

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Προπτυχιακή Διατριβή

«Παρακολούθηση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε μήλα κατά
τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης τους»

Καργάκη Γεωργία

Βόλος, 2013



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Έισ.: 12208/1
Ημερ. Έισ.: 12/12/2013
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΦΠΑΠ
2013
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Παρακολούθηση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε μήλα κατά τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης»

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τσιρόπουλος Νικόλαος
Καθηγητής
(Επιβλέπων)

Νάνος Γεώργιος
Αναπληρωτής Καθηγητής
(Μέλος)

Βέλλιος Ευάγγελος
Επίκουρος Καθηγητής
(Μέλος)

Καργάκη Γεωργία

Βόλος, 2013

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφιερώνεται

Στους πολυαγαπημένους μου γονείς που τόσο με έχουν στηρίξει όλα τα χρόνια των σπουδών μου και που συνεχίζουν να πιστεύουν σε μένα!

Στις αδερφές μου που με στηρίζουν σε ό,τι κι αν κάνω και ιδιαίτερα στη μεγάλη μου αδερφή που αποτελεί φωτεινό παράδειγμα για μένα!

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακή διατριβής αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω το τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος που με δέχτηκε στους κόλπους του και που μου έδωσε τη δυνατότητα να γίνω γεωπόνος.

Θα ήθελα μέσα από αυτές τις λιγοστές γραμμές να εκφράσω ευχαριστίες πρωτίστως στον καθηγητή κ. Τσιρόπουλο Νικόλαο για την πολύτιμη βοήθειά του για να έρθει εις πέρας το πείραμα αυτό.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Νάνο Γεώργιο και τον κ. Βέλλιο Ευάγγελο για το χρόνο που διέθεσαν για την διόρθωση και για τις παρατηρήσεις την πτυχιακής μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα. Ασημίνα Ψύλλου-Παπαδή για την αμέριστη συμπαράσταση της και την πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος και των μετρήσεων.

Τις ευχαριστίες μου επίσης θα ήθελα να εκφράσω στους καλούς μου φίλους Βιβή, Ελένη, Λένα και Μαρίνο για όλη τη συμπαράσταση που είχα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Καρατζιά Αθανάσιο και την κα. Ανανιάδου Σούλα για την πολύτιμη υποστήριξη και την αγάπη που μου έδειξαν όλα αυτά τα δέκα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την οικονομική και ηθική υποστήριξη και για την αγάπη που μου προσέφεραν και την πίστη που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια και όχι μόνο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν: η αξιολόγηση μιας αναλυτικής μεθοδολογίας για τον έλεγχο υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών ουσιών στο μήλο και ιδιαίτερα τεσσάρων ουσιών, τριών εντομοκτόνων (chlorpyrifos-ethyl, deltamethrin και indoxacarb) και ενός μηκυτοκτόνου (boscalid), η παρακολούθηση των υπολειμμάτων των ανωτέρω ουσιών στα μήλα κατά τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης και την καταγραφή της υποβάθμισης τους με το χρόνο καθώς και κατά το στάδιο της ζωής στο ράφι, η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των συνθηκών της ψυχοσυντήρησης (ψυχοσυντήρηση σε ατμόσφαιρα με χαμηλή συγκέντρωση όζοντος και ψυχοσυντήρηση χωρίς όζον) στην υποβάθμιση (απομείωση) των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών ουσιών.

Το πείραμα έγινε σε μήλα της ποικιλίας Granny Smith, από την περιοχή της Ζαγοράς Πηλίου και η ψυχοσυντήρηση τους στις εγκαταστάσεις του Αγροτικού Συνεταιρισμού Ζαγοράς Πηλίου.

Η εφαρμογή έγινε μια ημέρα μετά τη συγκομιδή των μήλων (Οκτώβριος 2012) με εμφύσηση τους σε υδατικό διάλυμα των προαναφερομένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε θερμοκρασία διαλύματος 23-24 °C και για χρονικό διάστημα εμφύσησης 4 min. Το σύνολο των εμφυσισμένων μήλων διαιρέθηκε στα δύο και αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικούς θαλάμους ψυχοσυντήρησης. Η μισή ποσότητα μήλων τοποθετήθηκε σε θάλαμο ψυχοσυντήρησης με ατμόσφαιρα που περιείχε 50-60ppb όζοντος και η άλλη μισή ποσότητα σε κοινό θάλαμο ψύξης (δύο πειραματικές μεταχειρίσεις). Έτσι το πείραμα έχει δύο πειραματικές μεταχειρίσεις, που είναι τα εμφυσισμένα μήλα που διατηρήθηκαν σε απλή ψυχοσυντήρηση (μάρτυρας) και αυτά που διατηρήθηκαν σε ψυχοσυντήρηση σε ατμόσφαιρα όζοντος. Και στις δύο μεταχειρίσεις δεν υπήρξε καμία άλλη μετασυσπλεκτική επεξεργασία στα μήλα του πειράματος στους θαλάμους ψυχοσυντήρησης τους.

Η παρακολούθηση της πορείας των υπολειμμάτων στα μήλα και των δύο μεταχειρίσεων έγινε με ανάλυση μήλων που λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα μετά την εισαγωγή τους στη ψυχοσυντήρηση και για ένα χρονικό

διάστημα περίπου έξι μηνών. Κατά τη δειγματοληψία στις 75, 150 και 180 ημέρες ψυχοσυντήρησης ελήφθησαν επιπλέον δείγματα μήλων τα οποία αφέθηκαν σε συνθήκες δωματίου υπό σκιά για μια εβδομάδα (ζωή στο ράφι) και μετά πραγματοποιήθηκε η ανάλυσή τους για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων, προσομοιάζοντας με αυτό τον τρόπο τις συνθήκες κατανάλωσης του προϊόντος.

Σε κάθε δειγματοληψία και για κάθε μεταχείριση λαμβάνονταν 15 μήλα συνολικού βάρους ~4 kg τα οποία ακολούθως χωρίζονταν σε 3 υποδιαιρούμενα σύνολα (3 επαναλήψεις a, b, c) ώστε να ελεγχθεί η παραλλακτικότητα για κάθε δειγματοληψία. Όλα τα δείγματα μήλων επεξεργάστηκαν εντός των 24 ωρών από την έξοδό τους από τη ψυχοσυντήρηση και τα αναλυτικά δείγματα τοποθετούνταν στον καταψύκτη μέχρι την ανάλυσή τους.

Για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων στο φυτικό ιστό των καρπών ελέγχθηκε αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού των υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb στα υπό μελέτη υποστρώματα μήλων με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (Gas Chromatography – electron capture detector, GC-ECD) μετά από εκχύλισή τους με κατανομή στην ακετόνη.

Η ταυτοποίηση των chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb στα χρωματογραφήματα του συστήματος GC-ECD έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης τους. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τεσσάρων φυτοπροστατευτικών ουσιών στα δείγματα μήλου έγινε με την τεχνική του εξωτερικού προτύπου με τη χρήση καμπύλης αναφοράς.

Με βάση λοιπόν τις μελέτες αυτές καθώς και με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνεται η σταθερότητα του boscalid στα φρούτα κατά τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης είτε αναφερόμαστε σε απλή ψύξη, είτε σε ψύξη σε ατμόσφαιρα με χαμηλή συγκέντρωση όζοντος. Επίσης, όσον αφορά στις συγκεντρώσεις chlorpyrifos παρατηρείται σχετική μείωση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της τάξεως του 27%.

