

# Metodología de cuantificación de residuos de fungicidas en granos de trigo

Ajuste de metodología para cuantificación de residuos de fungicidas para el control de fusariosis de la espiga

Foto: Carolina Francia

## Carolina Francia

Ayudante de investigación fitopatología, Dpto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.  
carofranciabent@gmail.com

## Carlos A. Pérez

Ing. Agr. MSc., PhD., Profesor Agregado, Fitopatología, Dpto. Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.  
caperez@fagro.edu.uy

## Cintia Palladino

Ing. Agr. MSc. Polo de Desarrollo Universitario Abordaje Holístico impactos de los agroquímicos, Cenur Litoral Norte, Udelar, EEMAC.  
cintiapalladino@fagro.edu.uy

## Lucas Martella

Departamento de Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.  
lucasmartella93@gmail.com

## Matías Passarino

Departamento de Protección Vegetal, Fagro, EEMAC.  
matipassarino@gmail.com

## Paula Fernández

Grupo de Análisis de Compuestos Traza, Departamento de Química del Litoral, Cenur Litoral Norte, Udelar.  
paula.fernandez@utec.edu.uy

## Lucía Pareja

Polo de Desarrollo Universitario Abordaje Holístico impactos de los agroquímicos, Cenur Litoral Norte, Udelar EEMAC. Grupo de Análisis de Compuestos Traza, Departamento de Química del Litoral, Cenur Litoral Norte, Udelar.  
pareja.lucia@gmail.com

## 1. INTRODUCCIÓN

La fusariosis de la espiga (FE), es causada principalmente por *Fusarium graminearum*. Es considerada una de las enfermedades más importantes en el cultivo de trigo por las pérdidas que genera tanto en rendimiento como en la calidad del producto a obtener, principalmente debido a la generación de micotoxinas que llegan a los subproductos (Goswami y Kistler, 2004). Existen reportes regionales de pérdidas de rendimiento de hasta un 50% (Ramírez *et al.*, 2004) y dado que ha sido reportada en América del Norte, Asia, Europa y América del Sur, se la ha considerado una amenaza al suministro mundial de alimentos (Goswami y Kistler, 2004). El síntoma característico en espiga es una decoloración de las espiguillas infectadas. Se puede observar la presencia de signo como masas de esporas rosado-salmón y eventualmente, estructuras oscuras (peritecios) al momento de la cosecha (Díaz de Ackermann *et al.*, 2002; Figura N° 1).



Figura N° 1. Síntoma de fusariosis de la espiga en trigo

Esta enfermedad, ha sido favorecida por los cambios recientes de la agricultura en Uruguay. La menor diversificación de la secuencia de los cultivos en agricultura continua sin laboreo, baja importancia relativa de la rotación con pasturas y la menor diversidad de especies y cultivos explotados (Pérez *et al.*, 2011), provoca mayor cantidad de rastrojo en superficie, favoreciendo a microorganismos que sobreviven en el mismo, como lo es *Fusarium graminearum* (Pérez *et al.*, 2009). El escenario es un aumento del riesgo de ocurrencia de FE.

Además de las pérdidas económicas que genera, la importancia de la enfermedad en trigo y cebada radica en que, dado que no se dispone de una medida de manejo de gran impacto, es de muy difícil control (Goswami y Kistler, 2004). Esto sumado a la baja resistencia genética en los genotipos actuales, la fuerte influencia ambiental y el inóculo externo (no limitante), hacen que la forma más adecuada para minimizar los daños y lograr una mayor eficiencia de control en los cultivos sea el manejo integrado (Mazzilli *et al.*, 2007).

Dentro de los controles más adecuados, se encuentran la diversificación de la fecha de floración (Hoffman *et al.*, 2003; Pérez, 2004), la resistencia genética de los cultivares (Díaz de Ackermann *et al.*, 2002), la correcta planificación de la rotación de cultivos (Pérez, 2004) y la aplicación de fungicidas, siendo esta última la medida de manejo más utilizada.

