. Cítricos.....	100
3.1.2.2.1. Mandarina satsuma (<i>Citrus unshiu</i>).....	100
3.1.2.2.2. Naranja navelina (<i>Citrus sinensis</i>).....	102
3.1.2.3. Frutos de hueso.....	105
3.1.2.3.1. Albaricoque búida (<i>Prunus ameniaca</i>).....	105
3.1.2.3.2. Melocotón catherina (<i>Prunus persica</i>).....	107
3.1.2.4. Uva.....	110
3.1.2.4.1. Uva tinta de vinificación (<i>Vitis vinifera</i> var. Monastrell).....	110
3.1.3. Estándares y productos químicos.....	113
3.1.4. Instrumentación.....	114
3.2. Métodos.....	115
3.2.1. Preparación de las muestras.....	123
3.2.2. Procedimientos de extracción.....	123
3.2.2.1. Extracción líquido-líquido en hortalizas.....	124
3.2.2.2. Extracción en fase sólida en cítricos y frutos de hueso.....	125
3.2.2.3. Método QuEChERS en uva tinta de vinificación.....	126
3.2.3. Análisis de residuos.....	127
3.2.3.1. CL-DAD en hortalizas, cítricos y frutos de hueso.....	128
3.2.3.2. CL-MS en uva tinta de vinificación.....	128
3.2.4. Validación analítica.....	128
3.2.4.1. Identificación, confirmación y cuantificación.....	129
3.2.4.2. Linealidad de respuesta del detector.....	131
3.2.4.3. Límites de detección y de cuantificación.....	131
3.2.4.4. Precisión y exactitud.....	132
3.2.5. Control de calidad.....	133
3.2.6. Experiencias supervisadas. Cinéticas de disipación.....	133
3.2.7. Ensayos de biodisponibilidad <i>in vitro</i>	136
3.2.8. Estudios de consumo.....	137
4. EXPERIMENTAL.....	141
4.1. Persistencia, degradación y biodisponibilidad <i>in vitro</i> de flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen en calabacín, pimiento, lechuga y pepino y sus preparados congelados y cuarta gama.....	143
4.1.1. Estudios de campo y procesado.....	145
4.1.2. Análisis de residuos.....	150
4.1.2.1. Validación analítica.....	150
4.1.2.1.1. Controles de calidad.....	152
4.1.2.2. Residuos en producto fresco.....	152
4.1.2.3. Residuos en productos elaborados.....	159
4.1.3. Diálisis en patrones, hortalizas frescas y procesadas.....	161
4.1.4. Estudio de dietas y cálculo de ingestas.....	164

4.1.5. Conclusiones	169
4.1.6. Producción científica	172
4.1.6.1. Comunicaciones a congresos	172
4.1.6.2. Artículos científicos	173
4.1.6.3. Capítulos de libro	173
4.2. Persistencia, degradación y biodisponibilidad <i>in vitro</i> de fenoxicarb, flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen en mandarina y naranja y sus preparados en conserva y zumo	174
4.2.1. Estudios de campo y procesado	175
4.2.2. Análisis de residuos	180
4.2.2.1. Validación analítica	180
4.2.2.1.1. Controles de calidad	182
4.2.2.2. Residuos en producto fresco	183
4.2.2.3. Residuos en productos elaborados	192
4.2.3. Diálisis en patrones, cítricos frescos y procesados	193
4.2.4. Estudio de dietas y cálculo de ingestas	197
4.2.5. Conclusiones	203
4.2.6. Producción científica	205
4.2.6.1. Comunicaciones a congresos	205
4.2.6.2. Artículos científicos	206
4.3. Persistencia, degradación y biodisponibilidad <i>in vitro</i> de fenoxicarb, flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen en albaricoque y melocotón y sus preparados en conserva	207
4.3.1. Estudios de campo y procesado	209
4.3.2. Análisis de residuos	214
4.3.2.1. Validación analítica	214
4.3.2.1.1. Controles de calidad	216
4.3.2.2. Residuos en producto fresco	216
4.3.2.3. Residuos en productos elaborados	227
4.3.3. Diálisis en patrones, frutos de hueso frescos y procesados	229
4.3.4. Estudio de dietas y cálculo de ingestas	233
4.3.5. Conclusiones	237
4.3.6. Producción científica	239
4.3.6.1. Comunicaciones a congresos	239
4.3.6.2. Artículos científicos	240
4.4. Persistencia, degradación y biodisponibilidad <i>in vitro</i> de fenoxicarb, flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen en uva y vino tinto de la denominación de origen Jumilla (Murcia)	241
4.4.1. Estudios de campo y procesado	243
4.4.2. Análisis de residuos	247
4.4.2.1. Validación analítica	248
4.4.2.1.1. Controles de calidad	249
4.4.2.2. Residuos en producto fresco	250
4.4.2.3. Residuos en productos elaborados	257
4.4.3. Diálisis en patrones, uva y vino tinto	263
4.4.4. Estudio de dietas y cálculo de ingestas	267
4.4.5. Conclusiones	272
4.4.6. Producción científica	275
4.4.6.1. Comunicaciones a congresos	275

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES.	
.....	277
5.1. Metodología	279
5.2. Experiencias supervisadas	280
5.3. Biodisponibilidad	284
5.4. Cálculos de ingestión	286
6. BIBLIOGRAFÍA.	
.....	289

1. OBJETO Y SÍNTESIS.

La fabricación de zumos y conservas vegetales junto con la manipulación de hortalizas y frutas en fresco y la elaboración de vinos son las actividades económicas más importantes del sector agroalimentario de la Región de Murcia. En los cultivos primarios que dan lugar a esta producción industrializada se utilizan nuevos plaguicidas de los que aún se pueden aportar nuevos conocimientos de sus características de persistencia y procesos de degradación, así como de los efectos indirectos en los consumidores que ingieren sus residuos a través de estos alimentos agrícolas. Concretamente, y dentro de las nuevas tendencias de uso de plaguicidas, se aplican inhibidores y reguladores del crecimiento de insectos (RCIs), diseñados en la década de los 90 como nuevos métodos de control biorracionales.

En el trabajo desarrollado en esta Memoria, se estudian algunos de estos compuestos, aplicados sobre diferentes cultivos de interés. Para ello, se han seleccionado por su representatividad, dos inhibidores de la síntesis de quitina, lufenuron y flufenoxuron, y dos reguladores del crecimiento, fenoxicarb y piriproxifen; y diferentes cultivos de hortalizas, frutos cítricos y de hueso y uva de vinificación.

De ellos, conocemos sus datos de registro, especificados en las etiquetas de sus formulados; por lo que parece interesante realizar estudios de disipación en campo en

diferentes condiciones de práctica agrícola, previos a su recolección y después de su manipulación. De esta forma, conoceremos sus niveles residuales en los vegetales en condiciones de buenas prácticas agrícolas (BPA) y en las condiciones más desfavorables, como la utilización sin observar plazos de seguridad, que denominamos críticas prácticas agrícolas (CPA). Además, al no existir normativa legal sobre límites máximos de residuos en los productos agrícolas industrializados, es importante también conocer la influencia que los diferentes procesos industriales, a los que se someten los productos agrícolas originales, tienen sobre su persistencia y desaparición.

Por otra parte, al actuar directamente sobre la síntesis de quitina y sobre el comportamiento fisiológico de los insectos, estos plaguicidas podrían afectar procesos similares en las personas, por lo que es necesario completar esta información con ensayos de biodisponibilidad y estudios toxicológicos-estadísticos de ingestión, que permitan conocer su asimilación en nuestro organismo.

El objeto, por tanto de esta Memoria, se puede resumir en:

- Obtención y validación de la metodología analítica para la determinación de los residuos de los insecticidas seleccionados, de acuerdo con los criterios de calidad de la norma ISO/IEC 17025 y las recomendaciones de la Guía SANCO (UE).
- Establecimiento de sus curvas de disipación, vida media y residuos finales en lechuga, pepino, pimiento, calabacín, albaricoque, melocotón, mandarina, naranja y uva, tras su aplicación en diferentes condiciones: buenas prácticas agrícolas y condiciones más desfavorables.
- Seguimiento de los niveles residuales durante las operaciones realizadas en la industria alimentaria para la transformación de los productos en fresco en productos congelados, de cuarta gama, conservas, zumos y vino, y durante su correspondiente periodo de conservación.

- Estudio de la biodisponibilidad de los plaguicidas en cada uno de los vegetales seleccionados.
- Valoración de la ingesta estimada de los plaguicidas estudiados.

En la Figura 1.1, se esquematiza el plan de trabajo seguido:

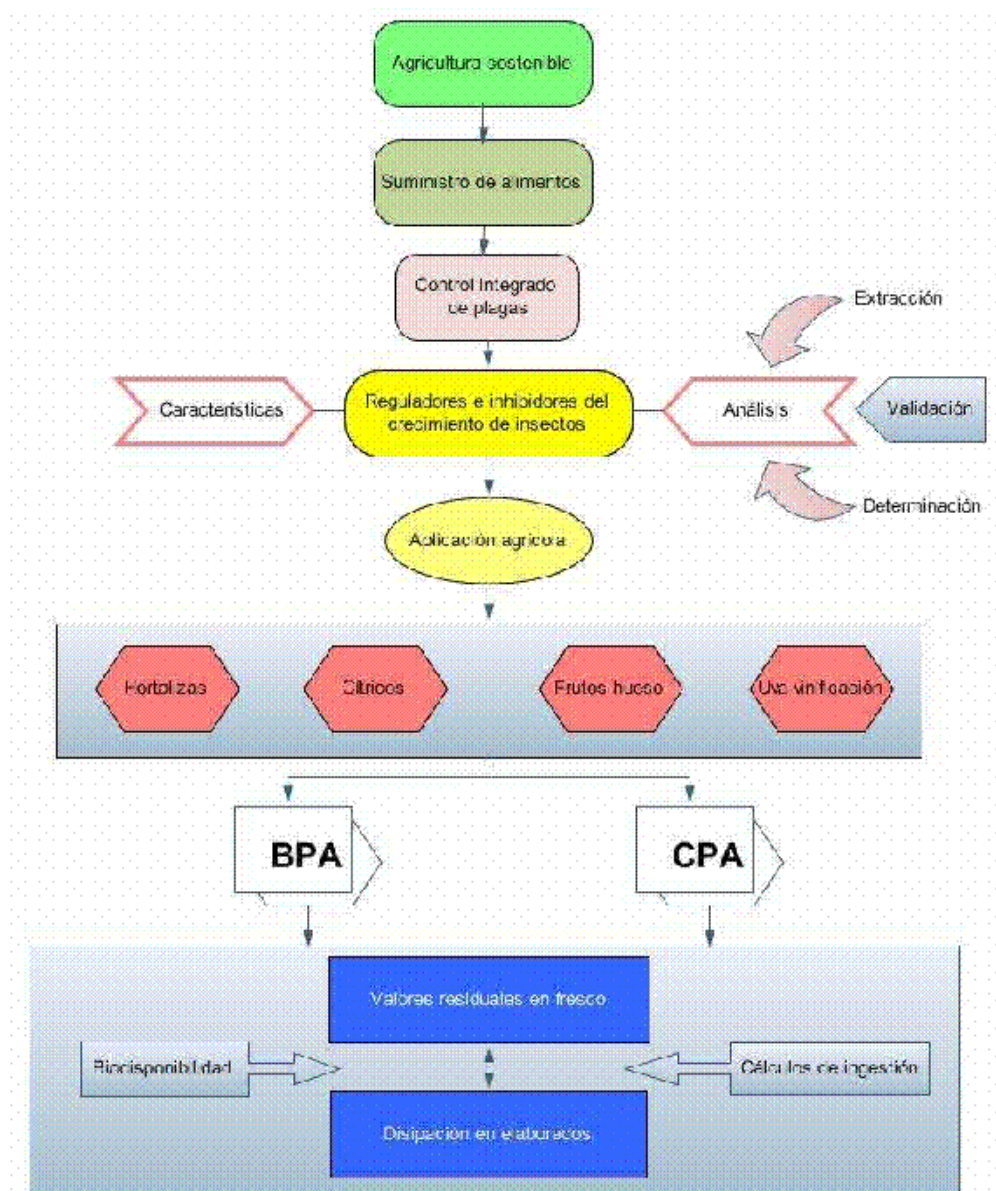


Figura 1.1.- Esquema de realización del trabajo.

De esta manera y globalmente, se aportarán conocimientos del comportamiento de los cuatro insecticidas en los alimentos agrícolas seleccionados, en las condiciones climáticas y de cultivo de nuestra Región, su eliminación durante los procesos de transformación industrial, y una aproximación de su absorción en el organismo humano, como aplicación para futuras acciones legales de la UE en materia de límites máximos de residuos y como forma de ofrecer información adecuada al consumidor.

2. INTRODUCCIÓN.

La etapa de mayor desarrollo de los plaguicidas sintéticos, destinados a la agricultura, comienza en el año 1945 con el uso del DDT (Nebel y Wright, 1993). En realidad, y aunque se utilizaban desde hace mucho más tiempo, ha sido en los últimos 63 años cuando se han convertido en importantes agentes externos para luchar contra las plagas y enfermedades que diezman nuestros cultivos. Al ser agentes biocidas, suscitan dudas, son objeto de estudio y se encuentran en entredicho por algunos sectores de la población. Son un tema de actualidad que genera controversia, y como ejemplo reciente, podemos citar el de la oscarizada película *Michael Clayton* en este último invierno, en la que intoxicaciones de trabajadores destapan un delito de falseo de documentos durante el registro de un plaguicida para uso agrícola.

El empleo de plaguicidas en la agricultura se remonta a muchos años atrás, aunque en los primeros tiempos fueron mayoritariamente obtenidos de fuentes de la naturaleza. Los primeros registros corresponden a la quema de azufre como fumigante en el año 1000 a.C. Más tarde, se usaron materias como extractos de pimiento y tabaco, agua jabonosa, aguacal, vinagre, trementina, aceite de pescado, salmuera y lejía, entre otras. Posteriormente, empezaron a utilizar sustancias químicas y más tarde se sintetizaron los primeros plaguicidas químicos. Al comienzo de la II Guerra Mundial (1940), la reserva de plaguicidas contenía por ejemplo compuestos arsenicales, aceites de

petróleo, nicotina, piretro, rotenona, azufre, cianuro de hidrógeno y criolita, y con el fin de esta Guerra y las necesidades mundiales, se abrió el arsenal de la química moderna (Casida y Quistad, 1998; Ware y Whitacre, 2004).

Por tanto, los intentos del hombre por controlar las plagas en los cultivos es una cuestión antigua, unida a la necesidad de supervivencia. Ahora, la población mundial se multiplica, la esperanza de vida es mayor y todos los consumidores necesitan alimentos sanos y seguros a buen precio.

En los últimos años, la actividad agrícola ha aumentado para abastecer esta demanda, gracias a la agricultura intensiva, a la producción integrada y ecológica actual, a las políticas de formación, y a la tecnificación del medio rural. Sin embargo, el 14,4% de la humanidad continúa pasando hambre (FAO, 2008a) y los riesgos derivados de una agricultura intensiva amenazan la integridad del consumidor y el medio ambiente.

2.1. IMPLICACIONES DE LA AGRICULTURA SOSTENIBLE EN LA ALIMENTACIÓN.

Formalmente, la agricultura sostenible puede ubicarse entre la agricultura productivista y la agricultura ecológica y entre otros, el Ministerio Español de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), la define como "un sistema integrado de prácticas de producción agrícola, cuya aplicación es dependiente de los ambientes o localidades, que a largo plazo pueda satisfacer las necesidades de alimentos y fibras de la población mediante la utilización eficiente de insumos y tecnologías agrarias, sin comprometer la conservación de los recursos naturales, la calidad del medio ambiente y la competitividad de los productos en precios y calidades que requiere el comercio internacional" (Jiménez, 2002; MAPA, 2003).

Un sistema adecuado de producción agrícola eficaz es clave en el nivel de alimentación y nutrición mundial. Actualmente, los productos agrícolas significan más del 50% de la producción final agraria española y algo más del 12% en la Unión Europea

(UE), destacando la producción hortofrutícola, el viñedo, el olivar y el cereal (MAPA, 2006a). Sin embargo, a pesar de que la agricultura se ha desarrollado extraordinariamente desde el punto de vista tecnológico en los últimos años, con importantes avances en los campos de irrigación, drenaje, conservación y sanidad, aún no se han resuelto las situaciones de desnutrición en el mundo.

El hambre se considera una situación vinculada a la seguridad alimentaria. Según la Declaración firmada por los Jefes de Estado en la Cumbre Mundial sobre la Alimentación de 1996, por invitación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la seguridad alimentaria es una condición que "existe cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana" (FAO, 1996). El hambre, por tanto, se debe a la inseguridad alimentaria promovida tanto por motivos económicos como cuantitativos o cualitativos. En términos absolutos, se han registrado progresos considerables en la cantidad de alimentos de origen vegetal disponibles en el mercado mundial. Como se muestra en la Figura 2.1, se calcula que en el último decenio (1996-2006), la producción agrícola mundial se ha incrementado de media en un 2,2%.

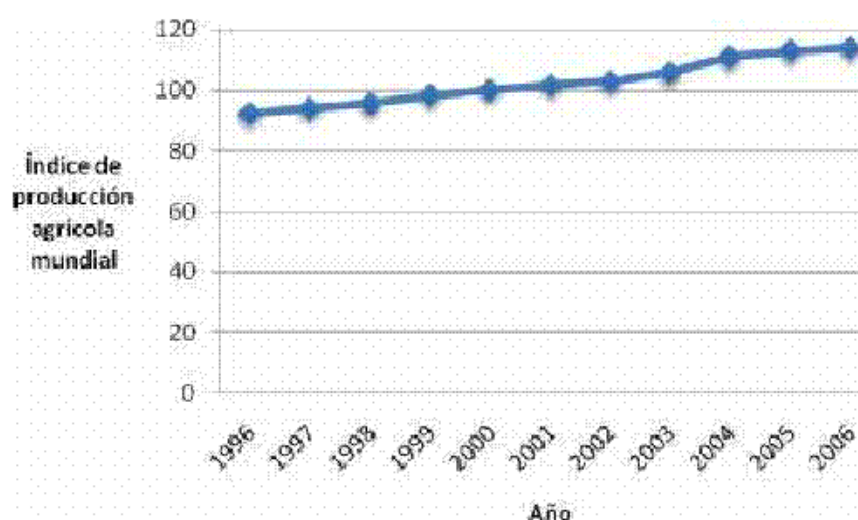


Figura 2.1.- Evolución de la producción agrícola mundial
(Fuente: FAOSTAT, 2008)

El suministro ha crecido al mismo tiempo que la población, por el aumento de la productividad agrícola entre otros factores, y el número de personas que padecen hambre y están malnutridas en el mundo ha disminuido considerablemente respecto a las cifras del pasado (FAO/FMFH, 2006).

En términos relativos, según el informe anual de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y FAO sobre la situación agrícola, el aumento de los ingresos por habitante, unido a la urbanización creciente, están modificando los hábitos alimentarios en la mayor parte de los países en desarrollo, con un alza del consumo de los productos animales, y por tanto de alimentación para el ganado, pero también de frutas, verduras y alimentos transformados (OCDE/FAO, 2005). En consecuencia, la producción agrícola por persona se ha visto incrementada en el último período (1996-2006) en un 1% de media, como se muestra en la Figura 2.2.

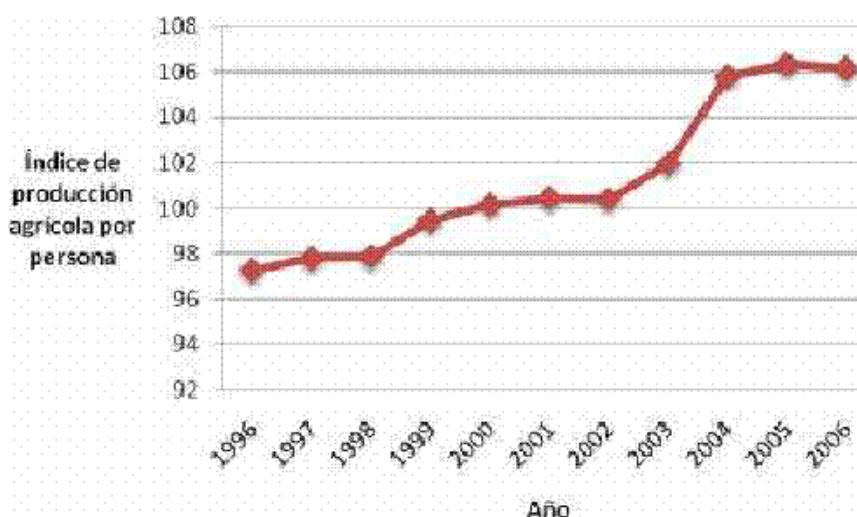


Figura 2.2.- Evolución de la producción agrícola mundial por persona
(Fuente: FAOSTAT, 2008)

Por tanto, actualmente se considera que el problema del abastecimiento mundial no es ya de cantidad, sino de seguridad, calidad y precio. Según FAO, el acceso a cantidades suficientes de una variedad de alimentos seguros y de buena calidad es la base del problema del hambre en estos momentos, incluso en aquellos donde el suministro

nacional es adecuado (FAO/FMFH, 2006). Aunque, los países en vías de desarrollo siguen adoleciendo de graves deficiencias en cuanto a la producción cuantitativa de alimentos. Según los últimos datos, como se muestra en la Figura 2.3, todos los países siguen presentando ciertas formas de hambre o malnutrición. En concreto, las últimas cifras indican que en el mundo aún pasan hambre 862 millones de personas, aproximadamente una de cada siete, lo cual representa una población mayor que la que vive en Europa (FAO, 2008a).

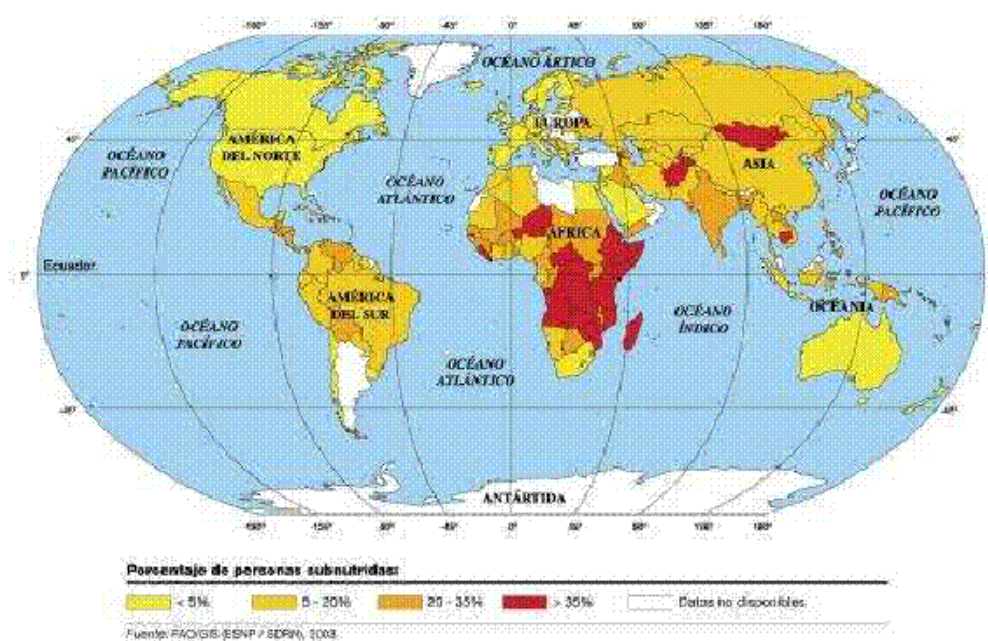


Figura 2.3.- *Proporción de personas subnutridas en el mundo (1998-2000)*
(Fuente: FAO/FMFH, 2006)

En la parte económica del problema, los más desfavorecidos son los países en desarrollo, ya que su poder adquisitivo es menor. Cuando una región de mercados amplios y de funcionamiento estable pierde una cosecha, los productos básicos de sus reservas o el excedente de alimentos de otras regiones fluyen normalmente hacia ese mercado para responder a la demanda y la posterior subida de precios, con lo que se alivia el déficit local de alimentos y el agravamiento de precios (Bell et al., 2007). Sin embargo, la probabilidad de que persistan problemas en la disponibilidad de alimentos es mayor en el

caso de mercados no bien desarrollados o de funcionamiento deficiente. Entre las circunstancias que con mayor probabilidad afectan a la adquisición de productos agrícolas se encuentran: la pérdida de bienes productivos, los salarios bajos y los cambios en los precios de los productos básicos.

En este sentido, las soluciones pasan por generar tecnologías sostenibles para la intensificación agrícola y en capacitar a los agricultores para aplicarlas, de forma que se puedan satisfacer a precios asequibles las necesidades de alimentos de las generaciones futuras, que se caracterizarán por un aumento de la población y la demanda efectiva, una disponibilidad más ajustada de los recursos del agua y suelo y mayores riesgos asociados con los procesos de cambio climático (FAO, 2008b).

Por otra parte, es necesario que el sistema productivo cumpla criterios de calidad y seguridad. Un alimento será totalmente de calidad cuando sea seguro, cuando no suponga peligros físicos, químicos o biológicos para el consumidor. En el campo de los plaguicidas, es cierto que la llamada "revolución verde" significó el avance esencial para alcanzar el rendimiento de la superficie agrícola que las previsiones de población mundial exigían, mediante la tecnificación del medio rural, los avances en genética de cultivos y los métodos de control de plagas, pero también que trajo consigo riesgos en la inocuidad de los alimentos y por tanto en su calidad.

Hoy se requiere que todas las etapas, desde la producción hasta el procesamiento, la comercialización y el consumo, respeten la calidad e inocuidad de los alimentos y se deberán realizar acciones apropiadas para garantizarlas. En esta cadena, las responsabilidades en seguridad y calidad son compartidas y empiezan en la producción agroalimentaria. Proteger la salud de los consumidores y promover la producción y el comercio de alimentos sanos y de calidad es una responsabilidad a nivel internacional, regional y nacional y los consumidores así lo exigen.

La garantía de seguridad y calidad en los alimentos, al igual que en el aspecto económico, sólo pueden residir en su fomento y control dentro de un sector agrario en

armonía con el medio ambiente (Comisión Europea, 1997). En otras palabras, es necesario un modelo de agricultura competitivo y sostenible, orientado al mercado, que mejore las condiciones de vida y abastezca a la población, pero que respete el medio ambiente y la salud. En las futuras prácticas agrícolas se deberán considerar las tendencias económicas, tecnológicas, ambientales, sociales y políticas para (Jiménez Díaz y Lamo de Espinosa, 1998; Yudelman et al., 1998; FAO, 2005):

- Establecer una producción sostenible, racionalizando las funciones del uso de la tierra.
- Disponer de medios para asegurar la renta de explotación, sin tener en cuenta las subvenciones.
- Incorporar componentes naturales de regulación que sustituyan inputs externos a la explotación.
- Minimizar la erosión del suelo, la polución ambiental, el consumo de energía fósil y los daños a la flora y fauna.
- Conservar el agroecosistema.
- Limitar los costes externos a la actividad agrícola.
- Obtener una adecuada relación entre los costes y beneficios en los aspectos ambientales.
- Mejorar la eficiencia en el uso del agua y su economía.

2.2. INTEGRACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS EN LA AGRICULTURA SOSTENIBLE.

FAO define el término plaguicida como "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 de plantas o animales indeseables 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” (FAO, 2006). Es una definición amplia, en donde se recogen todas las acciones posibles de un ingrediente activo.

En la aplicación agrícola, sus fines quedaron muy bien definidos en la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, aprobada por el Real Decreto 3349/1983, hoy recogidos por administraciones implicadas en este tema (BOE, 1984; MAPA, 2007; Consejería Valenciana de Sanidad, 2008):

- Combatir los agentes nocivos para los vegetales o prevenir su acción.
- Favorecer o regular la producción vegetal con excepción de los nutrientes o los destinados a la enmienda de suelos.
- Conservar los productos vegetales.
- Destruir los vegetales indeseables.
- Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.

Por estas funciones, los plaguicidas se consideran biocidas y fitosanitarios, ya que pueden eliminar o prevenir la aparición de plagas, enfermedades y malas hierbas (BOE, 2002). No obstante, actualmente el término biocida se reserva para aquellos plaguicidas de utilización en sectores no agrícolas como la conservación de la madera, la desinfección o determinados usos domésticos; y los productos fitosanitarios para los plaguicidas de aplicación agrícola o usos relacionados como la jardinería paisajista, mantenimiento de las vías de transporte, silvicultura y jardinería doméstica (Comisión Europea, 2002).

Estos compuestos están diseñados por tanto para influir en procesos fundamentales de organismos vivos. Pero su potencial para controlar los organismos nocivos y mejorar la salud de las plantas puede causar efectos adversos sobre organismos a los que no van dirigidos en el ámbito de la salud humana y el medio ambiente. Son un arma de doble filo y ése es su inconveniente. Su utilización dependerá del grado de compromiso que se alcance entre los beneficios para la agricultura y la alimentación y los riesgos para la salud y el medio ambiente.

2.2.1. CONTROL QUÍMICO DE PLAGAS Y PRODUCCIÓN AGRÍCOLA INTEGRADA.

Además de las limitaciones ambientales, uno de los grandes retos con los que se ha enfrentado la agricultura para lograr que progrese una cosecha es la protección de los cultivos frente a las plagas, enfermedades y malas hierbas, integrados generalmente en el término de "plaga agrícola". Los agentes causantes están repartidos entre infinidad de especies, agrupándose biológicamente en (Comuet, 1993; Carrero y Planes, 1995; Cabello, 1997; MAPA, 2001; García Marí y Ferragut, 2002; Domínguez García-Tejero, 2004; Agrios, 2005; Villarias, 2006):

a) Mamíferos.

- **Roedores.** En esta clase de vertebrados se encuentran algunos roedores e insectívoros, tales como ratas, ratones y topos, que causan daños en las cosechas y en las raíces con sus galerías.
- **Aves.** Las grandes bandadas causan estragos en las siembras y en algunos árboles.

b) Artrópodos.

- **Insectos.** Constituyen el mayor número de plagas y las más dañinas.
- **Arácnidos.** Algunos ácaros son muy perjudiciales en épocas de calor y tiempo seco.
- **Crustáceos.** Algunas cochinillas pueden ser nocivas.

c) Moluscos.

- Gasterópodos. Los caracoles y las babosas también pueden causar daños a muchos cultivos.

d) Plantas fanerógamas.

- Cuscuta.
- Hopo.

e) Hongos.

- Ectoparásitos.
- Endoparásitos.

f) Bacterias.

g) Virus.

A lo largo del tiempo, estas plagas se han tratado de eliminar desde diferentes estrategias, con los denominados métodos de "lucha" (término hoy en desuso), métodos de "control" o de "producción". Las técnicas y su terminología han ido evolucionando a medida que el conocimiento de la fisiopatología vegetal, la ecología y la química agrícola avanzaban. Uno de los métodos más antiguos empleados hoy son los medios agronómicos o culturales, con técnicas como (Carrero, 1996; Marco y Pérez, 2004):

- Manejo de la época de plantación o siembra así como la recolección precoz, para disminuir los daños de algunas plagas que atacan en una determinada fase del cultivo.
- Utilización de material de propagación sano.
- Mantenimiento del huésped en óptimo estado general, de modo que sea más tolerante al ataque de las plagas que si no gozase de él.

- La rotación de cultivos para evitar la propagación de plagas.
- La utilización de cultivos cebo que atraen a una determinada plaga para librar al cultivo verdadero de su ataque.
- Las labores culturales que puedan destruir algunos agentes nocivos que tengan alguna fase de su desarrollo en el suelo.

En 1945, con las necesidades alimenticias y de desarrollo tras la II Guerra Mundial, la "lucha química" alcanza su máximo auge, con los plaguicidas orgánicos de síntesis. Sus inicios constituyeron una verdadera revolución en la problemática de las plagas, ya que la efectividad y bajo coste de estos nuevos productos supuso un gran salto cualitativo en la protección de los cultivos y permitió durante muchos años aumentar las producciones agrícolas para alimentar a la población. Desde entonces han sido diseñados para acabar con todo tipo de especies (Barberá, 1989; Primo, 1991; Carrero, 1996; De Liñán, 2008; Yagüe y Yagüe, 2008). Durante su desarrollo ha pasado por varias fases de utilización que se pueden resumir en (Pérez, 2000):

a) Control químico indiscriminado. Basado en el empleo de plaguicidas de amplio espectro, aplicados sistemáticamente según un esquema rígido y preestablecido o calendarios, realizándose en muchas ocasiones tratamientos sin estar presente la plaga. Generalmente, se combina un número reducido de materias activas, que se repiten varias veces en una misma campaña. Las ventajas de este tipo de estrategia son:

- Inicialmente disminuyen los daños producidos por las plagas.
- Es un método sencillo y de fácil aplicación por los agricultores.

b) Control químico aconsejado. Consiste en la racionalización de los tratamientos en función de las recomendaciones dadas periódicamente por las Estaciones de Avisos pertenecientes a las Administraciones Autonómicas y por técnicos especialistas, basadas en un profundo conocimiento de la biología de las plagas, que permiten decidir el momento adecuado para su realización así como los productos fitosanitarios más idóneos.

Las ventajas que presenta este método son:

- Se produce una reducción del número de tratamientos y mejora su eficacia.
- Disminuye la contaminación ambiental y el riesgo de aparición de residuos en las cosechas.

Sus inconvenientes son:

- Las recomendaciones se realizan a nivel de zonas bastante extensas, no considerando las diferencias microclimáticas que existen dentro de cada área, por lo que existe la posibilidad de realizar tratamientos fuera de plazo o con una cadencia inadecuada.
- Las recomendaciones se realizan sin conocer la densidad de plaga en cada parcela, por lo que se siguen empleando productos polivalentes y poco selectivos.
- Sigue existiendo riesgo de aparición de resistencias.

c) Control químico dirigido. El control dirigido no se limita únicamente a determinar el momento oportuno de tratamiento de una plaga y el producto más efectivo, sino también la necesidad real de la intervención. Se introduce el concepto de "umbral económico de daños", definido como la densidad de plaga a partir de la cual los daños que se ocasionan son superiores al coste de las medidas de control que los evitaría. Las ventajas de su empleo son:

- Se produce un buen control de plagas y enfermedades.
- Se utilizan productos más selectivos y de baja toxicidad, respetando los organismos auxiliares o enemigos naturales de las plagas.
- Se reduce el número de tratamientos que se aplican en cada campaña y el nivel de residuos en cosecha.

- Al disminuir el número de tratamientos, se reducen los costes de producción.

Como inconvenientes hay que citar:

- Exige una mayor dedicación por parte del agricultor y/o técnicos especialistas en la determinación de los niveles de plagas de cada parcela.
- El agricultor tiene que asumir un mayor grado de riesgo en sus decisiones.

Hoy en día sabemos que el uso prologando del control químico como la alternativa efectiva y rápida contra las plagas, y en ocasiones su abuso, ha influido negativamente en los seres vivos y el medio ambiente. Debido a esto, en los últimos años, ha surgido una gran preocupación por el uso de estos productos, llegando incluso algunos sectores de la agricultura, como es la agricultura ecológica, a prohibir su uso de manera general.

Los problemas más importantes generados por este exceso del control químico, se pueden resumir en (Pérez, 2000; Marco y Pérez, 2004; Coscollá, 2006):

- Aparición de resistencias. Es frecuente que al realizar aplicaciones continuadas con un mismo plaguicida su efectividad contra determinada plaga vaya disminuyendo, a pesar de ir aumentando la dosis, ya que los organismos nocivos ponen en funcionamiento determinados mecanismos biológicos que les proporcionan resistencia a dicho plaguicida.
- Aumento de los costes de los tratamientos con agroquímicos. Debido al aumento del número de tratamientos, dosis y el tiempo necesario para acabar con las resistencias.
- Aparición de plagas secundarias. Al alterar el equilibrio del ecosistema eliminando una población, se favorece la aparición de otras controladas naturalmente por la primera al principio y que pueden convertirse en una nueva plaga, también por la trofobiosis de las plantas de alrededor provocada por los cambios fisiológicos en la planta para mejorar su calidad nutritiva y su cantidad, etc.

- Contaminación ambiental. Los residuos de estos productos pueden permanecer largo tiempo en el suelo o en el cultivo, estar presentes en la atmósfera o también en aguas superficiales y subterráneas.
- Peligrosidad para otros integrantes del ecosistema. Los plaguicidas no selectivos destruyen tanto las plagas como la fauna útil (enemigos naturales y polinizadores). Asimismo, a consecuencia de la contaminación ambiental, pueden afectar la salud de los seres vivos, incluido el hombre como aplicador o consumidor, y en el buen estado del medio ambiente.

No obstante, resulta interesante conocer las corresponsabilidades con otros factores como la contaminación atmosférica, la influencia del estilo de vida y la genética, en la salud humana. Asimismo, está aún por determinar el grado de relación entre los factores que condicionan la compartimentación medioambiental de los residuos en aguas, suelos y cultivos, junto a índices idóneos de riesgos ambientales y humanos por aplicación de plaguicidas, que incluyan los aspectos económicos de los diferentes tipos de control. Así lo demuestra la evolución de numerosos artículos de investigación y revisión sobre estos aspectos (Pimentel et al., 1992; Al-Saleh, 1994; Stephen, 1995; van der Werf, 1996; Pimentel y Greiner, 1997; Wijnands, 1997; Tykva, 1998; van der Werf y Zimmer, 1998; Maroni et al., 1999; Levitan, 2000; Reus y Leendertse, 2000; Finizio y Villa, 2002; Reus et al., 2002; Sanborn et al., 2002; Vercruysse y Steurbaut, 2002; Bues et al., 2004; Padovani et al., 2004; Sharpe e Irvine, 2004; De Smet et al., 2005; Cross y Jones, 2006; Matthews, 2006; Rubio, 2006; Travisi et al., 2006; Stenrød et al., 2008; Travisi y Nijkamp, 2008).

A pesar de esto, es obvio que la contribución de los plaguicidas en el deterioro de la salud y el medio ambiente es clara y se debe minimizar mediante el cumplimiento de una serie de normas que aseguren una correcta aplicación, enmarcadas siempre en el ámbito del control químico dirigido (Matthews, 1999, 2000; Holland y Sinclair, 2004; Marco y Pérez, 2004). Entre ellas, cabe destacar:

- Efectuar tratamientos únicamente cuando sea necesario.

- Elegir adecuadamente el producto y siempre que sea posible de baja toxicidad, selectivo y de bajo efecto residual.
- Seguir las recomendaciones indicadas en el producto a aplicar y realizar la consulta oportuna cuando exista duda.
- Aplicar la dosis recomendada en cada momento, pues una dosis mayor puede acarrear resistencias y un aumento del residuo.
- Alternancia de grupos químicos y modo de acción para evitar resistencias.
- Realizar tratamientos localizados cuando sea necesario.
- Realizar una aplicación correcta, con una maquinaria en buen estado y debidamente calibrada. Tener en cuenta las causas de derivas en parcelas colindantes y no realizar nunca la limpieza de los tanques en cursos de agua.
- Aplicar el producto en el momento adecuado respetando los plazos de seguridad.
- Llevar un control de la evolución de las plagas.
- Usar productos compatibles con el actual control biológico.

Actualmente, uno de los métodos de control que está en auge es el control biológico. Consiste en la destrucción de los agentes nocivos mediante agentes beneficiosos hasta llevar a la población de la plaga a niveles sin peligro. Esto había sido usado en el pasado con sueltas de hormigas (*Calasoma sycophanta*) contra *Lymantria dispar* o de *Rodolia cardinalis* contra la cochinilla acanalada de los cítricos, existiendo en 1925 más de 30 casos de establecimiento de enemigos naturales. Se ha realizado con enemigos naturales autóctonos contra artrópodos como *Diglyphus isaea*, *Eretmocerus mundus*, *Encarsia lutea* y *Encarsia transvena*, etc., aunque potencialmente la fauna útil o auxiliar contra una plaga la puede integrar cualquiera de sus agentes bióticos parásitos. También se está realizando con productos microbiológicos formulados, como por ejemplo micelios, conidios y esporas de hongos, con el fin, en ambos casos, de que los beneficiosos

establezcan relaciones parasitarias con los perjudiciales (Gerling, 1986; Peña, 1988; Viñuela y Jacas, 1993; Rodríguez et al., 1994; Sánchez, 1994; Malais y Ravensberg, 1995; Alcázar et al., 2002; Barranco, 2003).

Quando se emplean enemigos naturales se conoce como lucha macrobiológica, existiendo ya una extensa disponibilidad comercial, y si es con formulados microbiológicos, como lucha microbiológica. Hasta ahora, los objetivos han sido la araña roja, minadores, mosca blanca, *Bemisia tabaci*, *Autographa gamma*, *Chrysodeixis chaicites* y *Spodoptera exigua*, malas hierbas (Samways, 1990; Strobel, 1991) y enfermedades (Forsythe, 1992; Thun, 2001; Jacas et al., 2005). Hoy en día se considera como un método seguro, efectivo, permanente y económico para reducir el efecto de plagas sobre los cultivos. Sin embargo, necesita apoyarse en estrictos estudios sobre dinámica de poblaciones y un gran conocimiento sobre las especies y los ecosistemas para alcanzar su máxima utilidad, estribando en esto la mayor dificultad para la implantación de este tipo de control.

Otro concepto relacionado con el control biológico, es el control por métodos de interferencia, ya sean hormonales o feromonales, o también conocido como control etiológico (Carrero, 1996). Mediante sustancias químicas con base hormonal, se actúa sobre el comportamiento de los organismos nocivos pero sin provocar su muerte como por ejemplo: esterilizándolos, atrayéndolos hacia algún lugar con trampas, impidiendo la puesta, dispersándolos, etc.

Existen además otras estrategias posibles como las cuarentenas legislativas, enmarcados en el control legislativo; la modificación de las condiciones ambientales en las que viven las plagas, conocidos como control físico, muy utilizado en el almacenamiento de las cosechas; y el control genético, donde se aumenta la resistencia de la planta mediante manipulación genética, creando plantas transgénicas o provocando la esterilización de las especie plaga, entre otros (Carrero, 1996).

Todos los mecanismos de control anteriores tienen cabida en la producción agrícola con control integrado. Es la apuesta del presente y del futuro. Aunque el concepto de

lucha integrada se inició en Alemania y Norteamérica a finales de la década de los cincuenta y fue definido por FAO a nivel internacional en 1967, su desarrollo ha sido lento pero constante y actualmente ha adquirido plena vigencia con la identidad de "producción integrada" o "manejo integrado de plagas" (Dik y Albajes, 1999). La Organización Internacional para el Control Biológico e Integrado de Animales y Plantas Nocivos junto con la Sección Regional del Paleártico Oeste (IOBC/WPRS) la define como el sistema de producción sostenible de alimentos de alta calidad mediante métodos respetuosos con el medio ambiente y manteniendo los ingresos de la explotación (IOBC/WPRS, 1999; MAPA, 2003). Su objetivo es una combinación de técnicas que permita reducir las poblaciones de plagas de forma que no originen daños económicos pero que no se altere el funcionamiento del ecosistema ni suponga riesgos toxicológicos. Sus líneas de actuación son:

- Tiene en cuenta el medio ambiente para intentar conservar los recursos (edafológicos, genéticos, hidráulicos, etc.) y mejorar el medio (paisaje, ecosistemas, seguridad e higiene de la población rural, etc.).
- No pretende eliminar la plaga sino mantenerla por debajo de umbrales de tolerancia previamente fijados.
- Utiliza una serie de técnicas culturales, varietales, mecánicas, químicas y sobre todo biológicas, dando prioridad siempre a los procedimientos no químicos.
- Uso racional de insumos (energéticos, fitosanitarios, fertilizantes, etc.).
- Gestión adecuada de residuos, tanto sólidos como líquidos.
- Sólo se justifica la aplicación de medios de control cuando el nivel de plaga sobrepasa un umbral de tolerancia económica.
- Los medios de lucha empleados no deben impedir, dentro de lo posible, la acción de los factores naturales de mortalidad de la plaga.
- El método de lucha debe proteger adecuadamente el cultivo y permitir la obtención de cosechas rentables.

La aplicación de este sistema de control requiere por tanto gran estudio y conocimiento del ecosistema agrario junto con un sistema de evaluación y gestión que permita decidir la estrategia de control y el modo de ejecutarla. Los factores que se deben tener en cuenta se pueden resumir en (Albajes, 1992):

- Factores inherentes al cultivo. Susceptibilidad varietal, fenofase susceptible, estado fitosanitario de la planta y vigor, etc.
- Factores inherentes a la plaga. Niveles poblacionales, fuentes de inóculos, capacidad de diseminación, agresividad, especificidad, fauna auxiliar, etc.
- Factores abióticos o inherentes al medio. Condiciones edafoclimáticas como tipo de suelo, altura, temperatura, humedad relativa, precipitaciones, etc.

La aplicación de un programa de producción agrícola integrada responde indudablemente a un estadio superior en el conocimiento del cultivo y su entorno. La armonización de los métodos a utilizar no puede prefijarse, sino que se emplearán en el momento más adecuado. Debido a esto, el establecimiento de este tipo de producción se hace casi imposible a nivel individual, por lo que son necesarias las asociaciones entre agricultores a nivel local.

El MAPA reguló en 1983 un tipo de agrupaciones conocido como ATRIAS (Agrupación para el Tratamiento Integrado en la Agricultura) en las que se orienta a los agricultores desde asociaciones hacia la puesta a punto de las técnicas de control integrado y la formación del personal técnico y especializado en la dirección y aplicación de dichas técnicas, teniendo en cuenta los sistemas de cultivos locales (MAPA, 1983; Arias et al., 1987; Lozano y Balduque, 2001). España, y en particular Andalucía y Cataluña, han sido pioneras en el desarrollo de estos programas en el cultivo de algodón, extendidos posteriormente a otros cultivos como viña, olivar, frutales, hortícolas, etc. en regiones como Murcia, Valencia y Baleares (Torà et al., 1995; Caballero, 1998; Cruz, 1998). Posteriormente, en el ámbito valenciano se tradujeron en ADV (Asociaciones de Defensa

Vegetal) (Coscollá, 1998a, 1998b). Las ATRIAS han sido casi siempre el primer paso hacia la inclusión en programas oficiales de producción integrada.

Con estas asociaciones, se ha ido desarrollado la producción integrada como marca de garantía, impulsada y regulada por el MAPA, entre otros, con el fin de conseguir un instrumento de apoyo a la comercialización de productos que satisfagan la demanda de los mercados más exigentes, y en estos momentos ya cuenta con un significativo reconocimiento por parte de los grandes importadores en el marco de la UE. Son ya más de 460.000 Ha las contempladas en este sistema de producción a nivel nacional, con once Comunidades Autónomas al frente, cada una con un logotipo específico como marca de garantía, además del que existe a nivel nacional. Estas Comunidades son Andalucía, La Rioja, Aragón, Galicia, País Vasco, Cataluña, Extremadura, Navarra, Castilla-León, Región de Murcia y Comunidad Valenciana (MAPA, 2008b).

Actualmente, el control integrado de plagas se realiza dentro de los programas oficiales de producción integrada que se desarrollan a través de decretos y órdenes correspondientes, que establecen un reglamento genérico autonómico y tantos reglamentos específicos como cultivos sobresalientes en el área en cuestión, establecidos por el MAPA. En los diferentes decretos siempre existen una serie de puntos comunes como la definición del programa, la promoción de productos obtenidos, reglamento básico, comisión coordinadora, consejo y sanciones.

Para los agricultores, la inclusión oficial en estos programas regulados y sus trámites supone dificultades añadidas al tipo de producción, que ya de por sí es compleja. De hecho, la mayoría de las Regiones han tenido fluctuaciones a la baja en las hectáreas dedicadas a este tipo de producción con el paso de los años, entre ellas Murcia, Cataluña, Valencia, Navarra, Castilla-León, La Rioja y País Vasco, aunque otras como Andalucía, Extremadura, Galicia y Aragón, han experimentado subidas y a nivel nacional la producción integrada ha logrado aumentar en el último período (2002-2007). En particular, Murcia cuenta con aproximadamente 11.400 Ha para hortalizas y frutales, representado un 2,47% respecto de la producción integrada española, incluyéndose todos

los cultivos y sus transformados objeto de estudio de esta tesis en este tipo de producción a excepción del albaricoque, aunque el almendro ha supuesto tradicionalmente la mayoría de la superficie. A nivel nacional, Andalucía y el olivar representan los mayores exponentes de este tipo de producción, mientras que cultivos como los cítricos, frutales, hortícolas y vid han ido disminuyendo, estacándose o en cualquier caso han tenido algún repunte aislado (MAPA, 2008b).

A pesar de esto, los éxitos que se están obteniendo en la aplicación de este tipo de programas en varias zonas españolas, especialmente en lo que se refiere a la reducción del consumo de fitosanitarios, permite augurar un importante futuro para el control integrado de plagas, enfermedades y malas hierbas. Se esperan resultados superiores en la cantidad y calidad de la producción con rentabilidad económica y preservación del medio ambiente y la seguridad.

2.2.2. APARICIÓN DE LOS INHIBIDORES Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO DE INSECTOS.

De las más de 1.000.000 de especies conocidas de insectos, unas 10.000 se alimentan de cultivos, y de ellas, a nivel mundial, aproximadamente 700 causan la mayor parte del daño a los cultivos de la humanidad, tanto en campo como en almacenamiento (Ware y Whitacre, 2004).

Las últimas cifras publicadas por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (US EPA), indican que en el periodo 2000-2001, a nivel mundial, se emplearon $1,2 \cdot 10^{10}$ kg de ingredientes activos. Como muestra la Figura 2.4, los herbicidas representaron la mayor proporción, seguida por el uso de insecticidas y fungicidas (US EPA, 2007).

Sin embargo, en total, la cantidad de plaguicidas utilizados en el mundo disminuyó con respecto al periodo anterior para todos los tipos de plaguicidas, como muestra la Figura 2.5, siendo los insecticidas los más regulares en cuanto a su uso en el mundo (US EPA, 2007).

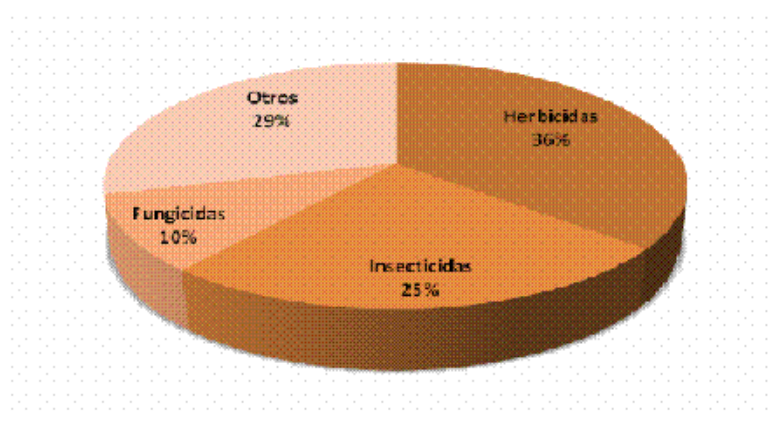


Figura 2.4.- Empleo de plaguicidas en el mercado mundial en el 2000-2001
(Fuente: US EPA, 2007)

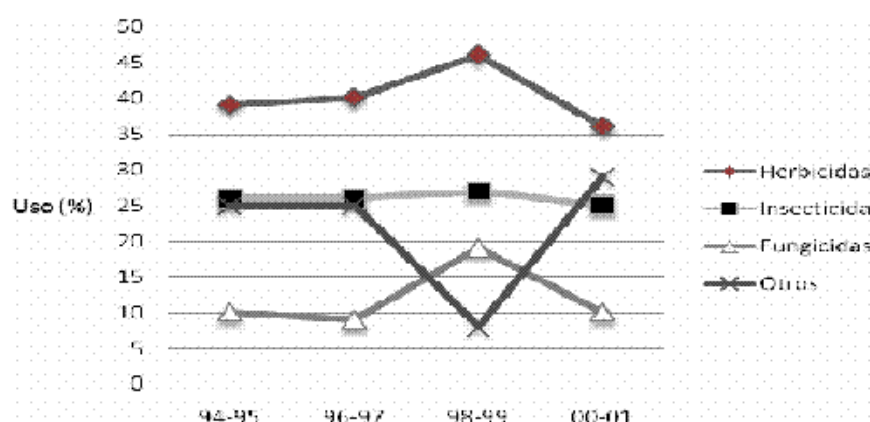


Figura 2.5.- Evolución del empleo de plaguicidas a nivel mundial
(Fuente: US EPA, 2007)

Con el objetivo de integrar plenamente el control químico dirigido en la producción agrícola integrada y conseguir una agricultura sostenible, se crearon nuevos mecanismos de control conocidos como "métodos biorracionales". Se basan en la modificación de algún proceso fisiológico o de comunicación específico de la plaga, para controlar finalmente el nivel de población perjudicial. Comprenden el uso de diversos productos químicos, en su mayoría semejantes o idénticos a sustancias producidas por insectos y plantas. Hoy día están incluidos en el manejo integrado de plagas (Bellés, 1988; Viñuela et al., 1991; Marco y Pérez, 2004). Los más importantes son:

a) Uso de feromonas. De los distintos tipos que se pueden distinguir según su función biológica, sólo dos han sido utilizados hasta el momento en el control de plagas: las sexuales (para seguimiento de poblaciones de insectos, trampeo masivo, control por confusión y control por atracción y muerte) y, en menor medida, las de agregación (fundamentalmente para el trampeo masivo).

b) Empleo de cairomonas. Son metabolitos secundarios de las plantas que intervienen en la atracción de los insectos por parte de ellas, pudiendo ser utilizadas para el seguimiento de poblaciones de especies fitófagas y para el trampeo masivo.

c) Utilización de alomonas. Son también metabolitos secundarios de las plantas, pero en este caso las utilizan para defenderse del ataque de los insectos. Según el tipo de alomona, pueden actuar como tóxicos, cesadores de la alimentación o antiapetitivos, repelentes y alteradores del balance hormonal. Un caso práctico lo representa la azadiractina.

d) Utilización de reguladores del crecimiento de los insectos (RCI). Incluyen una amplia gama de compuestos capaces de alterar el desarrollo y crecimiento de los mismos. La mayoría de ellos interfiere la formación normal de la cutícula del exoesqueleto de los insectos. En este grupo se incluyen los plaguicidas objeto de estudio de esta tesis, fenoxicarb, piriproxifen, lufenuron y flufenoxuron. Se pueden establecer los siguientes subgrupos:

- Hormona juvenil I, II y III, juvenoides y juvenógenos. Relacionados con el mecanismo de acción de la hormona juvenil natural de los insectos. En este subgrupo se incluyen fenoxicarb y piriproxifen.
- Antihormonas juveniles o precocenos I, II y III. Su uso práctico es nulo hasta ahora.

- Ecdisona u hormona de la muda y ecdisoides. Algunos de sus componentes están en el mercado tras el descubrimiento de ecdisoides químicamente no esteroideos y, por tanto, no similares a hormonas de vertebrados.
- Antiecdisoides. Son compuestos antagonistas de la hormona de la muda.
- Inhibidores de la formación de la cutícula. Estos compuestos, bien inhiben la síntesis de algún compuesto fundamental de la cutícula, bien alteran la estabilización de su estructura. En este grupo destacan los inhibidores de la síntesis de quitina que han presentado un importante desarrollo práctico con un número de compuestos registrados superior al de los demás grupos de reguladores. Entre ellos, sobresalen los pertenecientes al grupo químico de las benzoilfenilureas, entre las que se encuentran lufenuron y flufenoxuron.
- Círomacina. Es un compuesto incluido dentro de los reguladores del crecimiento de insectos, cuyo modo de acción primario no es todavía conocido, pero cuya manifestación externa muestra muchas características comunes con las de las benzoilfenilureas, actuando como éstas sobre el tegumento (Budia et al, 1988; Marco y Pérez, 2004; Van de Wouw et al., 2006). En España se trata de un compuesto registrado para su uso comercial frente a dípteros, al presentar una acción muy selectiva frente a larvas de este orden de insectos.

Aunque la síntesis de los RCI data de los años 80, comenzaron a usarse con asiduidad en la década de los 90, cuando se tiene que hacer frente al gran problema de las resistencias originadas por los anteriores insecticidas (Gerling, 1986; Horowitz et al., 1992; Denholm et al., 1999; Liu y Chen, 2001; Palumbo et al., 2001; Naranjo et al., 2004). Desde entonces se han usado ampliamente, tal y como lo demuestran las cifras del consumo en Almería, durante 2000/2001 (Figura 2.6) (Cavalloro y Pelerents, 1989; AEPLA, 2002; IOBC/WPRS, 2004; Liu y Stansly, 2004; Richardson y Lagos, 2007).

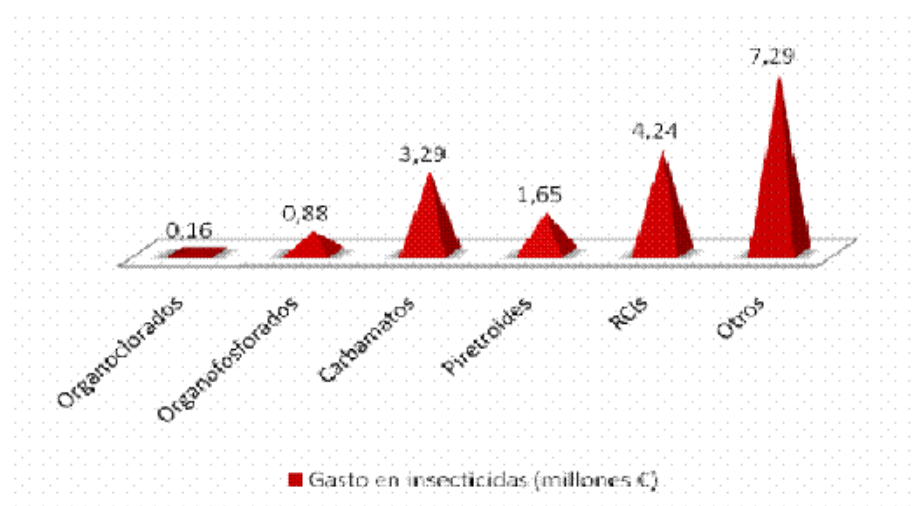


Figura 2.6.- Uso de los RCIs en la agricultura española
(Fuente: AEPLA, 2002)

En estos momentos, son varios los RCI registrados en vid con una clara tendencia a su incremento y particularmente en España ya se pueden utilizar el juvenoide fenoxicarb frente a cochinillas, polillas del racimo y otros lepidópteros; las benzoilfenilureas inhibidoras de la síntesis de quitina como flufenoxuron para las plagas de lepidópteros y ácaros tetránquidos de los géneros *Eotetranychus*, *Tetranychus* y *Panonychus*, y lufenuron y teflubenzuron, ambos contra el piral (Marco y Pérez, 2004). Asimismo, destaca el uso de piriproxifen en cítricos, y en el control de *Bemisia argentifolii* y *Bemisia tabaci* en cultivos como el algodón (Elbert y Nauen, 2000; Li et al., 2003; Otoidobiga et al., 2003). Finalmente, hay que señalar que la principal actividad insecticida de las benzoilfenilureas es su acción como larvicidas y ovicidas, encontrándose también reducción de la fecundidad de la especie plaga y cierto efecto como acaricidas (Viñuela et al., 1991; Tomlin, 2005).

Los RCI son catalogados también como insecticidas de cuarta generación o insecticidas selectivos, porque fueron diseñados en el marco del control químico dirigido, con el objetivo de conseguir una alta especificidad y baja toxicidad para los organismos a los que no están dirigidos (abejas, otros insectos, peces, etc.), con dosis muy bajas y baja persistencia en el medio ambiente (Denholm et al., 1999; Blümel et al., 2000). Sin embargo, se ha constatado una falta de selectividad, ya que no sólo afectan a la especie

objetivo, sino también a otras especies de artrópodos (Bi et al., 2002; Cutler et al., 2006; Prabhaker et al., 2007; Prabhaker y Toscazo, 2007).

En la práctica, los RCI se usan con el propósito de impedir el desarrollo pupal o la formación de los adultos, y de esta manera mantener los insectos en los estados inmaduros, lo cual finalmente implicará su muerte. En general, los efectos que surgen del empleo de estas sustancias dependen del estado en que se encuentra el ciclo vital y sus condiciones fisiológicas en el momento de la aplicación, porque también existe el peligro de inducción de estados supernumerarios y multiplicación de la plaga (Viñuela et al., 1991; Darvas, 1997; Schneider et al., 2008). Bien aplicados, los efectos que provocan en las especies-plaga pueden ser:

- Inhibición del desarrollo de las larvas, de forma que no lleguen a realizar la ninfosis.
- Ruptura de la metamorfosis, impidiendo la emergencia de los adultos.
- Alteración del sistema reproductor y del metabolismo, induciendo incluso la diapausia o interrumpiéndola.

Por tanto, el mecanismo de acción de los RCI se basa en la alteración del crecimiento y desarrollo de los insectos, y todos parecen interferir de alguna manera en la formación normal de la cutícula o exoesqueleto de los insectos (Viñuela et al., 1991).

Una de las características más importantes de los insectos es la existencia de un tegumento externo, que determina su forma y que es el responsable en gran medida de su evolución viable a la forma adulta. Este tegumento consta de una membrana basal, una epidermis y una capa externa no celular o cutícula que constituye el exoesqueleto. La cutícula realmente es la capa más importante en la correcta formación del insecto porque lo defiende de las agresiones externas, permitiendo que el insecto realice sus procesos fisiológicos. La cutícula tiene una estructura laminar, con capas dispuestas en paralelo a la superficie, que van atravesadas por numerosos poros canales. En la capa más exterior o

epicutícula se distinguen de fuera hacia dentro, la capa de cemento (para protección), la capa de ceras (que evita las pérdidas de agua y es una barrera a la entrada de insecticidas) y la cuticulina, que es quizás la capa más importante por ser una barrera permeable selectiva y limitar el crecimiento al ser inelástica. La zona interna o procutícula está formada esencialmente por una matriz proteica en la que van embebidas gran número de fibras de quitina con disposición helicoidal. La zona externa puede esclerotizarse constituyendo la exocutícula y el resto la endocutícula. El principal componente de la procutícula es la quitina (polisacárido con enlaces glicosídicos β -1,4 de N-acetil-D-glucosamina), de la que se conoce que su proporción va aumentando con la profundidad de la capa, oscilando el contenido medio entre un 25-50%. Otros componentes fundamentales de la procutícula son proteínas, conociéndose al menos 20 tipos de ellas y las células epidérmicas, que secretan la mayoría de la cutícula e intervienen en la impermeabilidad del tegumento al modificar el flujo de ceras desde su membrana. Es de comprender que la cutícula se usara como estrategia de control selectiva de los insectos, aunque ésta la comparten con arácnidos, crustáceos e insectos beneficiosos, y por ello han surgido resistencias cruzadas con estos organismos y toxicidades en algunos casos (Mendel et al., 1994; Dhadialla et al., 1998; Tuberty y Mckenney, 2005; Campiche et al., 2006). La quitina también está presente en las paredes celulares de los hongos, en quetas de anélidos y perisarco de cnidarios (Viñuela et al., 1991; Nation, 2002). Se ha hablado del paralelismo que existe entre la quitina, de naturaleza glucídica, y la queratina del hombre, de carácter proteico, porque ésta también posee funciones estructurales en el hombre (en pelo, uñas, etc.), sin embargo no ha sido posible encontrar ninguna evidencia de efectos adversos cruzados por residuos de los RCI. De hecho, el hombre posee enzimas con actividad quitinasa en jugos gástricos y sangre para protegerse de las posibles infecciones provocadas por los organismos que la presentan (Hakala et al., 1993; Escott y Adams, 1995; Renkema et al., 1995; Paoletti et al., 2007).

En concreto los juvenoides, entre los que se enmarcan fenoxicarb y piriproxifen, son compuestos análogos o mimetizadores de la hormona juvenil. Este tipo de compuestos altera la formación de la cutícula mediante un mecanismo hormonal, entre

otros efectos como impedir la diferenciación y el desarrollo embrionario (Henrick, 1995; Minakuchi et al., 2003, 2008). Principalmente, la proporción entre la hormona juvenil y la ecdisona, u hormona de la muda, determina si la muda será juvenil o llegará a adulta. Cuando este equilibrio se altera con exceso de hormona juvenil, se impide el desarrollo del ciclo vital del insecto hasta el estado adulto, originándose malformaciones en la cutícula como anomalías externas, alteraciones de la síntesis o contenido de proteínas y falta de diferenciación en las células epidérmicas de la cutícula (Viñuela et al, 1991; Nijhout, 1994; Nation, 2002). Los fundamentos biológicos de la hormona juvenil ya se conocían en 1956 y por ello se propuso utilizarla como insecticida. Sin embargo, al ser ésta de síntesis costosa y rápidamente degradable, se crearon los juvenoides y juvenógenos, compuestos de síntesis más sencilla o aislables de plantas y animales. De hecho, se dice que en un experimento paralelo entre Estados Unidos y Hungría, se observó que los insectos pasaban por un estado inmaduro extra antes de convertirse en adulto. Se revisaron los métodos sin encontrar diferencia, hasta que se analizaron las toallas de papel que se usaban en los dispositivos de alimentación de los insectos y se descubrió que procedían de diferentes árboles en ambos países, siendo una de ellas la conífera *Abies balsamea*, con presencia de un análogo de la hormona juvenil, juvabiona, que les inducía una muda supernumeraria. Posteriormente, se aisló otro análogo de la hormona juvenil en la albahaca (*Ocimum basilicum*), juvocrineme II, del que se derivaron sintéticos más estables al medio y resistentes al metabolismo del insecto, como piriproxifen y fenoxicarb (Dhadialla et al., 1998; Silva-Aguayo, 2002; Tunaz y Uygün, 2004; Ishaaya et al., 2007). Por este motivo, en ocasiones a estos juvenoides se les denomina también insecticidas vegetales o de origen botánico (Henrick, 1995; Silva-Aguayo, 2002). Hay que señalar que en los seres humanos no se da la hormona juvenil, por lo que la toxicidad cruzada por este mecanismo no es de esperar, aunque sí con otros artrópodos como arácnidos y crustáceos.

Los inhibidores de la formación de la cutícula lo consiguen a través de la inhibición de algunos componentes fundamentales de esta parte del tegumento o debilitando su estabilidad. Se consideran RCIs porque sus efectos tardan un tiempo en manifestarse, pero realmente responden más al nombre de inhibidores del crecimiento de insectos, ya

que a diferencia de los juvenoides por ejemplo, no están implicados en ningún equilibrio fisiológico del insecto, sino que inhiben un proceso vital como es la deposición de la cutícula (Viñuela et al., 1991). En concreto, los inhibidores de la síntesis de quitina evitan la incorporación del monómero N-acetil-glucosamina en el polímero de la quitina, y tienen una acción citostática sobre las células epidérmicas de la cutícula. Las benzoilfenilureas fueron los primeros en descubrirse, a principios de los años 70, dentro de los inhibidores de la síntesis de quitina, al observarse anomalías en la zona endocuticular como pérdida de la apariencia laminar. El mecanismo de acción de las benzoilfenilureas no está del todo claro, pero parece que lo que ocurre es una inhibición de la quitina sintetasa o de su síntesis y a consecuencia acumulación del precursor del monómero o que lo que ocurra sea la inhibición del transporte de los precursores hasta la membrana apical de los microvilos epidérmicos para la síntesis (Viñuela et al., 1991; Tunaz y Uygun, 2004).

Finalmente, se han constatado algunas resistencias para RCIs como piriproxifen y buprofezin en especies de insectos como *Bemisia tabaci* (Viñuela et al., 1991; Ma et al., 2007), aunque se incide en que aparecen lentamente, en un bajo porcentaje o que puede ser consecuencia del uso de los insecticidas anteriores (Toscano et al., 2001). Por tanto, debido a la baja aparición de resistencias, su alta selectividad sobre insectos y su baja toxicidad para mamíferos, los RCIs continúan siendo apreciados en el manejo integrado de plagas actualmente.

2.3. RIESGOS DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.

Los plaguicidas se diseñan con objetivos biocidas y por tanto su utilización puede suponer riesgos para los seres vivos a los que no van dirigidos. Estos riesgos se presentan en los aplicadores o trabajadores de la agricultura, el medio ambiente y el consumidor, como consecuencia de los residuos que pueden generarse por su utilización. Las toxicidades que pueden aparecer estarán relacionadas con la propia molécula o sus metabolitos, coadyuvantes de la formulación, potenciaciones toxicológicas por sinergismo entre plaguicidas, como el caso de algunos fosforados, o biomagnificación de los residuos en la cadena alimenticia (Repetto, 1997). Los posibles o probables efectos peligrosos de

los plaguicidas para los consumidores, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) o World Health Organization (WHO), se pueden resumir en carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis, procesos alérgicos, neurotoxicidad, alteraciones de la reproducción y del metabolismo, a corto y, sobre todo, a largo plazo (WHO, 2002).

Actualmente, se dispone de un vademecum de productos fitosanitarios muy amplio, compuesto por plaguicidas de naturaleza química muy variada. Existen pues diferencias en su modo de acción, penetración en el organismo, metabolismo, eliminación y toxicidad para los seres humanos, lo que hace difícil las generalizaciones sobre su peligrosidad. La OMS clasifica los RCI's estudiados en esta tesis, según su toxicidad aguda, en ligeramente peligrosos o tipo III (fenoxycarb y lufenuron) y con baja probabilidad para presentar toxicidad aguda en condiciones normales de uso o tipo U (piriproxifen y flufenoxuron), ya que las dosis letales medias, para conseguir una mortandad del 50%, de los animales de ensayo (ratas) fueron muy altas, tanto en la administración oral como en la dérmica en las formas sólida y líquida (Tomlin, 2005). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en condiciones no apropiadas, como incumplimiento de los plazos de seguridad o de las dosis de aplicación establecidas en cultivos, estos compuestos son susceptibles de originar mayor toxicidad. Estas situaciones pueden acarrear mayores peligros para la salud de los consumidores y de los aplicadores.

La exposición que afecta a la población en general es de tipo crónico. Son diversos los tipos de plaguicidas que en períodos prolongados, desde múltiples fuentes y a dosis bajas podrían penetrar en el organismo utilizando distintas vías (WHO, 2002). Las principales fuentes de exposición en la población son los alimentos de origen vegetal (frutas, hortalizas y cereales) o animal (carne, pescado, productos lácteos, huevo, etc.) y en menor grado el agua, la atmósfera, suelo, fauna y la flora contaminados (Simcox et al., 1995; Lee et al., 2002; Ritter et al., 2002; Hamilton et al., 2004; Goldman, 2007). Se debe considerar también los productos industrializados de uso cotidiano, que pueden contener residuos de plaguicidas, y por tanto afectar de manera directa o indirecta al ser humano. Los casos de exposición aguda suelen ser más infrecuentes (Ekström et al., 1996).

La exposición ocupacional a plaguicidas en trabajadores agrícolas suele suponer niveles de exposición e intoxicaciones agudas porque normalmente el contacto es en un tiempo breve y a altas dosis (Ramírez y Lacasaña, 2001). Los efectos tóxicos variarán en función del tipo y la cantidad de plaguicida al que se estuvo expuesto. Para algunos de los plaguicidas estudiados en esta tesis, como lufenuron y fenoxicarb, se han comunicado aisladas intoxicaciones agudas en trabajadores con cuadros de afectación respiratoria, irritación de mucosas y depresión del sistema nervioso central (De Liñán, 1997). Los episodios de tipo accidental están relacionados con un mayor número de aplicaciones del producto, olvidos en las medidas de protección, falta de observación de las medidas de limpieza de los dispositivos utilizados en la mezcla, incumplimiento de las distancias mínimas de aplicación, falta de calibración de los equipos o almacenamiento inadecuado de los productos (Alavanja et al., 1999; Mage et al., 2000; Keim y Alavanja, 2001; Maroni et al., 2006). Estos fallos no sólo provocan riesgos para el aplicador sino también en la seguridad del consumidor. Por eso, resulta esencial la observancia estricta de buenas prácticas agrícolas (BPA) en la aplicación de fitosanitarios.

Actualmente, en las BPA de aplicación de plaguicidas, se recomienda usar el plaguicida únicamente en el cultivo para el que fue aprobado y sólo bajo las condiciones, dosis e intervalos autorizados. En contraposición, unas críticas prácticas agrícolas (CPA), conducen a casos donde la seguridad alimentaria, la salud de trabajadores y consumidores y el medio ambiente se ponen gravemente en peligro. Además, suponen pérdidas económicas cuantiosas en la producción y recursos humanos porque la detección de esta irregularidad en los alimentos es un impedimento inevitable para el comercio nacional e internacional.

2.3.1. SEGURIDAD ALIMENTARIA.

Los casos escandalosos de alarma sanitaria, o incluso crisis, por la presencia de contaminantes o patógenos tóxicos en los alimentos, como la enfermedad de las vacas locas, las dioxinas, el aceite de colza en España o la fiebre aftosa en el Reino Unido, nos han obligado a considerar la necesidad de promover y garantizar la seguridad de los

alimentos. El control de alimentos y la gestión de estas situaciones han mejorado mucho desde entonces, pero la realidad es que no se puede perder de vista la inocuidad alimentaria, como demuestran los recientes brotes de fiebre aftosa en el Reino Unido o la contaminación del aceite de girasol en Europa del 2007. El peligro de los alimentos, frente a otras fuentes de exposición, radica en que resultan un vector de toxicidades de expansión rápida y fácilmente accesible y por ello, su seguridad y la protección de la salud pública se hacen indispensables.

La falta de seguridad alimentaria, rodeada a veces de un problema de transferencia clara de información, genera ríos de tinta en la opinión pública, gran preocupación entre los consumidores y estrepitosas pérdidas para agricultores, distribuidores, fabricantes y comerciantes. El hecho de que un producto de consumo básico pueda ser nocivo provoca en el consumidor rechazo o sencillamente prevención a la hora de consumirlo. Si a esto unimos el alcance y la predisposición del consumidor hacia la idea de la agricultura ecológica en la alimentación, según estudios de intención en la población europea, aunque les suponga un mayor coste, queda claro que la inocuidad alimentaria, con los residuos de plaguicidas a la cabeza, es un requisito exigido día a día por la población y un valor de mercado para decidirse a comprar entre un producto u otro (Boccaletti y Nardella, 2000; USDA, 2001; Canavari et al., 2002; Wier y Calverley, 2002; Grunert, 2005).

No en vano, cuando en el último Eurobarómetro del año 2005 se les preguntaba a los europeos por sus preocupaciones en cuanto a los riesgos asociados a la alimentación, respondían que su prioridad eran los residuos de plaguicidas en frutas, hortalizas y cereales, tal y como se muestra en la Figura 2.7 (European Commission, 2006).

Un año más tarde, en el Barómetro realizado por el Centro de Investigaciones Sociológicas (CIS) dependiente del Ministerio Español de la Presidencia, los españoles los situaron igualmente entre sus principales preocupaciones, como podemos observar en la Figura 2.8 (CIS, 2006).

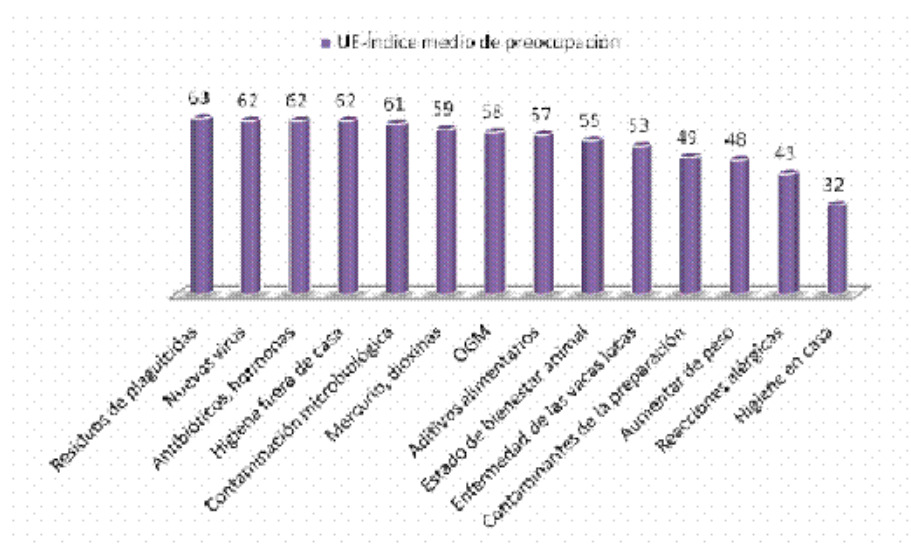


Figura 2.7.- Respuesta de los europeos en la seguridad alimentaria

0 = no preocupado, 1-33 = no muy preocupado, 34-67 = bastante preocupado, 68-100 = muy preocupado
(Fuente: European Commission, 2006)

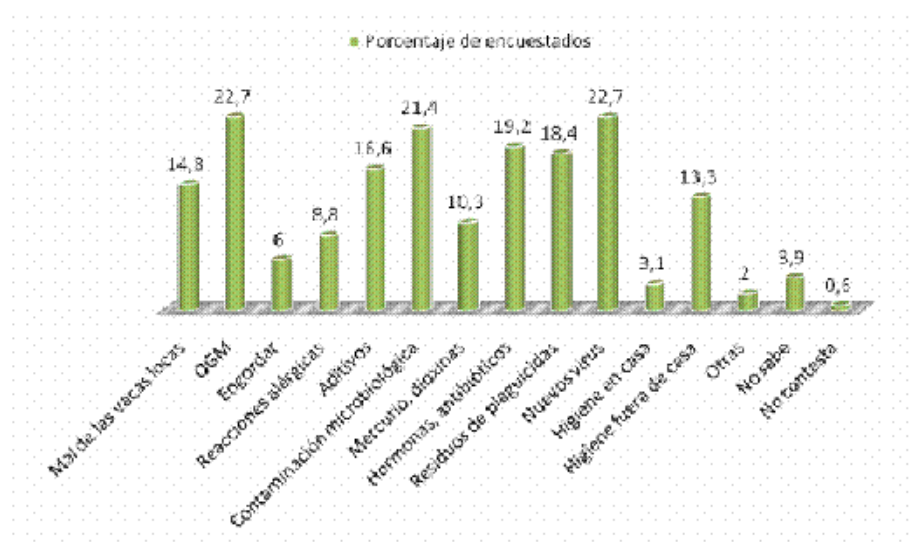


Figura 2.8.- Respuesta de los españoles en la seguridad alimentaria

Número de encuestados = 2.487 (Fuente: CIS, 2006)

No obstante, hay que decir que los casos de inseguridad alimentaria por residuos de plaguicidas han disminuido drásticamente en los últimos años, gracias a factores como la promoción de la producción integrada y mejores herramientas en el control analítico de

alimentos, tal y como lo demuestra por ejemplo los resultados de la vigilancia realizada en Murcia durante la campaña 2001 (Figura 2.9) (Fuster, 2002).

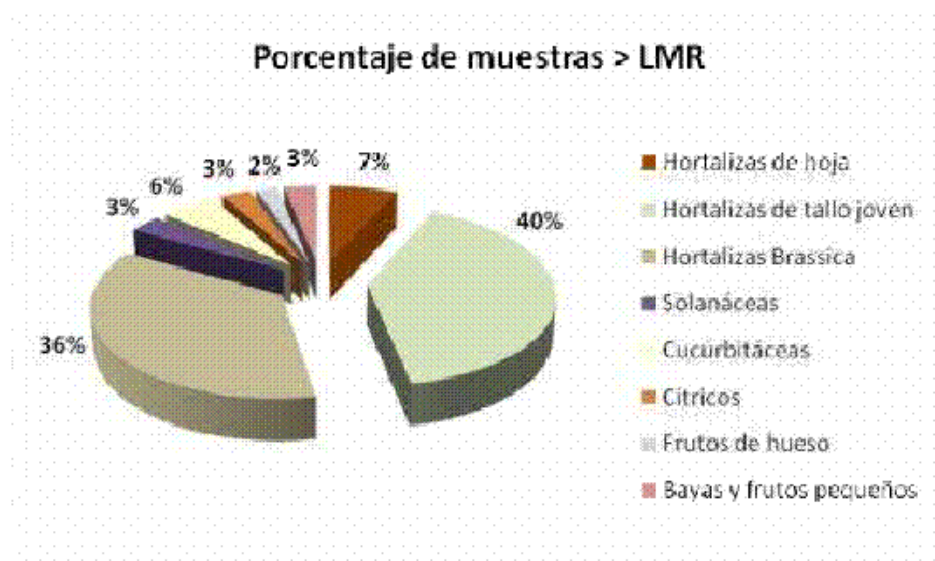


Figura 2.9.- Incumplimiento de los LMRs en la Región de Murcia (campaña 2001)
(Fuente: Fuster, 2002)

Como se observa, la presencia de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas es especialmente relevante en la protección de la seguridad alimentaria. Por un lado, estos alimentos fácilmente podrán contener residuos porque los fitosanitarios son necesarios la mayoría de las veces en la producción a gran escala de este tipo de cultivos. Como se ha mostrado, en la mayoría de ocasiones no superan los límites máximos de residuos (LMR), pero aunque sea en niveles traza, pueden seguir conteniendo residuos y por tanto siendo un foco de futuras toxicidades crónicas. Por otra parte, la promoción para aumentar la presencia de este tipo de productos agrícolas en la dieta habitual por parte de las autoridades sanitarias, debido a su contenido en vitaminas, minerales, fibra y antioxidantes y a su aplicación contra la obesidad, diabetes, trastornos cardiovasculares, problemas intestinales, tumores de colon y recto, gota o cataratas; las nuevas formas de presentación de mayor caducidad y tipo "listos para tomar" junto con la mayor disponibilidad y diversidad a través del comercio, hacen que su difusión en la población en estos momentos esté en expansión, y que su control sea, si cabe, aún más necesario (USDA, 2001; USDA, 2004).

2.3.2. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN FRUTAS Y HORTALIZAS.

El control analítico rutinario de los residuos de plaguicidas en alimentos es la herramienta fundamental para asegurar el cumplimiento del principio básico de las normas de seguridad alimentaria para plaguicidas, en otras palabras, la obligada observancia de los LMRs. Sin equipos instrumentales apropiados, actualizadas metodologías analíticas y personal adecuadamente formado, difícilmente se podrá afrontar las tolerancias cada vez más bajas impuestas por la UE en la Directiva 91/414/CEE y el siguiente Reglamento 396/2005 del Parlamento y el Consejo Europeo (Consejo Europeo, 1991; Parlamento Europeo y Consejo Europeo, 2005).

Debido a la relevancia del análisis de plaguicidas para la salud de los consumidores, hay una continua necesidad de revisión en busca de nuevos métodos analíticos que sean fiables, más sensibles y más selectivos, de forma que permitan el cumplimiento de los requisitos establecidos en los reglamentos nacionales e internacionales. La fiabilidad de un método la asegura un correcto procedimiento de validación. Y como la validez de los resultados depende fundamentalmente del protocolo que se sigue en los métodos analíticos, se hace esencialmente necesario la utilización de métodos armonizados en todos los laboratorios.

En el análisis de plaguicidas, el objetivo principal para el desarrollo de un nuevo método analítico es obtener un procedimiento que cumpla científicamente los criterios establecidos en la validación, para que el método sea ampliamente aceptado y utilizado para determinar el cumplimiento de los LMRs. Otros aspectos que se deben considerar en la aceptabilidad de un nuevo método es que sea económico, sencillo y rápido.

La aceptabilidad de los resultados analíticos se corresponde directamente con los criterios utilizados para validar el método. Hay varias guías para la validación de un método (Fajgelj y Ambrus, 2000). Internacionalmente, los criterios recomendados en el Documento No. SANCO/2007/3131, conocido como Guía SANCO, promovido por la

Comisión Europea a través de su Dirección General para la Sanidad y Consumidores (DG SANCO), son los aceptados para la vigilancia de los residuos de plaguicidas en la UE. Estas directrices describen el control de calidad analítico, los requisitos, los parámetros y sus valores para apoyar la validez de los resultados (DG SANCO, 2007). Estas recomendaciones son complementarias a las exigencias de la norma ISO/IEC 17025:2005. Esta norma europea especifica los requisitos generales en las competencias para llevar a cabo ensayos y/o calibraciones, incluida la toma de muestras; cubriendo los ensayos y calibraciones realizados mediante métodos estandarizados, métodos no estandarizados y aquellos desarrollados en los laboratorios (ISO, 2005).

Unas 400 sustancias activas están aprobadas para su uso como plaguicidas agrícolas en uno o varios Estados Miembros de la UE. Potencialmente, alrededor de 1.000 productos químicos diferentes, entre ingredientes activos y metabolitos, son analitos de interés (Pesticide Safety Directorate, 2001). Hay alrededor de 250 alimentos diferentes en la lista del Sistema Global de Vigilancia del Medio Ambiente/Dietas Regionales de Alimentos, según la OMS (WHO, 2003). Por lo tanto, hay alrededor de 250.000 combinaciones posibles de analito/alimento para analizar. Normalmente, esto se lleva a cabo de una manera racional y focalizada, en colaboración con los programas organizados por la UE; y así por ejemplo, en el Reino Unido cada año se analizan entre 3.000 y 4.000 muestras dentro de los programas de vigilancia de residuos en los alimentos (Wells, 1998) y en España en el año 2006 se realizaron algo más de 1.300 muestras de frutas, alrededor de 1.900 de hortalizas y algo más de 300 de cereales, según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) y el MAPA (AESAN y MAPA, 2006).

Como no se puede usar un método de extracción para cada combinación posible, las muestras se analizan por un método, o varios, que identifique y/o determine la mayoría de productos, pertenecientes a diferentes clases químicas, que con mayor probabilidad pueden estar presentes. Durante muchos años, los científicos han estado investigando en el desarrollo de procedimientos de extracción multirresiduos para la determinación simultánea de los residuos de plaguicidas en alimentos.

Entre los multiresiduos y multiclases más ampliamente utilizados a lo largo del tiempo se encuentran los basados en las publicaciones de Mills, Mills et al. y Luke (Sherma, 1995, 1997; FDA, 1999; USDA, 2007a). En el procedimiento basado en la publicación de Mills, los residuos no polares se extraen de alimentos con alto contenido en grasa mediante éter de petróleo y dietil éter y después se separan de la grasa extraída para un obtener extracto limpio adecuado para la determinación por cromatografía de gases (CG) (Mills, 1959). En el procedimiento basado en el trabajo de Mills et al., se consigue que residuos relativamente no polares en alimentos con bajo contenido en grasa sean extraídos con acetonitrilo o una mezcla de agua/acetonitrilo, después se realiza partición con éter de petróleo y posteriormente una purificación del extracto primario con Florisil® para obtener un extracto final limpio y adecuado para la determinación de CG (Mills et al., 1963). En el método multiresiduos desarrollado por Luke y colaboradores, y sus modificaciones posteriores, los residuos no iónicos en alimentos con bajo contenido en grasa, se extraen con acetona o una mezcla de acetona/agua, se realizan lavados con un disolvente orgánico más apolar y finalmente se purifica el extracto cuando sea necesario para su determinación por CG o cromatografía líquida (CL) con diferentes detectores (Luke et al., 1975, 1981).

