

CUANTIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS E INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA APLICACIÓN DE CLORPIRIFOS EN HUERTO DE MANZANO EN EDAD TEMPRANA

QUANTIFICATION OF WASTE AND UNCERTAINTY ASSOCIATED TO THE APPLICATION OF CHLORPYRIFOS IN APPLE ORCHARD IN EARLY AGE

JULIO JUNOD MONTANO¹, ALEJANDRA CONTRERAS FERNANDEZ¹,
MARIA PIA GIANELLI BARRA¹, MARCO SANDOVAL ESTRADA²

¹Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias de la Salud y los Alimentos, Universidad del Bío-Bío, Avda. Andrés Bello S/N, Chillán, jjunod@ubiobio.cl

²Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Campus Chillán, Avda. Vicente Méndez 595, Chillán.

RESUMEN

El insecticida Clorpirifos ha tenido últimamente restricciones en su aplicación, principalmente por la alta incidencia sobre el ser humano por este tipo de insecticida fosforado (exposiciones-intoxicaciones). El presente estudio tiene como objetivo mostrar la variabilidad de los residuos en frutos y hojas, en un huerto de manzanos en edad temprana, integrando un sistema que, por lo general, se aborda a través de la cuantificación del impacto de la aplicación de este insecticida sobre los frutos. Para el seguimiento, se utilizó una hilera de 7 árboles, donde se aplicó en forma manual Losban 50% WP. Se utilizó el micrométodo de extracción y se cuantificó la concentración de pesticida en los distintos tiempos por GC con detector FID. El promedio del coeficiente de variabilidad (Cv) presentó un 61,8% para frutas y 45,0% en hojas. Se demostró que el muestreo de los frutos planteado en el experimento es el de mayor fuente de incertidumbre (99,2%). Se discute la vida media ($t_{1/2}$) para los frutos y hojas, dividiendo el período en estudio en dos fases. El micrométodo de extracción experimental permite un mayor ahorro de tiempo y materiales, demostrando ser eficaz en la extracción de pesticida de las matrices estudiadas. Se plantea como poco probable describir con una relación matemática simple la persistencia de los residuos de clorpirifos, considerando los diversos procesos químicos, físicos y bioquímicos asociados a nivel de los dos elementos en estudio.

Palabras clave: Insecticida, degradación, incertidumbre.

ABSTRACT

Chlorpyrifos has been subject to use restrictions due to the high impact this phosphorus pesticide has on human health (exposures-poisonings). The present study aims to show the variation of pesticide residues in the fruit and leaves of a young apple orchard by integrating a system that, in general, quantifies the impact of pesticide application on the fruit. A row of 7 trees was used to monitor, where Losban 50% WP was applied by hand. A micromethod was used to extract residues and pesticide concentration was quantified at different times by gas chromatography using a flame ionization detector (FID). The coefficient of variation (Cv) was 61.8% in fruit and 45.0% in leaves. Fruit sampling conducted in this experiment was shown to be the one with the highest source of uncertainty (99.2%). Half-life ($t_{1/2}$) was studied for fruit and leaves, dividing the study period into two phases. The micromethod of experimental extraction allows greater savings in time and materials and proved effective in pesticide extraction from the studied matrices. It is

unlikely to describe the persistence of chlorpyrifos residues by a simple mathematical relationship since there are several chemical, physical and biochemical processes associated to the two elements under study.

Keywords: pesticide, degradation, uncertainty.

Recibido: 04.11.11. Revisado: 16.11.11. Aceptado: 23.11.11.

INTRODUCCIÓN

Un ensayo supervisado de residuos es definido por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) como un estudio científico en el cual un plaguicida es aplicado a cultivos o sobre animales según las condiciones especificadas que reflejen prácticas comerciales, después de lo cual los productos comestibles son cosechados en intervalos sucesivos y variables para analizar la presencia de residuos y así poder construir una curva de degradación. Las prácticas de manejo del cultivo y la aplicación de los plaguicidas se hacen según las condiciones existentes o propuestas en las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) (FAO, 1981; González, 1988; Curkovic, 1996).

El clorpirifos (CHP), cuya composición corresponde químicamente al Tiofosfato de *0,0*- dietilo y *0*- 3,5,6- tricloro -2- piridilo, es un compuesto aplicado generalmente a cultivos hortofrutícolas por ser un insecticida de amplio espectro, el cual ha causado discusiones acerca de su presunta contaminación tanto en el medio ambiente como en el hombre. Por otro lado, enfrenta una probable reducción de su actual límite máximo de residuo (LMR) asignado por la Environmental Protection Agency US (EPA) (1,5 ppm; expresado como residuo de clorpirifos y su metabolito), probablemente a su límite de detección: 0,01 ppm) (González, 2002).