Para la FE, el control químico debe realizarse de forma preventiva, previo al momento de infección, ya que no hay control curativo eficiente (Reis y Carmona 2002, Moschini *et al.* 2003, Pérez 2004). Los antecedentes de control químico

indican que en general la eficiencia de control es baja a intermedia, debido principalmente al corto período para la aplicación del fungicida en el momento adecuado, ya que las condiciones de lluvia que favorecen la enfermedad limitan la oportunidad de aplicación (Díaz de Ackermann *et al.*, 2002, Pereyra 2013). A su vez, una vez aplicados los fungicidas, necesitan tiempo para degradarse, por lo que, al momento de la cosecha, aún pueden haber residuos de éstos en los granos (Strada *et al.*, 2012). La presencia de dichos residuos podría perjudicar la salud de los consumidores además de la calidad del grano, generando consecuencias sobre el valor agregado y las exportaciones, ya que los mercados internacionales poseen regulaciones cada vez más estrictas en cuanto a las concentraciones máximas de fungicidas en alimentos (Guerrero 2003, Gravilescu 2005).

En este marco y dada esta creciente problemática, este trabajo tuvo por objetivo validar una metodología para la determinación de residuos de los fungicidas más utilizados para el control de esta enfermedad en grano de trigo.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Selección de las metodologías analíticas

Para el ajuste del método analítico, se seleccionaron los principios activos más utilizados y recomendados para el control de FE, carbendazim, epoxiconazol, metconazol y tebuconazol (Pereyra 2013).

Al no contar con antecedentes de métodos para los cuatro principios activos seleccionados en grano de trigo, se partió de una metodología multi-residuo denominada QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) que se ajusta adecuadamente para la detección de residuos de fitosanitarios en cereales (Pareja 2012, Strada *et al.*, 2012).

Este método tiene la ventaja de que permite analizar un gran número de analitos simultáneamente, además de que utiliza una baja cantidad de muestra, de reactivos y solventes por lo tanto es rápida, sencilla, y menos nociva para el medio ambiente (Anastassiades *et al.*, 2003).

Por lo tanto, a partir de esta metodología se plantearon seis modificaciones basadas principalmente en variaciones en cuanto a la cantidad de muestra, tipo de solvente, tipo de sales utilizadas, tiempo de agitación, entre otros (Figura 2).

Todas las metodologías evaluadas constan de cuatro etapas:

1. la preparación de la muestra donde se muelen los granos hasta llegar a una granulometría similar a la harina
2. una etapa de extracción con un solvente orgánico y sales apropiadas para realizar el proceso de *salting-out*, donde se remueven los fungicidas de interés de los componentes mayoritarios de la matriz (grano de trigo)
3. una etapa de purificación (*clean-up*) que consiste en la eliminación de co-extractivos de la matriz que podrían provocar interferencias durante el análisis cromatográfico. Este proceso consistió en la remoción de los lípidos de la matriz mediante *freeze-out* y una posterior etapa de dispersión en fase sólida de la matriz con adsorbentes apropiados para eliminar otras posibles interferencias
4. una última etapa de análisis instrumental mediante un cromatógrafo de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem (HPLC-QqQ-MS) que ofrece una elevada selectividad y sensibilidad (Pareja, 2012)