En la UE, la norma europea EN 12393:1998 recoge cinco métodos multiresiduos multiclases (Métodos L-P) para determinación en alimentos con bajo contenido en grasa como frutas y hortalizas con análisis por CG. Se encuentran en esta norma porque han sido validados y/o se utilizan ampliamente en toda Europa (Thier, 1997; European Committee for Standardization, 1998; Schenzler y Thier, 2001). El método L incluye extracción con acetona, partición líquido-líquido con diclorometano y purificación con columna de silica-gel/charcoal (United Kingdom Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1991). El método M, basado en parte en el de Luke et al., incluye extracción con acetona, partición líquido-líquido con diclorometano y éter de petróleo y si es necesario purificación con Florisil®; y el método N incluye extracción con acetona, partición líquido-líquido con diclorometano y purificación por cromatografía de permeación en gel (Thier y Zeumer, 1987; Thier y Kirchhoff, 1992). El método O incluye extracción con acetonitrilo, partición líquido-líquido con éter de petróleo y limpieza en columna de Florisil® (Helrich, 1990). El

método P incluye la extracción de compuestos organofosforados con acetato de etilo y, en caso necesario, purificación con cromatografía de permeación en gel (Greve, 1988).

Estos métodos multiresiduos y multiclases son los oficiales pero continuamente se trabaja en el desarrollo de otros que mejoren los anteriores, en aspectos tan importantes en un laboratorio como el ahorro de tiempo, facilidad de uso, bajo coste y bajos riesgos para el personal de laboratorio que los lleva a cabo asociados con la utilización de productos químicos como los disolventes halogenados. Entre los disolventes de extracción más comunes, encontramos los citados anteriormente, como son acetona, dietil éter, éter de petróleo, diclorometano, acetonitrilo, acetato de etilo, metanol y hexano.

En este sentido, hay que destacar un nuevo método multirresiduos y multiclases que está teniendo una progresiva implantación en los laboratorios de residuos y que pronto será incorporado a la lista de métodos oficiales. Conocido como método QuEChERS, porque responde a las siglas inglesas de rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro, se publicó por primera vez en 2003 y se corresponde con un nuevo enfoque para el análisis de múltiples residuos de plaguicidas en diversos productos alimenticios básicos (Anastassiades et al., 2003). Desde su publicación se han producido distintas versiones con el objetivo de incluir el mayor número de plaguicidas y matrices posibles. En general, el procedimiento se basa en extracción con acetonitrilo, partición con sales y control del pH por tampones. El extracto primario se puede someter a una purificación en fase sólida en dispersión mediante adición de una amina secundaria y otros componentes, según requiera el caso. Este método abarca plaguicidas altamente polares, menos polares, así como muy ácidos o básicos y matrices muy variadas en composición, con alto y bajo contenido en grasa. Además, hace honor a su nombre, realmente es económico, sencillo, y rápido, en comparación con la mayoría. El extracto se puede analizar tanto por CG como por CL. Actualmente, está reconocido internacionalmente por FAO, UE, USDA y muchos otros laboratorios de plaguicidas.

Otro método multirresiduos que merece señalarse, es el multiclases basado en extracción con acetato de etilo para frutas y hortalizas. Desarrollado en los laboratorios

oficiales de control de Holanda, fue muy bien acogido por los laboratorios, basando algunos de sus métodos en este tipo de extracción, como los casos de Suecia y España, donde este tipo de extracción es oficial, o en China, Japón, Reino Unido, República Checa, Holanda y Suiza, donde también se usa con asiduidad (Agüera et al., 2000, 2002; Garrido Frenich et al., 2004; Ortellí et al., 2004). Recientemente ha sido modificado para mejorar características como la sencillez, robustez, facilidad y velocidad de extracción y la manipulación. Los nuevos aspectos estudiados incluyen purificación en fase sólida en dispersión con grafito de carbón y la misma amina secundaria que se usa en QuEChERS, impedir la adsorción de plaguicidas de estructura planar con el uso del grafito por adición de tolueno e inyección de grandes volúmenes (20 µl) para CG. Este método ha sido validado para 341 plaguicidas y productos de degradación que se analizan por CG o CL con detectores de masas (Andersson y Pålsheden, 1991; Jansson et al., 2004; Mol et al., 2007).

Los multirresiduos y multiclases que utilizan metanol y hexano como disolvente de extracción son más minoritarios, debido a la alta polaridad del metanol y a la baja del hexano y por lo tanto presentan más inconvenientes de primeras en una extracción de diferentes plaguicidas en extractos limpios que no requieran muchas etapas, aunque se han usado con éxito en frutas, hortalizas y productos de alimentación infantil, entre otros (Tadeo et al., 2000; Ahmed, 2001; Sandra et al., 2003).

Se emplean también métodos multirresiduos selectivos de ciertas familias, por ejemplo para ditiocarbamatos, N-metil carbamatos, ácidos carboxílicos y fenoles, que son hoy por hoy necesarios en la mayoría de laboratorios dedicados al análisis de residuos de plaguicidas (Motohashi et al., 1996; Ahmed, 2001).

Además, el análisis de determinados plaguicidas como folpet, captan, dicofol, piretrinas, azadiractin, etc., en alimentos requiere métodos de extracción prácticamente específicos, ya que sus peculiaridades de estabilidad y rápida degradación en metabolitos, dificultan su inclusión en métodos multirresiduos de mayor alcance (Barreda et al., 2006; Payá et al., 2008a, 2008b).

Los procedimientos de extracción de esta tesis han pretendido proporcionar ante todo medios fiables de análisis, que fuesen lo más económicos, sencillos y rápidos que permitía la extracción de estos compuestos en las matrices estudiadas. La elección fue acetonitrilo en aquellas matrices de menor contenido en componentes lipofílicos y acetona con partición en diclorometano-éter de petróleo en aquellas con mayor contenido. Sólo fue necesaria purificación del extracto en las muestras de cítricos y frutos de hueso, por su elevado contenido de sustancias interferentes como aceites esenciales, pigmentos y azúcares. El análisis de las benzoilfenilureas requería unas condiciones específicas, como ya habían estudiado antes otros autores, ya que el grupo ureico en estos plaguicidas, sus radicales halogenados, su tamaño molecular y su baja polaridad en soluciones acuosas condicionaban los disolventes de extracción (Marsella et al., 2000; Anastassiades et al., 2001; Moltó y Berrada, 2004). Asimismo, su inestabilidad térmica y luminosa se tuvieron en cuenta a la hora de desarrollar los métodos de extracción que las incluían, como se verá en los capítulos siguientes (Tomlin, 2005). En conjunto, el análisis de N-etil carbamatos como fenoxicarb y benzoilfenilureas había sido abordado antes con análisis por CG pero esto implicaba procesos de derivatización costosos que requerían más tiempo (Stan y Klaffenbach, 1991). En este trabajo, los cuatro plaguicidas han sido determinados simultáneamente con una técnica sencilla de laboratorio, como CL con detector espectrofotométrico ultravioleta y fotodiodos, en condiciones analíticas simples y en un tiempo total de 15 min.

El análisis por CL y CG con detectores espectrofotométricos, captura de electrones, nitrógeno-fósforo y masas (MS) representan técnicas analíticas básicas en cualquier laboratorio y al alcance de casi todos. Sin embargo, por sí solos adolecen de falta de sensibilidad y selectividad en comparación con los detectores de masas en tandem (MS/MS) o los nuevos detectores de tiempos de vuelo con masas (TOF/MS) si se quieren analizar simultáneamente un gran número de plaguicidas. En este sentido, varios artículos han sido publicados recientemente donde se incluyen la determinación de algunos de los plaguicidas estudiados en esta tesis mediante CG-MS/MS y CL-MS/MS en frutas y hortalizas (Martínez Vidal et al., 2002; Taylor et al., 2002; Payá et al., 2007a).

Finalmente, existen técnicas alternativas para mejorar la eficiencia de la extracción como extracción acelerada con disolvente, con asistencia de microondas, con fluidos supercríticos y determinación por métodos inmunoenzimáticos o electroforesis capilar en las que los plaguicidas de esta tesis también han sido estudiados, aunque representan una baja proporción de los métodos de análisis empleados para estos analitos (O'Keeffe, 2000; Ahmed, 2001; Lehotay, 2002; Martínez Vidal y Garrido Frenich, 2005).

2.4. PERSISTENCIA Y DEGRADACIÓN EN LA CADENA AGROALIMENTARIA.

La Estrategia Global de Inocuidad de los Alimentos de WHO se proponía como meta reducir el impacto social y de salud de las enfermedades de transmisión alimentaria, incluyendo los residuos químicos (WHO, 2002). Establecía tres líneas de actuación principales:

- Promover y apoyar el desarrollo de sistemas sostenibles e integrados de inocuidad de alimentos fundamentados en riesgos.
- Formular medidas fundamentadas en ciencia a lo largo de toda la cadena de producción alimentaria que prevengan la exposición a niveles inaceptables de agentes microbiológicos y de productos químicos en los alimentos.
- Evaluar y gestionar los riesgos de transmisión alimentaria y transferir información, en cooperación con otros sectores y aliados.

En concreto, FAO/WHO establecen que las preocupaciones sobre los riesgos alimentarios se centran en general, por motivos científicos y sociológicos, en los residuos de plaguicidas, los riesgos microbiológicos, utilización inadecuada de los aditivos alimentarios, presencia de otros contaminantes químicos, adulteración de los alimentos, organismos genéticamente modificados, presencia de alérgenos, residuos de medicamentos veterinarios y hormonas que promueven el crecimiento de la producción animal (FAO/WHO, 2003). En este sentido, expertos de la OMS advierten que el vehículo

de exposición de plaguicidas más importante son los alimentos, responsables de un 90% de las exposiciones, frente a un 10% por agua (WHO, 2002).

Además, FAO/WHO establecen los criterios para conseguir esta inocuidad de los alimentos y garantizar por tanto la seguridad alimentaria, recogiendo aspectos como (FAO/WHO, 2003):

- Lograr la máxima reducción de riesgos aplicando el principio de prevención en la medida de lo posible a lo largo de toda la cadena alimentaria.
- Considerar el continuo "de la granja a la mesa".
- Establecer procedimientos de emergencia para hacer frente a riesgos particulares (por ejemplo, retirada de productos).
- Establecimiento de estrategias de control de los alimentos de base científica.
- Establecimiento de prioridades basadas en el análisis de riesgos y en la eficacia en la gestión de riesgos.
- Establecimiento de iniciativas distintas e integradas que tengan en cuenta los riesgos y efectos del bienestar económico.
- Reconocimiento de que el control de los alimentos es una responsabilidad ampliamente compartida que requiere la interacción positiva entre todas las partes interesadas.

Por tanto, el control de residuos de plaguicidas a lo largo de toda la cadena agroalimentaria, tanto en producción como en transformación, es fundamental para establecer los riesgos derivados de la exposición a los alimentos. No basta con el cumplimiento de los LMRs a través de los programas oficiales de control de alimentos, sino que el control de residuos se debe hacer también en el producto transformado que le llega al consumidor para derivar actuaciones futuras.

De hecho, las autoridades internacionales como FAO y OMS, inciden en la importancia de promover sistemas nacionales de control de los alimentos que estén basados en principios y directrices de carácter científico y que abarquen todos los sectores de la cadena alimentaria para que la producción, manipulación, almacenamiento, elaboración y distribución sean inocuos, sanos y aptos para el consumo humano y cumplan los requisitos de inocuidad y calidad, de acuerdo con las disposiciones de la ley.

Los estudios de persistencia y disipación de residuos de plaguicidas durante la etapa de producción y transformación de alimentos agrícolas se enmarcan en los objetivos anteriores en cuanto a la protección de la seguridad alimentaria. Con el cumplimiento de los LMR, controlados por las autoridades sanitarias y agrícolas nacionales e internacionales, propuestos por la Comisión para Residuos de Plaguicidas del Codex Alimentarius, se aseguran niveles de ingestión inferiores a los niveles máximos admisibles respecto de la toxicidad del producto activo y a la proporción del alimento fresco en la dieta normal. Pero se necesita conocer el destino de los residuos de plaguicidas durante el procesamiento de los alimentos básicos para una estimación más realista de la ingesta alimentaria de los plaguicidas, lo que ayudaría a formular directrices normativas para la gestión de los residuos en dichos productos fijando o reevaluando niveles máximos para su garantía y control de calidad.

2.4.1. PERSISTENCIA Y DISIPACIÓN EN LOS CULTIVOS.

El contexto o marco metodológico que FAO/WHO propone para los estudios del comportamiento de los residuos de plaguicidas en cultivos o alimentos son los denominados "ensayos supervisados", que se orientan hacia el establecimiento de LMRs. Se realizan comprobando el proceso por el que pasa un plaguicida para que finalmente su uso sea autorizado en determinados cultivos, contribuyendo también al conocimiento de las dinámicas en que su disipación transcurre, a lo largo de un tiempo determinado, para establecer los plazos de seguridad correspondientes. Estos ensayos se realizan en experiencias de campo con la aplicación del plaguicida en condiciones controladas y conocidas como la localidad, que será una zona típica de producción; especie y variedad

del cultivo; condiciones agroecológicas; modo de aplicación; dosis y formulación; número y tipo de aplicación; métodos de muestreo representativo y programa fitosanitario, entre otras variables. La selección de estas condiciones permite una interpretación adecuada de los resultados obtenidos y a veces extrapolaciones del comportamiento del residuo a otros cultivos (DG SANCO, 2008).

Estas experiencias se deben efectuar con aplicaciones lo más tardías posibles, con el mayor número de éstas que se recomienda en el uso del plaguicida, a las dosis más altas y teniendo en cuenta el menor plazo de seguridad que está estudiándose. Se trata de que las condiciones sean realmente similares a la práctica agrícola habitual, pero lo más desfavorable posible para sobreestimar por seguridad los residuos en los cultivos. Además estos ensayos deben repetirse en diferentes localidades, al menos cuatro veces para los cultivos mayores y como mínimo en dos temporadas de producción, para que sean más representativos (DG SANCO, 2008).

Por tanto, se puede pensar que los ensayos supervisados de residuos exigidos a los productores de fitosanitarios para autorizar oficialmente el uso de un plaguicida y fijar su LMR, queda sujeta a una sobreestimación importante y además con sesgos, porque tampoco cuatro ensayos son representativos de todas las situaciones posibles en agricultura, incluyendo las diferentes condiciones climatológicas entre regiones. Por ello, el objetivo de esta tesis fue estudiar la disipación de residuos y la observancia de los LMR y los plazos de seguridad establecidos mediante la realización de ensayos supervisados en condiciones normales de uso en un área de producción agrícola tan importante en el panorama nacional e internacional como la Región de Murcia, siguiendo las buenas prácticas agrícolas que se deben tener siempre en cuenta en un tratamiento fitosanitario, entendiéndolas como *"el uso seguro, recomendado, autorizado o registrado a escala nacional de los productos fitosanitarios en condiciones reales, en cualquier fase de la producción, almacenamiento, transporte, distribución y transformación de alimentos (...)"* (Parlamento Europeo y Consejo Europeo, 2005). Adicionalmente, se realizó otra aplicación en condiciones críticas para la práctica agrícola (CPA) con el fin conocer las diferencias de niveles de residuos en la cosecha y en el producto agrícola terminado, respecto a las

condiciones BPA, obteniendo un establecimiento del riesgo más real, que abarca tanto prácticas agrícolas correctas como incorrectas.

Los ensayos supervisados de residuos durante los plazos de seguridad, no sólo sirven para establecer los LMR, sino que también se puede procesar estadísticamente la información generada en ellos, en cuanto a niveles de residuos en relación al tiempo, para establecer las curvas de degradación o disipación de los residuos en el cultivo. Estas curvas permiten conocer la cinética del comportamiento de los residuos durante la fase agrícola, con la posibilidad de anticipar en qué momento se cumplen los LMR, establecer diferentes plazos de seguridad, conocer el depósito inicial y la vida media de los residuos y determinar su velocidad de disipación en el cultivo. Son conocidos como "estudios de disminución de residuos" y normalmente esta información sólo se exige en la autorización de un producto fitosanitario cuando éste se aplica en cultivos con parte consumible directamente, como es el caso de los cultivos estudiados en esta tesis (DG SANCO, 2008).

Los estudios de disminución de residuos son ensayos de residuos en los que normalmente se muestrea en cinco ocasiones diferentes, dos de las cuales son normalmente fechas fijas: el día de la aplicación (en caso de ser múltiple, se debe tomar después de la aplicación final) y en el momento de la cosecha. Esta manera de realización del ensayo es la habitual pero también se pueden hacer estudios de disminución de residuos "a la inversa", recomendados especialmente cuando el intervalo pre-cosecha o plazo de seguridad se presupone relativamente largo, basándose en los estudios de la sustancia activa realizados con anterioridad para el registro y los datos disponibles similares. En este tipo de estudios, se tratan parcelas vecinas según diferentes intervalos pre-cosecha y en el momento de la cosecha se muestrean todas las parcelas a la vez, obteniendo una progresión de los niveles de residuos con el tiempo pero a la inversa del método tradicional (DG SANCO, 2008).

A pesar de que estas experiencias suponen mayores costes de ensayo y análisis, este tipo de estudios tiene varias ventajas sobre la obtención única de valores de residuos en el momento de la cosecha, en el sentido de que ofrecen la oportunidad de evaluar el

comportamiento del residuo durante un período de tiempo y además con la curva de disipación obtenida es posible hacer una estimación relativamente fiable de los residuos en el momento de la cosecha, por ejemplo, mediante la identificación de valores anómalos y/o conocer la importancia de los factores que influyen en la disminución relativa de los residuos tales como el crecimiento de la planta y los efectos del clima. Asimismo, hacen posible el seguimiento de los depósitos iniciales (DG SANCO, 2008).

Estos estudios son particularmente importantes y necesarios cuando se tiene que determinar un plazo de seguridad porque no se puede extrapolar de datos anteriores. La Comisión Europea recomienda que en estudios con un plazo de seguridad previsto de 3 días, se debe tomar muestra a los 0 y 3 días como mínimo. Cuando el plazo es entre 4-7 días, se puede establecer 3 tomas de muestra. Sólo en algunas circunstancias específicas (especialmente en sustancias sistémicas que son tomadas por las raíces) puede ser necesario tomar muestras más allá del plazo de seguridad propuesto. Si un producto fitosanitario se utiliza varias veces durante la temporada de crecimiento de un cultivo, se recomienda que la primera muestra se tome inmediatamente antes de la aplicación final, para poder determinar la influencia de las aplicaciones anteriores en el nivel de residuos. En ciertas circunstancias, por ejemplo en el caso de las solicitudes de un producto fitosanitario en el sector de los cereales antes de la floración, debido al hecho de que el material de la muestra no es comparable durante su crecimiento, es suficiente llevar a cabo ensayos que consten de menos de cinco tomas de muestras (DG SANCO, 2008).

La experiencia ha demostrado que, en algunos casos, el conocimiento obtenido a partir de 2-3 valores de residuos en la cosecha, procedentes de diferentes ensayos, puede ser comparable con la obtenida a partir de un único estudio de disminución de residuos (DG SANCO, 2008).

Los aspectos que determinan la disminución de residuos en estos estudios son las características de persistencia, o en su aspecto opuesto, la disipación de un producto en un cultivo para un ámbito agrícola determinado. La tendencia hacia la persistencia o la disipación de los residuos viene determinada por la velocidad de disipación y los niveles

iniciales. La velocidad de disipación es el resultado de las velocidades de las reacciones de degradación ambientales que experimenta el residuo (generalmente elevadas o rápidas), las reacciones de metabolización (generalmente bajas o lentas), los mecanismos de transporte medioambientales y las características del plaguicida (mecanismo de acción y propiedades fisicoquímicas) que lo hacen propicio para unos u otros procesos (Seiber, 2001). El depósito inicial viene determinado fundamentalmente por la forma de aplicación del preparado (dosis, número de aplicaciones y tipo de formulado), las condiciones ambientales y las características externas del sustrato. En suma, la disipación de los residuos es consecuencia de la interacción de tres sistemas, planta/residuo químico/ambiente.

La disipación de los residuos del plaguicida en el vegetal se produce fundamentalmente por cuatro procesos (Coscollá, 1993; Çelik et al., 1995; DG SANCO, 2002; Whitmyre et al., 2004):

- Volatilización a la atmósfera.
- Arrastre de los residuos del vegetal por precipitaciones, viento, etc.
- Degradación por la incidencia de la luz en la superficie, temperatura, humedad.
- Metabolización vegetal. Principalmente se dan reacciones hidrolíticas, fotoquímicas y redox.
- Metabolización microbiológica.

Entre las características del plaguicida que determinan la facilidad para que se produzcan estos procesos, se pueden citar (Coscollá, 1993; Montemurro et al., 2002):

- Coeficiente de partición (K_{ow}) del plaguicida. En sustratos vegetales de naturaleza lipófila, la penetración aumenta con la liposolubilidad del ingrediente activo, o la inversa.

- Volumen molar y estructura molecular. Ciertas estructuras tienen mayor facilidad de penetración en el fruto por determinados transportes moleculares o radicales, como por ejemplo los grupos amida que se hidrolizan fácilmente.
- Tensión de vapor de la sustancia. A menor tensión, mayor facilidad para evaporarse.
- Formulación del plaguicida. Normalmente los tensoactivos favorecen la penetración.
- Grado de esparcimiento del plaguicida. Cuanto más extendido esté, más superficie de penetración.
- Mecanismo de acción. Los plaguicidas de contacto, a diferencia de los sistémicos, están más expuestos a las degradaciones ambientales y por tanto la penetración es menor.

Las condiciones ambientales más influyentes son (Coscollá, 1993; Antón, 2004):

- Temperatura. Es un factor de degradación y volatilización.
- Humedad. Es un factor de degradación.
- Lluvias y viento. Producen el arrastre o derivas a otros medios como aguas superficiales, suelos y atmósfera. Igualmente, el viento favorece el fenómeno de volatilización, ya que renueva las capas de aire en torno a las plantas, impidiendo que éstas se saturen con el vapor del plaguicida.

También influyen las características del vegetal (Coscollá, 1993):

- Tasa de crecimiento.
- Dilución provocada por el crecimiento del vegetal.
- Naturaleza del vegetal. De hoja, cítricos, desecados, etc.

- Composición del vegetal.
- Forma, volumen, peso y superficie.
- Estructura y composición química de su cutícula, epidermis y parénquima (lisa, cética, pilosa, porosa, etc.).

El resultado integral de estos procesos se expresa cinéticamente y en general, como una primera disminución rápida seguida por otra más lenta, conocido como una disipación en dos fases o bicompartimental, formada por una etapa de disipación rápida en la superficie del cultivo y otra de persistencia lenta en el interior (DG SANCO, 2002; Whitmyre et al., 2004). Este tipo de cinética ha sido estudiada por diversos autores en profundidad, intentando ajustar los datos experimentales a ecuaciones lineares, no lineares y modelos mecanísticos. Sobresalen los trabajos realizados por Timme y colaboradores y por Walter e investigadores, que propusieron un programa informático para ajustar estas cinéticas a ecuaciones de regresión de primer orden logarítmicas en base 10; de orden 1,5; de segundo orden, y funciones de raíz de primer, 1,5 y segundo orden (Timme y Freshe, 1980; Timme et al., 1986; Walter et al., 1993). Sin embargo, se puede afirmar que en la mayoría de los estudios, este tipo de cinéticas sigue ecuaciones exponenciales, obtenidas por inferencia de su correspondiente ecuación de regresión lineal de pseudo-primer orden [**Ln Concentración = f (Tiempo)**] a partir de los datos experimentales, mediante el método de mínimos cuadrados (DG SANCO, 2002; López-López et al., 2003a; Martínez Galera et al., 2003; De Melo et al., 2006).

Por lo tanto, habitualmente una cinética bifásica es exponencial, sobre todo para plazos de seguridad largos (más de treinta días) en los que da tiempo a observar las dos fases (Generalitat Valenciana, 2001; Martínez Galera et al., 2003), aunque es posible también observar cinéticas lineales cuando la disipación esté marcada más por las degradaciones rápidas que por los procesos de metabolización y transporte. Análogamente, en los plazos de seguridad cortos (hasta un mes), la disipación suele seguir cinéticas lineales de primer orden, observándose un modelo de disipación monofásico o monocompartimental, produciéndose una disipación rápida en la superficie

del cultivo debido a las reacciones de degradación. Estos modelos se investigan en la disipación de plaguicidas en suelos, follaje, cultivos al aire libre y en invernadero, siendo los conocimientos teóricos que se derivan de ellos muy útiles en el estudio de los cultivos de esta tesis (Willis y Mcdowell, 1987; Coscollá, 1993; Miliadis et al., 1994; Beulke y Brown, 2001; Montemurro et al., 2002; López-López et al., 2003a; Martínez Galera et al., 2003; Antonius, 2004; Juraske, 2007; Juraske et al., 2007; Li et al., 2008). No obstante, se debe asumir que el estudio de las cinéticas es de las cuestiones más complejas en el conocimiento de un proceso biológico, puesto que se pretende modelizar matemáticamente algo que no siempre sigue un patrón constante.

Para el posterior establecimiento del riesgo, actualmente se comprueba un marcado interés científico por aquellos estudios de disminución o desaparición de residuos bajo condiciones de uso agrícola en la práctica; interesando más los datos de residuos que abarcan todas las rutas de pérdida que los estudios centrados en el metabolismo vegetal. Además, hay un gran interés en conocer la desaparición en las primeras semanas después de su aplicación, lo que ofrecerá datos de la disipación del producto en el medio vegetal. Por lo tanto, los valores de tiempo de disipación medio (DT50) u otros descriptores de la disipación, como el tiempo de vida media, deben ser derivados de este intervalo de tiempo, no de períodos posteriores (Antonius y Snyder, 1994; Brouwer et al., 1997; DG SANCO, 2002; Antonius, 2004; Li et al., 2008). En este sentido, Willis y Mcdowell, publicaron una revisión de aproximadamente 450 valores de DT50 para 81 plaguicidas en un amplio espectro de alimentos de origen vegetal (gramíneas, cereales, cultivos forrajeros, algodón, hortalizas, tabaco, follaje de árboles frutales), resultando la media de valores de DT50 y las desviaciones estándar para el total de residuos (Willis y Mcdowell, 1987):

- Organoclorados: $5,8 \pm 6,0$ días.
- Organofosforados: $3,3 \pm 2,6$ días.
- Carbamatos: $2,7 \pm 1,2$ días.
- Piretroides: $5,9 \pm 5,0$ días.

Incluso los propios autores informaron que debido al plan de muestreo, estos valores podían estar sobreestimados. Por tanto, esto indica que la desaparición de los residuos en el material vegetal es de forma global bastante rápida, incluso en el caso de que los residuos sean persistentes en otros medios (DG SANCO, 2002).

2.4.2. PERSISTENCIA Y DISIPACIÓN EN LA TRANSFORMACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS PRODUCTOS AGRÍCOLAS.

Para evaluar el comportamiento de residuos de productos fitosanitarios, no sólo son necesarios los resultados de ensayos de residuos llevados a cabo en plantas y productos vegetales, sino también los obtenidos en ensayos de residuos en productos vegetales transformados o en estudios de procesado. Incluso cuando los productos fitosanitarios se utilizan correctamente, conforme a BPA, los residuos en los vegetales y productos derivados son inevitables. Dado que muchos de ellos son procesados antes de que lleguen al consumidor, el estudio de la disipación de los residuos durante estos procesos permite una mejor estimación de la exposición y un cálculo más realista de la ingesta de las sustancias activas de productos fitosanitarios y/o sus metabolitos, y por lo tanto, una mejor evaluación del riesgo. Además, estos estudios pueden proporcionar resultados relativos a los residuos en productos básicos empleados posteriormente para fabricar productos de alimentación animal, preparados cosméticos, etc.

No es necesario analizar sistemáticamente los productos transformados sino tienen LMR establecido, por tanto el control de sus residuos se escapa normalmente a los mecanismos oficiales de vigilancia. En esta tesis, se presentan los niveles de residuos en productos transformados por frío, conservas, zumos y vino a partir de muestras agrícolas tratadas bajo BPA y CPA, para obtener conclusiones acerca de la transferencia de los residuos a los diferentes productos que se obtienen en cada uno de estos procesados alimentarios.

Debe señalarse que el conocimiento de los residuos en los productos vegetales transformados es un requisito previo para la estimación de los factores de transferencia a los que se refiere la Directiva 97/41/CEE. Esta Directiva indica que "*en el caso de*

productos desecados y transformados para los que el Anexo II no fije explícitamente contenidos máximos, el contenido máximo de residuos aplicable será el que figure en dicho Anexo, teniendo en cuenta, respectivamente, la concentración provocada por el procedimiento de desecado o la concentración o dilución provocada por el tratamiento aplicado. (...) Podrá determinarse para algunos productos desecados o transformados un factor de concentración o dilución que refleje la concentración provocada por determinadas operaciones de desecación o transformación” (Consejo Europeo, 1997).

Por tanto, los resultados de estudios de transformación no sólo contribuirán a dar una estimación más realista de la ingesta alimentaria y una mejor comparación de la exposición entre países, sino que también pueden ayudar a lograr una implantación más amplia del control de LMRs a nivel nacional e internacional, a través del establecimiento de factores de transferencia, obtenidos, entre otros medios, mediante la relación entre los niveles de residuos del producto agrícola procesado y el mismo en fresco (DG SANCO, 1997).

Un estudio de residuos en el procesado alimentario se puede realizar con los siguientes objetivos:

- Obtener información acerca de productos de degradación o de reacción que puedan requerir una evaluación del riesgo por separado.
- Determinar la distribución cuantitativa de los residuos en los diferentes productos intermedios y productos finales, para conocer las reducciones y concentraciones que experimentan y estimar los factores de transferencia.
- Permitir una estimación más realista de la ingesta alimentaria de los productos fitosanitarios.
- En casos especiales, utilizar los resultados de los estudios como base para la fijación de LMRs en los diversos productos alimenticios transformados de origen vegetal.

Definidos por estos objetivos, se pueden realizar distintos tipos de estudios de residuos de plaguicidas en el procesado alimentario (DG SANCO, 1997):

a) Estudio del efecto en la naturaleza del residuo. La naturaleza de la mayoría de los procedimientos de transformación es tal que sería imposible llevar a cabo un estudio utilizando radiomarcadores de productos químicos de una manera representativa de las condiciones normales de las experiencias en la práctica. Sin embargo, el parámetro que es más probable que afecte a la naturaleza del residuo en la mayoría de las operaciones de tratamiento es la hidrólisis, porque procesos tales como un calentamiento (operación muy habitual en un procesado alimentario para higienizar los alimentos) inactiva enzimas presentes en el sustrato, dejando a las reacciones de hidrólisis como el mecanismo más importante de degradación. No obstante, los efectos de procesos distintos a la hidrólisis también se estudian, en general cuando se sabe que por las propiedades de la sustancia activa o sus metabolitos se pueden generar productos de degradación toxicológicamente significativos como resultado de las operaciones alimentarias.

b) Estudio del efecto en los niveles de residuos. El objetivo de éstos es determinar la distribución cuantitativa de los residuos en los diversos productos intermedios y productos finales; lo que permite conocer las reducciones de las concentraciones de los niveles de residuos y apreciar los factores de transferencia, además de lograr una estimación más realista de la ingesta alimentaria y un establecimiento más amplio de los LMRs. Con el fin de alcanzar estos objetivos, se puede diferenciar dos tipos de estudios de procesado:

- Estudios de balance. Este tipo se suele asociar con los estudios de procesado, también conocidos como estudios básicos. Su objetivo es determinar la distribución o balance de los residuos en todos los productos intermedios y finales y, en su caso, en los productos de desecho derivados de la transformación. De esta manera, se puede conocer cualquier concentración o reducción de los residuos en todos los productos obtenidos en el proceso. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, en caso de residuos volátiles o

termolábiles, o con los residuos durante el transformación metabólica, los factores de transferencia sólo se pueden determinar hasta cierto punto. Asimismo, se deben determinar los productos formados por hidrólisis.

- Estudios de seguimiento. Orientados a conocer la distribución de los residuos en los productos finales o productos intermedios importantes para el consumidor, ya le lleguen de un modo directo, como producto final, o se utilicen para fabricar otros que le pueden llegar indirectamente. Son estudios más específicos, escindidos a veces de los anteriores, donde se obtienen los factores de transferencia para los productos relevantes en la seguridad alimentaria. En este tipo de estudios es en el que se han centrado las investigaciones realizadas para esta tesis.

La decisión para llevar a cabo un tipo de estudio u otro debe depender de (DG SANCO, 1997):

- La importancia del producto transformado en la dieta humana y animal.
- El nivel de residuos en la planta o producto vegetal que vaya a ser transformado.
- Las propiedades fisicoquímicas de la sustancia activa o los metabolitos pertinentes.
- La posibilidad de que los productos de degradación de significación toxicológica se puedan encontrar después del procesamiento de la planta o producto vegetal.

Puesto que no se conocen metabolitos tóxicos de los plaguicidas estudiados en esta tesis, siendo el residuo legislado el propio plaguicida, ni se encontraron niveles de residuos alarmantes en campo, ni persistencia a grandes niveles, se consideró más oportuno realizar estudios de seguimiento de residuos en el procesado, con la intención de discernir la verdadera ingesta de estos plaguicidas tanto en alimentos en fresco como transformados muy comunes en la dieta humana.

En las consideraciones sobre los niveles de residuos que se deriven de estos estudios es necesario tener en cuenta la importancia de los alimentos en la dieta, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia(s) que constituyen el residuo, la distribución de los residuos en la parte comestible y no comestible de los alimentos (ejemplo, cítricos), los niveles de residuos de partida y su ingesta diaria máxima admisible (IDA) y dosis de referencia aguda (DRfA). Experiencias anteriores indican que, cuando los niveles de residuos en los productos en fresco no son significativos (menor de 0,1 mg/kg), los residuos que quedan en el alimento transformado después de los procesados más comunes son mínimos. DG SANCO recomienda realizar este tipo de estudios con productos que incurran en residuos; aunque admite que, pueden ser necesarias fortificaciones de los productos agrícolas mediante prácticas como el aumento de las tasas de aplicación o la reducción de los intervalos pre-cosecha (DG SANCO, 1997).

Por otra parte, es importante estudiar la transferencia de residuos en procesados que impliquen operaciones comunes en el tratamiento industrial y casero de los alimentos en fresco, con el fin de estimar los factores de transferencia más relevantes para el consumidor. De hecho, en las autorizaciones de fitosanitarios para las que se exigen estudios de balance o seguimiento, se piden resultados para las operaciones básicas de transformación. Asimismo, los estudios de procesado deben ser fidedignos de cómo se realizan en realidad en la industria o en los hogares, realizándose técnicas lo más similares posible.

Revisiones de la literatura publicada sobre estudios de procesado de alimentos muestran que en la mayoría de los casos las operaciones tecnológicas, ya sea en la industria o en casa, dan lugar a grandes reducciones en los niveles de residuos en los alimentos preparados, especialmente mediante el troceado, pelado, lavado y calentamiento. Estas disminuciones se producen por reacciones de hidrólisis, enzimáticas o redox y por degradaciones asociadas a cambios significativos de temperatura o a la acción de los microorganismos, producidas durante la transformación de los alimentos (Elkins, 1989; Farris et al., 1992; Holland et al., 1994; Çelik et al., 1995; Timme y Walz-Tyka, 2004; Coscollá y Coscollá, 2006).

Con el pelado y troceado, se reducen los niveles de la mayoría de insecticidas o fungicidas aplicados directamente a los cultivos que tienen una penetración limitada en la cutícula. Además, la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento apoyan que con el pelado de ciertas frutas, como cítricos, aguacate, plátanos, kiwi, mango y piña, se alcanzan prácticamente niveles indetectables en su parte comestible y por tanto, los LMRs para las frutas citadas son de importancia limitada en la evaluación de la exposición a los plaguicidas con la dieta (Holland et al., 1994). Sin embargo, la piel de estas frutas se utiliza con frecuencia en la producción de piensos o aceites esenciales (cítricos), entre otros, presentando una gran concentración de los residuos respecto a la fruta entera y justificándose así el control de los LMR en la fruta total. Asimismo, se ha comprobado que desechar las hojas exteriores de hortalizas como la lechuga contribuye a una reducción de los residuos, puesto que allí es donde se acumulan la mayor parte de ellos tras una aplicación. Los LMRs legislados para estas hortalizas de hoja ya contemplan un deshojado inicial y eliminación de la tierra pegada en el procesamiento de las muestras agrícolas y por lo tanto, en determinados casos, cabe esperar reducciones de los niveles de residuos presentes en la muestra de campo. Esta operación es también muy común en la preparación doméstica de ensaladas. Aunque debe señalarse que esas hojas en la industria a veces se aprovechan para fabricación de piensos y por tanto, los residuos eliminados del alimento humano son susceptibles de ingresar en la cadena alimentaria y verse sometidos a biomagnificación.

El lavado de los alimentos vegetales, produce una reducción de niveles más significativa en aquellos plaguicidas de contacto, que al estar en la superficie son más susceptible a este efecto, aunque también éste depende del tiempo que ha transcurrido desde el último tratamiento; hemos de tener en cuenta que los residuos tienden a pasar de la cutícula exterior a las capas ceras más profundas de la superficie externa del vegetal, donde son más difícilmente accesibles. Por supuesto, también depende de su coeficiente de partición (K_{ow}) que determina su solubilidad en agua y marca la tendencia a introducirse en dichas capas ceras, y de la temperatura y el tiempo del lavado, pudiendo afirmarse que el escaldado y lavado químico, realizados normalmente en la industria, son

más efectivos que el lavado en frío habitual de los hogares, ya que se provoca una hidrólisis de mayor magnitud.

Los procesos que implican un calentamiento de los alimentos son muy variados y entre ellos destacan cocción sencilla, pasteurización y esterilización. Las especificaciones de tiempo, temperatura, el grado de pérdida de humedad y el tipo de sistema (abierto o cerrado) son importantes para cuantificar los efectos sobre los niveles de residuos. Con el aumento de la temperatura se aumentan las tasas de degradación y volatilización de los residuos (Elkins, 1989; Farris et al., 1992; Holland et al., 1994; Çelik et al., 1995; Timme y Walz-Tyka, 2004; Coscollá y Coscollá, 2006).

Los niveles de residuos en los zumos de frutas dependerán de los K_{ow} o su partición entre la pulpa y el zumo o el mosto en el caso de la uva. La pulpa o el orujo, éste último incluye a menudo el hollejo de la uva, es un reservorio de residuos más apolares. De este modo, los residuos moderadamente o menos polares, no son transferidos al zumo o mosto, reduciéndose su concentración incluso más con operaciones como el centrifugado y la filtración (Farris et al., 1992; Holland et al., 1994). Aunque debemos señalar que como generalmente los jugos contienen restos sólidos (parte de las membranas de las vesículas de la corteza en los cítricos, parte de su albedo y aceites esenciales o restos de hollejo en el caso del mosto), es posible encontrar residuos de los plaguicidas de mayor K_{ow} .

En la fabricación de conservas, se combinan operaciones de troceado, pelado, lavado y calentamiento, entre otros, y por tanto los efectos antes descritos se pueden hacer patentes (Holland et al., 1994; Timme y Walz-Tyka, 2004; Coscollá y Coscollá, 2006). En la producción de vinos intervienen los procesos citados anteriormente en la fabricación de zumos, pero se debe tener en cuenta que, a diferencia con la producción de cerveza, este proceso no implica dilución con agua, y por tanto la probabilidad de encontrar residuos en el producto final es *a priori* mayor. En el caso de la vinificación, tiene gran importancia la separación del orujo y demás partes sólidas con operaciones como la filtración, a lo que se debe añadir la estabilidad de los residuos a la fermentación

y a los agentes de clarificación (Holland et al., 1994; Tsiropoulos et al., 1999a, 2005; Ying y Williams, 1999; Cabras y Angioni, 2000; Cabras et al., 2000a, 2001; Navarro et al., 1999, 2000; Fernández et al., 2005a, 2005b; De Melo et al., 2006; Oliva et al., 2006, 2007a, 2007b).

Finalmente, en el almacenamiento de alimentos en frío, conserva o como zumos, las reacciones y degradaciones citadas, causantes de la disminución de residuos de plaguicidas en los alimentos transformados, quedan ralentizadas porque los alimentos se encuentran en estado de conservación, preservados de las condiciones de degradación, dependiendo su efecto sobre la concentración de residuos del tipo y periodo de conservación, debiendo estudiarse los cambios en los niveles de residuos a lo largo del periodo de caducidad de los productos agrícolas transformados (Schafer y Kegley, 2002; Pose et al., 2006; DG SANCO, 2007).

2.5. DETERMINACIÓN DE LA EXPOSICIÓN.

La evaluación de la exposición de los consumidores a los residuos de plaguicidas es un área de la ciencia que se ha desarrollado rápidamente durante la última década. Desde cálculos más simplistas donde se estudiaban modelos deterministas de exposición continuada en adultos, los procedimientos de evaluación se han diversificado de manera que se han logrado estimaciones más realistas de la exposición a largo plazo para los adultos, escolares, niños pequeños y lactantes junto con la estimación de las exposiciones a corto plazo para los adultos y niños pequeños. La evaluación final del riesgo se centra en una comparación numérica contra un valor conocido de toxicidad, obtenido a partir de resultados del efecto de los residuos en estudios toxicológicos realizados con animales de experimentación y aplicando posteriormente los correspondientes factores de seguridad para los seres humanos (Harris et al., 2001; Ferrier et al., 2002; Tomerlin y Petersen, 2004; Schneider et al., 2007).

La evaluación de la exposición es una de las partes principales del proceso de evaluación de riesgos. Sólo la ingestión de cantidades significativas toxicológicamente

puede dar lugar a efectos adversos para la salud, incluso para sustancias muy tóxicas. En el caso de los residuos de plaguicidas en alimentos, esta evaluación se basa en tres aspectos principales (Ferrier et al., 2002; Renwick, 2002; Schneider et al., 2007):

- La forma de determinar cuantitativamente la presencia de una sustancia química en los distintos alimentos y dietas, entre ellos su destino durante los procesos dentro de la cadena de producción de alimentos.
- La forma de determinar los patrones de consumo de cada uno de los alimentos que contengan los residuos.
- La forma de integrar tanto la probabilidad de los consumidores de comer grandes cantidades de alimentos, como que los residuos estén presentes en estos alimentos en niveles significativos.

De estos puntos, el primero ha sido abordado en los estudios de procesado de esta tesis; el segundo punto se trata con estadísticas proporcionadas por el Instituto Nacional de Estadística de España (INE), diferenciando entre el ámbito nacional, local y medios urbano y no urbano, junto con encuestas de consumo de alimentos practicadas en grupos representativos de niños, adolescentes, adultos y edades avanzadas de la Región de Murcia; el tercero se ha enfocado asumiendo que los residuos que se encontraban en los productos finales de campo y procesado llegaban al consumidor y por tanto conociendo su ingesta, se puede obtener la ingesta diaria estimada (IDE) de los residuos de plaguicidas estudiados en esta tesis y compararla con el valor de IDA establecido para cada uno. Este enfoque de evaluación del riesgo en la ingesta es determinista, puesto que no entra en juego ningún cálculo de probabilidades relacionado con la presencia de residuos en los alimentos o con su consumo, como lo realizan los métodos probabilísticos.

Se debe tener en cuenta que hoy la estimación del riesgo por estos métodos está sobreestimada, ya que se considera que la dosis ingerida del residuo es la absorbida, obviando toda una serie de factores de absorción y metabolismo hepático de primer paso, previos a que el plaguicida llegue a su lugar sistémico y pueda producir un efecto en el

organismo humano, que son claros limitantes en la absorción oral humana. Por tanto para evaluar con exactitud el riesgo toxicológico asociado a la ingesta de residuos de plaguicidas en alimentos, es preciso (Harris et al., 2001; Luetzow, 2003):

- Obtener estimaciones adecuadas de la presencia y cantidad de un determinado residuo en un alimento y en la dieta en general.
- Evaluar los patrones de consumo de alimentos que contengan estas sustancias, especialmente los sectores de la población de alto consumo o más sensibles a la acción de los residuos.
- Desarrollar y aplicar herramientas para predecir con fiabilidad el riesgo derivado del consumo de alimentos que contengan residuos de plaguicidas.

Estos objetivos se deben integrar en un sistema de evaluación de la exposición rentable que permita categorizar con fiabilidad los productos fitosanitarios según los riesgos toxicológicos que implique la ingesta de sus residuos con los alimentos. Inevitablemente, esto pasa por una recopilación exhaustiva de los resultados que se deriven de estudios enfocados de esta manera.

2.5.1. BIODISPONIBILIDAD DE LOS RESIDUOS EN LOS ALIMENTOS.

Sin obviar la importancia de los plaguicidas, tanto en la agricultura como en las actividades de salud pública, son innegables los efectos tóxicos que generan en el ser humano. Su biodisponibilidad en el organismo depende de su toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos procesos están influenciados tanto por factores externos relacionados con los patrones de exposición y con la sustancia química (tipo de empleo, temperatura ambiental, tipo de plaguicida, frecuencia, intensidad y duración de la exposición, etc.), como por factores inherentes al individuo (edad, sexo, dotación genética, estado de salud, estado nutricional, estilos de vida, vía principal de absorción, etc.) (Fait y Colosio, 1998; Ramírez y Lacasaña, 2001). Las dietas bajas o carentes de proteínas y los estados de deshidratación son factores que influyen en la gravedad del daño a la salud. En animales de laboratorio sometidos a dietas hipoproteicas,

las dosis letales medias (DL50) de algunos plaguicidas pueden disminuir entre 4-2.100 veces, situación que podría ser extrapolable al ser humano. A este respecto, una gran proporción de la población laboral y general expuesta vive en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde el uso de plaguicidas es tan común como las carencias nutricionales mencionadas.

La biodisponibilidad es un término esencialmente farmacéutico que alude a la porción de la dosis de un fármaco administrado de manera exógena, que llega hasta el órgano o tejido en el que lleva a cabo su acción. Como determinar la concentración en un tejido resulta excesivamente invasivo, se acepta el valor de la concentración del mismo en el plasma. Puede expresarse en porcentaje o en tasas. Este concepto se utiliza para cuantificar el grado en que una sustancia es aprovechada por el organismo. Hoy día, el ámbito del estudio de la biodisponibilidad de un xenobiótico se ha extendido a otros campos y así se encuentran multitud de estudios en nutrientes y algunos en contaminantes. Para los residuos de plaguicidas este valor viene implícito en los estudios de toxicidad por ingestión que se realizan en los animales de experimentación en el registro de una sustancia pero se aplica la sustancia en estado puro, sin mezclar con los alimentos, y se ha demostrado ampliamente en el campo farmacéutico que la presencia de los alimentos puede disminuir sensiblemente, o en algunos casos aumentar, la biodisponibilidad de un xenobiótico para el organismo. Por tanto, el estudio de la biodisponibilidad de un residuo embebido en el medio que llega al organismo es esencial para determinar la dosis que realmente penetra en él. Los trabajos publicados por nuestro grupo de investigación han sido los primeros que contemplan este aspecto en los alimentos, aunque sí es posible encontrar diversos trabajos en suelos.

Quando un xenobiótico entra en contacto con el organismo, bien voluntaria o involuntariamente, lo primero que ha de ocurrir es que se absorba, es decir, la llegada del xenobiótico a la sangre (puede ocurrir a través de la piel, aparato digestivo, respiratorio, etc.), una vez en la sangre puede metabolizarse, pero la mayor parte se distribuye, pudiendo quedar muy restringido a algunos tejidos o que sea una distribución muy homogénea, pero siempre en equilibrio entre la concentración de la sangre y los tejidos;

ya dentro del tejido podrá metabolizarse. El principal órgano metabolizador de los xenobióticos es el hígado. El riñón filtra la sangre para excretar sustancias, pudiendo excretar el xenobiótico tal cual o los metabolitos resultantes. La mayor parte de los xenobióticos se excretan por la orina, pero hay otras vías de excreción como son heces, sudor, respiración, etc.

La absorción de un xenobiótico al torrente sanguíneo comienza con una concentración plasmática igual a 0 e irá subiendo a medida que pase el tiempo, hasta que se alcance una concentración máxima y a partir de ese momento la concentración irá disminuyendo de manera gradual debido a la metabolización, hasta que llega a desaparecer del plasma. Para esta curva de distribución se definen dos parámetros, la concentración mínima eficaz, que es la concentración mínima a partir de la cual aparece el efecto; y la concentración mínima tóxica, que es la concentración mínima a partir de la cual se observan efectos tóxicos.

La absorción de los fármacos va a depender de la vía por la que llegan al organismo. Existen varias vías de administración como la oral, parenteral, respiratoria, sublingual, intramuscular, dérmica, etc. En ellas los factores que pueden influenciar la biodisponibilidad de un xenobiótico difieren mucho. Por ejemplo, en la vía parenteral intravenosa, no hay absorción propiamente dicha, porque no se traspasan membranas celulares, ya que el agente externo se introduce directamente a la sangre, por tanto se puede decir que se trata de una absorción del 100%. En la vía parenteral extravascular, los capilares del músculo o la piel son vasos pequeños que tienen pocas capas celulares, siendo la absorción bastante rápida. En cambio, en la vía de absorción oral, el residuo de plaguicida debe traspasar el epitelio gastrointestinal, que es una capa de células bastante gruesa, encontrándose además que muchos xenobióticos son inestables en el medio ácido del estómago o más básico del intestino, degradándose con facilidad. En la Tabla 2.1 se exponen las diferentes vías de administración y los epitelios implicados en la absorción.

Tabla 2.1.- Vías de absorción humanas.

Tipo de estrato	Vía de administración	Lugar de absorción
	Parenteral, intravascular	No hay
Subcelular	Parenteral, extravascular	Endotelios capilares
	Oral	Epitelio gástrico, intestinal y cólico
	Sublingual y bucal	Epitelios bucales
	Nasal	Epitelio nasal
	Ocular	Epitelio de la córnea y conjuntiva
	Pulmonar	Epitelio del tracto respiratorio y de los alveolos
	Rectal	Epitelio rectal
Pluricelular	Dérmica o cutánea	Epidermis (piel)

La biodisponibilidad es muy dependiente de la vía de administración; en primer lugar, la mayor biodisponibilidad la presenta la vía intravascular (intravenosa o intrarterial), debido a su modo de administración, a continuación la vía intramuscular y sublingual, seguidas por la oral y por último la rectal. Además, en la vía oral, es en la que mayores interacciones se encuentran (Johnson, 1997; Hodgson y Smart, 2001; Ross et al., 2001). Los factores que influyen la biodisponibilidad oral son:

- **pH.** Se va modificando a lo largo del tubo digestivo, encontrando los valores más bajos en el estómago y aumentando a lo largo del intestino. El pH condiciona el grado de ionización, de manera que los xenobióticos que sean ácidos débiles se absorberán mejor en el estómago, caso contrario a los xenobióticos que sean bases débiles que se absorberán mejor en el intestino. También puede alterar la estabilidad de determinadas sustancias.
- **Vaciado gástrico.** Limita el grado y la velocidad de absorción de los xenobióticos que se absorben en el intestino, ya que si se produce un retraso en el vaciado, permanecen más tiempo en el estómago y se retrasa su absorción intestinal.
- **Motilidad intestinal.** Importante en la absorción intestinal, ya que cuando se disminuye la motilidad intestinal aumenta la absorción. La influencia de la presencia de fibras en la dieta es importante porque se acelera la motilidad intestinal.

- Presencia de los alimentos. Van a hacer que el xenobiótico permanezca más o menos tiempo en el estómago, influyendo en su absorción. Hay alimentos que limitan la absorción formando complejos insolubles con el agente externo, también alimentos que compiten con los mecanismos de transporte celular en la absorción de la sustancia, otros que aumentan la secreción gástrica, haciendo que las sustancias inestables en medio ácido se degraden con más facilidad o los de gran componente graso que pueden vehicular mejor a los agentes externos a través de las membranas lipoproteicas del endotelio gastrointestinal.
- Metabolismo presistémico. Se debe al metabolismo que, por distintas causas, pueden sufrir las sustancias antes de ser absorbidas. Por ejemplo, en las paredes intestinales hay muchos enzimas que participan en la degradación de los xenobióticos, como algunas isoformas del citocromo P₄₅₀.
- Efecto de primer paso hepático. Una parte de la dosis se metaboliza en el hígado, antes de distribuirse por la circulación sistémica, pero una vez que ha pasado las barreras celulares de la vía de absorción.
- Microflora bacteriana. El metabolismo bacteriano puede afectar la degradación de los xenobióticos y provocar una disminución presistémica.

El efecto individual de estos factores en la absorción oral de plaguicidas no se conoce. Pero de ellos, en el caso que nos ocupa, el de mayor relevancia es el efecto de la presencia de alimentos, puesto que los residuos de plaguicidas en la dieta nunca penetran aisladamente. Además, se debe tener en cuenta la influencia de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias, sobre todo su estructura y su liposolubilidad, que determinarán en gran medida su capacidad para atravesar las barreras biológicas. Por ello, los estudios de biodisponibilidad oral que se presentan en esta tesis se han centrado en la influencia de la naturaleza particular del plaguicida para la absorción y el efecto de los alimentos, estudiando tanto la influencia de los frescos como los preparados.

La biodisponibilidad oral puede expresar la velocidad y/o la cantidad de la forma que accede a la circulación sistémica y, por lo tanto, está disponible para acceder a los

tejidos y producir un efecto. La cantidad absorbida suele valorarse mediante el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas o la fracción de absorción biodisponible y la velocidad de absorción expresada como la concentración máxima entre el tiempo en que se alcanza. Se debe decir que, la biodisponibilidad no depende sólo de los procesos de absorción sino también de los de distribución y eliminación. Ahora bien, cuando la distribución y la eliminación se mantienen constantes, las variaciones en la biodisponibilidad reflejan diferencias en la absorción del xenobiótico, sea en la velocidad de absorción, en la cantidad absorbida o en ambas.

En general, se suelen utilizar dos tipos de modelos para el estudio de la biodisponibilidad oral en fármacos y xenobióticos, *in vivo* e *in vitro*. Los modelos *in vivo* con animales de experimentación son los más fácilmente correlacionables con los humanos, de hecho se puede aplicar el mismo factor de seguridad citado en los estudios toxicológicos de registro de una sustancia, pero plantean problemas de coste, tiempo y ética. En cambio, los *in vitro* son aceptables en el estadio inicial de una investigación por ser buenos indicadores de lo que ocurre en un medio fisiológico y por contra son mucho más económicos, sencillos y rápidos (Chiou y Barve, 1998). Los ensayos *in vitro* de biodisponibilidad oral se realizan frecuentemente con montajes de bolsas y cánulas en laboratorio para imitar los compartimentos gastrointestinales y vasos del organismo, con cultivos celulares o con membranas de diálisis (Audus et al., 1990; Artursson y Borchardt, 1997). La alternativa habitual es el uso de una membrana semipermeable a modo de intestino delgado, porque es el epitelio donde se produce mayoritariamente la absorción oral, al ser el más preparado celularmente por la presencia de sus microvellosidades *in vivo* para que así ocurra (Miller et al., 1981; Schricker et al., 1981; Gil-Izquierdo et al., 2002; Bollinger et al., 2005). Esta membrana se coloca dentro de un dispositivo adecuado, de manera que se dispone en un lado la disolución a estudiar, en este caso el alimento fortificado, y se mide su aparición en el lado opuesto, o sea, en el interior de la membrana, una vez que ha logrado traspasar la superficie de la membrana por difusión pasiva (Artursson, 1990). La permeabilidad de esta membrana es el factor fundamental para que estos experimentos sean correlacionables, ya que la característica esencial de las membranas biológicas es que son semipermeables (Artursson y Karlsson, 1991; Camenisch

et al., 1998a, 1998b). Para estudiar este proceso adecuadamente, hay disponibles membranas comerciales, celulósicas, de permeabilidad aproximada a las condiciones fisiológicas y en monocapa, como el epitelio intestinal. Además, la integridad y viabilidad de la membrana deben ser vigiladas durante todo el proceso, más si como en este caso, hay por lo menos cuatro horas de procedimiento.

Resulta de gran interés disponer de un método *in vitro* que permita realizar de manera rápida un barrido exhaustivo de un gran número de compuestos en las primeras fases de desarrollo a fin de seleccionar los candidatos menos biodisponibles para el ser humano oralmente, que sus resultados puedan dar idea de lo que ocurre en un medio fisiológico y que este conocimiento se pueda completar posteriormente en estudios *in vivo*.

2.5.2. INGESTA DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS CON LOS ALIMENTOS.

En la evaluación de la exposición a los residuos de plaguicidas en los alimentos, sea cual sea el modelo de estimación que se utilice, se sigue un paradigma para el establecimiento del riesgo (Renwick, 2002):

- Identificación y caracterización del agente de riesgo. En esta fase se evalúan los efectos del tóxico y su relación dosis-respuesta. Como resultado, se obtendrá el nivel de exposición humana sin efectos adversos significativos para la salud.
- Evaluación de la exposición al agente o estimación de la ingesta de los consumidores. Implica encuestas de dietas o consumo y conocimiento de los niveles de residuos de los alimentos.
- Caracterización del riesgo. Se compara la ingesta estimada anterior con la ingesta segura o admisible derivada de la caracterización del agente de riesgo y se establece el nivel de riesgo para el consumidor o la probabilidad de efecto para la salud.

El riesgo, es decir, la probabilidad de que se produzcan efectos tóxicos y su magnitud, depende de la dosis y de las características de cada sustancia. Por ello, es preciso llevar a cabo en cada caso una evaluación de riesgo en la que además de caracterizarlo, se identifiquen grupos especiales de riesgo, si es que los hay. La evaluación de riesgos es el primer paso del proceso global de análisis de riesgos, que incluye además la gestión de riesgos y la comunicación de riesgos. Las estrategias para la gestión de riesgos pueden ser de tipo legislativo, de formulación de recomendaciones o de cambios tecnológicos, entre otros, y tienen en cuenta no sólo los resultados de la evaluación sino otros factores, principalmente de tipo socioeconómico. Como resultado de las acciones de tipo legislativo se han regulado los contenidos máximos de muchas de estas sustancias en los alimentos y se han adoptado planes de prevención y vigilancia. Finalmente la comunicación de riesgos ha de realizarse como un proceso interactivo de intercambio de información y de opiniones entre los evaluadores del riesgo, los gestores del riesgo, los consumidores y todos los grupos que puedan tener intereses de cualquier tipo en estos temas.

En la identificación y caracterización del agente de riesgo, se realizan diversos estudios de toxicidad aguda y crónica, en los que se examinan aspectos como la toxicidad genética, neurotoxicidad, carcinogenicidad e inmunotoxicidad. En los estudios de toxicidad subcrónica o crónica, en los que se alimenta a los animales de experimentación durante 90 días en los primeros o 1 ó 2 años, en los segundos, según sean no roedores o roedores, respectivamente, se obtiene, entre otros, un parámetro toxicológico llamado NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), que dividido por un factor de seguridad de 100 (producto de un factor de variabilidad de 10 entre animal-humano y otro de 10 entre humano-humano), resulta el valor de la IDA (Huijbregts et al., 2000; Renwick, 2002). La IDA por tanto define la cantidad (mg) de un residuo de plaguicida que puede ser consumida diariamente con el alimento durante toda la vida de la persona, sin efecto adverso para ella, según ha demostrado la experiencia hasta ese momento. Debido a la gran diferencia de peso entre personas, indicativo de su nivel de desarrollo fisiológico, la IDA siempre se expresa como mg del residuo en función de kg de peso corporal. Un claro ejemplo lo constituyen el grupo de los niños, donde la cantidad admisible de un residuo

con la dieta será mucho menor que un adulto, debido a que sus mecanismos de defensa para xenobióticos se encuentran en estado de desarrollo aún y son más susceptibles a los posibles efectos tóxicos del plaguicida. Por ello, el conocimiento de la ingesta en grupos sensibles de la población como éstos constituye uno de los mayores retos en el establecimiento del riesgo de los residuos de plaguicidas en los alimentos.

El criterio de la IDA en el establecimiento del riesgo se viene realizando desde hace 40 años y casi desde el principio han surgido críticas en cuanto al factor de seguridad. Algunos lo consideran un pobre indicador de la variabilidad entre animales y humanos aunque otros piensan que es demasiado conservador. Lo cierto es que es el criterio con el que se compara la ingestión crónica actualmente.

No obstante, en el establecimiento del riesgo de esta manera hay un sesgo importantísimo, que es la variabilidad en los niveles de residuos entre las unidades de alimentos en un mismo lote. En 1996, estudios sobre residuos de organofosforados y carbamatos en frutas sirvieron para reconocer esta variabilidad (Harris et al., 2001). Hasta entonces, se consideraba el nivel de residuos representativo de un lote y la cantidad o porción del alimento que se consumía, pero era necesario introducir estudios de exposición aguda para aquellos alimentos que se consumían de una pieza y/o para residuos especialmente tóxicos, en donde la ingestión de una determinada unidad, quizás con mayor residuos que el nivel representativo del lote, podía conllevar un serio peligro de toxicidad aguda. De esta manera, en los estudios de toxicidad aguda, se obtiene un NOAEL, que dividido por el factor de seguridad para humanos, da la DRfA (Huijbregts et al., 2000; Renwick, 2002). Este parámetro, indicador de la ingestión aguda, marca la cantidad de un residuo que puede ser ingerido de una vez (una comida o un día), sin daños para el consumidor, con los conocimientos que se tienen hasta ese momento. Igual, que la IDA, también se refiere a kilogramos de peso corporal. La variabilidad de niveles de residuos entre unidades de alimentos se ha estudiado a estos efectos, encontrándose que generalmente es independiente del tipo de plaguicida, cultivo, tamaño de la unidad y el nivel de residuos representativo. El depósito de plaguicidas en la unidad individual durante la aplicación es probablemente el factor más importante. Teniendo en cuenta estos

aspectos, se ha publicado que se puede considerar un factor de variabilidad entre el nivel de residuos de un lote y el nivel por unidad igual al triple del nivel unitario situado en el percentil 97,5 de los resultados de análisis por unidades de un mismo lote (Hamilton et al., 2004). Este valor es el recomendado por el Codex a instancias del JMPR (Join Meeting Pesticide Residue), aunque la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) establece un factor de 5 en vez de 3 para los alimentos de peso unitario mayor de 250 g y uno de 7 para aquellos entre 25-250 g (CE, 2005).

En la evaluación de la exposición, se determina mediante encuestas de consumo y los niveles de residuos encontrados en las muestras, la IDE en caso de exposición crónica o la ingesta aguda estimada (IAE) para una exposición aguda con los alimentos (Löwik et al., 1999; Petersen et al., 2001; Kroes et al., 2002). En teoría, es posible estimar las ingestas de cualquier sustancia en una población dada si se conocen estos dos tipos de datos. Incluso, el sumatorio del producto del consumo de todos los alimentos donde el residuo está presente por las concentraciones en cada uno de ellos, nos puede dar la ingesta total del residuo.

En la práctica, se realizan diferentes encuestas de consumo, cada una con unas ventajas e inconvenientes, entre las que destacan los cuestionarios de frecuencia de consumo a lo largo de un año; el método de recuerdo de 24 h; el diario de alimentos de una semana; duplicidad de raciones; o los estudios de dieta total, en los que se registra el consumo de los alimentos de una dieta habitual en todas sus formas de presentación para un determinado periodo. En esta tesis, se han escogido los cuestionarios de frecuencia de consumo como encuesta de hábito de consumo por sus valores de acertada aproximación y alta practicabilidad. En cualquier caso, las dietas utilizadas para el cálculo de las ingestas estimadas deben proceder de distintas encuestas en hogares con un número suficiente de consumidores, para alcanzar el requisito de representatividad del grupo de población que se estudia y determinar adecuadamente la cantidad de los alimentos que consumen. Se debe distinguir qué grupo de la población es sometido a encuesta, clasificados por su lugar de residencia, edad, sexo, etc., ya que los patrones de consumo varían mucho entre grupos y no se establece un patrón de consumo generalizado (Rawn et al., 2004).

Asimismo, en las encuestas de exposición crónica y en el posterior establecimiento del riesgo, se deben distinguir las diferentes formas en que se consumen los alimentos, ya sea en zumos, conservas o frescos, por ejemplo, porque los niveles de residuos asociados con las diferentes tipos de presentación y sus patrones de consumo pueden ser muy diferentes (Kroes et al., 2002).

Por lo que se refiere al contenido de los residuos de plaguicidas de interés en los alimentos, en la práctica pueden presentarse algunos inconvenientes, como por ejemplo, que no haya datos de la concentración del nivel de residuos en todos los alimentos en los que puede estar presente y además, los alimentos de los que haya datos pueden no ser representativos de la dieta de la población objeto de estudio o más frecuentemente, la falta de conocimiento en el nivel de residuos de los alimentos procesados.

Por otra parte, las ingestas estimadas pueden ser calculadas por métodos deterministas o probabilísticos. Los métodos deterministas comprenden aquellos en los que se calculan valores concretos para las ingestas, y como ejemplo se pueden citar aquellos que calculan la ingesta en el peor de los casos (el plaguicida se aplicó en su dosis mayor, el plazo de seguridad fue el menor y que los residuos que quedaron en la porción comestible fueron los mayores posibles), los que utilizan estudios de dieta total, o los que, como en esta tesis, emplean encuestas de consumo de alimentos. En los métodos probabilísticos, enmarcados en los métodos estocásticos de estimación de ingestas, la distribución del consumo de alimentos en la dieta y la distribución de los posibles residuos se combinan en repetidos cálculos probabilísticos para obtener una distribución posible de la ingesta de residuos para un tiempo dado (Harvey, 2000; Petersen, 2000; Hamilton et al., 2004). El desarrollo de los métodos probabilísticos es complejo, ya que además de complicados tratamientos matemáticos, necesita contar con gran cantidad de información, tanto analítica como relacionada con la producción y preparación de los alimentos y su consumo. Entre ellos destaca el denominado "Proyecto Montecarlo" ("Desarrollo, validación y aplicación de modelos estocásticos para evaluar la exposición humana a sustancias químicas y nutrientes vehiculados por los alimentos"). Se desarrolló entre septiembre de 2000 y octubre de 2001 como proyecto de colaboración internacional en el

que participó la Dirección de Salud Pública del País Vasco y actualmente se encuentra en implantación (Jalón, 2006).

En la caracterización del riesgo, se establecen los factores de seguridad o riesgo entre las ingestas estimadas, aguda y crónica, y su correspondiente valor aceptable, DRfA e IDA, respectivamente. Es posible encontrar estas relaciones expresadas como porcentajes de IDA o DRfA cubiertos en la exposición o como factores expresados en valores enteros absolutos. Además, es importante señalar que el cumplimiento del LMR de un producto en un alimento en fresco asegura la ausencia de riesgos en una ingesta crónica o aguda, según el caso, ya que para fijar el valor de un LMR, además de las experiencias supervisadas de campo, se necesita que considerándolo como el valor de residuos de la muestra, la IAE sea inferior a la DRfA, si se debe establecer según el cultivo y el plaguicida, y siempre que la IDE sea inferior a la IDA. Por tanto, el criterio agrónomo, además del de ingestión y el toxicológico, también interviene en la caracterización del riesgo.

Finalmente, muchas de las investigaciones actuales están orientadas únicamente al establecimiento del riesgo en la franja de edad infantil, ya que a su mayor susceptibilidad toxicológica, se le une que las frutas y verduras son prácticamente constantes en su dieta, y estos alimentos precisamente son de los más tratados con fitosanitarios. En estos estudios se ha encontrado bajas exposiciones a uno o más plaguicidas, sin sobrepasar en la mayoría de casos los límites de ingestión aceptables (Adgate et al., 2001; Boon et al., 2004; Givens et al., 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIALES.

3.1.1. PLAGUICIDAS ESTUDIADOS.

A continuación se resumen las principales características y propiedades fisicoquímicas de los productos estudiados (Tomlin, 2005; De Liñán, 2008; MAPA, 2008a). Aunque se clasifican en reguladores e inhibidores del crecimiento de insectos, genéricamente se conocen como "reguladores del crecimiento de insectos", ya que de una u otra forma alteran dicho proceso.

3.1.1.1. REGULADORES DEL CRECIMIENTO DE INSECTOS.

La hormona juvenil junto con la ecdisona, producidas por cada especie de insectos en determinadas épocas, son las que regulan la muda de las larvas y su evolución a crisálida. Los reguladores del crecimiento de insectos mimetizan a la hormona juvenil, alterando el equilibrio hormonal del insecto y afectando su crecimiento. Al utilizar un producto químico de esta naturaleza, como fenoxicarb y piriproxifen, la larva muda, aumentando de tamaño, pero sin evolucionar a crisálida, con lo que se detiene la

metamorfosis; el insecto nunca llega al estado adulto y acaba muriendo porque es inviable. Así, estos plaguicidas ejercen su control regulando el ciclo de crecimiento de ciertos insectos.

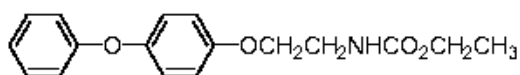
3.1.1.1.1. Fenoxicarb.

Insecticida perteneciente al grupo químico de los carbamatos. Fue descubierto en 1981 y comercializado por primera vez en 1985 (Dorn et al., 1981). Mimetiza a la hormona juvenil al inhibir las esterasas específicas de ésta. Inhibe la muda de los primeros estadios larvarios, la metamorfosis hacia el estado adulto y dificulta la embriogénesis. Sólo muestra su actividad cuando el insecto produce bajos niveles de la hormona o en ausencia de ésta. Actúa por ingestión y contacto, y no presenta acción neurotóxica. No es sistémico, aunque penetra rápidamente en el interior de los tejidos.

Nomenclatura y estructura.

Nombre común: Fenoxicarb.

Nombre químico según IUPAC:



etil 2-(4-fenoxifenoxi) etilcarbamato.

Propiedades físico-químicas.

Se presenta en cristales de amarillentos a incoloros, prácticamente inodoros y no es corrosivo. Su punto de fusión es de 53-54 °C y el de inflamación de 224 °C; presenta una tensión de vapor de $8,67 \times 10^{-4}$ mPa (25 °C) y un coeficiente de partición n-octanol/agua (K_{ow}) de 4,07 (25 °C). Su densidad es de 1,23 g/ml (20 °C); su solubilidad en agua 7,90 mg/l (pH 7,55-7,84; 25 °C), en etanol 510 g/l, en acetona 70 g/l, en tolueno 630 g/l, en n-hexano 5,30 g/l y en n-octanol 130 g/l. Es estable a la luz y a la hidrólisis en disoluciones acuosas con pH 3, 7 y 9, a 50 °C.

Aplicaciones.

Apto para el control de *Lepidoptera* e insectos trepadores y chupadores en frutas (incluidos cítricos), algodón, olivo, vid y ornamentales; *Coleoptera* and *Lepidoptera* en productos de almacén; y también para cucarachas, pulgas, larvas de mosquito y hormigas rojas en casos de salud pública.

Formulaciones.

Fenoxicarb 25% [WG] P/P: Insegar®, Yoruba®, Grial®, Carofen®, Atrezzo® y Nictol®. También se comercializa en mezclas: Lufox® (fenoxicarb 7,5% + lufenuron 3% [EC] P/V).

Aspectos toxicológicos.

Clasificación de la OMS: III.

Clasificación de la UE: N; R50, R53.

DL₅₀ oral y aguda: en ratas > 10.000 mg/kg.

NOEL: en ratones 5,5 mg/kg peso (18 meses); en ratas 8 mg/kg peso (2 años).

IDA: 0,055 mg/kg peso.

Teratogénesis: en rata no teratógeno hasta 300 mg/kg/d.

Mutagénesis: no mutágeno *in vivo* e *in vitro*.

Reproducción: sin efectos sobre rata o conejo.

En caso de intoxicación: aparecen síntomas de decaimiento, temblores, y sudoración, entre otros. Se desconoce el antídoto, el tratamiento sería sintomático y si la persona estuviera consciente se le podría provocar el vómito.

Aspectos metabólicos y medioambientales.

En ratas, la principal ruta metabólica es la hidroxilación del anillo para formar etil [2-[p-(p-hidroxifenoxi)fenoxi]etil]carbarnato. En las plantas se degrada rápidamente. Posee

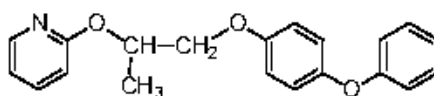
baja movilidad en el suelo, sufre una degradación relativamente rápida en suelo y agua, y no presenta bioacumulación. Se describe un tiempo de vida media de 1,7 a 2,5 meses en laboratorio y sobre 31 días en campo.

3.1.1.1.2. Piriproxifen.

Insecticida que mimetiza a la hormona juvenil, perteneciente al grupo químico de las piridinas. Fue comercializado en 1989 con fines de salud pública y en 1995 con fines agrícolas. Al mimetizar a la hormona, logra suprimir la embriogénesis e inhibir la metamorfosis y reproducción. También produce desequilibrios en la fisiología endocrina de la diapausa, con lo que los insectos se ven expuestos a condiciones ambientales desfavorables. Actúa por contacto e ingestión.

Nomenclatura y estructura.

Nombre común: Piriproxifen.



Nombre químico según IUPAC: 4-fenoxifenil (RS)-2-(2-piridiloxi)propil éter.

Propiedades físico-químicas.

Se presenta en cristales o líquido viscoso, de color amarillo pálido a marrón, de débil olor. Su punto de fusión es 47 °C y su punto de inflamación 119 °C; su tensión de vapor < 0,013 mPa (23 °C) y su K_{ow} es 5,37; su densidad es igual a 1,24 g/ml (25 °C). Posee una solubilidad en agua de 0,54 mg/l (20 °C). La solubilidad en hexano 400, en metanol 200 y en xileno 500 (g/kg, 20-25 °C). Es estable al calor y a la radiación luminosa (> 300 nm).

Aplicaciones.

Recomendado para el control de mosca blanca y trips en cítricos, entre otros. También para el control de plagas de insectos relacionados con salud pública (moscas,

escarabajos, mosquitos, pulgas) en sitios como establos, gallineros, pantanos, etc. Los mejores resultados se obtienen cuando se aplica sobre insectos en estado larvario. No es recomendable aplicar si se encuentran mezclados individuos en distintos estados de desarrollo. Su efecto de choque aumenta si se mezcla con aceite mineral.

Formulaciones.

Piriproxifen 10% [EC] P/V: Juvinal 10 EC®, Atominal 10 EC®, Muligan®, Discolo®, Expedient 10 EC®, Alazin®, Proxy 10 EC®, Delta plus®, Piriprox®, Cominal 10®, Promex® y Proximo®.

Aspectos toxicológicos.

Clasificación de la OMS: U.

DL₅₀ oral y aguda: en ratas > 5.000 mg/kg.

NOEL: en ratas 7,04 mg/kg peso (2 años).

IDA: 0,10 mg/kg peso.

Aspectos metabólicos y medioambientales.

Posee elevada persistencia lo que aumenta la posibilidad de que entre en contacto con el insecto o de que sea ingerido por él.

3.1.1.2. INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE INSECTOS.

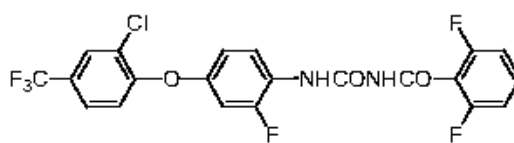
Otro grupo importante de los plaguicidas biorracionales lo integran los inhibidores del crecimiento de los insectos o inhibidores de la síntesis de quitina (compuesto estructural del esqueleto exógeno de los insectos), con lo que las larvas de los insectos no pueden desarrollarse, pues al llegar el momento de la muda quedan desprotegidos sin formar el exoesqueleto. Estos productos evitan también la eclosión de los huevos y si

alguno llega a buen fin, las larvas recién emergidas sucumben al poco tiempo. Dentro de este grupo se encuentran las benzoilfenilureas y entre ellas, flufenoxuron y lufenuron.

3.1.1.2.1. Flufenoxuron.

Acaricida e insecticida perteneciente al grupo químico de las benzoilureas. Fue presentado en 1986 y comercializado por primera vez en 1988 (Anderson et al., 1986). Con su estructura de benzoilfenilurea es capaz de inhibir la síntesis de quitina y afectar a la muda. Repercute también en la robustez de las mandíbulas y en la efectividad de los músculos, impidiendo la alimentación y la reproducción de las larvas. Posee acción por ingestión y contacto. No es sistémico y posee efecto translaminar.

Nomenclatura y estructura.



Nombre común: Flufenoxuron.

Nombre químico según IUPAC: 1-[4-(2-cloro- α,α,α -trifluoro-*p*-toliloxi)-2-fluorofenil]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea.

Propiedades físico-químicas.

Se presenta en cristales blancos, inodoros. Su punto de fusión es 169-172 °C; su tensión de vapor $6,52 \times 10^{-3}$ mPa (20 °C) y su K_{ow} es 4,00 (pH 7); su densidad es igual a 1,57 g/ml (20 °C) y no es autoinflamable. Posee una solubilidad en agua de $1,86 \times 10^{-2}$ (pH 4), $1,52 \times 10^{-3}$ (pH 7), $3,73 \times 10^{-3}$ (pH 9) (mg/l, 25 °C). La solubilidad en acetona es 82; en xileno 6; en diclorometano 24; en n-hexano 0,11, en ciclohexano 95, en diclorometano 18,8 y en metanol 3,5 (g/l, 25 °C). Es estable a la luz natural y a temperaturas de hasta 190 °C. No es explosivo.

Aplicaciones.

Recomendado para el control de estados inmaduros de ácaros fitófagos (*Aculus*, *Brevipalpus*, *Panonychus*, *Phyllocoptruta*, *Tetranychus* spp.) y plagas de insectos de vid, cítricos, té, algodón, maíz, soja, hortícolas y ornamentales, entre otros.

Formulaciones.

Flufenoxuron 10% [DC] P/V: Cascade®, Cascade-10® y Kimlux®.

Aspectos toxicológicos.

Clasificación de la OMS: U.

Clasificación de la EPA: formulación III.

DL₅₀ oral y aguda: en ratas y ratones > 3.000 mg/kg; en perros > 5.000 mg/kg.

NOEL: en perros 100 mg/kg dieta (1 año) ó 3,60 mg/kg peso (diariamente); en ratas 50 mg/kg dieta (2 años) ó 2,50 mg/kg peso (diariamente); en ratones 1.000 mg/kg dieta (2 años) ó 170 mg/kg peso (diariamente).

IDA: 0,025 mg/kg peso.

No se conocen los síntomas en caso de intoxicación ni su antídoto. El tratamiento sería sintomático.

Aspectos metabólicos y medioambientales.

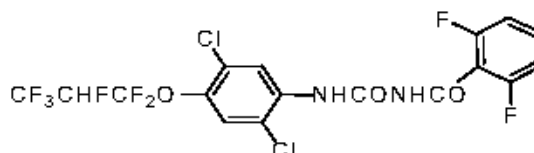
Se adsorbe fuertemente en suelos.

3.1.1.2.2. Lufenuron.

Acaricida e insecticida perteneciente al mismo grupo de las benzoilureas. Se presentó en 1989 y fue comercializado por primera vez en 1990. Análogamente al

anterior, inhibe la síntesis de quitina, afectando a la muda. Impide también la alimentación de las larvas. En algunos casos posee efecto ovicida, en parte por su carácter transovárico, favoreciendo que los embriones no eclosionen. Actúa más por ingestión que por contacto. No es sistémico ni tiene acción de vapor.

Nomenclatura y estructura.



Nombre común: Lufenuron.

Nombre químico según IUPAC: (RS)-1-[2,5-dicloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxi)fenil]-3-(2,6-difluorobenzoi)urea.

Propiedades físico-químicas.

Se presenta en cristales incoloros. Su punto de fusión es 168,70-169,40 °C; su tensión de vapor $< 4 \times 10^{-3}$ mPa (25 °C) y su K_{OW} es 5,12 (25 °C); su densidad es de 1,66 g/ml (20 °C). Posee una solubilidad en agua $< 0,06$ mg/l (25 °C). La solubilidad en etanol es de 41, en acetona de 460, en tolueno 72, en n-hexano 0,13 y en n-octanol 8,90 (g/l, 25 °C). Es estable a la luz y al aire.

Aplicaciones.

Recomendado para el control de larvas y ninfas, como larvas de *Lepidoptera* y *Coleoptera* en algodón, maíz, hortícolas, frutales y vid; también para mosca blanca y ácaros de cítricos, entre otros.

Formulaciones.

Lufenuron 3% [RB] P/P: Adress®. Lufenuron 5% [EC] P/V: Match 5 EC® y Match®. También se comercializa en mezcla: Lufox® (fenoxicarb 7,5% + lufenuron 3% [EC] P/V).

Aspectos toxicológicos.

Clasificación de la OMS: III.

Clasificación de la UE: R43| N; R50, R53.

DL₅₀ oral y aguda: en ratas y ratones > 2.000 mg/kg.

NOEL: en ratas 2,0 mg/kg peso diariamente (2 años).

IDA: 0,01 mg/kg peso.

No tiene potencial mutágeno ni disminuye las funciones reproductoras.

Los síntomas descritos en caso de intoxicación son irritación de piel, dolor de cabeza, mareos, somnolencia, náuseas, vómitos, diarrea, temblores y alteraciones respiratorias. No se conoce su antídoto. El tratamiento es sintomático. No se debe provocar el vómito, ni dar leche ni grasas, evitar también depresores centrales.

Aspectos metabólicos y medioambientales.

En animales existe una baja tasa de degradación de este compuesto y la principal vía de eliminación son las heces. Tampoco en plantas se han encontrado metabolitos en cantidades significativas. Es muy persistente sobre las hojas y permanece principalmente sobre la superficie de las partes tratadas de la planta. En suelos se ha observado una rápida degradación bajo condiciones biológicas aeróbicas, una fuerte adsorción y baja movilidad tanto del compuesto original como de sus metabolitos. No es muy agresivo contra ácaros e insectos beneficiosos.

3.1.2. ALIMENTOS AGRÍCOLAS ESTUDIADOS.

A continuación se exponen las características de interés de los alimentos agrícolas estudiados (Carrero y Planes, 1995; Moore et al., 1998; Pamplona, 1999; Souci et al., 1999; Mazza, 2000; Trichopoulou et al., 2000; Moreiras et al., 2006; Rieger, 2006; USDA, 2005, 2008).

3.1.2.1. HORTALIZAS.

En el año 2000, el promedio anual mundial de suministro de hortalizas *per cápita* fue 102 kg, con el nivel más alto en Asia (116 kg), y los niveles más bajos en Sudamérica (48 kg) y África (52 kg), lo que está relacionado con el nivel de desarrollo e industrialización de los países (WHO/FAO, 2003). De acuerdo con la USDA, el valor mundial de las exportaciones de hortalizas y sus productos se sitúa en la segunda posición dentro de la exportación mundial en el sector de las frutas y hortalizas y sus exportaciones continúan aumentando, lo que supone que una mayor variedad y cantidad de hortalizas está llegando a más mercados que antes (Huang, 2004).

En particular en la UE, Italia y España son los principales productores de hortalizas (con un promedio en el periodo 2003-2005 de $16.000 \cdot 10^3$ Tm y alrededor de $12.000 \cdot 10^3$ Tm, respectivamente). Concretamente, la Comunidad Autónoma de Murcia es el segundo productor de hortalizas de España ($1.701,7 \cdot 10^3$ Tm en 2003) (DG Agriculture and Rural Development, 2006; MAPA, 2006b).

3.1.2.1.1. Calabacín (*Cucurbita pepo*).

La procedencia de este alimento no está bien definida, pudiera ser de la India o de América del Sur, siendo una de las especies que introdujeron los españoles en Europa durante la época del descubrimiento. Actualmente es una planta cultivada en las regiones cálidas de la Tierra (Figura 3.1).



Figura 3.1.- Fotografía de la variedad de calabacín utilizada en este estudio

Clasificación científica.

Fruto en baya de la planta del calabacín. Perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Cucurbitales*, familia *Curcubitaceae*, género *Cucurbita* y especie *C. pepo*.

Variedades.

Las variedades que se siembran en mayo o junio son de piel verdi-blanca mientras que las sembradas en marzo son de piel oscura.

Requerimientos edafoclimáticos.

El calabacín se desarrolla de forma óptima a una temperatura de 20-30 °C. La humedad relativa óptima del aire en el invernadero oscila entre el 65-80%. Es un cultivo exigente en agua, por lo que el rendimiento dependerá en gran medida de la disponibilidad de agua en el terreno. Una mayor insolación repercutirá directamente en un aumento de la cosecha. Es poco exigente en suelo, adaptándose con facilidad a todo tipo de suelos, aunque funciona mejor en aquellos de textura franca, profundos y bien drenados. Sin embargo, se trata de una planta muy exigente en materia orgánica. Los valores de pH óptimos oscilan entre 5,6-6,8, aunque puede adaptarse a terrenos con valores de pH 5-7. Es una especie medianamente tolerante a la salinidad del suelo y del agua de riego.

Plagas y enfermedades.

Las más comunes son araña roja, mosca blanca, pulgón, trips, minadores de hoja, orugas, nematodos, "ceniza" u oídio de las cucurbitáceas, podredumbre gris, podredumbre blanca, podredumbre blanda, virus de mosaico amarillo del calabacín, virus del mosaico del pepino, virus del mosaico de la sandía y virus de las venas amarillas del pepino.

Composición.

Contiene fundamentalmente agua (92,2%), 2,1% de hidratos de carbono, 0,4% de lípidos y 1,6% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. Es rico en minerales, sobre todo calcio, y en vitaminas A, B y C. Su piel puede presentar diversas intensidades de verde, determinado por su composición en clorofila, según la variedad de que se trate.

Propiedades.

La presencia de mucílagos confiere a esta hortaliza propiedades emolientes sobre el aparato digestivo, por lo que al tratarse de un alimento fácil de digerir y con ligero efecto laxante, resulta adecuado en caso de problemas digestivos como dispepsia, gastritis y estreñimiento.

3.1.2.1.2. Lechuga romana (*Lactuca sativa*).

Su antecesor es *L. scariola*, que se encuentra en estado silvestre en la mayor parte de las zonas templadas. El cultivo de la lechuga se remonta 2.500 años atrás, siendo conocida por griegos y romanos. Las primeras lechugas de las que se tiene referencia son las de hoja suelta, aunque las acogolladas eran conocidas en Europa en el siglo XVI (Figura 3.2).



Figura 3.2.- Fotografía de la variedad de lechuga utilizada en este estudio

Clasificación científica.

La lechuga es una planta anual y autógama. Perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Asterales*, familia *Asteraceae*, subfamilia *Cichorioideae*, tribu *Lactuceae*, género *Lactuca*, especie *L. sativa* y variedad *longifolia*.

Variedades.