Η συγκέντρωση του deltamethrin κατά τη διάρκεια του πειράματος διαπιστώθηκε ότι διατηρείτο σταθερή στα μήλα και μόνο κατά τις δύο τελευταίες δειγματοληψίες-αναλύσεις εμφανίστηκε μία μείωση κατά 10% που συντηρούνταν σε ψυχοσυντήρηση σε συνθήκες όζοντος. Όσον αφορά το indoxacarb ουσιαστικά παραμένει σταθερή η συγκέντρωσή του και στις δύο μεταχειρίσεις και δεν τείνει να μειώνεται με την ψυχοσυντήρηση.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή	3
1.1 Ιστορική προέλευση	3
1.2 Γενικά.....	3
1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	4
1.4 Κλιματολογικές απαιτήσεις	5
1.5 Εδαφολογικές απαιτήσεις	6
1.6 Ποικιλίες	6
1.7 Ποιότητα καρπών-Κριτήρια ποιότητας	7
1.8 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα	7
1.9 Θρεπτική αξία	7
1.10 Οικονομική Σημασία Μηλοκαλλιέργειας	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Συντήρηση μήλων	9
2.1 Γενικά.....	9
2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συντήρηση.....	9
2.3 Ρύθμιση συνθηκών στους χώρους αποθήκευσης.....	10
2.4 Τροποποιημένη ατμόσφαιρα – Συσκευασία υπό κενό – Ενεργός συσκευασία	11
2.5 Αέρια που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα που συσκευάζονται υπό MAP	12
2.6 Υλικά και τρόποι συσκευασίας.....	14
2.7 Ελεγχόμενη ατμόσφαιρα.....	14
2.8 Εφαρμογή όζοντος στη συντήρηση φρούτων και λαχανικών.....	16
2.9 Εφαρμογή MCP στη συντήρηση φρούτων και λαχανικών.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Καταπονήσεις κατά τη συντήρηση	22
3.1 Αλλοιώσεις μήλων στα ψυγεία	22
3.2 Μετασυλλεκτικές παθήσεις καρπών.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών σε φυτικά προϊόντα	27
4.1 Γενικά.....	27
4.2 Η τύχη των υπολειμμάτων.....	28
4.3 Προσδιορισμός των υπολειμμάτων	30
4.4 Δειγματοληψία	30
4.5 Επεξεργασία δειγμάτων κι αποθήκευση.....	31
4.6 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου	31
4.7 Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων	32

4.8 Αναλυτική μεθοδολογία.....	32
4.9 Ενόργανες τεχνικές προσδιορισμού υπολειμμάτων.....	35
4.10 Αξιολόγηση μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Περιγραφή πειράματος.....	40
5.1 Σκοπός.....	40
5.2 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα και οι εφαρμογές τους στα μήλα.....	40
5.3 Μεταχειρίσεις, Ψυχοσυντήρηση και Δειγματοληψία.....	42
5.4 Προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση.....	43
5.5 Διαλύτες και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.....	44
5.6 Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε.....	44
5.7 Διαδικασία εκχύλισης δειγμάτων.....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	47
6.1 Ποιοτική ανάλυση.....	47
6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός.....	47
6.3 Πρότυπες καμπύλες – Επίδραση υποστρώματος.....	49
6.4 Αξιολόγηση της μεθόδου.....	52
6.5 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων του chlorpyrifos-ethyl.....	54
6.6 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων του boscalid.....	56
6.7 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων του deltamethrin.....	58
6.8 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων του indoxacarb.....	60
6.9 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb σε μήλα αποθηκευμένα στο ράφι σε συνθήκες δωματίου.....	62
6.10 Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε φρούτα.....	70
7. Συμπεράσματα.....	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1 Ιστορική προέλευση

Το μήλο είναι φρούτο, καρπός του δέντρου μηλιά (επιστ.: *Μηλέα η ήμερος*, λατ. *Malus* domestica*) της οικογένειας των Ροδοειδών (Rosaceae). Είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα και ευρύτατα καλλιεργούμενα φρούτα. Το δέντρο είναι φυλλοβόλο και φτάνει τα 5-12 μέτρα ύψος με φύλλα που έχουν ελλειψοειδές σχήμα και μυτερή άκρη. Ανθίζει την άνοιξη με άσπρα άνθη (ελαφρά ροζ στην αρχή), 2.5-3.5 cm σε διάμετρο, με πέντε πέταλα. Τα φρούτα ωριμάζουν το φθινόπωρο και συνήθως έχουν διάμετρο 5-9 cm (και σπάνια μέχρι και 15 cm). Η μηλιά ήταν γνωστή από τους προϊστορικούς χρόνους, τόσο σε άγρια όσο και σε καλλιεργούμενη μορφή. Η καταγωγή της τοποθετείται στην περιοχή νότια του Καυκάσου. Το δέντρο καλλιεργείται από την αρχαιότητα στην Ασία και στην Ευρώπη. Η καλλιεργούμενη μηλιά αναφέρεται από το Θεόφραστο τον 3ο αι. π.Χ.. Το γένος *Malus*, εκτός της κοινής μηλιάς, συμπεριλαμβάνει και άλλα είδη, μεταξύ των οποίων και τα ακόλουθα: *Malus baccata* (Μ. η ραγοφόρος), *Malus fusca* (Μ.η φαιά), *Malus orientalis* (Μ. η ανατολική), *Malus prunifolia* (Μ. η προυμνόφυλλος), *Malus pumila* (Μ. η νανοφυής), *Malus sylvestris* (Μ. η δασική), *Malus spectabilis* (Μ. η έκλαμπρος). Με την ανακάλυψη του νέου κόσμου και την εγκατάσταση αποίκων πολλές ευρωπαϊκές ποικιλίες μεταφέρθηκαν στην Αμερική (<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/30599/apple>).

1.2 Γενικά

Η μηλιά είναι το πιο διαδεδομένο οπωροφόρο παγκοσμίως, αντιπροσωπεύει το 50% των φυλλοβόλων οπωροφόρων δέντρων, με παγκόσμια ετήσια παραγωγή περί τα 60 εκατομμύρια τόνους. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής μήλων παγκοσμίως αποτελείται από επιτραπέζιες ποικιλίες. Οι ποικιλίες πολλαπλής χρήσεως όμως αρχίζουν να γίνονται συνεχώς δημοφιλέστερες. Παλιότερα σε κάθε τόπο καλλιεργούνταν διαφορετικές ποικιλίες μήλων. Οι απαιτήσεις όμως για αυξημένη παραγωγή και υψηλή ποιότητα καρπών, συνέβαλαν στη δημιουργία και διάδοση νέων ποικιλιών που καλλιεργούνται σήμερα σε διάφορα μέρη με παρόμοιες κλιματικές συνθήκες. Οι πιο διαδεδομένες ποικιλίες είναι η Golden Delicious και οι διάφορες κόκκινες ποικιλίες Delicious αμερικανικής προέλευσης, η Mutsu ιαπωνικής προέλευσης και η Granny Smith αυστραλιανής προέλευσης. Η καλλιέργεια της

μηλιάς είναι διαδεδομένη σε ολόκληρο σχεδόν τον κόσμο. Μηλεώνες απαντώνται ακόμη και στη Σιβηρία όπου η θερμοκρασία κατά τους χειμερινούς μήνες μπορεί να πέσει στους -40°C . Μέχρι το 1940 η παραγωγή μήλων στην Ελλάδα ήταν πολύ μικρή. Η *Μηλέα η οικιακή* (*Malus* domestica*), καθώς αναφέρεται, προήλθε από το είδος *Μηλέα η χαμηλή* ή *Μηλέα η νανοφυής* (*Malus pumila*), αλλά στην εξέλιξή της, όπως είναι παραδεχτό σήμερα, συνέβαλε το είδος *Μηλέα η δασική* (*Malus sylvestris*), καθώς και πολλά άλλα είδη. Σήμερα υπολογίζεται ότι υπάρχουν γύρω στις 7.5 χιλιάδες ποικιλίες μήλων (Βασιλακάκης, 2010).