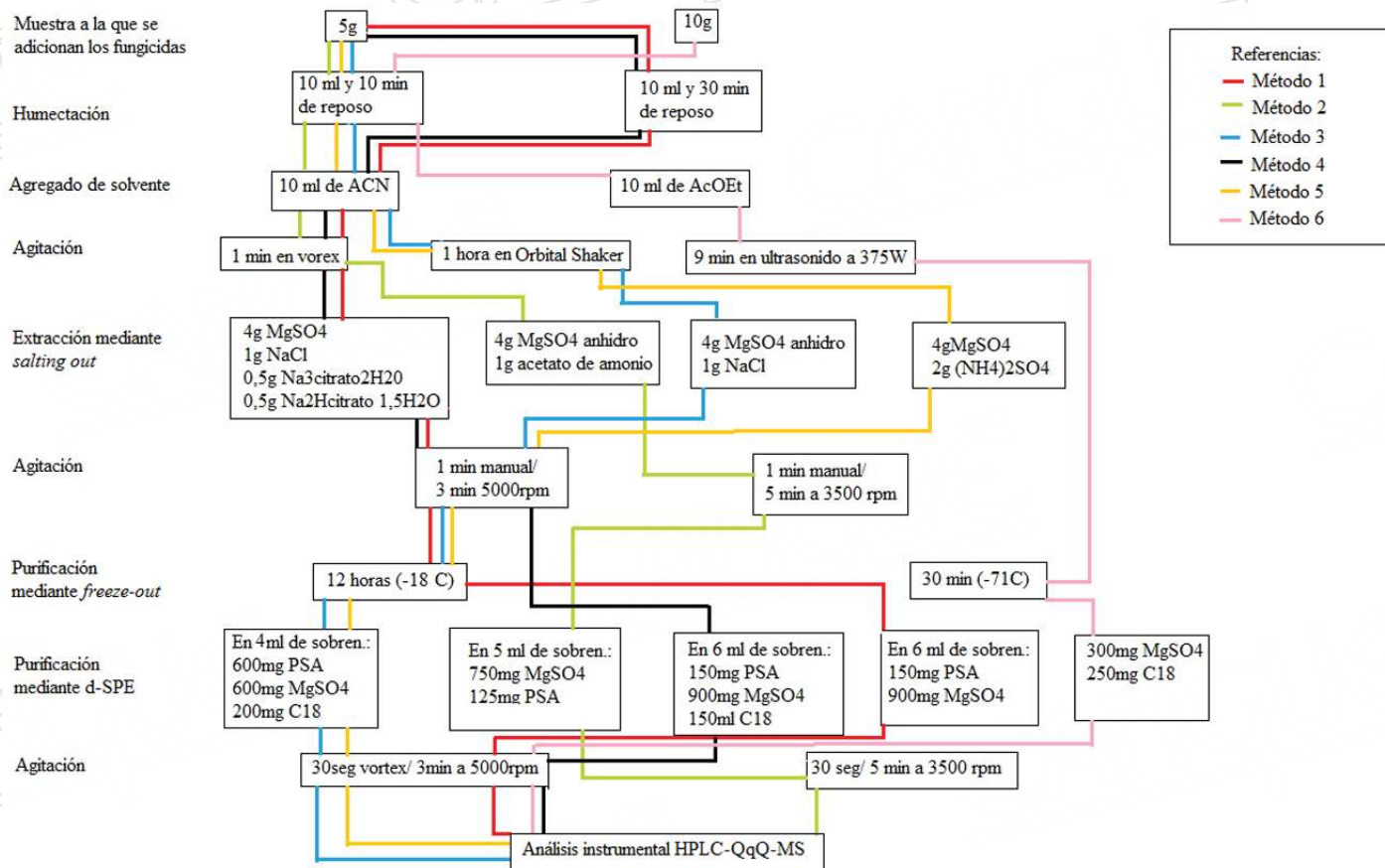


Figura N° 2. Metodologías ensayadas para la detección y cuantificación de residuos

### 3. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Una vez seleccionadas las mejores metodologías se realizó la validación de los métodos, es decir, la verificación de la idoneidad de los mismos (FAO, 1993a) la cual es una exigencia de organismos nacionales e internacionales. La validación se realizó mediante la evaluación de una serie de parámetros que describe DG-SANTE (2016) tales como precisión, exactitud, linealidad, límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y efecto matriz. Estos parámetros permiten asegurar que el método es adecuado para el fin propuesto.

#### 3.1. Precisión y exactitud

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones establecidas. Este parámetro se evaluó mediante la repetitividad,

que implica la determinación de los porcentajes desviación estándar relativa (% RSD). El criterio de aceptación para la técnica de QuEChERS fue que los valores de % RSD fueran  $\leq 20\%$  como establece el documento (DG-SANTE, 2016).

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado experimental y el valor de referencia aceptado (valor real). En este caso se evaluó la exactitud mediante el estudio de la veracidad, que implica la determinación de los porcentajes de recuperación del método (% Rec). Según los criterios de la DG-SANTE un método cumple los requisitos cuando los %Rec se encuentran en el rango 70-120%.

La muestra utilizada para la validación de la metodología fue una muestra de trigo testigo (sin aplicación de fungicida) que fue cosechada el 7 de diciembre del 2015.

Dos de los seis métodos evaluados (método 3 y 5) presentaron valores dentro de los rangos de aceptación establecidos por la DG-SANTE (2016), por lo tanto fueron los seleccionados para continuar con las otras evaluaciones (Cuadro N° 1).