Entre las variedades de lechuga destacan las de hoja larga o variedad *longifolia*, donde se incluye la lechuga romana, arrepollada o variedad *capitata*, y de colores rojizos o variedad *intybacea*. La lechuga romana es de cogollo largo, con hojas aproximadamente lanceoladas, menos gruesas que las de iceberg y crujientes. En España también se le conoce a esta variedad como "oreja de mulo".

Requerimientos edafoclimáticos.

La temperatura óptima de germinación oscila entre 18-20 °C. Durante la fase de crecimiento del cultivo se requieren temperaturas entre 14-18 °C por el día y 5-8 °C por la noche, pues la lechuga exige que haya diferencia de temperaturas entre el día y la noche. Durante el acogollado se requieren temperaturas en torno a los 12 °C durante el día y 3-5 °C por la noche. El sistema radicular de la lechuga es muy reducido en comparación con la parte aérea, por lo que es muy sensible a la falta de humedad y soporta mal un periodo de sequía, aunque éste sea muy breve. La humedad relativa conveniente para la lechuga es del 60-80%.

Su cultivo en invernadero presenta problemas por el incremento de la humedad ambiental, por lo que se recomienda su producción al aire libre, cuando las condiciones climatológicas lo permitan. Los mejores suelos son los ligeros, arenoso-limosos, con buen drenaje, situando el pH óptimo entre 6,7-7,4. En los suelos humíferos, la lechuga vegeta bien, pero si son excesivamente ácidos será necesario encalar. Aunque no admite la

sequía, es conveniente que la superficie del suelo esté seca para evitar en todo lo posible la aparición de podredumbres de cuello.

Plagas y enfermedades.

Trips, minadores, mosca blanca, pulgones, antracnosis, botritis, mildiu veloso, esclerotinia, septoriosis, virus del mosaico de la lechuga y virus del bronceado del tomate.

Composición.

Contiene mayoritariamente agua representada por un 95%, 1,1% de hidratos de carbono, 0,2% de lípidos y 1,3% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. Entre sus vitaminas destacan la A, B1, B2, B3, B9, C, E y K. En el aporte de minerales destaca el potasio. Contiene flavonoides, fundamentalmente quercetina, seguida de kaempferol, miricetina, luteolina y apigenina. La lechuga también aporta pequeñas cantidades de fitoesteroles como beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol. En sus hojas destaca la presencia de clorofila, que le aporta su color verde característico.

Propiedades.

Posee propiedades antioxidantes, favorables en procesos inmunes, cancerígenos, enfermedades cardiovasculares, etc., debido a su aporte de vitaminas. Su contenido en ácido fólico o vitamina B9 contribuye también a evitar la anemia megaloblástica y se asocia con un menor riesgo de sufrir alteraciones del crecimiento, de la función mental y malformaciones congénitas fetales. Al aportar fitoesteroles puede contribuir a la reducción de los niveles séricos de colesterol y en la protección frente a algunos tipos de cáncer y con el aporte de quercetina se consigue también actividades antioxidante, antitrombótica y anticarcinogénica. Además se le han atribuido propiedades calmantes y sedantes probablemente debidas a la presencia de sustancias como lactucina y lactucopicrina. Además a la clorofila se le atribuyen importantes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

3.1.2.1.3. Pepino español (*Cucumis sativus*).

Se cultiva desde hace más de 6.000 años a.C. Se cree que es oriundo de la India. Fueron los romanos quienes lo introdujeron en Europa y los españoles quienes lo llevaron a América (Figura 3.3).



Figura 3.3.- Fotografía de la variedad de pepino utilizada en este estudio

Clasificación científica.

Fruto en baya de la planta del pepino que es una planta herbácea trepadora anual. Perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Violales*, familia *Cucurbitaceae*, género *Cucumis* y especie *C. sativus*.

Variedades.

La mayor parte de las variedades cultivadas de pepino son híbridas, habiéndose demostrado su mayor productividad frente a las no híbridas. Se pueden englobar en pepino corto y pepinillo o "tipo español", pepino medio-largo o "tipo francés" y pepino largo o "tipo holandés". En el "tipo español", el fruto es pequeño (longitud máxima de 15 cm), de piel verde y rayada de amarillo o blanco.

Requerimientos edafoclimáticos.

Las temperaturas que durante el día oscilen entre 20-30 °C apenas tienen incidencia sobre la producción, aunque a mayor temperatura durante el día, hasta 25 °C, mayor es la producción precoz. Por encima de los 30 °C se observan desequilibrios en las plantas que afectan directamente a los procesos de fotosíntesis y respiración y temperaturas nocturnas iguales o inferiores a 17 °C ocasionan malformaciones en hojas y frutos. El umbral mínimo crítico nocturno es de 12 °C y a 1 °C se produce la helada de la planta. El empleo de dobles cubiertas en invernaderos tipo parral supone un sistema útil para aumentar la temperatura y la producción del pepino. Es una planta con elevados requerimientos de humedad, debido a su gran superficie foliar, siendo la humedad relativa óptima durante el día del 60-70% y durante la noche del 70-90%. Sin embargo, los excesos de humedad durante el día pueden reducir la producción, al disminuir la transpiración y en consecuencia la fotosíntesis, aunque esta situación no es frecuente.

El pepino es una planta que crece, florece y fructifica con normalidad incluso en días cortos, aunque también soporta elevadas intensidades luminosas y a mayor cantidad de radiación solar, mayor es la producción. Puede cultivarse en cualquier tipo de suelo de estructura suelta, bien drenado y con suficiente materia orgánica. El pH óptimo del suelo oscila entre 5,5-7, y es una planta medianamente tolerante a la salinidad.

Plagas y enfermedades.

Araña roja, araña blanca, mosca blanca, pulgón, trips, minadores de hoja, orugas, nemátodos, oidiopsis, "ceniza" u oídio de las cucurbitáceas, podredumbre gris, podredumbre blanca, chancro gomoso del tallo, virus del cribado del melón, virus de mosaico amarillo del calabacín, virus del mosaico del pepino, virus de mosaico de la sandía y virus de las venas amarillas del pepino.

Composición.

Contiene fundamentalmente agua representada por un 96,8%, 1,8% de hidratos de carbono, 0,2% de lípidos y 0,6% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. Tiene bajos contenidos en minerales, con excepción del potasio, cuyos niveles son medios. Tiene elevados contenidos en vitamina C, aunque éstos son muy variables dependiendo de las condiciones ambientales y la forma de cultivo. Aporta cantidades de provitamina A, luteína, y proporciones aún menores de otras vitaminas del grupo B, como folatos, niacina, tiamina y riboflavina. También presenta una pequeña proporción de beta-sitosterol. Su piel puede presentar diversas intensidades de verde con líneas amarillas, determinado por su composición en clorofila y carotenos, según la variedad de que se trate.

Propiedades.

A este alimento se le han atribuido efectos beneficiosos para la piel en casos como dermatitis, quemaduras e hinchazón de ojos. Los posibles efectos beneficiosos del pepino a este nivel se han relacionado con la presencia de vitamina C y ácido cafeico. Su aporte de beta-sitosterol, compuesto con actividad antiinflamatoria, hipoglucémica y moduladora de la respuesta inmunitaria, entre otras, puede resultar beneficioso en enfermedades como la artritis reumatoide, diabetes, cáncer e hiperplasia benigna de próstata.

3.1.2.1.4. Pimiento morrón verde (*Capsicum annuum*).

Se trata de una planta originaria de Méjico que tras el descubrimiento se extendió a Asia Oriental y Europa. Su cultivo en España se inició a finales del siglo XV y después llegó a Italia. Es cultivado mundialmente en zonas cálidas y de climas secos (Figura 3.4).



Figura 3.4.- Fotografía de la variedad de pimiento utilizada en este estudio

Clasificación científica.

Fruto de la planta del pimiento, herbácea, perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Asteridae*, orden *Solanales*, familia *Solanaceae*, género *Capsicum* y especie *C. annuum*.

Variedades.

Dentro de esta especie se pueden encontrar numerosas variedades, generadas por diferencias en el clima y las condiciones del suelo entre otros factores, pero las más populares son el pimiento morrón y el jalapeño. El pimiento morrón suele ser rojo, verde o amarillo, aunque hay ejemplares de color anaranjado, morado o incluso negro.

Requerimientos edafoclimáticos.

Es una planta exigente en temperatura. La coincidencia de bajas temperaturas durante el desarrollo del botón floral (entre 10-15 °C) da lugar a la formación de flores con anomalías como pétalos curvados y sin desarrollar, formación de múltiples ovarios que pueden evolucionar a frutos distribuidos alrededor del principal, acortamiento de estambres y de pistilo, engrosamiento de ovario y pistilo, fusión de anteras, etc. Las bajas temperaturas también inducen la formación de frutos de menor tamaño, que pueden presentar deformaciones, reducen la viabilidad del polen y favorecen la formación de frutos partenocárpicos. Las altas temperaturas provocan la caída de flores y pequeños

frutos. La humedad relativa óptima oscila entre el 50-70%. La coincidencia de altas temperaturas y baja humedad relativa puede ocasionar la caída de flores y de frutos recién cuajados. Es una planta muy exigente en luminosidad, sobre todo en los primeros estados de desarrollo y durante la floración. Los suelos más adecuados para el cultivo del pimiento son los franco-arenosos, profundos, ricos, con un contenido en materia orgánica del 3-4% y principalmente bien drenados. Los valores de pH óptimos oscilan entre 6,5-7 aunque puede resistir ciertas condiciones de acidez (hasta un pH de 5,5), en suelos enarenados puede cultivarse con valores de pH próximos a 8. En cuanto al agua de riego el pH óptimo es de 5,5-7. Es una especie de moderada tolerancia a la salinidad tanto del suelo como del agua de riego.

Plagas y enfermedades.

Las más comunes son araña roja, mosca blanca, pulgón, trips, minadores de hoja, orugas, nematodos, oídio o "ceniza" de las cucurbitáceas, podredumbre gris, podredumbre blanca, podredumbre blanda, virus de mosaico amarillo del calabacín, virus del mosaico del pepino, virus del mosaico de la sandía y virus de las venas amarillas del pepino. En suelos con antecedentes de *Phytophthora* sp. es conveniente realizar una desinfección previa a la plantación.

Composición.

Contiene fundamentalmente agua representada por un 93,4%, 2,1% de hidratos de carbono, 0,1% de lípidos y 0,9% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. El pimiento presenta una elevada cantidad de vitamina C, aunque hay diferencias entre variedades (los de color verde suelen presentar mayor contenido). Asimismo, contiene cantidades importantes de carotenos, en forma de provitamina A, y capsantina. Entre sus minerales destaca el potasio y el selenio. Su piel puede presentar diversas intensidades de verde, determinado por su composición en clorofila, según la variedad de que se trate.

Propiedades.

La vitamina C, los carotenos y el selenio hacen de esta hortaliza una buena fuente de antioxidantes. La capsantina también ha demostrado poseer actividad anticancerígena.

3.1.2.2. CÍTRICOS.

Los cítricos constituyen las frutas de mayor exportación a nivel mundial en términos de valor económico. La producción mundial de cítricos ha experimentado un crecimiento continuo desde las últimas décadas del siglo XX, llegando a un 138% más de producción en el periodo 1998-2000 respecto de 1970-1972, lo que se debe al aumento de las superficies de cultivo (FAO, 2003a). Según la USDA, el mayor productor mundial de cítricos en el periodo 2006-2007 fue Brasil, seguido por China, Estados Unidos, México y España (USDA, 2008).

3.1.2.2.1. Mandarina satsuma (*Citrus unshiu*).

La mandarina proviene de las zonas tropicales de Asia, en concreto la variedad satsuma procede de Japón. Su cultivo se introdujo en Europa en el siglo XIX (Figura 3.5).



Figura 3.5.- Fotografía de la variedad de mandarina utilizada en este estudio

Clasificación científica.

Fruto del árbol mandarino. Perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Rosidae*, orden *Sapindales*, familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioidea*, género *Citrus* y especie *C. unshiu*.

Variedades.

En España, las mandarinas se clasifican en cuatro grandes grupos, clementinas, clementillas, híbridos y satsumas. Las satsumas son las más precoces, con frutos de mayor tamaño y peor calidad gustativa.

Requerimientos edafoclimáticos.

Es más resistente al frío y más tolerante a la sequía que el naranjo, pero los frutos son sensibles. El factor limitante es la temperatura mínima, ya que no tolera las inferiores a 3 °C, pues la temperatura determina el desarrollo vegetativo, floración, cuajado y calidad de los frutos. Las temperaturas altas constantes mantienen altos niveles de clorofilas y su color es persistentemente verde. Necesitan suelos permeables y poco calizos y un medio ambiente húmedo tanto en el suelo como en la atmósfera. Se recomienda que el suelo sea profundo para garantizar el anclaje del árbol, una amplia exploración para garantizar una buena nutrición y un crecimiento adecuado. Los suelos deben tener una proporción equilibrada de elementos gruesos y finos, para garantizar una buena aireación y facilitar el paso de agua, además de proporcionar una estructura que mantenga un buen estado de humedad y una buena capacidad de cambio catiónico. No toleran la salinidad y son sensibles a la asfixia radicular.

Plagas y enfermedades.

Minador de los cítricos, cochinilla, mosca blanca, mosca de la fruta, pulgones, prays o polilla de los cítricos, nematodo de los cítricos, gomosis, podredumbre de la base del

tronco y cuello de la raíz, podredumbre de raíces absorbentes, *alternaria alternata* pv. *citri* y virus de la tristeza.

Composición.

Contiene fundamentalmente agua representada por un 86,7%, alto contenido en hidratos de carbono con un 10,1%, 0,3% de lípidos y 0,7% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. Es una buena fuente de carotenos, vitamina B y C, así como de bioflavonoides, potasio, fósforo, bromo y cinc. El color de su piel y pulpa es anaranjado-rojizo, debido a su contenido en carotenoides (carotenos y xantofilas). Además, los cítricos son plantas cargadas con aceites esenciales, lipofílicos y muy aromáticos. Estos aceites se encuentran en unas glándulas o vesículas compuestas por células específicas que los segregan. Estas glándulas están distribuidas en la planta por las hojas, flores y se hallan particularmente concentradas en las cortezas de los frutos.

Propiedades.

Posee propiedades digestivas y tónicas, y debido a su contenido en bromo, resulta un buen sedante del sistema nervioso.

3.1.2.2.2. Naranja navelina (*Citrus sinensis*).

La naranja es originaria del sureste de China y norte de Birmania, aunque se la conoce en el área mediterránea desde hace aproximadamente 3.000 años. Desde su lugar de origen el cultivo se extendió a Japón y la India, llegando a Occidente por la Ruta de la Seda. Los árabes la introdujeron en el sur de España en el siglo X, aunque el naranjo dulce no fue conocido hasta 1450. A partir de ese momento fue extendiéndose por toda Europa, alcanzando gran popularidad durante la segunda mitad del siglo XV. Una singular mutación en 1820 en un huerto de naranjas dulces plantadas en un monasterio de Brasil condujo a la variedad "navel" donde se incluye la naranja navelina (Figura 3.6).

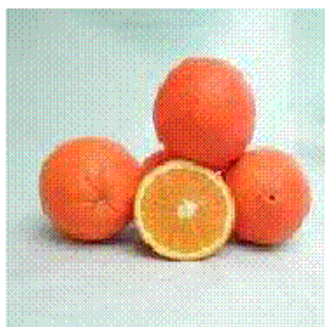


Figura 3.6.- Fotografía de la variedad de naranja utilizada en este estudio

Clasificación científica.

Fruto en baya del naranjo, árbol de hoja perenne. Perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Rosidae*, orden *Sapindales*, familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioidea*, género *Citrus* y especie *C. sinensis*.

Variedades.

Existen variedades amargas y dulces. En las dulces, destacan cinco grandes grupos que son las navel o naranjas de ombligo, blancas selectas, blancas comunes, sanguinas y tardías. En el grupo navel se incluyen las variedades navelina, navel y navelate. La mutación causa que en la naranja de ombligo se desarrolle parte de una segunda naranja en su base, resultando un híbrido con una corteza fácil de pelar y muy resistente al frío.

Requerimientos edafoclimáticos.

El factor limitante más importante es la temperatura mínima, ya que no tolera las inferiores a -3 °C. No tolera las heladas, ya que sufren tanto las flores y frutos como la vegetación, que pueden desaparecer totalmente. Presenta escasa resistencia al frío (a los 3-5 °C bajo cero la planta muere). No requiere horas-frío para la floración. No presenta reposo invernal, sino una parada del crecimiento por las bajas temperaturas, que provocan la inducción de ramas que florecen en primavera. Necesita temperaturas cálidas durante el verano para la correcta maduración de los frutos. Requiere importantes

precipitaciones (alrededor de 1.200 mm), que cuando no son cubiertas hay que recurrir al riego. Necesitan un medio ambiente húmedo tanto en el suelo como en la atmósfera. Es una especie ávida de luz para los procesos de floración y fructificación, que tienen lugar preferentemente en la parte exterior de la copa y faldas del árbol. Es muy sensible al viento, sufriendo pérdidas de frutos en precosecha por transmisión de la vibración. Necesitan suelos permeables y poco calizos y un medio ambiente húmedo tanto en el suelo como en la atmósfera. Se recomienda que el suelo sea profundo para garantizar el anclaje del árbol, una amplia exploración para una buena nutrición y un crecimiento adecuado. Los suelos deben tener una proporción equilibrada de elementos gruesos y finos, para garantizar una buena aireación y facilitar el paso de agua, además de proporcionar una estructura que mantenga un buen estado de humedad y una buena capacidad de cambio catiónico. No toleran la salinidad y son sensibles a la asfixia radicular.

Plagas y enfermedades.

Minador de los cítricos, mosca blanca, mosca de la fruta, pulgones, cóccidos o cochinillas, nematodo de los cítricos, gomosis, podredumbre de la base del tronco y cuello de la raíz, podredumbre de raíces absorbentes, *alternaria alternata* pv. *citri* y virus de la tristeza de los cítricos.

Composición.

Contiene fundamentalmente agua representada por un 85,7%, alto contenido en hidratos de carbono con un 8%, 0,2% de lípidos y 1% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. Destaca su aporte de vitamina C pero también es fuente de vitaminas A, B y E y minerales como potasio, hierro, cinc. Presenta un aporte interesante de luteína y zeaxantina, ácidos orgánicos como el ácido málico y el ácido cítrico, ácidos hidroxycinámicos como el ferúlico, cafeico y p-cumárico y flavonoides. El color de su piel y pulpa se debe a su contenido en carotenoides. Su piel contiene un alto número de vesículas cargadas de aceites esenciales.

Propiedades.

La vitamina C está implicada en la producción del colágeno, necesario para el crecimiento y reparación de células, mejora la cicatrización y sistema inmunitario, y al igual que los carotenos, posee actividad antioxidante. La luteína y la zeaxantina se asocian inversamente con el riesgo de padecer cataratas y degeneración macular. El ácido cítrico potencia la acción de la vitamina C, favorece la absorción intestinal del calcio y facilita la eliminación de toxinas como el ácido úrico. Los ácidos hidroxicinámicos también poseen actividad antioxidante y pueden inhibir la oxidación de las LDL. Los flavonoides presentan actividad antiinflamatoria, analgésica, hipolipidémica, antihipertensiva y diurética en animales de experimentación. En cuanto a la tangeretina y nobiletina, algunos estudios han sugerido que podrían tener un papel en la prevención del cáncer.

3.1.2.3. FRUTOS DE HUESO.

El término "fruto de hueso" implica el fruto de las especies del género *Prunus*. Se llaman así porque tienen una única y gran semilla encerrada en una cáscara o hueso muy duro. En este grupo de frutas se incluyen los melocotones, nectarinas, ciruelas, albaricoques y cerezas. Las exportaciones mundiales de frutas frescas de hueso sumaron más de $1 \cdot 10^{12}$ € en 2004, sin incluir el comercio interno de la UE. Los mayores exportadores de estas frutas son Estados Unidos, Chile, UE, Sudáfrica y Australia (USDA, 2005).

3.1.2.3.1. Albaricoque búlida (*Prunus armeniaca*).

El centro de diversidad del albaricoque es el noreste de China, cerca de la frontera rusa. De ahí se propagó en todo el oeste de Asia Central. El cultivo en China se remonta a 3.000 años. Los romanos los introdujeron en Europa en los años 70-60 a.C. a través de Grecia e Italia (Figura 3.7).



Figura 3.7.- Fotografía de la variedad de albaricoque utilizada en este estudio

Clasificación científica.

Fruto en baya del árbol albaricoquero. Perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Rosales*, familia *Rosaceae*, subfamilia *Prunoideae*, género *Prunus*, subgénero *Prunus* y especie *P. armeniaca*.

Variedades.

Destacan las variedades canino, nancy, paviot, maniquí y búlida. La variedad búlida es de fruto grande, surco poco profundo, color amarillo, hueso grande con quilla y carne dulce, jugosa y perfumada.

Requerimientos edafoclimáticos.

Es un árbol bastante rústico, propio de climas templados, aunque resiste bien los fríos invernales. Debido a lo temprano de su floración, puede sufrir por las heladas tardías en las localidades frías. Exige calor estival para la completa madurez de la fruta. Es resistente a la sequía. Se da mejor en exposiciones aireadas y soleadas de las mesetas y colinas que en las llanuras. En cuanto a suelo, poco exigente pero son mejores los suelos cálidos, secos, ligeros y profundos, no adaptándose a los suelos fuertes, fríos y húmedos. La permeabilidad del subsuelo tiene una gran importancia en este cultivo, pues todo estancamiento de agua es negativo para el albaricoquero. En tierras profundas toma un gran desarrollo y los frutos son de buena calidad. En laderas secas, los árboles se desarrollan menos, pero los frutos son más perfumados.

Plagas y enfermedades.

Pulgón verde del melocotonero, pulgón verde del almendro, pulgón ceroso, barrenillos, cochinilla perniciosa o piojo de San José, mosca de la fruta, oidio, cribado, monilia, roya, gomosis, chancro del melocotonero y de otros frutales de hueso y viruela.

Composición.

Contiene fundamentalmente agua representada por un 85,3%, alto contenido en hidratos de carbono con un 8,5%, 0,1% de lípidos y 0,9% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. Representa aporte de vitamina C y de minerales como potasio. Los tonos de su piel oscilan entre rojizos, blancos, amarillos o anaranjados, por los diferentes contenidos en carotenoides dependiendo de la variedad.

Propiedades.

El aceite de albaricoque se utiliza como demulcente de la piel y en Indochina se usa como antiséptico en enfermedades respiratorias. Las semillas se usan para tratar la tos y el estreñimiento en medicina china.

3.1.2.3.2. Melocotón catherina (*Prunus persica*).

El melocotonero es originario de China, donde las referencias de su cultivo se remontan a 3.000 años. Fueron llevados probablemente a Persia a través de las rutas comerciales, llegando a ser conocidos allí como fruta pérsica, de ahí el nombre "persica" o melocotón. Hacia el año 330 a.C., los melocotones llegaron a Grecia, y durante la Edad Media su cultivo se extendió por toda Europa. En el siglo XIX se constata que el melocotonero aparece ya como cultivo en expansión. A principios del siglo XX se empiezan a seleccionar genotipos de melocotoneros a partir de poblaciones procedentes de semilla y se fijan por medio de injerto (Figura 3.8).



Figura 3.8.- Fotografía de la variedad de melocotón utilizada en este estudio

Clasificación científica.

Fruto en baya del árbol melocotonero. También llamado también llamado presco o durazno. Perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Rosales*, familia *Rosaceae*, subfamilia *Prunoideae*, género *Prunus*, subgénero *Prunus* y especie *P. persica*.

Variedades.

El melocotonero es la especie de mayor dinamismo varietal dentro de los frutales, cada año aparecen numerosas novedades en el mercado y la renovación varietal es de las más rápidas. Debido a las características climáticas y de producción, la distribución varietal no solo varía con el tiempo sino también en las áreas de cultivo. Se clasifican en tres grandes grupos, de pulpa blanca, de pulpa amarilla y tipo pavía. En el último destaca la variedad catherina, de pulpa dura o semidura adherida al hueso.

Requerimientos edafoclimáticos.

Se trata de un frutal de zona templada no muy resistente al frío, su área de cultivo se extiende entre 30 y 40º de latitud. Las temperaturas mínimas invernales que el melocotonero puede soportar sin morir giran en torno a los -20 °C. A -15 °C en la mayoría

de las variedades se producen daños en las yemas de flor. Requiere de 400 a 800 horas de frío y los nuevos cultivares requieren incluso menos. La falta de frío puede ser un problema si la elección varietal es errónea. Las heladas tardías pueden afectarle, los órganos más sensibles a las mínimas térmicas son los óvulos, el pistilo y la semilla. Es una especie ávida de luz y la requiere para conferirle calidad al fruto. Sin embargo el tronco y las ramas sufren con la excesiva insolación, por lo que habrá que encalar o realizar una poda adecuada. Los diferentes patrones le permiten cualquier tipo de suelo, aunque prefiere suelos frescos, profundos, de pH moderado y arenosos. El melocotonero es muy sensible a la asfixia radicular, por ello hay que evitar los encharcamientos de agua y asegurar una profundidad de suelo no inferior a 1-1,5 m. También es muy sensible al contenido en caliza activa, que no debe ser superior al 2-3%, ya que puede producir clorosis férrica.

Plagas y enfermedades.

Anarsia, polilla oriental del melocotonero, mosca de la fruta, pulgón negro del melocotonero, pulgón harinoso del melocotonero, pulgón verde del melocotonero, pulgón cigarrero del melocotonero, piojo de san José, araña roja, abolladura, cribado, oidio, fusicocum, moniliosis, roya, amarillez del melocotonero, nemátodos y tumor o agallas del cuello y de las raíces.

Composición.

Contiene fundamentalmente agua representada por un 87,5%, alto contenido en hidratos de carbono con un 8,9%, 0,1% de lípidos y 0,8% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. El abanico de vitaminas hidrosolubles que contiene es amplio, sobre todo carotenos y vitamina C. Entre los minerales destaca el potasio, necesario para la actividad muscular. También destaca su riqueza en fibra. Tiene la piel y la pulpa de color rojizo-amarillento debido a los carotenoides. El tacto aterciopelado de su piel es muy característico, debido a la presencia de una fina capa de pelusa blanca, formada por cadenas de aminoácidos.

Propiedades.

La fibra mejora el tránsito intestinal. La vitamina A procedente de los carotenos contribuye con un buen estado de la visión, de la piel, cabello, mucosas, huesos, sistema inmunológico y tiene acción antioxidante.

3.1.2.4. UVA.

La viticultura representa hoy en día una de las actividades agrícolas de mayor importancia. Engloba el cultivo de uva de mesa y de vinificación. En 2004, el viñedo mundial alcanzó una superficie total de 7.923.220 Ha, cercana a la de 2003, pero comparándola con años atrás se hace patente una pausa del ritmo de crecimiento debido fundamentalmente a las medidas de incitación al arranque de la UE y de los arranques considerables efectuados por la ex URSS (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2004).

3.1.2.4.1. Uva tinta de vinificación (*Vitis vinifera* var. Monastrell).

Se considera que la vid es originaria de la zona del Mar Caspio, extendiéndose su cultivo a Europa y el antiguo Egipto mediante los comerciantes fenicios. El cultivo de la vid para la producción del vino es una de las actividades más antiguas de la civilización, probablemente contemporánea al comienzo de ésta. La mayoría de la uva cultivada proviene de la especie *V. vinifera* o vid común, natural de la Europa mediterránea y Asia central.

Clasificación científica.

Baya obtenida de la vid, arbusto leñoso trepador. Perteneciente al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Vitales*, familia *Vitaceae*, género *Vitis*, especie *V. vinifera* y variedad Monastrell.

Variedades.

Las principales variedades para vinificación en España se agrupan en variedades de uva blanca, de uva tinta y de uva tintorera. Las de uva tinta se caracterizan por una pulpa amarillo-verdoso y un hollejo azul-violáceo. Entre las variedades de uva tinta en nuestro territorio destacan: Bobal, Cabernet Sauvignon, Garnacha, Graciano, Jaén Tinta, Mazuela, Mencía, Merlot, Monastrell, Pinot Noir, Prieto Picudo y Tempranillo. La variedad Monastrell, característica de toda la zona levantina, predomina en las denominaciones de origen Jumilla, Yecla, Alicante y Almansa. La cepa de Monastrell es de porte erguido, con sarmientos gruesos, cortos y poco ramificados, sus racimos son pequeños-medianos y bastante compactos, con bayas esféricas de tamaño mediano, con un hollejo grueso azul-negro y pulpa carnosa y blanda (Figura 3.9). Es una variedad de gran rusticidad y elevada resistencia a la sequía y necesita buena insolación.



Figura 3.9.- Fotografía de la variedad de uva utilizada en este estudio

Requerimientos edafoclimáticos.

En invierno, las temperaturas mínimas que puede la vid aguantar son de hasta -20°C . Las temperaturas demasiado altas ($30-34^{\circ}\text{C}$), especialmente si van acompañadas de sequedad, viento caliente y seco, son temperaturas que queman hojas y racimos. Las temperaturas óptimas para el cultivo de la vid en sus distintas etapas de desarrollo son: apertura de yemas, $9-10^{\circ}\text{C}$; floración, $18-22^{\circ}\text{C}$; de floración a cambio de color, $22-26^{\circ}\text{C}$; de cambio de color a maduración, $20-24^{\circ}\text{C}$ y en vendimia, $18-22^{\circ}\text{C}$. En relación

con las lluvias, la distribución de éstas en el cultivo sería aproximadamente: durante la brotación, 14-15 mm; durante la floración, 10 mm; de la floración al cuajado de los frutos, 40-115 mm; entre el cuajado y la maduración, 80-100 mm y durante la vendimia, 0-40 mm. El granizo es el fenómeno climatológico más dañino para la viticultura.

La vid se adapta a muchísimos terrenos donde la materia orgánica es un componente fundamental del terreno para el buen crecimiento de la vid. El pH es de fundamental importancia para la elección del portainjerto.

Plagas y enfermedades.

Peronospora o mildiu, oidio, *botrytis cinerea*, araña roja, araña gallo, tortrix, filoxera, cigarrero y cigarra, polilla del racimo y podredumbre ácida.

Composición.

Contiene fundamentalmente agua representada por un 81,1%, un muy alto contenido en hidratos de carbono con un 15,6%, 0,3% de lípidos y 0,7% de proteínas, respecto de 100 g de porción comestible. Destacan dos tipos de nutrientes, los azúcares, principalmente glucosa y fructosa, y las vitaminas, principalmente el ácido fólico y la vitamina B6. Entre los minerales, el potasio es el más abundante mientras que el magnesio y el calcio están en cantidades moderadas. Se debe resaltar su contenido en antocianos, flavonoides y taninos ya que son sustancias de reconocidas propiedades dietoterapéuticas. En el hollejo o piel destacan los antocianatos, responsables del color rojizo y flavonoides, responsables del tono amarillo; polisacáridos y taninos. En sus semillas destaca su gran contenido en taninos.

Propiedades.

El ácido fólico interviene en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis material genético y la formación anticuerpos del sistema inmunológico. La vitamina B6

ayuda a mantener la función normal del cerebro, actúa en la formación de glóbulos rojos e interviene en el metabolismo de las proteínas. El potasio es necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso, para la actividad muscular normal e interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. Los antocianos, flavonoides y taninos son responsables del color, aroma y textura característicos de esta fruta y de sus actividades antioxidantes, que le confieren sus propiedades dietoterapéuticas en prevención cardiovascular, envejecimiento, procesos cancerígenos, etc.

3.1.3. ESTÁNDARES Y PRODUCTOS QUÍMICOS.

Se utilizaron estándares analíticos de los cuatro insecticidas, de pureza $\geq 98\%$, proporcionados por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). En las experiencias de campo, se aplicaron los formulados comerciales: Atominal 10 CE (piriproxifen 10% [EC] P/V), de Comercial Química Massó S.A. (Barcelona, España); Cascade (flufenoxuron 10% [DC] P/V), de Basf Agro BV (Wädenswil/Au, Suiza); Match 5 CE (lufenuron 5% [EC] P/V) de Syngenta Agro S.A. (Madrid, España) e Insegar (fenoxicarb 25% [WG] P/P), de Syngenta Crop Protection AG (Basilea, Suiza).

Se empleó sulfato sódico anhidro, de pureza 99%, de Panreac (Barcelona, España); bicarbonato sódico, con pureza de 99%, de Scharlau (Barcelona, España); pepsina porcina de mucosa gástrica, de Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, USA); disolución de 4 g de pepsina en 25 ml de HCl 0,10 M; ácido clorhídrico al 37%, de Scharlau (Barcelona, España); sales biliares, de Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, USA); pancreatina de páncreas porcino, de Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, USA); disolución de 0,4 g de pancreatina, 2,5 g de sales biliares y 0,84 g de bicarbonato sódico en 100 ml de agua milli-Q; hidróxido sódico, con 98% de pureza, de Scharlau (Barcelona, España); formiato amónico, de pureza 95%, de Fluka (Buchs, Suiza); sulfato magnésico anhidro, de pureza 97%, de Fluka (Buchs, Suiza); cloruro sódico, de pureza 99,5%, de Fluka (Buchs, Suiza); citrato disódico sesquihidratado, con pureza de 99%, de Aldrich (Milwaukee, USA) y citrato trisódico dihidratado, con pureza de 99%, de Sigma (St. Louis, USA).

Los disolventes empleados fueron: acetonitrilo de calidad cromatografía líquida en gradiente, de Scharlau (Barcelona, España); agua milli-Q, procedente de un sistema Millipore de Purificación Pak (Billerica, USA); acetona y diclorometano para análisis de residuos, de Panreac (Barcelona, España); y éter de petróleo 40-60 °C y dimetiltercbutileter para análisis de residuos, de Merck (Whitehouse Station, USA).

En el proceso de extracción se usaron filtros de papel separador de fases de 150 mm de diámetro, de Filtros Anolia (Barcelona, España); y en la preparación de los congelados y alimentos de cuarta gama, bolsas de poliamida/polietileno (PA/PE) de Cryovac Division (Elmwood Park, USA)

3.1.4. INSTRUMENTACIÓN.

La aplicación de productos fitosanitarios se realizó con mochila, lanza y boquilla modelo Maruyama MS073D (Auburn, USA). Los equipos analíticos utilizados fueron dos cromatógrafos líquido-líquido HPLC, series 1100, de Hewlett-Packard (Palo Alto, USA) con bomba cuaternaria, autoinyector y compartimiento termostatzado de la columna. Uno acoplado a un detector UV fotodiodos (DAD), software HPChemstation revisión A.10.02 y una columna cromatográfica C8 en fase reversa, Zorbax Eclipse XDB, 4,6 x 150 mm, de 5 µm de tamaño de partícula, todo de Agilent (Palo Alto, USA). El otro, acoplado a un detector de masas (MSD) de trampa de iones, software HPChemstation revisión A.10.02 y una columna cromatográfica C18 en fase reversa, Zorbax SB, 2,1 x 50 mm, de 3,5 µm de tamaño de partícula, todo de Agilent (Palo Alto, USA).

Se utilizaron los siguientes aparatos: Trituradora de alimentos, modelo Cyclo-trol, de Oster (Shelton, USA); homegeneizador de alta velocidad, Polytron, de Kinematica AG (Lucerna, Suiza); baño de ultrasonidos, de P-Selecta (Barcelona, España); rotaevaporador, de Büchi (Flawil, Suiza) acoplado a un baño de agua Univeba-400 de P-Selecta (Barcelona, España) y bomba de vacío V-500, de Büchi (Flawil, Suiza); centrífuga Heraeus Cristo (Osterode, Alemania); sellador de bolsas con calor y vacío, de Talleres Guasch (Barcelona, España); Biogon de la División de Gases de Linde (Pullach, Alemania); congelador

CFZ30JC, de Zanussi (Luton, Reino Unido); cámara de refrigeración semi industrial con control de temperatura; baño con agitación y control de temperatura, de Julabo (Seelbach, Alemania); pH-metro Crison (Barcelona, España); micropipetas para volúmenes de 10-1000 μ l y 1-10 ml y puntas adecuadas, de Rainin (Oakland, USA); balanza analítica, capaz de medir hasta 0,1 mg, de Sartorius AG (Goettingen, Alemania); granatario capaz de medir hasta 3000 g con precisión de 0,1 g, de Gram Precision (Barcelona, España); dispensadores de volumen de 1-10 ml y 2,5-25 ml, de Brand (Wertheim, Alemania). También se utilizaron: viales ámbar de 1,5 ml, para autoinyector, 32 x 11,6 mm, con cápsula y septum, y viales ámbar de 20 ml con tapón a rosca para conservar los extractos, todos de Ziemer GmbH (Mannheim, Alemania); membrana de diálisis, con tamaño de poro de 12.000 Da, procedente de la casa Sigma (St. Louis, USA); cartuchos Sep-Pack® megabondelut-NH₂, de Varian (Harbor City, USA); equipo para SFE, de Supelco (Bellefonte, USA), acoplado a bomba de vacío Vaccubrand (Wertheim, Alemania) y tubos de centrifuga de polipropileno, 114 x 28 mm, de 50 ml, con tapón a rosca y de un único uso, de Sarstedt (Nümbrecht, Alemania).

3.2. MÉTODOS.

En esta apartado, se describen las etapas de los diferentes métodos de extracción y análisis empleados para los plaguicidas y alimentos seleccionados, la validación de la metodología analítica y el control de calidad realizado en el laboratorio. Finalmente, se explica la interpretación de las cinéticas de disipación de los residuos, cómo estimar el riesgo para el consumidor mediante ensayos de biodisponibilidad *in vitro* y la realización de modelos de cálculo de consumo humano.

En la revisión bibliográfica realizada, encontramos métodos que incorporan cromatografía de gases (CG) para el análisis de fenoxicarb y piriproxifen (Natangelo et al., 1999; Štěpán et al., 2004; Ochiai et al., 2005). Sin embargo, es conocido que las benzoilfenilureas, flufenoxuron y lufenuron, no pueden ser analizadas directamente por esta técnica, debido a que son termolábiles y por tanto se degradan por las altas

temperaturas que se alcanzan para la volatilización de la muestra (Anastassiades et al., 2001). No obstante, en publicaciones recientes, se pueden encontrar autores que las identifican y cuantifican, mediante la derivatización previa a la inyección en cromatografía de gases (Moltó y Berrada, 2004; Hirahara et al., 2005; Kedar et al., 2008). Asimismo, se ha estudiado la derivatización postcolumna de las benzoilfenilureas mediante inducción fotoquímica, para detectar por fluorescencia los compuestos previamente separados por cromatografía líquida en muestras de hortalizas como pepino y tomate (Martínez-Galera et al., 2001; Gil García et al., 2004). Existen también referencias a métodos enzimáticos (ELISA o EIA) para la detección y determinación semicuantitativa de estos plaguicidas en muestras de alimentos de origen vegetal (Wang et al., 1998, 1999; Szurdoki et al., 2002; Le et al., 2003). En nuestro trabajo, se ha optado por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como técnica analítica que presenta el mejor balance coste-eficacia y que permite el análisis simultáneo de los cuatro plaguicidas.

En los trabajos publicados recientemente, se pueden encontrar diversos métodos de extracción y análisis para los plaguicidas y alimentos seleccionados. Existen métodos para la determinación de fenoxycarb y piriproxifen por cromatografía líquida y detector masas-masas (CL-MS/MS) en diversas frutas (naranjas, uva, manzanas, peras y fresas) y en vino (Bicchi et al., 1990; Wang et al., 2000; Soler et al., 2004). El método desarrollado por Andersson y colaboradores, basado en extracción líquido-líquido con acetato de etilo, ha sido utilizado y adaptado en distintas ocasiones para el análisis de flufenoxuron y lufenuron en hortalizas como pimiento, pepino, calabacín, lechuga y tomate; y frutas como manzanas y peras, con identificación y cuantificación por CL con detectores de DAD y MS(MS) (Balnova, 1998; Tsiropoulos et al., 1999b; Agüera et al., 2004; Garrido Frenich et al., 2004; Andersson et al., 2006; Mol et al., 2007; Pihlström et al., 2007). Otros autores han determinado flufenoxuron y lufenuron mediante HPLC-DAD y CL-MS con extracción líquido-líquido usando acetona y mezclas de diclorometano:éter de petróleo, basándose en el método de Luke, en naranja y albaricoques (Gamón et al., 1998; Hiemstra et al., 1999; Valenzuela et al., 2000). Pero también se ha determinado flufenoxuron en albaricoque mediante un método que incluía una extracción en fase sólida (SPE) con acetonitrilo, basado en el método de Mills y análisis por CL-MS (Zrostlikova et al., 2003). El método

QuEChERS, en su versión de utilización de citratos, ha sido también recientemente publicado para el análisis de los cuatro reguladores de crecimiento en pepino, naranja, uva y productos procesados como vino tinto; analizándose piriproxifen tanto por CG-MS(MS) como por CL-MS(MS) y lufenuron, flufenoxuron y fenoxicarb por CL-MS(MS) (Payá et al., 2007a). Anteriormente, de los RCIs y alimentos procesados estudiados en esta Memoria, sólo se extraían lufenuron y flufenoxuron en vino, utilizando SPE y se analizaban por HPLC-DAD (Miliadis et al., 1999). Además, algunos investigadores compararon procedimientos basados en dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), SPE y extracción por absorción en barra agitadora (SBSE), en combinación con cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC-DAD), HPLC-DAD y CL-MS para el análisis de piriproxifen y flufenoxuron en lechuga, uva y naranja (Valenzuela et al., 1999; Blasco et al., 2002; Juan-García et al., 2005). Finalmente, en los últimos años se han desarrollado métodos basados en SPE y determinación por CG-MS o CL-MS (Kaihara et al., 2000; Blasco et al., 2005; Garrido Frenich et al., 2005; Ono et al., 2006).

En este trabajo, se ha empleado una metodología basada en la extracción líquido-líquido con acetonitrilo y posterior purificación para hortalizas, y en la extracción en fase sólida, requiriendo mayores volúmenes de disolventes como acetona y diclorometano:éter de petróleo, de menor polaridad, para cítricos y frutos de hueso. La determinación se realizó mediante detector de fotodiodos DAD. En uva y vino, se utilizó el moderno método QuEChERS con la adición de sales tampón y análisis por CL-MS. En todos los casos, los productos frescos, procesados y procedentes de los ensayos de biodisponibilidad *in vitro*, fueron extraídos y analizados siguiendo el protocolo del correspondiente grupo de alimentos.

Qualquier método analítico debe ser validado antes de ser utilizado rutinariamente, es decir, deben realizarse las comprobaciones que aseguren que el método es científicamente correcto en las condiciones en que va a ser aplicado. En el proceso de validación se comprueban sus características técnicas en cuanto a selectividad y especificidad, sensibilidad, linealidad, límite de detección, límite de determinación o

cuantificación, exactitud y precisión, teniendo como referencia guías internacionales y/o directivas comunitarias.

Entre las directivas comunitarias, destaca la norma ISO/IEC 17025:2005, actualmente en vigor. En ella se especifican los requisitos generales para llevar a cabo ensayos y/o calibraciones, incluyendo el muestreo, mediante el uso de métodos normalizados, métodos no estandarizados y métodos desarrollados por el laboratorio. Es aplicable a todas las entidades que ejecuten ensayos y/o calibraciones y quieran poseer la acreditación de cumplimiento de esta norma. Los clientes del laboratorio, las autoridades reguladoras y los organismos de acreditación pueden usarla en la confirmación o el reconocimiento de la competencia de los laboratorios (ISO, 2005).

Entre las guías internacionales, se pueden citar las elaboradas por la DG SANCO, la Asociación Oficial de Químicos Analíticos Internacional (AOAC International), EURACHEM y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Hill y Reynolds, 1999; Alder et al., 2000). Actualmente, la más relevante es la denominada "guía SANCO". Esta guía puede ser considerada como un complemento de la norma ISO/IEC 17025:2005 y recoge recomendaciones para la realización de análisis fiables de residuos de plaguicidas en productos alimenticios. Describe detalladamente el proceso de validación analítica de un método y los requerimientos en el control de calidad analítico con los objetivos de sustentar la validez de los datos utilizados para comprobar el cumplimiento de los LMR, la adopción de medidas coercitivas en caso contrario o la evaluación de la exposición de los consumidores a los plaguicidas en la UE. Sin embargo, en caso de que un método vaya a ser acreditado, antes de que se generen datos de validación, se recomienda consultar el órgano de acreditación correspondiente. Los diferentes organismos de acreditación pueden requerir diferentes criterios para la validación de métodos (DG SANCO, 2007).

Los procedimientos correspondientes a todas estas guías van encaminados al control de la calidad en el laboratorio, que ha de ser implantado de acuerdo a las normas internacionales. En esta Memoria, los métodos analíticos fueron validados atendiendo los criterios de la norma ISO/IEC 17025:2005 y las recomendaciones de requisitos de

validación y control de calidad analítico de las guías SANCO disponibles en ese momento (DG SANCO, 2004a, 2006, 2007).

La metodología analítica validada fue la herramienta para alcanzar los fines centrales de esta tesis, el estudio de la persistencia, degradación y biodisponibilidad de los residuos en los alimentos seleccionados y sus consecuencias en la exposición humana.

Actualmente, a los estudios de persistencia y degradación se les conoce como estudios de disipación de residuos, ya sea en campo, procesado alimentario o incluso durante el almacenamiento de los alimentos. Hay diferentes técnicas para estudiar estos procesos. Algunos autores han trabajado con isótopos como marcadores de la molécula del plaguicida (Zhang et al., 1991; Gözek et al., 1999), pero mayoritariamente se realizan por determinación de residuos. Con estos ensayos se intenta buscar modelos asociados a las cinéticas que siguen los residuos en la matriz estudiada. Esto sirve para fijar los LMRs, examinar si los plazos de seguridad responden a las situaciones habituales de la agricultura, conocer el comportamiento del plaguicida y predecir sus residuos en los alimentos. Las cinéticas de disipación se calculan mediante métodos informáticos comunes. Pero, dada su complejidad ya que en ellas influyen la fisicoquímica del compuesto y la variabilidad del medio natural, se ha llegado incluso a tratarlas con aplicaciones de programas como "Backpropagation Neural Network" (Domine et al., 1993) y modelos tipo "Root Function" (Martínez Galera et al., 2003), basados en una interrelación larga y compleja de factores dependientes del plaguicida y del medio ambiente, con el fin de obtener cinéticas de orden superior, aunque se encuentran en un estadio inicial para el campo de la Química Agrícola. Finalmente, se ha encontrado que la mayoría de las cinéticas de disipación se ajustan a un modelo de primer orden (Aguilera et al., 1999; Kontou et al., 2004) o de pseudo primer orden (Cabras et al., 2000a; Arrebola et al., 2001), calculadas por medios informáticos convencionales.

Los estudios de disipación en campo se realizan mediante ensayos supervisados, registrando las condiciones ambientales, el marco de plantación, características del cultivo, situación de la parcela experimental, características de aplicación de los formulados y el

muestreo escogido (FAO, 1990). Por ley, estos estudios son obligatorios para registrar un producto fitosanitario y se deben realizar en condiciones de BPA (Parlamento Europeo y Consejo Europeo, 2005). Sin embargo, es conocido que no siempre se aplican estas normas, con lo que el residuo que ingresa en la cadena alimentaria puede ser más alto de lo previsto, encontrándonos con una situación de práctica agrícola crítica. Además, como las condiciones ambientales de los ensayos influyen tanto en la cinética de disipación de los residuos en campo, se requiere que los ensayos supervisados bajo BPA sean realizados en los distintos ámbitos agrícolas típicos de producción de un cultivo, de manera que se pueda asegurar que el LMR y el plazo de seguridad (PS) establecidos representan la realidad. Por tanto, parece obligado evaluar minuciosamente sus consecuencias para el consumidor.

En la revisión bibliográfica realizada, se pueden encontrar algunos autores que han definido el comportamiento de diversos plaguicidas en cultivos de hortalizas y frutas bajo condiciones de BPA (Cavanna y Molinari, 1998; Caboni et al., 2002; Antonious, 2004; Singh y Battu, 2005; Tsiropoulos et al., 2005; Rabølle et al., 2006) pero muy pocos lo han hecho en situaciones bajo CPA (Angioni et al., 2005). Para los RCI, apenas se encontraban referencias científicas para experiencias realizadas bajo BPA (López-López et al., 2003a) y ninguna para trabajos bajo CPA, antes de que se publicaran los resultados de esta tesis (Payá et al., 2007b, 2007c, 2007d).

Los estudios de disipación durante el procesado alimentario son de vital importancia, ya que no es igual el nivel de residuos que llega al consumidor con la mayoría de los productos agrícolas transformados que cuando éstos se consumen en fresco. Se ha observado una eliminación significativa de diversos residuos de plaguicidas durante la elaboración industrial y casera, por lo que se deben tener en cuenta los factores de transferencia o transformación para conocer el residuo final que llega al consumidor, en muchos casos muy por debajo del LMR del producto. Se han encontrado referencias en este sentido, para preparados tan distintos como infusiones, aceite de oliva, zumos, puré de frutas y verduras, mermeladas, frituras, vino, conservas, pan, etc., aunque no se encontraron referencias para los RCI estudiados (Mergnat et al., 1995; Burchat et

al., 1998; Abou-Arab, 1999; Navarro et al., 1999, 2000; Soliman, 2001; Cabras et al., 2000a, 2000b, 2001, 2002; Christensen et al., 2003; Rasmussen et al., 2003; Kumar et al., 2004, 2005; Pugliese et al., 2004; Tewary et al., 2004, 2005; Fernández et al., 2005a, 2005b; Kumar et al., 2005; Ruiz et al., 2005; Sharma et al., 2005; De Melo et al., 2006; Guardia et al., 2006, 2007; Oliva et al., 2007a, 2007b).

Los estudios de disipación en el periodo poscosecha o de almacenamiento de los productos frescos y elaborados es igualmente importante, ya que las diferentes condiciones de conservación pueden afectar en la degradación de los residuos de plaguicidas (Marín et al., 2003; Ticha et al., 2008). Para el caso de los RCIs, sólo se ha encontrado una referencia que estudiaba este aspecto en harina de trigo para lufenuron (Ahire et al., 2008).

Para juzgar qué capacidad tienen los plaguicidas de afectar al consumidor a través de los alimentos, se debe conocer su biodisponibilidad, ya que ésta "mide el acceso fisicoquímico de un tóxico a los procesos biológicos de los organismos" (US EPA, 2006). Las plaguicidas pueden ingresar en el organismo humano por vía oral, dérmica o pulmonar. En esta etapa, comienza el proceso conocido como "ADME" o absorción, distribución, metabolismo y eliminación del xenobiótico en un organismo. La absorción es por tanto la barrera que debe superar el plaguicida para llegar a su diana celular y la biodisponibilidad el proceso que mide esa capacidad de superación. En la dieta que contiene residuos de plaguicidas, es fundamental por tanto determinar la biodisponibilidad vía oral de estos productos para conocer su absorción y poder extraer consecuencias toxicológicas para el consumidor. Los trabajos encontrados sobre esta cuestión se pueden agrupar en aquellos que la estudian mediante métodos probabilísticos, teniendo en cuenta las relaciones estructura-actividad del compuesto (Blaauboer, 2002, 2003; Gubbels-van Hal et al., 2005; Gülden y Seibert, 2005; Valcke et al., 2005; Gülden et al., 2006); los que trabajan con métodos *in vivo* utilizando animales de experimentación o incluso monitorizando a voluntarios (Nolan et al., 1984; Sabbioni y Neumann, 1990; Woollen, 1993; Timchalk et al., 2002) y los que trabajan con métodos *in vitro* empleando tejidos celulares o modelos de laboratorio (Gad, 2000; Poet et al., 2003). Sin embargo, muy

pocos han considerado la influencia de los alimentos en la biodisponibilidad oral de los plaguicidas, y de éstos la mayoría la han estudiado en animales (Shahamat et al., 1987; Sandermann et al., 1990, 1992; Mathew et al., 1998). En concreto, para los reguladores de crecimiento, sólo se han publicado trabajos relacionados con su distribución, metabolismo y eliminación en mamíferos como perros y gatos y roedores como ratas y ratones pero no se ha estudiado la absorción o la biodisponibilidad oral de este familia de compuestos (Mackichan y Hink, 1993; Matsunaga et al., 1995; Yoshino et al., 1995 y 1996; Grant, 1996).

Otro aspecto importante a valorar, relacionado con la absorción vía oral, es la exposición a los residuos de plaguicidas con la dieta. Se ha calculado tradicionalmente usando métodos deterministas, mediante estimaciones puntuales de la ingesta. Sin embargo, los inconvenientes y limitaciones de este enfoque han sido reconocidos a escala internacional, aumentando el interés por el uso de métodos probabilísticos o estocásticos para su cálculo. Una de las organizaciones que ha reconocido el empleo de los métodos probabilísticos es el *Códex Alimentarius* en su Comité sobre Residuos de Plaguicidas (CCPR, 2001). En la actualidad, hay autores que prefieren calcular la ingesta de residuos de plaguicidas a partir de estimaciones puntuales de dietas (Moschandreas et al., 2002) pero mayoritariamente los expertos se decantan por métodos probabilísticos para su cálculo (Hamey, 2000; Gibney et al., 2003; Gilsenan et al., 2003; Leclercq et al., 2003; López et al., 2003b; Paulo et al., 2005; Ferrier et al., 2006; Allcroft et al., 2007; van der Voet y Slob, 2007).

En este trabajo, se estudia el efecto matriz que podían ejercer los patrones y los distintos productos agrícolas, frescos y procesados sobre la biodisponibilidad oral de estos plaguicidas, mediante un protocolo de ensayo *in vitro*, que previamente había demostrado tener una buena correlación con los procesos biológicos (Miller et al., 1981; Schricker et al., 1981; Gil-Izquierdo et al., 2002). Los estudios de exposición se realizaron teniendo en cuenta las encuestas de consumo en España del Instituto Nacional de Estadística y las realizadas por nosotros en población de diferentes edades de la Región de Murcia.

3.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de campo y procesado se trituraron finamente con el fin de obtener una muestra analítica homogénea con tamaño de partícula reducido, y así maximizar la superficie de contacto entre extractante y plaguicida y garantizar una mayor eficacia del procedimiento de extracción. Se trituraron las partes de los cultivos indicadas el Anexo I del R.D. 280/1994 (BOE, 1994). La trituración se realizó a temperatura ambiente en todos los casos. Las muestras de laboratorio en los ensayos de campo fueron obtenidas mediante la técnica de cuartos opuestos a partir de la muestra total (2 kg). Para su trituración, a las unidades de lechuga se les eliminó la tierra, al pimiento se le quitaron las pepitas y el pedúnculo, a los frutos de hueso se les separó el hueso y el pedúnculo, la uva se trituró sin raspón ni cáliz y los cítricos, calabacín y pepino fueron triturados sin pedúnculo. El procedimiento de homogeneización aseguró que las sucesivas submuestras fuesen representativas de la anterior. Las porciones analíticas fueron extraídas después de la trituración. Alícuotas de los extractos fueron conservadas en congelador a -20 ± 2 °C. Su descongelación, en el caso necesario, se realizó a 15 ± 2 °C.

3.2.2. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN.

Los procedimientos de extracción se eligieron considerando la composición fundamental de los alimentos, sus pigmentos naturales y ceras, y las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas (Otterstätter, 1999; Souci et al., 1999; Tomlin, 2005; USDA, 2007b). Los cuatro plaguicidas coinciden en que poseen un K_{ow} de valor intermedio (4,07-5,37), lo que determina su carácter moderadamente apolar a la hora de la extracción. En cambio, los alimentos, a pesar de que están clasificados de una manera general en las categorías de "alto contenido en agua" (hortalizas y frutos de hueso) y "alto contenido en ácidos" (cítricos y uva) por la Guía SANCO, poseen características diferenciadoras que determinan un procedimiento de extracción u otro (DG SANCO, 2007).

3.2.2.1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO EN HORTALIZAS.

Las cuatro hortalizas contienen mayoritariamente agua (92,2-96,8%) y muy pocos lípidos (0,1-0,4%), proteínas (0,6-1,6%) e hidratos de carbono (1,1-2,1%). Sin embargo, tienen una gran carga de pigmentos, sobre todo clorofilas, que son liposolubles. Esto exige una buena separación en la extracción, de manera que los pigmentos sean extraídos lo menos posible en la fase orgánica y haya una buena partición de ésta con la fase acuosa, con proteínas, azúcares, vitaminas y minerales solubilizados. Por ello, se desarrolló un método de micro-extracción líquido-líquido online, cuyo esquema de procedimiento se muestra en la Figura 3.10.

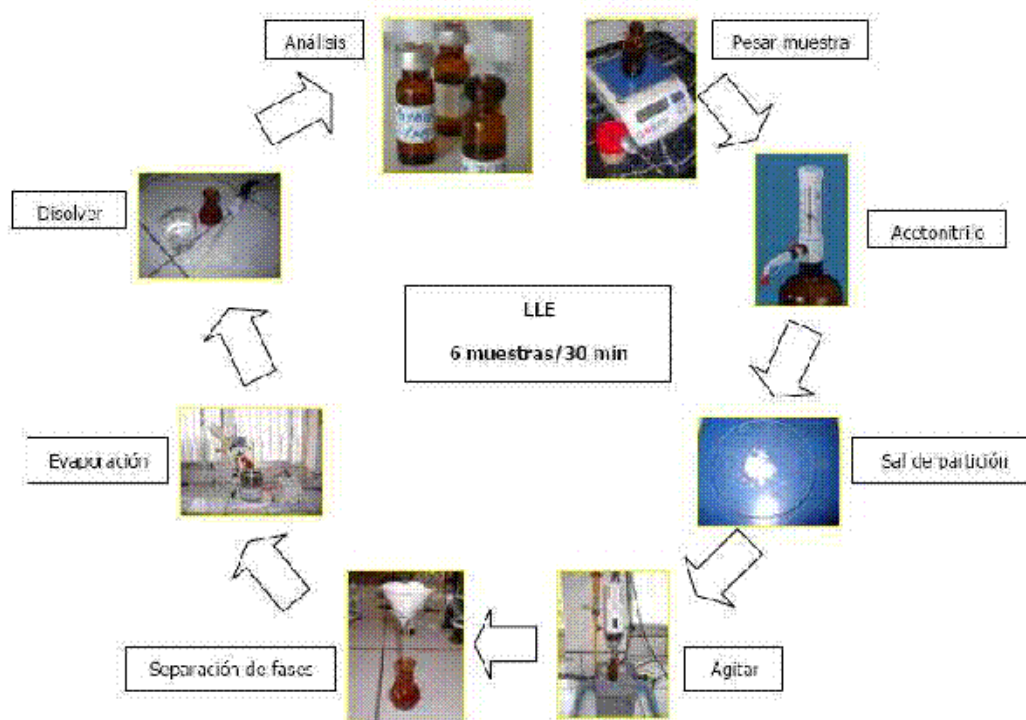


Figura 3.10.- Diagrama de la extracción en hortalizas

La extracción se realizó a partir de 10 g de muestra. Se adicionaron 30 ml de acetonitrilo, seleccionándose este disolvente por su alta polaridad además de su compatibilidad con las fases móviles de HPLC. Se añade 1 g de sulfato sódico anhidro, que

absorbe el agua residual de la muestra, aumenta la partición y consigue una extracción más eficaz, sin ser necesaria una fase de purificación. Posteriormente, la muestra se homogeneizó durante 3 min a velocidad media, se filtró a través de un filtro separador de fases y se evaporó la fase orgánica mediante un rotaevaporador a vacío a 30 °C. El extracto seco se disolvió en acetonitrilo:agua 50:50 (V:V) con una concentración de matriz de 1 g/ml.

3.2.2.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN CÍTRICOS Y FRUTOS DE HUESO.

La mayor dificultad en la extracción de los cítricos es el alto carácter lipofílico de los aceites esenciales de su corteza. Para ambos tipos de fruta, se debe tener en cuenta el alto contenido en carotenoides y pigmentos liposolubles. En su parte comestible, todos poseen un alto contenido en agua (85,3-87,5%), pocos lípidos (0,1-0,3%) y proteínas (0,7-1%) y un moderado contenido en hidratos de carbono (0,1-8,9%). Es necesario por tanto, una buena partición con la parte acuosa y una limpieza profunda del extracto. En consecuencia, se desarrolló una extracción en fase sólida, cuyo esquema se representa en la Figura 3.11.

A 15 g de muestra se le añadieron 30 ml de acetona y se homogeneizó a una velocidad media durante 30 s. A continuación, se añadieron 60 ml de diclorometano:éter de petróleo 50:50 (V:V) y se homogeneizó durante 60 s a la misma velocidad. Posteriormente se llevó a cabo la fase de purificación. Para ello, los cartuchos de grupos aminopropilo se acondicionaron con 15 ml de hexano. Después, el cartucho se cargó con 25 ml del extracto llevado a sequedad en el rotaevaporador a vacío (30 °C) y disuelto en 2 ml de hexano, y se realizaron una serie de eluciones. Una primera elución tuvo lugar con 9 ml de hexano y 8 ml de hexano:dimetiltercbutileter 80:20 (V:V). La segunda elución se realizó con 5 ml de acetonitrilo:agua 50:50 (V:V). Piriproxifen fue obtenido en la primera elución y fenoxicarb, lufenuron, flufenoxuron en la segunda. El extracto seco se disolvió en acetonitrilo:agua 50:50 (V:V) con una concentración de matriz de 1 g/ml.

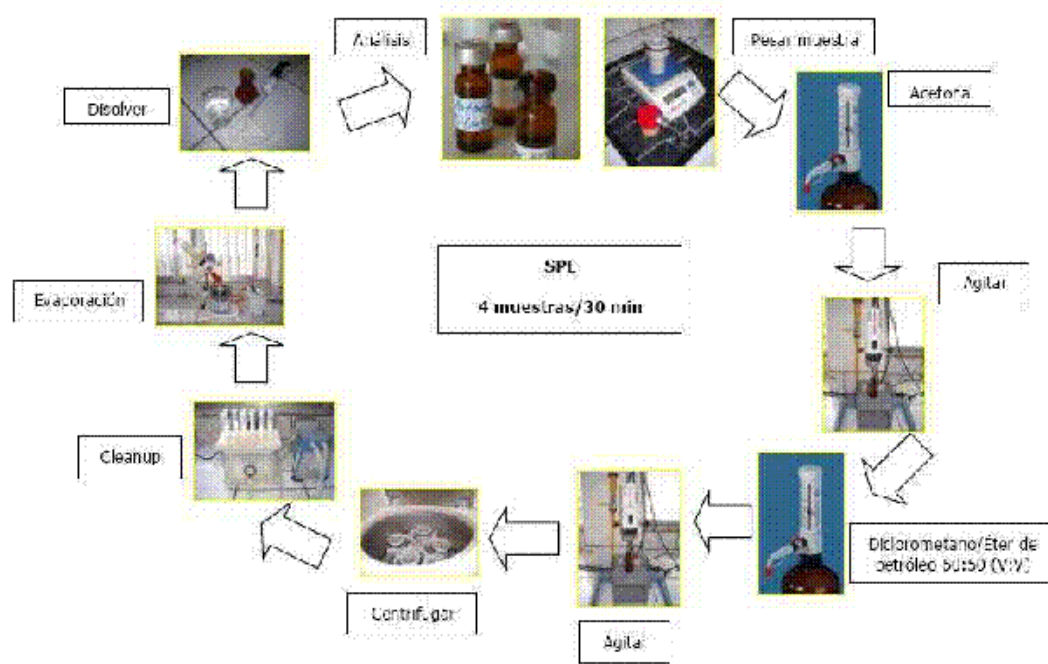


Figura 3.11.- Diagrama de la extracción en cítricos y frutos de hueso

3.2.2.3. MÉTODO QUECHERS EN UVA TINTA DE VINIFICACIÓN.

La uva contiene una alta proporción de agua (81,1%) y de hidratos de carbono (15,6%), en comparación con otras frutas. Esto implica que la partición de la fase orgánica y acuosa debe ser notoria. En cambio, su contenido en lípidos (0,3%) y proteínas (0,7%) no es alto. No es necesario por tanto purificación del extracto.

La extracción y partición en esta matriz se llevó a cabo de acuerdo con el método QuEChERS en su versión de utilización de sales tampón de citratos (Anastassiades et al., 2003, 2007). En la Figura 3.12, se muestra un diagrama esquemático del procedimiento.

La extracción se realizó a partir de 10 g de matriz congelada en tubos de centrifuga de 50 ml, de polipropileno. Se añadieron 10 ml de acetonitrilo. El tubo se cierra y se agita vigorosamente durante 1 min a mano. Para inducir la separación de fases y la partición, a la suspensión anterior se añade una mezcla de sales tampón y de partición, que consta de

4 g de sulfato de magnesio anhidro, 1 g de cloruro de sodio, 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado y 1 g de citrato trisódico dihidratado. El tubo se cierra y se agita enérgicamente durante 1 min a mano. A continuación se centrifuga a 3500 rpm durante 5 min. El extracto obtenido se puede analizar directamente.

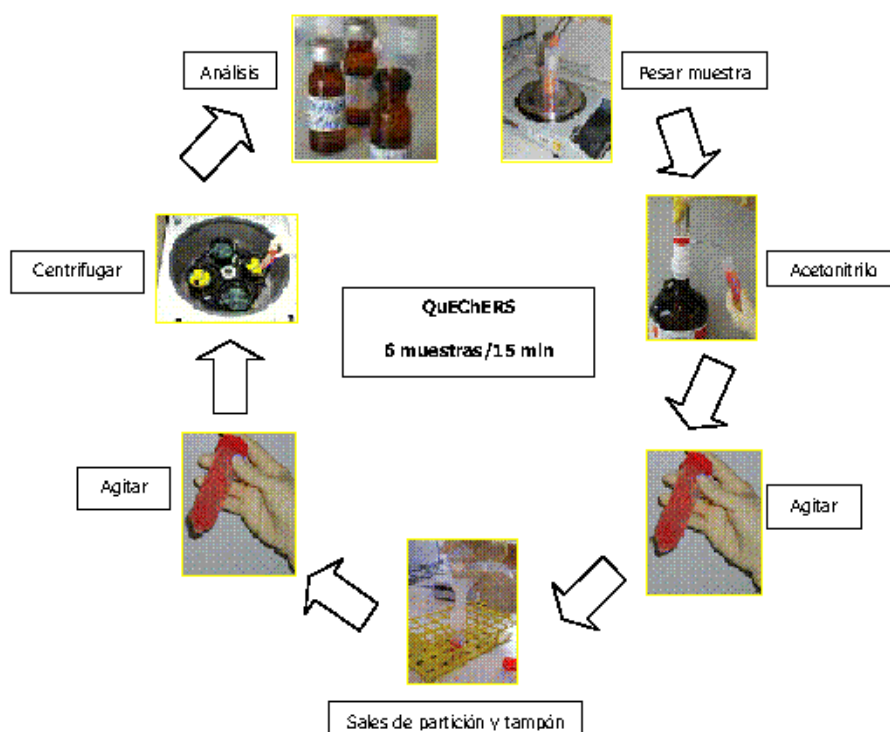


Figura 3.12.- Diagrama del método QuEChERS empleado
(Fuente: adaptación de www.springerlink.com)

3.2.3. ANÁLISIS DE RESIDUOS.

Los aspectos que se deben tener en cuenta en el desarrollo de un método analítico han sido definidos por autoridades y organismos internacionales, por ejemplo la Comisión Europea, la US EPA y AOAC International, en diferentes ocasiones. Recogen, entre otros, el establecimiento de las matrices que se van a analizar, definición de los analitos, instrumentos, reactivos y disolventes, preparación de la muestra, comentarios sobre estabilidad y efecto matriz, cromatogramas, espectros, precauciones y referencias (US EPA, 1982; AOAC International, 1998; DG SANCO, 2000, 2004b).

3.2.3.1. CL-DAD EN HORTALIZAS, CÍTRICOS Y FRUTOS DE HUESO.

Se utilizó una fase móvil en gradiente de dos componentes, A: acetonitrilo y B: agua. Se realizó a un flujo de 1 ml/min. El gradiente comenzó con 50% A (50% B), llegó hasta 70% A (30% B) en 7 min y se mantuvo en estas condiciones durante 8 min. El volumen de inyección fue 20 µl y la columna cromatográfica se encontraba a 25 °C. La longitud de onda del detector fue seleccionada en 230 nm con una anchura de banda de 16 nm.

3.2.3.2. CL-MS EN UVA TINTA DE VINIFICACIÓN.

Se utilizó fase móvil en gradiente, con dos componentes, A: formiato amónico 5 mM en agua y B: formiato amónico 5 mM en metanol, a un flujo de 0,3 ml/min. El gradiente comenzó con 100% de A, alcanzó gradualmente 60% A (40% B) en 3 min, posteriormente 10% A (90% B) a los 22 min, manteniéndose esta proporción durante 8 min y luego se restauraron las condiciones iniciales en 0,1 min y se mantuvo así hasta los 38 min después de la inyección. La temperatura de la columna fue de 40 °C y el volumen de inyección de 5 µl. La detección por MS se realizó en MRM (multiple reaction monitoring) y la fuente fue ESI (electrospray ionization) en modo positivo. El voltaje de ionización fue 5500 V y el gas nebulizador fue aire sintético a 40 psi. La evaporación de disolventes en la fuente tuvo lugar con la asistencia de un gas de secado que fue aire sintético a 350 °C.

3.2.4. VALIDACIÓN ANALÍTICA.

La validación de un método analítico se define como "el proceso de caracterizar el rendimiento que se espera de un método en términos de su alcance, especificidad, exactitud (sesgo), sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad. Parte de la información sobre todas las características, excepto la reproducibilidad, debe establecerse antes del análisis de las muestras, mientras que los datos sobre la reproducibilidad y extensiones de alcance pueden ser producidos a partir del control de calidad analítico, durante el análisis de las muestras. Siempre que sea posible, la evaluación de la exactitud (sesgo) debería

incluir el análisis de materiales de referencia certificados, la participación en ensayos de aptitud, o de otras comparaciones interlaboratorios" (DG SANCO, 2007). A continuación, se describen los aspectos caracterizados y los criterios de aceptación adoptados en la validación analítica de los métodos. El tratamiento estadístico de los datos fue realizado mediante los programas suministrados con los equipos de análisis, Minitab 14 y 15 y Microsoft Office Excel del 2003 y 2007.

3.2.4.1. IDENTIFICACIÓN, CONFIRMACIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

La identificación de las materias activas se realiza por comparación de los tiempos de retención (t_R) encontrados en la muestra con los de un patrón externo, inyectados ambos en el sistema cromatográfico con las mismas condiciones analíticas. Se admitirán como identificaciones positivas las que tengan un rango de $t_R \pm 2\%$. En la Figura 3.13, se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma realizado en HPLC-DAD y los tiempos de retención de los compuestos estudiados.

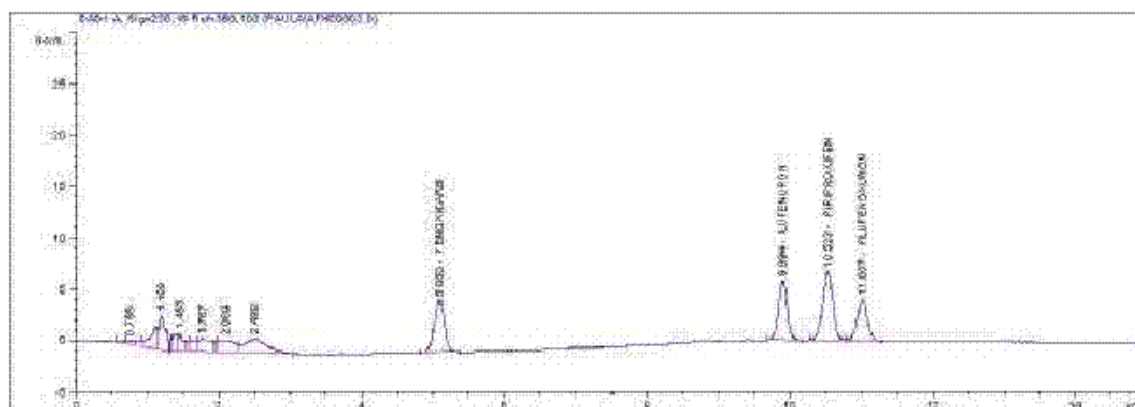


Figura 3.13.- Cromatograma en HPLC de una mezcla patrón de 1 µg/ml de cada insecticida

En el caso del detector DAD, la confirmación de los analitos se realizó mediante el análisis de su espectro, siendo válida la confirmación si el espectro tiene una pureza superior a 0,990.

En la Figura 3.14, se muestran algunos espectros obtenidos para estos compuestos.

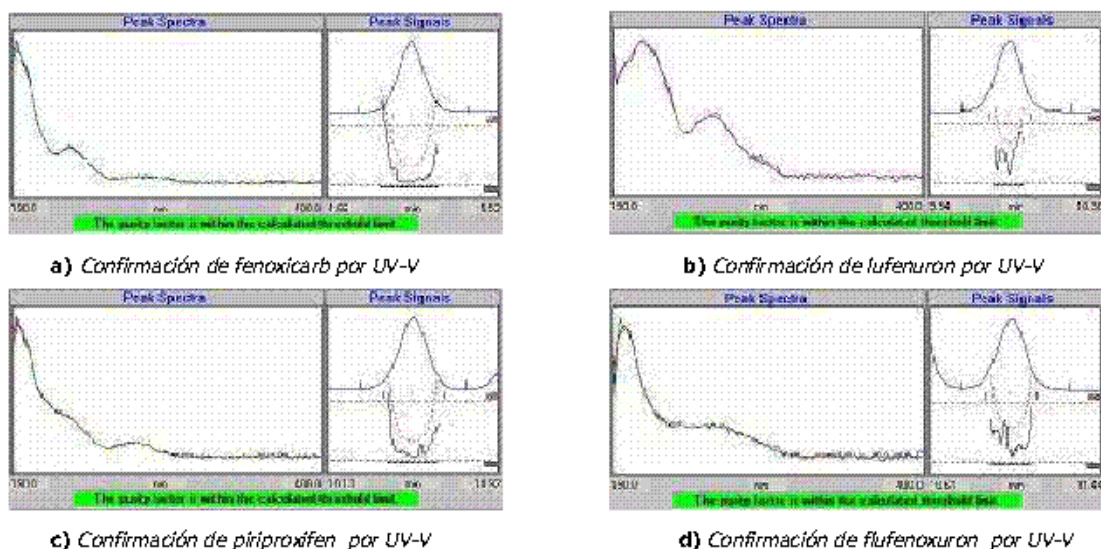


Figura 3.14.- Confirmación por espectros en ultravioleta-visible para un patrón de 1 µg/ml

Para MS, primero se seleccionaron las transiciones MRM y energías de colisión más óptimas, y se confirmó mediante espectro de masas, siendo el criterio de aceptación que los dos iones mayoritarios superaran una abundancia de 5000. En la Figura 3.15, se muestran ejemplos de los espectros de masas para cada compuesto.

Para los extractos analizados por CL-DAD, la cuantificación se realizó por área cromatográfica, mediante comparación con patrón externo, preparados en el mismo disolvente que los extractos. Para CL-MS, el criterio también fue el área cromatográfica, mediante comparación con patrón externo, pero esta vez preparados en matriz en blanco.

La selectividad y especificidad se estudiaron mediante el método de adiciones, que se basó en adicionar una cantidad conocida de materia activa, equivalente a una concentración en muestra entre 0,05 mg/kg y 2 mg/kg, a extractos de la materia vegetal objeto de estudio y posteriormente, se comparó la respuesta de la muestra, que contiene

posibles interferencias, con el resultado o respuesta de un patrón de la misma concentración, sin observar diferencias significativas entre ambas.

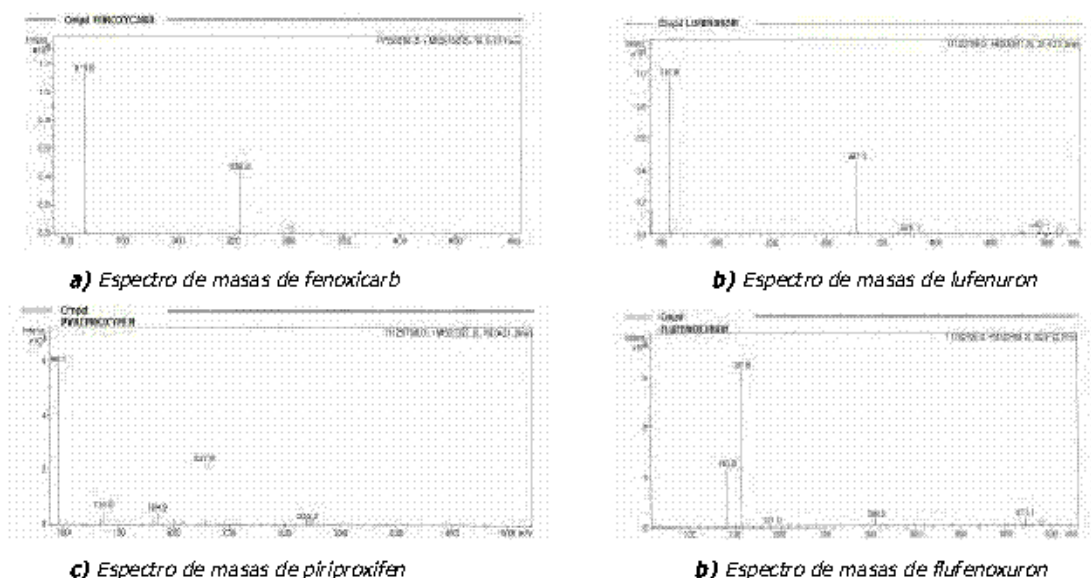


Figura 3.15.- Ejemplos de espectros de masas para un patrón de 1 µg/ml

3.2.4.2. LINEALIDAD DE RESPUESTA DEL DETECTOR.

La linealidad de respuesta de los detectores se determinó con tres puntos de calibración (menor, intermedia y mayor concentración del rango de análisis propuesto) y una sola inyección de cada uno, para cada materia activa. El ajuste lineal de los datos a una curva de regresión se evaluó para cada materia activa mediante el método de mínimos cuadrados, aceptando la linealidad de respuesta del detector entre las concentraciones inyectadas siempre que el coeficiente de correlación lineal (r^2) fuera superior a 0,98 y la desviación estándar < 20% para los factores de respuesta. La recta de regresión no fue forzada a pasar por el origen.

3.2.4.3. LÍMITES DE DETECCIÓN Y DE CUANTIFICACIÓN.

Para cada materia activa se calculó el límite de detección (LD) como la menor

cantidad de disolución patrón que fue detectada en las condiciones experimentales del instrumento utilizado, teniendo en cuenta que la respuesta presentara una relación señal/ruido mayor de 3.

El límite de cuantificación (LQ) se calculó para cada uno de los productos objeto de análisis en las matrices seleccionadas, determinando la menor concentración de materia activa presente en el extracto vegetal cuya respuesta en el cromatograma fue cuantificable sin error, es decir que se puede cuantificar con exactitud y precisión (relación señal/ruido > 10)

3.2.4.4. PRECISIÓN Y EXACTITUD.

La repetibilidad permite determinar el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de forma independiente, para un mismo tipo de muestra, bajo unas mismas condiciones experimentales, y por un mismo operador. Se evalúa mediante la obtención del coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) de estos resultados. Para el cálculo de este parámetro se realizaron de forma consecutiva cinco inyecciones de un mismo estándar preparado a la menor y mayor concentración del rango de linealidad del plaguicida y lo mismo se realizó para muestras fortificadas. Los resultados obtenidos fueron sometidos a tratamiento estadístico y el criterio de aceptación fue que el valor de RSD obtenido fuese $\leq 20\%$.

La reproducibilidad permite determinar el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de forma independiente, para un mismo tipo de muestra, bajo las mismas condiciones experimentales pero a distinto tiempo o por distintos operadores. Típicamente, la reproducibilidad se evalúa en comparaciones inter-laboratorio, con distintos operadores. Sin embargo, se acepta generalmente que este aspecto sea evaluado intra-laboratorio, mediante evaluación de los resultados de los controles de calidad del laboratorio y su variabilidad, suponiendo que, a lo largo del tiempo ha podido haber cambios en material o instrumentación que afectaran al resultado de los análisis. Para el cálculo de la reproducibilidad intra-laboratorio, se tomaron cinco

valores de recuperaciones introducidas como controles de calidad y cinco valores de patrones, a la concentración mayor y menor del rango analítico, abarcando todas las secuencias analizadas para cada grupo de alimentos, y se sometieron a tratamiento estadístico, con el fin de obtener el parámetro RSD. Se aceptó la reproducibilidad intra-laboratorio como válida cuando el RSD fue $\leq 20\%$ en patrones y recuperaciones y además el valor medio de las últimas estaba comprendido entre 70-120%.

La exactitud o porcentaje de recuperación del analito de la matriz vegetal mediante el método de extracción se evalúa con la realización de fortificaciones comprendidas en el rango lineal. Así, se prepararon cinco réplicas a las concentraciones menor y mayor del rango lineal y se hallaron sus recuperaciones respecto de patrones preparados a las mismas concentraciones y analizados todos en la misma secuencia. El criterio de aceptación fue que la recuperación media para cada conjunto de cinco réplicas estuviese comprendida entre 70-120% con un CV $\leq 20\%$.

3.2.5. CONTROL DE CALIDAD.

El control de calidad interno se llevó a cabo de manera rutinaria, incluyendo en cada secuencia de análisis tres puntos de calibración, análisis de blancos de disolvente y blancos de muestra y fortificaciones a la concentración mayor y menor del rango. Además, el blanco de disolvente fue inyectado a lo largo de las secuencias en aquellos puntos donde había más probabilidad de efectos de arrastre. Los datos obtenidos se revisaron en búsqueda de contaminaciones e interferencias y en particular, las recuperaciones y calibraciones sirvieron para examinar la reproducibilidad intra-laboratorio.

3.2.6. EXPERIENCIAS SUPERVISADAS. CINÉTICAS DE DISIPACIÓN.

La información generada en las experiencias supervisadas fue procesada estadísticamente para la confección de curvas de disipación. Este fenómeno fue representado por un modelo matemático exponencial. Después, a través de procedimientos de transformación de variables y regresión lineal por mínimos cuadrados,

se obtuvieron ecuaciones para interpretar la disipación en las condiciones del ensayo. El modelo exponencial fue:

$$C = C_0 e^{-kt}$$

siendo **C** la concentración de residuo para un tiempo dado (mg/kg); **C₀**, la concentración inicial para $t = 0$ (mg/kg); **k**, la tasa de disipación (d^{-1}); **t**, el tiempo (d).

Puesto que una ecuación exponencial es más difícil de correlacionar estadísticamente, las variables se transformaron para conseguir una ecuación logarítmica, de primer orden y lineal, definida por:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

siendo $\ln C$, el logaritmo neperiano de la concentración; $\ln C_0$, el logaritmo neperiano de la concentración inicial a $t = 0$; **k**, la tasa de disipación (d^{-1}); **t**, el tiempo (d) (Timme y Freshe, 1980; Timme et al., 1986).

En la Figura 3.16, se representa una curva tipo de disipación de plaguicidas, transformada en su regresión lineal, en donde se distinguen perfectamente las tres etapas de la cinética de disipación de un plaguicida.

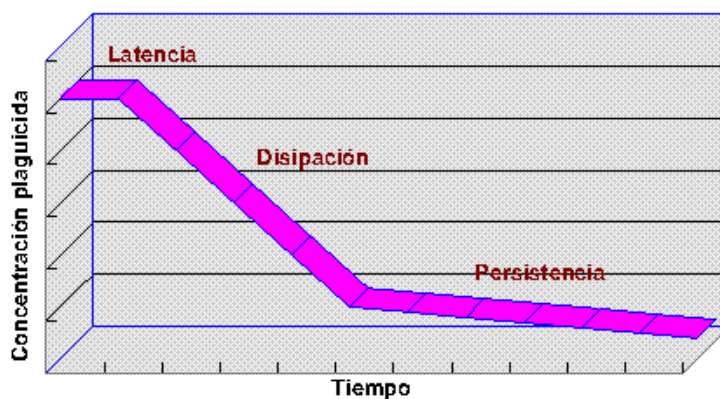


Figura 3.16.- Representación gráfica de una curva de disipación

La correlación lineal de esta última ecuación, por etapas o globalmente, que define el comportamiento exponencial de la disipación de residuos, se define por el coeficiente de regresión lineal (r^2). El criterio para aceptar que el modelo exponencial definía correctamente la disipación de los residuos, fue que $r^2 > 0,90$. En los casos positivos, a partir de la ecuación logarítmica, se pudieron obtener parámetros como la tasa de disipación (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), que se define como el tiempo necesario en días para que la concentración inicial del plaguicida se reduzca a la mitad, y se calcula introduciendo estos supuestos en la ecuación y calculando:

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

Hay ciertos valores que son especialmente significativos en la disipación de un plaguicida y que se deben interpretar para conocer su comportamiento. Por un lado, C_0 , que representa el depósito inicial del plaguicida en el cultivo, relacionado sobre todo con formas de aplicación, condiciones ambientales y características externas del vegetal; k , la tasa o velocidad de degradación o disipación, relacionada fundamentalmente con las condiciones climáticas, metabolismo vegetal y tipo de plaguicida; $t_{1/2}$, que indica la persistencia del plaguicida en el cultivo. Por otra parte, en la ecuación exponencial, al introducir el correspondiente LMR, es posible determinar el plazo en que se alcanzarían el nivel máximo permitido en tales condiciones. Finalmente, las curvas de disipación exponencial permiten identificar varias fases: periodo inicial, en el que se encontraría el mayor residuo a tiempo cero, aunque a veces, debido a que el plaguicida tarda un tiempo en distribuirse por la planta, el nivel mayor de residuos aparece en los primeros días de muestreo y entonces se conoce como periodo de latencia; periodo de disipación o degradación, cuando la incidencia de las variables climáticas en el fenómeno es muy alta; y periodo de persistencia, en el que la velocidad se atenúa porque el fenómeno es cada vez más dependiente de las condiciones internas (metabolismo del medio) y del propio plaguicida (estabilidad del principio activo, solubilidad, etc.)

El tratamiento estadístico de los datos fue realizado mediante los programas Minitab 14, 15 y Microsoft Office Excel 2003, 2007.

3.2.7. ENSAYOS DE BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO*.

En los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* se simularon la digestión gastrointestinal y el proceso de absorción intestinal. 40 g de muestra en blanco fueron fortificadas en el rango de concentraciones encontradas en los productos frescos y procesados que entrarían en el mercado (0,05-2 mg/kg), según los ensayos de campo y de procesamiento realizados en esta tesis, bajo las dos condiciones agrícolas estudiadas, BPA y CPA, y a concentraciones mucho mayores (5-100 mg/kg), con la intención de estudiar en profundidad el porcentaje de diálisis para cada caso. Las mismas concentraciones se ensayaron en 40 ml de estándares de los plaguicidas, preparados en acetonitrilo:agua 50:50 (V:V). Las muestras fueron diluidas 1:1 para permitir una mezcla adecuada con las soluciones enzimáticas, ácidas y básicas del ensayo. En la Figura 3.17 se expone un esquema del procedimiento.