1.3 Βοτανικά χαρακτηριστικά

Η μηλιά είναι δέντρο φυλλοβόλο, μεγάλου μεγέθους, πλαγιόκλαδο ή ορθόκλαδο και μακρόβιο.

Ρίζα: Το ριζικό σύστημα της μηλιάς αποτελείται από πολλές πλάγιες ρίζες και καταλαμβάνει έκταση διπλάσια από εκείνη που καταλαμβάνει η προβολή της κόμης του δέντρου. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ριζικού συστήματος βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του εδάφους αλλά η ρίζα μπορεί να φθάσει σε βάθος μέχρι 3 μέτρων και πάνω.

Φύλλα: Τα φύλλα είναι απλά, κατ' εναλλαγή, ωοειδή, οδοντωτά, βραχύμυσα, με την κάτω επιφάνεια χνουδωτή. Το μέγεθος και το πάχος των φύλλων επηρεάζονται από την ποικιλία, τις καλλιεργητικές συνθήκες, το χρόνο εμφάνισής τους και τη ζωνρότητα του δέντρου. Ο μίσχος των φύλλων φέρει μερικές φορές κοντά στη βάση δύο μικρά παράφυλλα.

Οφθαλμοί: Οι οφθαλμοί είναι πεπλατυσμένοι, χνουδωτοί και εφάπτονται του βλαστού. Οι καρποφόροι οφθαλμοί είναι μικτοί (όταν ανοίγουν δίνουν βλάστηση μικρού μήκους 0,5 – 3 εκ., που φέρει πλάγια φύλλα και επάκρια άνθη) και ο καθένας περικλείει πέντε με έξι άνθη. Η διαφοροποίηση των οφθαλμών σε βλαστοφόρους και μικτούς αρχίζει τον Ιούλιο – Αύγουστο και ολοκληρώνεται την επόμενη άνοιξη πριν από την άνθηση.

Άνθη: Από κάθε μικτό οφθαλμό αναπτύσσονται περίπου πέντε άνθη σε ταξιανθία κορύμβου. Το κεντρικό άνθος καλείται βασιλικό, ανοίγει πρώτο και ακολουθείται από τα δύο άνθη της βάσης και εν συνεχεία από τα δύο ενδιάμεσα άνθη. Τα άνθη αποτελούνται από πέντε σέπαλα, πέντε πέταλα, είκοσι στήμονες με κίτρινους ανθήρες και έναν ύπερο αποτελούμενο από την ωοθήκη και πέντε στύλους που συμφύονται σε

κοινή βάση. Τα άνθη είναι εντομόφιλα. Σε μερικές ποικιλίες όπου οι στήμονες είναι μακρύτεροι από τους στύλους, οι μέλισσες μπορούν να συλλέγουν γύρη χωρίς να γίνεται επικονίαση.

Καρπός: Ο καρπός της μηλιάς είναι ψευδής. Το βρώσιμο τμήμα αποτελείται από ιστούς που προέρχονται από την πάχυνση της βάσης του κάλυκα, της στεφάνης και των στημόνων. Έχει ποικίλο σχήμα, από σφαιρικό έως επίμηκες, σάρκα τραγανή ή αλευρώδη, εύχυμη, γλυκιά, όξινη ή υποξίνη και τα σπέρματα είναι καφέ απόχρωσης (<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%AE%CE%BB%CE%BF>).

1.4 Κλιματολογικές απαιτήσεις

Η μηλιά είναι δέντρο κυρίως των ψυχρών και υγρών περιοχών. Απαιτεί δροσερό καλοκαίρι και αντέχει σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διακοπή του λήθαργου των οφθαλμών της και το δροσερό καλοκαίρι για παραγωγή μήλων υψηλής ποιότητας. Παρόλα αυτά κατά την περίοδο της ανθοφορίας κινδυνεύει από παγετούς. Παραθαλάσσιες και παραλίμνιες περιοχές ευνοούν την καλλιέργεια της μηλιάς γιατί ο κίνδυνος πρόκλησης ζημιών από παγετό μειώνεται σημαντικά λόγω της υδάτινης επιφάνειας που συντελεί στη διατήρηση της θερμοκρασίας σε επιθυμητά επίπεδα. Σε ανεμόπληκτες παραθαλάσσιες περιοχές μπορεί να προκληθούν ζημιές από τα σταγονίδια της θάλασσας στα φύλλα και τους καρπούς της.

Θερμοκρασία: Η θερμοκρασία του καλοκαιριού επηρεάζει την εμφάνιση του κόκκινου χρώματος των καρπών και κατά συνέπεια την ποιότητα της παραγωγής. Η άριστη μέση θερμοκρασία κατά τους μήνες Ιούλιο και Αύγουστο είναι 20 – 21 βαθμοί Κελσίου. Οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, όταν συνοδεύονται και από σημαντική έλλειψη εδαφικής υγρασίας, προξενούν σοβαρές ζημιές στην παραγωγή. Οι κατ' εξαίρεση χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω των -25 βαθμών Κελσίου) μπορεί να προξενήσουν ζημιές στα δέντρα κυρίως όταν είναι απότομες. Η ανθεκτικότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες διαφέρει από ποικιλία σε ποικιλία. Η μηλιά έχει μεγαλύτερες ανάγκες σε χαμηλές θερμοκρασίες από οποιοδήποτε άλλο φυλλοβόλο καρποφόρο είδος. Η επιτυχής της καλλιέργεια εξαρτάται άμεσα από αυτό τον παράγοντα, σε θερμές περιοχές ή όπου οι χειμώνες είναι θερμοί δημιουργούνται προβλήματα όπως για παράδειγμα πολλοί οφθαλμοί δεν εκπτύσσονται, η βλάστηση είναι αδύνατη, η

άνθηση χρονικά ανώμαλη, η καρποφορία περιορισμένη και η ωρίμανση των καρπών ασύγχρονη.

Βροχόπτωση: Ευδοκμεί σε περιοχές με ετήσιο ύψος βροχόπτωσης πάνω από 500 χιλ., που κατανέμεται σε όλη τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου. Σε περιοχές με λιγότερη βροχόπτωση χρειάζεται άρδευση. Η υψηλή σχετική ατμοσφαιρική υγρασία κατά την περίοδο της καρποφορίας μπορεί να προκαλέσει ασθένειες, κυρίως σκωριάσεις. Η μηλιά ανέχεται την εδαφική υγρασία αλλά και την απαιτεί, ιδιαίτερα τη θερινή περίοδο. Όταν οι ανάγκες της δεν ικανοποιούνται από τις βροχοπτώσεις τότε πρέπει να αρδεύεται. Η άρδευση γίνεται συχνότερα σε βαριά εδάφη όπου οι ρίζες είναι επιπόλαιες. Το υπερβολικό πότισμα όμως πρέπει να αποφεύγεται γιατί δημιουργεί προβλήματα και προκαλεί ασθένειες.

Ηλιοφάνεια: Το άφθονο φως είναι απαραίτητο γιατί επηρεάζει σημαντικά το χρώμα των καρπών, χαρακτηριστικό που σε ορισμένες περιπτώσεις καθορίζει την ποιότητά τους.