		Carbendazim		Epoconazol		Metconazol		Tebuconazol	
Mét.	Rep.	%Rec.	%RSD	%Rec.	%RSD	%Rec.	%RSD	%Rec.	%RSD
3	1	80	13	76	21	69	9	72	11
5	2	82	7	88	13	117	17	108	10

Cuadro N° 1. Porcentaje de recuperación y porcentaje de desviación estándar para las repeticiones realizadas para el método 3 y 5

Compuesto	R <sup>2</sup>					Ecuación de la recta
Carbendazim	0,999					$y = 1628x + 16557$
Epoxiconazol	0,999					$y = 9E06x + 6E07$
Metconazol	0,998					$y = 3560x + 12702$
Tebuconazol	0,999					$y = 15653x + 18667$
	Residual %					
Compuesto	5 µg/kg	10 µg/kg	20 µg/kg	100 µg/kg	250 µg/kg	
Carbendazim	19,6	8,9	4,0	0,0	0,6	
Epoxiconazol	18,7	8,9	4,0	0,1	0,6	
Metconazol	19,5	9,0	3,9	0,1	0,6	
Tebuconazol	19,3	9,0	3,9	0,0	0,6	

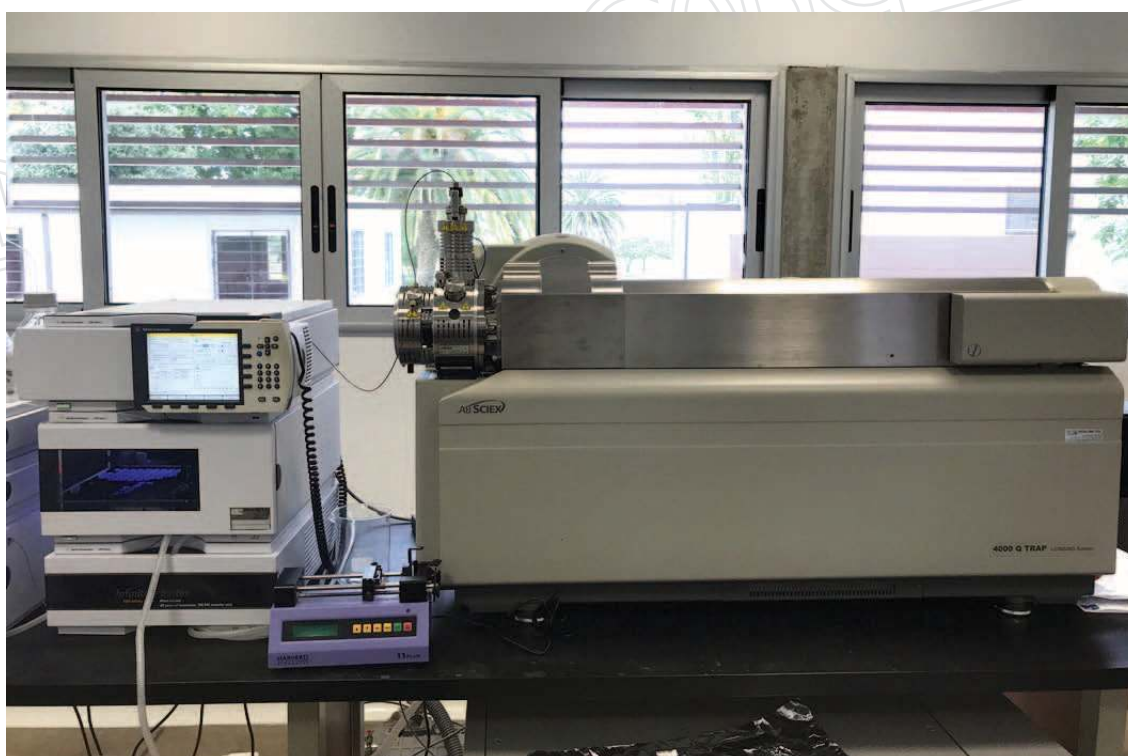
Cuadro N° 2. Linealidad de los compuestos seleccionados

### 3.2. Linealidad

La linealidad es la habilidad del método de obtener resultados experimentales (en un determinado rango) proporcionales a la concentración del analito. Este parámetro se evaluó para cada uno de los compuestos de interés tanto en solvente como en matriz. Los valores de aceptación que establece la DG-SANTE (2016) son coeficiente de determinación mayor a 0,99, valores de residuales  $\leq 20\%$  (valor absoluto) e inspección visual. Para los dos métodos evaluados, todos los compuestos del estudio presentaron comportamiento lineal en el rango 5 a 250 µg/kg, tal como se observa en el Cuadro N° 2.