Inicialmente, el pH de la muestra se mide y se valora con HCl hasta pH 2. Entonces, se añaden 6 ml de la solución de pepsina y se realiza la digestión ácida durante 2 horas, a 37 °C, en un baño con agitación moderada constante, imitando los peristaltismos y la temperatura corporal humana. Durante este tiempo, se verificó el mantenimiento del pH en 2. En segundo lugar, una alícuota de la muestra, a la que se añaden 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina, se valora con NaOH hasta pH 7, mientras la otra alícuota permanece en un baño de hielo con la digestión ácida detenida. En tercer lugar, esta segunda alícuota se somete a la segunda digestión y a la diálisis, a 37 °C, durante 2 h y en un baño con agitación constante moderada, imitando las condiciones humanas. Para ello, se introduce una membrana tubular sellada, con un volumen de 10 ml de una solución preparada con una cantidad de NaHCO₃ equivalente a la acidez valorada en la primera alícuota y diluida hasta 25 ml con agua Milli-Q. Media hora después, se añaden los 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina. Finalmente, se recoge el dializado, se mide y analiza.

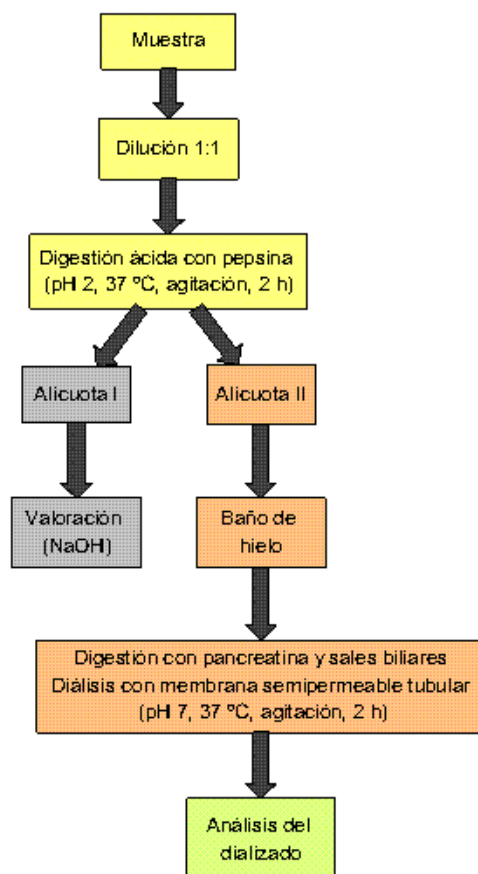


Figura 3.17.- Protocolo del ensayo de biodisponibilidad *in vitro*

3.2.8. ESTUDIOS DE CONSUMO.

Cualquier sustancia puede considerarse tóxica cuando la dosis es lo suficientemente alta. Sin embargo, es muy extraño que la ingestión de alimentos vegetales con presencia de residuos de plaguicidas pueda provocar una toxicidad aguda en el consumidor, siempre que se hayan cultivado siguiendo BPA. Ahora bien, la presencia de estos fitosanitarios en niveles superiores al LMR sí podría provocar una toxicidad crónica.

Para determinar los riesgos crónicos, se disponen de varios índices de consumo de alimento. Un índice comúnmente utilizado es la media del consumo diario. Otros incluyen la media del tamaño de las porciones, los percentiles de los valores de consumo, la

media de consumo de las personas que en realidad se comen el producto o el consumo de grupos de población de riesgo, por ejemplo, los niños.

En la predicción de ingesta de residuos de plaguicidas, se reflejarán los hábitos de consumo de alimentos a largo plazo y no las variaciones del día a día, para permitir así una comparación válida con la IDA, la cual se basa en ingesta a lo largo de toda una vida. De este modo, en el ámbito internacional, la media de los valores del consumo de alimento diario se utiliza para predecir la ingesta de residuos de plaguicidas de cara a riesgos a largo plazo (FAO, 1993, 1995, 2002; Urieta et al., 1996; WHO, 1997; United Kingdom Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 2004).

El cálculo de la ingesta diaria estimada (IDE) (mg de plaguicida/peso en kg) se ha determinado a partir de la ingesta diaria calculada (IDC) (mg de plaguicida/persona), de acuerdo con la fórmula siguiente (Navarro García et al., 1992).

$$IDC = (\Sigma c/N) \times (C/D)$$

Siendo:

Σc : Suma de concentraciones del plaguicida encontrado en cada vegetal (mg/kg).

N: Número de muestras con presencia del plaguicida.

C: Consumo anual por persona del producto vegetal (kg/persona).

D: 365 días.

Se realizaron encuestas de hábitos de consumo de la población de nuestra Región, seleccionada por edades, con las que se calcularon también la IDE.

Así, se ha calculado la IDE de estos cuatro insecticidas, teniendo en cuenta los índices de consumo del INE y las encuestas de hábito de consumo realizadas en la Región de Murcia. Se han utilizado los últimos índices de consumo comparativos publicados (1990-91) y para comprobar su validez se realizaron 30-40 encuestas por nivel de consulta, agrupando la población en cuatro sectores: niños (edad media 10 años),

procedentes de Murcia capital y Espinardo; adolescentes (edad media 20 años), estudiantes universitarios de Murcia; adultos (edad media 32 años), de diversa procedencia con nivel académico superior; y edad avanzada (edad media 66 años), procedentes de Guadalupe y Totana.

El cálculo de ingestas se ha realizado obteniendo la IDC como producto del valor de residuos encontrados en cada tipo de muestra analizada por el consumo diario del producto alimenticio C/D (obtenido al dividir el consumo anual C, por persona, por 365 días). Posteriormente, se calcula la IDE dividiendo los valores de IDC por 60 kg para adolescentes, adultos y edad avanzada (peso medio por persona) ó por 30 kg para niños (peso medio por persona).

Finalmente, se calculó la relación IDE/IDA con el fin de comprobar el peligro potencial de la ingestión de los residuos de los plaguicidas estudiados.

4. EXPERIMENTAL.

4.1. PERSISTENCIA, DEGRADACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE FLUFENOXURON, LUFENURON Y PIRIPROXIFEN EN CALABACÍN, PIMIENTO, LECHUGA Y PEPINO Y SUS PREPARADOS CONGELADOS Y CUARTA GAMA.

Según la última encuesta anual del gasto familiar, publicada por el INE para el año 2005, sólo en hortalizas cultivadas por su fruto (frescas o refrigeradas), se invirtieron 1.611.383.210 €, siendo su consumo total el primero en el grupo de frutas y hortalizas (INE, 2005). Considerando las estadísticas de producción del Ministerio de Agricultura, se observa que la producción de lechuga, pepino, pimiento y calabacín ha aumentado en todos los casos entre los años 1990-2005, hasta alcanzar en el 2005 una producción global mínima del orden de $300 \cdot 10^3$ Tm de calabacín hasta una máxima de unas $1.000 \cdot 10^3$ Tm de lechuga (MAPA, 2006b).

En la Región de Murcia y según datos de su Consejería de Agricultura y Agua, en 2004 el grupo de las hortalizas constituye casi el 100% de los cultivos herbáceos, con una producción total de más de $1,7 \cdot 10^6$ Tm anuales; de ellas, algo más de $811 \cdot 10^3$ Tm corresponden a los cuatro cultivos antes citados y por tanto, se pueden considerar base

de nuestra riqueza comercial, tanto por su consumo en fresco como industrializado (congelados y refrigerados) (CARM, 2006).

Por otra parte, la comodidad de preparación de los alimentos es un factor cada vez más importante en la selección de hortalizas por los consumidores. Las más populares son las que se encuentran en presentaciones precocinadas, que a menudo incluyen formas de procesamiento; se constata cada vez más que el consumidor elige hortalizas ya preparadas, siendo los tratamientos en frío una de las formas de presentación mayoritaria, debido a su ventaja en la conservación de alimentos perecederos y a la facilidad de preparación culinaria que representan. En la actualidad, las hortalizas frescas transformadas representan una proporción cada vez mayor del total de productos frescos del mercado agrícola, con un crecimiento estimado de 10-25% por año desde 1990 en Europa occidental (Ragaert et al., 2004). En particular, la introducción de hortalizas refrigeradas ha propiciado un incremento considerable del consumo de diferentes productos, siendo las ensaladas embolsadas un ejemplo claro. El consumo de productos congelados también se ha incrementado, por ejemplo en Estados Unidos ha habido un aumento de un 44% en los dos últimos decenios (Pollack, 2001). Por tanto, es necesario evaluar la exposición de los consumidores a los residuos de plaguicidas en el caso de estos nuevos procesos de acondicionamiento de hortalizas, y por ello, en esta experiencia se estudia el comportamiento de los RCI seleccionados en estas hortalizas.

La experimentación englobó a RCI de diferentes grupos químicos, en hortalizas frescas y transformadas por frío, pertenecientes a diferentes familias como solanáceas, cucurbitáceas de piel comestible y hortalizas de hoja. Se aplicaron las materias activas lufenuron, flufenoxuron y piriproxifen, según criterios de BPA y CPA en ensayos de campo supervisados, para determinar diferencias en niveles de concentración y disipación; monitoreando los residuos desde la aplicación hasta la cosecha, durante la elaboración industrial y en la posterior conservación de los alimentos. El estudio se realizó a lo largo de la cadena de producción agroalimentaria de pimiento, calabacín, pepino y lechuga para evaluar la exposición humana a estos residuos como último fin. Pimiento y calabacín se

transformaron en productos congelados y lechuga y pepino en productos de cuarta gama envasados en atmósfera modificada (EAM o MAP).

Se debe señalar que en este apartado no se estudió fenoxicarb, al no estar autorizado por el Ministerio de Agricultura en ninguna de las hortalizas ensayadas (MAPA, 2008a).

4.1.1. ESTUDIOS DE CAMPO Y PROCESADO.

En los ensayos de campo supervisados, se aplicaron los productos fitosanitarios según las autorizaciones registradas en el Ministerio de Agricultura para cada cultivo de interés (MAPA, 2008a). En pimiento, se aplicaron flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen; en calabacín, piriproxifen; y en lechuga y pepino, flufenoxuron. En la Tabla 4.1, se puede observar un resumen de las características de aplicación de estos plaguicidas para los cultivos seleccionados.

Tabla 4.1.- Características de registro de los plaguicidas estudiados en hortalizas.

Cultivo	Plaga	RCI	Producto comercial	Dosis (%)	LMR (mg/kg)	PS (días)
Pimiento	Araña, <i>Spodoptera</i>	Flufenoxuron	Cascade	0,05-0,1	0,5	7
	<i>Spodoptera</i> , <i>Trips</i>	Lufenuron	Match	0,04-0,2	0,3	7
	Mosca blanca	Piriproxifen	Atominal	0,05-0,075	1	3
Pepino	<i>Spodoptera</i> , ácaros	Flufenoxuron	Cascade	0,05-0,1	0,2	7
Lechuga	<i>Spodoptera</i>	Flufenoxuron	Cascade	0,05-0,1	1	7
Calabacín	Mosca blanca	Piriproxifen	Atominal	0,05-0,075	0,05	3

PS: Plazo de seguridad.

Todas las parcelas experimentales se ubicaron en fincas productoras de la Región de Murcia, elegidas como representativas del cultivo de nuestra Región. En todos los casos, se tomaron parcelas control, situadas lo suficientemente cerca de las tratadas para garantizar idéntico cultivo y condiciones climáticas, pero suficientemente separadas para excluir cualquier riesgo de contaminación procedente de los tratamientos. Las características de las parcelas utilizadas se pueden observar en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Características de las parcelas experimentales.

Alimento	Calabacín	Lechuga	Pepino	Pimiento
Forma de Cultivo	Invernadero (suelo artificial)	Aire libre	Invernadero (suelo artificial)	Invernadero (suelo artificial)
Siembra	Caballón	Caballón	Tres bolillo	Tres bolillo
Antigüedad	5 meses	1,5 mes	1 mes	5 meses
Localización*	Balsicas	Siscar	Mazarrón	Balsicas
GPS (°N; °W; m)	37,83165; -0,95406; 112	38,07425; -1,03128; 38	37,54517; -1,38776; 38	37,81126; -0,96281; 101
Área (m²)	168	55	85,5	16
Marco (cm)	80 x 110	40 x 70	60 x 450	80 x 25

* Región de Murcia.

El muestreo de las parcelas se realizó al azar, tomando muestras de todas y cada una de las parcelas; incluyendo tanto frutos cubiertos por hojas como aquellos más expuestos a la luz, evitándose los puntos de inicio y final de la aplicación por posibles derivas y sobretratamiento.

Las muestras fueron recogidas con adecuadas medidas de protección, evitando contaminaciones entre áreas y procurando una mínima manipulación. Se muestreó en orden creciente de dosis de aplicación, de manera que primero se tomó muestra en el área control y después en el área de aplicación. Una vez recogidas, fueron envasadas en bolsas opacas de polietileno inequívocamente identificadas. Durante el transporte al laboratorio, las bolsas se mantuvieron a temperatura ambiente, en posición estable, protegiéndolas de golpes y se evitó su exposición directa a la luz. Se recogieron aproximadamente 2 kg, resultado de al menos 12 unidades procedentes de 12 plantas por área de ensayo, de acuerdo con las recomendaciones de FAO para la realización de ensayos supervisados para estos cultivos (FAO, 1990), excepto en el caso de la muestra dedicada a la industrialización para la que se recogieron unos 10 kg.

Los primeros ensayos supervisados realizados en las parcelas fueron siguiendo el código de BPA (FAO, 2003b; CARM, 2003). Para ello, se respetaron dichas normas y las dosis y plazos de seguridad registrados en cada caso. Las dosis aplicadas se encontraban situadas en el punto mínimo o medio del intervalo permitido por el MAPA.

Las dosis de aplicación de piriproxifen, flufenoxuron y lufenuron en pimiento fueron 0,05, 0,075 y 0,04%, respectivamente. En lechuga, flufenoxuron fue aplicado al 0,075%. En calabacín, piriproxifen se aplicó a una dosis de 0,05%. En pepino, flufenoxuron se aplicó al 0,075%. Se realizó un muestreo periódico desde la aplicación hasta el momento del plazo de seguridad establecido. La primera muestra se recogió 2 h después de la aplicación, establecido como tiempo de secado, de manera que el producto quedase fijado en la planta. En la toma de muestra a plazo de seguridad, se recogió una muestra adicional que sería sometida al procesamiento alimentario. Se registraron las condiciones ambientales más relevantes del tratamiento, esto es, temperatura ambiental y humedad relativa. Ambas fueron medidas en una localización representativa de la parcela.

En los ensayos supervisados bajo CPA, se introdujeron dos condiciones críticas desde el punto de vista de la presencia de residuos: nueva dosis transcurrido el plazo de seguridad y toma de muestra inmediata, de manera que no se respetaron los plazos de seguridad preceptivos en ningún caso. Así, el día que cumplía el plazo de seguridad en el ensayo bajo BPA, y una vez finalizado éste, se aplicaron otra vez las mismas dosis sobre los cultivos; posteriormente, se recogieron muestras 2 h después, una destinada al análisis en el laboratorio y otra que ingresaría en el procesamiento alimentario.

Las condiciones en las que se practicaron ambos tipos de ensayo se pueden observar en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Condiciones de los ensayos realizados bajo BPA y CPA.

Cultivo	V (l)	Dosis (l/ha)		Temperatura (°C)		Humedad (%)		Muestreo (días)	
		BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
Calabacín	15	892,85	892,85	25	19	65	72	0-1-3	0
Lechuga	4,7	854,54	854,54	21	21	35	49	0-1-3-7	0
Pepino	7,15	836,25	836,25	30	29	40	39	0-1-3-7	0
Pimiento	5	3.125	3.125	27	21,5 ^a	74	78 ^b	0-1-3-7	0

a. valor medio de los dos tratamientos practicados (21 °C, 22 °C).

b. valor medio de los dos tratamientos practicados (72%, 84%).

Aunque el uso de bajas temperaturas para prolongar la vida de los alimentos, en particular las hortalizas, reduce los procesos de degradación, puede suponer también una ralentización en la metabolización de los residuos de plaguicidas, ya que la luz y la temperatura son los factores más importantes en su desaparición (Holland et al., 1994; Marín et al., 2003).

Los estudios de procesado por frío de las hortalizas seleccionadas se realizaron separadamente para cada cultivo y cada tipo de tratamiento en origen, siempre en orden creciente de dosis de aplicación, para evitar riesgos de contaminación. El procesado de los alimentos y su manipulación tuvo lugar tal y como lo realiza la industria alimentaria para obtener congelados de calabacín o pimiento y productos de cuarta gama con lechuga o pepino. Los congelados se fabricaron en el laboratorio y los productos de cuarta gama en una cámara frigorífica situada a 4 °C, manteniendo en todos los casos las condiciones de asepsia requeridas en cuanto a material y personal para procesos de transformación alimentaria de este tipo. Los procesos fueron secuenciales, recogiendo una muestra de 1 kg en cada etapa influyente en la disipación de residuos.

Para el procesado por congelación, la muestra fue cuarteada inicialmente en la forma de presentación procedente, pimiento en tiras y calabacín en rodajas, se lavaron para eliminar los restos del cultivo; se escaldaron a 95 °C; se enfriaron y se desinfectaron por inmersión en solución acuosa de NaClO a 10 mg/l y por último, se realizó el envasado en bolsas de plástico de calidad alimentaria que fueron selladas por calor y almacenadas a -25 ± 2 °C.

En el caso de procesado de cuarta gama, las lechugas se trocearon inicialmente mientras que los pepinos, debido a la baja resistencia de su pulpa para este proceso, se mantuvieron enteros hasta el final. Una vez hecho esto, se realizó un primer lavado para eliminar los restos del cultivo; un segundo lavado en una solución acuosa de NaClO a 100 mg/l para la desinfección; un tercer lavado para reducir la concentración de cloro activo, y finalmente, las piezas de lechuga fueron centrifugadas a 800 rpm durante 5 min, con lo que se eliminó el agua sobrante de las hojas, y los pepinos se hicieron rodajas. Por último,

el producto fue envasado en atmósfera modificada, consistente en una mezcla inerte compuesta por CO₂: N₂ (20:80), en bolsas específicas de calidad alimentaria, que fueron termoselladas y almacenadas a 5 °C. En las Figuras 4.1 y 4.2 se muestran esquemas de los procesos estudiados.

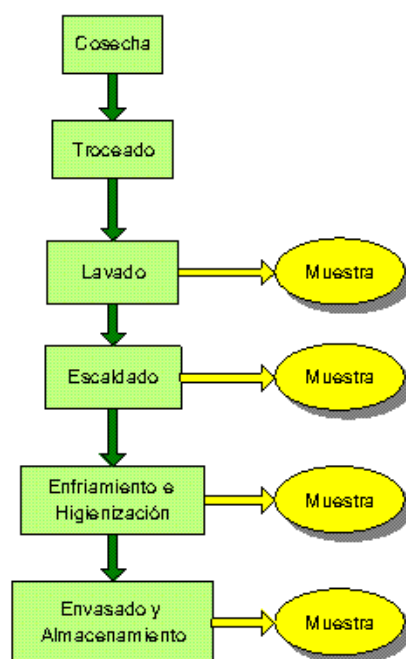


Figura 4.1.- *Elaboración de hortalizas congeladas*

Los productos elaborados fueron almacenados hasta su vida útil manteniendo la cadena del frío. Los congelados se conservaron durante un mes a -25 ± 2 °C y las bolsas de cuarta gama permanecieron 10 d a 5 ± 2 °C. Durante el periodo de caducidad, los productos fueron muestreados aleatoriamente con 1 kg por muestra y analizados.

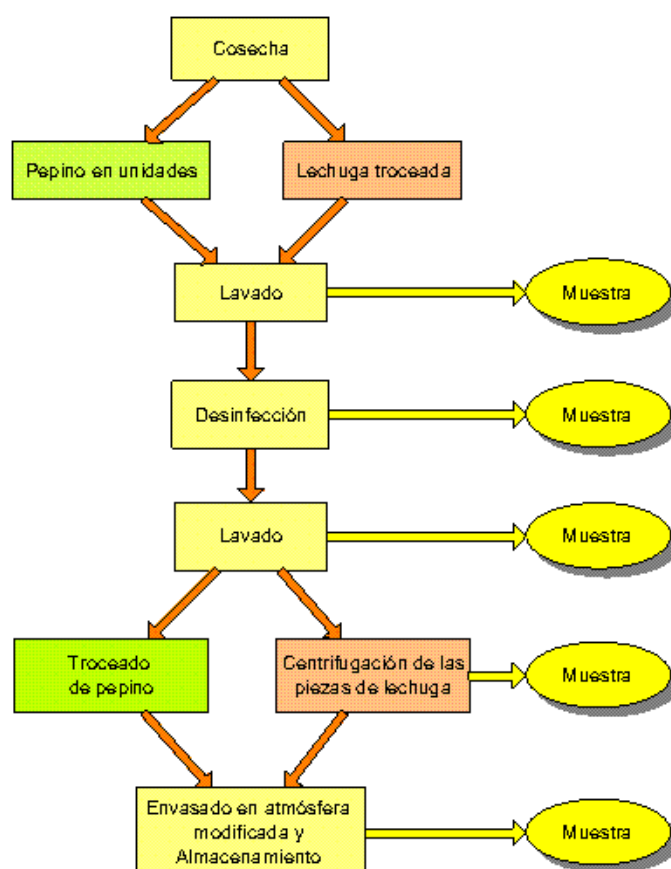


Figura 4.2.- *Elaboración de hortalizas de cuarta gama*

4.1.2. ANÁLISIS DE RESIDUOS.

A continuación se muestran los resultados de los análisis de residuos realizados en las experiencias de campo y de procesado junto con los valores de la validación analítica y de los controles de calidad.

4.1.2.1. VALIDACIÓN ANALÍTICA.

La metodología analítica descrita en el apartado 3.2.2.1 de metodología, basada en una microextracción online con acetonitrilo y determinación por CL-DAD, fue validada teniendo en cuenta los criterios descritos en la Guía SANCO y la norma internacional ISO 17025:2005 (ISO, 2005; DG SANCO, 2007).

En todos los casos el LQ se fijó en 0,05 mg/kg y el LD estuvo comprendido entre 0,61 y 1,23 ng, como se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4.- Límites de detección y cuantificación en hortalizas.

Matriz	RCI	LD (ng)	LQ _T (mg/kg)	LQ _E (mg/kg)
Pimiento	Lufenuron	0,82	0,06	0,05
	Piriproxifen	0,65	0,04	0,05
	Flufenoxuron	1	0,08	0,05
Lechuga	Flufenoxuron	0,61	0,05	0,05
Pepino	Flufenoxuron	1,23	0,10	0,05
Calabacín	Piriproxifen	0,62	0,05	0,05

LQ_T establecido teóricamente. LQ_E fijado experimentalmente.

En todo el proceso de validación, el intervalo de concentración ensayado fue 0,05-1 mg/kg para todas las matrices. Así, la linealidad de respuesta del detector se estudió en este rango; precisión y exactitud fueron estudiadas en 0,05 mg/kg y 1 mg/kg con cinco réplicas por nivel, empleándose multipatrones para fortificar las muestras en blanco previamente analizadas. En la Tabla 4.5, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.5.- Resultados de la validación analítica en hortalizas.

Matriz/ Plaguicida	Parámetros (%)	R ² 0,05-1	RSD Repetibilidad		RSD Intra- Reproducibilidad		Recuperación Media	
	Nivel (ppm)		0,05	1	0,05	1	0,05	1
Patrón en disolvente	Flufenoxuron	99	4,3	2,5	6,7	1,8	--	--
	Lufenuron	100	3,8	0,5	3,9	1,4	--	--
	Piriproxifen	100	2,8	1,8	2,9	1,5	--	--
Pimiento	Flufenoxuron	--	8,9	3,6	16,8	4,1	95,7	75,0
	Lufenuron	--	19,4	2,3	19,4	4,6	89,7	72,5
	Piriproxifen	--	17,8	2,6	13,9	4,0	79,2	72,8
Calabacín	Piriproxifen	--	2,2	5,8	19,7	7,1	103,7	80,8
Lechuga	Flufenoxuron	--	11,0	4,5	11,7	3,5	103,7	72,4
Pepino	Flufenoxuron	--	8,8	16,4	2,6	11,3	76,3	81,7

Como se muestra, los niveles validados (0,05 y 1 mg/kg) abarcaron los LMRs fijados para estas hortalizas (rango 0,05-1 mg/kg). El LQ (0,05 mg/kg) para todas las combinaciones plaguicida-matriz fue siempre igual o inferior al LMR establecido. Los coeficientes de correlación lineal fueron $\geq 99\%$, indicando una respuesta lineal del detector adecuada para cada plaguicida en el intervalo analítico estudiado.

La precisión en patrones fue muy consistente, siendo el RSD < 7% en todos los casos. En las muestras fortificadas, los valores de RSD en repetibilidad fueron < 20%, con dos tercios de los valores < 10%. La recuperación media se mantuvo en todas las fortificaciones entre 70-120%, con un valor máximo de 103,7% en piriproxifen y flufenoxuron, en calabacín y lechuga, respectivamente, al nivel de 0,05 mg/kg, y con valor mínimo de 72,4% para flufenoxuron en lechuga a 1 mg/kg. Por último, los resultados de RSD en la reproducibilidad intra-laboratorio de las muestras de hortalizas fortificadas fueron < 20%, siendo la mitad de ellos < 10%.

4.1.2.1.1. Controles de calidad.

En todos los casos, las recuperaciones de los controles de calidad estuvieron comprendidos entre 70-120%. En la Tabla 4.6, se pueden observar los valores medios. Las inyecciones de blancos de matriz y disolvente, incluidas en las secuencias de análisis de las muestras, confirmaron la ausencia de contaminaciones o interferencias.

Tabla 4.6.- Media de los resultados de los controles de calidad analizados en el laboratorio.

Control de calidad	Nivel (mg/kg)	Recuperación media (%)		
		Lufenuron	Piriproxifen	Flufenoxuron
Pimiento	0,05	87,0	76,9	94,7
	1	74,1	70,2	95,3
Lechuga	0,05	- -	- -	94,5
	1	- -	- -	72,7
Pepino	0,05	- -	- -	69,1
	1	- -	- -	75,3
Calabacín	0,05	- -	104,0	- -
	1	- -	71,9	- -

4.1.2.2. RESIDUOS EN PRODUCTO FRESCO.

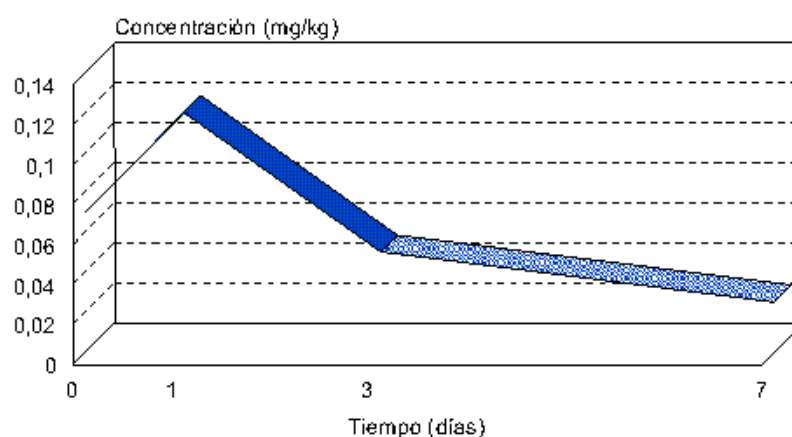
La Tabla 4.7, muestra los resultados de los residuos de RCI encontrados en los productos en fresco durante los ensayos de campo realizados.

Tabla 4.7.- Residuos de RCIs encontrados en los cultivos hortícolas durante los ensayos de campo supervisados cuando se aplican BPA y CPA.

Ensayo de campo Muestra (mg/kg)	BPA				CPA
	2 h	1 d	3 d	7 d	2 h
Flufenoxuron/Pimiento	0,07	0,12	0,05	< LQ	0,06
Lufenuron/Pimiento	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Piriproxifen/Pimiento	0,05	0,16	< LQ	--	< LQ
Piriproxifen /Calabacín	< LQ	< LQ	< LQ	--	< LQ
Flufenoxuron/Lechuga	1,06	1,01	1,02	0,52	1,14
Flufenoxuron/Pepino	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

En condiciones de BPA, no se superaron los LMRs fijados en ningún caso, para los plazos de seguridad establecidos legalmente. Igualmente ocurrió en la situación de CPA, aunque el nivel de flufenoxuron en lechuga fue muy cercano al LMR del producto. Hay que destacar que en calabacín y en pepino, no se encontraron residuos $\geq$ al LQ en ninguna de las dos aplicaciones agrícolas.

En las Figuras 4.3, 4.4 y 4.5, se pueden observar la representaciones de las curvas de disipación de los residuos encontrados en los cultivos estudiados.

**Figura 4.3.-** Curva de disipación del residuo de flufenoxuron en el cultivo de pimiento durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

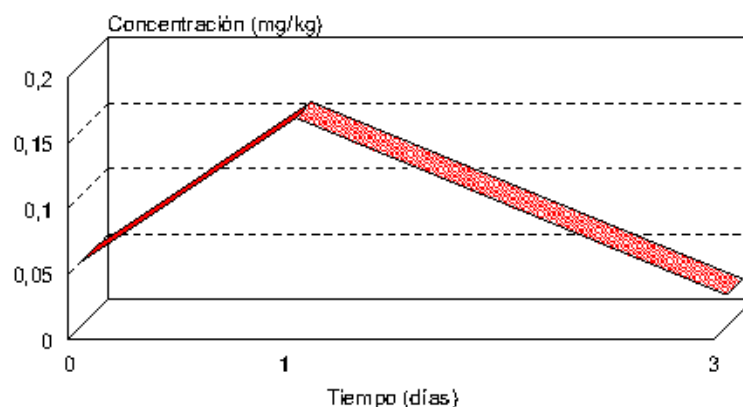


Figura 4.4.- Curva de disipación del residuo de piriproxifen en el cultivo de pimiento durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

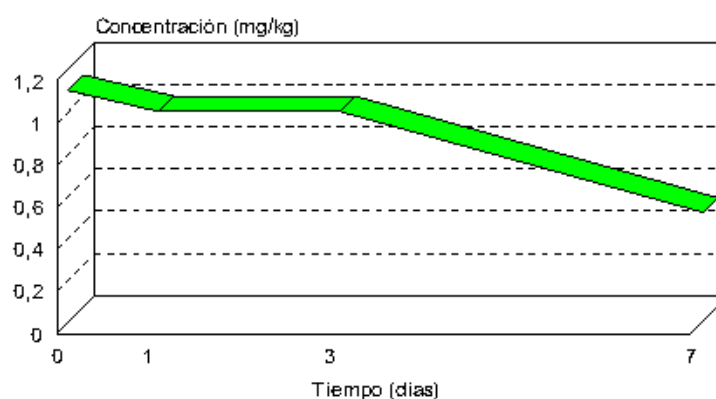


Figura 4.5.- Curva de disipación del residuo de flufenoxuron en el cultivo de lechuga durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

Las curvas de disipación de los residuos de flufenoxuron y piriproxifen en pimiento describen una primera fase en la que el residuo duplica o triplica su concentración inicial y alcanza su máxima concentración (0,14 mg/kg de media) un día después de la aplicación; y una segunda fase, donde se da una rápida degradación que llega a niveles $\leq$ LQ (0,05 mg/kg), entre 2 y 3 veces inferiores a los anteriores, en los dos días siguientes del ensayo. La primera fase se puede interpretar como el tiempo de distribución del plaguicida por todos los frutos de la planta, y la segunda fase se corresponde con un rápido proceso de degradación, motivado fundamentalmente por factores ambientales como la incidencia de la luz solar, humedad, temperatura ambiental, etc.

La curva de disipación de flufenoxuron en lechuga es completamente distinta a las anteriores, aunque también se distinguen dos fases en ella. En los tres primeros días o primera fase, se observa que la concentración del residuo se mantiene (aproximadamente 1 mg/kg), pero en los cuatro días siguientes o segunda fase, la concentración decrece hasta la mitad (0,52 mg/kg). La primera fase sería un proceso de persistencia del residuo en el cultivo y la segunda se identificaría con un proceso de degradación, más ralentizada que en pimiento, debido fundamentalmente al metabolismo interno de la planta. En la Figura 4.6 se presenta la regresión lineal de estos resultados.

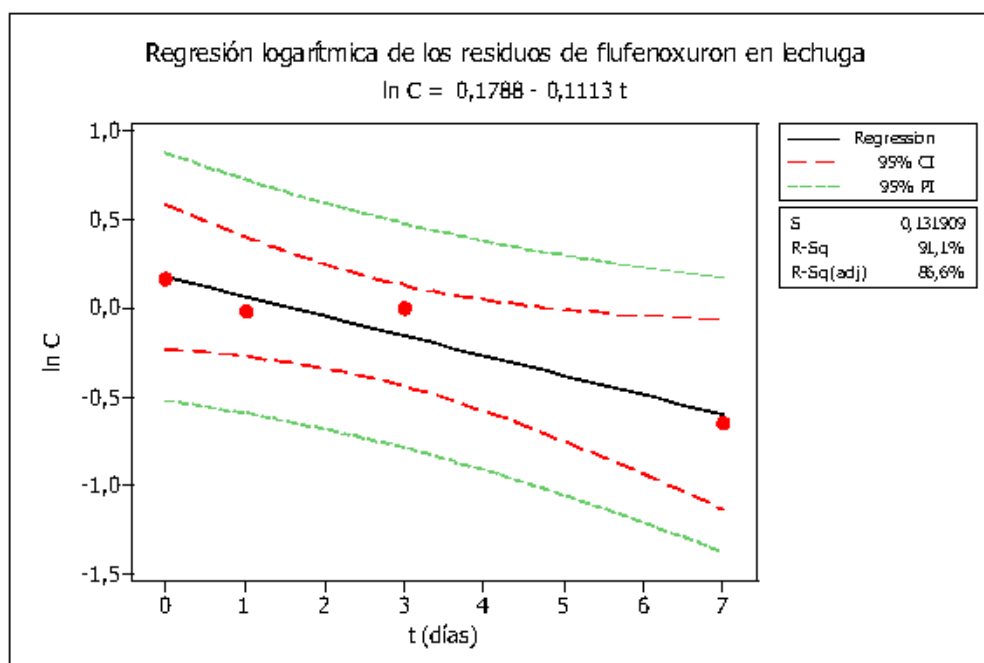


Figura 4.6.- Modelo de disipación exponencial para los residuos de flufenoxuron en lechuga

C: Concentración (mg/kg). *t:* Tiempo (días). *CI:* Intervalo de confianza. *PI:* Intervalo de predicción. *S:* Varianza. *R-Sq:* Coeficiente de regresión. *R-Sq(adj):* Coeficiente de regresión ajustado.

A la vista de los resultados, ha sido posible calcular parámetros estadísticos que nos informan de la disipación encontrada en lechuga. Los parámetros establecidos se muestran en la Tabla 4.8.

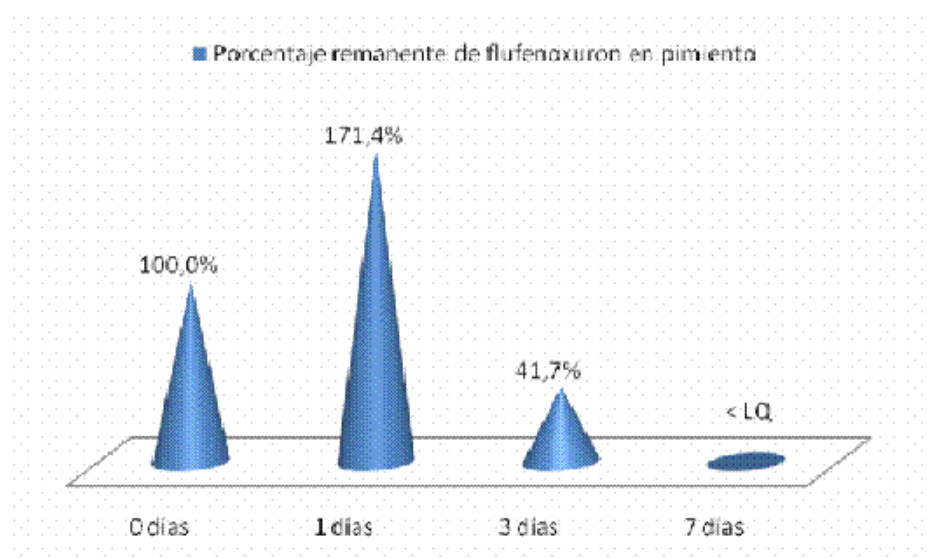
Tabla 4.8.- *Parámetros de la disipación encontrada en hortalizas.*

Muestra	Ecuación de disipación	C ₀ (mg/kg)	t LMR (d)	V _d (d ⁻¹)	t _{1/2} (d)
Flufenoxuron/Lechuga	$C = 1,19 e^{-0,1113 t}$	1,19	2	0,1113	6

C₀ = Concentración inicial. t LMR = Tiempo para alcanzar el LMR. V_d = Velocidad o tasa de disipación. t_{1/2} = Tiempo de vida media.

Sólo los residuos de flufenoxuron en lechuga siguieron un modelo exponencial de disipación, como indica su coeficiente de correlación en la regresión lineal (91,1%). Su tiempo de vida media (6 d) se alcanzó durante la fase de degradación descrita en la curva de disipación y en el segundo día del ensayo los residuos se encontraban exactamente al nivel de su LMR. Asimismo, se ha encontrado una velocidad de disipación moderada para flufenoxuron en lechuga (0,1113 d⁻¹).

En las Figuras 4.7, 4.8 y 4.9, se muestran los porcentajes de disipación de los residuos que quedaron en los cultivos tras la aplicación agrícola en condiciones de BPA.

**Figura 4.7.-** *Disipación de los residuos de flufenoxuron en el cultivo de pimiento durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA*

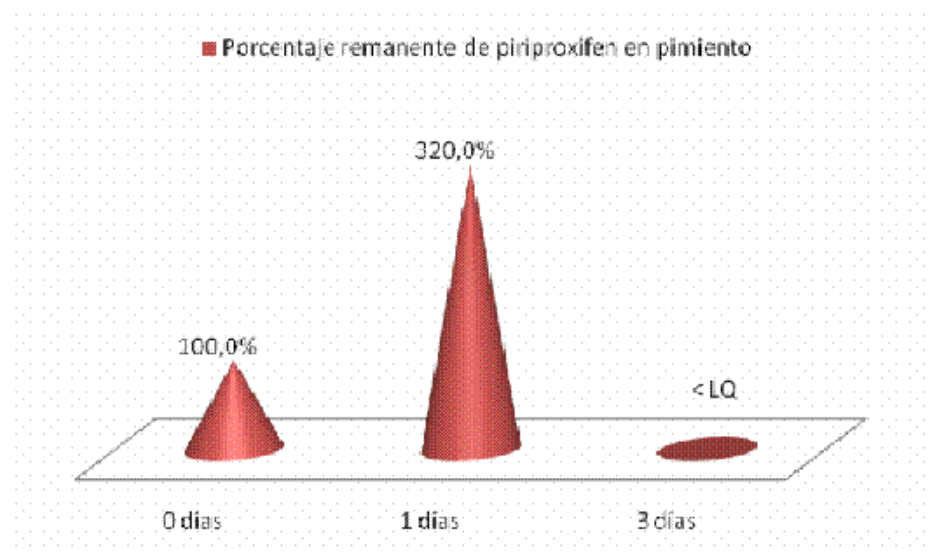


Figura 4.8.- Disipación de los residuos de piriproxifen en el cultivo de pimiento durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

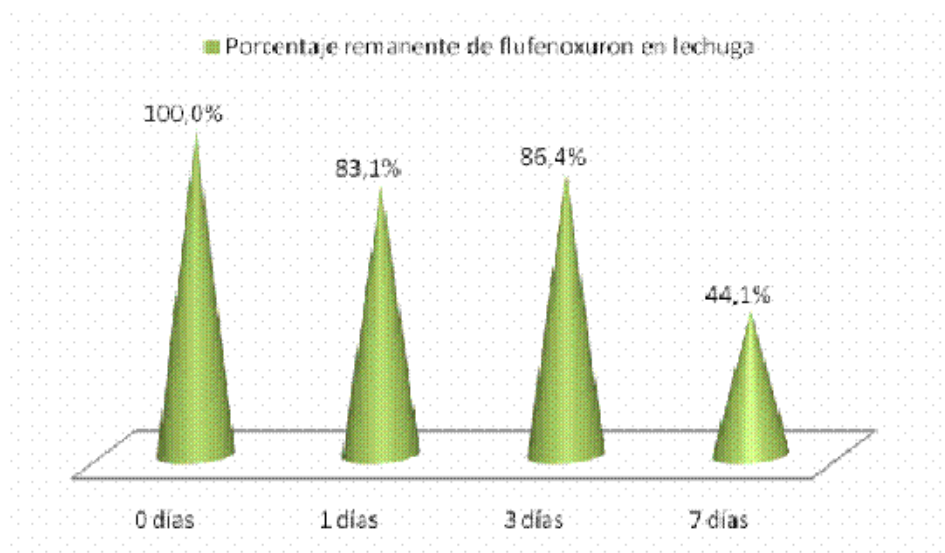


Figura 4.9.- Disipación de los residuos de flufenoxuron en el cultivo de lechuga durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

Los residuos de flufenoxuron en pimiento sólo aparecen en los tres días siguientes a su aplicación, con un valor máximo de 0,12 mg/kg para la muestra del día posterior a la aplicación. El incremento en el nivel remanente se debe por tanto a la distribución completa del plaguicida por la planta 24 h después de la aplicación fitosanitaria. Una vez

ocurre esto, se observa una disipación del 58,3% en los 2 días siguientes, que continúa hasta niveles inferiores al LQ en el plazo de seguridad.

En pimienta, los residuos de piriproxifen fueron cuantificables en las muestras de campo los días previos al plazo de seguridad, con un valor máximo de 0,16 mg/kg en la muestra del día posterior a la aplicación. Al igual que antes, durante el primer día del ensayo se observa la distribución total del plaguicida en la planta, alcanzando un porcentaje remanente superior al del primer día. En los 2 días siguientes se produce una disipación considerable, llegando finalmente a niveles menores que el LQ en los 3 días que duró el ensayo.

En lechuga, el nivel inicial de residuos de flufenoxuron fue 1,18 mg/kg, encontrándose el 44,1% en la muestra a plazo de seguridad. Por tanto, se produjo una disipación del 55,9% en el ensayo de campo realizado bajo BPA. Sin embargo, la magnitud de la disipación encontrada en los días intermedios del ensayo fue moderada, 16,9% en el primer día, manteniéndose en los dos siguientes; por lo que la verdadera disipación ocurrió en los cuatro últimos días del ensayo en los que los niveles de residuos descendieron hasta la mitad. En la Figura 4.10, se comparan los niveles de residuos significativos entre los supuestos de BPA y CPA.

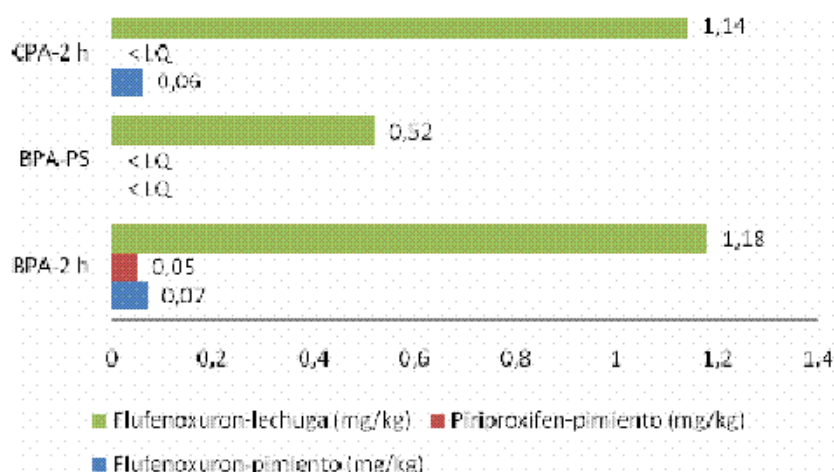


Figura 4.10.- Comparación de niveles de residuos entre la aplicación bajo BPA y CPA.
PS: plazo de seguridad

Se observa que en condiciones de CPA se encontraron concentraciones similares a las que inicialmente quedaron en la planta tras la aplicación bajo BPA. Finalmente, se debe señalar que no se observó la presencia de residuos de los tres compuestos en las muestras control de las parcelas de ensayo.

4.1.2.3. RESIDUOS EN PRODUCTOS ELABORADOS.

Para flufenoxuron y piriproxifen en pimiento, no se encontraron residuos $\geq$ LQ en las muestras de los procesados congelados y almacenados, en ninguna de las dos condiciones de aplicación; puesto que los niveles residuales del producto en fresco en la entrada de la cadena industrial fueron inferiores o muy próximos al LQ. Análogamente ocurrió con lufenuron en pimiento, flufenoxuron en pepino y piriproxifen en calabacín.

En cambio, se observaron efectos de disipación a lo largo del procesado y del periodo de almacenamiento de las ensaladas cuarta gama elaboradas con las muestras de lechuga recogidas. Los niveles de residuos encontrados se muestran en la Tabla 4.9, y se representan gráficamente en las Figuras 4.11 y 4.12.

Tabla 4.9.- Residuos de flufenoxuron encontrados durante la elaboración y almacenamiento de ensaladas cuarta gama de lechuga romana cuando se aplican BPA y CPA en el cultivo.

Práctica	Cuarta gama con atmósfera modificada					Almacenamiento	
	Lavado	Desinfección	Lavado	Centrifugado	Embolsado	5 d	10 d
BPA	0,20	0,22	0,32	0,19	0,13	0,08	0,09
CPA	0,39	0,41	0,43	0,20	0,21	0,20	0,19

En condiciones de BPA, se encontraron unos porcentajes remanentes del 25% en la bolsa final y del 69,2% a los 10 días de almacenamiento, de los niveles iniciales de cada proceso. Por lo tanto, hubo una disipación del 75% durante la elaboración y del 30,8% durante el almacenamiento.

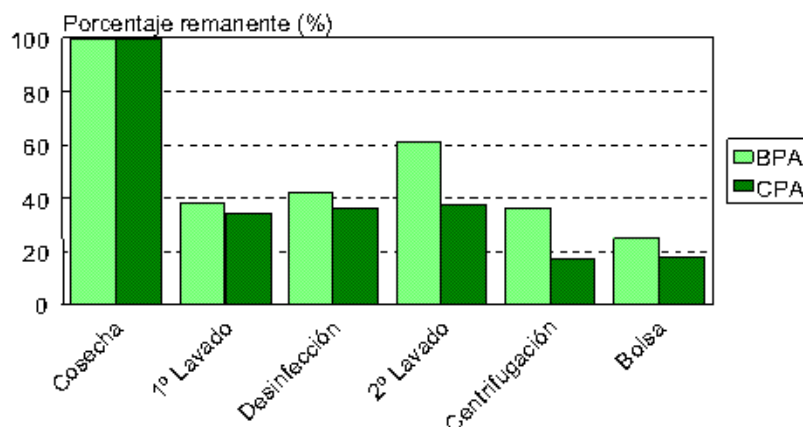


Figura 4.11.- Disipación de los residuos de flufenoxuron durante la elaboración de ensaladas cuarta gama con lechuga romana

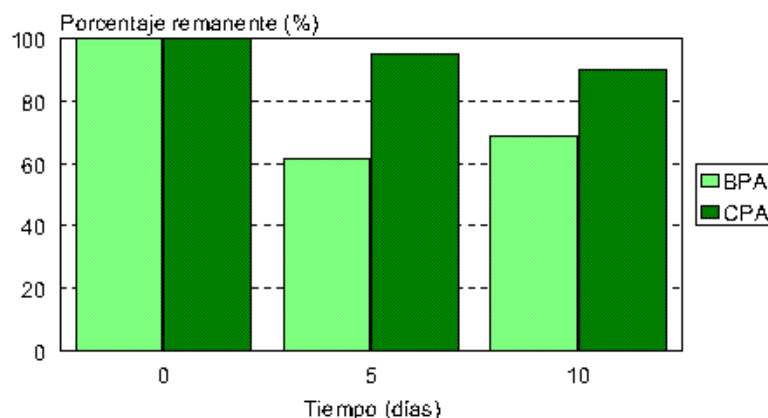


Figura 4.12.- Disipación de los residuos de flufenoxuron durante la caducidad de las ensaladas cuarta gama de lechuga romana

En las condiciones de CPA, después de la elaboración quedó un porcentaje remanente del 18,4% y del 90,5% a los 10 días de almacenamiento del producto. En consecuencia, se produjo una disipación del 81,6% y 9,5%, en el proceso de EAM y almacenamiento, respectivamente, respecto a los niveles iniciales en cada caso. Así, se puede establecer que la disipación de flufenoxuron se produce mayoritariamente durante la elaboración del producto y no en la conservación de las bolsas de ensalada fabricadas. Además, se observa que en la elaboración, es el primer lavado el que contribuye mayoritariamente a la eliminación de los residuos iniciales y en el almacenamiento, es en los cinco primeros días donde hay una disminución más significativa de éstos, que se mantiene hasta el final del periodo de caducidad de las ensaladas cuarta gama.

4.1.3. DIÁLISIS EN PATRONES, HORTALIZAS FRESCAS Y PROCESADAS.

En los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* realizados sobre muestras de lechuga fortificadas al nivel de los residuos del plazo de seguridad, condiciones críticas y productos elaborados (0,05-1 mg/kg), no se detectó la presencia del insecticida en el dializado. Muestras de pepino, pimiento y calabacín fortificadas al LQ (0,05 mg/kg) tampoco presentaron diálisis. En los ensayos realizados sobre estándares de concentración análoga a las muestras fortificadas, no se observó diálisis para los niveles de 0,05 y 0,1 mg/kg. Este proceso comenzó a partir de 0,25 mg/kg y continuó hasta 1 mg/kg. En ningún caso el porcentaje de RCI dializable superó el 7% de la cantidad sometida a diálisis. Los resultados se pueden observar en las Figuras 4.13, 4.14 y 4.15.

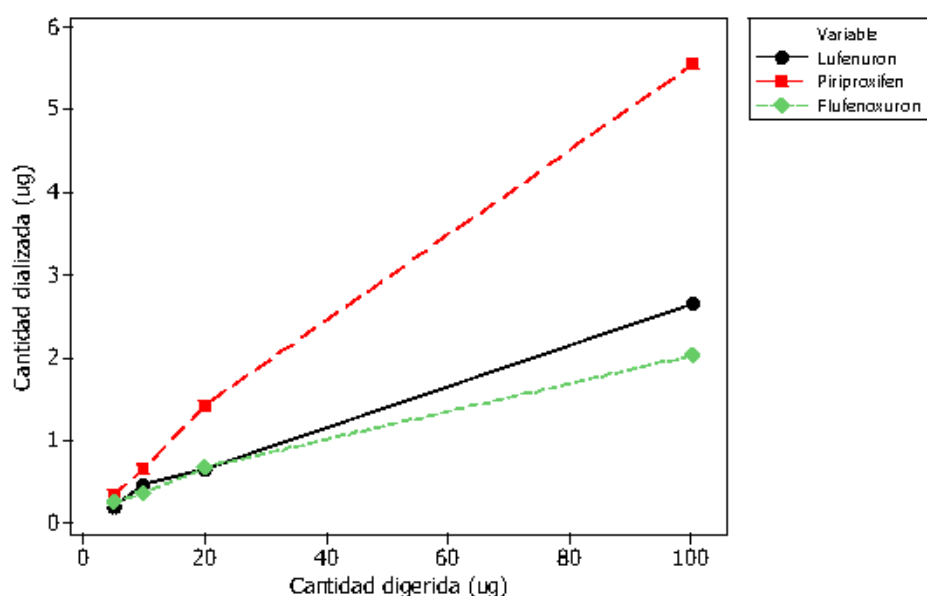


Figura 4.13.- Diálisis de cantidades de estándares análogas a las encontradas.

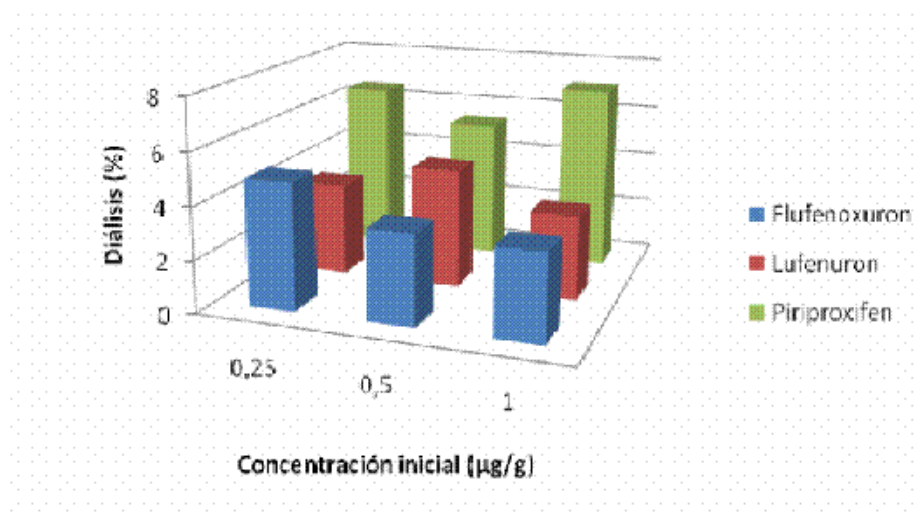


Figura 4.14.- Porcentajes de diálisis encontrados en estándares

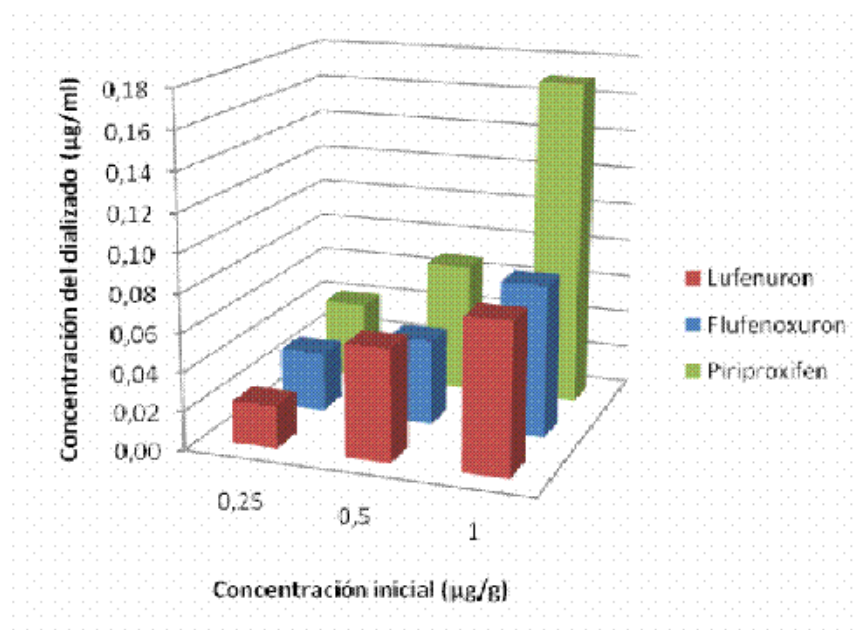


Figura 4.15.- Concentración del residuo encontrado en la membrana de diálisis en los estándares

Finalmente, se ensayaron cantidades crecientes de los plaguicidas en muestras de hortalizas hasta encontrar un intervalo de diálisis. Para flufenoxuron en lechuga y pepino, la diálisis fue detectada a partir de niveles de 70 mg/kg hasta 100 mg/kg. En cambio, el nivel mínimo de diálisis de flufenoxuron en pimiento fue 90 mg/kg. Lufenuron, análogo de flufenoxuron, dializó en pimiento a partir de niveles de 70 mg/kg. La diálisis de piriproxifen

en pimiento comenzó a partir de 7,5 mg/kg, pero en calabacín lo hizo a partir de 5 mg/kg. En ningún caso el porcentaje de diálisis superó el valor de 0,35%. Los resultados se presentan gráficamente en las Figuras 4.16, 4.17 y 4.18.

Se puede observar como al aumentar la concentración inicial en la muestra, el parámetro indicador de la capacidad de diálisis, llamado porcentaje de diálisis o porcentaje de compuesto dializable, no varía significativamente, excepto para aquellas muestras de gran concentración, donde el proceso de diálisis se vio favorecido por un importante efecto de difusión pasiva a favor de gradiente durante las 2 horas que duró esta etapa. Sin embargo, cuanto mayor es la cantidad de plaguicida sometida a digestión o mayor es la concentración inicial de la muestra, mayor es la cantidad de plaguicida dializado. Así, la concentración de los residuos en la membrana tubular de diálisis depende exclusivamente de la concentración de la muestra o de la cantidad digerida de forma directa, ya que el volumen de dializado no varió significativamente entre muestras.

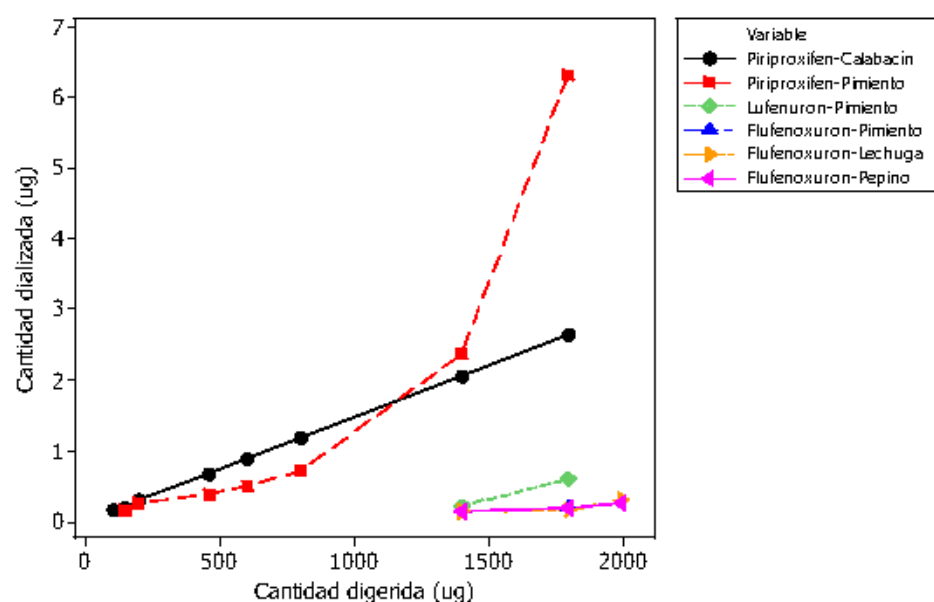


Figura 4.16.- *Diálisis en muestras de hortalizas fortificadas con estándares.*

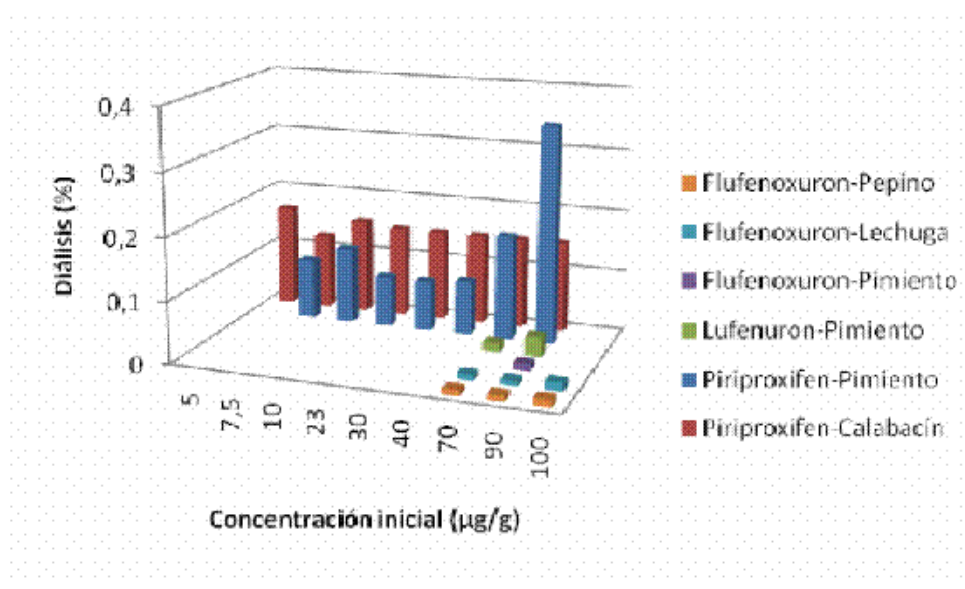


Figura 4.17.- Porcentajes de diálisis encontrados en hortalizas

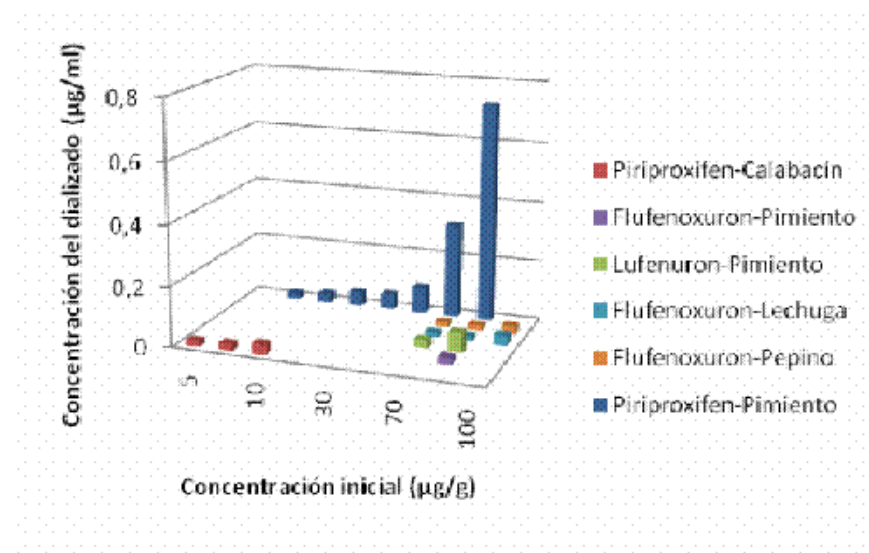


Figura 4.18.- Concentración del residuo encontrado en la membrana de diálisis en hortalizas

4.1.4. ESTUDIO DE DIETAS Y CÁLCULO DE INGESTAS.

En las Tablas 4.10 y 4.11, se exponen los valores del consumo anual y diario de los productos hortícolas estudiados.

Tabla 4.10.- Valores del consumo anual de las hortalizas en distintos ámbitos según el INE.

C = Consumo Anual (kg/persona · año)				
Ámbito	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Nacional	8,64	0,64	3,56	0,7
Murcia	8,08	3,15	2,92	0,66
Urbano	8,65	0,66	3,42	0,82
No urbano	8,62	1,48	3,7	0,56

Tabla 4.11.- Valores del consumo diario de las hortalizas en distintos ámbitos según el INE.

C/D = Consumo Diario (kg/persona · día)				
Ámbito	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Nacional	2,37E-02	1,80E-03	9,80E-03	1,90E-03
Murcia	2,21E-02	8,60E-03	8,00E-03	1,80E-03
Urbano	2,37E-02	1,80E-03	9,40E-03	2,20E-03
No urbano	2,36E-02	4,10E-03	1,01E-02	1,50E-03

En la Tabla 4.12, se exponen los valores de la relación entre la ingestión estimada y la diaria admisible (IDE/IDA).

Tabla 4.12.- Relación IDE/IDA en hortalizas a partir de la estimación de consumo del INE.

IDE/IDA de Flufenoxuron					
Ámbito	Alimento	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Nacional	Fresco BPA	3,73E-03	2,66E-05	1,48E-04	--
	Fresco CPA	8,18E-03	2,66E-05	1,77E-04	--
	Elaborado BPA	9,33E-04	2,66E-05	1,48E-04	--
	Elaborado CPA	1,51E-03	2,66E-05	1,48E-04	--
Murcia	Fresco BPA	3,49E-03	1,31E-04	1,21E-04	--
	Fresco CPA	7,65E-03	1,31E-04	1,45E-04	--
	Elaborado BPA	8,72E-04	1,31E-04	1,21E-04	--
	Elaborado CPA	1,41E-03	1,31E-04	1,21E-04	--
Urbano	Fresco BPA	3,73E-03	2,74E-05	1,42E-04	--
	Fresco CPA	8,19E-03	2,74E-05	1,70E-04	--
	Elaborado BPA	9,34E-04	2,74E-05	1,42E-04	--
	Elaborado CPA	1,51E-03	2,74E-05	1,42E-04	--
No urbano	Fresco BPA	3,72E-03	6,14E-05	1,54E-04	--
	Fresco CPA	8,16E-03	6,14E-05	1,84E-04	--
	Elaborado BPA	9,30E-04	6,14E-05	1,54E-04	--
	Elaborado CPA	1,50E-03	6,14E-05	1,54E-04	--

Tabla 4.12 (cont).- Relación IDE/IDA en hortalizas a partir de la estimación de consumo del INE.

IDE/IDA de Lufenuron					
Ámbito	Alimento	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Nacional	Fresco BPA	--	--	1,48E-04	--
	Fresco CPA	--	--	1,48E-04	--
	Elaborado BPA	--	--	1,48E-04	--
	Elaborado CPA	--	--	1,48E-04	--
Murcia	Fresco BPA	--	--	1,21E-04	--
	Fresco CPA	--	--	1,21E-04	--
	Elaborado BPA	--	--	1,21E-04	--
	Elaborado CPA	--	--	1,21E-04	--
Urbano	Fresco BPA	--	--	1,42E-04	--
	Fresco CPA	--	--	1,42E-04	--
	Elaborado BPA	--	--	1,42E-04	--
	Elaborado CPA	--	--	1,42E-04	--
No urbano	Fresco BPA	--	--	1,54E-04	--
	Fresco CPA	--	--	1,54E-04	--
	Elaborado BPA	--	--	1,54E-04	--
	Elaborado CPA	--	--	1,54E-04	--
IDE/IDA de Piriproxifen					
Ámbito	Alimento	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Nacional	Fresco BPA	--	--	1,48E-04	2,91E-05
	Fresco CPA	--	--	1,48E-04	2,91E-05
	Elaborado BPA	--	--	1,48E-04	2,91E-05
	Elaborado CPA	--	--	1,48E-04	2,91E-05
Murcia	Fresco BPA	--	--	1,21E-04	2,74E-05
	Fresco CPA	--	--	1,21E-04	2,74E-05
	Elaborado BPA	--	--	1,21E-04	2,74E-05
	Elaborado CPA	--	--	1,21E-04	2,74E-05
Urbano	Fresco BPA	--	--	1,42E-04	3,40E-05
	Fresco CPA	--	--	1,42E-04	3,40E-05
	Elaborado BPA	--	--	1,42E-04	3,40E-05
	Elaborado CPA	--	--	1,42E-04	3,40E-05
No urbano	Fresco BPA	--	--	1,54E-04	2,32E-05
	Fresco CPA	--	--	1,54E-04	2,32E-05
	Elaborado BPA	--	--	1,54E-04	2,32E-05
	Elaborado CPA	--	--	1,54E-04	2,32E-05

*En color amarillo se identifican los resultados calculados con una concentración de residuos hipotética igual al LQ (0,05 mg/kg) aunque esas muestras presentaron niveles inferiores en la realidad.

En ella, se puede comprobar que en ningún caso esta relación es superior a 8,19E-03, lo que supone un factor de seguridad de 122 en cuanto a la ingestión de estos insecticidas; siempre considerando los cálculos realizados con los valores estimados de consumo del INE.

Respecto a los valores calculados según las encuestas de hábitos de consumo realizadas en nuestra Región, en las Tablas 4.13 y 4.14, se exponen los consumos calculados en función de raciones y semanas disponibles, tanto anual como diario.

Tabla 4.13.- Consumo anual de hortalizas según las encuestas realizadas.

C = Consumo Anual (kg/persona · año)				
Ámbito	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Niños	6,24	4,13	0,87	5,01
Adolescentes	12,65	6,92	2,38	7,37
Adultos	13,09	10,31	6,72	17,68
Edad avanzada	11,87	8,14	6,50	10,61

Tabla 4.14.- Consumo diario de hortalizas según las encuestas realizadas.

C/D = Consumo Diario (kg/persona · día)				
Ámbito	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Niños	1,71E-02	1,13E-02	2,37E-03	1,37E-02
Adolescentes	3,47E-02	1,89E-02	6,53E-03	2,02E-02
Adultos	3,59E-02	2,83E-02	1,84E-02	4,84E-02
Edad avanzada	3,25E-02	2,23E-02	1,78E-02	2,91E-02

Finalmente y de forma análoga a lo realizado con la encuesta del INE, en la Tabla 4.15, se exponen los resultados de la relación IDE/IDA, calculada con los consumos valorados con las encuestas.

Tabla 4.15.- Relación IDE/IDA en hortalizas a partir de la valoración de las encuestas de consumo.

IDE/IDA de Flufenoxuron					
Ámbito	Alimento	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Niños	Fresco BPA	5,39E-03	3,42E-04	7,19E-05	--
	Fresco CPA	1,18E-02	3,42E-04	8,63E-05	--
	Elaborado BPA	1,35E-03	3,42E-04	7,19E-05	--
	Elaborado CPA	2,18E-03	3,42E-04	7,19E-05	--
Adolescentes	Fresco BPA	5,46E-03	2,87E-04	9,89E-05	--
	Fresco CPA	1,20E-02	2,87E-04	1,19E-04	--
	Elaborado BPA	1,37E-03	2,87E-04	9,89E-05	--
	Elaborado CPA	2,21E-03	2,87E-04	9,89E-05	--
Adultos	Fresco BPA	5,65E-03	4,28E-04	2,79E-04	--
	Fresco CPA	1,24E-02	4,28E-04	3,35E-04	--
	Elaborado BPA	1,41E-03	4,28E-04	2,79E-04	--
	Elaborado CPA	2,28E-03	4,28E-04	2,79E-04	--
Edad avanzada	Fresco BPA	5,13E-03	3,38E-04	2,70E-04	--
	Fresco CPA	1,12E-02	3,38E-04	3,24E-04	--
	Elaborado BPA	1,28E-03	3,38E-04	2,70E-04	--
	Elaborado CPA	2,07E-03	3,38E-04	2,70E-04	--

Tabla 4.15 (cont).- Relación IDE/IDA en hortalizas a partir de la valoración de las encuestas de consumo.

IDE/IDA de Lufenuron					
Ámbito	Alimento	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Niños	Fresco BPA	--	--	7,19E-05	--
	Fresco CPA	--	--	7,19E-05	--
	Elaborado BPA	--	--	7,19E-05	--
	Elaborado CPA	--	--	7,19E-05	--
Adolescentes	Fresco BPA	--	--	9,89E-05	--
	Fresco CPA	--	--	9,89E-05	--
	Elaborado BPA	--	--	9,89E-05	--
	Elaborado CPA	--	--	9,89E-05	--
Adultos	Fresco BPA	--	--	2,79E-04	--
	Fresco CPA	--	--	2,79E-04	--
	Elaborado BPA	--	--	2,79E-04	--
	Elaborado CPA	--	--	2,79E-04	--
Edad avanzada	Fresco BPA	--	--	2,70E-04	--
	Fresco CPA	--	--	2,70E-04	--
	Elaborado BPA	--	--	2,70E-04	--
	Elaborado CPA	--	--	2,70E-04	--
IDE/IDA de Piriproxifen					
Ámbito	Alimento	Lechuga	Pepino	Pimiento	Calabacín
Niños	Fresco BPA	--	--	7,19E-05	4,16E-04
	Fresco CPA	--	--	7,19E-05	4,16E-04
	Elaborado BPA	--	--	7,19E-05	4,16E-04
	Elaborado CPA	--	--	7,19E-05	4,16E-04
Adolescentes	Fresco BPA	--	--	9,89E-05	3,06E-04
	Fresco CPA	--	--	9,89E-05	3,06E-04
	Elaborado BPA	--	--	9,89E-05	3,06E-04
	Elaborado CPA	--	--	9,89E-05	3,06E-04
Adultos	Fresco BPA	--	--	2,79E-04	7,34E-04
	Fresco CPA	--	--	2,79E-04	7,34E-04
	Elaborado BPA	--	--	2,79E-04	7,34E-04
	Elaborado CPA	--	--	2,79E-04	7,34E-04
Edad avanzada	Fresco BPA	--	--	2,70E-04	4,40E-04
	Fresco CPA	--	--	2,70E-04	4,40E-04
	Elaborado BPA	--	--	2,70E-04	4,40E-04
	Elaborado CPA	--	--	2,70E-04	4,40E-04

*En color amarillo se identifican los resultados calculados con una concentración de residuos hipotética igual al LQ (0,05 mg/kg) aunque esas muestras presentaron niveles inferiores en la realidad.

Los resultados son similares a los obtenidos anteriormente, aunque el valor máximo de la relación en este caso es 1,24E-02, lo que supone un factor de seguridad entre ingestión y toxicidad crónicas de 81. La diferencia con los resultados anteriores se debe a diferencias metodológicas entre las encuestas de consumo de las dos fuentes.

4.1.5. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en la validación del método analítico, basado en una microextracción en línea, fiable, sencilla y rápida, se puede asegurar que es suficientemente preciso, sensible y exacto para el propósito de esta experiencia. Cumple los requisitos establecidos en la Guía SANCO para el rango seleccionado (0,05-1 mg/kg), suficientemente amplio para abarcar los niveles de residuos encontrados. Por tanto, la metodología desarrollada fue eficaz para alcanzar el objetivo de esta experiencia.

Los resultados obtenidos en pimiento y calabacín indican que no se sobrepasan los LMR en ninguno de los tratamientos realizados y que no se detectaron residuos en la muestras de los cultivos tratados en condiciones de BPA. Si se consideran los residuos antes de la cosecha y el hecho de que la duración máxima de los plazos de seguridad en ambos cultivos fue 7 días, se puede afirmar que se trata de productos de rápida degradación y baja persistencia en estas hortalizas. Además, tanto flufenoxuron como piriproxifen mostraron tendencias similares para la disipación de residuos en pimiento durante el intervalo de tiempo previo a la cosecha. Debido a una acelerada degradación de los residuos de lufenuron en pimiento y de piriproxifen en calabacín, no se encontraron niveles de estos compuestos en las muestras de campo, cuando se aplicaron bajo normas de BPA. Las diferencias en los niveles de residuos de piriproxifen en calabacín y pimiento se puede explicar por las diferencias en las dosis de aplicación (3.125 y 892,85 l/ha, respectivamente) y los cultivos (mayor proporción de superficie/masa en pimiento que en calabacín), a pesar de el hecho de que la dosis aplicada fue la misma (0,05%).

En el segundo tratamiento en el momento de la cosecha y el muestreo 2 horas más tarde, tratando de reproducir una situación de peligro para el consumidor, se obtuvieron aproximadamente los mismos niveles que el día de la aplicación del primer tratamiento (concentraciones residuales en las hortalizas inferiores al LQ). Sólo se encontraron residuos superiores al LQ para flufenoxuron en pimiento (0,06 mg/kg). Por lo tanto, incluso en las condiciones menos favorables para la cosecha no hubo infracción de los LMR. En el proceso de congelación y almacenamiento, las hortalizas con niveles

superiores al LQ, caso de flufenoxuron en pimiento bajo CPA, después de la primera etapa o lavado inicial, el nivel de residuos disminuyó por debajo del LQ. De este modo, el proceso de congelación contribuyó a la disipación de los residuos en el producto elaborado.

Los niveles de residuos obtenidos en los estudios de campo de lechuga y pepino revelaron diferencias significativas en la disipación entre hortalizas de hoja y cucurbitáceas de piel comestible. Aunque las dosis aplicadas fueron similares en lechuga y pepino (854,5 y 836,2 l/ha, respectivamente) para la misma concentración de plaguicida (0,075%), los niveles de residuos fueron claramente inferiores en el segundo. Esto se debe a las diferentes morfologías de los dos tipos de hortalizas. La morfología del pepino hace que la adsorción del insecticida sea más difícil que en las hojas de la lechuga. Así pues, los factores ambientales pudieron tener una mayor incidencia en la degradación del compuesto en el pepino que en la lechuga. Por otra parte, el pepino muestra un mayor factor de dilución en su crecimiento que una hortaliza de hoja como la lechuga.

Los resultados indican que los residuos de flufenoxuron encontrados a plazo de seguridad, para los tratamientos realizados bajo BPA, cumplieron los LMR permitidos. Al considerar los niveles de residuos hasta la cosecha, y teniendo en cuenta que el plazo de seguridad para estas hortalizas es de 7 días, los resultados obtenidos muestran que flufenoxuron es un producto de rápida degradación y baja persistencia en estos alimentos. Los niveles de residuos obtenidos para el segundo tratamiento fueron aproximadamente los iniciales del primer tratamiento. En los ensayos de campo bajo CPA, sólo flufenoxuron presentó un nivel en lechuga (1,14 mg/kg) cercano a su LMR (1 mg/kg). Cabe remitirse a la interpretación que realizan los Estados miembros de la UE en cuanto a la evaluación de residuos en alimentos, indicándose una incertidumbre por defecto del 50% (correspondiente al 95% de nivel de confianza) para estos casos, a falta de una estimación más concreta y siempre que los criterios de calidad analítica se hayan cumplido (DG SANCO, 2007). Por lo tanto, podría no considerarse este nivel como una infracción del LMR. Definitivamente, el proceso de elaboración de productos de cuarta gama contribuyó eficazmente en la desaparición de los residuos en aquellas muestras que presentaron

niveles superiores al LQ al comienzo del proceso, caso de flufenoxuron en lechuga para las dos prácticas agrícolas; principalmente mediante el lavado inicial o primera etapa del proceso. Durante el período de almacenamiento, no se apreciaron variaciones significativas en los residuos de flufenoxuron en los productos elaborados.

Se debe señalar que las diferencias en los niveles de flufenoxuron encontrados en lechuga y pimiento se deben a diferencias morfológicas entre los cultivos. Pimiento presenta menores niveles que lechuga porque su factor de dilución es mayor y porque la fijación en el fruto es más difícil, y por tanto la incidencia de los factores ambientales en la desaparición del residuo es mayor, a pesar de que la tasa aplicada fue mayor en pimiento (3.125 l/ha) que en lechuga (854,54 l/ha) para una misma dosis del ingrediente activo (0,075%).

No se detectó biodisponibilidad *in vitro* de los insecticidas a partir de muestras que contenían los niveles de residuos determinados tras los tratamientos fitosanitarios y/o procesado. La diálisis comenzó a niveles que en ningún caso presentaban las muestras (5 mg/kg).

En los ensayos de biodisponibilidad *in vitro*, se observó que la diálisis de piriproxifen comenzó a distintas concentraciones para calabacín y pimiento, encontrándose en calabacín menor efecto matriz que en pimiento para este compuesto. En cambio, se observó que la diálisis de flufenoxuron comenzó a la misma concentración en lechuga y pepino, y que para concentraciones iguales de la muestra, los valores de diálisis son muy similares. Sin embargo, comparando los valores de diálisis de flufenoxuron entre las tres hortalizas donde se estudió, se demuestra que en pimiento disminuye su capacidad de diálisis frente a lechuga y pepino.

Todas las hortalizas impidieron significativamente la diálisis de los tres compuestos, en comparación a cuando éstos se ensayaron en disolvente.

Entre los tres productos, piriproxifen es el compuesto donde mayor índice de biodisponibilidad *in vitro* se observa. Para una misma matriz, pimienta, piriproxifen presentó un valor medio de porcentaje de RCI dializable 6 veces superior al de lufenuron y éste 2 veces superior al de flufenoxuron.

Los resultados indican que la biodisponibilidad de los compuestos está influida por su naturaleza química, concentración en la muestra, características de la matriz donde se estudia y selectividad de la membrana de diálisis.

En los estudios de consumo realizados con los datos proporcionados por el INE se obtiene un factor de seguridad de 122 entre la IDA e IDE de cada producto para las hortalizas seleccionadas. Con las encuestas practicadas, este factor se queda en 81, debido a diferencias metodológicas entre ambas estadísticas. Por tanto, ambos cálculos indican un factor de seguridad muy amplio entre la ingestión de estos productos y su riesgo de toxicidad crónica para un consumidor que abarca todas las zonas de residencia y principales grupos de población.

4.1.6. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.

4.1.6.1. COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Barba, A., Morillas, J., Zafrilla, P. 2006. *In vitro availability of insect growth regulators from vegetables*. 58th International Symposium on Crop Protection, Ghent (Belgium).

Mulero, J., Payá, P., Oliva, J., Barba, A., Morillas, J., Zafrilla, P. 2005. *Estudio de biodisponibilidad "in vitro" de insecticidas reguladores del crecimiento en cultivos de hortalizas*. I Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria, Murcia (España).

Payá, P., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M.A. 2005. *Analytical methodology for the control of fenoxycarb, flufenoxuron, lufenuron and pyriproxifen residues by HPLC-DAD*. 4th International Symposium of Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries and MGPR Annual Meeting 2005, Aydın (Turkey).

Payá, P., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M.A. 2005. *Disappearance of three IGRs residues in pepper and zucchini by vegetable freezing*. 4th International Symposium of Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries and MGPR Annual Meeting 2005, Aydın (Turkey).

Payá, P., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M.A. 2005. *Influence of modified atmosphere processing (MAP) in the elimination of IGRs residues in cucumber and lettuce*. 4th International Symposium of Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries and MGPR Annual Meeting 2005, Aydın (Turkey).

4.1.6.2. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.

Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Barba, A., Morillas, J., Zafrilla, P. 2006. *In vitro availability of insect growth regulators from vegetables*. Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University, 71(2B), 549-553.

4.1.6.3. CAPÍTULOS DE LIBRO.

Mulero, J., Payá, P., Oliva, J., Barba, A., Morillas, J., Zafrilla, P. 2005. *Estudio de biodisponibilidad "in vitro" de insecticidas reguladores del crecimiento en cultivos de hortalizas*. En: Libro de actas I Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria, ISBN 84-923537-8-3. Ed. Iltre. Colegio Oficial de Veterinarios de la Región de Murcia, Murcia, España, pp. 107.

4.2. PERSISTENCIA, DEGRADACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE FENOXICARB, FLUFENOXURON, LUFENURON Y PIRIPROXIFEN EN MANDARINA Y NARANJA Y SUS PREPARADOS EN CONSERVA Y ZUMO.

Los cítricos (frescos o refrigerados) son el segundo grupo de alimentos al que las familias españolas destinan más dinero anualmente (1.107.209.120 €), dentro de las frutas y hortalizas, según la última encuesta de gasto familiar (INE, 2005). Si se consideran las estadísticas de producción del MAPA, se observa que para mandarina y naranja la producción ha aumentado significativamente en los últimos años (1990-2005), hasta llegar en 2005 a cantidades del orden de $2 \cdot 10^6$ Tm (MAPA, 2006b).

En la Región de Murcia, los cítricos suponen el 50% de los cultivos leñosos, con una producción de 818.119 Tm anuales aproximadamente y por tanto son base de nuestra riqueza comercial, según datos de la Consejería de Agricultura y Agua de la Comunidad Autónoma de Murcia en el 2003 (CARM, 2006). Dentro de ellos, los de mayor producción, son, por este orden, el limonero, el naranjo y el mandarino.

El Departamento de Agricultura de EE.UU. en sus estimaciones del año 2005 sobre el consumo per cápita de alimentos frescos y procesados, referidos a peso fresco equivalente para la población estadounidense, estableció que una persona consume al año 36 kg de naranja e híbridos, de los cuales el 86% los toma en procesado y el resto en

fresco. El consumo de mandarinas e híbridos per cápita anual es 1,6 kg, de los que se consumieron el 70% en fresco y el resto como procesado. Además, se destaca como forma de procesamiento la elaboración de zumo de naranja (USDA, 2007b). Podemos considerar, por tanto, que la ingestión de zumos de naranja y mandarina en la dieta habitual es elevada y justifica la necesidad de conocer la exposición del consumidor a los residuos de plaguicidas presentes en ellos.

Esta experiencia tiene por finalidad el estudio de los residuos de fenoxicarb, flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen en los cultivos de mandarina y naranja, tanto en la fase de campo como durante su transformación en conservas y zumos, para finalmente evaluar el riesgo toxicológico que supondría para el consumidor.

4.2.1. ESTUDIOS DE CAMPO Y PROCESADO.

En los ensayos supervisados de campo, se aplicaron los productos fitosanitarios autorizados para ambos cultivos: flufenoxuron, lufenuron, piriproxifen y fenoxicarb (MAPA, 2008a). En la Tabla 4.16 se resumen las características más significativas de los formulados utilizados.

Tabla 4.16.- Características de registro de los plaguicidas estudiados en cítricos.

RCI (m.a.)	Fórmula	Plaga	Dosis (%)	LMR (mg/kg)	PS (días)
Fenoxicarb	Insegar	Caparreta, <i>phyllocnistis</i> , piojos	0,02-0,06	2	45
Flufenoxuron	Cascade	Ácaros, <i>phyllocnistis</i>	0,025-0,1	0,3	28
Lufenuron	Match	Mosca blanca, <i>phyllocnistis</i>	0,1-0,15	0,3	28
Piriproxifen	Atominal	Caparreta, piojos, serpeta	0,025-0,075	0,5	30

m.a.: Materia activa. PS: Plazo de seguridad.

Las parcelas experimentales ubicadas en fincas productoras de la Región de Murcia, seleccionadas como representativas del cultivo, fueron divididas en un área control y un área de aplicación. Las parcelas control estaban situadas lo suficientemente cerca de las parcelas tratadas como para garantizar idéntico cultivo y condiciones climáticas, pero suficientemente separadas para excluir cualquier riesgo de contaminación cruzada procedente de la aplicación. Las características de las parcelas utilizadas se exponen en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17.- Características de las parcelas experimentales.

Árbol	Mandarino	Naranja
Forma de Cultivo	Aire libre	Aire libre
Siembra	Injerto	Injerto
Antigüedad (años)	5	10
Localización	Cabezo de Torres (Murcia)	Casas Nuevas (Murcia)
GPS (°N; °W; m)	38,0349; 1,11534; 72	37,86426; 1,32863; 168
Área (m²)	27	49,5
Marco (m)	1,5 x 3	4,5 x 5,5

El muestreo de las parcelas se realizó al azar, tomando muestras representativas de las parcelas en su totalidad, incluyendo tanto frutos cubiertos por hojas como aquellos más expuestos a la luz, evitándose los puntos de inicio y final de la aplicación por posibles derivas. Las muestras fueron recogidas con medidas adecuadas de protección, evitando contaminaciones entre áreas y procurando una mínima manipulación. Se muestreó en orden creciente de dosis de aplicación, de manera que primero se tomó muestra en el área control y después en el área de aplicación. Una vez recogidas, fueron envasadas en bolsas opacas de polietileno inequívocamente identificadas. Durante el transporte al laboratorio, las bolsas se mantuvieron a temperatura ambiente, en posición estable, protegiéndolas de golpes y se evitó su exposición directa a la luz. Se recogieron 2 kg de frutos por muestra, resultado de al menos 12 unidades procedentes de más de 4 árboles por área de ensayo, de acuerdo con las recomendaciones de FAO para la realización de ensayos supervisados para estos cultivos (FAO, 1990), excepto en el caso de la muestra dedicada a la industrialización para la que se recogieron 10 kg.