Se estima que la Región del Biobío utiliza sobre 20 toneladas al año de insecticidas (SAG, 2006). Por lo tanto, es recomendable el uso de técnicas analíticas que extraigan

el ingrediente activo (IA), sin interferir su cuantificación (Arias-Estévez *et al.*, 2008). En orden prioritario, para una misma combinación plaguicida/cultivo, el resultado analítico de una curva de disipación, después de la última aplicación, depende de diferentes factores como dosis empleada, tipo y estado fenológico del cultivo (Riccio, 2006), formulaciones comerciales, número de aplicaciones, y mínimo número de ensayos. La mayor incertidumbre de los resultados corresponde al muestreo; según Ambrus y Lantos (2002), éste es de un 80-90%. Otros autores, señalan una variabilidad de 49 % para frutos y 71% para hojas, concluyendo que debería considerarse el muestreo estratificado sobre la base de estructurar zonalmente los árboles (Xu *et al.*, 2006).

El micrométodo de extracción, según Stainwanter (1990), permite un mayor ahorro de tiempo, materiales. Sin embargo, considerando la incertidumbre asociada, desde la aplicación, toma de muestra, métodos analíticos, entre otros, hacen que los ensayos supervisados no aseguren evidenciar el comportamiento e impacto de los residuos de plaguicidas. En el presente estudio permite determinar la variabilidad de los residuos de CHP en frutos y hojas, integrando un sistema que, por lo general, se aborda a través de la cuantificación del impacto de los residuos sobre los frutos.

MATERIALES Y MÉTODO

Se trabajó en un huerto experimental de manzanas, con la variedad Scarlet, de la

Universidad de Concepción, Campus Chillán. El huerto es de 3 ha y de 9 años. Los árboles del huerto están formando bloques de 5 por 3 m. Para el seguimiento se utilizó una hilera con 7 árboles. Se estableció una segunda hilera, como zona control, la que no recibió el tratamiento. Se aplicó Lorsban 50% WP, mediante máquina a pistón manual, según lo recomendado por la Asociación Nacional de Fabricantes e Importadores de Productos Fitosanitarios (AFIPA, 1998) y las BPA para el producto en estudio, durante el período de crecimiento del fruto temprano (Octubre–Noviembre del 2004).

Las muestras compuestas de manzana y hojas se levantaron en los tiempos 0 (dos horas después de la aplicación), 4, 7, 11 y 14 días posterior a la incorporación del pesticida, según Ambrus y Lantos (2002). Los sitios de muestras fueron seleccionados aleatoriamente.

Las muestras compuestas se formaron con 12 unidades de manzanas y 30 unidades de hojas, las que se extrajeron de seis segmentos imaginarios en los que se dividió cada árbol (alto interior, alto exterior, medio interior, medio exterior, bajo interior y bajo exterior). De cada segmento se sacaron dos unidades de manzanas y 5 unidades de hojas, de un total de 7 árboles (previamente aleatorizados), marcando el lugar de extracción. Para obtener muestras sucesivas de los diferentes tiempos, éstas fueron obtenidas de los alrededores de la marca. Por lo tanto, se extrajeron 35 muestras totales (7 árboles x 5 tiempos x 1 matriz).

Las muestras se envasaron en bolsas de polietileno y se trasladaron al laboratorio en un período no mayor a una hora, y se sometieron a enfriamiento profundo y se mantuvieron a -18°C. Se molió y homogenizó una muestra equivalente a 1 kg de frutos, y 30 unidades de hojas en una picadora o en una procesadora de alimentos (Moulinex (R)). Se pesó 5g de muestra y se