1.5 Εδαφολογικές απαιτήσεις

Η μηλιά προτιμά εδάφη γόνιμα, βαθειά, καλά αποστραγγιζόμενα και με επαρκή περιεκτικότητα σε ασβέστιο. Οι μεγαλύτερες αποδόσεις επιτυγχάνονται στις πεδινές περιοχές, όπου υπάρχει η δυνατότητα εντατικής εκμετάλλευσης και η καλύτερη ποιότητα στις ημιορεινές ή ορεινές περιοχές λόγω πιο ευνοϊκού κλίματος.

1.6 Ποικιλίες

Οι κυριότερες σύγχρονες ποικιλίες που προωθούνται στην αγορά είναι οι παρακάτω:

- Από τις πρώιμες ποικιλίες, η ποικιλία *Gala* και ιδιαίτερα οι κλώνοι *Gala Schniga*, *Anaglo*, *Brookfield Gala* στις πεδινές περιοχές.
- Από τις όψιμες ποικιλίες, η ποικιλία *Fuji* και η ποικιλία *Granny Smith* και Μούτσου που ευδοκμεί σε ορεινές περιοχές.
- Από την ομάδα *Red Delicious* οι κλώνοι *Red Chief*, *Superchief*, *Red Kan*, *Scarlet Spur*, *Red Cap* σε ημιορεινές και ορεινές περιοχές.
- Από την ομάδα *Golden Delicious*, οι κλώνοι *Golden Reinders*, *Golden Smoothee* και *Golden B*.
- Από τις τριπλοειδείς ποικιλίες, οι ποικιλίες *Red Jonaprince*, *Jonagored*, *Jonagold*.

- Η ελληνική ποικιλία Φιρίκι συναντάται ως επί το πλείστον στις ορεινές και ημιορεινές περιοχές της χώρας. Πριν από 150-200 χρόνια εμφανίστηκε στο Πήλιο ένα μοναδικό στο είδος μήλο, μικρό στο μέγεθος και υπόξινο στη γεύση: το φιρίκι, το ήμερο και το άγριο (που δεν είναι εδώδιμο). Το φιρίκι είχε σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των υπόλοιπων ποικιλιών: ήταν ένα μήλο ανθεκτικό στις ασθένειες και με μεγάλη αντοχή μετά τη συγκομιδή. Με την έλευση όμως των καινούργιων ποικιλιών περιορίστηκε πολύ η καλλιέργειά του λόγω της μεγάλης παρενιαυτοφορίας, του μικρού του μεγέθους και του ελαφρού επιχρώματος (Βασιλακάκης, 2010).

1.7 Ποιότητα καρπών-Κριτήρια ποιότητας

Διακρίνονται δύο ποιότητες, η Φυσική και η Εμπορική. Φυσική ποιότητα είναι η θεωρητική, ενώ Εμπορική είναι η ποιότητα που πρέπει να έχει το προϊόν προκειμένου να γίνει αποδεκτό από τον καταναλωτή.

Για τον προσδιορισμό της ποιότητας εξετάζονται χαρακτηριστικά των προϊόντων σε σχέση με τα κριτήρια ποιότητας που ισχύουν γι' αυτά. Τέτοια κριτήρια ποιότητας είναι: η γενική εμφάνιση, η κατάσταση επιφάνειας και τα ελαττώματα, τα φυσικά ανατομικά χαρακτηριστικά, η γεύση και το άρωμα, η θρεπτική αξία και η ασφάλεια (Βασιλακάκης, 2006).

1.8 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα

Η ποιότητα ενός προϊόντος εξαρτάται και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Αυτοί είναι γενετικοί (ποικιλία και υποκείμενο), οι εδαφοκλιματικές συνθήκες, το υψόμετρο, η έκθεση του οπωρώνα, οι καλλιεργητικές φροντίδες (λίπανση, άρδευση, αραίωμα καρπών), το στάδιο ωρίμανσης ή ανάπτυξης κατά την συγκομιδή, οι συλλεκτικές και μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις (Βασιλακάκης, 2006).

1.9 Θρεπτική αξία

Το μήλο είναι πλούσιο σε βιταμίνες, διαιτητικές ίνες, μεταλλικά στοιχεία. Περιέχει ασβέστιο, φώσφορο, σίδηρο, κάλιο, βιταμίνη C, βιταμίνη A, φολικό οξύ, βιοτίνη, μηλικό οξύ. Βοηθά στην πέψη καθώς και στην καύση του λίπους. Έχοντας πολύ λίγες θερμίδες βοηθά τον οργανισμό να διατηρηθεί υγιής. Είναι καλό να καταναλώνεται

μετά από κάποιο γεύμα γιατί έχοντας πολύτιμες θρεπτικές ουσίες βοηθά στο μεταβολισμό του οργανισμού και την γρηγορότερη πέψη.

1.10 Οικονομική Σημασία Μηλοκαλλιέργειας

Η μηλοκαλλιέργεια είναι η τέταρτη σε σημασία καλλιέργεια μετά από εκείνη της ελιάς, των εσπεριδοειδών και της ροδακινιάς. Η παραγόμενη ποσότητα μήλων κυμαίνεται περί τους 300.000 τόνους ετησίως και παραμένει σταθερή τα τελευταία χρόνια.

Σημαντικές ποσότητες μήλων παράγονται σε πολλές περιοχές της Ελλάδας, είναι γνωστά όμως τα μήλα της Νάουσας, της Ζαγοράς Πηλίου, της Αγίας Λαρίσης, της Καστοριάς, της Τριπόλεως. Μεγάλες ποσότητες μήλων παράγουν πολλές ευρωπαϊκές καθώς και άλλες χώρες και ως εκ τούτου υπάρχει έντονο διεθνές εμπορικό ενδιαφέρον για το μήλο καθώς και ανταγωνισμός (Βασιλακάκης, 2010).

Σήμερα η καλλιεργούμενη έκταση είναι περίπου 150.000 στρέμματα και η ετήσια παραγωγή ανέρχεται σε 350.000 τόνους, αποτελώντας τη δεύτερη σπουδαιότερη καλλιέργεια από τα φυλλοβόλα οπωροφόρα μετά τη ροδακινιά. Η καλλιέργεια της μηλιάς σε μορφή συστηματικών οπωρώνων εντοπίζεται κυρίως στην κεντρική και δυτική Μακεδονία, στη Θεσσαλία και στην Πελοπόννησο. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση δέντρων μηλιάς βρίσκεται στην περιοχή του Βερμίου. Καλλιεργείται επίσης στους νομούς Ημαθίας, Πέλλας, Καστοριάς, Μαγνησίας, Λάρισας και Αρκαδίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Συντήρηση μήλων

2.1 Γενικά

Η συντήρηση τροφίμων βασίζεται σε δύο αρχές, στην καταστροφή, αδρανοποίηση ή απομάκρυνση ενός ή όλων των παραγόντων που συμβάλλουν στην υποβάθμιση και αλλοίωση των τροφίμων και στη δημιουργία κατάλληλων συνθηκών στο τρόφιμο ή στο περιβάλλον του τροφίμου για να περιοριστεί η δράση των παραγόντων αυτών (Αρβανιτογιάννης, 2001).

Με τη συντήρηση επιδιώκεται η παράταση της εμπορικής ζωής των προϊόντων χωρίς να υποβαθμίζεται σοβαρά η ποιότητα τους. Η συντήρηση των οπωροκηπευτικών απαιτεί κατάλληλες εγκαταστάσεις ώστε να διατηρηθεί και να παραταθεί όσο το δυνατόν περισσότερο ο χρόνος συντήρησης των καρπών.