Los primeros ensayos supervisados realizados en las parcelas fueron siguiendo el código de BPA (FAO, 2003b; CARM, 2003). Para ello, se respetaron dichas normas y las dosis y plazos de seguridad registrados en cada caso. Las dosis aplicadas se encontraban situadas en el punto medio o máximo del intervalo permitido por el MAPA. Las dosis de aplicación de piriproxfen, flufenoxuron, lufenuron y fenoxicarb en ambos cultivos fueron 0,05%, 0,05%, 0,15% y 0,04%, respectivamente. Se realizó un muestreo periódico desde el momento de la aplicación hasta transcurrido el plazo de seguridad permitido. La primera muestra se recogió 2 h después de la aplicación, considerado como tiempo de secado para que el producto quede fijado en la planta. En la toma de muestra a plazo de seguridad, se

recogió una muestra adicional que sería sometida al procesado alimentario. Se registraron las condiciones ambientales más relevantes para el tratamiento como temperatura ambiental y humedad relativa.

En los ensayos supervisados en situación de CPA, se introdujeron dos condiciones críticas desde el punto de vista de la presencia de residuos en los cultivos: por un lado, en el día que cumplía el plazo de seguridad en el ensayo bajo BPA, y una vez que éste había finalizado, se aplicaron de igual forma las dosis anteriores sobre los cultivos y por otro, se recogieron muestras 2 h después; una destinada al análisis en el laboratorio y otra que ingresaría en el procesado alimentario, de manera que no se respetaron los plazos de seguridad preceptivos en ningún caso.

Las condiciones en las que se practicaron ambos tipos de ensayo se pueden observar en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18.- Condiciones de los ensayos realizados bajo BPA y CPA en cítricos.

Cultivo	V(l)	Dosis (l/ha)		Tª (°C)		Humedad (%)		Muestreo (días)	
		BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
Mandarina	25,6	1306,2	1306,2	21	22	80	29	0-3-7-14-21-28-30-45	0
Naranja	25	1683,5	1683,5	18	7	63	57	0-3-7-14-21-28-30-45	0

Diversos autores han confirmado el efecto de los procesos de pelado y lavado, así como de los que implican cambios de temperatura (esterilización y pasteurización), en la desaparición de los residuos de plaguicidas en los alimentos, ya que suelen suponer la separación de los depósitos de los compuestos y/o la destrucción de su molécula (Coscollá y Coscollá, 2006; Timme y Walz-Tylla, 2004; Chavarri et al., 2005); por ello, a continuación se estudian las variaciones que sufren los residuos de los insecticidas seleccionados como consecuencia de los procesos de industrialización a los que se someten los cítricos.

Las experiencias de procesado y manipulación para obtener conservas y zumos se realizaron tal y como lo hace la industria alimentaria, separadamente para cada cultivo y cada tipo de tratamiento en origen, siempre en orden creciente de dosis de aplicación, para evitar riesgos de contaminación. La elaboración de conserva de mandarina se realizó en la planta industrial piloto que posee el Centro Tecnológico Nacional de la Conserva de la Región de Murcia. El zumo de naranja fue elaborado a escala de laboratorio. En todos los casos se respetaron las condiciones de asepsia requeridas en cuanto a material y personal para procesos de transformación alimentaria de este tipo. Los procesos fueron secuenciales, recogiendo una muestra de 1 kg en cada etapa influyente en la disipación de residuos.

La elaboración de conservas de mandarina incluyó una fase de pelado y desgajado manual, seguida de lavado con agua osmótica; una fase de pelado químico, consistente en un lavado con solución de HCl 0,2% a 30 °C durante 35-40 min; tres lavados con agua osmótica; lavado con solución de NaOH 0,2% a 34 °C durante 15 minutos y cuatro lavados con agua osmótica; embotado de los gajos de mandarina limpios (290 g) con el líquido de gobierno, almíbar a 26 °Bx en caliente (95 °C), junto con ácido cítrico 1 ‰; y finalmente, esterilización de las conservas durante 10 min a 87 °C. El proceso de elaboración del zumo de naranja consistió en cepillado y lavado de las naranjas; exprimido; tamización del jugo por 0,25 mm de luz; pasteurización durante 5 min a 85 °C; embotellado y enfriamiento con agua a temperatura ambiente. En las Figuras 4.19 y 4.20 se muestran esquemas de ambos procesados.

Los productos elaborados fueron conservados durante su vida útil en lugar fresco y seco. Durante este periodo, los productos fueron muestreados y analizados, tomando 1 kg por muestra.

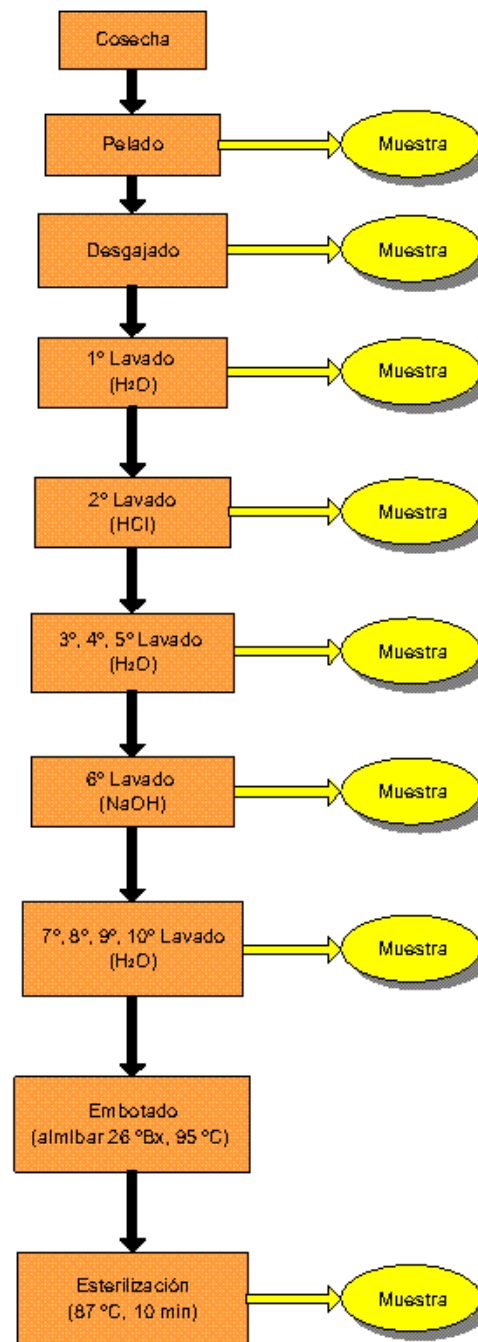


Figura 4.19.- *Elaboración de satsuma en conserva*

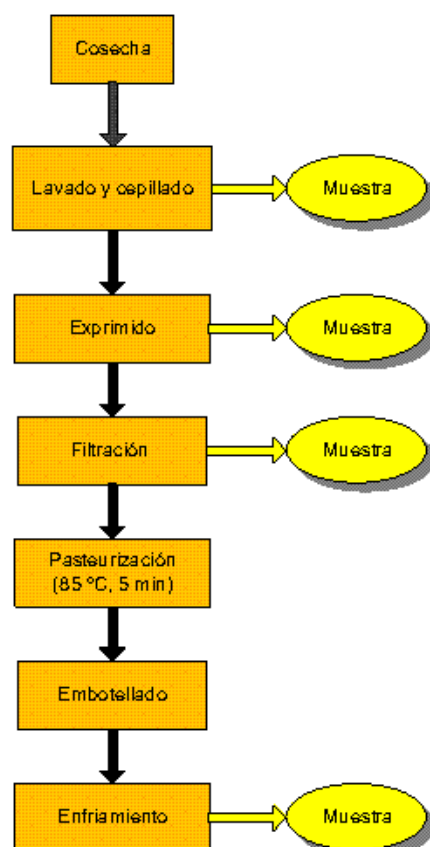


Figura 4.20.- *Elaboración industrial de zumo de naranja a escala de laboratorio*

4.2.2. ANÁLISIS DE RESIDUOS.

En este apartado se muestran los resultados de los análisis de residuos realizados en las experiencias de campo y de procesado, junto con los valores de la validación analítica y de los controles de calidad.

4.2.2.1. VALIDACIÓN ANALÍTICA.

La metodología analítica, basada en una extracción en fase sólida y determinación por CL-DAD, fue validada teniendo en cuenta los criterios descritos en la Guía SANCO y la norma internacional ISO 17025:2005 (ISO, 2005; DG SANCO, 2007). En todos los casos, el

LQ se fijó en 0,1 mg/kg y el LD estuvo comprendido entre 0,8 y 1,6 ng, tal y como se muestra en la Tabla 4.19.

Tabla 4.19.- Límites de detección y cuantificación en cítricos.

Matriz	RCI	LD (ng)	LQ _T (mg/kg)	LQ _E (mg/kg)
Mandarina	Fenoxicarb	1,61	0,14	0,10
	Lufenuron	1	0,08	0,10
	Piriproxifen	1,22	0,10	0,10
	Flufenoxuron	1,22	0,10	0,10
Naranja	Fenoxicarb	1,61	0,14	0,10
	Lufenuron	1,21	0,10	0,10
	Piriproxifen	1,41	0,12	0,10
	Flufenoxuron	0,81	0,07	0,10

LQ_T establecido teóricamente. LQ_E fijado experimentalmente.

La linealidad de respuesta del detector se estudió en el intervalo de concentración de 0,1-2 mg/kg para ambas matrices. Se emplearon multipatrones para fortificar las muestras en blanco previamente analizadas. En ambas matrices, la precisión y exactitud fueron estudiadas en 0,1 mg/kg y 2 mg/kg con cinco réplicas por nivel y análogamente se realizó con patrones. En la Tabla 4.20, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.20.- Resultados de la validación analítica en cítricos.

Matriz/ Plaguicida	Parámetros (%)	R ²	RSD Repetibilidad		RSD Intra- Reproducibilidad		Recuperación Media	
	Nivel (ppm)		0,1	2	0,1	2	0,1	2
Patrón en disolvente	Fenoxicarb	100	1,2	0,4	1,2	0,4	--	--
	Flufenoxuron	100	1,8	0,3	1,5	0,4	--	--
	Lufenuron	100	1,5	0,1	1,9	0,2	--	--
	Piriproxifen	100	0,9	0,2	1,1	0,3	--	--
Mandarina	Fenoxicarb	--	8,2	4,3	12,4	4,8	97,6	73,4
	Flufenoxuron	--	16,7	4,4	6,2	3,6	85,7	71,7
	Lufenuron	--	16,1	3,5	7,7	1,9	79,3	71,7
	Piriproxifen	--	6,0	2,6	9,5	2,2	126,4	79,3
Naranja	Fenoxicarb	--	13,0	8,9	2,1	11,6	102,8	75,0
	Flufenoxuron	--	16,7	6,6	18,2	7,6	87,3	73,0
	Lufenuron	--	16,5	5,6	6,5	13,8	86,5	72,7
	Piriproxifen	--	7,2	9,1	17,2	7,4	101,5	77,5

Como podemos comprobar, los niveles validados (0,1 y 2 mg/kg) cubrieron los LMRs fijados para mandarina y naranja (0,3-2 mg/kg). El LQ (0,1 mg/kg) fue para todas las combinaciones plaguicidas-matriz siempre igual o inferior al LMR pertinente. Los coeficientes de correlación lineal fueron del 100%, indicando una respuesta lineal del detector adecuada para cada plaguicida en el intervalo analítico estudiado. La precisión en patrones fue muy consistente, siendo el RSD menor del 2% en todos los casos.

La repetibilidad en muestras fortificadas presentó valores de RSD inferiores al 20%, con la mayoría de éstos inferiores al 10%. La recuperación media se mantuvo mayoritariamente entre 70-120%, con un valor mínimo de 71,7% para flufenoxuron y lufenuron en mandarina a 2 mg/kg y un máximo de 126,4% para piriproxifen en mandarina a 0,1 mg/kg, cuyo valor fue el único que rebasó ligeramente el límite superior del criterio de aceptación. Sin embargo, este resultado se consideró válido teniendo en cuenta la gran carga de interferentes de la matriz y su gran consistencia en la recuperación (RSD = 6%). Finalmente, los valores de RSD en la reproducibilidad intra-laboratorio de las fortificaciones fueron menores del 20%, con la mayor parte inferiores al 10%, aunque flufenoxuron y piriproxifen en naranja al nivel de 0,1 mg/kg presentaron un valor cercano al 20%.

4.2.2.1.1. Controles de calidad.

En todos los casos, las recuperaciones de los controles de calidad estuvieron comprendidos entre 70-120%, destacando las altas recuperaciones, próximas al 120%, de piriproxifen en naranja y mandarina y fenoxicarb en naranja al nivel de 0,1 mg/kg. En la Tabla 4.21, se pueden observar los valores medios.

Tabla 4.21.- Media de los resultados de los controles de calidad analizados en el laboratorio.

Control de calidad	Nivel (mg/kg)	Recuperación media (%)			
		Lufenuron	Piriproxifen	Flufenoxuron	Fenoxicarb
Mandarina	0,1	86,9	118,6	94,5	90,7
	2	73,1	79,0	71,1	72,2
Naranja	0,1	74,1	119,0	82,1	119,5
	2	74,5	73,5	70,7	78,9

Las inyecciones de blancos de matriz y disolvente y una adecuada calibración durante los análisis de las muestras confirmaron la ausencia de contaminaciones o interferencias.

4.2.2.2. RESIDUOS EN PRODUCTO FRESCO.

La Tabla 4.22 muestra los resultados de los residuos de RCIs encontrados en los productos en fresco durante los ensayos de campo.

Tabla 4.22.- Residuos de RCIs encontrados en los cultivos de mandarina y naranja durante los ensayos de campo supervisados cuando se aplican BPA y CPA.

Ensayo de campo Muestra (mg/kg)	BPA						CPA
	2 h	3 d	7 d	14 d	21 d	PS*	2 h
Fenoxicarb/Mandarina	0,22	0,19	0,17	0,16	0,12	0,10	0,24
Lufenuron/Mandarina	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,19
Piriproxifen/Mandarina	0,11	0,11	0,11	0,10	0,10	0,10	0,18
Flufenoxuron/Mandarina	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,10
Fenoxicarb/Naranja	0,19	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,35
Lufenuron/ Naranja	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,55
Piriproxifen/ Naranja	0,17	0,16	0,15	0,13	0,10	< LQ	0,17
Flufenoxuron/Naranja	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,10

* Plazo de seguridad.

En condiciones de BPA, no se superaron los LMRs fijados para los plazos de seguridad establecidos en ningún caso. Igualmente ocurrió en la situación de CPA, aunque en el caso de lufenuron en naranja la concentración fue casi el doble del LMR correspondiente (0,3 mg/kg), pero aplicando las condiciones de incertidumbre de SANCO (DG SANCO, 2007), no rebasaría el LMR. Asimismo, se debe destacar que no se encontraron residuos de lufenuron y flufenoxuron iguales o superiores al LQ a lo largo del ensayo bajo BPA, en ambos cultivos. En cambio, sí se encontraron todos en la aplicación bajo CPA.

En las Figuras 4.21, 4.22, 4.23 y 4.24, se muestran las representaciones de las curvas de disipación de los residuos encontrados.

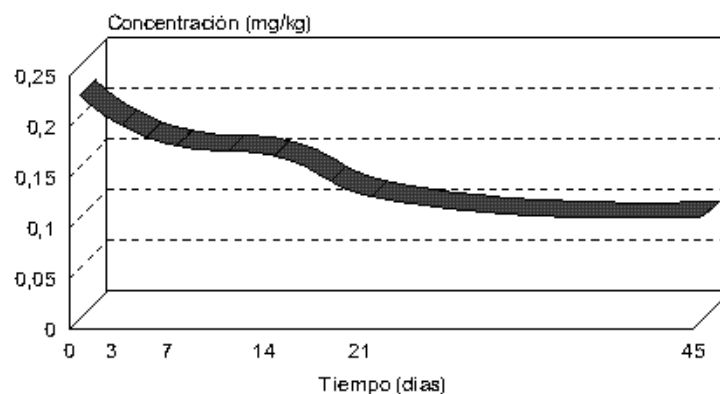


Figura 4.21.- Curva de disipación del residuo de fenoxicarb en el cultivo de mandarina durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

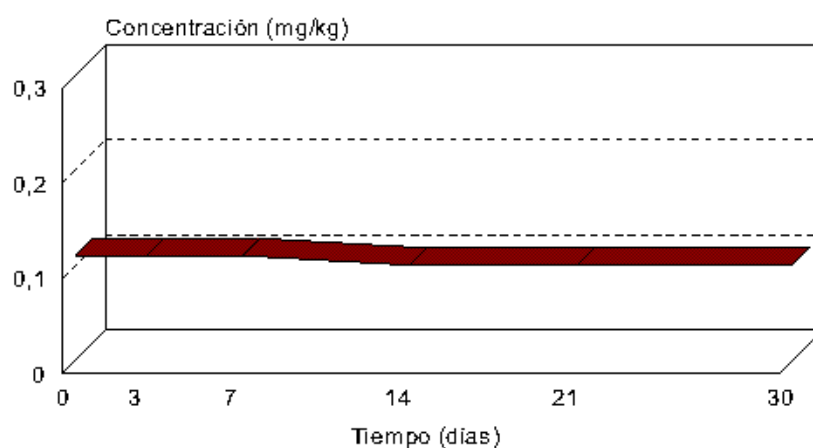


Figura 4.22.- Curva de disipación del residuo de piriproxifen en el cultivo de mandarina durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

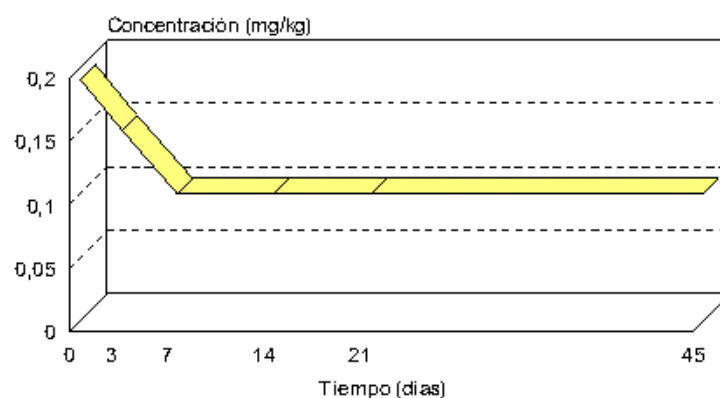


Figura 4.23.- Curva de disipación del residuo de fenoxicarb en el cultivo de naranja durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

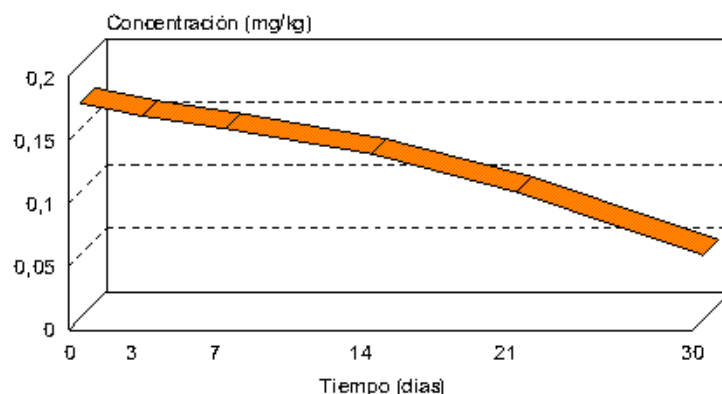


Figura 4.24.- Curva de disipación del residuo de piriproxifen en el cultivo de naranja durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

En las Figuras 4.25, 4.26 y 4.27 se representan las rectas de regresión en función de los datos obtenidos. Para todas ellas, los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,9.

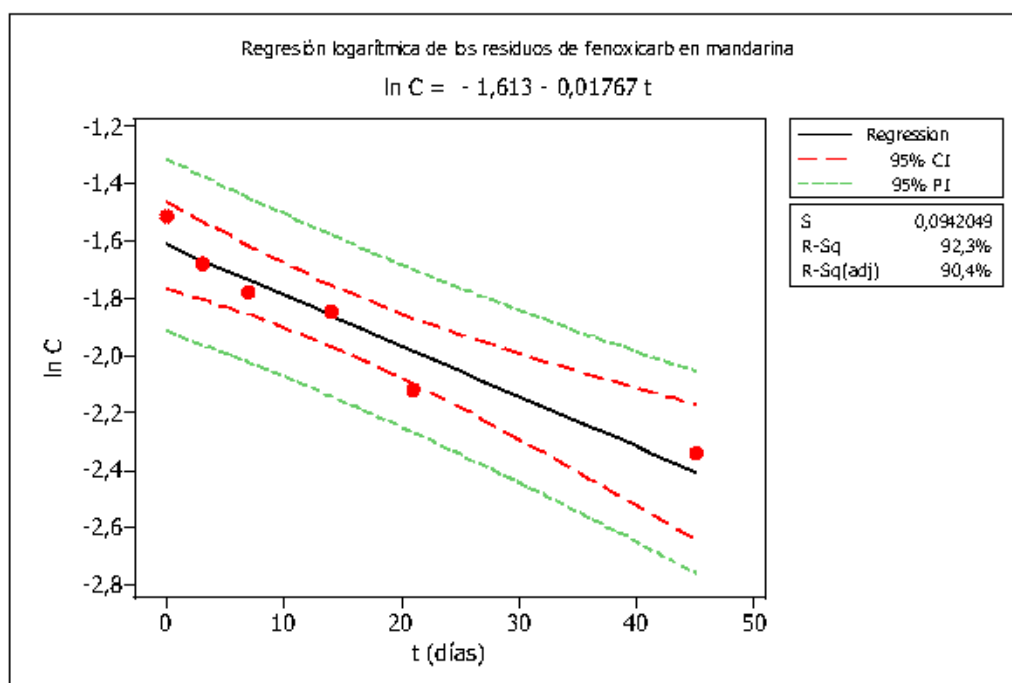


Figura 4.25.- Modelo de disipación exponencial para los residuos de fenoxicarb en mandarina
C: Concentración (mg/kg). *t*: Tiempo (d). *CI*: Intervalo de confianza. *PI*: Intervalo de predicción. *S*: Varianza. *R-Sq*: Coeficiente de regresión. *R-Sq(adj)*: Coeficiente de regresión ajustado.

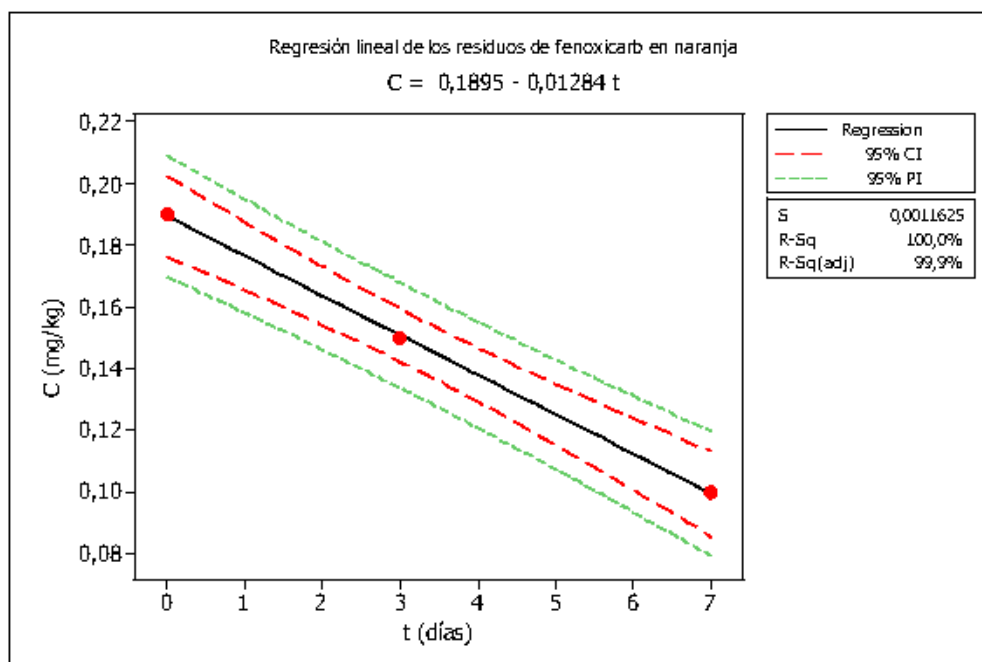


Figura 4.26.- Modelo de disipación lineal para los residuos de fenoxicarb en naranja
C: Concentración (mg/kg). *t*: Tiempo (d). *CI*: Intervalo de confianza. *PI*: Intervalo de predicción. *S*: Varianza. *R-Sq*: Coeficiente de regresión. *R-Sq(adj)*: Coeficiente de regresión ajustado.

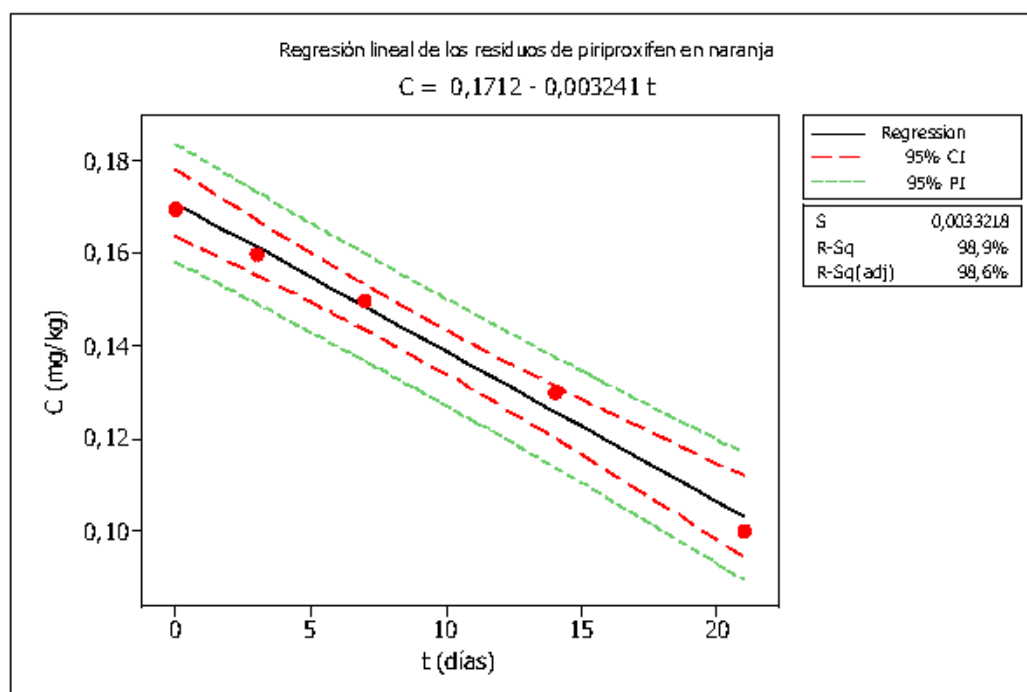


Figura 4.27.- Modelo de disipación lineal para los residuos de piriproxifen en naranja
C: Concentración (mg/kg). *t*: Tiempo (d). *CI*: Intervalo de confianza. *PI*: Intervalo de predicción. *S*: Varianza. *R-Sq*: Coeficiente de regresión. *R-Sq(adj)*: Coeficiente de regresión ajustado.

Se ha encontrado un modelo de disipación exponencial ($R^2 = 92,3\%$) de baja pendiente ($-0,01767 \text{ d}^{-1}$) para los residuos de fenoxicarb en mandarina. Para los residuos de piriproxifen en este cultivo no se encontró ninguna regresión, ya que describen una asíntota paralela al eje de abscisas con un valor medio de $0,105 \text{ mg/kg}$. Los primeros datos de fenoxicarb en naranja, correspondientes a los 7 días iniciales, se ajustaron a un modelo lineal de disipación ($R^2 = 100\%$) de baja pendiente ($-0,01284 \text{ d}^{-1}$), aunque los siguientes describieron una asíntota respecto a abscisas con un valor de $0,1 \text{ mg/kg}$. Para piriproxifen en naranja, se encontró un modelo de disipación lineal ($98,9\%$) también de baja pendiente ($-0,003241 \text{ d}^{-1}$).

En la Tabla 4.23 se muestran los parámetros de disipación encontrados de acuerdo con estos modelos.

Tabla 4.23.- Parámetros de la disipación encontrada en cítricos.

Muestra	Ecuación de disipación	C_0 (mg/kg)	V_d (d^{-1})	$t_{1/2}$ (d)
Fenoxicarb/Mandarina	$C = 0,20 e^{-0,017167 t}$	0,20	0,01767	39
Piriproxifen/Mandarina	--	--	--	--
Fenoxicarb/Naranja	$C = 0,1895 - 0,01284 t$	0,19	0,01284	7*
Piriproxifen/Naranja	$C = 0,1712 - 0,003241 t$	0,17	0,003241	26

C_0 = Concentración inicial. V_d = Velocidad o tasa de disipación. $t_{1/2}$ = Tiempo de vida media.

* Valor calculado para la ecuación lineal de la curva.

La curva de disipación de fenoxicarb en mandarina muestra una primera etapa de degradación lenta y un punto de inflexión que introduce una etapa de persistencia, en la que la concentración del residuo disminuye también lentamente. Esta cinética se ajusta a un modelo de disipación exponencial, y se puede decir que globalmente lo que ocurre es una degradación del residuo a una velocidad de disipación muy baja ($0,01767 \text{ d}^{-1}$), típico de un metabolismo vegetal lento, ya que por la liposolubilidad del fenoxicarb y la naturaleza lipofílica de la corteza de mandarina, los residuos quedan retenidos en las vesículas de esta parte del fruto, evitando parcialmente el efecto metabólico del vegetal y las condiciones ambientales. Esto explicaría el alto tiempo de vida media del producto (39 d) y la disipación paulatina de los niveles remanentes encontrados, ya que como se puede observar en la Figura 4.28, las tasas de disipación fueron muy bajas a lo largo del tiempo,

siendo de un 13,6% en los tres primeros días, 9,1% en los cuatro días siguientes, 4,6% y 18,2% en las dos semanas posteriores, respectivamente, y un 9% en el último periodo, alcanzando un nivel remanente alrededor del 50% a las tres semanas del ensayo que se mantuvo prácticamente constante hasta finalizar el plazo de seguridad.

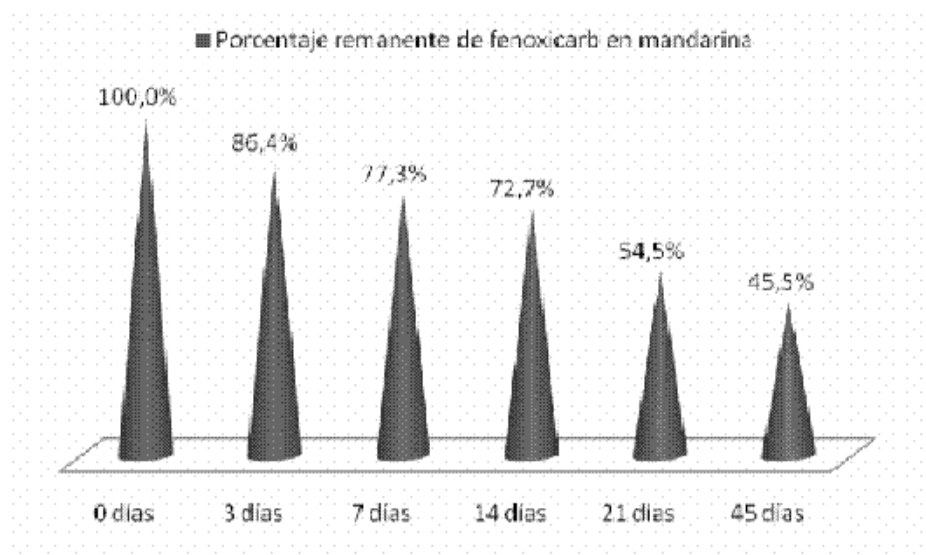


Figura 4.28.- Disipación de los residuos de fenoxicarb en el cultivo de mandarina durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

La disipación de piriproxifen en mandarina está representada por una asíntota al eje X, con un valor medio de 0,105 mg/kg, sin posibilidad de calcular regresión. Esta tendencia indica una fase de persistencia clara, en donde la tasa de disipación o pendiente de la recta es nula. Por eso, los niveles remanentes permanecieron próximos al 100% independientemente del tiempo, como se muestra en la Figura 4.29, a pesar de la pequeña disminución (9,1%) que experimentaron a los 14 d, que sólo sirvió para bajar hasta un 90,9%, demostrando una efecto metabólico lento por parte del vegetal y baja influencia de los factores ambientales, que se explicaría por el almacenamiento del plaguicida que se produce en las vesículas oleosas de la corteza. En este caso, el tiempo de vida media sería indeterminado.

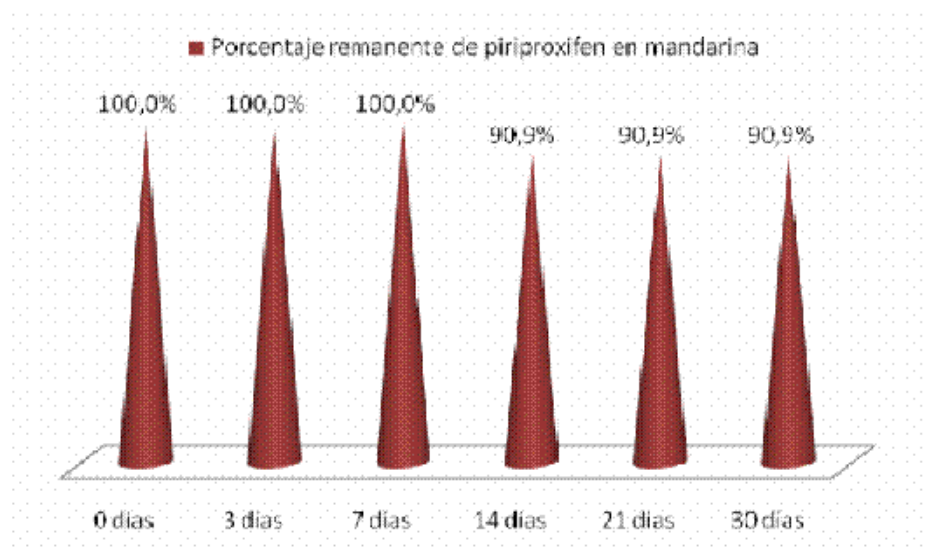


Figura 4.29.- Disipación de los residuos de piriproxifen en el cultivo de mandarina durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

La curva disipación de fenoxicarb en naranja se ajusta a un modelo lineal en los 7 primeros días y después continúa en una asíntota al eje X. La primera parte corresponde con un periodo de degradación rápido, lineal, y la segunda con un fenómeno de persistencia. El tiempo de vida media (7 d) se encuentra situado en la fase degradación dando paso al periodo de persistencia. Los niveles remanentes, representados en la Figura 4.30, muestran como en los 7 primeros días hay una degradación del 47,4%, mayor que en todos los casos anteriores que eran definidos por modelos exponenciales o asíntóticos, hasta que se alcanza un nivel del 52,6%, que persiste hasta el plazo de seguridad.

La curva disipación de piriproxifen en naranja se identifica con un modelo de disipación lineal. El tiempo de vida media se alcanza a los 26 d. Como se observa en la Figura 4.31, los niveles remanentes disiparon lentamente con disminuciones del orden de 5,9%, 11,7% y 17,7% hasta el día 21 del ensayo. En ese día el residuo era de 0,1 mg/kg y una semana después, a plazo de seguridad, el nivel remanente era < LQ. Esta tendencia indica una fase lenta de degradación hasta niveles inferiores al LQ, debido a la baja influencia de los factores metabólicos y ambientales, ya que el residuo se encontraría almacenado en las vesículas de la corteza del fruto.

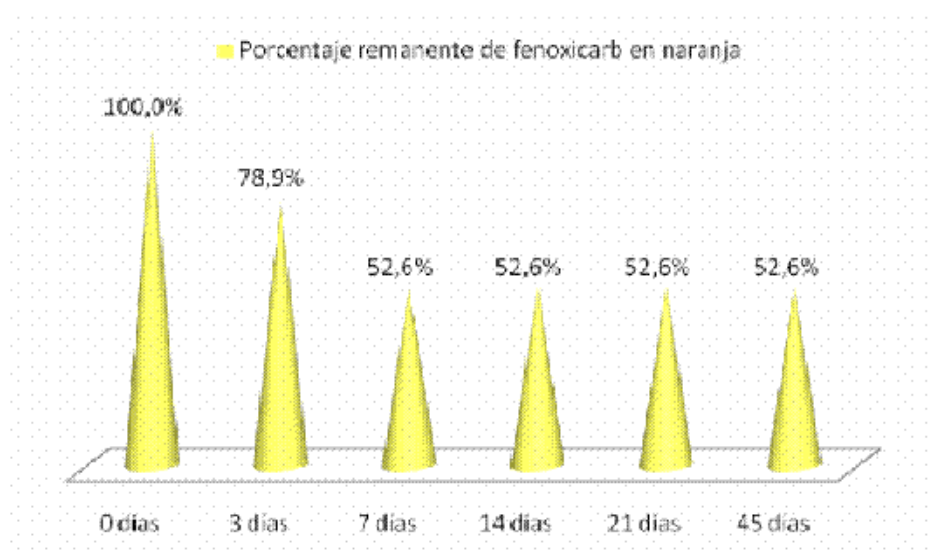


Figura 4.30.- *Disipación de los residuos de fenoxicarb en el cultivo de naranja durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA*

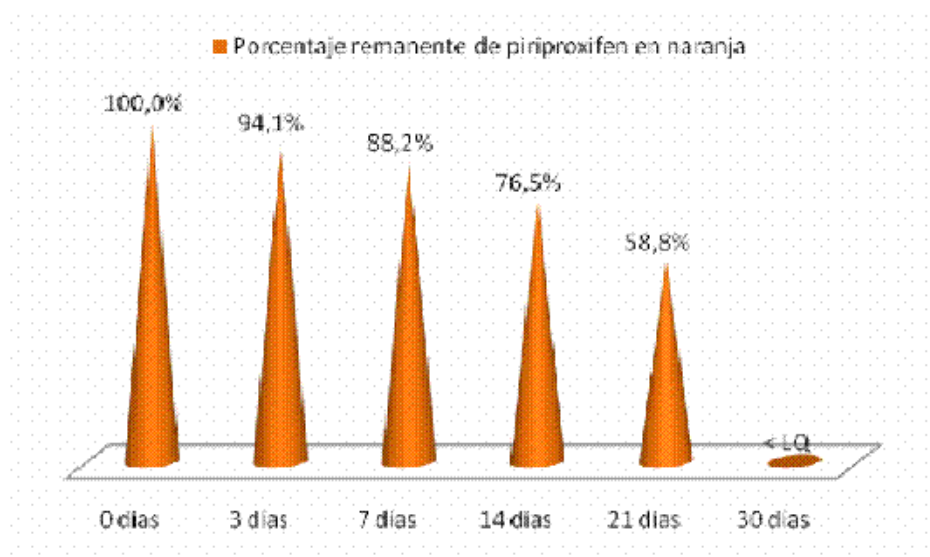


Figura 4.31.- *Disipación de los residuos de piriproxifen en el cultivo de naranja durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA*

En las Figuras 4.32 y 4.33, se comparan los niveles de residuos significativos entre los supuestos de BPA y CPA. Se observa que en general la concentración que se encuentra en CPA es resultado de la concentración remanente del fruto a plazo de seguridad y el depósito inicial de un tratamiento de estas características.

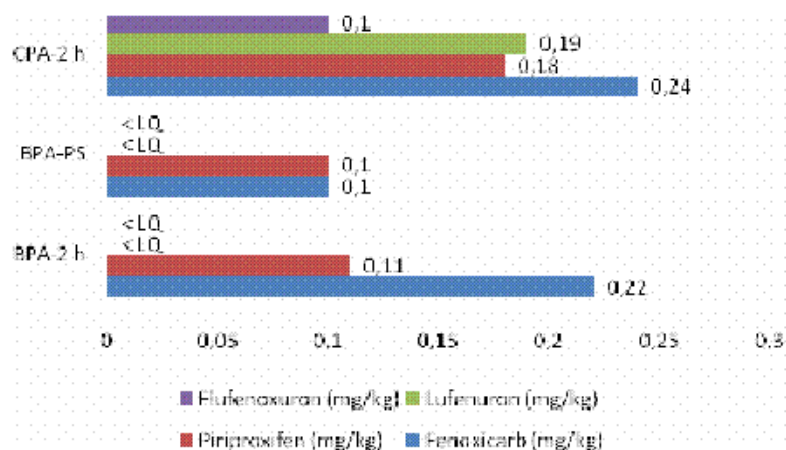


Figura 4.32.- Comparación de niveles de residuos entre la aplicación bajo BPA y CPA en mandarina (PS: plazo de seguridad)

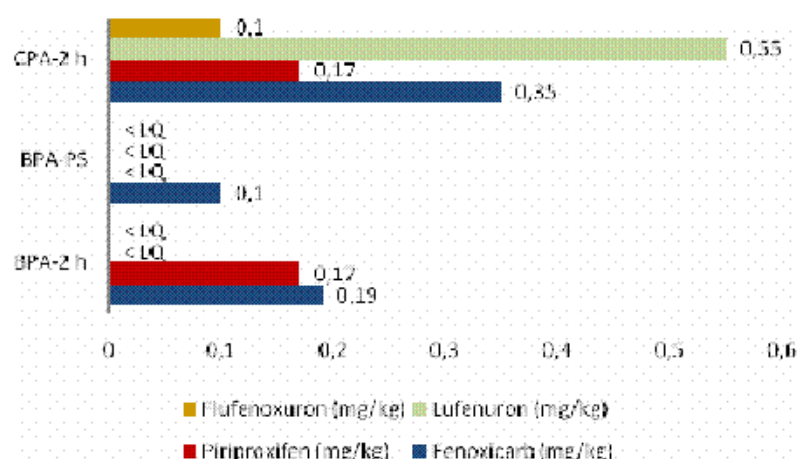


Figura 4.33.- Comparación de niveles de residuos entre la aplicación bajo BPA y CPA en naranja (PS: plazo de seguridad)

Finalmente, se debe señalar que no se detectaron residuos de los cuatro compuestos en ninguna de las muestras control.

4.2.2.3. RESIDUOS EN PRODUCTOS ELABORADOS.

No se encontraron procesos de disipación durante la transformación alimentaria ni en las muestras tomadas a los 3 y 6 meses del periodo de almacenamiento. Únicamente se obtuvieron residuos en la corteza de los cítricos, subproducto de la etapa inicial de pelado de ambos procesados, demostrando la retención que ejerce esta parte sobre los compuestos. Por lo tanto, lo que ocurrió fue un efecto de concentración de los residuos de la cosecha en la corteza, quedando la parte comestible libre de éstos. En las Figuras 4.34 y 4.35, se puede observar este efecto.

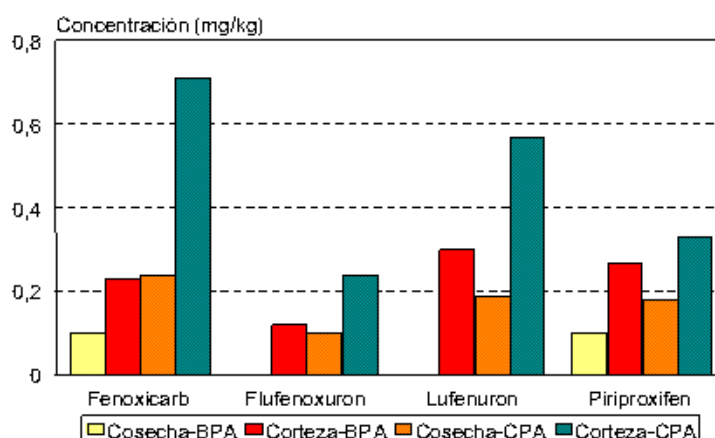


Figura 4.34.- Efecto del pelado de la fruta en la conserva de mandarina

Para la muestra de mandarina bajo BPA, los residuos de fenoxicarb y piriproxifen se concentraron 2,4 y 2,8 veces en la corteza respecto del nivel encontrado en el fruto durante la cosecha. Para la muestra de CPA, este efecto de concentración fue de 2,9 para fenoxicarb y 1,8 piriproxifen. Los niveles de residuos de lufenuron y flufenoxuron aparecieron en la corteza de mandarina en niveles de 0,3 mg/kg y 0,12 mg/kg, respectivamente, para las BPA. En condiciones de CPA, flufenoxuron y lufenuron mostraron concentraciones 2,3 y 3 veces mayores que la muestra de la cosecha, respectivamente.

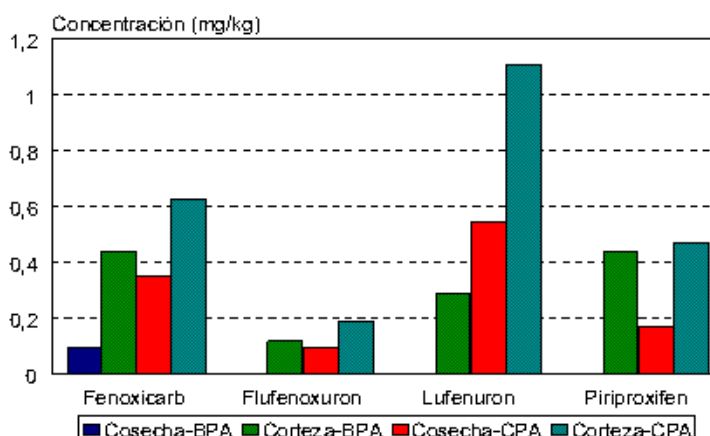


Figura 4.35.- Efecto del pelado de la fruta en la elaboración de zumo de naranja

Para la muestra de naranja bajo BPA, los residuos de fenoxicarb se concentraron 4,4 veces en la corteza respecto del nivel encontrado en el fruto durante la cosecha. Además los residuos de flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen aparecieron en la corteza en niveles de 0,12, 0,29 y 0,44 mg/kg, respectivamente. Para la muestra de CPA, el efecto de concentración fue de 1,8 para fenoxicarb, 1,9 para flufenoxuron, 2 para lufenuron y 2,7 para piriproxifen.

4.2.3. DIÁLISIS EN PATRONES, CÍTRICOS FRESCOS Y PROCESADOS.

Se fortificaron blancos de ambas frutas al nivel medio de las cosechas (0,1 mg/kg), sin resultado de diálisis para todos los plaguicidas. Tampoco se observó proceso de diálisis en los blancos de conserva y zumo fortificados a este nivel. Al estudiar la diálisis de fenoxicarb en estándares de similares concentraciones, como previamente se realizó para flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen, se observó que tampoco existían valores de diálisis para los niveles $\leq 0,1$ mg/kg. Este proceso comenzó en 0,25 mg/kg y continuó hasta 1 mg/kg, siendo los porcentajes de diálisis $< 13\%$, la cantidad dializada < 2 μg y la concentración en el dializado $< 0,3$ $\mu\text{g/ml}$ en todos los casos. Los resultados de este estudio se exponen en las Figuras 4.36, 4.37 y 4.38.

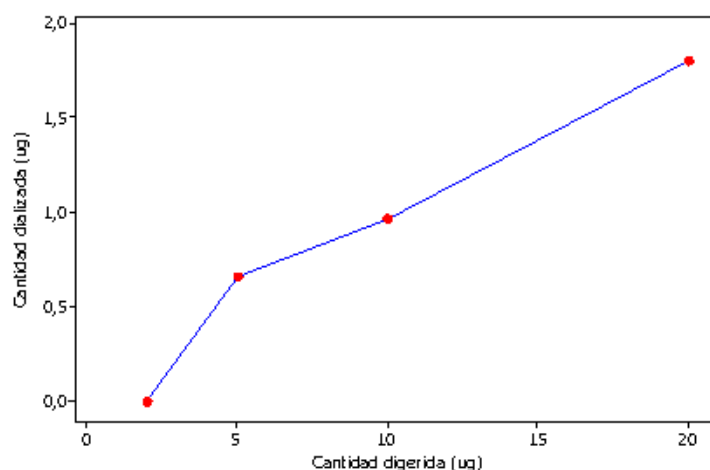


Figura 4.36.- *Diálisis de estándares en cantidades equivalentes a las encontradas de fenoxicarb*

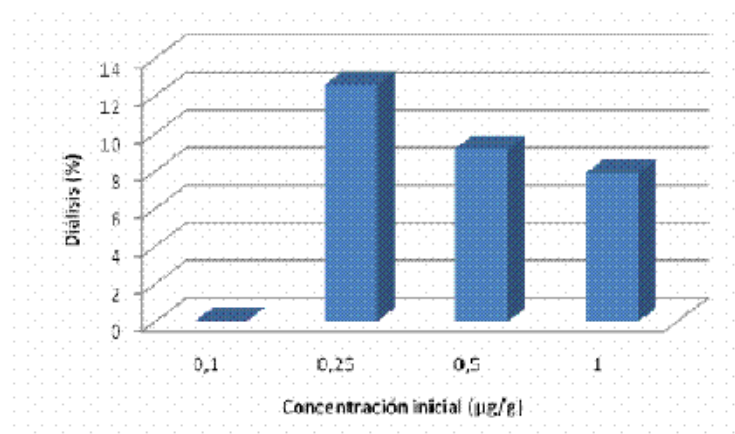


Figura 4.37.- *Porcentajes de diálisis de fenoxicarb en estándares*

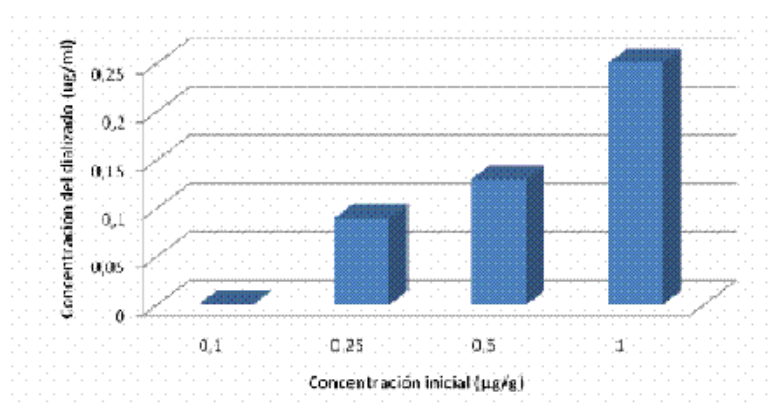


Figura 4.38.- *Concentración del residuo de fenoxicarb en la membrana de diálisis de los estándares*

Al aumentar el rango de fortificación en los cítricos (1-100 mg/kg), se pudo observar que la diálisis comienza en niveles inferiores para los preparados, y además éstos presentan mayores valores de todos los parámetros. Los resultados obtenidos permiten establecer la siguiente secuencia de diálisis: fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron > flufenoxuron. En mandarina, la diálisis de fenoxicarb comenzó en 7 mg/kg en fresco y 1 mg/kg en conserva, piriproxifen a 60 mg/kg en conserva y para flufenoxuron y lufenuron no se encontró diálisis. Los porcentajes de diálisis no superaron el 0,6% en fresco y 12% en conserva. La concentración del dializado fue inferior a 1,2 µg/ml en fresco y 30 µg/ml en conserva. En naranja, la diálisis de fenoxicarb comenzó en 70 mg/kg en fresco y 28 mg/kg en zumo, piriproxifen a 70 mg/kg en zumo y para flufenoxuron y lufenuron sí se encontró diálisis en zumo, aunque en porcentajes bajísimos. Los porcentajes de diálisis no superaron 0,6% en fresco y 7% en zumo. La concentración del dializado fue inferior a 1,5 µg/ml en fresco y 17 µg/ml en zumo. Entre todas las situaciones, se encontró una mayor cantidad dializada para fenoxicarb en la conserva de mandarina. Los resultados se presentan gráficamente en las Figuras 4.39, 4.40 y 4.41.

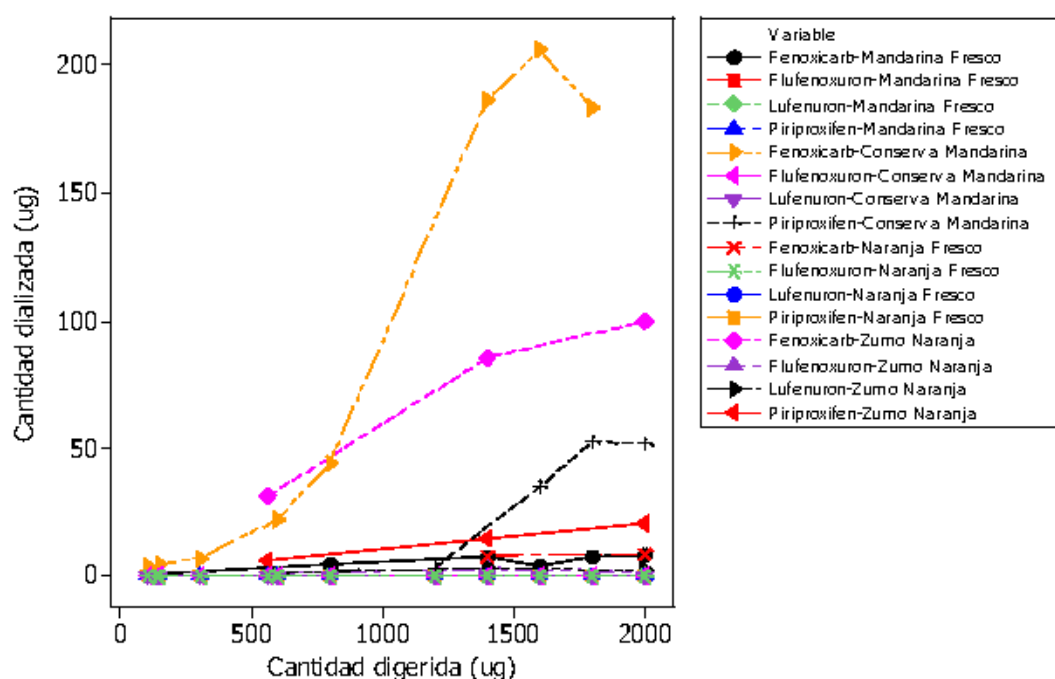


Figura 4.39.- Diálisis en cantidad encontrada en las muestras de cítricos

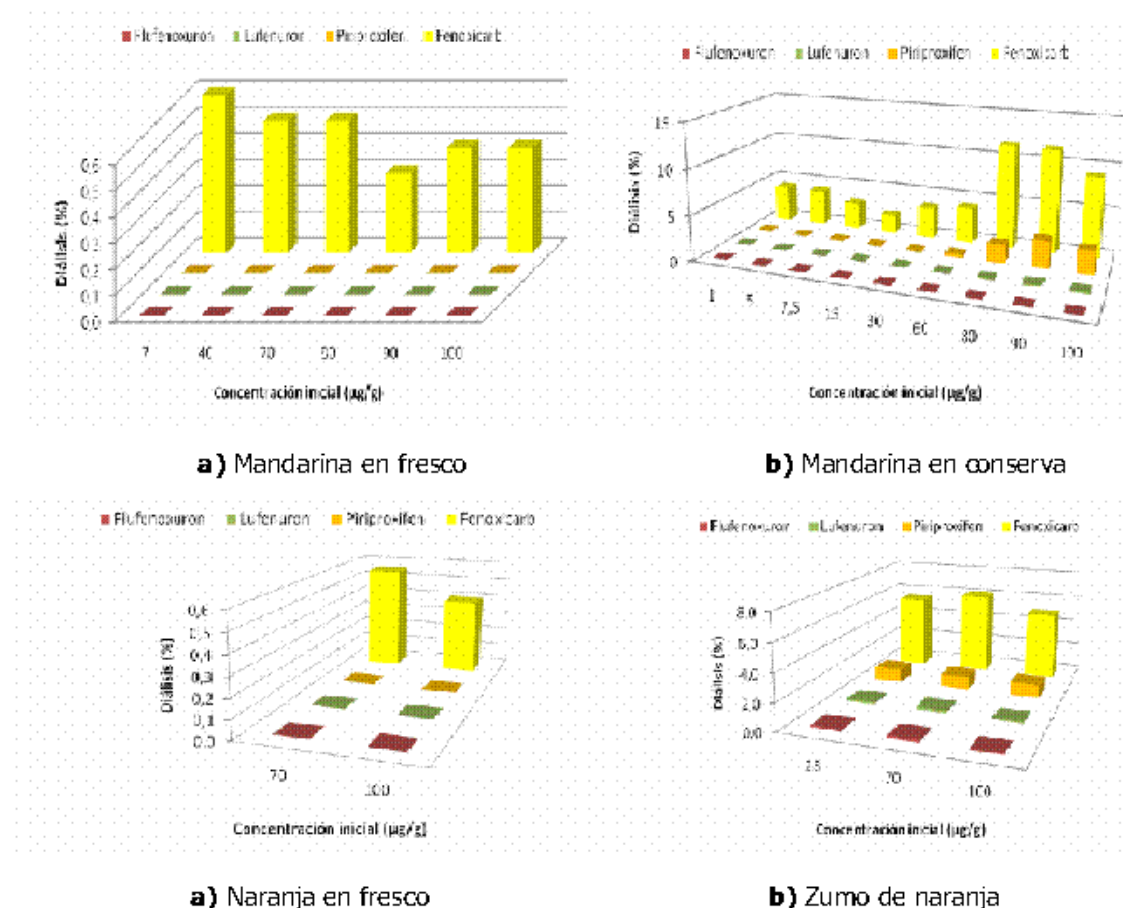


Figura 4.40.- Porcentajes de diálisis en mandarina, naranja y sus preparados

Se puede observar como al aumentar la concentración inicial en la muestra, el porcentaje de compuesto dializable no varía significativamente, excepto para aquellas muestras de gran concentración en la conserva de mandarina, donde el proceso de diálisis se vio favorecido por un importante efecto de difusión pasiva a favor de gradiente durante las 2 horas que duró esta etapa.

A mayor cantidad de plaguicida sometida a digestión o mayor concentración inicial de la muestra, mayor es la cantidad de plaguicida dializado. Así, la concentración de los residuos en la membrana de diálisis depende exclusivamente de la concentración de la muestra o de la cantidad digerida de forma directa, ya que el volumen del dializado no varió significativamente entre muestras.

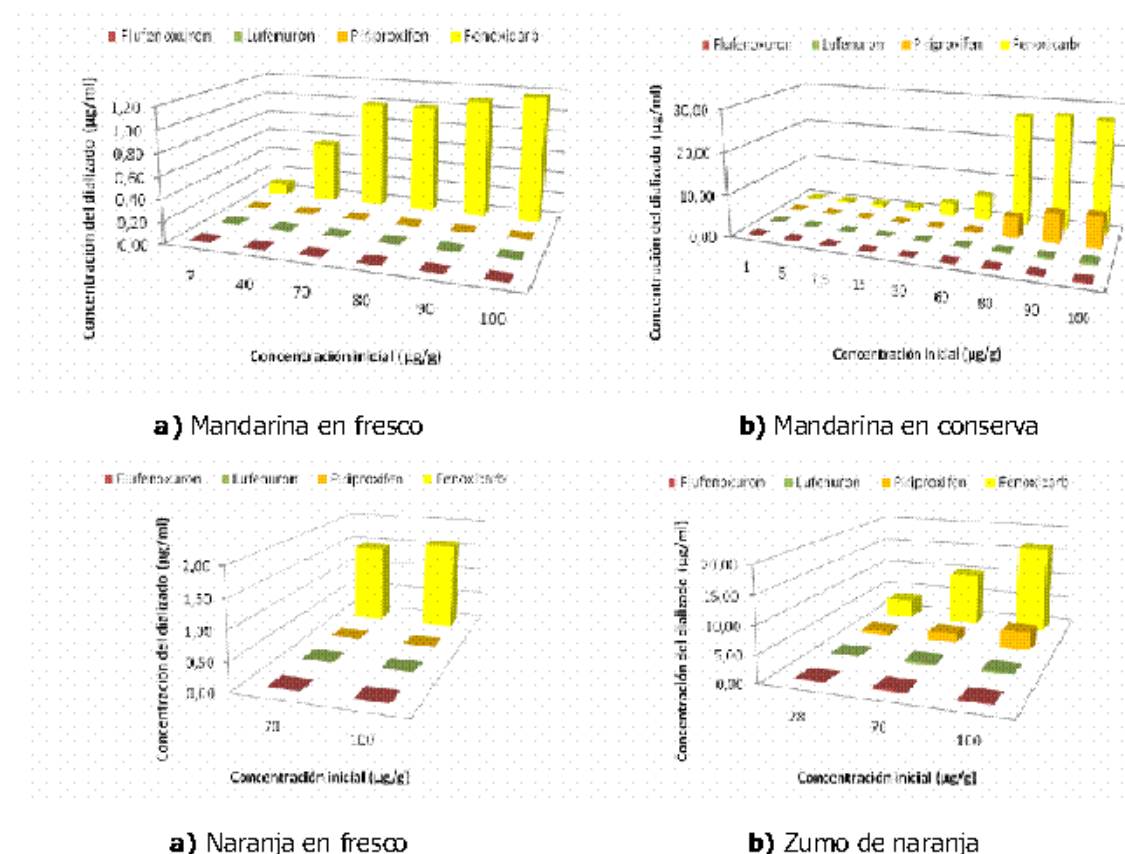


Figura 4.41.- Concentración del dializado en mandarina, naranja y sus preparados

4.2.4. ESTUDIO DE DIETAS Y CÁLCULO DE INGESTAS.

En las Tablas 4.24 y 4.25 se exponen los valores de consumo anual y diario de los cítricos estudiados según el INE.

Tabla 4.24.- Valores de consumo anual para los cítricos según el INE.

C = Consumo Anual (kg/persona · año)			
Ámbito	Mandarina	Naranja	Zumo
Nacional	5,51	29,77	1,71
Murcia	3,48	23,63	1,06
Urbano	6,36	30,42	2,08
No urbano	4,6	29,08	1,31

Tabla 4.25.- Valores de consumo diario para los cítricos según el INE.

C/D = Consumo Diario (kg/persona · día)			
Ámbito	Mandarina	Naranja	Zumo
Nacional	1,51E-02	8,16E-02	4,68E-03
Murcia	9,53E-03	6,47E-02	2,90E-03
Urbano	1,74E-02	8,33E-02	5,70E-03
No urbano	1,26E-02	7,97E-02	3,59E-03

En la Tabla 4.26 se exponen los valores de la relación entre la ingestión diaria estimada y la diaria admisible (IDE/IDA) a partir de los datos de consumo del INE. Se puede comprobar que esta relación es como máximo $1,39\text{E-}02$, lo que supone un factor de seguridad mínimo de 72 en cuanto a la ingestión de estos insecticidas. Además, en general la relación es mayor a nivel nacional que local y en el ámbito urbano respecto al no urbano.

Tabla 4.26- Relación IDE/IDA en los cítricos a partir de las estadísticas de consumo del INE.

IDE/IDA de Fenoxicarb				
Ámbito	Alimento	Mandarina	Naranja	Zumo
Nacional	Fresco BPA	4,57E-04	2,47E-03	--
	Fresco CPA	1,10E-03	8,65E-03	--
	Elaborado BPA	4,57E-04	--	1,42E-04
	Elaborado CPA	4,57E-04	--	1,42E-04
Murcia	Fresco BPA	2,89E-04	1,96E-03	--
	Fresco CPA	6,93E-04	6,87E-03	--
	Elaborado BPA	2,89E-04	--	8,80E-05
	Elaborado CPA	2,89E-04	--	8,80E-05
Urbano	Fresco BPA	5,28E-04	2,53E-03	--
	Fresco CPA	1,27E-03	8,84E-03	--
	Elaborado	5,28E-04	--	1,73E-04
	Elaborado CPA	5,28E-04	--	1,73E-04
No urbano	Fresco BPA	3,82E-04	2,41E-03	--
	Fresco CPA	9,17E-04	8,45E-03	--
	Elaborado BPA	3,82E-04	--	1,09E-04
	Elaborado CPA	3,82E-04	--	1,09E-04
IDE/IDA de Flufenoxuron				
Ámbito	Alimento	Mandarina	Naranja	Zumo
Nacional	Fresco BPA	4,57E-04	2,47E-03	--
	Fresco CPA	4,57E-04	2,47E-03	--
	Elaborado BPA	4,57E-04	--	1,42E-04
	Elaborado CPA	4,57E-04	--	1,42E-04
Murcia	Fresco BPA	2,89E-04	1,96E-03	--
	Fresco CPA	2,89E-04	1,96E-03	--
	Elaborado BPA	2,89E-04	--	8,80E-05
	Elaborado CPA	2,89E-04	--	8,80E-05
Urbano	Fresco BPA	5,28E-04	2,53E-03	--
	Fresco CPA	5,28E-04	2,53E-03	--
	Elaborado	5,28E-04	--	1,73E-04
	Elaborado CPA	5,28E-04	--	1,73E-04
No urbano	Fresco BPA	3,82E-04	2,41E-03	--
	Fresco CPA	3,82E-04	2,41E-03	--
	Elaborado BPA	3,82E-04	--	1,09E-04
	Elaborado CPA	3,82E-04	--	1,09E-04

Tabla 4.26 (cont.)- Relación IDE/IDA en los cítricos a partir de las estadísticas de consumo del INE.

IDE/IDA de Lufenuron				
Ámbito	Alimento	Mandarina	Naranja	Zumo
Nacional	Fresco BPA	4,57E-04	2,47E-03	--
	Fresco CPA	8,69E-04	1,36E-02	--
	Elaborado BPA	4,57E-04	--	1,42E-04
	Elaborado CPA	4,57E-04	--	1,42E-04
Murcia	Fresco BPA	2,89E-04	1,96E-03	--
	Fresco CPA	5,49E-04	1,08E-02	--
	Elaborado	2,89E-04	--	8,80E-05
	Elaborado CPA	2,89E-04	--	8,80E-05
Urbano	Fresco BPA	5,28E-04	2,53E-03	--
	Fresco CPA	1,00E-03	1,39E-02	--
	Elaborado BPA	5,28E-04	--	1,73E-04
	Elaborado CPA	5,28E-04	--	1,73E-04
No urbano	Fresco BPA	3,82E-04	2,41E-03	--
	Fresco CPA	7,26E-04	1,33E-02	--
	Elaborado BPA	3,82E-04	--	1,09E-04
	Elaborado CPA	3,82E-04	--	1,09E-04
IDE/IDA de Piriproxifen				
Ámbito	Alimento	Mandarina	Naranja	Zumo
Nacional	Fresco BPA	4,57E-04	2,47E-03	--
	Fresco CPA	8,23E-04	4,20E-03	--
	Elaborado BPA	4,57E-04	--	1,42E-04
	Elaborado CPA	4,57E-04	--	1,42E-04
Murcia	Fresco BPA	2,89E-04	1,96E-03	--
	Fresco CPA	5,20E-04	3,34E-03	--
	Elaborado BPA	2,89E-04	--	8,80E-05
	Elaborado CPA	2,89E-04	--	8,80E-05
Urbano	Fresco BPA	5,28E-04	2,53E-03	--
	Fresco CPA	9,50E-04	4,29E-03	--
	Elaborado BPA	5,28E-04	--	1,73E-04
	Elaborado CPA	5,28E-04	--	1,73E-04
No urbano	Fresco BPA	3,82E-04	2,41E-03	--
	Fresco CPA	6,87E-04	4,10E-03	--
	Elaborado BPA	3,82E-04	--	1,09E-04
	Elaborado CPA	3,82E-04	--	1,09E-04

*En color amarillo se identifican los resultados calculados con una concentración de residuos hipotética igual al LQ (0,1 mg/kg) aunque esas muestras presentaron niveles inferiores en la realidad.

Respecto a los valores calculados según las encuestas de hábitos de consumo realizadas en nuestra Región, en las Tablas 4.27 y 4.28 se exponen los consumos calculados en función de raciones y semanas disponibles, tanto anual como diario.

Tabla 4.27. - Consumo anual de los cítricos a partir de las encuestas realizadas.

C = Consumo Anual (kg/persona · año)			
Ámbito	Mandarina	Naranja	Zumo
Niños	2,94	8,74	26,65
Adolescentes	2,35	11,44	27,3
Adultos	5,33	25,17	12,13
Edad avanzada	2,47	22,88	13,65

Tabla 4.28. - Consumo diario de los cítricos a partir de las encuestas realizadas.

C/D = Consumo Diario (kg/persona · día)			
Ámbito	Mandarina	Naranja	Zumo
Niños	8,07E-03	2,39E-02	7,30E-02
Adolescentes	6,43E-03	3,13E-02	7,48E-02
Adultos	1,46E-02	6,90E-02	3,32E-02
Edad avanzada	6,78E-03	6,27E-02	3,74E-02

Finalmente, en la Tabla 4.29, se exponen los resultados de la relación IDE/IDA, calculada con los consumos valorados por las encuestas, con resultados análogos a los obtenidos anteriormente, aunque el valor máximo de la relación en este caso fue 1,15E-02 y por tanto existiría un factor de seguridad mínimo entre ingestión y riesgo toxicológico de 87. También se puede observar cómo los niños representan el grupo de población más sensible en cuanto a la ingestión de estos residuos, ya la relación IDE/IDA es mayor para ellos. Además, en general los adultos presentan una relación IDE/IDA mayor que la de adolescentes y edad avanzada, y la de estos dos últimos suele ser de similar valor.

Tabla 4.29 - Relación IDE/IDA en cítricos a partir de las estadísticas de consumo de las encuestas.

IDE/IDA de Fenoxicarb				
Ámbito	Alimento	Mandarina	Naranja	Zumo
Niños	Fresco BPA	4,89E-04	1,45E-03	--
	Fresco CPA	1,17E-03	5,08E-03	--
	Elaborado BPA	4,89E-04	--	4,43E-03
	Elaborado CPA	4,89E-04	--	4,43E-03
Adolescentes	Fresco BPA	1,95E-04	9,50E-04	--
	Fresco CPA	4,67E-04	3,32E-03	--
	Elaborado BPA	1,95E-04	--	2,27E-03
	Elaborado CPA	1,95E-04	--	2,27E-03
Adultos	Fresco BPA	4,43E-04	2,09E-03	--
	Fresco CPA	1,06E-03	7,31E-03	--
	Elaborado	4,43E-04	--	1,01E-03
	Elaborado CPA	4,43E-04	--	1,01E-03
Edad avanzada	Fresco BPA	2,05E-04	1,90E-03	--
	Fresco CPA	4,93E-04	6,65E-03	--
	Elaborado BPA	2,05E-04	--	1,13E-03
	Elaborado CPA	2,05E-04	--	1,13E-03
IDE/IDA de Flufenoxuron				
Ámbito	Alimento	Mandarina	Naranja	Zumo
Niños	Fresco BPA	4,89E-04	1,45E-03	--
	Fresco CPA	4,89E-04	1,45E-03	--
	Elaborado BPA	4,89E-04	--	4,43E-03
	Elaborado CPA	4,89E-04	--	4,43E-03
Adolescentes	Fresco BPA	1,95E-04	9,50E-04	--
	Fresco CPA	1,95E-04	9,50E-04	--
	Elaborado BPA	1,95E-04	--	2,27E-03
	Elaborado CPA	1,95E-04	--	2,27E-03
Adultos	Fresco BPA	4,43E-04	2,09E-03	--
	Fresco CPA	4,43E-04	2,09E-03	--
	Elaborado	4,43E-04	--	1,01E-03
	Elaborado CPA	4,43E-04	--	1,01E-03
Edad avanzada	Fresco BPA	2,05E-04	1,90E-03	--
	Fresco CPA	2,05E-04	1,90E-03	--
	Elaborado BPA	2,05E-04	--	1,13E-03
	Elaborado CPA	2,05E-04	--	1,13E-03

Tabla 4.29 (cont). - Relación IDE/IDA en cítricos a partir de las estadísticas de consumo de las encuestas.

IDE/IDA de Lufenuron				
Ámbito	Alimento	Mandarina	Naranja	Zumo
Niños	Fresco BPA	4,89E-04	1,45E-03	--
	Fresco CPA	9,29E-04	7,98E-03	--
	Elaborado BPA	4,89E-04	--	4,43E-03
	Elaborado CPA	4,89E-04	--	4,43E-03
Adolescentes	Fresco BPA	1,95E-04	9,50E-04	--
	Fresco CPA	3,70E-04	5,22E-03	--
	Elaborado	1,95E-04	--	2,27E-03
	Elaborado CPA	1,95E-04	--	2,27E-03
Adultos	Fresco BPA	4,43E-04	2,09E-03	--
	Fresco CPA	8,41E-04	1,15E-02	--
	Elaborado BPA	4,43E-04	--	1,01E-03
	Elaborado CPA	4,43E-04	--	1,01E-03
Edad avanzada	Fresco BPA	2,05E-04	1,90E-03	--
	Fresco CPA	3,90E-04	1,04E-02	--
	Elaborado BPA	2,05E-04	--	1,13E-03
	Elaborado CPA	2,05E-04	--	1,13E-03
IDE/IDA de Piriproxifen				
Ámbito	Alimento	Mandarina	Naranja	Zumo
Niños	Fresco BPA	4,89E-04	1,45E-03	--
	Fresco CPA	8,80E-04	2,47E-03	--
	Elaborado BPA	4,89E-04	--	4,43E-03
	Elaborado CPA	4,89E-04	--	4,43E-03
Adolescentes	Fresco BPA	1,95E-04	9,50E-04	--
	Fresco CPA	3,51E-04	1,61E-03	--
	Elaborado BPA	1,95E-04	--	2,27E-03
	Elaborado CPA	1,95E-04	--	2,27E-03
Adultos	Fresco BPA	4,43E-04	2,09E-03	--
	Fresco CPA	7,97E-04	3,55E-03	--
	Elaborado BPA	4,43E-04	--	1,01E-03
	Elaborado CPA	4,43E-04	--	1,01E-03
Edad avanzada	Fresco BPA	2,05E-04	1,90E-03	--
	Fresco CPA	3,70E-04	3,23E-03	--
	Elaborado BPA	2,05E-04	--	1,13E-03
	Elaborado CPA	2,05E-04	--	1,13E-03

*En color amarillo se identifican los resultados calculados con una concentración de residuos hipotética igual al LQ (0,1 mg/kg) aunque esas muestras presentaron niveles inferiores en la realidad.

4.2.5. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en la validación del método, se puede afirmar que el procedimiento analítico es suficientemente preciso, sensible y exacto para el propósito de esta experiencia, y cumple los requisitos establecidos en un rango analítico suficientemente amplio para abarcar los niveles de residuos encontrados (0,1-2 mg/kg). Por tanto, la metodología desarrollada fue eficaz para alcanzar el objetivo de esta experiencia.

Todas las muestras de mandarina procedentes del ensayo de campo bajo BPA presentaron niveles residuales inferiores al LMR establecido. Bajo CPA, se obtuvieron niveles resultantes de la suma de los iniciales bajo BPA y el depósito previo que existía en el vegetal a plazo de seguridad; siendo también inferiores a los LMR establecidos. Fenoxicarb y piriproxifen mostraron procesos de persistencia en el cultivo durante el amplio plazo de seguridad establecido para estos productos, aunque en el caso de fenoxicarb se observó una lenta degradación. Por último, en el proceso industrial de la conserva, el pelado de la fruta eliminó los residuos de RCI para ambas prácticas agrícolas, obteniéndose conservas sin presencia de residuos que fueron conservadas durante 6 meses.

Análogamente a la mandarina, todas las muestras de naranja procedentes del ensayo de campo bajo BPA presentaron niveles inferiores al LMR establecido. También bajo CPA, se obtuvieron niveles resultantes de la suma de los iniciales bajo BPA y el depósito previo que existía en el vegetal a plazo de seguridad; siendo inferiores a los LMR establecidos, aunque en el caso de lufenuron su residuo fue prácticamente el doble del LMR correspondiente, pero aplicando las condiciones de SANCO para residuos violativos, no superaría su tolerancia (DG SANCO, 2007). Fenoxicarb y piriproxifen mostraron lentas degradaciones en el cultivo durante el amplio plazo de seguridad establecido para estos productos, y en particular para fenoxicarb se observó una tendencia a la persistencia una vez había transcurrido la primera semana de las seis del ensayo.

Finalmente, en el proceso industrial de elaboración de zumo, el pelado de la fruta eliminó los residuos de RCIs para ambas prácticas agrícolas, obteniéndose embotellados sin presencia de residuos, que fueron conservados durante 6 meses.

A pesar de las lentas degradaciones y/o persistencia de fenoxicarb y piriproxifen durante los plazos de seguridad, se obtuvieron disipaciones de un mínimo del 50% entre el valor inicial y final de los residuos, excepto en el caso de piriproxifen en mandarina donde fue de 9,1%. Flufenoxuron y lufenuron presentaron residuos inferiores al LQ desde el principio del tratamiento bajo BPA.

Los análisis de residuos demuestran la retención que se produce en la corteza de los cítricos de estos compuestos, lo que supone un aspecto muy positivo de cara al riesgo toxicológico del consumidor de estos alimentos; pero se debe tener en cuenta en las industrias que emplean esta parte de los cítricos, en la elaboración de esencias, fabricación de piensos, preparaciones cosméticas, industrias heladeras, etc. En estos casos, su posible contaminación conllevaría la posibilidad de que entren en la cadena alimentaria o penetren en el organismo humano por vía dérmica, normalmente más receptiva a este tipo de productos que la oral.

La biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos a partir de muestras que contenían niveles de residuos próximos a los obtenidos tras los tratamientos fitosanitarios y/o procesado fue inexistente. La diálisis comenzó a niveles que en ningún caso presentaban las muestras (1 mg/kg).

En los ensayos de biodisponibilidad *in vitro*, se observó que la diálisis de fenoxicarb en patrones comenzó a 0,25 mg/kg, la misma concentración que para flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen, y un 75% menor a la obtenida en muestras, pudiendo establecer el siguiente orden según las características que presentan los compuestos para este proceso en patrones: fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron = flufenoxuron.

Los preparados presentaron menor efecto matriz que los alimentos en fresco para la diálisis. Comparativamente, la naranja y el zumo presentaron mayor efecto matriz que la mandarina y la conserva, ya que la diálisis tuvo lugar para concentraciones superiores de fortificación de los dos primeros. Según los resultados de diálisis en las muestras, se puede establecer el siguiente orden según las características que presentan los compuestos para este proceso en estos alimentos: fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron > flufenoxuron. Los resultados demuestran que la biodisponibilidad de los compuestos está influida por su naturaleza química, concentración en la muestra, características de la matriz donde se estudia y la selectividad de la membrana de diálisis.

En los estudios de consumo realizados con los datos proporcionados por el INE se obtiene un factor de seguridad mínimo de 72 entre la IDA e IDE de cada producto para los frutos seleccionados. Con las encuestas practicadas, este factor llega hasta 87, debido a diferencias metodológicas entre ambas estadísticas. Se puede concluir que resulta un factor de seguridad muy amplio entre la ingestión de estos productos y su riesgo de toxicidad crónica, para un consumidor perteneciente a todas las zonas de residencia y principales grupos de población.

4.2.6. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.

4.2.6.1. COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Payá, P., Mulero, J., Zafrilla, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2008. *In vitro* bioavailability of insect growth regulator residues in fresh, juice and can production of oranges, apricots and peaches. 7th European Pesticide Residue Workshop, Berlin (Germany).

Payá, P., Zafrilla, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A., García, M.L. 2008. *Bioavailability of insect growth regulator residues in citrus*. 7th Iberian Congress and 4th Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology, Lisbon (Portugal).

Payá, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2007. *Dissipation of insect growth regulators in fresh orange and orange juice*. 59th International Symposium on Crop Protection, Ghent (Belgium).

Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M.A., Zafrilla, P., Barba, A. 2007. *Bioavailability of insect growth regulators in citrus and stone fruits*. 59th International Symposium on Crop Protection, Ghent (Belgium).

Payá, P., Oliva, J., Barba, A., Cámara M.A. 2006. *Residues of insect growth regulators in fresh and canned satsuma mandarin*. 4th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and 10th Symposium on the Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Almería (Spain).

Payá, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Toledano, R., Barba, A. 2006. *Determination of fenoxycarb, lufenuron, pyriproxyfen and flufenoxuron in mandarin by HPLC-DAD*. 6th European Pesticide Residue Workshop, Corfu (Greece).

4.2.6.2. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.

Payá, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2007. *Dissipation of insect growth regulators in fresh and canned fruits*. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 87(13-14), 971-983.

Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M.A., Zafrilla, P., Barba, A. 2007. *Bioavailability of insect growth regulators in citrus and stone fruits*. Comm. Appl. Biol. Sci., Ghent University, 72(2), 151-159.

Payá, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2007. *Dissipation of insect growth regulators in fresh orange and orange juice*. Comm. Appl. Biol. Sci., Ghent University, 72(2), 161-169.

4.3. PERSISTENCIA, DEGRADACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE FENOXICARB, FLUFENOXURON, LUFENURON Y PIRIPROXIFEN EN ALBARICOQUE Y MELOCOTÓN Y SUS PREPARADOS EN CONSERVA.

Las familias españolas emplean 855.468.510 € anualmente en la compra de frutas de hueso (frescas, refrigeradas o en conserva), según la última encuesta continua de presupuestos familiares publicada por el INE para el año 2005 (INE, 2005). Por tanto, constituyen el tercer grupo al que los españoles destinan mayor presupuesto entre frutas y hortalizas. Esto es significativo, ya que en comparación con hortalizas o cítricos, estas frutas se suelen consumir en la temporada de producción, primavera-verano, y no a lo largo de todo el año, y por tanto significaría que a pesar de su baja disponibilidad, el consumidor las sitúa entre sus productos de consumo preferentes.

A nivel nacional, la producción de melocotón y nectarina durante el periodo 1990-2005 ha ido aumentando hasta alcanzar $1260,9 \cdot 10^3$ Tm en el 2005, representado las cifras más altas para el grupo de los frutales no cítricos. Sin embargo, la producción de albaricoque ha sufrido fluctuaciones a la baja durante este periodo hasta alcanzar $137,2 \cdot 10^3$ Tm en 2005 y no se encuentra entre los puestos de mayor producción actualmente (MAPA, 2006b).

En la Región de Murcia, los frutales no cítricos son el segundo grupo de producción después de los cítricos en los cultivos leñosos, destacando el melocotonero con 294.786 Tm anuales y el albaricoquero con 92.188 Tm anuales, según datos de la Consejería de Agricultura y Agua de Murcia para el año 2003 (CARM, 2006).

La producción nacional de ambos cultivos destinada a ventas supone un 67,4% dirigida a consumo en fresco y un 32,6% como transformado para albaricoque, y un 77% en fresco y un 23% como transformado para melocotón (MAPA, 2006b).

Tradicionalmente, albaricoque y melocotón se han transformado en conservas en almíbar y mermeladas, aunque son comunes otras formas de procesamiento como las frutas desecadas, escarchadas, congeladas o ultracongeladas. Según los últimos datos de la USDA en el año 2005, la disponibilidad per cápita de melocotón y nectarina procesados, referido a peso fresco equivalente para la población estadounidense, fue de un 83% en conservas, 12% congelado y 5% desecado. En cambio, la disponibilidad per cápita de albaricoque procesado, referido a peso fresco equivalente para esta población, fue de un 20% en conserva y un 80% en desecado y tan sólo un 10% de la disponibilidad total del albaricoque fue para fresco (USDA, 2007b).

Por tanto, ambas formas de consumo, en fresco y en conserva, pueden ser importantes en la exposición a los residuos de RCI. Para evaluarla, se estudiaron fenoxycarb y piriproxifen, aplicados según criterios de BPA y CPA, en ensayos de campo supervisados con el objetivo de determinar diferencias en niveles de concentración y su disipación. Los residuos fueron controlados desde la aplicación hasta la cosecha, en la elaboración de las conservas en almíbar y en el periodo de almacenamiento. Finalmente, se determinó la exposición crónica a los residuos de los productos frescos y transformados bajo las dos prácticas agrícolas según distintos índices de consumo de estos alimentos.

Se debe señalar que en este apartado no se estudiaron flufenoxuron ni lufenuron, al no estar autorizados por el Ministerio de Agricultura en ninguna de los dos cultivos seleccionados (MAPA, 2008a).

4.3.1. ESTUDIOS DE CAMPO Y PROCESADO.

En los ensayos de campo, se aplicaron fenoxicarb y piriproxifen. A efectos de un estudio más completo, se incluyó piriproxifen en la experiencia de albaricoque, teniendo en cuenta las mismas características de registro que en melocotón, aunque no está registrado para este uso por el MAPA. En la Tabla 4.30, se puede observar un resumen de las características de registro de estos plaguicidas para los cultivos seleccionados (MAPA, 2008).

Tabla 4.30.- Características de registro de los plaguicidas estudiados en frutos de hueso.

Cultivo	Plaga	RCI	Producto comercial	Dosis (%)	LMR (mg/kg)	PS (días)
Albaricoque	Capua, carpocapsa, piojo de San José	Fenoxicarb	Insegar	0,02-0,30	1	21
	NP	Piriproxifen	Atominal	0,0375-0,05	0,05	NP
Melocotón	Capua, carpocapsa, piojo de San José	Fenoxicarb	Insegar	0,02-0,30	1	21
	Piojo de San José	Piriproxifen	Atominal	0,0375-0,05	0,05	NP

PS: Plazo de seguridad. NP: No procede.

Todas las parcelas experimentales se ubicaron en fincas productoras de la Región de Murcia, elegidas como representativas del cultivo de nuestra Región. En todos los casos, se marcaron parcelas control, situadas lo suficientemente cerca de las tratadas para garantizar idéntico cultivo y condiciones climáticas, pero suficientemente separadas para excluir cualquier riesgo de contaminación cruzada. Las características de las parcelas utilizadas se pueden observar en la Tabla 4.31.

Tabla 4.31.- Características de las parcelas experimentales.

Árbol	Albaricoquero	Melocotonero
Forma de Cultivo	Aire libre	Aire libre
Siembra	Injerto	Injerto
Antigüedad	8 años	7 años
Localización*	El Niño de Mula	El Niño de Mula
GPS (°N; °W; m)	38,06006°; 1,52930°; 420	38,05605°; 1,53295°; 408
Área (m ²)	42	105
Marco (m)	6 x 2,3	6 x 3,5

* Mula (Murcia).

El muestreo de las parcelas se realizó al azar, tomando muestras de todas y cada una de las parcelas; incluyendo tanto frutos cubiertos por hojas como aquellos más expuestos a la luz, evitándose los puntos de inicio y final de la aplicación por posibles derivas y sobretratamientos.