traspasan a un tubo de centrifuga de 50 ml. Se agregó 20 mL de una mezcla de acetona/diclorometano (1:1) y 2 g de NaCl. Se agitó con homogenizador Ultraturrax (Jankel & Kunkel (R)), durante 1 minuto exacto, medido con cronómetro. Se centrifugó a 3200 rpm (Hettich (R)), durante 5 minutos. Se colocó el extracto orgánico en vaso de 50 ml con barra magnética. Se agregó 2 g de Na₂SO₄ anhidro y se agitó con agitador magnético (Colors Quid (R)) durante 5 minutos. Se dejó en reposo durante 2 a 5 minutos hasta que aclare la fase orgánica. Se tomó una alícuota de 10 mL equivalente a 2,5 g de muestra. Se colocó en un balón de 50 mL, esmerilado, de forma cónica. Se redujo el volumen en evaporador rotatorio al vacío (Heidolph (R)), a 40°C hasta 0,5mL. Se agregó 5mL de acetona y concentró nuevamente. Se repitió la operación dos veces. Se transfirió el residuo a un tubo graduado de 2 mL con pipeta Pasteur (con goma), se lavó con acetona hasta completar el volumen de 2 mL. Se inyectó 1 µL de la muestra en las condiciones indicadas para el cromatógrafo. Se cuantificó contra un estándar, inyectando tres veces en forma alternada con la muestra.

Para la identificación y determinación cuantitativa del IA se utilizó un cromatógrafo Carlo Erba con detector NPD y columna capilar SGE 25QC5/BP5-1.0 de 25 m y 0.53 mm ID. Se determinó el coeficiente de variación total para determinar la incerteza de los resultados, del procesamiento, y del análisis cromatográfico, según los estudios de Ambros y Lantos (2002), además de la validación de la metodología, según Stainwanter (1990).

Se calculó la vida media del compuesto, mediante la fórmula: $C_t = C_0 \times e^{-kt}$ (Montemurro *et al.*, 2002). Donde: C_t = Concentración de CHP en un tiempo t; C_0 = Concentración de CHP en el tiempo inicial; k = tasa de disipación en días; t = tiempo de postaplicación.

RESULTADOS

Evaluación de las curvas de declinación para fruto

Se observó que la variación de los resultados distorsiona las tendencias de los cam-

bios que presentan los residuos, como se aprecia en la Tabla I, donde los resultados destacados en negrita presentan valores superiores a las mediciones previas, llegando a un número de 9 resultados, con un coeficiente de variación (Cv) de 61%.

Tabla I. Concentración de CHP de las 7 muestras compuestas de manzanas (ppm) a través del tiempo (días) y su coeficiente de variabilidad (Cv).

Tiempo (días)	Árbol 1	Arbol 2	Arbol 3	Arbol 4	Arbol 5	Arbol 6	Arbol 7	Promedio	C _v
0	3,029	2,445	0,563	0,481	0,712	1,893	2,903	1,649	0,53
4	0,991	0,657	0,653	0,671	0,209	0,630	0,903	0,673	0,34
7	0,189	0,438	0,178	0,125	0,260	0,138	0,763	0,290	0,73
11	0,108	0,197	0,238	0,311	0,177	0,077	0,806	0,273	0,83
14	0,363	0,284	0,109	0,093	0,181	0,072	0,480	0,226	0,64
Cv promedio 0,61									

Las variaciones de las concentraciones de CHP en manzana, en los 7 sitios, se pueden representar matemáticamente a través de curvas de declinación, donde el mejor

ajuste se expresa en los sitios con una expresión del tipo polinómica, con los coeficientes de determinación que reflejan las correlaciones respectivas (Tabla II).

Tabla II. Ecuaciones Características de las curvas de declinación del CHP de manzanas en los 7 árboles y promedio.

Árbol	Ecuación característica	Coficiente correlación r ²	Tendencia	orden
	$y=a+bx^{1.5}+cx^2+dx^{2.5}$	0,999	P	2,5
2	$y=a+bx+cx^3+dx^{0.5}$	0,998	P	3
3	$y= a+bx+cx^{1.5}+dx^{0.5}$	0,858	P	1,5
4	$y=a+bx+cx^{1.5}+dx^{0.5}$	0,674	P	1,5
5	$y=a+bx+cx^{1.5}+dx^{0.5}$	0,983	P	1,5
6	$y=a+bx^{1.5}+cx^2+dx^3$	0,999	P	3
7	$y=a+bx^{2.5}+cx^3+dx^{0.5}$	0,999	P	3
Promedio en frutos	$y=a+bx^{1.5}+cx^{2.5}+dx^3$	0,999	P	3

P: tendencia polinómica.

Evaluación de las curvas de declinación de CHP para hojas

Los resultados para hojas (Tabla III) muestran un decrecimiento continuo del nivel

de residuos de CHP, similar a los observados en frutos de manzanas. Presentan sólo 3 valores destacados en negrita, superiores a las mediciones previas, el Cv alcanza un valor de 45%.

Tabla III. Datos de concentración de CHP de las 7 muestras compuestas de hojas (ppm) a través del tiempo (días) y su coeficiente de variabilidad (Cv).