Οι καρποί των περισσότερων εμπορικών ποικιλιών μήλων συγκομίζονται από τα τέλη Αυγούστου έως τα τέλη Οκτωβρίου και μπορούν να διατηρηθούν υπό συνθήκες κανονικής ατμόσφαιρας σε κοινά ψυγεία από δύο έως έξι μήνες, το υπόλοιπο χρονικό διάστημα που απομένει καλύπτεται από εισαγωγές. Ωστόσο, όταν τα μήλα συντηρούνται υπό συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας παρατείνεται η διάρκεια ζωής τους πέραν των επτά μηνών.

2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη συντήρηση

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη συντήρηση των μήλων στους ψυκτικούς θαλάμους είναι οι εξής:

Κατά τη συγκομιδή θα πρέπει να ελέγχεται το στάδιο ωριμότητας των συγκομιζόμενων προϊόντων. Οι γεωργικές φροντίδες που λαμβάνουν χώρα καθόλη την παραγωγική περίοδο αλλά κυρίως λίγο πριν τη συγκομιδή παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάρκεια της συντήρησης όπως επίσης και ο τρόπος συγκομιδής ώστε οι καρποί να μην υφίστανται τυχόν τραυματισμούς.

Αμέσως μετά τη συγκομιδή θα πρέπει να ακολουθεί πρόψυξη ώστε να απομακρυνθεί το ταχύτερο δυνατό η θερμότητα από τα προϊόντα. Η πρόψυξη σκοπό έχει τη διατήρηση των προϊόντων για αρκετές μέρες σε κατάσταση που ελάχιστα διαφέρει ποιοτικά από αυτήν της στιγμής της συλλογής (Κατσούλας & Κίττας, 2008).

Επίσης, οι καρποί θα πρέπει να είναι απαλλαγμένοι από προσβολές κι από παθογόνους μικροοργανισμούς καθώς επίσης και οι χώροι αποθήκευσης. Αυτό

επιτυγχάνεται με ψεκασμούς, πριν την εισαγωγή των καρπών στους θαλάμους αποθήκευσης, σε όλες τις επιφάνειες των θαλάμων με μυκοστατική βαφή ώστε να περιοριστεί η ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών.

Τελευταίος και σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει τη συντήρηση των καρπών είναι οι συνθήκες στις οποίες διατηρούνται μετά τη συλλογή τους. Η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, η περιεκτικότητα του αέρα σε οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα και αιθυλένιο είναι τα στοιχεία αυτά τα οποία καθορίζουν τη διάρκεια ζωής των καρπών μέσα στους θαλάμους. Τα μήλα στην Ελλάδα συνήθως αποθηκεύονται σε απλούς θαλάμους ψύξης, θερμοκρασίας 0-5°C και σχετικής υγρασίας 95% περίπου και σε συνθήκες κανονικής ατμόσφαιρας και λιγότερο σε συνθήκες ελεγχόμενης ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

2.3 Ρύθμιση συνθηκών στους χώρους αποθήκευσης

Σκοπός της ρύθμισης των συνθηκών που επικρατούν στους χώρους αποθήκευσης των οπωροκηπευτικών, είτε αυτοί είναι ψυκτικοί θάλαμοι μεγάλου ή μικρού όγκου είναι η διατήρηση των προϊόντων όσο το δυνατόν σε κατάσταση τέτοια όπως κατά τη συγκομιδή. Οι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη και που θα πρέπει να ελέγχονται – ρυθμίζονται είναι η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, η σύσταση του αέρα και ο αερισμός.

Το κάθε προϊόν συντηρείται σε διαφορετική θερμοκρασία και σχετική υγρασία και για διάφορα χρονικά διαστήματα. Μερικά προϊόντα είναι πολύ ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες, άλλα λιγότερο. Για τα μήλα των ποικιλιών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα το βέλτιστο επίπεδο θερμοκρασίας είναι από -1°C έως +1°C. Η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας μέσα σε στενά επιθυμητά όρια είναι το αποτέλεσμα καλού σχεδιασμού του συστήματος ψύξης, σωστής διάταξης των ψυχόμενων προϊόντων, καλής μόνωσης των τοιχωμάτων των ψυγείων και καλής κυκλοφορίας του αέρα μέσα σε αυτό (Κατσούλας & Κίττας, 2008).

Κατά τη συντήρηση των μήλων επιδιώκεται η σχετική υγρασία να διατηρείται σε εύρος 90 – 95%. Ο έλεγχος της σχετικής υγρασίας στους χώρους αποθήκευσης υπό ψύξη είναι απαραίτητος για την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής. Σχετική υγρασία μεγαλύτερη από τη βέλτιστη τιμή προκαλεί την ανάπτυξη μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις σε όλα τα φρούτα και συχνά έχει σαν αποτέλεσμα το σχίσμο της σάρκας ορισμένων καρπών. Αντίθετα σχετική υγρασία

χαμηλότερη από τη βέλτιστη τιμή προκαλεί αφυδάτωση και συρρίκνωση των φρούτων.

Η περιεκτικότητα του αέρα είθισται να είναι 21% O₂, 78% N₂ και 0,03% <CO₂. Οι συνθήκες αυτές επικρατούν και στους θαλάμους αποθήκευσης με κάποια διαφοροποίηση λόγω των μεταβολικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα εντός τους. Κρίνεται αναγκαίος ο αερισμός του θαλάμου συντήρησης στον οποίο είναι αποθηκευμένοι οι καρποί. Πραγματοποιείται μέσω εξαερισμών με τη βοήθεια ανεμιστήρων που είναι προσαρτημένοι στις μονάδες ψύξης. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε απομάκρυνση της θερμότητας αναπνοής καθώς κι αφαίρεση οσμών ή ανεπιθύμητων αερίων από τους θαλάμους ψύξης (Ακριτίδης, 1993).

2.4 Τροποποιημένη ατμόσφαιρα - Συσκευασία υπό κενό - Ενεργός συσκευασία

Είναι γνωστό για τουλάχιστον 100 χρόνια ότι η μέθοδος συντήρησης της ψύξης όταν συνδυαστεί με ελεγχόμενη ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα στη διατήρηση του τροφίμου. Η σύσταση του ατμοσφαιρικού αέρα είναι περίπου 78% άζωτο (N₂), 21% οξυγόνο (O₂), 0,9% αργό (Ar) και 0,3% διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) επίσης υπάρχουν ακόμα και κάποια άλλα αέρια που οι συγκεντρώσεις τους όμως είναι πολύ μικρές. Όταν αυτή η σύσταση των αερίων αλλάξει, τότε έχουμε τροποποίηση της ατμόσφαιρας (Packdata Factsheet, 1992).

Συγκεκριμένα, η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μείωση του οξυγόνου εντός της συσκευασίας λέγεται τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) και περιλαμβάνει τη συσκευασία υπό κενό και τη συσκευασία υπό ελεγχόμενη ατμόσφαιρα. Η μέθοδος της τροποποιημένης ατμόσφαιρας χρησιμοποιείτο από την αρχαιότητα και σύμφωνα με καταγραφές από το 6000 π.Χ.. Ουσιαστικά, δεν ακολουθούταν η ίδια διαδικασία, απλώς γέμιζαν τα δοχεία με τρόφιμα (κυρίως κρέας) και αφαιρούσαν τον αέρα μέσα από αυτά. Μια αρκετά πιο προηγμένη εφαρμογή της τροποποιημένης ατμόσφαιρας εφαρμόστηκε το 1927 παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής σε μήλα, τα οποία αποθηκεύτηκαν σε ατμόσφαιρα με μειωμένες συγκεντρώσεις οξυγόνου και αυξημένες διοξειδίου του άνθρακα (Philips, 1996).