Las muestras fueron recogidas con adecuadas medidas de protección, evitando contaminaciones entre áreas y procurando una mínima manipulación. Se muestreó en orden creciente de dosis de aplicación, de manera que primero se tomó muestra en el área control y después en el área de aplicación. Una vez recogidas, fueron envasadas en bolsas opacas de polietileno inequívocamente identificadas. Durante el transporte al laboratorio, las bolsas se mantuvieron a temperatura ambiente, en posición estable, protegiéndolas de golpes y se evitó su exposición directa a la luz. En todos los casos, se recogieron aproximadamente 2 kg de fruta, resultado de al menos 12 unidades procedentes de todos los árboles de la parcela de ensayo (FAO, 1990), excepto en el caso de la muestra dedicada a la industrialización para la que se tomaron unos 10 kg.

Primeramente, se realizaron los ensayos bajo criterios de BPA (FAO, 2003b; CARM, 2003); para lo que se mantuvieron dosis y plazos de seguridad autorizados en cada caso. Las dosis de piriproxifen y fenoxicarb aplicadas en albaricoque fueron 0,04% y 0,03%, y en melocotón, 0,04% y 0,25%, respectivamente; registrándose las condiciones ambientales más relevantes (temperatura y humedad relativa). Se realizó un muestreo periódico desde el momento de la aplicación hasta transcurrido su plazo de seguridad. La primera muestra se recogió 2 h después de la aplicación (tiempo de secado para que la materia activa quede fijada en la planta). En la toma de muestra a plazo de seguridad, se recogió una muestra adicional que sería sometida al procesamiento alimentario.

En los ensayos bajo criterios de CPA, se introdujeron dos condiciones críticas: nueva dosis transcurrido el plazo de seguridad y toma de muestra inmediata, de manera que no se respetaron los plazos de seguridad preceptivos. Así, el día que cumplía el plazo de seguridad en el ensayo bajo BPA, y una vez finalizado éste, se aplicaron otra vez las

mismas dosis sobre los cultivos; posteriormente, se recogieron muestras 2 h después, una destinada al análisis en el laboratorio y otra que ingresaría en el procesado alimentario.

Las condiciones en las que se practicaron ambos tipos de ensayo se pueden observar en la Tabla 4.32.

Tabla 4.32.- Condiciones de los ensayos realizados bajo BPA y CPA.

Cultivo	V (l)	Dosis (l/ha)		Temperatura (°C)		Humedad (%)		Muestreo (días)	
		BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
Albaricoque	22	1309,50	1309,50	20	28	50	61	0-3-7-14-21	0
Melocotón	6	1904,76	1904,76	28	26	51	44	0-2-7-14-21 ^a	0

a. Aunque piriproxifen no tiene plazo de seguridad en melocotón, se tomó muestra hasta finalizar el de fenoxicarb.

La conserva de frutas de hueso trata de preservar los alimentos de la acción microbiana, capaz de modificar sus condiciones sanitarias y su sabor, durante un largo periodo de tiempo, normalmente dos años, de manera que la accesibilidad del consumidor a estas frutas se ve ampliada hasta más allá de su escasa temporada de producción. Para higienizar estas frutas, son necesarios procesos de lavado, pelado y esterilización, tres factores susceptibles de influir enormemente en la eliminación de los residuos de plaguicidas (Lentza-Rizos, 1995; Chavarrí et al., 2004; Lennon et al., 2006).

Los estudios de elaboración de conservas para las frutas de hueso seleccionadas se realizaron separadamente para cada cultivo y cada tipo de tratamiento en origen, siempre en orden creciente de dosis de aplicación, para evitar riesgos de contaminación. El procesado de los alimentos y su manipulación tuvieron lugar tal y como lo realiza la industria alimentaria para obtener conservas en almíbar de estos productos. La elaboración de estos preparados se realizó en la planta piloto industrial del Centro Tecnológico Nacional de la Conserva de la Región de Murcia. Los procesos fueron secuenciales, recogándose una muestra de 1 kg al cabo de cada etapa influyente en la disipación de residuos.

El proceso de fabricación de conserva de albaricoque sin pelar se esquematiza en la Figura 4.42.

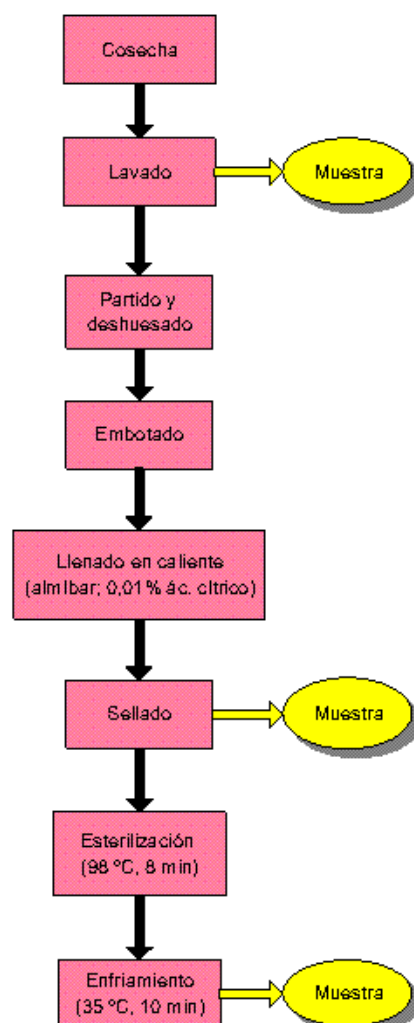


Figura 4.42.- *Elaboración de albaricoque en conserva*

Consta de una fase de lavado inicial con agua, por inmersión, durante 2 min; partición en mitades y deshuesado manual; embotado (240-250 g) y llenado en caliente con almíbar a 95 °C, 14 °Bx y 0,01% de ácido cítrico; sellado hermético de los botes; esterilización a 98 °C durante 8 min y finalmente enfriamiento a 35 °C durante 10 min.

En la conserva de melocotón, el proceso se representa en la Figura 4.43.

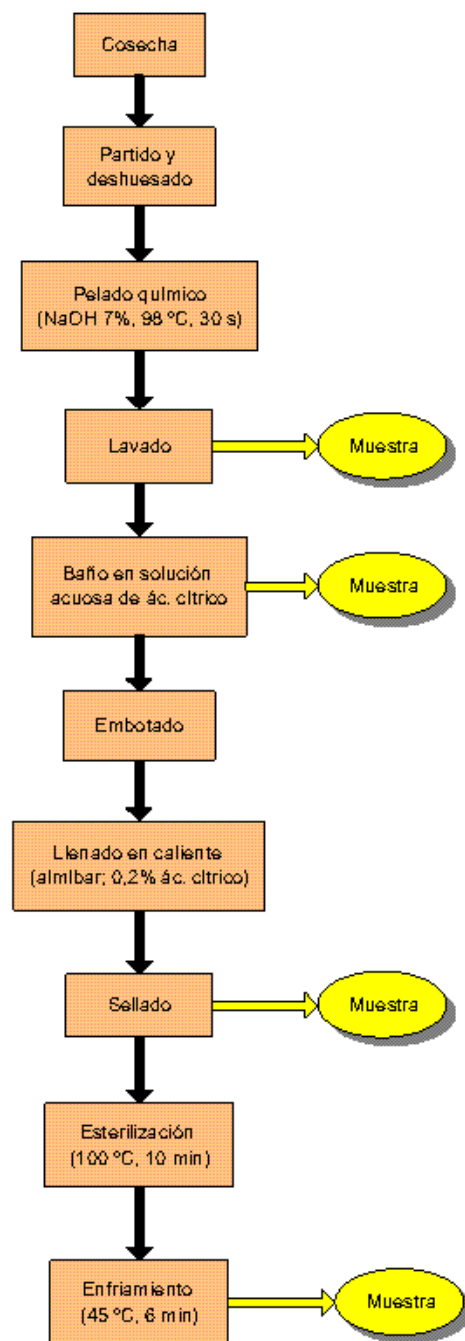


Figura 4.43.- *Elaboración de melocotón en conserva*

En este caso, la fruta se pela químicamente y no se realiza lavado inicial. El proceso de fabricación consta de división en mitades y deshuesado manual; pelado

químico por inmersión en solución acuosa de NaOH al 7% a 98 °C durante 30 s; lavado con agua por inmersión durante 2 min; inmersión en solución acuosa de ácido cítrico al 1% durante 20 s; embotado (240-250 g) y llenado en caliente con almíbar a 95 °C, 16,5 °Bx y 0,2% de ácido cítrico; sellado hermético de los botes; esterilización a 100 °C durante 10 min y finalmente enfriamiento a 45 °C durante 6 min.

Los productos elaborados fueron almacenados durante 6 meses en lugar fresco y seco. Durante este periodo, los productos fueron muestreados aleatoriamente tomando 1 kg por muestra, y analizados.

4.3.2. ANÁLISIS DE RESIDUOS.

A continuación se muestran los resultados de los análisis de residuos realizados en las experiencias de campo y de procesado junto con los valores de la validación analítica y de los controles de calidad.

4.3.2.1. VALIDACIÓN ANALÍTICA.

La metodología analítica descrita en el apartado 3.2.2.2, basada en una extracción en fase sólida con acetona, diclorometano y éter de petróleo, y determinación por LC-DAD, fue validada teniendo en cuenta los criterios descritos en la Guía SANCO y la norma internacional ISO 17025:2005 (ISO, 2005; DG SANCO, 2007). En todos los casos el LQ se fijó en 0,05 mg/kg y el LD estuvo comprendido entre 0,57 y 0,80 ng, como se muestra en la Tabla 4.33.

Tabla 4.33.- Límites de detección y cuantificación en frutos de hueso.

Matriz	RCI	LD (ng)	LQ _T (mg/kg)	LQ _E (mg/kg)
Albaricoque	Fenoxicarb	0,80	0,06	0,05
	Piriproxifen	0,62	0,05	0,05
Melocotón	Fenoxicarb	0,66	0,05	0,05
	Piriproxifen	0,57	0,05	0,05

LQ_T establecido teóricamente. LQ_E fijado experimentalmente.

En todo el proceso de validación, el intervalo de concentración ensayado fue 0,05-1 mg/kg para todas las matrices. Para precisión y exactitud se realizaron cinco réplicas por nivel, empleándose multipatrones para fortificar las muestras en blanco previamente analizadas. En la Tabla 3.34, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.34.- Resultados de la validación analítica en frutos de hueso.

Matriz/ Plaguicida	Parámetros (%)	R ²	RSD Repetibilidad		RSD Intra- Reproducibilidad		Recuperación Media	
	Nivel (ppm)		0,05	1	0,05	1	0,05	1
Patrón en disolvente	Fenoxicarb	100	12,1	0,9	7,1	1,0	--	--
	Piriproxifen	100	5,6	0,2	7,1	0,6	--	--
Albaricoque	Fenoxicarb	--	14,0	6,2	11,3	0,4	94,8	82,0
	Piriproxifen	--	14,8	8,2	16,8	4,0	93,0	78,1
Melocotón	Fenoxicarb	--	17,7	4,6	13,4	15,0	77,5	87,9
	Piriproxifen	--	6,4	6,1	11,1	11,9	83,5	89,6

Se comprueba que los niveles validados abarcaron los LMRs fijados para albaricoque y melocotón (rango 0,05-1 mg/kg); y el LQ (0,05 mg/kg) para todas las combinaciones plaguicida-matriz fue siempre igual o inferior al LMR establecido. Los coeficientes de correlación lineal fueron del 100%, indicando una respuesta lineal del detector adecuada para cada plaguicida en el intervalo analítico estudiado. La precisión en patrones fue muy consistente, siendo el RSD < 7,5% en todos los casos a excepción de la repetibilidad de fenoxicarb a 0,05 µg/ml con un RSD de 12,1%. En las muestras fortificadas, los valores de RSD fueron inferiores al 20% para repetibilidad, con más de la mitad de los valores menores del 8,5%. La recuperación media se mantuvo en todas las fortificaciones entre 70-120%, con un valor máximo de 94,8% para fenoxicarb a 0,05 mg/kg en albaricoque y mínimo de 77,5% para fenoxicarb en melocotón a 0,05 mg/kg. Por último, para reproducibilidad, los resultados de RSD intra-laboratorio de las muestras de frutas de hueso fortificadas fueron menores del 20%, con dos valores inferiores al 4,5% y seis comprendidos entre 11,1% y 16,8%.

4.3.2.1.1. Controles de calidad.

En todos los casos, las recuperaciones de los controles de calidad estuvieron comprendidos entre 70-120% (Tabla 4.35). Las inyecciones de blancos de matriz y disolvente, incluidas en las secuencias de análisis de las muestras, confirmaron la ausencia de contaminaciones o interferencias.

Tabla 4.35.- Media de los resultados de los controles de calidad analizados en el laboratorio.

Control de calidad	Nivel (mg/kg)	Recuperación media (%)	
		Fenoxicarb	Piriproxifen
Albaricoque	0,05	88,5	70,2
	1	87,2	80,3
Melocotón	0,05	78,2	93,6
	1	76,2	80,3

4.3.2.2. RESIDUOS EN PRODUCTO FRESCO.

La Tabla 4.36 muestra los resultados de los residuos de RCIs encontrados en los productos en fresco durante los ensayos de campo realizados.

Tabla 4.36.- Residuos de RCIs encontrados en los cultivos de albaricoque y melocotón durante los ensayos de campo supervisados cuando se aplican BPA y CPA.

Ensayo de campo	BPA						CPA
Muestra (mg/kg)	2 h	2 d	3 d	7 d	14 d	21 d	2 h
Fenoxicarb/Albaricoque	1,89	- -	0,36	0,31	0,18	0,05	1,24
Piriproxifen/Albaricoque	0,41	- -	0,20	0,15	0,17	0,09	0,57
Fenoxicarb/Melocotón	3,89	6,29	- -	1,28	0,68	0,33	1,36
Piriproxifen/Melocotón	0,07	0,20	- -	0,13	0,06	0,05	0,12

En condiciones de BPA, en ningún caso se superaron los LMRs fijados legalmente para estos compuestos. Sin embargo, hay que señalar que el nivel de piriproxifen en melocotón al plazo de seguridad fue igual a su LMR (0,05 mg/kg); lo que sería admisible siguiendo los criterios de la guía SANCO (DG SANCO, 2007) en nuestras condiciones de control de calidad analítico y cálculo de incertidumbres asociadas al método.

Por otra parte, el LMR propuesto para piriproxifen en albaricoque durante esta experiencia (0,05 mg/kg) aunque fue ampliamente superado, ya que su nivel al plazo de seguridad propuesto fue prácticamente el doble de éste (0,09 mg/kg), no se consideraría una infracción del LMR propuesto, teniendo en cuenta los criterios de incertidumbre y de control de calidad aplicables de SANCO (DG SANCO, 2007).

En las Figuras 4.44, 4.45, 4.46 y 4.47, se pueden observar las representaciones de las curvas de disipación de los residuos encontrados en los cultivos estudiados.

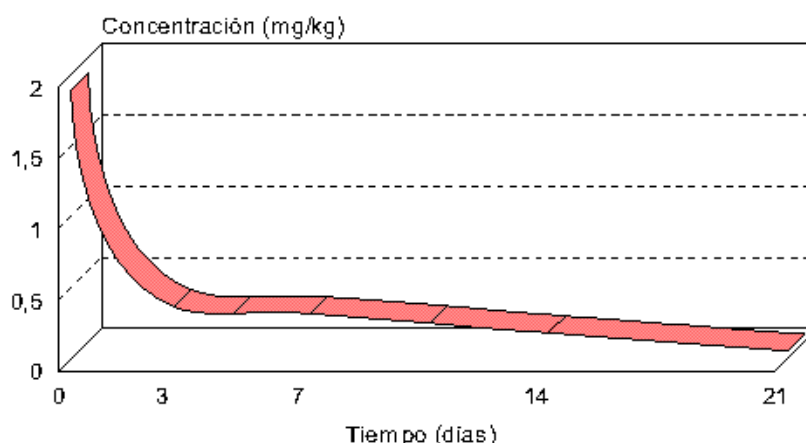


Figura 4.44.- Curva de disipación del residuo de fenoxicarb en el cultivo de albaricoque durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

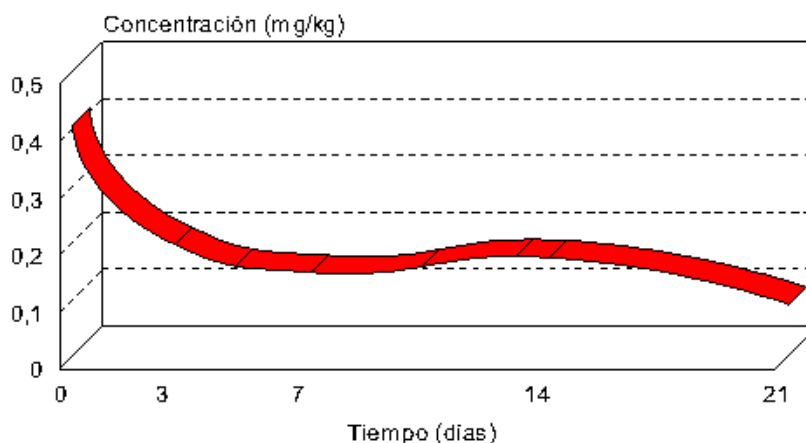


Figura 4.45.- Curva de disipación del residuo de piriproxifen en el cultivo de albaricoque durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

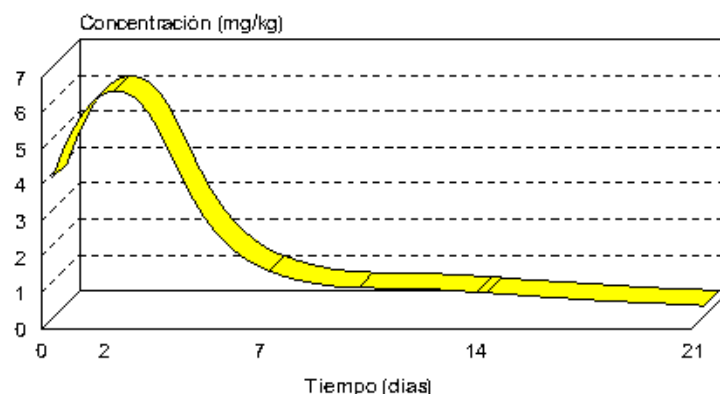


Figura 4.46.- Curva de disipación del residuo de fenoxycarb en el cultivo de melocotón durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

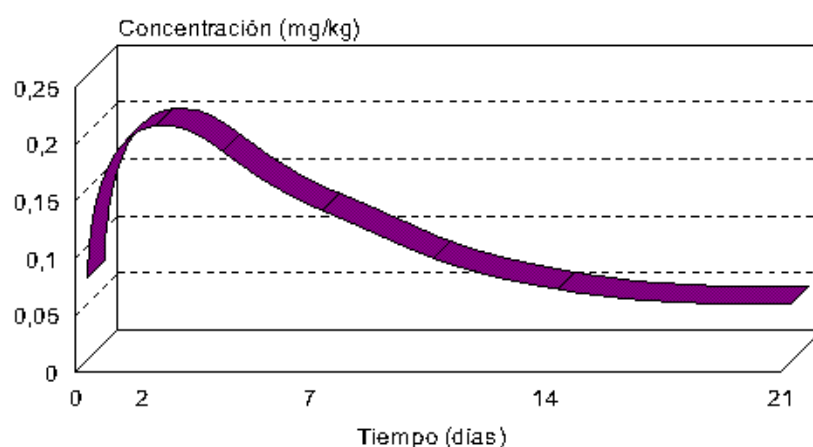


Figura 4.47.- Curva de disipación del residuo de piriproxifen en el cultivo de melocotón durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

En las Figuras 4.48, 4.49, 4.50 y 4.51, se representa la regresión logarítmica de los niveles residuales durante el plazo de seguridad, siendo los coeficientes de correlación aproximadamente 0,9 ó superiores para melocotón, y ligeramente inferiores para albaricoque.

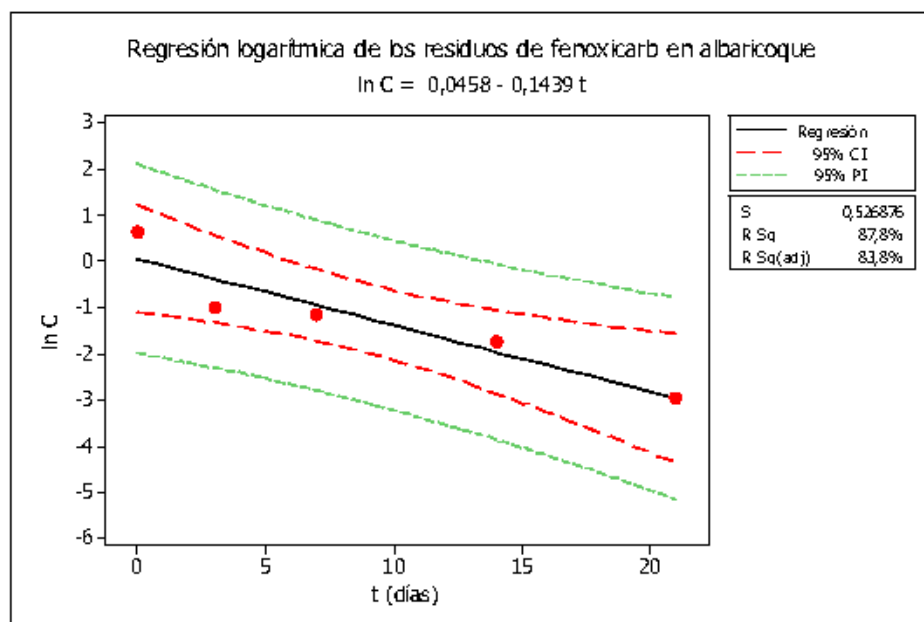


Figura 4.48.- Modelo de disipación exponencial para los residuos de fenoxycarb en albaricoque
C: Concentración (mg/kg), *t*: Tiempo (días), *CI*: Intervalo de confianza, *PI*: Intervalo de predicción, *S*: Varianza, *R-Sq*: Coeficiente de regresión, *R-Sq(adj)*: Coeficiente de regresión ajustado.

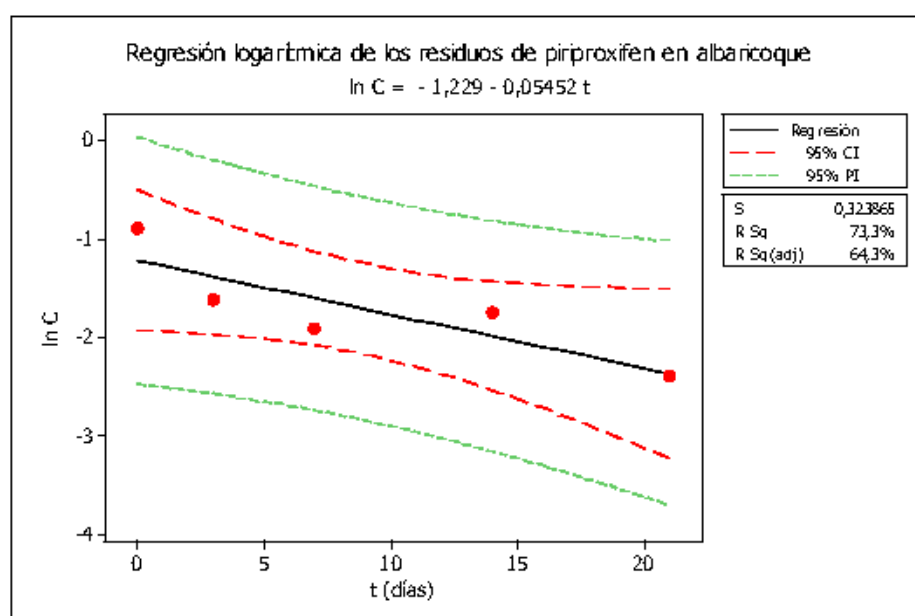


Figura 4.49.- Modelo de disipación exponencial para los residuos de piriproxifen en albaricoque
C: Concentración (mg/kg), *t*: Tiempo (días), *CI*: Intervalo de confianza, *PI*: Intervalo de predicción, *S*: Varianza, *R-Sq*: Coeficiente de regresión, *R-Sq(adj)*: Coeficiente de regresión ajustado.

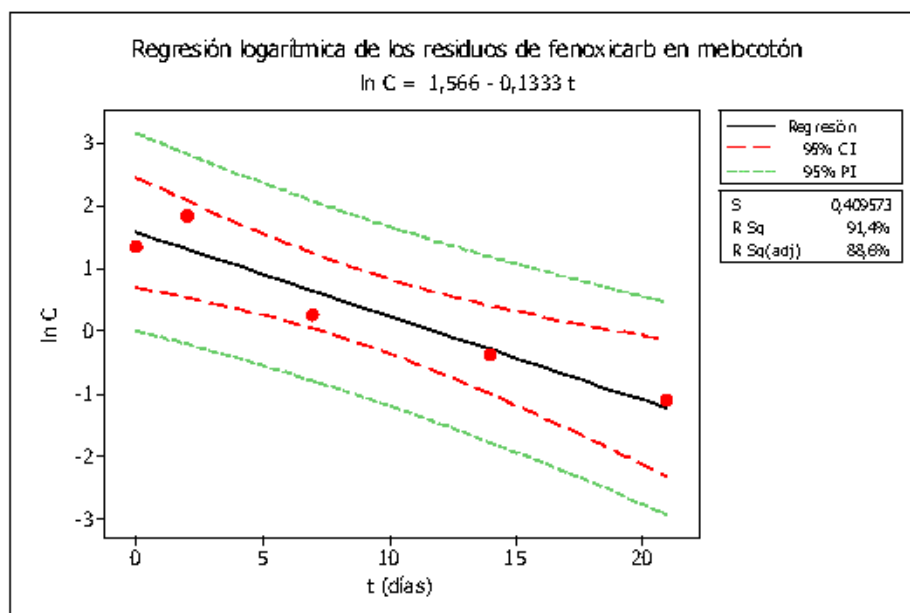


Figura 4.50.- Modelo de disipación exponencial para los residuos de fenoxycarb en melocotón
C: Concentración (mg/kg), *t*: Tiempo (días), *CI*: Intervalo de confianza, *PI*: Intervalo de predicción, *S*: Varianza, *R-Sq*: Coeficiente de regresión, *R-Sq(adj)*: Coeficiente de regresión ajustado.

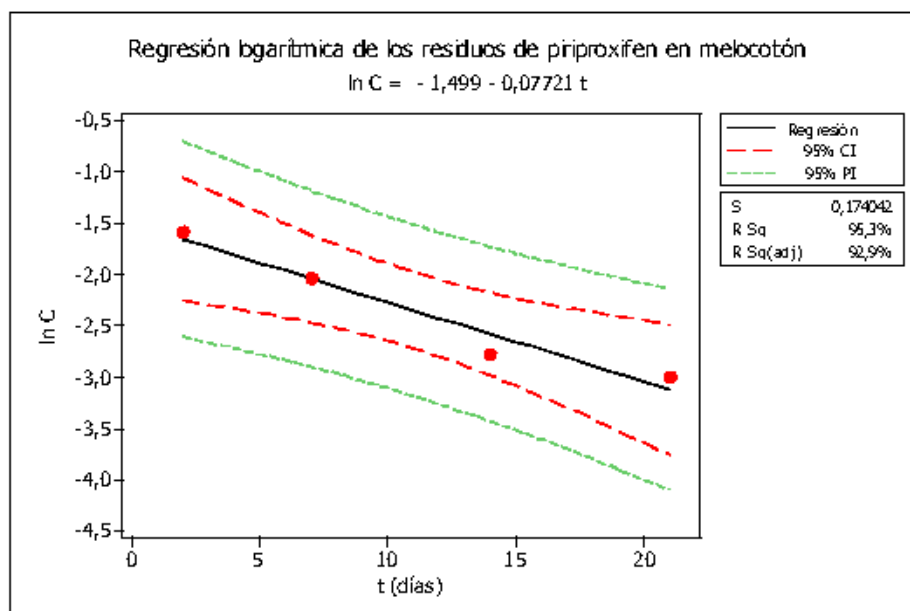


Figura 4.51.- Modelo de disipación exponencial para los residuos de piriproxifen en melocotón
C: Concentración (mg/kg), *t*: Tiempo (días), *CI*: Intervalo de confianza, *PI*: Intervalo de predicción, *S*: Varianza, *R-Sq*: Coeficiente de regresión, *R-Sq(adj)*: Coeficiente de regresión ajustado.

A la vista de los resultados, ha sido posible calcular parámetros que nos informan de la disipación encontrada en los cultivos. Los parámetros establecidos se muestran en la Tabla 4.37.

Tabla 4.37.- Parámetros de la disipación encontrada en frutos de hueso.

Muestra	Ecuación de disipación	C ₀ (mg/kg)	t LMR (d)	V _d (d ⁻¹)	t _{1/2} (d)
Fenoxicarb/Albaricoque	$C = 1,05 e^{-0,1439 t}$	1,05	0	0,1439	5
Piriproxifen/Albaricoque	$C = 0,29 e^{-0,05452 t}$	0,29	32	0,05452	13
Fenoxicarb/Melocotón	$C = 4,79 e^{-0,1333 t}$	4,79	12	0,1333	5
Piriproxifen/Melocotón *	$C = 0,22 e^{-0,07721 t}$	0,22	19	0,07721	9

C₀ = Concentración inicial. t LMR = Tiempo para alcanzar el LMR V_d = Velocidad o tasa de disipación. t_{1/2} = Tiempo de vida media. * = Resultados según los residuos obtenidos a partir del día 2 del ensayo de campo bajo BPA.

Los residuos de fenoxicarb en albaricoque durante el intervalo previo a la cosecha en condiciones de BPA, describieron una fase de disipación inicial rápida, de gran pendiente, en los 3 primeros días del ensayo, y a continuación, una fase de persistencia lenta, con una pendiente moderada que duró los 18 días restantes para alcanzar el plazo de seguridad fijado para el compuesto. Se observó por tanto una cinética de disipación exponencial típica, determinando un tiempo de vida media para el plaguicida de 5 días, un depósito inicial de 1,05 mg/kg y una velocidad de disipación de 0,1439 días⁻¹. A tiempo 0 este plaguicida ya presentaba niveles iguales al LMR establecido para el plazo de seguridad del compuesto (21 días).

Los residuos de piriproxifen en este cultivo durante el intervalo previo a la cosecha en condiciones de BPA, describieron una fase de disipación inicial rápida aunque a menor velocidad que la de fenoxicarb, ya que en este caso duró 7 días partiendo de un nivel 4,6 veces inferior. A continuación se observó una fase de persistencia lenta, con una pendiente moderada, que duró los 14 días restantes para alcanzar el plazo de seguridad. De nuevo se observó una cinética de disipación exponencial típica, determinando una velocidad de disipación de 0,05452 días⁻¹ y un depósito inicial de 0,29 mg/kg. El tiempo de vida media obtenido ha sido 13 días y el tiempo necesario para alcanzar el LMR propuesto para este cultivo (0,05 mg/kg) 32 días. Por tanto, el plazo de seguridad propuesto (21

días), para el mismo LMR que este compuesto tiene regulado en melocotón (0,05 mg/kg), no serviría en albaricoque.

Los residuos de fenoxicarb en melocotón durante el intervalo previo a la cosecha en condiciones de BPA, describieron una curva de disipación exponencial con existencia de una primera fase de reparto y acumulación del residuo en los frutos del árbol. En los dos primeros días, el compuesto se distribuye y almacena en los frutos, alcanzando su máximo nivel (6,29 mg/kg), después comienza una fase de disipación que dura hasta el décimo día, aproximadamente, del ensayo, y finalmente encontramos una fase de persistencia, en la que el residuo se degrada pero más lentamente que antes. Se observó una cinética de disipación exponencial a una velocidad de $0,1333 \text{ días}^{-1}$. El depósito calculado es 4,79 mg/kg. El tiempo de vida media determinado fue 5 días y el LMR se alcanzaría a los 12 días. Por tanto, aproximadamente hacia la mitad del plazo de seguridad fijado oficialmente en este cultivo (21 días), el plaguicida ya se encontraría en niveles cercanos a su LMR (1 mg/kg).

Los residuos de piriproxifen durante el intervalo previo a la cosecha en condiciones de BPA, describieron una curva de disipación similar a la anterior. En los dos primeros días el compuesto se distribuye y almacena en los frutos, alcanzando su máximo nivel (0,2 mg/kg), después comienza una fase de disipación exponencial que dura hasta el día 14 del ensayo y finalmente encontramos una fase de persistencia exponencial, en la que el residuo se degrada pero más lentamente que antes. Se observó una cinética de disipación exponencial a partir del segundo día del ensayo, a una velocidad de $0,07721 \text{ días}^{-1}$. Se obtuvo un tiempo de vida media para el plaguicida de 9 días y un depósito inicial de 0,22 mg/kg para el segundo día del ensayo. Es importante destacar que, según esta cinética, a los 19 días se alcanzaría el LMR establecido para este compuesto en melocotón.

En las Figuras 4.52, 4.53, 4.54 y 4.55, se muestra la disipación de los residuos en forma de porcentajes remanentes encontrados en los cultivos tras la aplicación agrícola con BPA.

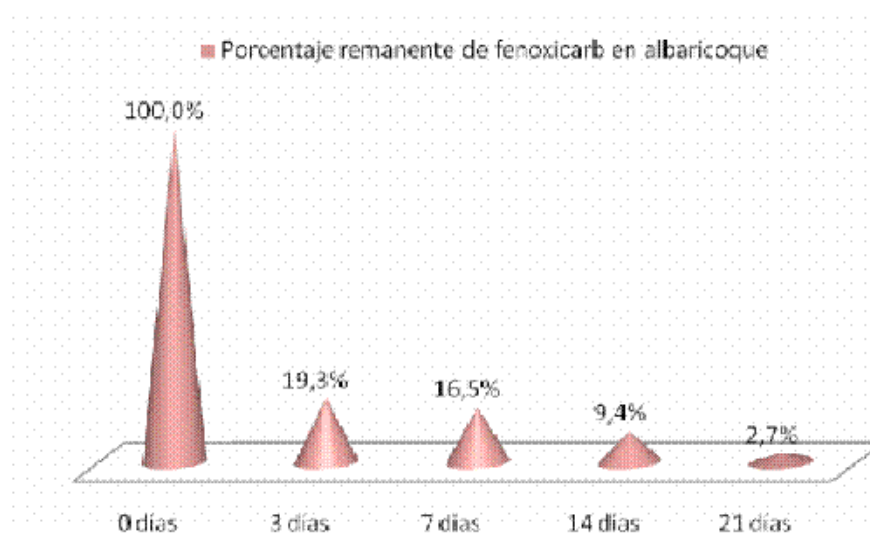


Figura 4.52.- *Disipación de los residuos de fenoxycarb en el cultivo de albaricoque durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA*

Los porcentajes remanentes de fenoxycarb en albaricoque, durante el tratamiento bajo BPA, demuestran como el residuo experimenta una disipación inicial rápida, en 3 días, disminuyendo un 80,7% y a partir de ahí disipa lentamente, en una fase de persistencia, con disminuciones progresivas de un 2,8%, 7,1% y 6,7%, hasta alcanzar un remanente del 2,7% respecto del residuo inicial.

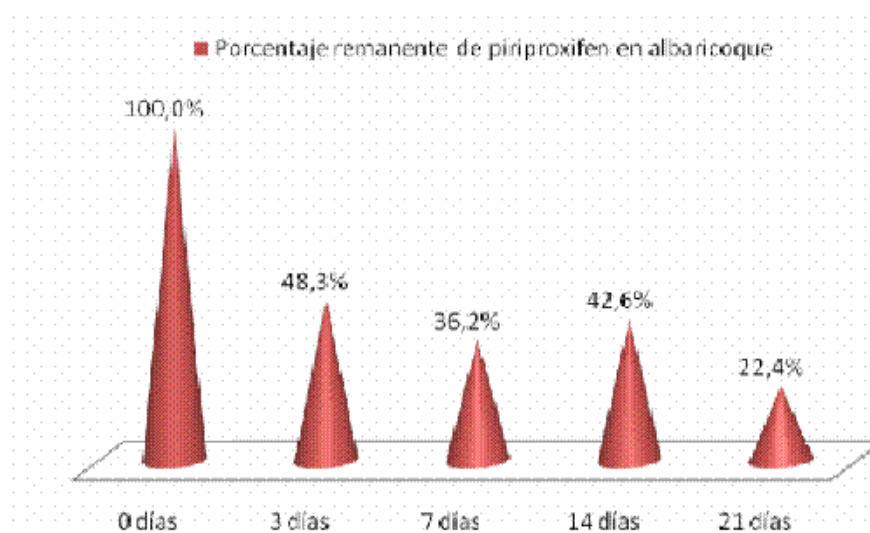


Figura 4.53.- *Disipación de los residuos de piriproxifen en el cultivo de albaricoque durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA.*

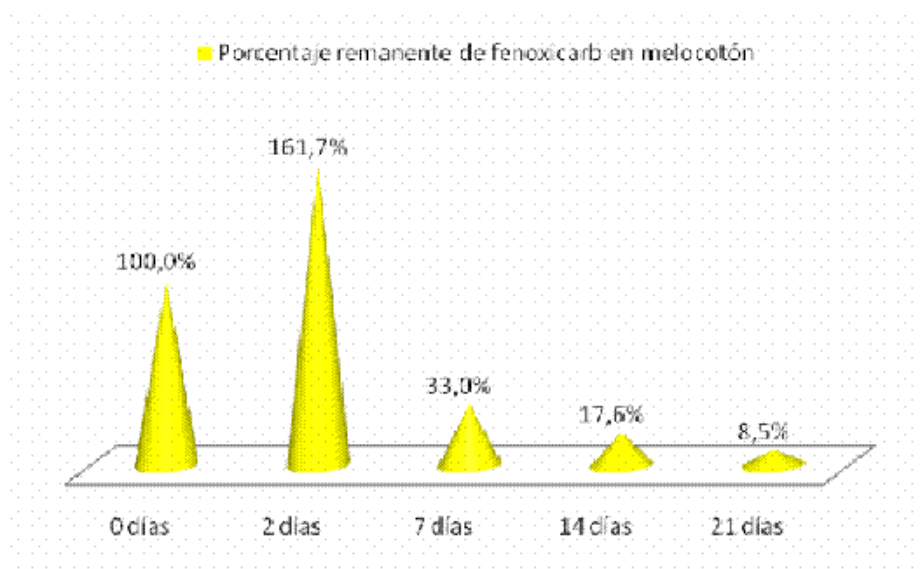


Figura 4.54.- Disipación de los residuos de fenoxicarb en el cultivo de melocotón durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

Los porcentajes remanentes de piriproxifen en el albaricoque durante el tratamiento bajo BPA demuestran como el residuo experimenta una disipación inicial rápida, en 3 días, donde disminuye en un 51,7% y a partir de ahí disipa lentamente, en una fase de persistencia, con disminuciones progresivas de 12,1% y 20,2%, hasta alcanzar un remanente del 22,4% respecto del residuo inicial.

Los porcentajes remanentes de fenoxicarb en el melocotón durante el tratamiento bajo BPA demuestran como el residuo experimenta una primera etapa de distribución y almacenamiento en los frutos durante los 2 días iniciales del ensayo, obteniéndose el mayor porcentaje remanente (161,7%), para después disipar rápidamente en un 128,7%, en una fase de disipación que dura hasta el séptimo día, y a partir de ahí disminuye lentamente, en un 15,4% y 9,1% a los 7 y 21 días respectivamente, dentro de la fase de persistencia, hasta que se alcanza un remanente del 8,5% respecto del residuo inicial.

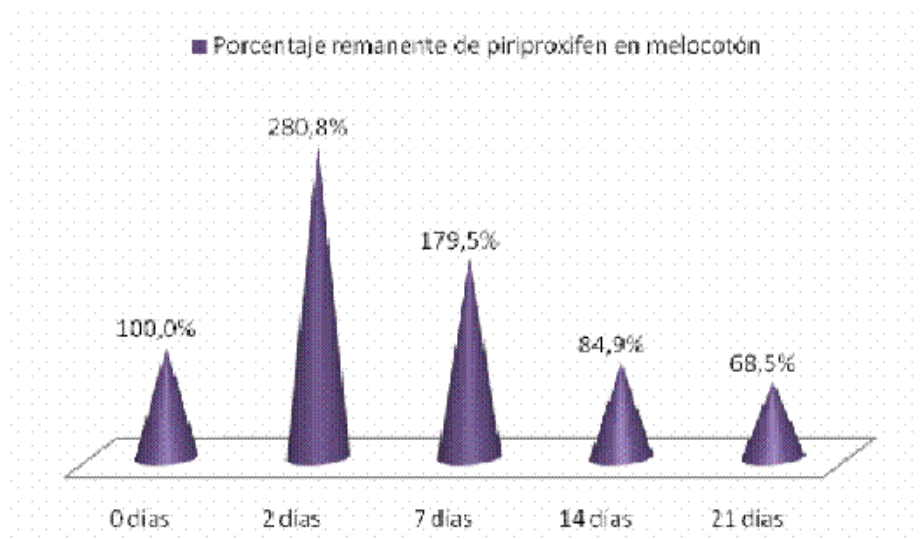


Figura 4.55.- *Disipación de los residuos de piriproxifen en el cultivo de melocotón durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA*

Los porcentajes remanentes de piriproxifen en el melocotón durante el tratamiento bajo BPA, demuestran como el residuo experimenta una primera etapa de distribución y almacenamiento en los frutos durante los 2 días iniciales del ensayo, obteniéndose el mayor porcentaje (280,8%), para después disipar rápidamente, en un 101,3% y 94,6% a los 7 y 14 días respectivamente, enmarcados en una fase disipación que duraría 12 días, y a partir de ahí habría una disminución lenta, de un 16,4%, dentro de la fase de persistencia, hasta que se alcanza un remanente del 68,5% respecto del residuo inicial.

En suma, fenoxicarb y piriproxifen en albaricoque mostraron cinéticas de disipación exponenciales, de pseudo-primer orden, similares entre ellas, a una velocidad de $0,1439 \text{ días}^{-1}$ para fenoxicarb y $0,05452 \text{ días}^{-1}$ para piriproxifen, formadas ambas por una fase de degradación o disipación rápida, en la que actuaron fundamentalmente los factores ambientales (humedad, temperatura, radiación solar, etc.) como agentes de disipación, y una fase de persistencia en la que el residuo siguió disipando, aunque más lentamente, debido fundamentalmente al metabolismo vegetal, caracterizado por tasas menores de degradación que las de los procesos ambientales.

A diferencia con el albaricoque, en melocotón mostraron una etapa de distribución y almacenamiento en los frutos primero, para después ofrecer cinéticas de disipación exponenciales, de pseudo-primer orden, similares entre ellas, con velocidades de $0,1333 \text{ días}^{-1}$ para fenoxicarb y $0,07721 \text{ días}^{-1}$ para piriproxifen. Ambas presentaron una fase de degradación rápida, influida fundamentalmente por factores ambientales, y otra de persistencia con disipación más lenta, debido fundamentalmente al metabolismo vegetal.

En la Figura 4.56 se comparan los niveles de residuos significativos entre los supuestos de BPA y CPA.

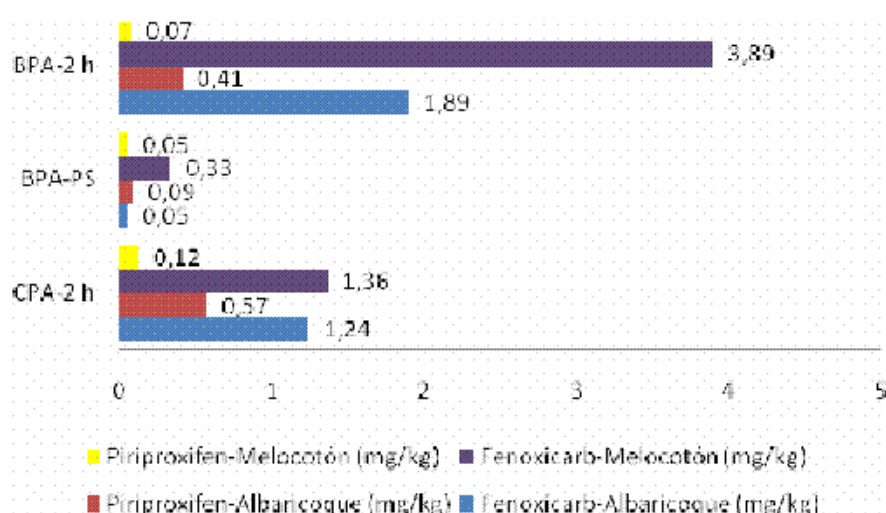


Figura 4.56.- Comparación de niveles de residuos entre la aplicación bajo BPA y CPA. BPA: Buenas prácticas agrícolas. PS: plazo de seguridad. CPA: Críticas prácticas agrícolas

Se observa que en general la concentración que se encuentra en CPA es resultado de la concentración remanente del fruto a plazo de seguridad y el depósito inicial de un tratamiento de estas características.

Finalmente, se debe señalar que no se observó la presencia de residuos de los dos compuestos en las muestras control de las parcelas de ensayo.

4.3.2.3. RESIDUOS EN PRODUCTOS ELABORADOS.

Únicamente se observó transferencia de residuos durante la elaboración de las conservas en el caso de albaricoque en almíbar para piriproxifen bajo criterios de BPA y CPA y fenoxicarb bajo CPA. Sin embargo, en el producto terminado los residuos de piriproxifen bajo BPA fueron inferiores al LQ (0,05 mg/kg) y en los otros dos casos, aunque se alcanzaron niveles de 0,09 y 0,20 mg/kg, terminaron no alcanzando el LQ durante el periodo de almacenamiento. Se debe recordar que los tres casos suponen usos ilegales de los productos, ya que no están permitidas ni las prácticas bajo CPA, ni el uso de piriproxifen en albaricoque. Aún así, los residuos de fenoxicarb y piriproxifen que quedaron en la conserva de albaricoque cuando se aplicaron CPA en el cultivo, estarían muy por debajo de los LMRs descritos para producto en fresco. Los resultados de residuos obtenidos durante la elaboración de las conservas se pueden observar en la Tabla 4.38.

Tabla 4.38.- Residuos de RCI's encontrados durante la elaboración y almacenamiento de conservas de albaricoque y melocotón en almíbar.

Proceso	Etapa	Albaricoque (mg / kg)				Melocotón (mg/kg)			
		Fenoxicarb		Piriproxifen		Fenoxicarb		Piriproxifen	
		BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
Elaboración	Lavado	< LQ	0,80	0,06	0,51	< LQ	0,11	< LQ	0,14
	Inm. cítrico ^a	--	--	--	--	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Sellado	< LQ	0,14	0,06	0,23	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Enfriamiento	< LQ	0,09	< LQ	0,20	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Conservación	3 meses	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	6 meses	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

^a Llenado en caliente con almíbar y ácido cítrico.

En las Figuras 4.57 y 4.58, se representan los porcentajes de disipación de los residuos en las conservas de albaricoque y melocotón, respectivamente.

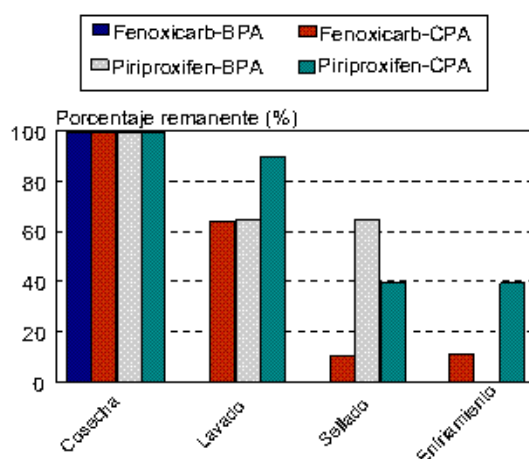


Figura 4.57.- Disipación de los residuos durante la elaboración y almacenamiento de la conserva de albaricoque

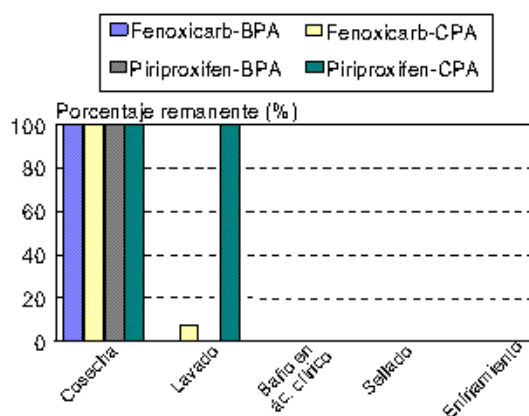


Figura 4.58.- Disipación de los residuos durante la elaboración y almacenamiento de la conserva de melocotón

A la vista de los resultados, se confirma que la disipación de residuos fue mayor durante la elaboración de la conserva de melocotón que en la de albaricoque. Entre las muestras procedentes de BPA y CPA en campo, la disipación fue siempre mayor para BPA, por suponer niveles de partida menores para el procesado. Además, entre plaguicidas, se encontraron menores porcentajes remanentes para fenoxicarb que para piriproxifen, y por tanto se puede decir que las etapas tecnológicas tuvieron un mayor efecto en la desaparición de fenoxicarb que en la de piriproxifen.

En general, comparando los niveles de residuos entre las muestras de cosechas y las de procesado, se observa que, cuando los residuos fueron bajos, la etapa determinante en su desaparición fue el lavado inicial, es el caso de fenoxicarb para BPA en albaricoque y melocotón y piriproxifen para BPA en melocotón, donde se alcanzaron niveles inferiores al LQ. En cambio, cuando los niveles de residuos fueron mayores, fue necesaria una etapa más para alcanzar niveles menores que el LQ, como los casos de fenoxicarb y piriproxifen para CPA en melocotón. En el caso particular de la conserva de melocotón, hay que tener en cuenta que la muestra de lavado procedía del pelado químico con NaOH 7% a 98 °C y aunque corta, sólo 30 s, supuso importantes cambios de temperatura y pH, que por tanto afectarían a los residuos. En el caso de la conserva de albaricoque, donde se encontró la menor disipación de fenoxicarb para CPA y piriproxifen para ambos tratamientos, las muestras donde se observó mayor desaparición fueron las procedentes del sellado y enfriamiento; posiblemente porque procedían de otras dos, el llenado en caliente y la esterilización, en las que se someten a un aumento de temperatura (aproximadamente 100 °C) y por tanto, influyen claramente en la disipación de los plaguicidas.

Finalmente, cuando se determinaron residuos en los productos elaborados, se observó una disipación hasta niveles inferiores al LQ durante los 3 primeros meses de almacenamiento, en la conserva de albaricoque con residuos de piriproxifen y fenoxicarb bajo condiciones de CPA.

4.3.3. DIÁLISIS EN PATRONES, FRUTOS DE HUESO FRESCOS Y PROCESADOS.

Para los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* realizados sobre muestras de albaricoque y melocotón en fresco y en conserva, fortificadas al nivel correspondiente encontrado a plazo de seguridad, condiciones críticas y productos elaborados (0,05-1 mg/kg), no se detectó la presencia de los insecticidas en el dializado.

Por tanto, se ensayaron cantidades crecientes en las muestras hasta encontrar intervalos de diálisis. En los frutos de hueso en fresco, la diálisis de ambos compuestos fue detectada en niveles de 5 $\mu\text{g/g}$ hasta 100 $\mu\text{g/g}$. En cambio, en las conservas, la diálisis de ambos compuestos fue detectada desde 1 $\mu\text{g/g}$ hasta 100 $\mu\text{g/g}$. Los porcentajes de diálisis encontrados en los ensayos no superaron el valor de 14% en fresco y 16% en conserva. La concentración máxima del dializado para los ensayos en fresco fue 30 $\mu\text{g/ml}$ para la fortificación de 100 $\mu\text{g/g}$. En cambio, en la conserva a 100 $\mu\text{g/g}$ casi llegó a 40 $\mu\text{g/ml}$. La máxima cantidad dializada se encontró para fenoxicarb en la conserva de melocotón y fue 0,3 mg para una cantidad digerida de 2 mg correspondiente a una fortificación de 100 $\mu\text{g/g}$. Se observó que en todos los casos fenoxicarb es más dializable que piriproxifen. Los resultados se presentan gráficamente en las Figuras 4.59, 4.60 y 4.61.

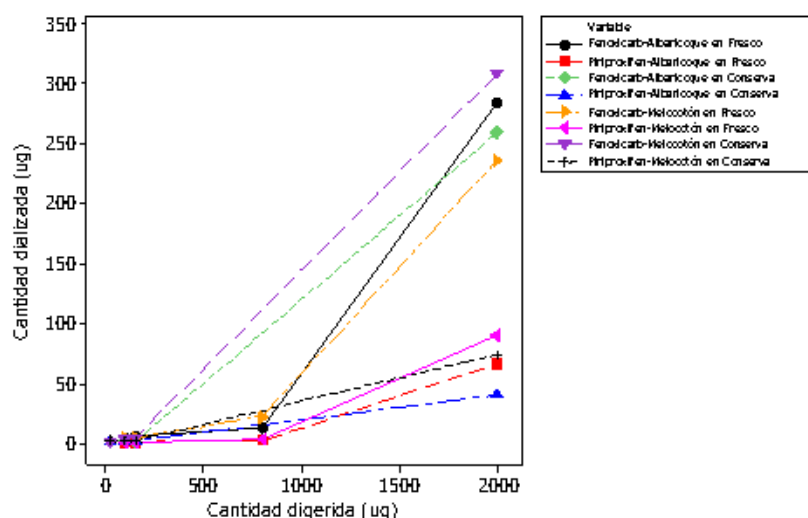


Figura 4.59.- Diálisis en la cantidad encontrada en frutos de hueso

Asimismo, se estudiaron las concentraciones de 5 y 7,5 $\mu\text{g/g}$ en estándares. En ambas se observaron valores de diálisis superiores para fenoxicarb. Comparativamente, los valores de cantidad dializada, porcentaje de diálisis y concentración del dializado fueron 2 y 3,5 veces mayores en fenoxicarb que en piriproxifen, para los niveles de 5 y 7,5 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

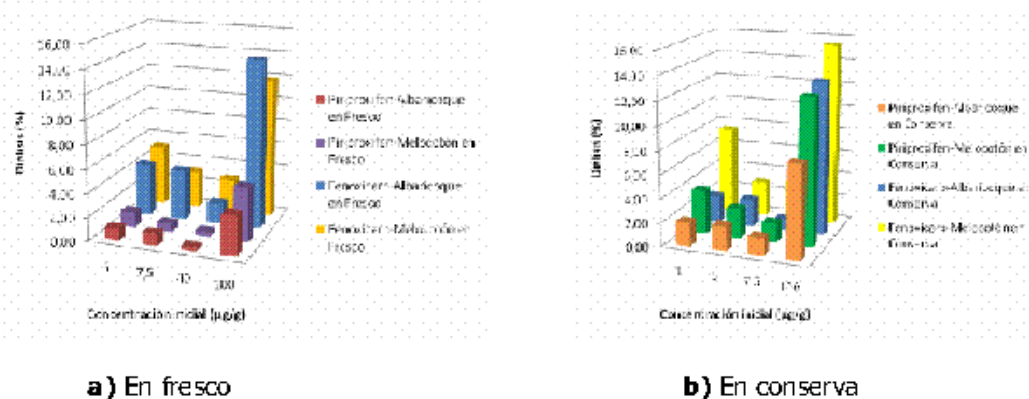


Figura 4.60.- Porcentajes de diálisis encontrados en frutos de hueso

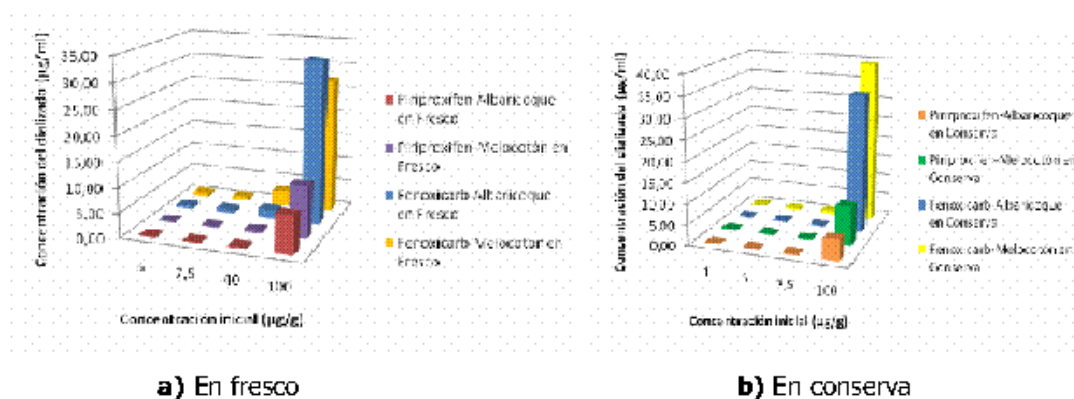


Figura 4.61.- Concentración del residuo encontrado en la membrana de diálisis en frutos de hueso

En estándares, en ningún caso el porcentaje de RCI dializable superó el 11%, la cantidad dializada 16 µg ni la concentración del dializado 2 µg/ml. Los resultados se pueden observar en las Figuras 4.62, 4.63 y 4.64.

En general, al aumentar la concentración inicial en la muestra, el parámetro indicador de la capacidad de diálisis, el porcentaje de diálisis o porcentaje de compuesto dializable, no varió significativamente, excepto para aquellas muestras de gran concentración, donde el proceso de diálisis se vio favorecido por un importante efecto de difusión pasiva a favor de gradiente durante las 2 horas que duró esta etapa.

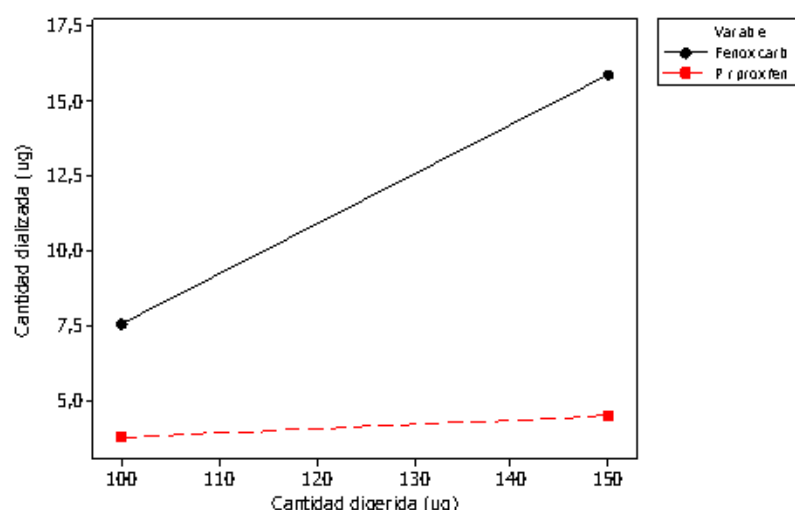


Figura 4.62.- Diálisis en cantidad encontrada en estándares

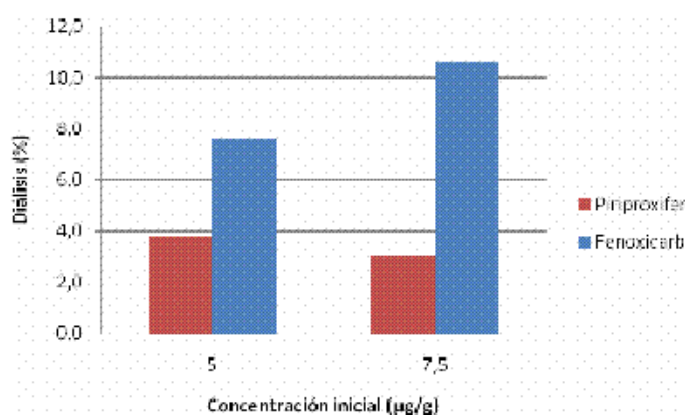


Figura 4.63.- Porcentajes de diálisis encontrados en estándares

Sin embargo, cuanto mayor fue la cantidad de plaguicida sometida a digestión o mayor la concentración inicial de la muestra, mayor fue la cantidad de plaguicida dializado. Así, la concentración de los residuos en la membrana tubular de diálisis depende exclusivamente de la concentración de la muestra o de la cantidad digerida de forma directa, ya que el volumen de dializado no varió significativamente entre muestras.

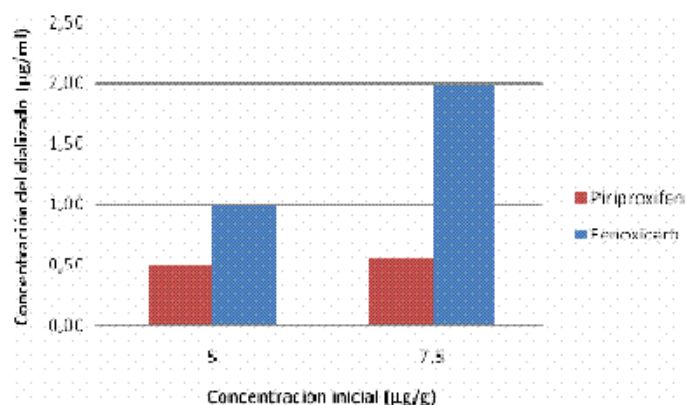


Figura 4.64.- Concentración del residuo encontrado en la membrana de diálisis en estándares

4.3.4. ESTUDIO DE DIETAS Y CÁLCULO DE INGESTAS.

En las Tablas 4.39 y 4.40, se exponen los valores del consumo anual y diario de los productos estudiados.

Tabla 4.39.- Valores de consumo anual para los frutos de hueso, según INE.

C = Consumo Anual (kg/persona · año)			
Grupo	Melocotón-Fresco	Melocotón-Conserva	Albaricoque
Nacional	6,31	0,67	0,57
Murcia	6,23	0,38	0,47
Urbano	6,63	0,63	0,69
No urbano	5,96	0,72	0,45

Tabla 4.40.- Valores de consumo diario para los frutos de hueso según el INE.

C/D = Consumo Diario (kg/persona · día)			
Grupo	Melocotón-Fresco	Melocotón-Conserva	Albaricoque
Nacional	1,73E-02	1,84E-03	1,56E-03
Murcia	1,71E-02	1,04E-03	1,29E-03
Urbano	1,82E-02	1,73E-03	1,89E-03
No urbano	1,63E-02	1,97E-03	1,23E-03

En la Tabla 4.41, se exponen los valores de la relación entre la ingestión diaria estimada y la diaria admisible (IDE/IDA) a partir de los datos de consumo del INE.

Tabla 4.41.- Relación IDE/IDA en frutos de hueso a partir de las estadísticas de consumo del INE.

IDE/IDA de Fenoxicarb				
Grupo	Alimento	Melocotón-Fresco	Melocotón-Conserva	Albaricoque
Nacional	Fresco BPA	1,73E-03	--	2,37E-05
	Fresco CPA	7,12E-03	--	5,87E-04
	Elaborado BPA	--	2,78E-05	2,37E-05
	Elaborado CPA	--	2,78E-05	4,26E-05
Murcia	Fresco BPA	1,71E-03	--	1,95E-05
	Fresco CPA	7,03E-03	--	4,84E-04
	Elaborado BPA	--	1,58E-05	1,95E-05
	Elaborado CPA	--	1,58E-05	3,51E-05
Urbano	Fresco BPA	1,82E-03	--	2,86E-05
	Fresco CPA	7,49E-03	--	7,10E-04
	Elaborado	--	2,62E-05	2,86E-05
	Elaborado CPA	--	2,62E-05	5,16E-05
No urbano	Fresco BPA	1,63E-03	--	1,87E-05
	Fresco CPA	6,73E-03	--	4,63E-04
	Elaborado BPA	--	2,99E-05	1,87E-05
	Elaborado CPA	--	2,99E-05	3,36E-05

IDE/IDA de Piriproxifen				
Grupo	Alimento	Melocotón-Fresco	Melocotón-Conserva	Albaricoque
Nacional	Fresco BPA	2,62E-04	--	4,26E-05
	Fresco CPA	6,29E-04	--	2,70E-04
	Elaborado BPA	--	2,78E-05	2,37E-05
	Elaborado CPA	--	2,78E-05	9,46E-05
Murcia	Fresco BPA	2,59E-04	--	3,51E-05
	Fresco CPA	6,21E-04	--	2,22E-04
	Elaborado BPA	--	1,58E-05	1,95E-05
	Elaborado CPA	--	1,58E-05	7,80E-05
Urbano	Fresco BPA	2,75E-04	--	5,16E-05
	Fresco CPA	6,61E-04	--	3,27E-04
	Elaborado BPA	--	2,62E-05	2,86E-05
	Elaborado CPA	--	2,62E-05	1,15E-04
No urbano	Fresco BPA	2,47E-04	--	3,36E-05
	Fresco CPA	5,94E-04	--	2,13E-04
	Elaborado BPA	--	2,99E-05	1,87E-05
	Elaborado CPA	--	2,99E-05	7,47E-05

*En color amarillo se identifican los resultados calculados con una concentración de residuos hipotética igual al LQ (0,05 mg/kg) aunque esas muestras presentaron niveles inferiores en la realidad.

En ella, se puede comprobar que esta relación es como máximo $7,49\text{E-}03$, lo que supone un factor de seguridad mínimo de 134 en cuanto a la ingestión de estos insecticidas. Además, en general la relación es mayor para los compuestos en el consumo de melocotón en fresco.

Respecto a los valores calculados según las encuestas de hábitos de consumo realizadas en nuestra Región, en las Tablas 4.42 y 4.43 se exponen los consumos calculados en función de raciones y semanas disponibles, tanto anual como diario.

Tabla 4.42.- Consumo anual de los frutos de hueso a partir de las encuestas realizadas.

C = Consumo Anual (kg/persona · año)			
Grupo	Melocotón-Fresco	Melocotón-Conserva	Albaricoque
Niños	3,06	1,62	2,28
Adolescentes	6,19	4,42	3,93
Adultos	7,75	1,18	4,80
Edad avanzada	0,97	4,27	4,66

Tabla 4.43.- Consumo diario de los frutos de hueso a partir de las encuestas realizadas.

C/D = Consumo Diario (kg/persona · día)			
Grupo	Melocotón-Fresco	Melocotón-Conserva	Albaricoque
Niños	8,39E-03	4,44E-03	6,24E-03
Adolescentes	1,70E-02	1,21E-02	1,08E-02
Adultos	2,12E-02	3,23E-03	1,31E-02
Edad avanzada	2,64E-03	1,17E-02	1,28E-02

Finalmente, en la Tabla 4.44, se exponen los resultados de la relación IDE/IDA, calculada con los consumos valorados por las encuestas, con resultados análogos a los obtenidos anteriormente.

En este caso, el valor máximo de la relación fue $8,76\text{E-}03$ y por tanto existiría un factor de seguridad mínimo entre ingestión y riesgo toxicológico de 114. También se puede observar como la relación es en general mayor en el consumo de melocotón en fresco para fenoxicarb y en albaricoque para piriproxifen.

Tabla 4.44.- Relación IDE/IDA en frutos de hueso a partir de las encuestas de consumo.

IDE/IDA de Fenoxicarb				
Grupo	Alimento	Melocotón-Fresco	Melocotón-Conserva	Albaricoque
Niños	Fresco BPA	1,68E-03	--	1,89E-04
	Fresco CPA	6,91E-03	--	4,69E-03
	Elaborado BPA	--	1,34E-04	1,89E-04
	Elaborado CPA	--	1,34E-04	3,40E-04
Adolescentes	Fresco BPA	1,70E-03	--	1,63E-04
	Fresco CPA	6,99E-03	--	4,05E-03
	Elaborado BPA	--	1,83E-04	1,63E-04
	Elaborado CPA	--	1,83E-04	2,94E-04
Adultos	Fresco BPA	2,12E-03	--	1,99E-04
	Fresco CPA	8,76E-03	--	4,94E-03
	Elaborado	--	4,89E-05	1,99E-04
	Elaborado CPA	--	4,89E-05	3,58E-04
Edad avanzada	Fresco BPA	2,64E-04	--	1,93E-04
	Fresco CPA	1,09E-03	--	4,79E-03
	Elaborado BPA	--	1,77E-04	1,93E-04
	Elaborado CPA	--	1,77E-04	3,48E-04

IDE/IDA de Piriproxifen				
Grupo	Alimento	Melocotón-Fresco	Melocotón-Conserva	Albaricoque
Niños	Fresco BPA	2,54E-04	--	3,40E-04
	Fresco CPA	6,10E-04	--	2,16E-03
	Elaborado BPA	--	1,34E-04	1,89E-04
	Elaborado CPA	--	1,34E-04	7,56E-04
Adolescentes	Fresco BPA	2,57E-04	--	2,94E-04
	Fresco CPA	6,17E-04	--	1,86E-03
	Elaborado BPA	--	1,83E-04	1,63E-04
	Elaborado CPA	--	1,83E-04	6,53E-04
Adultos	Fresco BPA	3,22E-04	--	3,58E-04
	Fresco CPA	7,73E-04	--	2,27E-03
	Elaborado BPA	--	4,89E-05	1,99E-04
	Elaborado CPA	--	4,89E-05	7,96E-04
Edad avanzada	Fresco BPA	4,01E-05	--	3,48E-04
	Fresco CPA	9,61E-05	--	2,20E-03
	Elaborado BPA	--	1,77E-04	1,93E-04
	Elaborado CPA	--	1,77E-04	7,73E-04

*En color amarillo se identifican los resultados calculados con una concentración de residuos hipotética igual al LQ (0,05 mg/kg) aunque esas muestras presentaron niveles inferiores en la realidad.

4.3.5. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en la validación del método analítico, basado en una extracción en fase sólida sencilla, se puede asegurar que es suficientemente preciso, sensible y exacto para el propósito de esta experiencia. Cumple los requisitos establecidos en la Guía SANCO para el rango seleccionado (0,05-1 mg/kg), suficientemente amplio para abarcar los niveles de residuos encontrados. Por tanto, la metodología desarrollada fue eficaz para alcanzar el objetivo de esta experiencia.

En los estudios de campo supervisados bajo BPA no se superaron los LMRs fijados legalmente para estos compuestos en ningún caso. Sin embargo, hay que señalar que el nivel de piriproxifen en melocotón al plazo de seguridad fue igual a su LMR, siendo esto admisible toxicológica y legalmente en estos momentos. Por otra parte, el LMR propuesto para piriproxifen en albaricoque durante la experiencia bajo BPA (0,05 mg/kg), igual al que tiene fijado oficialmente este compuesto en melocotón, fue ampliamente superado pero sería admisible bajo los criterios de incertidumbre de SANCO (DG SANCO, 2007).

Considerando los niveles de residuos obtenidos antes de la cosecha durante los ensayos de campo con BPA practicados, se puede afirmar que se trata de productos que experimentan una rápida degradación en los primeros días pero que después presentan persistencia en los cultivos. Según el tiempo de vida media y la velocidad de disipación encontradas, piriproxifen es más persistente que fenoxicarb en ambos cultivos. Sin embargo, fenoxicarb produce un depósito mayor en ellos. El LMR de fenoxicarb en estos cultivos se alcanzaría a tiempo 0 para albaricoque y a los 12 días en melocotón, a diferencia del plazo de seguridad establecido en ambos (21 días). El LMR fijado para piriproxifen en melocotón se alcanzaría a los 19 días. En cambio, ese LMR en albaricoque tardaría 32 días en alcanzarse.

En las aplicaciones fitosanitarias críticas, se observa que en general la concentración que se encuentra en el cultivo es resultado de la concentración remanente del fruto a plazo de seguridad y el depósito inicial de un tratamiento de estas

características. Los niveles de residuos en estas condiciones fueron $\leq$ LMRs correspondientes excepto para la concentración de piriproxifen en albaricoque y melocotón, que fueron superiores a sus tolerancias admitidas, incluso asumiendo la incertidumbre que recoge SANCO para estos casos (DG SANCO, 2007).

En los estudios de procesado, se confirma que la disipación de residuos fue mayor durante la elaboración de la conserva de melocotón que en la de albaricoque. Entre las muestras procedentes de BPA y CPA en campo, la disipación fue siempre mayor para BPA, por suponer niveles de partida menores para el procesado. Además, entre plaguicidas, se encontraron menores porcentajes remanentes para fenoxicarb que para piriproxifen, y por tanto se puede decir que las etapas tecnológicas tuvieron un mayor efecto en la desaparición de fenoxicarb que en la de piriproxifen. Cuando los residuos de las muestras de cosecha fueron bajos, la etapa determinante en su desaparición fue el lavado inicial, alcanzando niveles $< LQ$. En el caso particular de la conserva de melocotón, hay que tener en cuenta que la muestra de lavado procedía del pelado químico con NaOH 7% a 98 °C y aunque corta, sólo 30 s, supuso importantes cambios de temperatura y pH, que por tanto afectarían a los residuos. Cuando los niveles de residuos en las muestras de cosechas fueron mayores, hicieron falta más etapas para alcanzar niveles $< LQ$, como los casos de fenoxicarb y piriproxifen para CPA en melocotón, en donde con la inmersión en cítrico se llegó a niveles no cuantificables. En el caso de la conserva de albaricoque, se observó la mayor desaparición en las muestras procedentes del sellado y enfriamiento, pero no por estas etapas en sí, que no deben suponer ningún cambio en los residuos, sino porque procedían del llenado en caliente y la esterilización en las que se produce un considerable aumento de temperatura, factor verdaderamente influyente en la disipación de los residuos remanentes.

Finalmente, cuando se determinaron residuos en los productos procesados, sólo en los casos de la conserva de albaricoque con residuos de piriproxifen y fenoxicarb en la situación de CPA, se observó disipación hasta niveles $< LQ$ durante los 3 primeros meses de almacenamiento de los botes de conserva.

No se detectó biodisponibilidad *in vitro* de los insecticidas en muestras que contenían los niveles de residuos determinados tras los tratamientos fitosanitarios y/o procesado. Se encontró diálisis en un rango de 1-100 µg/g, que no se correspondía con los niveles de la realidad.

En los ensayos de biodisponibilidad *in vitro*, se observó que fenoxicarb fue más dializable que piriproxifen tanto en las muestras en fresco y procesadas como en estándares. Los resultados indican que en general la diálisis fue en estándares > frutos de hueso en conserva > frutos en fresco. Por tanto, se encuentran diferencias para la diálisis en relación a la estructura del compuesto y la matriz donde se encuentra.

En los estudios de consumo realizados con los datos proporcionados por el INE se obtiene un factor de seguridad de 134 entre la IDA e IDE de cada producto, para los alimentos seleccionados. Con las encuestas practicadas, este factor llega hasta 114, debido a diferencias metodológicas entre ambas estadísticas. Por tanto, los cálculos indican un factor de seguridad muy amplio entre la ingestión de estos productos y su riesgo de toxicidad crónica para un consumidor que abarca todas las zonas de residencia y los principales grupos de población.

4.3.6. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.

4.3.6.1. COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Payá, P., Mulero, J., Zafrilla, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2008. *In vitro bioavailability of insect growth regulator residues in fresh, juice and can production of oranges, apricots and peaches.* 7th European Pesticide Residue Workshop, Berlin (Germany).

Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M.A., Zafrilla, P., Barba, A. 2007. *Bioavailability of insect growth regulators in citrus and stone fruits.* 59th International Symposium on Crop Protection, Ghent (Belgium).

Payá, P., Oliva, J., Barba, A., Cámara M.A. 2006. *Dissipation of fenoxycarb and pyriproxyfen in field and canning of apricots*. 4th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and 10th Symposium on the Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Almería (Spain).

4.3.6.2. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS.

Payá, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2007. *Dissipation of insect growth regulators in fresh and canned fruits*. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 87(13-14), 971-983.

Payá, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2007. *Dissipation of fenoxycarb and pyriproxyfen in fresh and canned peach*. J. Environ. Sci. Heal. B, 42(7), 767-773.

Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M.A., Zafrilla, P., Barba, A. 2007. *Bioavailability of insect growth regulators in citrus and stone fruits*. Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University, 72(2), 151-159.

4.4. PERSISTENCIA, DEGRADACIÓN Y BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE FENOXICARB, FLUFENOXURON, LUFENURON Y PIRIPROXIFEN EN UVA Y VINO TINTO DE LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN JUMILLA (MURCIA).

Aunque el consumo de uva no ocupa un puesto relevante en el presupuesto de las familias españolas, debido a que es una fruta exclusivamente de temporada y la importación internacional para otras épocas sigue siendo limitada, es evidente que el consumo de vino es un valor al alza en España. En la última encuesta de presupuestos familiares anual publicada por el INE, el vino fue la bebida más consumida, por encima de la cerveza (INE, 2005). Este hecho, demuestra que el control de los productos alimenticios elaborados es actualmente tan necesario como el de los productos en fresco.

En el último anuario de estadística agroalimentaria publicado por el MAPA, el viñedo para vinificación representó el 95% de la producción total, situándose el primero respecto al viñedo destinado a uva de mesa (5%) y el destinado a pasificación (0,02%). Prácticamente el 100% (5.739.408 Tm) de la producción total de los viñedos para vinificación (5.740.746 Tm) se emplea para elaboración de vinos y mostos, aunque un 0,02% de la producción (1.338 Tm) se destina a consumo en fresco (MAPA, 2006b).

No obstante, en la Región de Murcia, el viñedo de vinificación y el de uva de mesa ocupan la misma proporción en la producción regional, con un 49% y 51%,

respectivamente. Asimismo, su destino principal es la producción de fresco y vino (CARM, 2006). Y en la elaboración de vinos de nuestra Región, destaca sobre todo la variedad Monastrell.

Principalmente, los vinos españoles se exportan a Estados Unidos. Allí encontramos que la disponibilidad per cápita de fresco y procesado supone respectivamente un 40% y un 60%, aunque el consumo de vino/mosto se encuentra casi al mismo nivel que el de uvas pasas (USDA, 2007b).

En la escala nacional, destaca la elaboración de vinos tintos y rosados, que encabezan la producción vinícola. En el año 2005, se produjeron 20.556.500 HI de tintos y rosados y 15.880.400 HI de blancos. En concreto, según los últimos datos del Ministerio de Agricultura, la Denominación de Origen (D.O.) Jumilla, que agrupa ocho municipios de las provincias de Murcia y Albacete y cuya variedad mayoritaria es la uva Monastrell, con aproximadamente un 80% del total, es la quinta en superficie de cultivo y la decimoséptima por número de viticultores, de las 57 denominaciones que posee España. En la campaña 2004/2005 esta Denominación contó con 30.740 ha y 2.967 viticultores (MAPA, 2006b).

Por tanto, consideramos importante conocer el impacto de los residuos de los cuatro insecticidas objeto de estudio en productos con una progresiva difusión entre la población, como son los vinos de la D.O. Jumilla. Para ello, se aplicaron los correspondientes formulados en las uvas, según criterios de BPA y CPA en ensayos supervisados, con objeto de determinar las diferencias en sus niveles de concentración y cinéticas de disipación. Se realizó un seguimiento de los residuos desde la aplicación hasta la cosecha y durante la vinificación. Finalmente, mediante ensayos de biodisponibilidad *in vitro*, estadísticas y encuestas de consumo, se determinó la exposición crónica a los residuos de la uva y el vino.

4.4.1. ESTUDIOS DE CAMPO Y PROCESADO.

En los ensayos de campo supervisados en uva para vinificación var. Monastrell, se aplicaron fenoxicarb, flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen, según las autorizaciones de registro que constan en el MAPA para los formulados empleados. En la Tabla 4.45, se expone un resumen de las características de los formulados y los LMRs que presentan en el cultivo seleccionado (MAPA, 2008a).

Tabla 4.45.- Características de registro de los plaguicidas estudiados en uva var. Monastrell.

Producto comercial	RCI	Plaga	Dosis (%)	LMR (mg/kg)	PS (días)
Insegar	Fenoxicarb	Polillas del racimo	0,02-0,06	1	21
Cascade	Flufenoxuron	Ácaros tetrarínidos, mosquito verde, píral, polillas del racimo	0,05-0,1	0,5	28
Match	Lufenuron	Píral	0,05	1	28
Atominal	Piriproxifen	Cochinillas	50-75*	0,05	NP

PS: Plazo de seguridad. *: Dosis en ml/Hl. NP: No procede.

La parcela experimental se ubicó en una finca productora representativa de la D.O. Jumilla, en la Región de Murcia. Se identificó adecuadamente para evitar contaminaciones. Fue dividida en área control y área de tratamiento. El área control se situó lo suficientemente cerca de la tratada como para garantizar idéntico cultivo y condiciones climáticas y evitar riesgos de contaminación procedente de los tratamientos. Las características de las parcelas utilizadas se pueden observar en la Tabla 4.46.

Tabla 4.46.- Características de las parcelas experimentales.

Forma de Cultivo	Aire libre
Plantación	Por estacas
Antigüedad	14 años
Localización*	Paraje Hoya Torres, Jumilla
GPS (°N; °W; m)	38,3492°; 115,334°; 772
Área (m²)	101,56
Marco (m)	2,5 x 2,5

* Región de Murcia.

El muestreo de campo se realizó al azar, tomando muestras de todas las parcelas; incluyendo tanto frutos cubiertos por follaje como aquellos más expuestos a la luz, evitándose los puntos de inicio y final de la aplicación por posibles derivas. Las muestras fueron recogidas con adecuadas medidas de protección, evitando contaminaciones entre áreas y procurando una mínima manipulación. Se muestreó en orden creciente de dosis de aplicación, de manera que primero se tomó muestra en el área control y después en el área de aplicación. Una vez recogidas, fueron envasadas en bolsas opacas de polietileno inequívocamente identificadas. Durante el transporte al laboratorio, las bolsas se mantuvieron a temperatura ambiente, en posición estable, protegiéndolas de golpes y se evitó su exposición directa a la luz. En cada toma de muestras, se recogieron aproximadamente 2 kg por cada parcela de ensayo, cantidad formada por cortes de más de 12 racimos procedentes de diferentes cepas, de acuerdo con las recomendaciones de FAO para la realización de ensayos supervisados para este cultivo (FAO, 1990), excepto en el caso de la muestra dedicada a la vinificación para la que se recogieron unos 15 kg.

El primer ensayo supervisado realizado en la parcela fue siguiendo el código de BPA (FAO, 2003b; CARM, 2003). Para ello, se respetaron dichas normas y las dosis y plazos de seguridad registrados en cada caso. Las dosis aplicadas se encontraban situadas en el intervalo permitido por el MAPA. Las dosis de aplicación de piriproxifen, fenoxicarb, flufenoxuron y lufenuron en la vid fueron 60 ml/Hl, 0,04%, 0,08%, 0,05%, respectivamente. Se realizó un muestreo periódico desde la aplicación hasta el momento del plazo de seguridad permitido. La primera muestra se recogió 2 h después de la aplicación, establecido como tiempo de secado, de manera que el producto quedase fijado en la planta. En la toma de muestra a plazo de seguridad, se recogió una muestra adicional que sería sometida a la vinificación. Se registraron las condiciones ambientales más relevantes (temperatura y humedad relativa) en el momento de la aplicación, medidas en un punto representativo de la parcela.

En los ensayos supervisados bajo CPA, se introdujeron dos condiciones críticas desde el punto de vista de la presencia de residuos: nueva dosis transcurrido el plazo de seguridad y toma de muestra inmediata, de manera que no se respetaron los plazos de

seguridad preceptivos en ningún caso. Así, el día que cumplía el plazo de seguridad en el ensayo bajo BPA, y una vez finalizado éste, se aplicaron otra vez las mismas dosis sobre los cultivos; posteriormente, se recogieron muestras 2 h después, una destinada al análisis en el laboratorio y otra destinada a la vinificación en la bodega.

Las condiciones en las que se practicaron ambos tipos de ensayo se pueden observar en la Tabla 4.47.

Tabla 4.47.- Condiciones de los ensayos realizados bajo BPA y CPA.

Cultivo	V (l)	Dosis (l/ha)		Temperatura (°C)		Humedad (%)		Muestreo (días)	
		BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
Vid	33	3249,23	3249,23	23	24	55	45	0-2-7-14- 21-28	0

La transformación de uva en vino durante la vinificación conlleva procesos que pueden tener gran influencia en la disipación de los residuos de plaguicidas. En general, las etapas enológicas convencionales como despalillado, estrujado, prensado, trasiego, clarificado y filtrado implican una separación mecánica de sólidos o semisólidos (raspón, orujo, lías y heces), adición de coagulantes y agentes filtrantes susceptibles de afectar el destino de los residuos de plaguicidas durante la elaboración. Además, la técnica de vinificación empleada, con posibilidad de maceración, adición de taninos o empleo de criomaceración, etc., puede influir también debido a efectos de temperatura o de limpieza mecánica. Así, estos procesos pueden ser un factor determinante en la disminución de los residuos de plaguicidas de la uva original. En este sentido, diversas publicaciones atestiguan una disipación notable durante la vinificación con respecto a los residuos encontrados en la cosecha (Cabras et al., 1995, 1999, 2000a, 2001; Cabras y Angioni, 2000; Navarro et al., 1999, 2000; Oliva et al., 1999, 2006, 2007a, 2007b; Flori et al., 2000; Teixeira et al., 2004; Ruediger et al., 2004, 2005; Fernández et al., 2005a, 2005b). Sin embargo, el efecto que provoquen las prácticas enológicas dependerá de las características fisicoquímicas de cada residuo. Será más probable encontrar en el producto final los plaguicidas de mayor solubilidad en medios hidroalcohólicos, como los que

conforman el mosto y el vino. En este sentido, la presencia de residuos de RCI's en el vino no había sido estudiada con anterioridad.

Se realizaron micro vinificaciones (15 kg), separadamente y por duplicado, para cada tipo de tratamiento de la uva en origen y en orden creciente de dosis de aplicación para evitar riesgos de contaminación. La elaboración de los vinos se realizó en una planta piloto situada en la Bodega San Isidro (Murcia) perteneciente al Consejo Regulador de la D.O. Jumilla. El proceso y la manipulación tuvieron lugar tal y como lo realiza esta bodega en la práctica. Los procesos fueron secuenciales, recogiendo una muestra de 1 kg al cabo de cada etapa influyente en la disipación de residuos.

Las vinificaciones se realizaron sin adición de levaduras seleccionadas. A las uvas despalilladas y estrujadas, se añadió 80 mg/l de SO₂ para controlar la fermentación. El estrujado se mantuvo en maceración dinámica durante 10 días a una temperatura controlada de 26-28 °C. Tras el prensado mecánico y finalizado el periodo de fermentación del mosto (10 días), el vino resultante se trasegó y clarificó utilizando 40 g/Hl de bentonita y 8 g/Hl de gelatina. Finalmente, los vinos fueron filtrados a través de filtros de nylon de 0,45 µm de diámetro. Los análisis de residuos se realizaron en los productos líquidos (mostos y vinos) y en los subproductos sólidos o semi-sólidos (estrujado, orujo y lías).

Los vinos no pasaron por barrica. Fueron almacenados durante 6 meses en lugar fresco, seco y protegido de la luz. Durante este periodo, fueron muestreados aleatoriamente y se analizaron.