Tiempo (días)	Árbol 1	Arbol 2	Arbol 3	Arbol4	Arbol 5	Arbol 6	Arbol 7	Promedio	C _v
0	20,600	15,260	45,280	15,04	16,480	9,440	17,540	19,94	0,58
4	5,676	1,689	3,267	2,453	2,515	2,797	3,000	3,058	0,51
7	0,487	1,116	0,728	0,299	0,337	0,473	0,651	0,584	0,42
11	0,543	0,492	0,708	0,502	0,319	0,820	0,637	0,574	0,25
14	0,224	0,278	0,223	0,362	0,315	0,485	0,196	0,228	0,51
Cv promedio 0,45									

Las variaciones de las concentraciones de CHP en hojas, en los 7 sitios, se pueden representar matemáticamente a través de curvas de declinación, donde el mejor ajuste

se expresa en los sitios con una expresión del tipo polinómica, con los coeficientes de determinación que reflejan las correlaciones respectivas (Tabla IV).

Tabla IV. Ecuaciones Características de las curvas de declinación del CHP de hojas en los 7 árboles y promedio.

Árbol	Ecuación Característica	Coefficiente correlación	tendencia	orden
1	$y = a + bx^{1,5} + cx^2 + dx^3$	0,999	P	3
2	$y = a + bx + cx^{1,5} + dx^{0,5}$	0,999	P	1,5
3	$y = a + bx + cx^{2,5} + dx^{0,5}$	0,999	P	2,5
4	$y = a + bx + cx^{1,5} + dx^3$	0,999	P	3
5	$y = a + bx + cx^{1,5} + dx^2$	0,999	P	2
6	$y = a + bx^{1,5} + cx^{2,5} + dx^3$	0,999	P	3
7	$y = a + bx + cx^{1,5} + dx^{2,5}$	0,999	P	2,5
Promedio en Hojas	$y = a + bx + cx^{1,5} + dx^2$	0,999	P	2

P: tendencia polinómica.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En la evaluación de los residuos de pesticidas, una etapa inicial de seguimiento estaría relacionada con las implicancias asociadas a las metodologías en uso para el control de plagas agrícolas, especialmente cuando se aplican compuestos al sistema, y que podrían impactar en el medio ambiente, ya que la focalización dirigida a una plaga específica es difícil de lograr, como se ha demostrado a través de diferentes estudios, donde la presencia de estos compuestos y sus metabolitos aún es posible de ubicar en sustratos diversos, que no necesariamente son el objetivo (Barra *et al.*, 2001; Palma *et al.*, 2004; Kogan *et al.*, 2007; Woudneh *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2010; Bradford *et al.*, 2010). Es decir, los controles actuales están dirigidos principalmente a medir la eficiencia del IA sobre las plagas y los niveles de residuos en el producto final (Sazo *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009), pero, ¿qué ocurre con los residuos del IA en los otros sustratos ajenos al objetivo principal, al utilizar las metodologías vigentes a nivel de campo? Dentro de este contexto, los residuos medidos en las muestras compuestas de manzanas y hojas se aprecian en las tablas I y III, respectivamente, donde el promedio de C_v presentó un 61,8 y 45,0%, respectivamente; lo que estaría indicando una mayor incertidumbre en los resultados que los obtenidos por Ambrus y Lantos (2002), que para el caso de manzanas presentó un 30%. En el caso de Junod *et al.* (2009), el C_v presenta un valor de 43% en frutos y 39% en hojas, en edad madura del fruto. Esto confirma que a la incertidumbre asociada al muestreo se agregan los factores relacionados a la aplicación del IA, como en este caso, que corresponde a una pulverización manual. Para las muestras de manzanas, se obtuvo un C_v para procesamiento de 7,25% de incerteza, similar al obtenido por Ambrus y Lantos (2002). Sin embar-

go, al calcular la variabilidad total del resultado (C_{v_t}), según Ambrus *et al.* (2002), variabilidad del resultado ($C_{v_R} = 61,8\%$), variabilidad del procesamiento de la muestra ($C_{v_s} = 7,25\%$) y variabilidad del análisis cromatográfico $C_{v_A} = 3,66$, se obtuvo un valor de C_{v_t} de 61,26%, lo que significaría que el muestreo planteado en el experimento es el de mayor fuente de incertidumbre (99,2%), siendo la contribución remanente del procesamiento de muestras y análisis de menos impacto $(61,8-61,26)/61,8 = 0,8\%$. Se esperaba de la metodología utilizada, obtener un grado de incertidumbre para el muestreo entre un 84-90% considerando la propuesta experimentada.