Πέραν αυτών, τα προϊόντα που συσκευάζονται θα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από παθογόνους μικροοργανισμούς πριν τη συσκευασία όσο το δυνατόν περισσότερο και να συσκευάζονται υπό συνθήκες άριστης υγιεινής, μετά τη συσκευασία η θερμοκρασία να μειώνεται άμεσα και να διατηρείται ώστε να αποφεύγεται η

ανάπτυξη θερμοφίλων παθογόνων μικροοργανισμών. Αν πραγματοποιηθούν τα παραπάνω μέτρα και τα προϊόντα θα διατηρούνται καλύτερα και θα αποφεύγεται και ο κίνδυνος για τη δημόσια υγεία.

(http://www.michigan.gov/documents/MDA_mod_04_21085_7.html#_Toc49173722).

Ως ενεργός συσκευασία χαρακτηρίζεται κάθε συσκευασία της οποίας τα συστατικά μεταβάλλουν συνήθως την ατμόσφαιρα (αέρια σύσταση) της συσκευασίας ώστε να επιτευχθεί καλύτερη ποιότητα προϊόντος και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Τα ενεργά συστατικά περιλαμβάνουν σακουλάκια καθώς και μεμβράνες που απελευθερώνουν ενθυλακωμένες χημικές ενώσεις (Αρβανιτογιάννης, 2001).

Υπάρχουν διάφορες ουσίες που προστίθενται στη συσκευασία τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι αντιοξειδωτικές, ένζυμα τα οποία μετατρέπουν κάποιες ουσίες σε άλλες όπως η λακτάση. Στις περισσότερες περιπτώσεις οπωροκηπευτικών χρησιμοποιούνται ουσίες που απορροφούν το οξυγόνο που βρίσκεται στη συσκευασία ώστε να μειωθεί η οξείδωση των προϊόντων αυτών.

Διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο αυτή, όπως: edώδιμα φράγματα που εμποδίζουν τη μεταφορά υγρασίας, υλικά απορρόφησης αιθυλενίου και οξυγόνου, μεμβράνες που περιέχουν ανασταλτικές ουσίες μικροβίων, edώδιμες μεμβράνες που απορροφούν ή απομακρύνουν κάποιες δυσάρεστες οσμές και υλικά δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα (Αρβανιτογιάννης, 2001).

2.5 Αέρια που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα που συσκευάζονται υπό MAP

Τα τρία κυριότερα αέρια που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι το οξυγόνο (O_2), το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και το άζωτο (N_2). Η επιλογή του αερίου που θα χρησιμοποιηθεί καθώς και η ποσοστιαία αναλογία του καθενός εξ αυτών εξαρτάται από το προϊόν που πρόκειται να συσκευαστεί, τη μικροβιακή χλωρίδα και το χρώμα του τροφίμου, καθώς και την ευαισθησία του τροφίμου σε καθένα από αυτά τα αέρια. Έτσι λοιπόν, τα τρία αυτά αέρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε σε συνδυασμό ή ακόμα και μόνα τους. Η χρήση τους έγκειται στο γεγονός ότι είναι σε θέση να παρατείνουν με ασφάλεια το χρόνο ζωής του τροφίμου και να διατηρήσουν το ίδιο καλά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Τα αέρια πλήρωσης της συσκευασίας που είναι τα ευγενή αέρια δηλαδή το άζωτο (N_2), το ήλιο (He), το ξένο (Xe) και το αργό (Ar) δεν προσφέρουν κάποιο πλεονέκτημα όσον αφορά στην παράταση ζωής του τροφίμου

(Zagori, 1988). Πέραν αυτών των τριών αερίων, σε έρευνες έχουν χρησιμοποιηθεί κι άλλα αέρια, όταν βέβαια αυτό επιτρέπεται από τη νομοθεσία όπως το μονοξείδιο του άνθρακα και το διοξείδιο του θείου, το όζον, το διοξείδιο του αζώτου τα οποία δεν έχουν εγκριθεί λόγω του ό,τι είναι μη ασφαλή (Mullan, 2002).

Το διοξείδιο του άνθρακα είναι ένα άγευστο και άχρωμο αέριο, μη αδρανές, το οποίο όταν βρεθεί σε μεγάλη συγκέντρωση έχει έντονη οσμή και μεταλλική και ξινή γεύση, δύναται να προκαλέσει ασφυξία και είναι ελαφρώς διαβρωτικό παρουσία υγρασίας. Είναι διαλυτό στο νερό (1,57g/kg σε 100kPa και 20°C) παράγοντας ανθρακικό οξύ, το οποίο αυξάνει την οξύτητα του διαλύματος και μειώνει το pH. Είναι διαλυτό και στα λίπη αλλά και σε άλλες οργανικές ενώσεις. Η διαλυτότητα του διοξειδίου του άνθρακα αυξάνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας (Mullan, 2002). Γι' αυτό το λόγο, η αντιμικροβιακή δράση του διοξειδίου του άνθρακα είναι εμφανώς μεγαλύτερη σε θερμοκρασίες κάτω των 10°C απ' ό,τι σε 15°C ή και σε χαμηλότερη ακόμα. Αυτό έχει σημαντικές επιπτώσεις σε προϊόντα που συντηρούνται υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Η υψηλή διαλυτότητα του διοξειδίου του άνθρακα μπορεί να οδηγήσει στην κατάρρευση της συσκευασίας που οφείλεται στη μείωση του όγκου γι' αυτό άλλωστε χρησιμοποιούνται και τα αδρανή αέρια. Για να ελεγχθεί η ανάπτυξη των μικροβίων συνίστανται συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας με περιεκτικότητα ατμόσφαιρας 25 % διοξείδιο του άνθρακα. Θεωρείται ότι είναι πολύ αποτελεσματικό στη μείωση της ανάπτυξης αερόβιων κατά Gram⁻ ψυχρότροφων βακτηρίων καθώς και μυκήτων.

Πέραν του αζώτου, χρησιμοποιούνται κι άλλα ευγενή αέρια όπως το αργό, το ήλιο, το νέο και το ξένο, τα οποία είναι εγκεκριμένα από την Ε.Ε. Τα ευγενή αέρια είναι στοιχεία που χαρακτηρίζονται από έλλειψη ενεργότητας. Με πειράματα που έχουν γίνει έχει φανεί ότι δύσκολα μπορεί να διακριθεί πιο απ' όλα τα ευγενή είναι ισχυρότερο, όσον αφορά τη συντήρηση των τροφίμων, ωστόσο λόγω του ό,τι το αργό είναι βαρύτερο από το άζωτο θεωρείται ότι είναι πολύ καλό στο να εκτοπίζει το οξυγόνο (Fletcher, 2003).

2.6 Υλικά και τρόποι συσκευασίας

Καθώς λοιπόν αναπτύχθηκαν αυτές οι μέθοδοι για την συντήρηση των τροφίμων προέκυψε κι άλλο ένα πρόβλημα, που ήταν η εύρεση της κατάλληλης συσκευασίας. Πέραν αυτού οι επιθυμίες της βιομηχανίας να παράγει μεγάλες ποσότητες γαλακτοκομικών έφερε στο προσκήνιο το θέμα της συσκευασίας και μάλιστα συσκευασίας η οποία θα είναι ικανή ακόμα και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Το οποιοδήποτε υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για να συσκευάσει ένα τρόφιμο θα πρέπει να είναι κατάλληλο για την εκάστοτε μέθοδο συντήρησης και για το εκάστοτε προϊόν .