El proceso se representa esquematizado en la Figura 4.65.

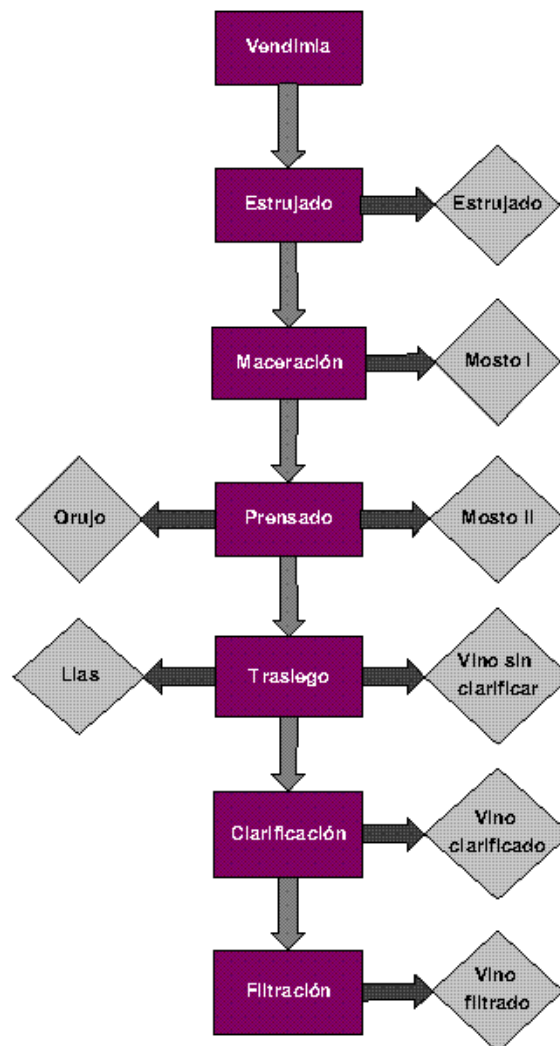


Figura 4.65.- *Elaboración de vino tinto 100% Monastrell*

4.4.2. ANÁLISIS DE RESIDUOS.

A continuación se muestran los resultados de los análisis de residuos realizados en las experiencias de campo y en la vinificación junto con los valores de la validación analítica y de los controles de calidad.

4.4.2.1. VALIDACIÓN ANALÍTICA.

La metodología analítica descrita en el apartado 3.2.2.3, basada en extracción por QuEChERS y determinación por CL-MS, fue validada teniendo en cuenta los criterios descritos en la Guía SANCO y la norma internacional ISO 17025:2005 (ISO, 2005; DG SANCO, 2007). En todos los casos el LQ se fijó en 0,05 mg/kg y el LD estuvo comprendido entre 0,01-0,15 ng, como se muestra en la Tabla 4.48.

Tabla 4.48.- Límites de detección y cuantificación en uva de vinificación.

RCI	LD (ng)	LQ _T (mg/kg)	LQ _E (mg/kg)
Fenoxicarb	0,04	0,01	0,05
Piriproxifen	0,15	0,05	0,05
Fenoxicarb	0,15	0,05	0,05
Piriproxifen	0,01	0,003	0,05

LQ_T = Establecido teóricamente. LQ_E = Fijado experimentalmente.

En todo el proceso de validación, el intervalo de concentración ensayado fue 0,05-1 mg/kg. Así, la linealidad de respuesta del detector se estudió en este rango; precisión y exactitud fueron estudiadas en 0,05 mg/kg y 1 mg/kg con cinco réplicas por nivel, empleándose multipatrones para fortificar las muestras en blanco previamente analizadas. A diferencia de las demás, en esta experiencia se emplearon calibraciones fortificadas en matriz, con el objetivo de implantar la misma metodología que previamente se había puesto a punto en el CVUA-Stuttgart (Alemania) (Payá et al., 2007a). En la Tabla 4.49, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.49.- Resultados de la validación analítica en uva de vinificación.

Matriz/ Plaguicida	Parámetros (%)	R ² 0,05-1	RSD Repetibilidad		RSD Intra- Reproducibilidad		Recuperación Media	
	Nivel (ppm)		0,05	1	0,05	1	0,05	1
Patrón en matriz	Fenoxicarb	99,9	9,2	5,3	6,3	6,1	--	--
	Flufenoxuron	97,7	1,6	9,4	7,8	8,7	--	--
	Lufenuron	94,9	12,7	6,8	15,5	6,7	--	--
	Piriproxifen	99,8	16,5	7,6	17,6	4,9	--	--
Uva	Fenoxicarb	--	14,0	6,2	14,6	8,6	78,4	80,8
	Flufenoxuron	--	6,21	1,6	12,6	9,5	97,3	91,2
	Lufenuron	--	18,5	6,6	14,5	11,3	89,7	101,3
	Piriproxifen	--	7,0	10,9	19,5	12,5	121,0	85,3

Como se muestra, los niveles validados (0,05 y 1 mg/kg) abarcaron los LMRs fijados en uva de vinificación (rango 0,05-1 mg/kg). El LQ (0,05 mg/kg) para todas las combinaciones plaguicida-matriz fue siempre igual o inferior al LMR establecido. Los coeficientes de correlación lineal fueron $\geq 95\%$, indicando una respuesta lineal del detector adecuada para cada plaguicida en el intervalo analítico estudiado. La precisión en patrones mostró valores de RSD inferiores al 10% en el 75% de los valores, con excepción de la repetibilidad e intra-reproducibilidad de lufenuron y piriproxifen a 0,05 $\mu\text{g/ml}$ con RSD comprendidos entre 12,7-17,6%. En las muestras fortificadas, los valores de RSD en repetibilidad fueron inferiores al 20%, con más de la mitad de los valores menores del 7%. La recuperación media se mantuvo en las fortificaciones entre 70-120%, si bien la de piriproxifen a 0,05 mg/kg fue 121%. Este valor fue el máximo entre las recuperaciones medias y el mínimo estuvo situado en 78,4% para fenoxicarb a 0,05 mg/kg. Por último, los resultados de RSD en la reproducibilidad intra-laboratorio de las muestras fortificadas fueron inferiores al 20%, con dos valores menores del 9,5% y seis comprendidos entre 11,3% y 19,5%.

4.4.2.1.1. Controles de calidad.

En todos los casos, las recuperaciones de los controles de calidad estuvieron comprendidos entre 70-120%. En la Tabla 4.50, se pueden observar los valores medios. Las inyecciones de blancos de matriz y disolvente, incluidas en las secuencias de análisis de las muestras, confirmaron la ausencia de contaminaciones o interferencias.

Tabla 4.50.- Media de los resultados de los controles de calidad analizados

Nivel (mg/kg)	Recuperación media (%)			
	Fenoxicarb	Flufenoxuron	Lufenuron	Piriproxifen
0,05	88,8	110,1	114,8	112,2
1	88,3	97,6	94,1	90,8

4.4.2.2. RESIDUOS EN PRODUCTO FRESCO.

La Tabla 4.51, muestra los resultados de los residuos de RCIs encontrados en los productos en fresco durante los ensayos de campo realizados.

Tabla 4.51.- Residuos de RCIs encontrados en el cultivo de uva var. Monastrell durante los ensayos de campo supervisados cuando se aplican BPA y CPA.

Ensayo de campo	BPA						CPA
Muestra (mg/kg)	2 h	2 d	7 d	14 d	21 d	28 d	2 h
Fenoxicarb	0,28	0,09	0,07	0,05	0,07	--	0,27
Flufenoxuron	0,45	0,28	0,26	0,22	0,23	0,21	0,57
Lufenuron	0,14	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,11
Piriproxifen	0,15	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,18

En condiciones de BPA, los residuos de fenoxicarb, flufenoxuron y lufenuron no superaron los LMRs transcurridos sus plazos de seguridad establecidos por el MAPA. Sin embargo, en el caso de piriproxifen, para el que este Ministerio no especifica plazo de seguridad concreto, el nivel de residuos en la muestra del primer día del ensayo bajo BPA (0,15 mg/kg) excedió en el triple su LMR (0,05 mg/kg) y posteriormente se alcanzaron niveles iguales o ligeramente superiores (0,06 mg/kg) hasta finalizar el plazo de seguridad propuesto en este trabajo (28 días). Por lo tanto, los niveles de piriproxifen sólo podrían ser admisibles toxicológica y legalmente a partir del segundo día de un ensayo de estas características.

En caso de aplicación de CPA, y teniendo en cuenta las condiciones de incertidumbre expandida (50%) que establece SANCO en casos de niveles próximos al LMR (DG SANCO, 2007), sólo piriproxifen (0,18 mg/kg) superaría su tolerancia máxima (0,05 mg/kg) en este cultivo. En el caso de lufenuron, su nivel de residuos (0,57 mg/kg) entraría dentro del intervalo permitido por SANCO para determinar residuos violativos con respecto a su LMR (0,5 mg/kg).

En las Figuras 4.66, 4.67 y 4.68, se pueden observar las representaciones de las curvas de disipación de los residuos encontrados durante el ensayo bajo BPA.

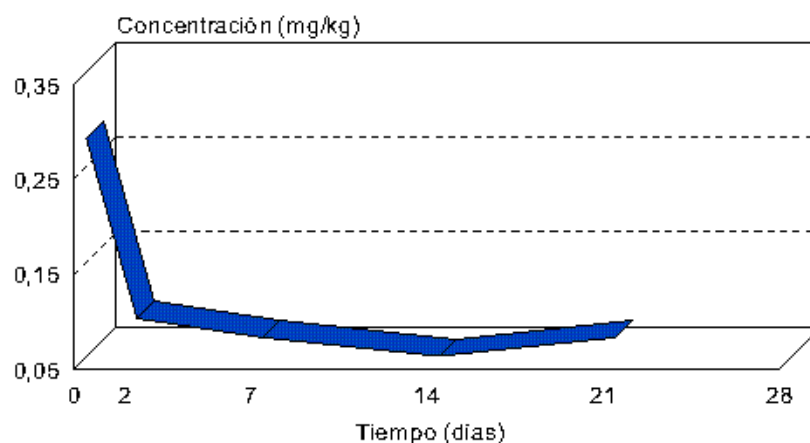


Figura 4.66.- Curva de disipación del residuo de fenoxycarb en la uva de vinificación durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

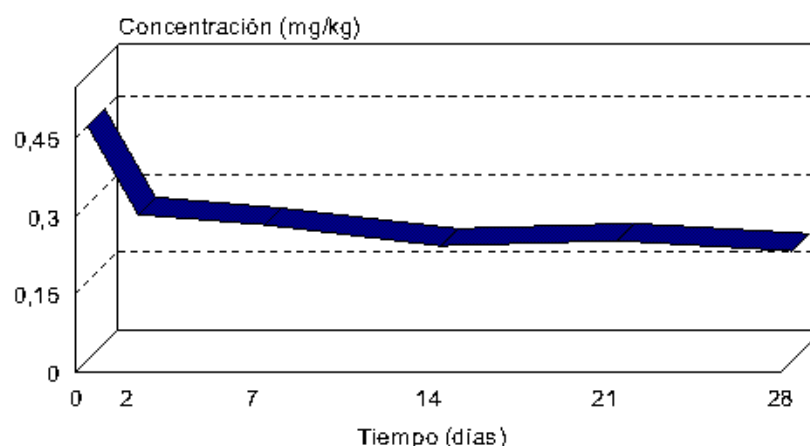


Figura 4.67.- Curva de disipación del residuo de flufenoxuron en la uva de vinificación durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

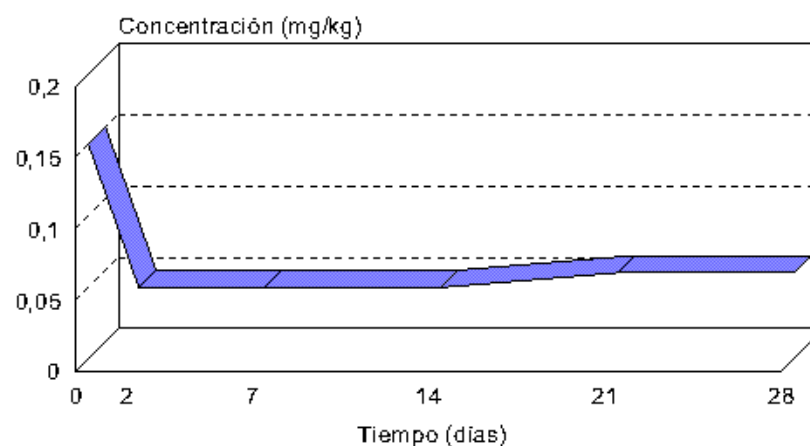


Figura 4.68.- Curva de disipación del residuo de piriproxifen en la uva de vinificación durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

En el caso de lufenuron, no se pudo estudiar su curva de disipación, ya que sólo se encontraron residuos a las 2 horas, siendo el depósito inicial 0,14 mg/kg.

Por la tendencia de las curvas de disipación, cabe pensar que sigan una regresión logarítmica y por tanto una cinética exponencial. Sin embargo, los coeficientes de correlación obtenidos fueron $< 0,9$, indicando que lo que verdaderamente encontramos es una fase de degradación de dos puntos y una fase de persistencia asintótica, sin posibilidad de relacionar matemáticamente la disipación de los residuos con el tiempo. Por tanto, no se pudo calcular en ningún caso los parámetros matemáticos que podrían informar sobre la disipación de estos plaguicidas en el cultivo.

Los residuos de fenoxicarb en la uva de vinificación durante el intervalo previo a la cosecha en el ensayo con BPA, describieron una fase de disipación inicial rápida, en los 2 primeros días del ensayo, en la que se obtiene un tercio de los residuos iniciales, y a continuación, una fase de persistencia muy lenta, en la que apenas hay disipación, que duró los 19 días restantes para alcanzar el plazo de seguridad fijado para el compuesto (21 días). El residuo muestra por tanto poca disipación en campo transcurridos los dos primeros días del ensayo aunque sus residuos en la fase de persistencia fueron $\leq 0,09$ mg/kg.

Los residuos de flufenoxuron durante el intervalo comprendido entre su aplicación y el plazo de seguridad, en el ensayo con BPA, describieron una fase de disipación inicial rápida, en dos días, análogamente a lo ya descrito, aunque en este caso se obtienen dos tercios de los residuos iniciales, y por tanto la tasa de disipación en esta fase sería inferior a las anteriores. A continuación se observó una fase de persistencia muy lenta, en la que apenas hay disipación, que duró los 26 días restantes para alcanzar el plazo de seguridad del compuesto (28 días). El residuo muestra por tanto poca disipación en campo transcurridos los dos primeros días del ensayo aunque sus residuos en la fase de persistencia fueron $\leq 0,28$ mg/kg.

Los residuos de piriproxifen para el mismo intervalo, en el ensayo con BPA, describieron una fase de disipación inicial rápida, en dos días, similar a los casos anteriores, en la que se obtiene un tercio de los residuos iniciales. A continuación se observó una fase de persistencia muy lenta, en la que apenas hay disipación, que duró los 26 días restantes para alcanzar el plazo de seguridad del compuesto (28 días). No fue posible por tanto obtener una regresión de los residuos. El residuo muestra por tanto poca disipación en campo transcurridos los dos primeros días del ensayo aunque sus residuos en la fase de persistencia fueron $\leq 0,06$ mg/kg.

En el caso de lufenuron, no se pudo estudiar su curva de disipación ni su regresión en este cultivo, ya que sólo se encontraron residuos a las 2 h o primer día, siendo su depósito inicial de 0,14 mg/kg en la uva de vinificación.

En las Figuras 4.69, 4.70, 4.71 y 4.72 se muestra la disipación de los residuos en forma de porcentajes remanentes encontrados en el cultivo tras la aplicación agrícola bajo BPA.

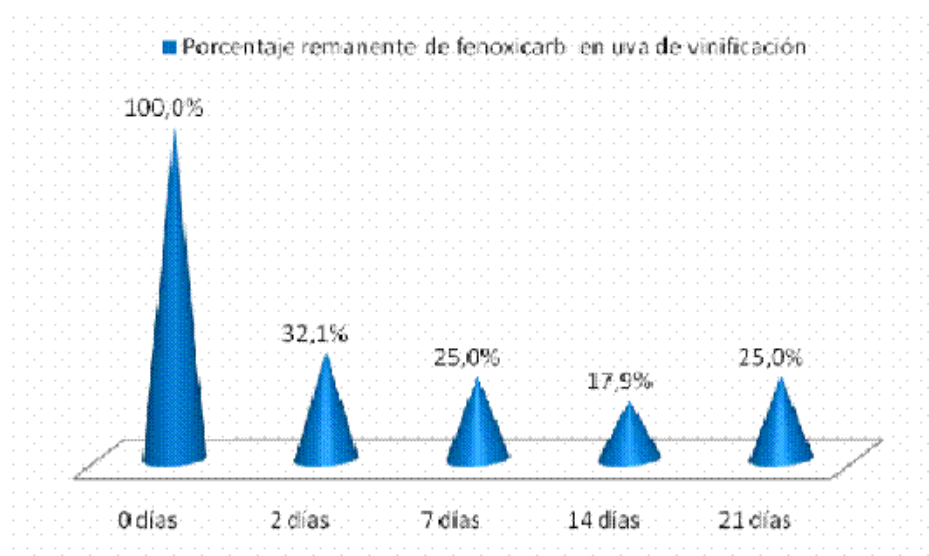


Figura 4.69.- Disipación de los residuos de fenoxicarb en la uva de vinificación durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

Los porcentajes remanentes de fenoxycarb en la uva durante el tratamiento bajo BPA muestran como el residuo experimenta una disipación inicial rápida, disminuyendo en un 67,9% en 2 días, alcanzando un remanente de 32,1%; a partir de ahí, comienza la fase de persistencia, en la que se producen pequeñas disminuciones progresivas de un 7,1% a los 7 y 14 días hasta que se alcanza un remanente de un 25% respecto del residuo inicial en el momento de finalizar su plazo de seguridad.

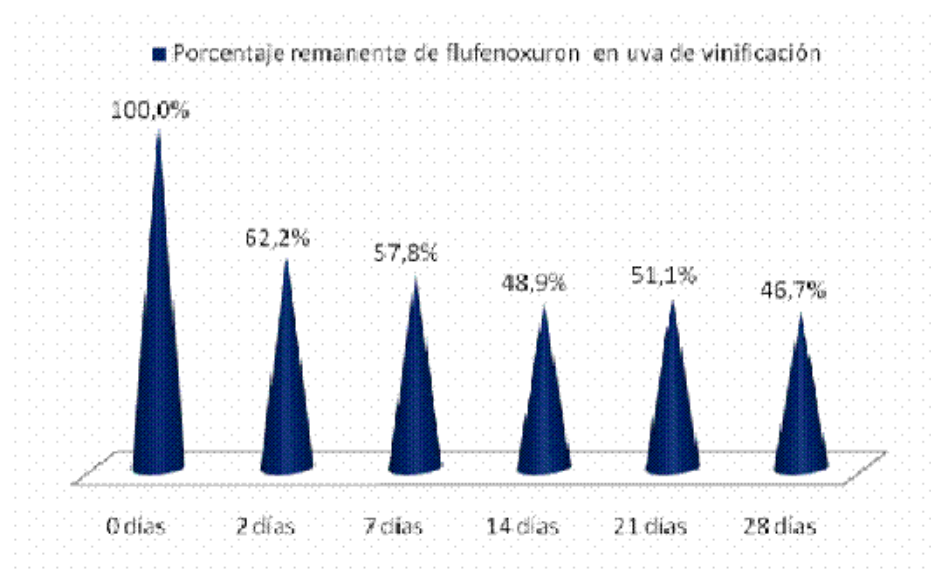


Figura 4.70.- Disipación de los residuos de flufenoxuron en la uva de vinificación durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

Para el caso de flufenoxuron en uva, también durante el tratamiento bajo BPA, se observa como el residuo experimenta una disipación inicial rápida, disminuyendo en un 37,8% en 2 días, alcanzando un remanente del 62,2%. A partir de ahí, comienza la fase de persistencia, en la que se producen pequeñas disminuciones progresivas de un 4,4%, 8,9% y 4,4% en un plazo de 5 ó 7 días hasta llegar a un remanente de un 46,7% respecto del residuo inicial en el momento de finalizar su plazo de seguridad. Este comportamiento es muy similar al anterior, aunque en este caso las disminuciones en general son de menor orden.

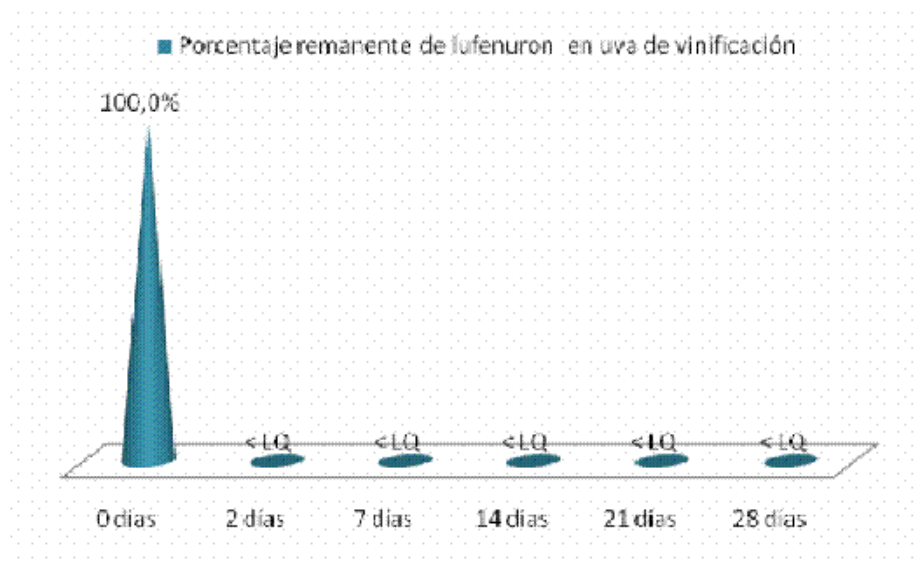


Figura 4.71.- *Disipación de los residuos de lufenuron en la uva de vinificación durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA*

Los porcentajes remanentes de lufenuron durante el tratamiento bajo BPA muestran una gran disipación en dos días, pasando del 100% a niveles no cuantificables. Comparando con el caso anterior, ya que ambos compuestos son análogos estructuralmente, se puede explicar una disipación tan brusca desde el punto de vista de los niveles de residuos que ambos dejan en este cultivo durante los 2 primeros días, ya que la concentración de lufenuron al comienzo del ensayo es un tercio del nivel que se obtiene en el ensayo de flufenoxuron, y por tanto justificaría la disipación total que provocan las condiciones ambientales al existir una degradación más sencilla en el caso de lufenuron, ya que parte de niveles mucho más bajos que flufenoxuron al inicio de la fase de disipación.

Piriproxifen en uva, en el tratamiento bajo BPA, muestra como el residuo experimenta una disipación inicial rápida, donde se elimina un 66,7% en 2 días, alcanzando un remanente de 33,3%. A partir de este momento, comienza la fase de persistencia, en la que los remanentes se mantienen en un 33,3% aunque con pequeñas variaciones (40%) durante el resto del tiempo que constituye el plazo de seguridad del

compuesto. A diferencia de la disipación de fenoxicarb y flufenoxuron, piriproxifen muestra una persistencia sin tendencia a la disipación.

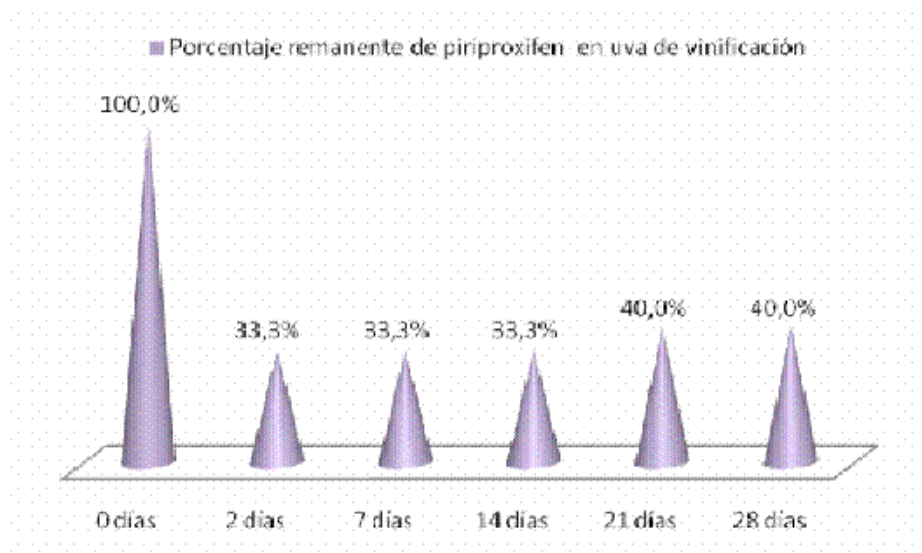


Figura 4.72.- Disipación de los residuos de piriproxifen en la uva de vinificación durante el plazo de seguridad previo a la cosecha en caso de un tratamiento realizado con BPA

En suma, fenoxicarb y flufenoxuron en uva muestran disipaciones similares, con una fase de disipación rápida provocada fundamentalmente por los factores ambientales (luz, temperatura, humedad, viento, etc) y otra de persistencia muy lenta debido a la influencia de los factores metabólicos vegetales, aunque en el caso de fenoxicarb la disipación es en general de mayor orden. Lufenuron, que se encuentra en niveles notablemente inferiores a flufenoxuron al comienzo del ensayo, queda afectado sensiblemente por la degradación que producen las condiciones ambientales, disipando hasta niveles no cuantificables en la fase de disipación. Por último, piriproxifen también muestra una disipación análoga a las de fenoxicarb y flufenoxuron, pero su fase de persistencia demuestra una tendencia nula a la disipación, en la que el metabolismo vegetal no parece influir, al menos durante los 28 días que se propusieron como plazo de seguridad en este estudio.

En la Figura 4.73, se comparan los niveles de residuos significativos entre los supuestos de BPA y CPA. Se observa que en general la concentración que se encuentra en CPA es resultado de la concentración remanente del fruto a plazo de seguridad y el depósito inicial de un tratamiento de estas características.

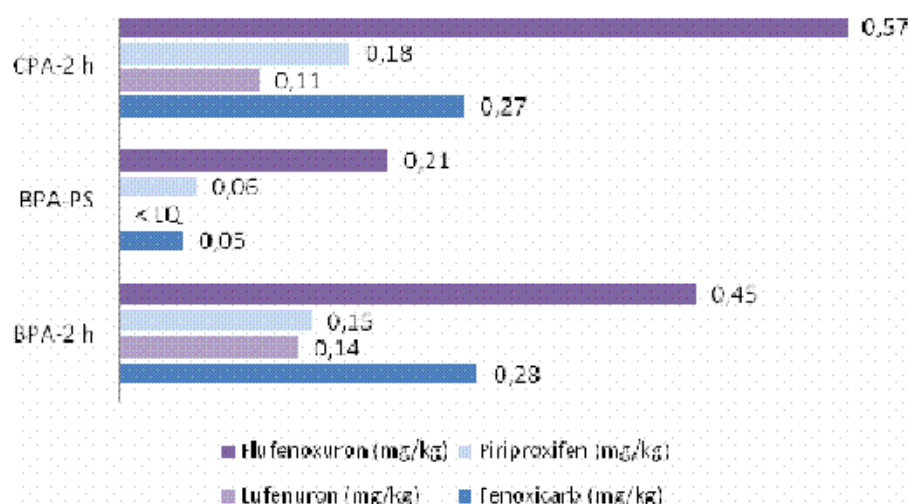


Figura 4.73.- Comparación de niveles de residuos entre la aplicación bajo BPA y CPA. BPA: Buenas prácticas agrícolas. PS: plazo de seguridad. CPA: Críticas prácticas agrícolas

Finalmente, se debe señalar que no se observó la presencia de ninguno de los insecticidas en las muestras control tomadas en el área sin tratar durante el ensayo.

4.4.2.3. RESIDUOS EN PRODUCTOS ELABORADOS.

No se encontraron residuos superiores al LQ en los productos líquidos (mostos y vinos). Los residuos fueron encontrados en los sub-productos sólidos o semi-sólidos de la vinificación (estrujado, orujo y lías). Entre las muestras con residuos, se puede establecer el siguiente orden según su concentración: **orujo > estrujado > lías**. Comparando por plaguicidas, se puede establecer el siguiente orden según los niveles de residuos encontrados: **flufenoxuron > fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron**. Además, sólo se encontraron residuos de lufenuron en el orujo de las micro-vinificaciones y en el

estrujado bajo CPA. Los niveles encontrados durante la elaboración y conservación del vino tinto de Monastrell se pueden observar en la Tabla 4.52.

Tabla 4.52.- Niveles medios de residuos de RCI's ($n = 2$) encontrados durante la vinificación y almacenamiento de los vinos.

Proceso	Etapa	Niveles Medios de Residuos (mg/kg)							
		Fenoxicarb		Flufenoxuron		Lufenuron		Piriproxifen	
		BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
Vinificación	Estrujado	0,08	0,20	0,24	0,41	< LQ	0,11	0,10	0,13
	Mosto I	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Mosto II	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Orujo	0,22	0,41	0,55	0,72	0,13	0,31	0,18	0,39
	Vino SCL	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Lías	0,06	0,16	0,09	0,32	< LQ	< LQ	0,06	0,10
	Vino CL	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Vino F	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Conservación de botellas	3 meses	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	6 meses	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

SCL = Sin clarificar, CL = Clarificado, F = Filtrado.

A la vista de los resultados, se pueden establecer factores de transferencia de residuos entre los diferentes productos de la vinificación, teniendo en cuenta las concentraciones encontradas en cada caso ($LQ = 0,05 \text{ mg/kg}$). Estos factores se pueden observar en las Figuras 4.74 y 4.75.

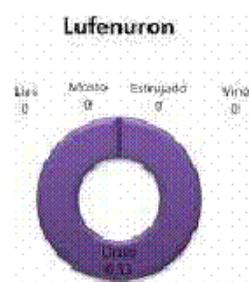
Como se observa, la transferencia de residuos en el mosto y vino es nula ($LQ = 0,05 \text{ mg/kg}$) y por tanto la seguridad alimentaria asociada estaría garantizada. Sin embargo, existe transferencia de residuos entre subproductos de la vinificación. Esta transferencia es mayoritaria hacia el orujo y también ocurre en las lías para algunos compuestos. Esto debe tenerse en consideración cuando se dirijan a la obtención de aguardientes y piensos, entre otros, ya que contendrían residuos de plaguicidas y podrían incluirse en la cadena alimentaria.



a) Factores de transferencia de fenoxicarb



b) Factores de transferencia de flufenoxuron

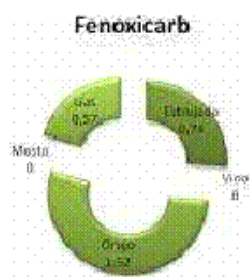


c) Factores de transferencia de lufenuron

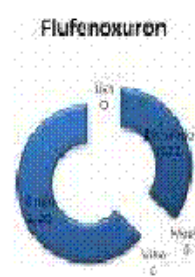


d) Factores de transferencia de piriproxifen

Figura 4.74.- Factores de transferencia de RCIs en la vinificación bajo BPA



a) Factores de transferencia de fenoxicarb



b) Factores de transferencia de flufenoxuron



c) Factores de transferencia de lufenuron

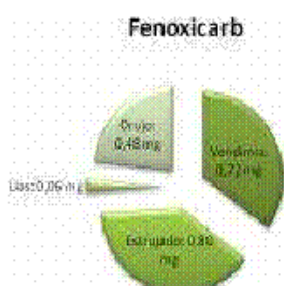


d) Factores de transferencia de piriproxifen

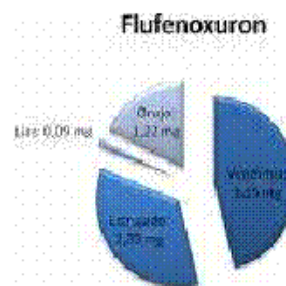
Figura 4.75.- Factores de transferencia de RCIs en la vinificación bajo CPA

El factor de transferencia medio en el orujo fue 2,54 con BPA y 1,92 con CPA. En las lías, no existió transferencia de flufenoxuron ni lufenuron; mientras que se observó un mantenimiento de niveles de fenoxicarb y piriproxifen bajo BPA, siendo el factor de transferencia medio 1,06, e incluso una disipación bajo CPA, con un factor de transferencia medio de 0,56. En el estrujado se observó el mantenimiento de niveles con respecto a la vendimia, tanto bajo BPA como bajo CPA, con factores de transferencia medios de 1,44 y de 0,80, respectivamente; siendo la transferencia nula para el caso de lufenuron bajo BPA. Por tanto, las concentraciones de residuos que se encuentran originalmente en la vendimia se mantienen en el estrujado y en las lías, aunque en éstas podrían verse disminuidas hasta la mitad; sin embargo, se duplicarían en el orujo que se obtiene de la vinificación.

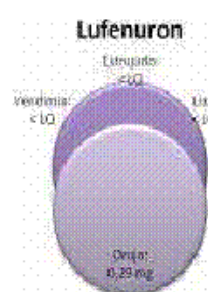
En las Figuras 4.76 y 4.77, se representan los residuos encontrados, expresados en cantidad (mg), y calculados según los pesos de vendimia (15 kg), estrujado (media 10 kg), orujo (media 2,6 kg) y lías (media 1 kg).



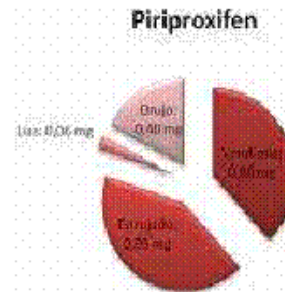
a) Cantidad de fenoxicarb



b) Cantidad de flufenoxuron



c) Cantidad de lufenuron



d) Cantidad de piriproxifen

Figura 4.76.- Cantidades medias de residuos ($n = 2$) encontradas en la vinificación bajo BPA

Se observa también la disipación de los residuos en las sucesivas etapas de la vinificación y la acumulación mayoritaria en el orujo.

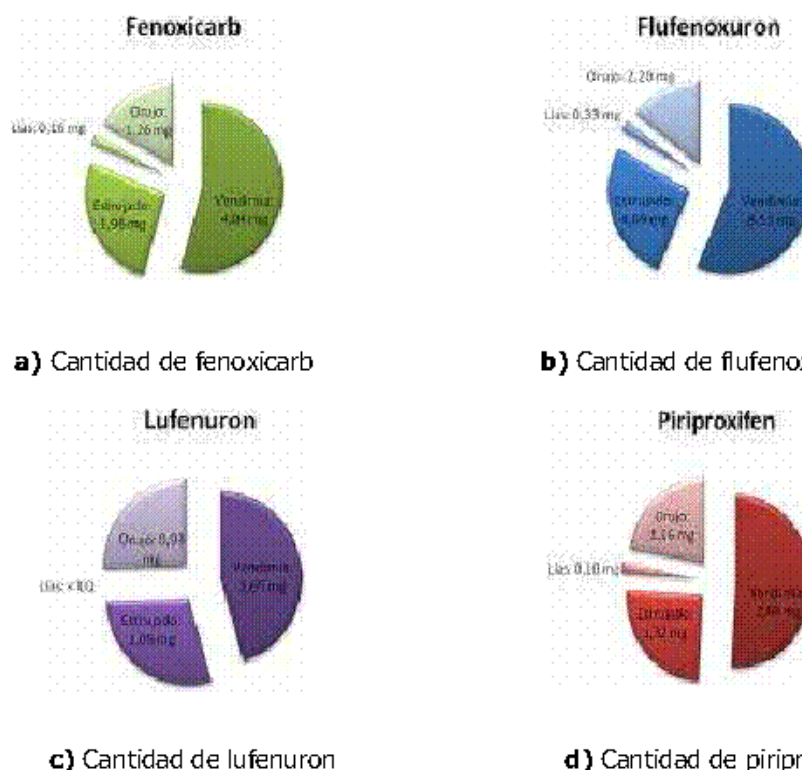


Figura 4.77.- Cantidades medias de residuos ($n = 2$) encontradas en la vinificación bajo CPA

En las Figuras 4.78 y 4.79 se representan los porcentajes remanentes encontrados en las micro-vinificaciones bajo ambas prácticas agrícolas, calculados respecto a la cantidad de residuos presentes en cada vendimia.

Como se observa, la mayor disipación entre los sub-productos fue encontrada para flufenoxuron en las dos condiciones agrícolas, mientras que lufenuron, fenoxicarb y piriproxifen, aunque con niveles más bajos en las muestras, presentaron menor disipación.

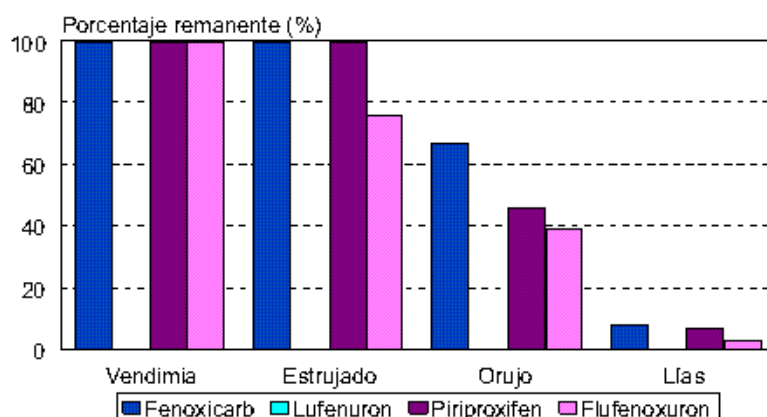


Figura 4.78.- *Disipación media (n = 2) de los residuos en la vinificación aplicando BPA*

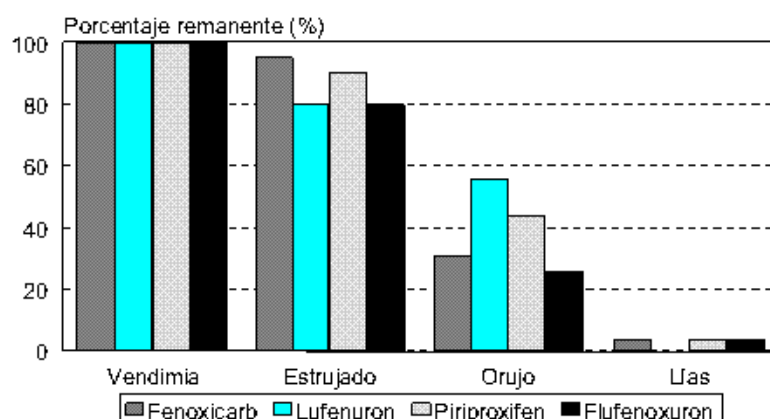


Figura 4.79.- *Disipación media (n = 2) de los residuos en la vinificación aplicando CPA*

En el caso de lufenuron no se pudieron calcular los porcentajes remanentes en BPA por desconocer la cantidad existente en la vendimia y en algunas muestras ($< LQ$) así como en la muestra de lías con CPA ($< LQ$).

Los porcentajes remanentes encontrados en el estrujado fueron de media un 92% en BPA y un 86,3% en CPA, respecto a la vendimia, y por tanto prácticamente no hubo disipación. En el orujo, los porcentajes remanentes fueron de media un 50,7% para BPA y un 39,3% para CPA, respecto a la vendimia.

En las lías, los porcentajes remanentes fueron de media un 6% para BPA y un 4% para CPA, respecto a la vendimia. Por tanto, el orujo retira del proceso una gran parte de los residuos y con las lías se elimina una parte mínima. El resto dejaría en mosto y vino una concentración inferior a 0,05 mg/kg y por tanto, el vino embotellado entraría en el mercado sin residuos cuantificables (LQ = 0,05 mg/kg).

También se debe tener en cuenta que un porcentaje importante se degrada durante la fermentación.

4.4.3. DIÁLISIS EN PATRONES, UVA Y VINO TINTO.

En los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* realizados sobre uva fortificada a niveles que comprendían los encontrados a plazo de seguridad y condiciones críticas (0,05-1 mg/kg) no se detectó la presencia de los insecticidas en el dializado. Asimismo, en muestras de vino fortificadas a 0,05 mg/kg tampoco se detectó su presencia en el dializado.

Por tanto, se ensayó un intervalo mayor (5-100 mg/kg) en ambas muestras para conocer la diálisis. La diálisis de los compuestos fue detectada en niveles de 50 µg/g hasta 100 µg/g en vino y de 70 µg/g hasta 100 µg/g en uva. En cambio, en los estándares se observó diálisis desde 5 µg/g hasta 100 µg/g. Los porcentajes de diálisis encontrados en los ensayos no superaron el valor de 4% en vino y 2% en uva. En cambio en los estándares llegaron hasta 19%. La concentración máxima del dializado para los ensayos en vino fue 7,7 µg/ml para la fortificación de 100 µg/g. En cambio, en uva fue 3,4 µg/ml para la fortificación de 100 µg/g y en estándares 42,2 µg/ml para la misma fortificación. Entre todas las muestras, la máxima cantidad dializada se encontró para fenoxycarb en estándar y fue 0,3 mg para una cantidad digerida de 2 mg correspondiente a una fortificación de 100 µg/g.

En todos los casos se observó que según su capacidad para dializar, los plaguicidas pueden ser ordenados en: **fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron > flufenoxuron**. Por tanto, los plaguicidas más dializables son fenoxicarb y piriproxifen y los que menos las dos benzoilfenilureas. Las diferentes matrices también se pueden ordenar según el efecto matriz que interponen a la diálisis: uva > vino > estándares. Por tanto, a igualdad de concentraciones iniciales, se observa una diálisis mayor cuando los plaguicidas se encuentran en disolvente o en vino tinto que en la matriz en fresco.

Los resultados en uva y vino se exponen en las Figuras 4.80, 4.81 y 4.82.

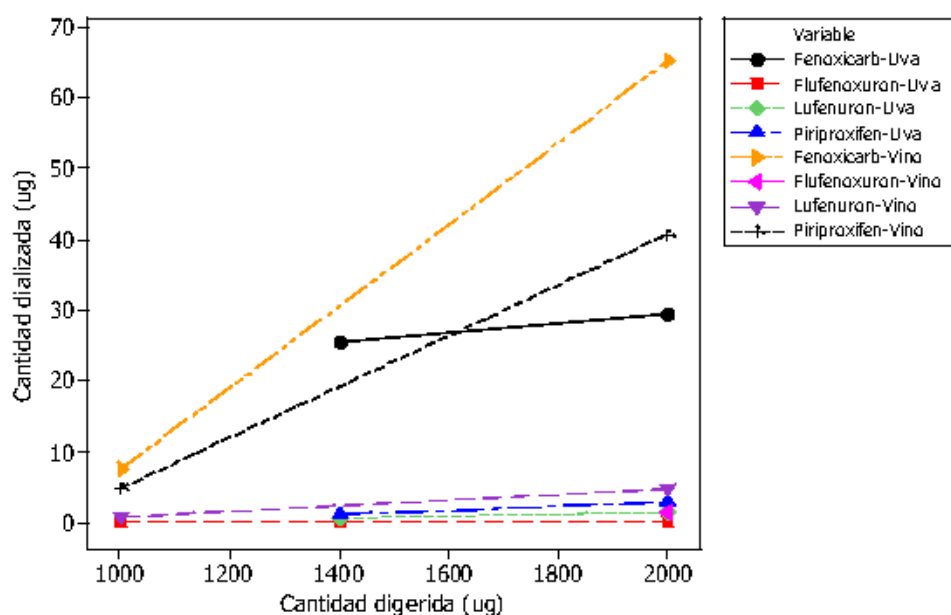


Figura 4.80.- Cantidades dializadas encontradas en uva y vino

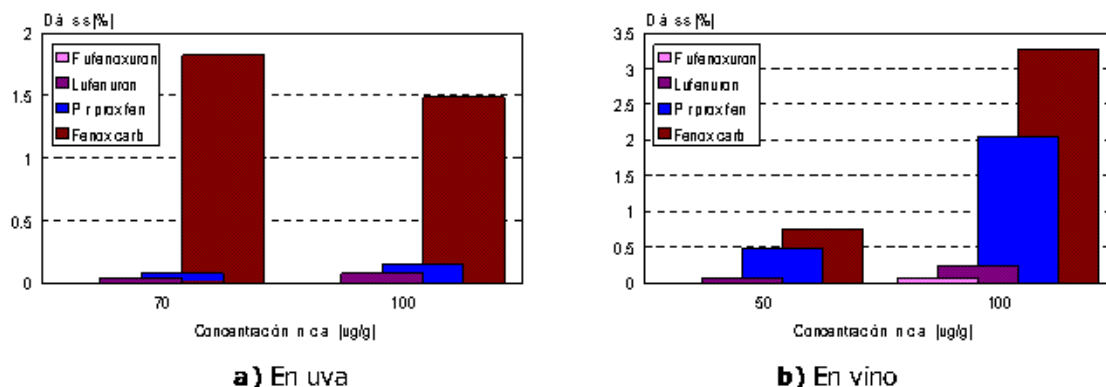


Figura 4.81.- Porcentajes de diálisis encontrados en uva y vino

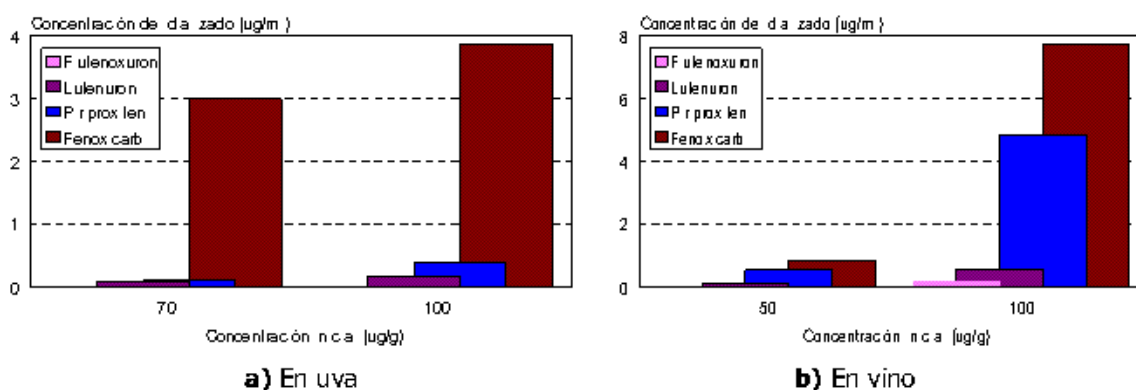


Figura 4.82.- Concentración del residuo encontrado en la membrana de diálisis en uva y vino

Los resultados en estándares se exponen en las Figuras 4.83, 4.84 y 4.85.

En general, al aumentar la concentración inicial en la muestra, el parámetro indicador de la capacidad de diálisis (porcentaje de diálisis o porcentaje de compuesto dializable), no varió significativamente, excepto para aquellas muestras de gran concentración, donde el proceso de diálisis se vio favorecido por un importante efecto de difusión pasiva a favor de gradiente durante las 2 horas que duró esta etapa.

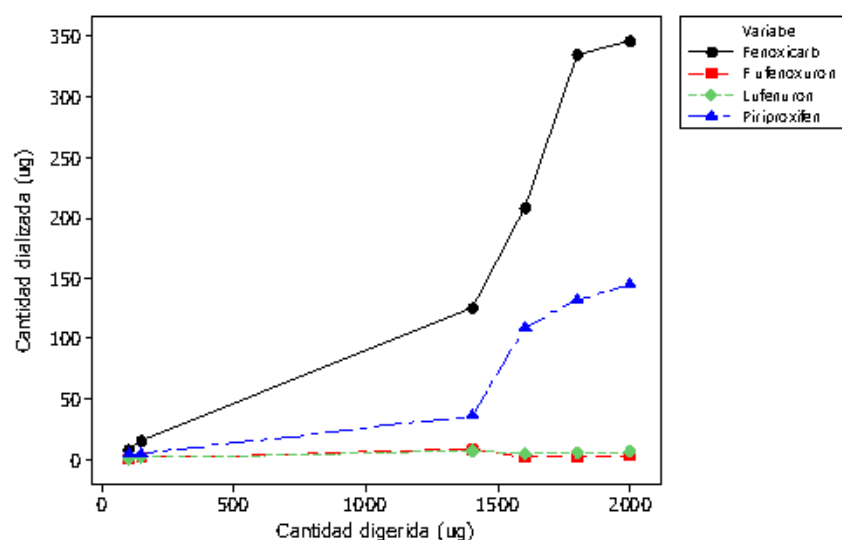


Figura 4.83.- Diálisis en cantidad encontrada en estándares

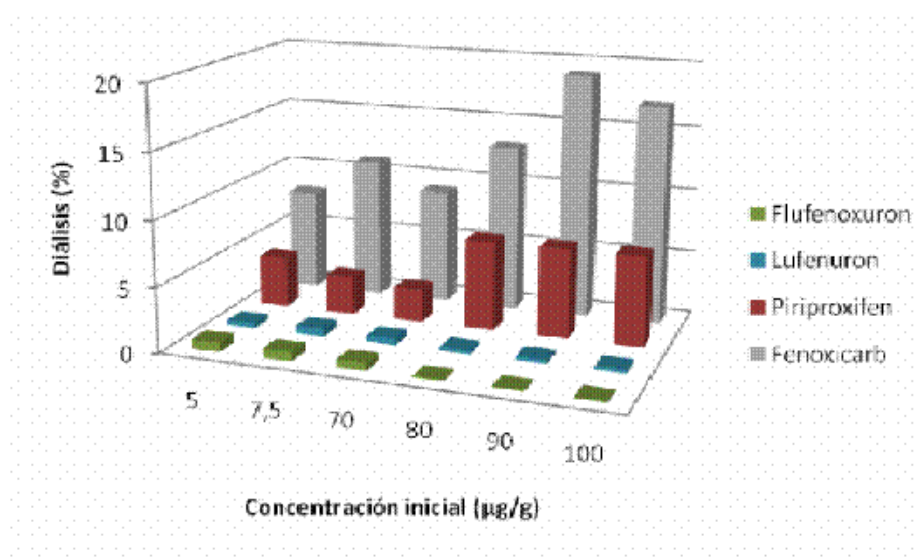


Figura 4.84.- Porcentajes de diálisis encontrados en estándares

Sin embargo, cuanto mayor fue la cantidad de plaguicida sometida a digestión o mayor la concentración inicial de la muestra, mayor fue la cantidad de plaguicida dializado. Así, la concentración de los residuos en la membrana tubular de diálisis depende

exclusivamente de la concentración de la muestra o de la cantidad digerida de forma directa, ya que el volumen de dializado no varió significativamente entre muestras.

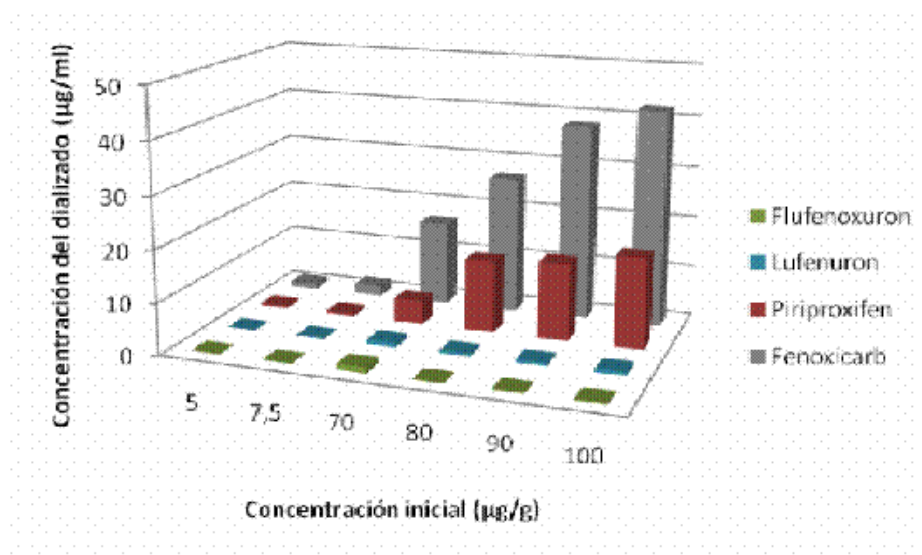


Figura 4.85.- Concentración del residuo encontrado en la membrana de diálisis en estándares

4.4.4. ESTUDIO DE DIETAS Y CÁLCULO DE INGESTAS.

En este estudio, se han considerado los valores de consumo de uva y vino de mesa, ya que son los que cuantifica el INE y los que se encuentran de manera continuada en una dieta habitual.

En las Tablas 4.53 y 4.54, se exponen los valores del consumo anual y diario de los productos estudiados.

Tabla 4.53.- Valores de consumo anual para uva y vino de mesa según el INE.

C = Consumo Anual (kg/persona · año)		
Grupo	Uva de mesa	Vino de mesa*
Nacional	4,77	22,12
Murcia	3,33	14,35
Urbano	3,84	17,29
No urbano	5,76	27,27

*: l/persona · año.

Tabla 4.54.- Valores de consumo diario para uva y vino de mesa según el INE.

C/D = Consumo Diario (kg/persona · día)		
Grupo	Uva de mesa	Vino de mesa*
Nacional	1,31E-02	6,06E-02
Murcia	9,12E-03	3,93E-02
Urbano	1,05E-02	4,74E-02
No urbano	1,58E-02	7,47E-02

*: l/persona · año.

En la Tabla 4.55, se exponen los valores de la relación entre la ingestión diaria estimada y la diaria admisible (IDE/IDA) a partir de los datos de consumo del INE.

Se observa que en los casos de residuos de fenoxicarb y flufenoxuron la relación IDE/IDA es siempre mayor en vino que en uva en condiciones de BPA, debido al efecto que ejerce el alto consumo de vino, en comparación con el de uva según el INE, sobre el producto del IDC, a pesar de la mayor presencia de residuos en uva que en vino. Por el contrario, la relación IDE/IDA en uva supera a la del vino en CPA, ya que los residuos encontrados en uva en estas condiciones son mucho mayores que en vino y compensan el bajo consumo de este alimento en el cálculo del IDC. Para lufenuron y piriproxifen, la relación IDE/IDA fue siempre mayor en vino, justificado por su alto consumo, a pesar de que los niveles de residuos encontrados en uva sean mayores o iguales que los del vino. Sin embargo, entre todos los casos, el valor máximo de IDE/IDA encontrado fue 2,73E-03, lo que supone un factor de seguridad mínimo de 367 entre ingestión y riesgo toxicológico para estos insecticidas.

Respecto a los valores calculados según las encuestas de hábitos de consumo realizadas en nuestra Región, en las Tablas 4.56 y 4.57 se exponen los consumos calculados en función de raciones y semanas disponibles, tanto anual como diario. El único consumo nulo ha sido el de vino de mesa en el grupo de los niños, debido obviamente a su corta edad.

Tabla 4.55.- Relación IDE/IDA en uva y vino de mesa con las estadísticas de consumo del INE.

IDE/IDA de Fenoxycarb			
Grupo	Práctica	Uva de mesa	Vino de mesa
Nacional	BPA	2,77E-04	9,18E-04
	CPA	1,07E-03	9,18E-04
Murcia	BPA	1,94E-04	5,96E-04
	CPA	7,46E-04	5,96E-04
Urbano	BPA	2,23E-04	7,18E-04
	CPA	8,61E-04	7,18E-04
No urbano	BPA	3,35E-04	1,13E-03
	CPA	1,29E-03	1,13E-03
IDE/IDA de Flufenoxuron			
Grupo	Práctica	Uva de mesa	Vino de mesa
Nacional	BPA	8,32E-04	9,18E-04
	CPA	2,26E-03	9,18E-04
Murcia	BPA	5,81E-04	5,96E-04
	CPA	1,58E-03	5,96E-04
Urbano	BPA	6,69E-04	7,18E-04
	CPA	1,82E-03	7,18E-04
No urbano	BPA	1,00E-03	1,13E-03
	CPA	2,73E-03	1,13E-03
IDE/IDA de Lufenuron			
Grupo	Práctica	Uva de mesa	Vino de mesa
Nacional	BPA	1,98E-04	9,18E-04
	CPA	4,36E-04	9,18E-04
Murcia	BPA	1,38E-04	5,96E-04
	CPA	3,04E-04	5,96E-04
Urbano	BPA	1,59E-04	7,18E-04
	CPA	3,51E-04	7,18E-04
No urbano	BPA	2,39E-04	1,13E-03
	CPA	5,26E-04	1,13E-03
IDE/IDA de Piriproxifen			
Grupo	Práctica	Uva de mesa	Vino de mesa
Nacional	BPA	2,38E-04	9,18E-04
	CPA	7,13E-04	9,18E-04
Murcia	BPA	1,66E-04	5,96E-04
	CPA	4,98E-04	5,96E-04
Urbano	BPA	1,91E-04	7,18E-04
	CPA	5,74E-04	7,18E-04
No urbano	BPA	2,87E-04	1,13E-03
	CPA	8,61E-04	1,13E-03

*En color amarillo se identifican los resultados calculados con una concentración de residuos hipotética igual al LQ (0,05 mg/kg) aunque esas muestras presentaron niveles inferiores en la realidad.

Tabla 4.56.- Consumo anual para uva y vino de mesa a partir de las encuestas realizadas.

C = Consumo Anual (kg/persona · año)		
Grupo	Uva de mesa	Vino de mesa*
Niños	2,76	0,00
Adolescentes	4,92	2,82
Adultos	6,00	16,03
Edad avanzada	6,06	17,12

*: l/persona·año.

Tabla 4.57.- Consumo diario para uva y vino de mesa a partir de las encuestas realizadas.

C/D = Consumo Diario (kg/persona · día)		
Grupo	Uva de mesa	Vino de mesa*
Niños	7,56E-03	0,00E+00
Adolescentes	1,35E-02	7,72E-03
Adultos	1,64E-02	4,39E-02
Edad avanzada	1,66E-02	4,69E-02

*: l/persona·año.

Finalmente, en la Tabla 4.58 se exponen los resultados de la relación IDE/IDA según los datos de las encuestas practicadas.

En este caso, se observa la ausencia de relación IDE/IDA en vino para el grupo de los niños; una relación IDE/IDA en uva mayor que en vino en adolescentes, por doble motivo, el mayor nivel de residuos y el mayor consumo encontrado en uva; una mayor relación IDE/IDA en vino que en uva para el grupo de adultos y edad avanzada, debido a que consumen más vino que uva, según las encuestas practicadas, aunque con excepciones como los casos de fenoxicarb y piriproxifen para CPA y flufenoxuron, donde la relación en uva es mayor porque la mayor presencia de residuos en la uva predomina en el producto del IDC. Entre todos los resultados, se obtiene un valor máximo de IDE/IDA de 2,87E-03, análogo al encontrado con los datos del INE, y por tanto define un factor de seguridad mínimo de 349 entre ingestión y riesgo toxicológico, similar a lo encontrado anteriormente.

Tabla 4.58. - Relación IDE/IDA en uva y vino de mesa a partir de las encuestas de consumo.

IDE/IDA de Fenoxicarb			
Grupo	Práctica	Uva de mesa	Vino de mesa
Niños	BPA	3,21E-04	0,00E+00
	CPA	1,24E-03	0,00E+00
Adolescentes	BPA	2,86E-04	1,17E-04
	CPA	1,10E-03	1,17E-04
Adultos	BPA	3,49E-04	6,66E-04
	CPA	1,34E-03	6,66E-04
Edad avanzada	BPA	3,52E-04	7,11E-04
	CPA	1,36E-03	7,11E-04
IDE/IDA de Flufenoxuron			
Grupo	Práctica	Uva de mesa	Vino de mesa
Niños	BPA	9,62E-04	0,00E+00
	CPA	2,61E-03	0,00E+00
Adolescentes	BPA	8,58E-04	1,17E-04
	CPA	2,33E-03	1,17E-04
Adultos	BPA	1,05E-03	6,66E-04
	CPA	2,84E-03	6,66E-04
Edad avanzada	BPA	1,06E-03	7,11E-04
	CPA	2,87E-03	7,11E-04
IDE/IDA de Lufenuron			
Grupo	Práctica	Uva de mesa	Vino de mesa
Niños	BPA	2,29E-04	0,00E+00
	CPA	5,04E-04	0,00E+00
Adolescentes	BPA	2,04E-04	1,17E-04
	CPA	4,49E-04	1,17E-04
Adultos	BPA	2,49E-04	6,66E-04
	CPA	5,48E-04	6,66E-04
Edad avanzada	BPA	2,52E-04	7,11E-04
	CPA	5,53E-04	7,11E-04
IDE/IDA de Piriproxifen			
Grupo	Práctica	Uva de mesa	Vino de mesa
Niños	BPA	2,75E-04	0,00E+00
	CPA	8,25E-04	0,00E+00
Adolescentes	BPA	2,45E-04	1,17E-04
	CPA	7,35E-04	1,17E-04
Adultos	BPA	2,99E-04	6,66E-04
	CPA	8,97E-04	6,66E-04
Edad avanzada	BPA	3,02E-04	7,11E-04
	CPA	9,06E-04	7,11E-04

*En color amarillo se identifican los resultados calculados con una concentración de residuos hipotética igual al LQ (0,05 mg/kg) aunque esas muestras presentaron niveles inferiores en la realidad.

4.4.5. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en la validación de la metodología analítica, basada en extracción por QuEChERS y determinación por CL-MS, se puede asegurar que es adecuada, precisa, sensible y exacta para el propósito de esta experiencia. Cumple los requisitos establecidos en la Guía SANCO para el rango seleccionado (0,05-1 mg/kg), suficientemente amplio para abarcar los niveles de residuos encontrados. Por tanto, la metodología desarrollada fue eficaz para alcanzar el objetivo de esta experiencia.

En los ensayos de campo supervisados bajo BPA, los residuos de fenoxicarb, flufenoxuron y lufenuron no superaron los LMRs para los plazos de seguridad establecidos por el MAPA para estos compuestos. Sin embargo, en el caso de piriproxifen, para el que este Ministerio no especifica un plazo de seguridad en concreto, el nivel de residuos en la muestra del primer día del ensayo bajo BPA (0,15 mg/kg) excedió en el triple su LMR (0,05 mg/kg) y posteriormente se alcanzaron niveles iguales o ligeramente superiores (0,06 mg/kg) a éste hasta finalizar el plazo de seguridad propuesto en este trabajo (28 días). Por lo tanto, los niveles de piriproxifen sólo podrían ser admisibles toxicológica y legalmente a partir del segundo día de su tratamiento.

En las aplicaciones fitosanitarias críticas, se observa que en general la concentración que se encuentra en el cultivo es resultado de la concentración remanente del fruto a plazo de seguridad y el depósito inicial de un tratamiento de estas características. Teniendo en cuenta las condiciones de incertidumbre expandida (50%) que establece SANCO en casos de niveles próximos al LMR (DG SANCO, 2007), sólo piriproxifen (0,18 mg/kg) superaría su tolerancia máxima (0,05 mg/kg) en este cultivo. En el caso de lufenuron, su nivel de residuos (0,57 mg/kg) entraría dentro del intervalo permitido por SANCO para determinar residuos violativos con respecto a su LMR (0,5 mg/kg).

Durante el plazo de seguridad, fenoxicarb y flufenoxuron mostraron disipaciones similares, con una fase de disipación rápida provocada fundamentalmente por los factores

ambientales (luz, temperatura, etc.) y otra de persistencia lenta debido a la influencia de los factores metabólicos vegetales, aunque el caso de fenoxicarb la disipación fue en general de mayor orden. Lufenuron, que se encontró en niveles notablemente inferiores a flufenoxuron al comienzo del ensayo, queda afectado sensiblemente por la degradación que producen las condiciones ambientales, desapareciendo hasta niveles no cuantificables en la fase de disipación. Por último, piriproxifen también mostró una disipación bifásica como las de fenoxicarb y flufenoxuron, pero su fase de persistencia demostró una tendencia nula a la disipación, en la que el metabolismo vegetal no parece influir, al menos durante los 28 días que se propusieron como plazo de seguridad en este estudio. Por tanto, fenoxicarb, flufenoxuron y piriproxifen mostraron persistencia en campo durante el plazo de seguridad que tienen establecido (3-4 semanas). Sin embargo, los residuos de los cuatro compuestos fueron inferiores a sus LMR a partir del primero (fenoxicarb, flufenoxuron, lufenuron) o segundo día del ensayo (piriproxifen).

En las micro-vinificaciones realizadas, no se encontraron residuos superiores al LQ en los productos inmediatos para el consumidor (mostos, vino clarificado y vino filtrado), posiblemente debido a la separación de los subproductos sólidos o semi-sólidos del proceso mediante el ejercicio de las prácticas de prensado y trasiego. Los residuos fueron encontrados en el estrujado y en los subproductos (orujo y lías). El orujo fue el subproducto donde predominantemente se transfirieron los residuos remanentes de la vinificación. Se puede decir que, los plaguicidas se encontraban ligados a las partes sólidas de la uva (hollejo y pepitas), ya que son el elemento en común de los sub-productos. Entre los cuatro plaguicidas, la mayor disipación durante el proceso de vinificación fue encontrada para flufenoxuron en las dos condiciones agrícolas, mientras que lufenuron, fenoxicarb y piriproxifen presentaron niveles más bajos durante todo el proceso y su disipación fue menos intensa. Finalmente, el vino embotellado entraría en el mercado sin residuos cuantificables ($LQ = 0,05 \text{ mg/kg}$). Sin embargo, la presencia de residuos en el orujo (media $0,36 \text{ mg/kg}$) y lías (media $0,13 \text{ mg/kg}$) debe ser considerada en la obtención industrial de aguardientes, holandas, alcoholes, piensos, aceite de pepitas de uva y aditivos alimentarios como el tartrato cálcico, principales derivados de estos sub-

productos, ya que la materia de partida estaría contaminada con residuos de plaguicidas y podrían ingresar en la cadena alimentaria.

No se detectó biodisponibilidad *in vitro* de los insecticidas cuando las muestras de uva y vino fueron fortificadas en niveles que abarcaban los residuos determinados tras los tratamientos fitosanitarios y procesado (0,05-1 µg/g). Se encontró diálisis en concentraciones de 50 y 100 µg/g en vino y 70 y 100 µg/g en uva, niveles muy superiores a los residuos que en la realidad dejaron estos plaguicidas en las muestras agroalimentarias. Por tanto, se puede afirmar que *in vitro* los niveles de residuos encontrados en estos alimentos no superan la primera y principal barrera biológica del ingreso oral de xenobióticos, imposibilitando por tanto su llegada a un lugar de acción sistémico en el organismo humano.

En todos los casos se observó que según sus características para dializar, los plaguicidas pueden ser ordenados como: fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron > flufenoxuron. Por tanto, los plaguicidas más dializables son fenoxicarb y piriproxifen y los que menos las dos benzoilfenilureas, como se ha concluido en los anteriores capítulos experimentales. Las diferentes matrices también se pueden ordenar según el efecto matriz que interponen a la diálisis: uva > vino > estándares. Por tanto, a igualdad de concentraciones iniciales, se observa una diálisis mayor cuando los plaguicidas se encuentran en disolvente > vino tinto > matriz en fresco, como también se ha concluido en los capítulos experimentales anteriores. Por consiguiente, los resultados indican que la biodisponibilidad de los compuestos está influida por su naturaleza físicoquímica, concentración en la muestra, características de la matriz donde se estudia y la selectividad de la membrana de diálisis.

En los estudios de ingestas realizados con los datos proporcionados por el INE, se obtiene un factor de seguridad de 367 entre el IDE e IDA de cada producto, como mínimo, para los alimentos seleccionados. Con las encuestas practicadas, este valor es 349, ligeramente diferente al anterior debido a diferencias metodológicas entre las estadísticas. En ambos casos, los cálculos indican factores de seguridad muy amplios entre la ingestión

de estos productos y su riesgo de toxicidad crónica para un consumidor que representa todas las zonas de residencia y los principales grupos de población.

4.4.6. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.

4.4.6.1. COMUNICACIONES A CONGRESOS.

Payá, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2008. *Field dissipation of insect growth regulators in grapes var. Monastrell*. 7th European Pesticide Residue Workshop, Berlin (Germany).

Payá, P., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A., Pardo, F. 2008. *Processing dissipation of insect growth regulators in red wine. Influence of oenotechnological practices*. 7th European Pesticide Residue Workshop, Berlin (Germany).

Payá, P., Zafrilla, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M.A., Barba, A. 2008. *Differences in bioavailability of insect growth regulator residues from standards, grapes and wine*. 7th European Pesticide Residue Workshop, Berlin (Germany).

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES.

Finalizado el trabajo experimental expuesto en esta Memoria, podemos resumir los resultados obtenidos en los siguientes epígrafes y conclusiones globales.

5.1. METODOLOGÍA.

La metodología analítica utilizada para la determinación de fenoxicarb, flufenoxuron, lufenuron y piriproxifen se ha basado en: microextracción en línea, fiable, sencilla y rápida, extracción en fase sólida sencilla y el procedimiento QuEChERS, y determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución, con detectores UV-DAD y MS. De ella, se puede asegurar que, a partir de los resultados obtenidos en su validación, es suficientemente precisa, sensible y exacta para el propósito perseguido. Cumple los requisitos establecidos en la Guía SANCO para los rangos seleccionados: 0,05-1 mg/kg en hortalizas, 0,1-2 mg/kg en frutos cítricos, 0,05-1 mg/kg en frutos de hueso y 0,05-1 mg/kg en uva y vino. Rangos suficientemente amplios para abarcar tanto los LMR como los niveles de residuos encontrados. Por tanto, la metodología desarrollada fue eficaz para alcanzar el objetivo propuesto en esta experiencia, para los cuatro insecticidas seleccionados y los cuatro tipos de cultivos estudiados.

5.2. EXPERIENCIAS SUPERVISADAS.

En cuanto a las experiencias supervisadas, destinadas a conocer la persistencia de los cuatro insecticidas en los cultivos seleccionados por su importancia comercial y de producción, se comprueba que:

a) En las hortalizas pimiento, pepino y calabacín, no se sobrepasan los LMR de los insecticidas aplicados ni el mismo día del tratamiento; concretamente lufenuron en pimiento, piriproxifen en calabacín y flufenoxuron en pepino, presentan residuos inferiores a su LQ desde el momento de su aplicación. En pimiento, tanto flufenoxuron como piriproxifen mostraron tendencias similares de disipación. Los resultados obtenidos permiten afirmar que se trata de productos de rápida degradación y baja persistencia en estas hortalizas. En el caso del tratamiento que simula la máxima situación de peligro para el consumidor, se obtuvieron niveles similares a los del tratamiento bajo BPA, manteniéndose el cumplimiento de los LMR.

Los niveles de residuos encontrados en los estudios de lechuga revelaron diferencias significativas en la disipación entre hortalizas de hoja y cucurbitáceas, debidas a las diferencias morfológicas y de factores de crecimiento y dilución de los dos tipos de hortalizas. En los ensayos realizados bajo CPA, sólo flufenoxuron presentó un nivel cercano a su LMR, que según la interpretación europea de la guía SANCO de análisis de residuos, en nuestras condiciones de aseguramiento de la calidad de los análisis y la incertidumbre asociada, no puede considerarse como una infracción del LMR (DG SANCO, 2007).

En el proceso de congelación y almacenamiento, los niveles superiores o iguales al LQ determinados en alguna hortaliza (flufenoxuron en pimiento bajo CPA), disminuyeron a valores inferiores al LQ después de la primera etapa o lavado inicial. Así, el proceso de congelación contribuye a la disipación de los residuos en el producto elaborado. También, el proceso de elaboración de productos de cuarta gama contribuyó eficazmente a la desaparición de los residuos en aquellas muestras que presentaron niveles superiores al

LQ al comienzo del proceso (flufenoxuron en lechuga bajo las dos prácticas agrícolas), principalmente mediante el lavado inicial o primera etapa del proceso. Durante el período de almacenamiento, no se apreciaron variaciones significativas de los residuos en los productos elaborados.

b) En el caso de los frutos cítricos, todas las muestras de mandarina procedentes del ensayo de campo, en las dos condiciones de aplicación, presentaron niveles residuales inferiores al LMR establecido. Fenoxicarb y piriproxifen mostraron evidentes procesos de persistencia en este fruto, aunque en el caso de fenoxicarb se observó una lenta degradación. Lufenuron y flufenoxuron fueron detectados por debajo de su LQ en condiciones de BPA.

En naranja, las muestras procedentes de los ensayos bajo BPA y CPA presentaron niveles inferiores al LMR establecido, aunque en el caso de lufenuron aplicado bajo CPA, su residuo fue prácticamente el doble del LMR correspondiente, pero aplicando las condiciones de SANCO no puede considerarse como una infracción del LMR (DG SANCO, 2007). Análogamente a la mandarina, fenoxicarb y piriproxifen mostraron lentas degradaciones y en particular fenoxicarb, que presentó una tendencia a la persistencia una vez había transcurrido la primera semana de las seis del ensayo.

En el proceso industrial de la conserva de mandarina, el pelado de la fruta eliminó los residuos de los insecticidas para ambas prácticas agrícolas. En el proceso industrial de elaboración de zumo, los residuos de los insecticidas se mantienen retenidos en la corteza, para ambas prácticas agrícolas, con el consiguiente riesgo en caso de utilización de estos subproductos en alguna otra actividad industrial (piensos, aceites esenciales, etc.). En ambos elaborados, se obtuvieron conservas y zumos embotellados sin presencia de residuos, que se controlaron durante 6 meses.

c) En los ensayos de frutos de hueso, realizados bajo BPA, el nivel de piriproxifen en melocotón transcurrido el plazo de seguridad fue igual a su LMR; mientras que el encontrado en albaricoque durante la experiencia bajo BPA (0,09 mg/kg) supera el LMR

fijado por nosotros, igual al establecido oficialmente en melocotón, pero sería admisible bajo los criterios legales, al ser aplicable la incertidumbre asociada establecida por SANCO para estos casos (DG SANCO, 2007).

Considerando los niveles de residuos obtenidos antes de la cosecha durante los ensayos bajo BPA, se puede afirmar que se trata de productos que experimentan una rápida degradación en los primeros días pero que después presentan persistencia en los cultivos. Según sus tiempos de vida media y velocidad de disipación, piriproxifen es más persistente que fenoxicarb en ambos frutos. Sin embargo, fenoxicarb produce un depósito mayor en ellos.

En las aplicaciones críticas, los niveles de residuos fueron superiores a los LMR correspondientes y aunque fenoxicarb cumpliría las recomendaciones de la guía SANCO en cuanto a la aceptación de la incertidumbre de los resultados, piriproxifen no lo haría en ambos frutos.

En los estudios de procesado, se comprueba que la disipación de residuos fue mayor en la elaboración de la conserva de melocotón que en la de albaricoque. Entre las muestras procedentes de los ensayos bajo BPA y CPA, la disipación fue siempre mayor en las de BPA, al presentar niveles de partida menores para el procesado. Se puede afirmar que las etapas tecnológicas tuvieron un mayor efecto en la desaparición de fenoxicarb que en la de piriproxifen.

A niveles residuales bajos, la etapa determinante en su desaparición fue el lavado inicial, alcanzando niveles inferiores al LQ. Pero a niveles de residuos mayores, hicieron falta más etapas para alcanzar niveles inferiores al LQ. En el caso de la conserva de albaricoque, donde se encontró la menor disipación en fenoxicarb para CPA y piriproxifen para ambos tratamientos, la mayor desaparición se produjo en las muestras tomadas en las etapas de sellado y enfriamiento, en las que se produce un gran cambio de temperatura. Finalmente, sólo en los casos de la conserva de albaricoque con residuos de piriproxifen y

fenoxicarb en condiciones de CPA, se observó disipación hasta niveles inferiores al LQ durante los 3 primeros meses de almacenamiento de los botes de conserva.

d) En el caso de uva de vinificación, en los ensayos realizados bajo BPA, los residuos de fenoxicarb, flufenoxuron y lufenuron no superaron los LMR, ni tan siquiera el mismo día de la aplicación. Piriproxifen muestra el primer día del ensayo un nivel triple a su LMR; posteriormente, disminuye a niveles iguales o ligeramente superiores a éste hasta finalizar el plazo de seguridad propuesto en este trabajo (28 días). Por tanto, los niveles de piriproxifen sólo podrían ser admisibles en nuestro supuesto a partir del segundo día de la aplicación.

En los ensayos bajo prácticas críticas, y teniendo en cuenta las condiciones de incertidumbre expandida ($\pm 50\%$) que establece SANCO en casos de niveles próximos al LMR (DG SANCO, 2007), sólo piriproxifen superaría su tolerancia máxima en este cultivo. En el caso de lufenuron, su nivel de residuos entraría dentro del intervalo permitido por SANCO para determinar residuos violativos con respecto a su LMR.

Durante la experiencia, fenoxicarb y flufenoxuron mostraron disipaciones similares, con una fase de desaparición rápida provocada por factores ambientales y otra de persistencia lenta, debido a la influencia de los factores metabólicos vegetales, aunque fue fenoxicarb el que experimentó la mayor disipación. Lufenuron se ve afectado sensiblemente por la degradación que producen las condiciones ambientales, desapareciendo hasta niveles no cuantificables en la fase de disipación. Por último, piriproxifen también mostró una disipación en dos fases como las de fenoxicarb y flufenoxuron, pero su fase de persistencia demostró una tendencia nula a la disipación, en la que el metabolismo vegetal no parece influir, al menos durante los 28 días que se propusieron como plazo de seguridad en este estudio.

En las microvinificaciones realizadas, no se encontraron residuos superiores al LQ en los productos inmediatos para el consumidor (mostos, vino clarificado y vino filtrado). Los residuos se detectaron en el estrujado y en los subproductos orujo y lías,

predominantemente en el orujo; por lo que se deduce que los plaguicidas se encontraban ligados a las partes sólidas de la uva (hollejo). Entre los cuatro plaguicidas, la mayor disipación durante el proceso de vinificación fue encontrada para flufenoxuron en las dos condiciones agrícolas, mientras que lufenuron, fenoxicarb y piriproxifen presentaron niveles más bajos durante todo el proceso y su disipación fue menos intensa. Finalmente, el vino embotellado entraría en el mercado sin residuos cuantificables. Sin embargo, la presencia de residuos en el orujo y lías debe ser considerada en la obtención industrial de aguardientes, holandas, alcoholes, piensos, aceite de pepitas de uva y aditivos alimentarios como el tartrato cálcico, ya que la materia de partida podría estar contaminada con residuos de plaguicidas y podrían ingresar en las cadenas de consumo.

5.3. BIODISPONIBILIDAD.

Respecto al estudio de biodisponibilidad de los insecticidas seleccionados, y tras examinar cuidadosamente sus resultados, podemos afirmar que el proceso se ve influido por la naturaleza química de los insecticidas, concentración en la muestra, características de la matriz donde se estudia y selectividad de la membrana de diálisis. Por otra parte, se puede afirmar que *in vitro*, los niveles de residuos encontrados en estos alimentos no superan la primera y principal barrera biológica del ingreso oral de xenobióticos, imposibilitando por tanto su llegada a un lugar de acción sistémico en el organismo humano.

De esta manera, podemos resumir los resultados de este objetivo de la Memoria en:

a) En hortalizas, no se detectó biodisponibilidad *in vitro* de los insecticidas en las muestras que contenían los niveles residuales determinados después de los tratamientos fitosanitarios y/o del procesado. La diálisis comenzó a niveles de 5 mg/kg, valor que en ningún caso presentaban las muestras.

Se observó que la diálisis de piriproxifen comenzó a distintas concentraciones para calabacín y pimiento, encontrándose en el primero menor efecto matriz. En cambio, se observó que la de flufenoxuron comenzó a la misma concentración en lechuga y pepino, y que para concentraciones iguales de la muestra, los valores de diálisis son muy similares; sin embargo, en pimiento disminuye su capacidad de diálisis frente a lechuga y pepino. Todas las hortalizas impidieron significativamente la diálisis de los tres compuestos comparativamente a cuando se ensayaron en disolvente.

Piriproxifen es el compuesto donde se observa el mayor índice de biodisponibilidad *in vitro*; así, para pimiento, presentó un valor medio de porcentaje de RCI dializable 6 veces superior al de lufenuron y éste 2 veces superior al de flufenoxuron.

b) Para frutos cítricos, tampoco se detectó biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos en las muestras que contenían los residuos obtenidos tras los tratamientos fitosanitarios y/o procesado. La diálisis comenzó a observarse a niveles que en ningún caso presentaban las muestras (1 mg/kg).

En los ensayos se observó que la diálisis en patrones comenzó a 0,25 mg/kg, concentración un 75% menor que la obtenida en muestras. Según las características que presentan los compuestos para este proceso, en patrones se puede establecer el siguiente orden de diálisis: fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron = flufenoxuron.

Los preparados presentaron menor efecto matriz que los alimentos en fresco para la diálisis. Comparativamente, naranja y su zumo presentaron mayor efecto matriz frente a mandarina y su conserva.

c) En el caso de frutos de hueso, no se encontró biodisponibilidad *in vitro* de los insecticidas en las muestras con los niveles de residuos encontrados tras los tratamientos fitosanitarios y/o procesado. Se encontró diálisis en un rango de 1-100 mg/kg, que no se correspondía con los niveles experimentales.

Se observó que fenoxicarb fue más dializable que piriproxifen tanto en las muestras en fresco y procesadas como en estándares. Los resultados indican que, en general, la diálisis fue mayor en estándares que en los frutos en conserva y mayor que en los frutos en fresco. Por tanto, se encuentran diferencias para la diálisis en relación a la estructura del compuesto y la matriz donde se encuentra.

d) Respecto a la uva de vinificación y como en los casos anteriores, no se detectó biodisponibilidad *in vitro* de los insecticidas cuando se ensayaron muestras de uva y vino con niveles que abarcaban los residuos determinados tras los tratamientos fitosanitarios y procesado. Se observó diálisis a concentraciones de 50-100 mg/kg en vino y de 70-100 mg/kg en uva, niveles muy superiores a los encontrados en las muestras de los ensayos supervisados.

En todos los casos se observó que los plaguicidas, según sus características pueden ser ordenados en función de su capacidad de diálisis: fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron > flufenoxuron. Las diferentes matrices también se pueden ordenar según el efecto que presentan en la diálisis: uva > vino > estándares.

5.4. CÁLCULOS DE INGESTIÓN.

Respecto a los cálculos de consumo realizados con los datos proporcionados por el INE y con las encuestas realizadas, encontramos que en todos los casos resulta un factor de seguridad muy amplio entre la ingestión de los productos estudiados y su riesgo de toxicidad crónica, para un consumidor perteneciente a todas las zonas de residencia y grupos de población. Los resultados concretos de estos cálculos se pueden resumir en:

a) En hortalizas, con los datos del INE, se obtiene un factor de seguridad de 122 entre la IDE e IDA de cada producto seleccionado. Con las encuestas practicadas, este factor llega hasta 81, debido a diferencias metodológicas entre ambas estadísticas (pesos, cálculos, etc.).

b) En el caso de frutos cítricos, con los datos proporcionados por el INE, se obtiene un factor de seguridad mínimo de 72 entre la IDE e IDA de cada producto para los dos frutos. En el cálculo realizado con las encuestas, este factor llega hasta 87.

c) Para frutos de hueso, con los datos proporcionados por el INE, se obtiene un factor de seguridad de 134 entre la IDE e IDA de cada producto para los alimentos seleccionados; y con las encuestas practicadas, este factor llega hasta 114, debido a diferencias metodológicas entre ambas estadísticas.

d) Para uva de vinificación y vino, con los datos proporcionados por el INE, se obtiene un factor de seguridad de 367 como mínimo, entre la IDE e IDA de cada producto para los alimentos seleccionados. Con las encuestas practicadas, este valor es 349, ligeramente inferior.

6. BIBLIOGRAFÍA.

ABOU-ARAB, A.A.K. 1999. *Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation*. Food Chem., 65, 509-514.

ADGATE, J.L., BARR, D.B., CLAYTON, C.A., EBERLY, L.E., FREEMAN, N.C., LIOY, P.J., NEEDHAM, L.L., PELLIZZARI, E.D., QUACKENBOSS, J.J., ROY, A., SEXTON, K. 2001. *Measurement of children's exposure to pesticides: analysis of urinary metabolite levels in a probability-based sample*. Environ. Health Perspect., 109(6), 583-590.

AEPLA. 2002. *Memoria 2002*. Ed. Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas, Madrid, España, p. 8.

AESAN, MAPA. 2006. *Memoria anual 2006, Vigilancia de residuos en productos vegetales, Plan nacional de control de la cadena alimentaria*. Ed. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España, p. 131.

AGRIOS, G.N. 2005. *Plant pathology*. 5th Edition, Ed. Academic Press, San Diego, USA, p. 920.

AGÜERA, A., PIEDRA, L., HERNANDO, M.D., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., CONTRERAS, M. 2000. *Splitless large-volume GC-MS injection for the analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in vegetables using a miniaturised ethyl acetate extraction*. Analyst, 125, 1397-1402.

AGÜERA, A., CONTRERAS, M., CRESPO, J., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. 2002. *Multiresidue method for the analysis of multiclass pesticides in agricultural products by gas chromatography-tandem mass spectrometry*. Analyst, 127, 347-354.

AGÜERA, A., LÓPEZ, S., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., CONTRERAS, M., CRESPO, J., PIEDRA, L. 2004. *One-year routine application of a new method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of 16 multiclass pesticides in vegetable samples*. J. Chromatogr. A., 1045(1-2), 125-135.

AGUILERA, A., VALVERDE, A., CAMACHO, F. 1999. *Behavior of methamidophos residues in peppers, cucumbers, and cherry tomatoes grown in a greenhouse: evaluation by decline curves*. J. Agric. Food Chem., 47(8), 3355-3358.

AHIRE, K.C., ARORA, M.S., MUKHERJEE, S.N. 2008. *Development and application of a method for analysis of lufenuron in wheat flour by gas chromatography-mass spectrometry and confirmation of bio-efficacy against Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. J. Chromatogr. B, 861, 16-21.

AHMED, F.E. 2001. *Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks*. Trends in Analytical Chemistry, 20, 649-661.

ALAVANJA, M.C.R., SANDLER, D.P., MCDONNELL, C.J., MAGE, D.T., KROSS, B.C., ROWLAND, A.S., BLAIR, A. 1999. *Characteristics of persons who self reported a high pesticide exposure event in the agricultural health study*. Environ. Res., 80(2), 180-186.

ALBAJES, R. 1992. *Control integrado de plagas: realidad o utopía*. Phytoma-España, 40, 4-8.

ALCÁZAR, M.D., BARRANCO, P., BELDA, E., CABELLO, T. 2002. *Parasitoides de especies plaga en hortícolas de invernaderos en Almería: prospección, incidencia e identificación*. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, España, p. 181.