Otros autores señalan una variabilidad de 49% para frutos y 71% para hojas, concluyendo que debería considerarse el muestreo estratificado sobre la base de estructurar zonalmente los árboles (Xu *et al.*, 2006), tal como se realizó en el presente trabajo, es decir, la metodología no aseguraría resultados con menos incertidumbre. Por otra parte, en 11 ensayos supervisados, con muestras que representan a 13 países, se ha encontrado C_v entre un 16 a 38% para muestras compuestas en productos vegetales frondosos, 10 unidades para muestras de tamaño pequeño y 5 unidades para las de tamaño mayor (Ambrus, 2009). Una posible explicación está referida al tamaño de muestra, ya que a través de la simulación se ha visto que, al disminuir el número de frutas, el C_v aumenta considerablemente (Xu *et al.*, 2008).

La $t_{1/2}$ estimada para los frutos y hojas fue de 5,84 y 2,85 días para el primer estudio de 7 días y una vida media $t_{1/2}$ de 9,16 y 5,17 los siguientes 7 días; situación que se vería afectada por la distribución del IA sobre la cutícula y ceras de las manzanas. Para frutos y hojas de manzanos en edad madura, según Junod *et al.* (2009), presentaron una $t_{1/2}$ de 3,5 y 1,3 días; los 7 días posteriores 8,3 y 2,7; siendo más lenta la

degradación en el segundo periodo, similar al presente estudio, lo que pareciera tener un efecto sobre la fotodegradación e incorporación de IA al fruto (Riccio *et al.*, 2006).

La forma de presentación separada de la degradación es propia de sistemas donde se pretende describir en forma más apropiada la disipación en el sustrato requerido (fruto, hojas), a través de modelos matemáticos bifásicos, al procurar mejores ajustes y definición (Montemurro *et al.*, 2002; Magri y Haith, 2009). La curva de declinación de los residuos de frutos y hojas presentan una tendencia polinómica (Tablas II y IV) con un valor de coeficiente de correlación (r^2) de 0,999 en todos los casos, la que estaría influenciada por la relación superficie/volumen, aumentando las probabilidades de exposición al ambiente de los sustratos, principalmente al utilizar una pulverización manual del IA.

El micrométodo de extracción permitió un ahorro de solventes (1/10), con posibilidades de su recuperación. A su vez, muestra un ahorro de tiempo y materiales, presentando alta eficiencia en la extracción del IA de las matrices estudiadas.

Finalmente, se aprecia que es difícil describir con una simple relación matemática la persistencia de los residuos de CHP, el cual está influenciado por procesos químicos, físicos y bioquímicos a nivel de los dos elementos en estudio. Por lo tanto, confirma la necesidad de validaciones metodológicas locales, con un enfoque integrador del sistema de huerto de manzanos.

BIBLIOGRAFÍA

- AFIPA (1998), Manual fitosanitario. 1997-1998. Asociación Nacional de Fabricantes e importadores de Productos Fitosanitarios Agrícolas (AFIPA), Santiago: Imprenta Los Leones. 450-567.
- AMBRUS A. (2009), Estimation of sampling uncertainty for determination of pesticide residues in plant commodities. *Journal of Environmental Science and Health part B* 44(7): 627-639.
- AMBRUS A., LANTOS J. (2002), Evaluation of the Studies on Declination of Residue Pesticides. *Journal Agriculture, Food Chem*, 50 (17): 4846-4851.
- ARIAS-ESTÉVEZ M., E. LÓPEZ-PERIAGO, E. MARTÍNEZ-CARBALLO, J. SIMAL-GÁNDARA, J.C. MEJUTO AND L. GARCÍA-RÍO (2008), The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 123, 247-260.
- BARRA R., POZO K., URRUTIA R. (2001), Plaguicidas organofosforados persistentes en sedimentos de tres lagos costeros y un lago andino de Chile central. *Bol Soc Chil Quim* 46(2): 149-159.
- BRADFORD D.F., HEITHMAR E.M., TALLENT-HALSELL N.G., MOMPLAISIR G.M., ROSAL C.G., VARNER KE, NASH M.S., RIDDICK L.A. (2010), Temporal patterns and sources of atmospherically deposited pesticides in alpine lakes of the Sierra Nevada, California, USA. *Environmental Science and Technology* 44 (12): 4609-4614.
- CAI M.G., QIU C.R., SHEN Y., CAI M.H., HUANG S.Y., QIAN B.H., SUN J.H., LIU X.Y. (2010), Concentration and distribution of 17 organochlorine pesticides (OCPs) in seawater from the Japan sea northward to the Arctic Ocean, *Science China. Chemistry* 53(5): 1033-1047.
- CURKOVIC, T. (1996), Degradación y evaluación de residuos de pesticidas en Chile. *Avances en Sanidad Vegetal de Frutales y Vides. Facultad de Ciencias Agronómicas y Forestales, Universidad de Chile, Santiago, Chile*, pp. 71-73.
- FAO (1981), Orientaciones para la experimentación de residuos de plaguicidas para información de registros y establecimientos de LMRs. *Bol Fitosan* (29): 12-27.
- GONZÁLEZ H. R. (1988), Ensayos supervisados sobre degradación y límites máximos