### 3.3. Efecto matriz

El efecto matriz (EM) es la influencia de uno o más componentes de la muestra detectados durante la medición de la masa o concentración de un analito, se observan como un aumento o disminución de la respuesta del detector, en comparación con la producida por soluciones en disolvente (Hajšlová y Zrostlíková, 2003). Este parámetro se evaluó mediante la determinación de las curvas de calibración en solvente y en matriz. A partir de las pendientes se calculó  $((\text{Pendiente en Matriz} / \text{Pendiente en solvente}) - 1) * 100$ . Por definición se establece que si el valor absoluto de este cálculo



Espectrofotómetro de masas disponible en la EEMAC para determinación de residuos de agroquímicos en grano. Foto: Lucía Pareja

Fungicida	Método 3 LOQ (µg/kg)	Método 5 LOQ (µg/kg)	LMR (µg/kg)	Fuente
Carbendazim	20	10	50	FAO (2016)
Epoxiconazol	100	10	600	Unión Europea (2016)
Metconazol	20	100	150	Unión Europea (2016)
Tebuconazol	20	100	100	Unión Europea (2016)

Cuadro N° 3. LOD y LOQ para cada principio activo, en los dos métodos evaluados vs. LMR.

estaba comprendido entre el rango de 0 a 20 se considera que no hay EM, si el valor absoluto está en el rango de 20 a 50 se considera que hay EM moderado y si es mayor a 50 se considera que es EM alto. Asimismo si el EM es positivo

es aumento de la señal, mientras que si el valor es negativo se considera que hay supresión de la señal (Hajšlová y Zrostlíková, 2003).

El compuesto que tuvo mayor EM fue el metconazol, con 83% en el método 5 y -41% en el método 3. La presencia de EM puede llevar a errores de subestimación o sobreestimación de la concentración de residuos de fungicidas durante la cuantificación. Por esto es necesario en caso de que exista EM realizar la cuantificación con curvas de calibración preparadas en extracto de matriz.

### 3.4. Límite de detección y cuantificación

Estos parámetros se definen como la mínima concentración o masa del analito que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión adecuada (media de recuperación para cada producto representativo en el rango de 70 a 120%, con una RSD ≤ 20%). Lo ideal es que una metodología sea capaz de detectar y cuantificar residuos en concentraciones menores o iguales al límite máximo de residuos (LMR) establecidos por los organismos internacionales (Cuadro N° 3).

Los valores de LOD y LOQ obtenidos fueron para todos los fungicidas en el método 3 menores a los valores de LMRs establecidos por la Unión Europea y el *Codex Alimentarius* cumpliendo de esta forma con los lineamientos establecidos. Por su parte el método 5 para los fungicidas carbendazim, epoxiconazol y metconazol también presenta valores de LOD y LOQ menores a los LMR, sin embargo para tebuconazol los valores de LOD y LOQ son iguales a los LMR (100 µg/kg).




Vista del ensayo parcelario a campo. Cultivo en espigazón, aproximándose al período de mayor susceptibilidad a la fusariosis de la espiga. Foto: Carolina Francia



## 4. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Se validaron dos métodos para la cuantificación de residuos de fungicidas; estos cumplieron con los criterios establecidos por la guía DG-SANTE (2016) respondiendo así a las exigencias de la Unión Europea y *Codex Alimentarius* para el análisis de residuos de fungicidas.

El desarrollo de estos métodos analíticos es la base para poder sumar a las eficiencias de control de los fungicidas, su benevolencia con el ambiente, al permitir posteriores evaluaciones de los residuos de fungicidas en grano de trigo en distintos manejos.

Aplicando estas metodologías se podrá corroborar si el grano de trigo producido bajo diferentes sistemas productivos cumple con los LMR exigidos por los organismos internacionales. 

Espiga de trigo con evidente infección por *Fusarium* resultando en fusariosis de la espiga. Las espiguillas amarilladas representan las espiguillas donde ocurrió la infección, mientras que las apicales verde pálidas se encuentran senescentes por bloqueo de la infección en el raquis, muriendo y cortándose el llenado aún sin haber sido infectadas.  
Foto: Carolina Francia

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Anastasiades, M.; Lehotay, S.; Štajnbaher, D.; Schenck, F.** 2003. Método multiresiduo rápido y fácil que emplea extracción / partición de acetonitrilo y "extracción en fase sólida dispersiva" para la determinación de residuos de pesticidas en productos. *Revista internacional AOAC*. 86(2):412-431.