ALDER, L., HILL, A., HOLLAND, P.T., LANTOS, J., LEE, S.M., MACNEIL, J.D., O'RANGERS, J., VAN ZONEN, P., AMBRUS, A. 2000. *Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals*. In: Principles and practices of method validation. Ed. Fajgelj, A., Ambrus, A., Royal Society of Chemistry, London, United Kingdom, pp. 179-249.

ALLCROFT, D.J., GLASBEY, C.A., PAULO, M.J. 2007. *A latent Gaussian model for multivariate consumption data*. Food Qual. Prefer., 18, 508-516.

AL-SALEH, I.A. 1994. *Pesticides: a review article*. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 13(3), 151-161.

ANASTASSIADES, M., SCHERBAUM, E., SCHWACK, W. 2001. *Analysis of benzoylphenylurea insecticides in fruits and vegetables-methodology and residue data*. Deut. Lebensm.-Rundsch., 97(5), 176-190.

ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F.J. 2003. *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. J. AOAC Int., 86, 412-431.

ANASTASSIADES, M., TASDELEN, B., SCHERBAUM, E., STAJNBAHER, D. 2007. *Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis*. In: *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*. Ed. Ohkawa, H., Miyagawa, H., Lee, P.W., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 439-458.

ANDERSON, M., FISHER, J.P., ROBINSON, J., DEBRAY, P.H. 1986. *Flufenoxuron an acylurea acaricide/insecticide with novel properties*. Proc. Br. Crop Prot. Conf., Pests and Disease, 1, 89-96.

ANDERSSON, A., PÅLSHEDEN, H. 1991. *Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 339(6), 365-367.

ANDERSSON, A., JANSSON, A., HELLSTRÖM, A. 2006. *Rapport 13-2006, The Swedish monitoring of pesticide residues in food of plant origin: 2005, EC and National Report, Report concerning Directives 90/642/ECC, 86/362/ECC and Commission Recommendation 2005/178/EC*. In: *Livsmedelsverkets rapport nr 13/2006*, Livsmedelsverket. Ed. National Food Administration, Uppsala, Sweden, p. 221.

ANGIONI, A., DEDOLA, F., MINELLI, E.V., BARRA, A., CABRAS, P., CABONI, P. 2005. *Residues and half-life times of pyrethrins on peaches after field treatments*. J. Agric. Food Chem., 53(10), 4059-4063.

ANTÓN, M.A. 2004. *Utilización del análisis del ciclo de vida en la evaluación del impacto ambiental del cultivo bajo invernadero mediterráneo*. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España, p. 231.

ANTONIOUS, G.F., SNYDER, J.C. 1994. *Residues and half-lives of acephate, methamidophos, and pirimiphos-methyl in leaves and fruit of greenhouse-grown tomatoes*. B. Environ. Contam. Tox., 52(1), 141-148.

ANTONIOUS, G.F. 2004. *Residues and half-lives of pyrethrins on field-grown pepper and tomato*. J. Environ. Sci. Health B, 39(4), 491-503.

AOAC INTERNATIONAL. 1998. *AOAC-peer-verified methods program, Manual on policies and procedures*. Ed. AOAC International, Virginia, USA, p. 35.

ARIAS, A., NIETO, J., BOTE, M., BUENO, M., GALLEGU, F., PÉREZ, A., SABIDO, F., VALENZUELA, M. 1987. *Atrías de vid: balance del segundo año en Badajoz*. Boletín Sanidad Vegetal-Plagas, 13, 189-202.

ARREBOLA, F.J., EGEA-GONZÁLEZ, F.J., MORENO, M., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., HERNÁNDEZ-TORRES, M.E., MARTÍNEZ-VIDAL, J.L. 2001. *Evaluation of endosulfan residues in vegetables grown in greenhouses*. Pest Manag. Sci., 57(7), 645-652.

ARTURSSON, P. 1990. *Epithelial transport of drugs in cell culture. I. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells*. Eur. J. Pharm. Sci., 79, 476-482.

ARTURSSON, P., KARLSSON, J. 1991. *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 175, 880-885.

ARTURSSON, P., BORCHARDT, R. 1997. *Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond*. Pharm. Res., 14, 1655-1657.

AUDUS, K.L., BARTEL, R.L., HIDALGO, I.J., BORCHARDT, R.T. 1990. *The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies*. Pharm. Res., 7, 435-451.

BALINOVA, A. 1998. *Multiresidue determination of pesticides in plants by high-performance liquid chromatography following gel permeation chromatographic clean-up*. J. Chromatogr. A, 823(1-2), 11-16.

BARBERÁ, C. 1989. *Pesticidas agrícolas*. Ed. Omega, Barcelona, España, p. 198.

BARRANCO, P. 2003. *Dípteros de interés agronómico. Agromícidos plaga de cultivos hortícolas intensivos*. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa, 33, 293-307.

BARREDA, M., LÓPEZ, F.J., VILLARROYA, M., BELTRÁN, J., GARCÍA-BAUDÍN, J.M., HERNÁNDEZ, F. 2006. *Residue determination of captan and folpet in vegetable samples by gas chromatography/negative chemical ionization mass spectrometry*. J. AOAC Int., 89(4), 1080-1087.

BELL, B., KAUCK, D., LEACH, M., SAMPATH, P. 2007. *Afrontando la realidad del hambre*. eJournal USA, 12(9), 19-23.

BELLÉS, X. 1988. *Insecticidas biorracionales*. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España, p. 405.

BEULKE, S., BROWN, C.D. 2001. *Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling*. Biol. Fertil. Soils, 33, 558-564.

BI, J.L., TOSCANO, N.C., BALLME, G.R. 2002. *Greenhouse and field evaluation of six novel insecticides against the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* on strawberries*. Crop Prot., 21(1), 49-55.

BICCHI, C., D'AMATO, A., TONUTTI, I., CANTAMESSA, L. 1990. *Simultaneous determination of clofentezine, fenoxycarb and hexythiazox by HPLC on apples, pears and their pulps*. Pestic. Sci., 30(1), 13-19.

BLAAUBOER, B.J. 2002. *The applicability of in vitro-derived data in hazard identification and characterisation of chemicals*. Environ. Toxicol. Phar., 11, 213-225.

BLAAUBOER, B.J. 2003. *The integration of data on physico-chemical properties, in vitro-derived toxicity data and physiologically based kinetic and dynamic as modelling a tool in hazard and risk assessment. A commentary*. Toxicol. Lett., 138, 161-171.

BLASCO, C., FONT, G., PICÓ, Y. 2002. *Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 970(1-2), 201-212.

BLASCO, C., FONT, G., PICÓ, Y. 2005. *Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-ion trap-triple stage mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1098(1-2), 37-43.

BLÜMEL, S., MATTHEWS, G.A., GRINSTEIN, A., ELAD, Y. 2000. *Pesticides in IPM: selectivity, side-effects, application and resistance problems*. In: Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Ed. Albajes, J., Lodovica, M., Van Lenteren, J.C., Elad, Y., Springer, Amsterdam, The Netherlands, p. 568.

BOCCALETTI, S., NARDELLA, M. 2000. *Consumer willingness to pay for pesticide-free fresh fruit and vegetables in Italy*. International Food and Agribusiness Management Review, 3, 297-310.

BOE. 1984. *Real Decreto 3349/1983, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas*. Boletín Oficial del Estado Español, nº 20 (24/1/1984), 1850-1856.

BOE. 1994. *Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero, por el que se establece los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal*. Boletín Oficial del Estado Español, nº 58 (9/3/1994), 7723-7726.

BOE. 2002. *Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas.* Boletín Oficial del Estado Español, nº 247 (15/10/2002), 36188-36220.

BOLLINGER, D.W., TSUNODA, A., LEDOUX, D., ELLERSIECK, M.R., VEUM, T.L. 2005. *A comparison of the test tube and the dialysis tubing in vitro methods for estimating the bioavailability of phosphorus in feed ingredients for swine.* J. Agric. Food Chem., 53, 3287-3294.

BOON, P.E., TJOE NIJ, E.I.M., KOOPMAN, N., KLAVEREN, J.D. 2004. *Dietary habits and exposure to pesticides in Dutch infants, RIKILT-Institute of Food Safety Report 2004.017.* Ed. RIKILT-Institute of Food Safety, Wageningen, The Netherlands, p. 23.

BROUWER, D.H., DE HAAN, M., LEENHEERS, L.H., DE VREEDE, S.A.F., VAN HEMMEN, J.J. 1997. *Half-Lives of pesticides on greenhouse crops.* B. Environ. Contam. Tox., 58(6), 976-984.

BUDIA, F., VIÑUELA, E., DEL ESTAL, P. 1988. *Estudios preliminares de los efectos de la ciromacina sobre Ceratitis capitata. (Diptera: Trypetidae).* Boletín Sanidad Vegetal-Plagas, 14, 141-147.

BUES, R., BUSSIÈRES, P., DADOMO, M., DUMAS, Y., GARCIA-POMAR, M.I., LYANNAZ, J.P. 2004. *Assessing the environmental impacts of pesticides used on processing tomato crops.* Agr. Ecosyst. Environ., 102(2), 155-162.

BURCHAT, C.S., RIPLEY, B.D., LEISHMAN, P.D., RITCEY, G.M., KAKUDA, Y., STEPHENSON, G.R. 1998. *The distribution of nine pesticides between the juice and pulp of carrots and tomatoes after home processing.* Food Addit. Contam., 15(1), 61-71.

CABALLERO, J.I. 1998. *Producción integrada: concepto y desarrollo en la Unión Europea. Su aplicación en el sector hortofrutícola*. En: Ampliación de temas sobre la horticultura almeriense. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, Sevilla, España, pp. 31-47.

CABELLO, T. 1997. *Plagas de los cultivos guía de identificación*. Ed. Universidad de Almería, Servicio de Publicaciones, Almería, España, p. 163.

CABONI, P., CABRAS, M., ANGIONI, A., RUSSO, M., CABRAS, P. 2002. *Persistence of azadirachtin residues on olives after field treatment*. J. Agric. Food Chem., 50(12), 3491-3494.

CABRAS, P., GARAU, V.L., PIRISI, F.M., CUBEDDU, M., CABITZA, F., SPANEDDAT, L. 1995. *Fate of some insecticides from vine to wine*. J. Agric. Food Chem., 43, 2613-2615.

CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L., PIRISI, F.M., FARRIS, G.A., MADAU, G., EMONTI, G. 1999. *Pesticides in fermentative processes of wine*. J. Agric. Food Chem., 47, 3854-3857.

CABRAS, P., ANGIONI, A. 2000. *Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products*. J. Agric. Food Chem., 48(4), 967-973.

CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L., PIRISI, F.M., CABITZA, F., PALA, M., FARRIS, G.A. 2000a. *Fate of quinoxifen residues in grapes, wine, and their processing products*. J. Agric. Food Chem., 48(12), 6128-6131.

CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L., PIRISI, F.M., CABITZA, F., PALA, M. 2000b. *Acephate and buprofezin residues in olives and olive oil*. Food Addit. Contam., 17(10), 855-858.

CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L., PIRISI, F.M., CABITZA, F., PALA, M., FARRIS, G.A. 2001. *Fenhexamid residues in grapes and wine*. Food Addit. Contam., 18(7), 625-629.

CABRAS, P., CABONI, P., CABRAS, M., ANGIONI, A., RUSSO, M. 2002. *Rotenone residues on olives and in olive oil*. J. Agric. Food Chem., 50(9), 2576-2580.

CAMENISCH, G., ALSENZ, J., WATERBEEMD, H., FOLKERS, G. 1998a. *Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayer using the drugs' lipophilicity and molecular weight*. Eur. J. Pharm. Sci., 6, 313-319.

CAMENISCH, G., FOLKERS, G., WATERBEEMD, H. 1998b. *Shapes of membrane permeability-lipophilicity curves; extension of theoretical models with an aqueous pore pathway*. Eur. J. Pharm. Sci., 6, 321-329.

CAMPICHE, S., BECKER-VAN SLOOTEN, K., RIDREAU, C., TARRADELLAS, J. 2006. *Effects of insect growth regulators on the nontarget soil arthropod Folsomia candida (Collembola)*. Ecotox. Environ. Safe., 63, 216-225.

CANAVARI, M., BAZZANI, G.M., SPADONI, R., REGÁIS, D. 2002. *Food safety and organic fruit demand in Italy: a survey*. Brit. Food J., 104, 220-232.

CARM. 2003. *Orden de 3 de diciembre de 2003, de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, por la que se aprueba el Código de Buenas Prácticas Agrarias de la Región de Murcia*. En: BORM. 286ª Edición, Ed. CARM, Murcia, España, pp. 20517- 20530.

CARM. 2006. *Estadísticas agrícolas*. En: Estadística agraria regional. Ed. CARM, Murcia, España, <http://www.carm.es/>.

CARRERO, J.M., PLANES, S. 1995. *Plagas del campo*. 12ª Edición, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 550.

CARRERO, J.M. 1996. *Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales*. 1ª Edición, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 256.

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

CAVALLORO, R., PELERENTS C. 1989. Integrated pest management in protected vegetable crops: proceedings of the CEC/IOBC experts' group meeting, held in Cabrils, from 27th to 29th May 1987. Ed. CRC Press, London, United Kingdom, p. 240.

CAVANNA, S., MOLINARI, G.P. 1998. *Residues of fenthion and trichloron in olives and olive oil after olive tree treatments*. *Food Addit. Contam.*, 15(5), 518-527.

CCPR. 2001. *Report of the thirty-third session of the CCPR, The Hague, 2-7 April 2001, ALINORM 01/24A*. Ed. CCPR, The Hague, The Netherlands, p. 112.

CE. 2005. *Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo*. En: DO L 70 de 16.3.2005. Ed. Parlamento Europeo, Consejo Europeo, Bruselas, Bélgica, pp. 1-16.

ÇELİK, S., KUNÇ, S., ASAN, T. 1995. *Degradation of some pesticides in the field and effect of processing*. *Analyst*, 120, 1739-1743.

CHAVARRI, M.J., HERRERA, A., ARIÑO, A. 2004. *Pesticide residues in field-sprayed and processed fruits and vegetables*. *J. Sci. Food Agric.*, 84, 1253-1259.

CHAVARRI, M.J., HERRERA, A., ARIÑO, A. 2005. *The decrease in pesticides in fruit and vegetables during commercial processing*. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 40(2), 205-211.

CHIOU, W.L., BARVE, A. 1998. *Linear correlation of the fraction absorbed of 64 drugs between humans and rats.* Pharm. Res., 15, 1792-1795.

CHRISTENSEN, H.B., GRANBY, K., RABØLLE, M. 2003. *Processing factors and variability of pyrimethanil, fenhexamid and tolylfluanid in strawberries.* Food Addit. Contam., 20(8), 728-741.

CIS. 2006. *Barómetro de septiembre, Estudio nº 2654.* Ed. Centro de Investigaciones Sociológicas, Madrid, España, p. 19.

COMISIÓN EUROPEA. 1997. *La Agenda 2000. Fortalecer y ampliar la Unión Europea.* Ed. Comisión Europea, Bruselas, Bélgica, p. 20.

COMISIÓN EUROPEA. 2002. *Comunicación de la Comisión, de 1 de julio de 2002, al Consejo, al Parlamento Europeo y al Comité Económico y Social, "Hacia una estrategia temática para el uso sostenible de los plaguicidas".* Ed. Comisión Europea, Bruselas, Bélgica, pp. 9.

CONSEJERÍA VALENCIANA DE SANIDAD. 2008. *Vigilancia sanitaria de plaguicidas y biocidas.* Ed. Consejería Valenciana de Sanidad, Valencia, España, <http://www.sp.san.gva.es/DgspWeb/plaguicidas/>.

CONSEJO EUROPEO. 1991. *Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.* En: DO L 230 de 19.08.1991, Ed. Consejo Europeo, Bruselas, Bélgica, pp. 0001-0032.

CONSEJO EUROPEO. 1997. *Directiva 97/41/CE del Consejo de 25 de junio de 1997 por la que se modifican las Directivas 76/895/CEE, 86/362/CEE, 86/363/CEE y 90/642/CEE relativas a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en las frutas y hortalizas, sobre y en los cereales, sobre y en los productos alimenticios de origen animal, y en determinados productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas, respectivamente.* En: DO L 184 de 12.7.1997. Ed., Consejo Europeo, Bruselas, Bélgica, pp. 33-49.

CORNUET, P. 1993. *Elementos de virología vegetal.* Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 218.

COSCOLLÁ, R. 1993. *Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales.* Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 205.

COSCOLLÁ, R. 1998a. *La producción integrada en la citricultura valenciana.* Phytoma-España, 103, 20-22.

COSCOLLÁ, R. 1998b. *Normativa sobre la producción integrada en la Comunidad Valenciana.* Ed. Phytoma-España, 97, 40-41.

COSCOLLÁ, R., COSCOLLÁ, C. 2006. *Cómo disminuir o eliminar los residuos de plaguicidas en frutas, hortalizas y alimentos transformados.* Ed. Phytoma-España, Valencia, España, p. 232.

COSCOLLÁ, R. 2006. *Problemas de residuos en la lucha química e interés en superarlos con métodos feromonales.* Phytoma-España, 183, 64.

CROSS, P., JONES, G.E. 2006. *Variation in pesticide hazard from arable crop production in Great Britain from 1992 to 2002: Pesticide risk indices and policy analysis.* Crop Prot., 25(10), 1101-1108.

CRUZ, S. 1998. *Radiografía de la producción integrada en España*. Hortofrutícola, 16, 22-29.

CUTLER, G.C., SCOTT-DUPREE, C.D., TOLMAN, J.H., HARRIS, C.R. 2006. *Toxicity of the insect growth regulator novaluron to the non-target predatory bug Podisus maculiventris (Heteroptera: Pentatomidae)*. Biol. Control, 38(2), 196-204.

DARVAS, B. 1997. *Insect development and reproduction disrupters*. In: Soft scale insect: their biology, natural enemies and control. Ed. Ben-Dov, Y., Hodgson, C.J., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 165-182.

DE LIÑÁN, C. 1997. *Farmacología vegetal*. Ed. Agrotécnicas S.L., Madrid, España, p. 1196.

DE LIÑÁN, C. 2008. *Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales*. 24ª Edición, Ed. Agrotécnicas S.L., Madrid, España, p. 784.

DE MELO, A.S., CABONI, P., PIRISI, F.M., CABRAS, P., ALVES, A., GARAU, V.L. 2006. *Residues of the fungicide famoxadone in grapes and its fate during wine production*. Food Addit. Contam., 23(3), 289-294.

DENHOLM, I., PICKET, J.A., DEVONSHIRE, A.L. 1999. *Insecticide resistance from mechanism to management*. Ed. CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom, p. 123.

DE SMET, B., CLAEYS, S., VAGENENDE, B., OVERLOOP, S., STEURBAUT, W., VAN STEERTEGEM, M. 2005. *The sum of spread equivalents: a pesticide risk index used in environmental policy in Flanders, Belgium*. Crop Prot., 24(4), 363-374.

DG AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT. 2006. *Main producers/products*. In: Major features of the sector of fresh fruits and vegetables in the EU. Ed. European Commission, Brussels, Belgium, pp. 7.

DG SANCO. 1997. *SANCO 7035/VI/95 rev.5, Processing studies, Appendix E of Guidelines for the generation of data concerning residues as provided in Annex II part A, section 6 and Annex III, part A, section 8 of Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market.* Ed. European Commission, Brussels, Belgium, p. 15.

DG SANCO. 2000. *Residue analytical methods for pre-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5), Doc. SANCO/3029/99.* Ed. European Commission, Brussels, Belgium, p. 26.

DG SANCO. 2002. *Residue decline in plants.* In: *SANCO/4145/2000, Working document on Guidance document on risk assessment for birds and mammals under Council Directive 91/414/EEC.* Ed. European Commission, Brussels, Belgium, pp. 25-27.

DG SANCO. 2004a. *Quality control procedures for pesticide residue analysis, Document Nº SANCO/10476/2003.* Ed. European Commission, Brussels, Belgium, p. 3.

DG SANCO. 2004b. *Residue analytical methods for post-registration control and monitoring, Doc. SANCO/825/00.* Ed. European Commission, Brussels, Belgium, p. 16.

DG SANCO. 2006. *Quality control procedures for pesticide residues analysis, Document Nº SANCO/10232/2006.* Ed. European Commission, Brussels, Belgium, p. 30.

DG SANCO. 2007. *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document No. SANCO/2007/3131.* Ed. European Commission, Brussels, Belgium, p. 38.

DG SANCO. 2008. *SANCO 7525/VI/95-rev.8, Guidelines on comparability, extrapolation, group tolerances and data requirements for setting MRLs, Appendix D of Guidelines for the generation of data concerning residues as provided in Annex II part A, section 6 and Annex III, part A, section 8 of Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market.* Ed. European Commission, Brussels, Belgium, p. 38.

DHADIALLA, T.S., CARLSON, G.R., LE, D.P. 1998. *New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity*. Annu. Rev. Entomol., 43(5), 45-69.

DIK, A.J., ALBAJES, R. 1999. *Principles of epidemiology, population biology, damage relationships and integrated control of diseases and pests*. In: Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Ed. Albajes, R., Gullino, M.L., Lenteren, J.C.v., Elad, Y., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 69-81.

DOMINE, D., DEVILLERS, J., CHASTRETTE, M., KARCHER, W. 1993. *Estimating pesticide field half-lives from a backpropagation neural network*. SAR QSAR Environ. Res., 1(2-3), 211-219.

DOMINGUEZ GARCÍA-TEJERO, F. 2004. *Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas*. 9ª Edición, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 821.

DORN, S., FRISCHKNECHT, M.L., MARTÍNEZ, V., ZURFLÜH, R., FISCHER, U., PFLANZENKR, Z. 1981. *A novel non-neurotoxic insecticide with a broad activity spectrum*. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz, 88(5), 269-275.

EKSTRÖM, G., HEMMING, H., PALMBORG, M. 1996. *Swedish pesticide risk reduction 1981-1995: food residues, health hazard, and reported poisonings*. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 147, 119-147.

ELBERT, A., NAUEN, R. 2000. *Resistance of Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in Southern Spain with special reference to neonicotinoids*. Pest Manag. Sci., 56(1), 60-64.

ELKINS, E.R. 1989. *Effect of commercial processing on pesticide residues in selected fruits and vegetables*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72(3), 533-535.

ESCOTT, G.M., ADAMS, D.J. 1995. *Chitinase activity in human serum and leukocytes*. Infect. Immun., 63(12), 4770-4773.

EUROPEAN COMMISSION. 2006. *Special eurobarometer n°238*. In: Eurobarometer 64.1. Ed. European Commission, Brussels, Belgium, p. 8.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. 1998. *EN 12393:1998*. Ed. European Committee for Standardization, Brussels, Belgium, parts 1-3.

FAIT, A., COLOSIO, C. 1998. *Recent advances and current concepts in pesticide hazards*. In: The year book of occupational and environmental medicine. Ed. Emmet, E.A., Frank, A.L., Gochfeld, M., Hez, S.M., Mosby, St. Louis, USA, pp. 15-29.

FAJGELJ, A., AMBRUS, A. 2000. *Principles and practices of method validation*. Ed. The Royal Society of Chemistry, London, United Kingdom, p. 305.

FAO. 1990. *Guidelines on producing pesticide residues data from supervised trials*. Ed. FAO, Rome, Italy, p. 52.

FAO. 1993. *Codex Alimentarius: Pesticides residues in food*. 2nd Edition, Ed. FAO, Rome, Italy, p. 480.

FAO. 1995. *Application risk analysis to food standard issues*. Ed. FAO, Rome, Italy, p. 39.

FAO. 1996. *Rome declaration on world food security and world food summit plan of action*. Ed. FAO, Rome, Italy, p.10.

FAO. 2002. *Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed*. 1st Edition, Ed. FAO, Rome, Italy, p. 192.

FAO 2003a. *Agricultural commodities: profiles and relevant WTO negotiating issues*. Ed. FAO, Rome, Italy, p. 92.

FAO. 2003b. *Development of a good agricultural practice approach*. Ed. FAO, Rome, Italy, p. 27.

FAO. 2005. *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2005. La erradicación del hambre en el mundo: claves para la consecución de los objetivos del desarrollo del Milenio*. Ed., FAO, Roma, Italia, p. 36.

FAO. 2006. *Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas*. Ed. FAO, Roma, Italia, pp. 7.

FAO. 2008a. *Declaration of the high-level conference on world food security: the challenges of climate change and bioenergy*. Ed. FAO, Rome, Italy, p. 4.

FAO. 2008b. *Aumento de los precios de los alimentos: hechos, perspectivas, impacto y acciones requeridas*. Ed. FAO, Roma, Italia, p. 45.

FAO/FMFH. 2006. *Hunger and malnutrition*. Ed., FAO, Rome, Italy, <http://www.feedingminds.org/>.

FAOSTAT. 2008. *FAOSTAT database*. Ed. FAO, Rome, Italy, <http://faostat.fao.org>.

FAO/WHO. 2003. *Assuring food safety and quality: guidelines for strengthening national food control systems*. Ed. FAO, Rome, Italy, p. 80.

FARRIS, G.A., CABRAS, P., SPANEDDA, L. 1992. *Pesticide residues in food processing*. Ital. J. Food Sci., 4(3), 149-169.

FDA. 1999. *Pesticide analytical manual volume I*. Ed. US FDA, Rockville, USA, <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/pami3.html>.

FERNÁNDEZ, M.J., OLIVA, J., BARBA, A., CÁMARA, M.A. 2005a. *Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step*. J. Agric. Food Chem., 53(3), 804-811.

FERNÁNDEZ, M.J., OLIVA, J., BARBA, A., CÁMARA, M.A. 2005b. *Effects of clarification and filtration processes on the removal of fungicide residues in red wines (var. Monastrell)*. J. Agric. Food Chem., 53(15), 6156-6161.

FERRIER, H., NIEUWENHUIJSEN, M., BOOBIS, A., ELLIOTT, P. 2002. *Current knowledge and recent developments in consumer exposure assessment of pesticides: A UK perspective*. Food Addit. Contam., 19(9), 837-852.

FERRIER, H., SHAW, G., NIEUWENHUIJSEN, M., BOOBIS, A., ELLIOTT, P. 2006. *Assessment of uncertainty in a probabilistic model of consumer exposure to pesticide residues in food*. Food Addit. Contam., 23(6), 601-615.

FINIZIO, A., VILLA, S. 2002. *Environmental risk assessment for pesticides: A tool for decision making*. Environmental Impact Assessment Review, 22(3), 235-248.

FLORI, P., FRABBONI, B., CESARI, A. 2000. *Pesticide decay models in the wine-making process and wine storage*. Ital. J. Food Sci., 12(3), 279-289.

FORSYTHE, T.G. 1992. *Plagas del campo: control biológico*. Ed. CEAC, Barcelona, España, p. 136.

FUSTER, A. 2002. *Análisis de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal. Control de calidad en los ensayos*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia, España, p. 244.

GAD, S.C. 2000. *In vitro toxicology*. 2nd Edition, Ed. CRC Press, London, United Kingdom, p. 410.

GAMÓN, M., SAEZ, A., PELEGRÍ, R., PERIS, I., DE LA CUADRA, J.G., COSCOLLÁ, R.J. 1998. *Liquid chromatographic determination of five benzoylurea insecticides in fruit and vegetables*. J. AOAC Int., 81(5), 1037-1042.

GARCÍA MARÍ, F., FERRAGUT, F. 2002. *Las plagas agrícolas*. 3^a Edición, Ed. Phytoma-España, Valencia, España, p. 400.

GARRIDO FRENICH, A., MARTÍNEZ VIDAL, J.L., LÓPEZ LÓPEZ, T., CORTÉS AGUADO, S., MARTÍNEZ SALVADOR, I. 2004. *Monitoring multi-class pesticide residues in fresh fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A., 1048(2), 199-206.

GARRIDO FRENICH, A., MARTÍNEZ SALVADOR, I., MARTÍNEZ VIDAL, J.L., LÓPEZ-LÓPEZ, T. 2005. *Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS*. Anal. Bioanal. Chem., 383(7-8), 1106-1118.

GENERALITAT VALENCIANA. 2001. *Estudios de curvas de disipación de plaguicidas en cítricos*. Ed. Generalitat Valenciana, Valencia, España, p. 184.

GERLING, D. 1986. *Natural enemies of Bemisia tabaci, biological characteristics and potential as biological control agents: a review*. Agr. Ecosyst. Environ., 17(1-2), 99-110.

GIBNEY, M.J., VAN DER VOET, H. 2003. *Introduction to the Monte Carlo project and the approach to the validation of probabilistic models of dietary exposure to selected food chemicals*. Food Addit. Contam., 20(Supplement 1), 1-7.

GIL GARCÍA, M.D., BARRANCO MARTÍNEZ, D., MARTÍNEZ GALERA, M., PARRILLA VÁZQUEZ, P. 2004. *Coupled-column liquid chromatography method with photochemically induced derivatization for the direct determination of benzoylureas in vegetables.* J. Sep. Sci., 27(14), 1173-1180.

GIL-IZQUIERDO, A., ZAFRILLA, P., TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 2002. *An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract.* Eur. Food Res. Technol., 214, 155-159.

GILSENAN, M.B., LAMBE, J., GIBNEY, M.J. 2003. *Assessment of food intake input distributions for use in probabilistic exposure assessments of food additives.* Food Addit. Contam., 20(11), 1023-1033.

GIVENS, M.L., LU, C., BARTELL, S.M., PEARSON, M.A. 2007. *Estimating dietary consumption patterns among children: A comparison between cross-sectional and longitudinal study designs.* Environ. Res., 103(3), 325-330.

GOLDMAN, L.R. 2007. *Managing pesticide chronic health risks: U.S. policies.* J. Agromedicine, 12(1), 67-75.

GÖZEK, K., YÜCEL, U., ILIM, M., AYSAL, P., TUNÇBILEK, A.S. 1999. *¹⁴C-dimethoate residues in olive oil during oil processing.* J. Environ. Sci. Health B, 34(3), 413-29.

GRANT, D.M. 1996. *A comparison of the distribution, metabolism and excretion of two benzoylphenylurea pesticides, diflubenuron and lufenuron, in the rat and mouse.* Diss. Abstr. Int. B, 57(3), 1747.

GREVE, P.A. 1988. *Analytical methods for residues of pesticides in foodstuffs.* 5th Edition, Ed. Ministry of Welfare, Health and Cultural Affairs, Rijswijk, The Netherlands, p. 53.

GRUNERT, K.G. 2005. *Food quality and safety: consumer perception and demand*. Eur. Rev. Agric. Econ., 32(3), 369-391.

GUARDIA, M., RUIZ, A., MOLINA, A., FERNÁNDEZ, M.L. 2006. Determination of pesticides in washing waters of olive processing by gas chromatography-tandem mass spectrometry. J. Sep. Sci., 29(11), 1578-1586.

GUARDIA, M., AYORA, M.J., RUIZ, A. 2007. *Effect of washing on pesticide residues in olives*. J. Food Sci., 72(2), C139-C143.

GUBBELS-VAN HAL, W.M.L.G., BLAAUBOER, B.J., BARENTSEN, H.M., HOITINK, M.A., MEERTS, I.A.T.M., VAN DER HOEVEN, J.C.M. 2005. *An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing*. Regul. Toxicol. Pharm., 42, 284-295.

GÜLDEN, M., SEIBERT, H. 2005. *Impact of bioavailability on the correlation between in vitro cytotoxic and in vivo acute fish toxic concentrations of chemicals*. Aquat. Toxicol., 72(4), 327-337.

GÜLDEN, M., DIERICKX, P., SEIBERT, H. 2006. *Validation of a prediction model for estimating serum concentrations of chemicals which are equivalent to toxic concentrations in vitro*. Toxicol. In Vitro, 20, 1114-1124.

HAKALA, B.E., WHITE, C., RECKLIES, A.D. 1993. *Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family*. J. Biol. Chem., 268(34), 25803-25810.

HAMEY, P.Y. 2000. *A practical application of probabilistic modelling in assessment of dietary exposure of fruit consumers to pesticide residues*. Food Addit. Contam., 17(7), 601-610.

HAMILTON, D., AMBRUS, Á., DIETERLE, R., FELSOT, A., HARRIS, C., PETERSEN, B., RACKE, K., WONG, S.S., GONZALEZ, R., TANAKA, K., EARL, M., ROBERTS, G., BHULA, R. 2004. *Pesticide residues in food - acute dietary exposure*. Pest Manag. Sci., 60(4), 311-339.

HARRIS, C.A., RENFREW, M.J., WOOLRIDGE, M.W. 2001. *Assessing the risks of pesticide residues to consumers: recent and future developments*. Food Addit. Contam., 18(1), 1124-1129.

HELDRICH, K. 1990. *AOAC official methods of analysis, method 970.52*. Ed. AOAC International, Gaithersburg, USA, pp. 274-281.

HENRICK, C.A. 1995. *Juvenoids*. In: *Agrochemicals from natural products*. Ed. Godfrey, C.R.A., Marcel Dekker, New York, USA, pp. 147-214.

HIEMSTRA, M., TOONEN, A., DE KOK, A. 1999. *Determination of benzoylphenylurea insecticides in pome fruit and fruiting vegetables by liquid chromatography with diode array detection and residue data obtained in the dutch national monitoring program*. J. AOAC Int., 82(5), 1198-1205.

HILL, A.R.C., REYNOLDS, S.L. 1999. *Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds*. Analyst, 124, 953-958.

HIRAHARA, Y., KIMURA, M., INOUE, T., UCHIKAWA, S., OTANI, S., HAGANUMA, A., MATSUMOTO, N., HIRATA, A., MARUYAMA, S., IIZUKA, T., UKYO, M., OTA, M., HIROSE, H., SUZUKI, S., UCHIDA, Y. 2005. *Validation of multiresidue screening methods for the determination of 186 pesticides in 11 agricultural products using gas chromatography (GC)*. J. Health Sci., 51(5), 617-627.

HODGSON, E., SMART, R. 2001. *Introduction to biochemical toxicology*. 3rd Edition, Ed. Appleton & Lange, Connecticut, USA, p. 588.

HOLLAND, P.T., HAMILTON, D., OHLIN, B., SKIDMORE, M.W. 1994. *Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products*. Pure & Appl. Chem., 66(2), 335-356.

HOLLAND, J., SINCLAIR, P. 2004. *Environmental fate of pesticides and the consequences in food and drinking water*. In: Pesticide residues in food and drinking water. Ed. Hamilton, D., Crossley, S., John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, USA, pp. 27-62.

HOROWITZ, A.R., KLEIN, M., YABLONSKI, S., ISHAAYA, I. 1992. *Evaluation of benzoylphenyl ureas for controlling the spiny bollworm, *Earias insulana* (Boisd.), in cotton*. Crop Prot., 11(5), 465-469.

HUANG, S.W. 2004. *Agriculture and trade report number WRS-04-06, Global trade patterns in fruits and vegetables*. Ed. USDA, Washington, DC, USA, p. 83.

HUIJBREGTS, M.A.J., THISSEN, U., JAGER, T., VAN DE MEENT, D., RAGAS, A.M.J. 2000. *Priority assessment of toxic substances in life cycle assessment. Part II: assessing parameter uncertainty and human variability in the calculation of toxicity potentials*. Chemosphere, 41(4), 575-588.

INE. 2005. *Gasto total por alimentos, bebidas y tabaco y valor unitario*. En: Encuesta continua de presupuestos familiares, Base 1997, Resultados anuales 2005. Ed. INE, Madrid, España, <http://www.ine.es/>.

IOBC/WPRS. 1999. *Integrated production. Principles and technical guidelines*. Bulletin IOBC/WPRS, 22(4), 5-34.

IOBC/WPRS. 2004. *Guidelines for integrated production of field grown vegetables*. 1st Edition, Ed. IOBC/WPRS, p. 24.

ISO. 2005. *ISO/IEC 17025:2005: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Ed. ISO, Geneva, Switzerland, p. 28.

JACAS, J., CABALLERO, P., AVILLA, J. 2005. *El control biológico de plagas y enfermedades*. Ed. Universidad Jaume I, Servicio de Comunicación y Publicaciones, Valencia, España, p. 223.

JALÓN, M. 2006. *Seguridad química de los alimentos: los niños como grupo de riesgo*. XVIII Jornadas de Pediatría en Atención Primaria, Vitoria, España, 17 de noviembre, p. 16.

JANSSON, C., PIHLSTROM, T., OSTERDAHL, B.G., MARKIDES, K.E. 2004. *A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. J. Chromatogr. A, 1023(1), 93-104.

JIMÉNEZ, R.M. 2002. *Agricultura sostenible para satisfacer el reto medioambiental de la producción agrícola*. Jornada temática sobre Aspectos medioambientales de la agricultura, 18 de julio de 2002, Madrid, España, pp. 2.

JIMÉNEZ DÍAZ, R.M., LAMO DE ESPINOSA, J. 1998. *Agricultura sostenible*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 3-38.

JOHNSON, L.R. 1997. *Gastrointestinal physiology*. 5th Edition, Ed. Mosby, St Louis, USA, p. 190.

JUAN-GARCÍA, A., PICÓ, Y., FONT, G. 2005. *Capillary electrophoresis for analyzing pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction*. J. Chromatogr. A, 1073(1-2), 229-236.

JURASKE, R. 2007. *Advances in life cycle impact assessment of pesticides: Methodological improvements and experimental studies*. Tesis Doctoral, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España, p. 140.

JURASKE, R., ANTÓN, A., CASTELLS, F. 2007. *Estimating half-lives of pesticides in/on vegetation for use in multimedia fate and exposure models*. J. Chromatogr. A, 1150(1-2), 208-214.

KAIHARA, A., YOSHII, K., TSUMURA, Y., NAKAMURA, Y., ISHIMITSU, S., TONOGAI, Y. 2000. *Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and HPLC*. J. Health Sci., 46(5), 336-342.

KEDAR, C.A., MANJIT, S.A., SAMINDRA, N.M. 2008. *Development and application of a method for analysis of lufenuron in wheat flour by gas chromatography-mass spectrometry and confirmation of bio-efficacy against Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. J. Chromatogr. B, 861(1), 16-21.

KEIM, S.A., ALAVANJA, M.C.R. 2001. *Pesticide use by persons who reported a high pesticide exposure event in the agricultural health study*. Environ. Res. 85(3), 256-259.

KONTOU, S., TSIPI, D., TZIA, C. 2004. *Kinetics of maneb degradation during thermal treatment of tomatoes*. J. Agric. Food Chem., 52(5), 1212-1219.

KROES, R., MÜLLER, D., LAMBE, J., LÖWIK, M.R.H., VAN KLAVEREN, J., KLEINER, J., MASSEY, R., MAYER, S., URIETA, I., VERGER, P., VISCONTI, A. 2002. *Assessment of intake from the diet*. Food Chem. Toxicol., 40(2-3), 327-385.

KUMAR, V., RAVINDRANATH, S.D., SHANKER, A. 2004. *Fate of hexaconazole residues in tea and its behavior during brewing process*. Chemical Health and Safety, 11(1), 21-25.

KUMAR, V., SOOD, C., JAGGI, S., RAVINDRANATH, S.D., BHARDWAJ, S.P., SHANKER, A. 2005. *Dissipation behavior of propargite-an acaricide residues in soil, apple (Malus pumila) and tea (Camellia sinensis).* Chemosphere, 58(6), 837-843.

LE, H.T., SZURDOKI, F., SZEKACS, A. 2003. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of the insect growth regulator fenoxycarb in environmental and biological samples. Pest Manag. Sci., 59(4), 410-416.

LECLERCQ, C., ARCELLA, D., ARMENTIA, A., BOON, P.E., KRUIZINGA, A.G.; GILSENAN, M.B., THOMPSON, R.L. 2003. *Development of databases for use in validation studies of probabilistic models of dietary exposure to food chemicals and nutrients.* Food Addit. Contam., 20(Supplement 1), 27-35.

LEE, S., MCLAUGHLIN, R., HARNLY, M., GUNIER, R., KREUTZER, R. 2002. *Community exposures to airborne agricultural pesticides in California: ranking of inhalation risks.* Environ. Health Perspect., 110(12), 1175-1184.

LEHOTAY, S.J. 2002. *Determination of pesticide residues in nonfatty food by practical extraction and gas chromatography/mass spectrometry: collaborative study.* J. AOAC Int., 85(5), 1148-1166.

LENNON, S.F., REIGHARD, G.L., SCHERMERHORN, P., PODHORNIAK, L., HORTON, D. 2006. *Profiling presence and concentration of eighteen pesticide residues through a commercial canning process.* Acta Hort. (ISHS), 713, 409-416.

LENTZA-RIZOS, C. 1995. *Residues of iprodione in fresh and canned peaches after pre- and postharvest treatment.* J. Agric. Food Chem., 43, 1357-1360.

LEVITAN, L. 2000. *"How to" and "why": assessing the enviro-social impacts of pesticides.* Crop Prot., 19(8-10), 629-636.

- LI, A.Y., DENNEHY, T.J., NICHOLS, R.L.** 2003. *Baseline susceptibility and development of resistance to pyriproxyfen in Bemisia Argentifolii (Homoptera: Aleyrodidae) in Arizona.* J. Econ. Entomol., 96(4), 1307-1314.
- LI, W., QIU, S.P., WU, Y.J.** 2008. *Triazophos residues and dissipation rates in wheat crops and soil.* Ecotox. Environ. Safe., 69(2), 312-316.
- LIU, T.X., CHEN, T.Y.** 2001. *Effects of a juvenile hormone analog, pyriproxyfen, on the apterous form of Lipaphis erysimi.* Entomol. Exp. Appl., 98(3), 295-301.
- LIU, T.X., STANSLY, P.A.** 2004. *Lethal and sublethal effects of two insect growth regulators on adult Delphastus catalinae (Coleoptera: Coccinellidae), a predator of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae).* Biol. Control, 30(2), 298-305.
- LÓPEZ-LÓPEZ, T., MARTÍNEZ-VIDAL, J.L., GIL-GARCÍA, M.D., MARTÍNEZ-GALERA, M., RODRÍGUEZ-LALLENA, J.A.** 2003a. *Benzoylphenylurea residues in peppers and zucchinis grown in greenhouses: determination of decline times and pre-harvest intervals by modelling.* Pest Manag. Sci., 60, 183-190.
- LÓPEZ, A., RUEDA, C., ARMENTIA, A., RODRÍGUEZ, M., CUERVO, L., OCIO, J.A.** 2003b. *Validation and sensitivity analysis of a probabilistic model for dietary exposure assessment to pesticide residues with a Basque Country duplicate diet study.* Food Addit. Contam., 20(Supplement 1), 87-101.
- LÖWIK, M.R.H., HULSHOF, K., BRUSSAARD, J.H., KISTEMAKER, C.** 1999. *Dependence of dietary intake estimates on the time frame of assessment.* Regul. Toxicol. Pharm., 30(2), S48-S56.
- LOZANO, C., BALDUQUE, R.** 2001. *Las ATRÍAs de frutales en Aragón, en continuo desarrollo.* Vida Rural, 135, 42-43.

LUETZOW, M. 2003. *Harmonization of exposure assessment for food chemicals: the international perspective*. *Toxicol. Lett.*, 140-141, 419-425.

LUKE, M.A., FROBERG, J.E., MASUMOTO, H.T. 1975. *Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58, 1020-1026.

LUKE, M.A., FROBERG, J.E., DOOSE, G.M., MASUMOTO, H.T. 1981. *Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 1187-1195.

MA, D., GORMANC, K., DEVINEC, G., LUO, W., DENHOLM, I. 2007. *The biotype and insecticide-resistance status of whiteflies, Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae), invading cropping systems in Xinjiang Uygur Autonomous Region, northwestern China*. *Crop Prot.*, 26, 612-617.

MACKICHAN, J.J., HINK, W.F. 1993. *High-performance liquid chromatographic determination of CGA-184699 (lufenuron) in dog and cat blood*. *J. Liq. Chromatogr.*, 16(12), 2595-2604.

MAGE, D.T., ALAVANJA, M.C.R., SANDLER, D.P., MCDONNELL, C.J., KROSS, B., ROWLAND, A., BLAIR, A. 2000. *A model for predicting the frequency of high pesticide exposure events in the agricultural health study*. *Environ. Res.*, 83(1), 67-71.

MALAIS, M., RAVENSBERG, W.J. 1995. *Conocer y reconocer. La biología de las plagas de invernadero y sus enemigos naturales*. Ed. Koppert BV, Rotterdam, Holanda, p. 109.

MAPA. 1983. *Orden de 26 de julio de 1983 por la que se establecen actuaciones de promoción de las agrupaciones para tratamientos integrados de agricultura (ATRIAS), contra las plagas de los diferentes cultivos.* BOE, 186, 21634-21635.

MAPA. 2001. *Daños en la agricultura causados por vertebrados.* Ed. MAPA, Madrid, España, p. 177.

MAPA. 2003. *Libro blanco de la agricultura y el desarrollo rural.* Ed. MAPA, Madrid, España, p. 825.

MAPA. 2006a. *Hechos y cifras de la agricultura, la pesca y la alimentación en España.* Ed. MAPA, Madrid, España, p. 159.

MAPA. 2006b. *Anuario de estadística agroalimentaria, datos de 2004, 2005 y 2006.* Ed. MAPA, Madrid, España, p. 1002.

MAPA. 2007. *Programa de control de residuos en mercado.* Ed. MAPA, Madrid, España, pp. 1.

MAPA. 2008a. *Registro de productos fitosanitarios.* Ed. MAPA, Madrid, España, <http://www.mapa.es/>.

MAPA. 2008b. *Producción integrada.* Ed. MAPA, Madrid, España, <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/ProduccionIntegrada/Int.htm>

MARCO, V.S., PÉREZ, I. 2004. *Manejo integrado de plagas: la aportación de la lucha contra las plagas a la agricultura sostenible. El caso de la viticultura.* ACE Revista de Enología, 44, 1697-1703.

MARÍN, A., OLIVA, J., GARCÍA, C., NAVARRO, S., BARBA, A. 2003. *Dissipation rates of cyprodinil and fludioxonil in lettuce and table grape in the field and under cold storage conditions.* J. Agric. Food Chem., 51(16), 4708-4711.

MARONI, M., FAIT, A., COLOSIO, C. 1999. *Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides.* Toxicol. Lett., 107(1-3), 145-153.

MARONI, M., FANETTI, A.C., METRUCCIO, F. 2006. *Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides in agriculture.* Med. Lav., 97(2), 430-437.

MARSELLA, A.M., JASKOLKA, M., MABURY, S. 2000. *Aqueous solubility, photolysis rates and partition coefficients of benzoylphenylurea insecticides.* Pest. Manag. Sci., 56, 789-794.

MARTÍNEZ-GALERA, M., LÓPEZ-LÓPEZ, T., GIL-GARCÍA, M.D., MARTÍNEZ-VIDAL, J.L., PARRILLA VÁZQUEZ, P. 2001. *Determination of benzoylureas in tomato by high-performance liquid chromatography using continuous on-line post-elution photoirradiation with fluorescence detection.* J. Chromatogr. A, 918, 79-85.

MARTÍNEZ GALERA, M., GIL GARCÍA, M.D., RODRÍGUEZ LALLENA, J.A., LÓPEZ LÓPEZ, T., MARTÍNEZ VIDAL, J.L. 2003. *Dissipation of pyrethroid residues in peppers, zucchinis, and green beans exposed to field treatments in greenhouses: evaluation by decline curves.* J. Agric. Food Chem., 51(19), 5745-5751.

MARTÍNEZ VIDAL, J.L., ARREBOLA, F.J., MATEU-SÁNCHEZ, M. 2002. *Multi-residue method for determination of pesticides in vegetable samples by GC-MS-MS.* Chromatographia, 56(7-8), 475-481.

MARTÍNEZ VIDAL, J.L., GARRIDO FRENICH, A. 2005. *Pesticide protocols.* Ed. Humana Press, New Jersey, USA, p. 503.

- MATHEW, R., KACEW, S., SHAHAMAT, U.K.** 1998. *Bioavailability in rats of bound pesticide residues from tolerant or susceptible varieties of soybean and canola treated with metribuzin or atrazine*. *Chemosphere*, 36(3), 589-596.
- MATTHEWS, G.A.** 1999. *Application of pesticides to crops*. Ed. Imperial College Press, London, United Kingdom, p. 340.
- MATTHEWS, G.A.** 2000. *Pesticide application methods*. 3rd Edition, Ed. Blackwell, Oxford, United Kingdom, p. 432.
- MATTHEWS, G.A.** 2006. *Pesticides: health, safety and the environment*. Ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, United Kingdom, p 235.
- MATSUNAGA, H., YOSHINO, H., ISOBE, N., KANEKO, H., NAKATSUKA, I., YAMADA, H.** 1995. *Metabolism of pyriproxyfen in rats. 1. Absorption, disposition, excretion, and biotransformation studies with [phenoxyphenyl-¹⁴C]pyriproxyfen*. *J. Agric. Food Chem.*, 43(1), 235-240.
- MAZZA, G.** 2000. *Frutas y verduras autóctonas de Latinoamérica*. En: Alimentos funcionales, Aspectos bioquímicos y de procesado. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp. 313-314.
- MENDEL, Z., BLUMBERG, D., ISHAAYA, I.** 1994. *Effects of some insect growth regulators on natural enemies of scale insects (Hom.: Coccoidea)*. *Biocontrol*, 39(2), 199-209.
- MERGNAT, T., FRITSCH, P., SAINT-JOLY, C., TRUCHOT, E., SAINT-BLANQUAT, G.** 1995. *Reduction in phosalone residue levels during industrial dehydration of apples*. *Food Addit. Contam.*, 12(6), 759-767.

MILIADIS, G.E., APLADA-SARLIS, P., LIAPIS, K. S. 1994. *Dissipation of pyrazophos residues in greenhouse tomatoes*. B. Environ. Contam. Tox., 53(6), 883-887.

MILIADIS, G.E., TSIROPOULOS, N.G., APLADA-SARLIS, P.G. 1999. *High-performance liquid chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grapes and wine using liquid and solid-phase extraction*. J. Chromatogr. A, 835, 113-120.

MILLER, D.D., SCHRICKER, R.B., RASMUSSEN, R.R., VAN CAMPEND, D. 1981. *An in vitro method for estimation of iron availability from meals*. Am. J. Clin. Nutr., 34(10), 2248-2256.

MILLS, P.A. 1959. *Detection and semiquantitative estimation of chlorinated organic pesticide residues in foods by paper chromatography*. J. Assoc. Off. Agric. Chem., 42, 734-740.

MILLS, P.A., ONLEY, J.H., GAITHER, R.A. 1963. *Rapid method for chlorinated pesticide residues in non-fatty foods*. J. Assoc. Off. Agric. Chem., 46, 186-191.

MINAKUCHI, C., NAKAGAWA, Y., KAMIMURA, M., MIYAGAWA, H. 2003. *Binding affinity of nonsteroidal ecdysone agonists against the ecdysone receptor complex determines the strength of their molting hormonal activity*. Eur. J. Biochem., 270, 4095-4104.

MINAKUCHI, C., ZHOU, X., RIDDIFORD, L.M. 2008. *Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of Drosophila melanogaster*. Mech. Dev., 125, 91-105.

MOL, H.G.J, ROOSEBOOM, A., VAN DAM, R., RODING, M., ARONDEUS, K., SUNARTO S. 2007. *Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce*. Anal. Bioanal. Chem., 389(6), 1715-1754.

MOLTÓ, J.C., BERRADA, H. 2004. *Urea pesticide residues in food*. In: Handbook of Food Analysis. 2nd Edition, Ed. Nollet L.M.L, CRC Press, London, United Kingdom, Vol. II, pp. 1065-1100.

MONTEMURRO, N., GRIECO, F., LACERTOSA, G., VISCONTI, A. 2002. *Chlorpyrifos decline curves and residue levels from different commercial formulations applied to oranges*. J. Agric. Food Chem., 50(21), 5975-5980.

MOORE, R., CLARK, W.D., VODOPICH, D.S. 1998. *Botany*. 2nd Edition, Ed. WCB-McGraw-Hill, Boston, USA, p. 919.

MOREIRAS, O., CARBAJAL, A., CABRERA, L., CUADRADO, M. 2006. *Tablas de composición de alimentos*. 10^a Edición, Ed. Pirámide, Madrid, España, p. 140.

MOSCHANDREAS, D.J., KARUCHIT, S., BERRY, M.R., O'ROURKE, M.K., LO, D., LEBOWITZ, M.D., ROBERTSON, G. 2002. *Exposure apportionment: Ranking food items by their contribution to dietary exposure*. J. Expo. Sci. Env. Epid., 12, 233-243.

MOTOHASHI, N., NAGASHIMA, H., PÁRKANYI, C., SUBRAHMANYAN, B., ZHANG, G.W. 1996. *Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil*. J. Chromatogr. A, 754, 333-346.

NARANJO, S.E., ELLSWORTH, P.C., HAGLER, J.R. 2004. *Conservation of natural enemies in cotton: role of insect growth regulators in management of Bemisia tabaci*. Biol. Control, 30(1), 52-72.

NATANGELO, M., TAVAZZI, S., FANELLI, R., BENFENATI, E. 1999. *Analysis of some pesticides in water samples using solid-phase microextraction gas chromatography with different mass spectrometric techniques*. J. Chromatogr. A, 859(2), 193-201.

NATION, J.L. 2002. *Insect physiology and biochemistry*. Ed. Nation, J.L., CRC Press, Florida, USA, p. 115.

NAVARRO GARCÍA, S., CÁMARA, M.A., BARBA, A., TOLEDANO, R., LUNA, A. 1992. *Incidence of residual levels of organophosphorus insecticides in farm produce in the Region of Murcia, Spain. Comparison of intake in the 1985-86 and 1989 campaigns*. J. Appl. Toxicol., 12(4), 251-254.

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. Agric. Food Chem., 47(1), 264-270.

NAVARRO, S., OLIVA, J., BARBA, A., NAVARRO, G., GARCIA, M.A., ZAMORANO, M. 2000. *Evolution of chlorpyrifos, fenarimol, metalaxyl, penconazole, and vindoxolin in red wines elaborated by carbonic maceration of Monastrell grapes*. J. Agric. Food Chem., 48(8), 3537-3541.

NEBEL, B.J., WRIGHT, R.T. 1993. *Pests and pest control*. In: Environmental science: the way the world works. Ed. Prentice Hall PTR, Indiana, USA, pp. 217.

NICHOUT, H.F. 1994. *Insect hormones*. Ed. Princeton, N.J., Princeton Univ. Press, New Jersey, USA, p. 267.

NOLAN, R.J., RICK, K.L., FRESHOUR, N.L., SAUNDERS, J.H. 1984. *Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 73(1), 8-15.

OCDE/FAO. 2005. *Perspectivas agrícolas OCDE-FAO: 2005-2014*. Ed. FAO, Roma, Italia, p. 3.

OCHIAI, N., SASAMOTO, K., KANDA, H., YAMAGAMI, T., DAVID, F., TIENPONT, B., SANDRA, P. 2005. *Optimization of a multi-residue screening method for the determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS*. J. Sep. Sci., 28, 1083-1092.

O'KEEFFE, M. 2000. *Residue analysis in food: principles and applications*. Ed. CRC Press, Florida, USA, p. 306

OLIVA, J., NAVARRO, S., BARBA, A., NAVARRO, G. 1999. *Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography*. J. Chromatogr. A, 833(1), 43-51.

OLIVA, J., BARBA, A., PAYÁ, P., CÁMARA, M.A. 2006. *Disappearance of fenhexamid residues during wine-making process*. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci., 71(2), 65-74.

OLIVA, J., PAYÁ, P., CÁMARA, M.A., BARBA, A. 2007a. *Removal of famoxadone, fluquinconazole and trifloxystrobin residues in red wines: effects of clarification and filtration processes*. J. Environ. Sci. Health B., 42(7), 775-781.

OLIVA, J., PAYÁ, P., CÁMARA, M.A., BARBA, A. 2007b. *Removal of pesticides from white wine by the use of fining agents and filtration*. Commun. Agric. Appl. Biol. Sci., 72(2), 171-180.

ONO, Y., YAMAGAMI, T., NISHINA, T., TOBINO, T. 2006. *Pesticide multiresidue analysis of 303 compounds using supercritical fluid extraction*. Anal. Sci., 22, 1473-1476.

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO. 2004. *Situación y estadísticas del sector vitivinícola mundial*. Ed. Organización Internacional de la Viña y el Vino, París, Francia, p. 164.

OTOIDOBIGA, L.C., VINCENT, C., STEWART, R.K. 2003. *Field efficacy and baseline toxicities of pyriproxifen, acetamiprid, and diafenthiuron against Bemisia tabaci gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) in Burkina Faso (West Africa).* J. Environ. Sci. Health Part B-Pestic. Contam. Agric. Wastes, 38(6), 757-769.

OTTERSTÄTTER, G. 1999. *Coloring of food, drugs, and cosmetics.* Ed. Marcel Dekker Inc., New York, USA, p. 385.

PADOVANI, L., TREVISAN, M., CAPRI, E. 2004. *A calculation procedure to assess potential environmental risk of pesticides at the farm level.* Ecol. Indic., 4(2), 111-123.

PALLI, S.R., CUSSON, M. 2007. *Future insecticides targeting genes involved in the regulation of molting and metamorphosis in insecticides design using advanced technologies.* Ed. Ishaaya, I., Nauen, R., Horowitz, A.R., Springer, Heidelberg, Germany, pp. 105-134.

PALUMBOA, J.C., HOROWITZB, A.R., PRABHAKERC, N. 2001. *Insecticidal control and resistance management for Bemisia tabaci.* Crop Prot., 20, 739-765.

PAMPLONA, J.D. 1999. *Enciclopedia de los alimentos y su poder curativo.* Ed. Safeliz S.L., Madrid, España, Vol. I, II, III.

PAOLETTI, M.G., NORBERTOB, L., DAMINIA, R., MUSUMECI, S. 2007. *Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin.* Ann. Nutr. Metab., 51(3), 244-251.

PARLAMENTO EUROPEO, CONSEJO EUROPEO. 2005. *Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.* En: DO L 70 de 16.3.2005. Ed. Parlamento Europeo, Consejo Europeo, Bruselas, Bélgica, pp. 1-16.

PAYÁ, P., ANASTASSIADES, M., MACK, D., SIGALOVA, I., TASDELEN, B., OLIVA, J., BARBA, A. 2007a. *Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection*. Anal. Bioanal. Chem., 389(6), 1697-1714.

PAYÁ, P., OLIVA, J., CÁMARA, M.A., BARBA, A. 2007b. *Dissipation of insect growth regulators in fresh and canned fruits*. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 87, 971-983.

PAYÁ, P., OLIVA, J., CÁMARA, M.A., BARBA, A. 2007c. *Dissipation of insect growth regulators in fresh and canned peach*. J. Environ. Sci. Health B, 42, 767-773.

PAYÁ, P., OLIVA, J., CÁMARA, M.A., BARBA, A. 2007d. *Dissipation of insect growth regulators in fresh orange and orange juice*. Comm. Appl. Biol. Sci., 72(2), 161-169.

PAYÁ, P., FUSSELL, R., DAY, J., OLIVA, J. 2008a. *Determination of 'natural pesticides' in apple by ultra performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS)*. 4th International Workshop on LC-MS-MS for Screening and Trace Level Quantitation in Environmental and Food Samples, Barcelona, Spain, February 7-8.

PAYÁ, P., DAY, J., FINDLAY, D., FUSSELL, R.J., OLIVA, J. 2008b. *Validation and monitoring of 'natural pesticides' in fruits and vegetables by ultra performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS)*. 7th European Pesticide Residue Workshop, Berlin, Germany, June 1-4.

PAULO, M.J., VAN DER VOET, H., JANSEN, M.J.W, TER BRAAK, C.J.F., VAN KLAVEREN, J.D. 2005. *Risk assessment of dietary exposure to pesticides using a Bayesian method*. Pest Manag. Sci., 61(8), 759-766.

PEÑA, M.A. 1988. *Primeras experiencias de lucha biológica contra Liriomyza trifolii (Burg.) (Dipt., Agromyzidae) con Diglyphus isaea (Walk.) (Hym., Eulophidae) en las Islas Canarias.* Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas, 14(3), 439-445.

PÉREZ, I. 2000. *Fundamentos teóricos del manejo integrado de plagas.* Aracnet, 27, 127-133.

PESTICIDE SAFETY DIRECTORATE. 2001. *Data requirements handbook.* Ed. Pesticide Safety Directorate, York, United Kingdom, p. 179.

PETERSEN, B.J. 2000. *Probabilistic modelling: theory and practice.* Food Addit. Contam., 17(7), 591-599.

PETERSEN, B.J., YOUNGREN, S.H., WALLS, C.L. 2001. *Modeling dietary exposure with special sections on modeling aggregate and cumulative exposure.* In: Handbook of Pesticide Toxicology. 2nd Edition, Ed. Academic Press, San Francisco, USA, 443-455.

PIHLSTRÖM, T., BLOMKVIST, G., FRIMAN, P., PAGARD, U., ÖSTERDAHL, B.G. 2007. *Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection.* Anal. Bioanal. Chem., 389(6), 1773-1789.

PIMENTEL, D., ACQUAY, H., BILTONEN, M., RICE, P., SILVA, M., NELSON, J., LIPNER, V., GIORDANO, S., HOROWITZ, A., D'AMORE, M. 1992. *Environmental and economic costs of pesticide use.* BioScience, 42(10), 750-760.

PIMENTEL, D., GREINER, A. 1997. *Environmental and socio-economic costs of pesticide use.* In: Techniques for reducing pesticide use: economics and environmental benefits. Ed. Pimentel, D., John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 51-57.

POET, T.S., WU, H., KOUSBA, A.A., TIMCHALK, C. 2003. *In vitro* rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicol. Sci.*, 72, 193-200.

POLLACK, S.L. 2001. *Consumer demand for fruit and vegetables: The U.S. example*. In: Agriculture and trade report WRS-04-1, Changing structure of global food consumption and trade. Ed. Regmi, A., Economic Research Service/USDA, Washington, DC, USA, pp. 49-54.

POSE, E., CANCHO, B., RIAL, R., SIMAL, J. 2006. *The dissipation rates of cyprodinil, fludioxonil, procymidone and vinclozoline during storage of grape juice*. *Food Control*, 17(12), 1012-1017.

PRABHAKER, N., MORSE, J.G., CASTLE, S.J., NARANJO, S.E., HENNEBERRY, T.J., TOSCAZO, N.C. 2007. *Toxicity of seven foliar insecticides to four insect parasitoids attacking citrus and cotton pests*. *J. Econ. Entomol.*, 100(4), 1053-1061.

PRABHAKER, N., TOSCAZO, N.C. 2007. *Toxicity of the insect growth regulators, buprofezin and pyriproxyfen, to the glassy-winged sharpshooter, Homalodisca coagulata say (Homoptera: Cicadellidae)*. *Crop Prot.*, 26(4), 495-502.

PRIMO, E. 1991. *Ecología química. Nuevos métodos de lucha contra los insectos*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 191.

PUGLIESE, P., MOLTÓ, J.C., DAMIANI, P., MARÍN, R., COSSIGNANI, L., MAÑES, J. 2004. *Gas chromatographic evaluation of pesticide residue contents in nectarines after non-toxic washing treatments*. *J. Chromatogr. A*, 1050(2), 185-191.

RABØLLE, M., SPLIID, N.H., KRISTENSEN, K., KUDSK, P. 2006. *Determination of fungicide residues in field-grown strawberries following different fungicide strategies against gray mold (Botrytis cinerea)*. *J. Agric. Food Chem.*, 54(3), 900-908.

RAGAERT, P., VERBEKE, W., DEVLIEGHERE, F., DEBEVERE, J. 2004. *Consumer perception and choice of minimally processed vegetables and packaged fruits*. Food Qual. Prefer., 15(3), 259-270.

RAMÍREZ, J.A., LACASAÑA, M. 2001. *Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*. Archivos de Prevención de Riesgos Laborales, 4(2), 67-75.

RASMUSSEN, R.R., POULSEN, M.E., HANSEN, H.C. 2003. *Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing*. Food Addit. Contam., 20(11), 1044-1063.

RAWN, D.F.K., CAO, X.L., DOUCET, J., DAVIES, D.J., SUN, W.F., DABEKA, R.W., NEWSOME, W.H. 2004. *Canadian total diet study in 1998: pesticide levels in foods from Whitehorse, Yukon, Canada, and corresponding dietary intake estimates*. Food Addit. Contam., 21(3), 232-250.

RENKEMA, G.H., BOOT, R.G., MUIJSERS, A.O., DONKER-KOOPMAN, W.E., AERTS, J.M.F.G. 1995. *Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins*. J. Biol. Chem., 270(5), 2198-2202.

RENWICK, A. 2002. *Pesticide residue analysis and its relationship to hazard characterisation (ADI/ARfD) and intake estimations (NEDI/NESTI)*. Pest Manag. Sci., 58, 1073-1082.

REPETTO, M. 1997. *Toxicología fundamental*. 3ª Edición, Ed. Díaz de Santos, Madrid, España, p. 406.

REUS, J., LEENDERTSE, P. 2000. *The environmental yardstick for pesticides: a practical indicator used in the Netherlands*. Crop Prot., 19(8-10), 637-641.

REUS, J., LEENDERTSE, P., BOCKSTALLER, C., FOMSGAARD, I., GUTSCHE, V., LEWIS, K., NILSSON, C., PUSSEMIER, L., TREVISAN, M., VAN DER WERF, H., ALFARROBA, F., BLÜMEL, S., ISART, J., MCGRATH, D., SEPPÄLÄ, T. 2002. *Comparison and evaluation of eight pesticide environmental risk indicators developed in Europe and recommendations for future use*. Agr. Ecosyst. Environ., 90(2), 177-187.

RICHARDSON, M.L., LAGOS, D.M. 2007. *Effects of a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen, on the apterous form of soybean aphid (Aphis glycines)*. J. Appl. Entomol., 131(5), 297-302.

RIEGER, M. 2006. *Introduction to fruit crops*. Ed. Haworth Press, Philadelphia, USA, p. 462.

RITTER, L., SOLOMON, K., SIBLEY, P., HALL, K., KEEN, P., MATTU, G., LINTON, B. 2002. *Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry*. J. Toxicol. Environ. Health A., 65(1), 1-142.

RODRÍGUEZ, M.D., MORENO, R., TÉLLEZ, M.M., RODRÍGUEZ, M.P., FERNÁNDEZ, R. 1994. *Eretmocerus mundus* (Mercet), *Encarsia lutea* (Masi) y *Encarsia transvena* (Timberlake) (Hym., Aphelinidae) parasitoides de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) en los cultivos hortícolas protegidos almerienses. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas, 20(3), 695-702.

ROSS, J.H., DRIVER, J.H., COCHRAN, R.C., THONGSINTHUSAK, T., KRIEGER, R.I. 2001. *Could pesticide toxicology studies be more relevant to occupational risk assessment?*. Ann. Occup. Hyg., 45, S5-S17.

RUBIO, A. 2006. *Persistencia y movilidad de plaguicidas en suelos y aguas. Aportaciones sobre lixiviación, absorción, fotodegradación y movilidad*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia, España, p. 250.

RUEDIGER, G., PARDON, K., SAS, A., GODDEN, P., POLLNITZ, A. 2004. *Removal of pesticides from red and white wine by the use of fining and filter agents*. Aust. J. Grape Wine Res., 10, 8-16.

RUEDIGER, G., PARDON, K., SAS, A., GODDEN, P., POLLNITZ, A. 2005. *Fate of pesticides during the winemaking process in relation to malolactic fermentation*. J. Agric. Food Chem., 53(8), 3023-3026.

RUIZ, M.V., DE LA ROSA, I.P., JIMÉNEZ, A., UCEDA, M. 2005. *Elimination of pesticides in olive oil by refining using bleaching and deodorization*. Food Addit. Contam., 22(1), 23-30.

SABBIONI, G., NEUMANN, H.G. 1990. *Biomonitoring of arylamines: hemoglobin adducts of urea and carbamate pesticides*. Carcinogenesis, 11(1), 111-115.

SAMWAYS, M.J. 1990. *Control biológico de plagas y malas hierbas*. Ed. Oikos-Tau, Barcelona, España, p. 88.

SANBORN, M.D., COLE, D., ABELSOHN, A., WEIR, E. 2002. *Identifying and managing adverse environmental health effects: 4. Pesticides*. CMAJ, 166(11), 1431-1436.

SÁNCHEZ, F.F. 1994. *Control biológico de plagas en invernadero*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 86.

SANDERMANN, H., ARJMAND, M., GENNITY, I., WINKLER, R. 1990. *Animal bioavailability of defined xenobiotic lignin metabolites*. J. Agric. Food Chem., 38, 1877-1880.

SANDERMANN, H., MUSICK, T.J., ASCHBACHER, P.W. 1992. *Animal bioavailability of a 3,4-dichloroaniline-lignin metabolite fraction from wheat*. J. Agric. Food Chem., 40(10), 2001-2007.

SANDRA, P., TIENPONT, B., DAVID, F. 2003. *Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1000, 299-309.

SCHAFER, K.S., KEGLEY, S.E. 2002. *Persistent toxic chemicals in the US food supply*. J. Epidemiol. Commun. H., 56, 813-817.

SCHENZLER, C., THIER, H.P. 2001. *European standardization of methods for pesticide residue analysis in foods? current status*. Food Addit. Contam., 10, 875-879.

SCHNEIDER, K., OLLROGE, I., CLAUBERG, M., SCHUHMACHER-WOLZ, U. 2007. *Analysis of risk assessment and risk management processes in the derivation of maximum levels for environmental contaminants in food*. Food Addit. Contam., 24(7), 768-776.

SCHNEIDER, M., SMAGGHE, G., PINEDA, S., VIÑUELA, E. 2008. *The ecological impact of four IGR insecticides in adults of Hyposoter didymator (Hym., Ichneumonidae): pharmacokinetics approach*. Ecotoxicology, 17, 181-188.

SCHRICKER, B.R., MILLER, D.D., RASMUSSEN, R.R., VAN CAMPEN, D. 1981. *A comparison of in vivo and in vitro methods for determining availability of iron from meals*. Am. J. Clin. Nutr., 34(10), 2257-2263.

SEIBER, J.N. 2001. *Environmental transport and fate*. In: Handbook of pesticide toxicology. 2nd Edition, Ed. Krieger, R.I., Academic Press, New York, USA, pp. 643-648.

SHAHAMAT, U.K., KACEW, S., DUPONT, S., STRATTON, G.D., WHEELER, W.B. 1987. *Bioavailability in rats of bound residues from radishes treated with either radiolabeled dieldrin or carbofuran*. J. Agric. Food Chem., 35, 89-93.

SHARMA, J., SATYA, S., KUMAR, V., TEWARY, D.K. 2005. *Dissipation of pesticides during bread-making*. Chemical Health and Safety, 12(1), 17-22.

SHARPE, R.M, IRVINE, D.S. 2004. *How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health?*. BMJ. 328(7437), 447-451.

SHERMA, J. 1995. *Pesticides*. Anal. Chem., 67, 1R-20R.

SHERMA, J. 1997. *Current status of pesticide residue analysis*. J. AOAC Int., 80(2), 283-287.

SILVA-AGUAYO, G. 2002. *Botanical insecticides*. In: Radcliffe's IPM World Textbook. Ed. Radcliffe, E.B., Hutchison, W.D., University of Minnesota, Minnesota, USA, <http://ipmworld.umn.edu/>.

SIMCOX, N.J, FENSKE, R.A., WOLZ, S.A., LEE, I.C., KALMAN, D.A. 1995. *Pesticides in household dust and soil: exposure pathways for children of agricultural families*. Environ. Health. Perspect., 103(12), 1126-1134.

SINGH, B., BATTU, R.S. 2005. *Dissipation of lindane on okra under subtropical conditions at Ludhiana, Punjab, India*. B. Environ. Contam. Tox., 74(1), 141-145.

SOLER, C., MAÑES, J., PICÓ, Y. 2004. *Liquid chromatography–electrospray quadrupole ion-trap mass spectrometry of nine pesticides in fruits*. J. Chromatogr. A, 1048, 41-49.

SOLIMAN, K.M. 2001. *Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation*. Food Chem. Toxicol., 39, 887-891.

SOUCI, S.W., FACHMANN, W., KRAUT, H. 1999. *Tablas de composición de alimentos, El pequeño "Souci-Fachmann-Kraut"*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, p. 430.

STAN, H.J., KLAFFENBACH, P. 1991. *Determination of carbamate pesticides and some urea pesticides after derivatization with acetic anhydride by means of GC-MSD*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 339(3), 151-157.

STENRØD, M., HEGGEN, H.E., BOLLI, R.I., EKLO, O.M. 2008. *Testing and comparison of three pesticide risk indicator models under Norwegian conditions-A case study in the Skuterud and Heiabekken catchments*. Agr. Ecosyst. Environ., 123(1-3), 15-29.

ŠTĚPÁN, R., HAJŠLOVÁ, J., KOCOUREK, V., TICHÁ, J. 2004. *Uncertainties of gas chromatographic measurement of troublesome pesticide residues in apples employing conventional and mass spectrometric detectors*. Anal. Chim. Acta, 520, 245-255.

STEPHEN, H.S. 1995. *Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?*. Environ. Health. Persp., 103(4), 346-351.

STROBEL, G.A. 1991. *Control biológico de las malas hierbas*. Investigación y Ciencia, 180, 52-58.

SZURDOKI, F., SZÉKÁCS, A., LE, H.M., HAMMOCK, B.D. 2002. *Synthesis of haptens and protein conjugates for the development of immunoassays for the insect growth regulator fenoxycarb*. J. Agric. Food Chem., 50, 29-40.

TADEO, J.L., SÁNCHEZ-BRUNETE, C., PÉREZ, R.A., FERNÁNDEZ, M.D. 2000. *Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables*. J. Chromatogr. A, 882, 175-191.

TAYLOR, M.J., HUNTER, K., LINDSAY, D., LE BOUELLEC, S. 2002. *Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 982(2), 225-236.

- TEIXEIRA, M.J., AGUIAR, A., AFONSO, C.M.M., ALVES, A., BASTOS, M.M.S.M.** 2004. *Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology*. Anal. Chim. Acta, 513, 333-340.
- TEWARY, D.K., KUMAR, V., SHANKER, A.** 2004. *Leaching of pesticides in herbal decoction*. Chemical Health and Safety, 11(4), 25-29.
- TEWARY, D.K., KUMAR, V., RAVINDRANATH, S.D., SHANKER, A.** 2005. *Dissipation behavior of bifenthrin residues in tea and its brew*. Food Control, 16(3), 231-237.
- THIER, H.P., ZEUMER, H.** 1987. *Deutsche forschungsgemeinschaft manual of pesticide residue analysis volume I*. Ed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, p. 432.
- THIER, H.P., KIRCHHOFF, J.** 1992. *Deutsche forschungsgemeinschaft manual of pesticide residue analysis volume II*. Ed. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, p. 477.
- THIER, H.P.** 1997. *Harmonization of pesticide residue analytical methods by the Technical Committee 275 of the Comité Européen de Normalisation (CEN/TC 275)*. Pestic. Sci., 50, 151-155.
- THUN, M.** 2001. *El control de las plagas*. Ed. Rudolf Steiner, Madrid, España, p. 86.
- TICHA, J., HAJŠLOVA, J., JECH, M., HONZICEK, J., LACINA, O., KOHOUTKOVA, J., KOCOUREK, V., LANSKY, M., KLOUTVOROVA, J., FALTA, V.** 2008. *Changes of pesticide residues in apples during cold storage*. Food Control, 19, 247-256.
- TIMCHALK, C., NOLAN, R.J., MENDRALA, A.L., DITTENBER, D.A., BRZAK, K.A., MATSSON, J.L.** 2002. *A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans*. Toxicol. Sci., 66, 34-53.

TIMME, G., FREHSE, H. 1980. *Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticides residues I*. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

TIMME, G., FREHSE, H., LASKA, V. 1986. *Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II*. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

TIMME, G., WALZ-TYLLA, B. 2004. *Effects of food preparation and processing on pesticide residues in commodities of plant origin*. In: Pesticide residues in food and drinking water: human exposures and risks. Ed. Hamilton, D., Crossley, S., John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, USA, pp. 121-148.

TOMERLIN, J.R., PETERSEN, B.J. 2004. *Diets and dietary modelling for dietary exposure assessment*. In: Pesticide residues in food and drinking water: human exposures and risks. Ed. Hamilton, D., Crossley, S., John Wiley & Sons, Ltd., New Jersey, USA, pp. 167-211.

TOMLIN, C.D.S. 2005. *The e-pesticide manual. A world compendium*. 13th Edition, Ed. British Crop Protection Council, Farnham, United Kingdom.

TORÀ, R., SIÓ, J., SARASÚA, M.J., AVILLA, J. 1995. *Control integrado de plagas en huertos de manzano y peral en Cataluña*. Fruticultura Profesional, 70, 36-51.

TOSCANO, N.C., PRABHAKER, N., CASTLE, S.J., HENNEBERRY, T.J. 2001. *Inter-regional differences in baseline toxicity of Bemisia Argentifolii (Homoptera: Aleyrodidae) to the two insect growth regulators, buprofezin and pyriproxyfen*. J. Econ. Entomol., 94(6), 1538-1546.

TRAVISI, C.M., NIJKAMP, P., VINDIGNI, G. 2006. *Pesticide risk valuation in empirical economics: a comparative approach*. Ecol. Econ., 56(4), 455-474.

- TRAVISI, C.M., NDIKAMP, P.** 2008. *Valuing environmental and health risk in agriculture: A choice experiment approach to pesticides in Italy*. Ecol. Econ., In press, Available online, DOI:10.1016/j.ecolecon.2008.01.011.
- TRICHOPOULOU, A., VASILOPOULOU, E., LAGIOU, A.** 2000. *Mediterranean diet and coronary heart disease: are antioxidant critical?*. Nutr. Rev., 57(8), 253-255.
- TSIROPOULOS, N.G., APLADA-SARLIS, P.G., MILIADIS, G.E.** 1999a. *Evaluation of teflubenzuron residue levels in grapes exposed to field treatments and in the must and wine produced from them*. J. Agric. Food Chem., 47(11), 4583-4586.
- TSIROPOULOS, N.G., APLADA-SARLIS, P.G., MILIADIS, G.E.** 1999b. *Determination of benzoylurea insecticides in apples and pears by solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography with UV detection*. J. AOAC Int., 82(1), 213-216.
- TSIROPOULOS, N.G., MILIADIS, G.E., LIKAS, D.T., LIAPIS, K.** 2005. *Residues of spiromamine in grapes following field application and their fate from vine to wine*. J. Agric. Food Chem., 53(26), 10091-10096.
- TUBERTY, S.R., MCKENNEY, C.L.J.** 2005. *Ecdysteroid responses of estuarine crustaceans exposed through complete larval development to juvenile hormone agonist insecticides*. Integr. Comp. Biol., 45, 106-117.
- TUNAZ, H., UYGUN, N.** 2004. *Insect growth regulators for insect pest control*. Turk. J. Agric. For., 28, 377-387.
- TYKVA, R.** 1998. *Selection of a pesticide with low environmental impact*. Ecotox. Environ. Safe, 40(1-2), 94-96.

UNITED KINGDOM MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. 1991. *Analysis of pesticide residues in products of animal origin, Method FScLPest-1*. Ed. United Kingdom Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, United Kingdom, 23.4.91.

UNITED KINGDOM MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. 2004. *Instructions for carrying out long term consumer risk assessment using PSD's ten consumer model*. Ed. United Kingdom Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, United Kingdom, p. 12.

URIETA, I., JALÓN, M., EGUILEOR, I. 1996. *Food surveillance in the Basque Country (Spain). II. Estimation of the dietary intake of organochlorine pesticides, heavy metals, arsenic, aflatoxin M1, iron, zinc through the total diet study, 1990/91*. Food Addit. Contam., 13, 29-52.

US EPA. 1982. *Pesticide assessment guidelines, subdivision 0, residue chemistry, EPA-540/09-82-023*. Ed. US EPA, Washington, DC, USA, p. 15.

US EPA. 2006. *Terminology reference system*. Ed. US EPA, Washington, DC, USA, <http://www.epa.gov/trs/>.

US EPA. 2007. *Pesticide industry sales and usage*. Ed. US EPA, Washington, DC, USA, <http://www.epa.gov/oppbead1/pestsales/index.htm>.

USDA. 2001. *Changing structure of global food consumption and trade*. Ed. Regmi, A., USDA, Washington, DC, USA, p. 107.

USDA. 2004. *U.S.-EU food and agriculture comparisons*. Ed. Normile, M.A., Leetmaa, S.E., USDA, Washington, DC, USA, p. 97.

USDA. 2005. *Stone fruit situation and outlook for selected countries*. Ed. USDA, Washington, DC, USA, p. 6.

USDA. 2007a. *Combined abstracts for analytical methods*. Ed. USDA, Washington, DC, USA, p. 5.

USDA. 2007b. *Per capita consumption*. Ed. USDA, Washington, DC, USA, <http://www.ers.usda.gov/Data/FoodConsumption/>.

USDA. 2008. *World markets and trade: citrus*. Ed. USDA, Washington, DC, USA, p. 3.

VALCKE, M., CHAVERRI, F., MONGE, P., BRAVO, V., MERGLER, D., PARTANEN, T., WESSELING, C. 2005. *Pesticide prioritization for a case-control study on childhood leukemia in Costa Rica: a simple stepwise approach*. *Environ. Res.*, 97(3), 335-347.

VALENZUELA, A.I., LORENZINI, R., REDONDO, M.J., FONT, G. 1999. *Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit*. *J. Chromatogr. A*, 839(1-2), 101-107.

VALENZUELA, A.I., PICÓ, Y., FONT, G. 2000. *Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometric analysis of benzoylurea insecticides in citrus fruits*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14(7), 572-577.

VAN DE WOUW, A.P., BATTERHAM, P., DABORN, P.J. 2006. *The insect growth regulator insecticide cyromazine causes earlier emergence in *Drosophila melanogaster**. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 63(3), 101-109.

VAN DER VOET, H., SLOB, W. 2007. *Integration of probabilistic exposure assessment and probabilistic hazard characterization*. *Risk Anal.*, 27(2), 351-371.

VAN DER WERF, H.M.G. 1996. *Assessing the impact of pesticides on the environment*. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 60(2-3), 81-96.

VAN DER WERF, H.M.G., ZIMMER, C. 1998. An indicator of pesticide environmental impact based on a fuzzy expert system. *Chemosphere*, 36(10), 2225-2249.

VERCRUYSE, F., STEURBAUT, W. 2002. *POCER, the pesticide occupational and environmental risk indicator*. *Crop Prot.*, 21(4), 307-315.

VILLARIAS, J.L. 2006. *Atlas de malas hierbas*. 4ª Edición, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 632.

VIÑUELA, E., BUDIA, F., DEL ESTAL, P. 1991. *Los insecticidas reguladores del crecimiento y la cutícula*. *Boletín Sanidad Vegetal-Plagas*, 17, 391-400.

VIÑUELA, E., JACAS, J. 1993. *Los enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas*. En: *Hojas Divulgadoras*. Ed. MAPA, Madrid, España, p. 24.

WALTER, H.F., FREHSE, H., TIMME, G. 1993. *Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues III. Extension of the formal description of degradation*. *Planzenschutz-Nachrichten Bayer*, 46, 265-288.

WANG, S., ALLAN, R.D., SKERRITT, J.H., KENNEDY, I.R. 1998. *Development of a class-specific competitive ELISA for the benzoylphenylurea insecticides*. *J. Agric. Food Chem.*, 46(8), 3330-3338.

WANG, S., ALLAN, R.D., SKERRITT, J.H., KENNEDY, I.R. 1999. *Development of a compound-specific ELISA for flufenoxuron and an improved class-specific assay for benzoylphenylurea insect growth regulators*. *J. Agric. Food Chem.*, 47(8), 3416-3424.

WANG, Z., HENNION, B., URRUTY, L., MONTURY, M. 2000. *Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography: a complementary technique to solid-phase microextraction-gas chromatography for the analysis of pesticide residues in strawberries*. *Food Addit. Contam.*, 17, 913-923.

WARE, G.W., WHITACRE, D.M. 2004. *The pesticide book*. Ed. Meister Media Worldwide, 6th Edition, Ohio, USA, p. 496.

WELLS, M. 1998. *The work of the Pesticides Safety Directorate*. Nutrition & Food Science, 6, 310-313.

WHITMYRE, G.K., ROSS, J.H., LUNCHICK, C., VOLGER, B., SINGER, S. 2004. *Biphasic dissipation kinetics for dislodgeable foliar residues in estimating postapplication occupational exposures to endosulfan*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 46, 17-23.

WHO. 1997. *Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues*. Ed. WHO, Geneva, Switzerland, p. 30.

WHO. 2002. *WHO global strategy for food safety: safer food for better health*. Ed. WHO, Geneva, Switzerland, p. 23.

WHO. 2003. *GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities*. Ed. WHO, Geneva, Switzerland, p. 24.

WHO/FAO. 2003. *Global and regional food consumption patterns and trends*. In: WHO technical report series 916, Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, Report of a joint WHO/FAO expert consultation. 2nd Edition, Ed. WHO, Geneva, Switzerland, pp. 13-29.

WIER, M., CALVERLEY, C. 2002. Market potential for organic foods in Europe. Brit. Food J., 104(1), 45-62.

WIJNANDS, F.G. 1997. *Integrated crop protection and environment exposure to pesticides: methods to reduce use and impact of pesticides in arable farming*. Eur. J. Agron., 7, 251-260.

WILLIS, G.H., MCDOWELL, L.L. 1987. *Pesticide persistence on foliage*. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 100, 23-73.

WOOLLEN, B.H. 1993. *Biological monitoring for pesticide absorption*. Ann. Occup. Hyg., 37(5), 525-540.

YAGÜE, J.I., YAGÜE, A. 2008. *Guía práctica de productos fitosanitarios 2008*. 3ª Edición, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, p. 414.

YING, G.G., WILLIAMS, B. 1999. *Herbicide residues in grapes and wine*. J. Environ. Sci. Health B, 34(3), 397-411.

YOSHINO, H., KANEKO, H., NAKATSUKA, I., YAMADA, H. 1995. *Metabolism of pyriproxyfen. 2. Comparison of in vivo metabolism between rats and mice*. J. Agric. Food Chem., 43(10), 2681-2686.

YOSHINO, H., KANEKO, H., NAKATSUKA, I., YAMADA, H. 1996. *Metabolism of pyriproxyfen. 3. In vitro metabolism in rats and mice*. J. Agric. Food Chem., 44(6), 1578-1581.

YUDELMAN, M., RATTA, A., NYGAARD, D. 1998. *Una visión de la alimentación, la agricultura y el medio ambiente en el año 2020. El control de plagas y la producción de alimentos: una mirada hacia el futuro*. En: Resumen 2020, nº 52. Ed. International Food Policy Research Institute, Washington, DC, USA, p. 1.

ZHANG, L.Z., WANG, H.F., MO, H.H. 1991. *Radiotracer study on mancozeb residues in tomato plants*. Biomed. Environ. Sci., 4(4), 409-414.

ZROSTLIKOVA, J., HAJŠLOVA, J., KOVALCZUK, T., STEPAN, R., POUSTKA, J. 2003. *Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry*. J. AOAC Int., 86(3), 612-622.