Υλικά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη συσκευασία είναι τα παρακάτω: πολυμερή, όπως το πολυαιθυλένιο (PET), πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) και το πολυστυρένιο (PS) χαρτί και χαρτόνι, μέταλλα, όπως ο λευκοσίδηρος (Scott Smith, 2004).

2.7 Ελεγχόμενη ατμόσφαιρα

Η ελεγχόμενη ατμόσφαιρα είναι μια τεχνολογία που έχει ως στόχο την αναστολή της αναπνοής του φρούτου. Για να ελαττωθεί ο ρυθμός αναστολής σε πλήρως στεγανό θάλαμο προστίθεται περίσσεια αζώτου καθαρότητας 99%. Η περίσσεια αζώτου δεσμεύει το οξυγόνο εντός του ψυκτικού θαλάμου με αποτέλεσμα μετά από μερικές ημέρες να ελαττωθεί το ποσοστό οξυγόνου από 21% (ατμοσφαιρικός αέρας) σε 2-3%. Σε αυτές τις συνθήκες η αναπνοή του προϊόντος επιβραδύνεται σημαντικά. Ο μικρός ρυθμός αναπνοής αλλά και η πλήρης στεγανότητα του θαλάμου έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση διοξειδίου του άνθρακα εντός του ψυκτικού θαλάμου. Αυτό ώστε να μην είναι επιβλαβές για το προϊόν απορροφάται μέσω του απορροφητή διοξειδίου του άνθρακα με στόχο η περιεκτικότητά του να μην υπερβεί το 5%. Το δίκτυο σωληνώσεων του απορροφητή διοξειδίου του άνθρακα και της γεννήτριας αζώτου λειτουργεί πνευματικά, με τις ανάλογες πνευματικές βαλβίδες, που λαμβάνουν πίεση από έναν κεντρικό αεροσυμπιεστή και ένα κοντέρ. Τα ποσοστά διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου ελέγχονται συνεχώς από ένα σύστημα ανάλυσης και τα επιθυμητά ποσοστά τους διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία του προϊόντος αποθήκευσης (<http://www.criogen.gr/elengxomeni-atmosfera>).

Η μεταβολή της περιεκτικότητας σε οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας των χώρων ψύξης επηρεάζει την αερόβια αναπνοή των φρούτων και λαχανικών, τη μικροβιακή ανάπτυξη και τις οξειδωτικές δράσεις. Για το λόγο αυτό εφαρμόζεται ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (Controlled Atmosphere, CA).

Η αερόβια αναπνοή των φρούτων και λαχανικών πρέπει να διατηρείται σε χαμηλό ρυθμό για την επιμήκυνση του χρόνου ζωής αυτών. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, αύξηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα και μείωση της θερμοκρασίας. Τα μήλα αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα προϊόντος που συντηρείται σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα. Μείωση της συγκέντρωσης του O₂ σε 10% ή χαμηλότερο μειώνει το ρυθμό αναπνοής τόσο παρουσία όσο και απουσία CO₂. Για την ίδια συγκέντρωση O₂ ο ρυθμός αναπνοής μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του CO₂. Αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂ σε 10% επίσης μειώνει το ρυθμό αναπνοής ακόμη και εάν η παρουσία οξυγόνου βρίσκεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα (<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/sbt/files/%CE%A8%CE%A5%CE%9E%CE%97.pdf/>).

Εάν η συγκέντρωση του O₂ μειωθεί πάρα πολύ, η αερόβια αναπνοή καταστέλλεται και υποκαθίσταται τουλάχιστο μερικά από την αναερόβια αναπνοή. Το αποτέλεσμα είναι η συγκέντρωση αλκοόλης και άλλων τοξικών προϊόντων της αναερόβιας αναπνοής, η εμφάνιση φυσιολογικών ανωμαλιών και η μείωση του χρόνου ζωής. Η κρίσιμη συγκέντρωση O₂ για την έναρξη αναερόβιας αναπνοής εξαρτάται από τη θερμοκρασία (η απαίτηση σε O₂ είναι μεγαλύτερη σε ψηλότερη θερμοκρασία), το βαθμό ωρίμανσης και το είδος του προϊόντος. Παραδείγματα κρίσιμης συγκέντρωσης O₂ για την έναρξη αναερόβιας αναπνοής είναι 1,8% για μήλα στους 3,5°C, 2,3% και 1,2% για σπαράγγια στους 20° και 10°C, αντίστοιχα και 4% για καρότα και μπιζέλια στους 20°C (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2004).

Η συγκέντρωση του οξυγόνου συνήθως κυμαίνεται ανάμεσα στο 3 και 5%. Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου περιορίζεται υπερβολικά σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (1-1,5%) τότε ονομάζεται ULO (Ultra Lower Oxygen) (Tahir & Nybom, 2013). Ουσιαστικά είναι ελεγχόμενη ατμόσφαιρα με πολύ χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου. Με αυτόν τον τρόπο παρατείνεται η διάρκεια ζωής των μήλων, διατηρείται επί μακρότερο η φρεσκάδα των καρπών και περιορίζεται η εμφάνιση φυσιολογικών ασθενειών στους καρπούς. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή θεωρείται δαπανηρή από πλευράς κατασκευής και συντήρησης κι επίσης σύμφωνα με πειράματα έχει

παρατηρηθεί ότι οι καρποί που αποθηκεύονται σε τέτοιες συνθήκες δεν αναπτύσσουν ικανοποιητικό άρωμα (Harb et al., 2008).

Πολύ αυξημένη συγκέντρωση CO₂ καταστέλλει και την αερόβια και την αναερόβια αναπνοή, περιορίζει ή καθυστερεί την κλιμακτήριο, και συνήθως επιταχύνει την υποβάθμιση της ποιότητας. Οι πρώτες μεταβολές στην ποιότητα είναι η ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών που ακολουθείται από μεταβολή του χρώματος και αλλοίωση της υφής (Κοτζεκίδου-Ρούκα, 2004).

Η συγκέντρωση O₂ και CO₂ επηρεάζει την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών που βρίσκονται στην επιφάνεια των τροφίμων. Συγκέντρωση CO₂ μεγαλύτερη από 10% επιβραδύνει σημαντικά την ανάπτυξη τους. Το κατώτερο αποτελεσματικό όριο εξαρτάται από τη θερμοκρασία (ψηλότερες θερμοκρασίες απαιτούν μεγαλύτερες τιμές), τον πληθυσμό των μικροοργανισμών, και τη θρεπτική σύσταση του τροφίμου (Kweon et al., 2013).

Υπερβολικά αυξημένη συγκέντρωση CO₂ και έλλειψη O₂ μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών, μεταξύ των οποίων και παθογόνοι. Εκτός της μεταβολής της σύστασης του αέρα σε οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα ορισμένες φορές χρησιμοποιούνται μικρές συγκεντρώσεις άλλων αερίων, όπως χλώριο, διοξείδιο του θείου, όζον κ.λ.π. για την επιβράδυνση της ανάπτυξης μικροοργανισμών και εντόμων. Επίσης χρησιμοποιείται αιθυλένιο, όπως ήδη αναφέρθηκε για την επιτάχυνση της ωρίμανσης των φρούτων (Kweon et al., 2013).