- de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas de exportación. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 40 p.
- GONZÁLEZ H. R. (2002), "Degradación de Residuos de Plaguicidas en Huertos Frutales en Chile". Universidad de Chile, Serie Ciencias Agronómicas N° 4. Santiago, Chile, 163 p.
- JUNOD J., ZAGAL E., SANDOVAL M., VENEGAS A., CAMPOS J., RAGRIGAN R., BARRA R., VIDAL G. (2009), Variabilidad asociada a la determinación de residuos de clorpirifos al ser aplicado en un huerto de manzanos. *Rev. Cienc. Suelo Nutr.* 9(3): 176-189.
- KOGAN M., ROJAS S., GÓMEZ P., SUÁREZ F., MUÑOZ J.F., ALISTER C. (2007), Evaluation of six pesticides leaching indexes using field data of herbicide application in Casa Blanca Valley. *Water Science and Technology* (56): 169-178.
- MAGRI A., HAITH D. (2009), Pesticide decay in turf: a review of processes and experimental data. *J Environ Qual* (38): 4-12.
- MEYER G.D., KOVALESKI A., VALDEVENITO-SANHUEZA R.M. (2009), Pesticide selectivity used in Apple crops *Neoseiulus bcalifornicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae). *Revista Brasileira de Fruticultura* 31(2): 381-387.
- MONTEMURRO N., GRIECO F., LACERTOSA G., AND VISCONTI A. (2002), Clorpirifos Decline Curves and Residue Levels from Different Commercial Formulations Applied to Oranges. *Journal Agricultural Chem* (50): 5975-5980.
- PALMA G., SÁNCHEZ A., OLAVE Y., ENCINA F., PALMA R. (2004), Pesticides levels in surface waters in agricultural-forestry basin in southern Chile. *Chemosphere* 57: 763-770.
- RICCIO R., TREVISAN M., CAPRI, E. (2006), Effect of surface waxes on the persistence of chlorpyrifos-methyl in apples, strawberries and grapefruits. *Food Addit. Contam.* 23: 683-692.
- STEINWANTER H (1990), Contributions to the on line method for extraction and isolation of pesticide residues and environmental chemicals II. Miniaturization of the on – line method. *Fresenius J Anal Chem* 336, pp. 8-11.
- SAG (2006), Declaración de ventas de plaguicidas agrícolas enero a junio 1999. 2002 Departamento de Protección Agrícola, Subdepartamento Plaguicidas y Fertilizantes. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Santiago, Chile, 140 pp.
- SAZO L., ARAYA J.E., ESPARZA S. (2008), Control of San Jose scale nymphs, *Diaspidiotus perniciosus* (Comstock), on almond and Apple orchards with pyriproxyfen, phenoxycarb, chlorpyrifos, and mineral oil. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68(3): 284-289.
- STEINWANDTER H. (1990), Contribution to the on-line method for extraction and isolation of pesticides residues and environmental chemicals. II Miniaturization of the on-line method. *Fresenius J Anal Chem* 336: 8-11.
- WOUNDNEH MB, OU Z, SEKELA M, TUOMINEN T, GLEDHILL M (2009), Pesticide multiresidues in waters of the lower Fraser valley, British Columbia, Canada. Part II. Groundwater. *J Environ Qual* (38): 948-954.
- XU X.M., WU P.H., THORBEEK P., HYDER K. (2006), Variability in initial deposit in apple trees in space and time. *Pest Management Science* 62(10): 947-956.
- XU X.M., HUO R., SALAZAR J.D., HYDER K. (2008), Investigating factors affecting unit-to-unit variability in non-systemic pesticide residues by stochastic simulation modelling. *Human and Ecological Risk Assessment* 14(5): 992-1006.