**Díaz de Ackermann, M.; Pereyra, S.; Stewart, S.; Mieres, J.** 2002. Fusariosis de la espiga en trigo y cebada. (en línea). Montevideo, Uruguay, INIA. s.p. Consultado 17 nov. 2016. Disponible en [http://inia.inia.org.uy/novedades/art%EDculo\\_micotoxinas.htm](http://inia.inia.org.uy/novedades/art%EDculo_micotoxinas.htm)

**Comisión Europea. DG SANTE (Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria, BE).** 2016. Procedimientos analíticos de control de calidad y validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. (en línea). Bruselas. 46 p. Consultado 17 nov. 2016. Disponible en [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides\\_mrl\\_guidelines\\_wrkd\\_11945.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkd_11945.pdf)

**FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT).** 1993a. Directrices sobre buenas prácticas de laboratorio en el análisis de residuos de plaguicidas CAC/GL 40-1993. Roma. 41 p.

**FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT).** 2016. *Codex Alimentarius*; manual de procedimiento. 25ª. ed. Roma. 275 p.

**Gavrilescu, M.** 2005. Destino de los plaguicidas en el medio ambiente y su biorremediación. *EngineEring in LifeSciences*. 5(6):497-526.

**Goswami, R.; Kistler, H.** 2004. Rumbo al desastre: *Fusarium graminearum* en cultivos de cereales. *Molecular Plant Pathology*. 5(6):515-525.

**Hajšlová, J.; Zrostlíková, J.** 2003. Efectos de la matriz en el análisis (ultra) traza de residuos de plaguicidas en alimentos y matrices bióticas. *Revista de cromatografía*. 1000 (1-2):181-197.

**Hoffman, E.; Ernst, O.; Benitez, A.; Borghi, E.** 2003. Fecha De floración: efecto de la elección de variedades y su época de siembra. *Cangüé* no. 24: 20-22

**Mazzilli, S.; Pérez, C.; Ernst, O.** 2007. Fusariosis de la espiga en trigo; características de la enfermedad y posibilidades de uso de modelos de predicción para optimizar el control químico. *Agrociencia* (Montevideo). 6(1):11-21

**Mazzilli, S.; De Galich, M.; Annone, J.; Polidoro, O.** 2003. Enfoque fundamental empírico para estimar la evolución del índice de *Fusarium* en trigo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias (RIA)*. 31(3):39-53.

**Pareja, L.** 2012. Estudio de residuos de pesticidas en cultivos de arroz de Uruguay por métodos analíticos modernos y evaluación de procesos fotoquímicos para la remediación de aguas de campo. Tesis Doc. Qui. Montevideo, Uruguay. Facultad de Química. 367 p.

**Paullier, J.; Núñez, S.; Arboleja, J.; Leoni, C.; Maeso, D.** 2005. Producción integrada en Uruguay. *Revista INIA*. no. 3: 21-25

**Pérez, C.** 2004. Manejo sanitario de cereales de invierno; algunas consideraciones epidemiológicas frente a la próxima zafra. *Cangüé*. no. 25: 34-38.

**Pérez, C.; Carameso, L.; Fros, D.; Cadenazzi, M.; Ernst, O.** 2009. Manejo sanitario en sistemas sin laboreo; agrónomos o nutricionistas? In: Simposio Nacional de Agricultura de Secano (1º, 2009, Paysandú, Uruguay). Agricultura de secano. Paysandú, Facultad de Agronomía. EEMAC. pp. 141-160.

**Pérez, C.; Hoffman, E.; Viega, L.; Villar, H.; Ernst, O.** 2011. Manejo de enfermedades en sistemas agrícolas: mitos y realidades. In: Simposio Nacional de Agricultura (2º, 2011, Paysandú, Uruguay). Agricultura de secano. Paysandú, Facultad de Agronomía. EEMAC. p. 14.

**Ramírez, M.; Chulze, S.; Magan, N.** 2004. Impacto de factores ambientales y fungicidas en el crecimiento y la producción de deoxinivalenol por aislados de *Fusarium graminearum* a partir de trigo argentino. *CropProtection*. 23(2):117

**Reis, E.; Carmona, M.** 2002. Fusariosis del trigo; biología, epidemiología y estrategias para su manejo. Buenos Aires, Gráfica Condal. 26 p.

**Strada, J.; Ricca, A.; Conles, M.; Silva, M.; Rojas, D.; Casini, C.; Piatti, F.; Martínez, M.** 2012. Evaluación de residuos de plaguicidas en granos de maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) posterior a la aplicación en el almacenamiento y en el campo. *Interciencia*. 37(6):412-417.

**UE (Unión Europea). Parlamento Europeo (BE); UE. Consejo Europeo (BE).** 2005. Reglamento No. 396/2005. (en línea). Estrasburgo. 16 p. Consultado 17 nov. 2016. Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0396&from=ES>