Επίσης, άλλες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για να περιορίσουν φυσιολογικές ανωμαλίες και μεταβολές (π.χ. εμφάνιση κηλίδων, εκβλάστηση), ή οξειδώσεις, και ψεκάζονται πάνω στα προϊόντα σε μορφή αεροζόλ ή υδατικών διαλυμάτων, είτε προστίθενται στη συσκευασία προϊόντων που διατηρούνται υπό ψύξη.

2.8 Εφαρμογή όζοντος στη συντήρηση φρούτων και λαχανικών

Λόγω της πολύ υψηλής οξειδωτικής και απολυμαντικής του δράσης το όζον χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την απολύμανση πόσιμου νερού ως εναλλακτικό του χλωρίου σε διυλιστήρια νερού ύδρευσης μεγάλων πόλεων. Συμβάλλει αποτελεσματικά στην εξάλειψη παρασίτων του πόσιμου νερού όπως *Giardia lamblia* και *Cryptosporidium* sp., χωρίς ωστόσο να σχηματίζει οργανοχλωριωμένες ενώσεις, ούτε αφήνει υπολείμματα μετά την εφαρμογή του. Έρευνες στο Πολυτεχνείο της

Καλιφόρνια (ΗΠΑ) έδειξαν ότι σε συγκέντρωση όζοντος 0,3 ppm στο νερό της βρύσης ήταν ικανό να μειώσει κατά 99,9% τα μικρόβια τροφίμων, όπως *Salmonella*, *Escherichia coli* 0157:H7 και *Campylobacter*. Το κωλοβακτηρίδιο (*E. coli*) θανατώθηκε μετά από έκθεση επί 1 sec σε συγκέντρωση 2 ppm όζοντος. Ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις όζοντος (0,3 ppm επί 8 λεπτά της ώρας) είναι αρκετές για να νεκρώσουν τα σπόρια μερικών μυκήτων (*B. cinerea*) (Dickson et al., 1992).

Πέραν της ευεργετικής δράσης του όζοντος εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων εξίσου ευεργετική είναι και χρήση του όζοντος για τη διάσπαση του αιθυλενίου η οποία έχει καλά τεκμηριωθεί εδώ και αρκετά χρόνια. Το όζον είναι αποτελεσματικό (και μάλιστα σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση 0,04 ppm), στην οξείδωση του αιθυλενίου σε ψυκτικούς θαλάμους όπου συντηρούνταν μήλα και αχλάδια (Skog et al., 2001) . Το όζον από το 1997 είχε χαρακτηριστεί ως GRAS (Generally Recognized As Safe) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (Food & Drug Administration, FDA) και το 2001 εγκρίθηκε για χρήση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων (νωπά και επεξεργασμένα φρούτα και λαχανικά) και για την εφαρμογή του στους χώρους αποθήκευσης ως αέριο ή διαλυμένο στο νερό (FDA, 1997).

Το όζον εφαρμόζεται ως αέριο α) για την απολύμανση θαλάμων συντήρησης τροφίμων και εξοπλισμού στη βιομηχανία τροφίμων και β) για τη συντήρηση φρούτων και λαχανικών σε θαλάμους ψυχρής συντήρησης, για τον περιορισμό των σήψεων συγχρόνως με την απομάκρυνση του αιθυλενίου, όταν δεν εφαρμόζεται άλλη μέθοδος απομάκρυνσης (η παροχή μπορεί να είναι συνεχής ή διακοπτόμενη, πχ. ημέρα - νύχτα).

Το όζον εφαρμόζεται στο νερό για το πλύσιμο ή την εμβάπτιση φρούτων και λαχανικών σε οζονισμένο νερό (μήλα, εσπεριδοειδή, σταφύλια, ροδάκινα, νεκταρίνια, μαρούλια, τομάτες, σέλινο, καρότα). Επίσης, μπορεί να εφαρμοστεί κατά την υδρόψυξη, όπου αυτή εφαρμόζεται, για την απολύμανση του νερού. Με τον τρόπο αυτό εκτός από ευεργετικό αποτέλεσμα στην υγιεινή των φρούτων γίνεται και μεγάλη εξοικονόμηση στο νερό. Το όζον χρησιμοποιείται πάντοτε σε καθαρό νερό και απουσία οργανικών ενώσεων, διότι στην αντίθετη περίπτωση μειώνεται η αποτελεσματικότητά του (αυτός είναι ο λόγος που το όζον είναι αναποτελεσματικό στην απολύμανση των τεμαχισμένων λαχανικών).

Μια πρώτη έρευνα από τον Spalding (1968) και κατόπιν από τον Palou και τους συνεργάτες του (2002) έδειξαν ότι ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 0,3 ως 0,5 ppm

όζοντος επιβράδυνε σημαντικά την ανάπτυξη των μυκήτων *Monilinia fructicola* (φαιά σήψη), *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* (τεφρά σήψη) σε τεχνητά προσβεβλημένους καρπούς ροδακινιάς, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην μυκηλιακή ανάπτυξη του μύκητα *Mucor pyriformis*. Οι Liew & Prange (1994) ανέφεραν μια μείωση της τάξης του 50% στον ημερήσιο ρυθμό αύξησης του μύκητα *B. cinerea* και του μύκητα *Sclerotinia sclerotiorum* σε καρότα που εκτέθηκαν σε 60 ppm όζοντος με δράση του όζοντος καθαρά μυκοστατική και όχι μυκοτοξική.

Όταν εφαρμόστηκαν χαμηλότερα επίπεδα όζοντος κατά τη διάρκεια της συντήρησης (1 ppm O₃ στους 8°C) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ανάπτυξη των παραπάνω μυκήτων στα καρότα, με το όζον ικανό να μειώνει την εξάπλωση των ανθεκτικών στα μυκητοκτόνα στελεχών. Η Barth και οι συνεργάτες της (1995) επίσης ανέφεραν ότι ο εμπλουτισμός με όζον (0,3 ppm στους 2 °C) αναστέλλει την ανάπτυξη των μυκήτων *B. cinerea* και *R. stolonifer* κατά τη συντήρηση βατόμουρων. Όμοια, η έκθεση πορτοκαλιών (ποικ. Valencia) και λεμονιών (ποικ. Eureka) σε όζον 0,05 ppm στους 10°C καθυστέρησε την προσβολή από τους μύκητες *Penicillium digitatum* και *P. italicum* και μείωσε το ρυθμό ανάπτυξης της σήψης που προκαλούνται από τα συγκεκριμένα παθογόνα.

Το όζον δεν εισέρχεται σε βάθος στους προσβεβλημένους ιστούς και ως εκ τούτου δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των μυκήτων εφόσον εισέλθουν στο εσωτερικό του καρπού. Ωστόσο, η παραγωγή σπορίων σε πηλές εσπεριδοειδών που είχαν μολυνθεί με τους μύκητες *Penicillium digitatum* (πράσινη σήψη) και *P. italicum* (μπλε σήψη) μειώθηκε ύστερα από έκθεση σε όζον.

Οι Margosan & Smilanick (2000) ανέφεραν ότι η βλάστηση των σπορίων των μυκήτων *B. cinerea*, *M. fructicola*, *P. digitatum* και *R. stolonifer* αναστέλλεται από τον εμπλουτισμό της ατμόσφαιρας με όζον. Ο Tzortzakis και οι συνεργάτες του το (2007) ανέφεραν ότι το όζον (0,1 ppm, 13°C) επέδρασε σημαντικά στην αναστολή της σποριοποίησης και της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα *B. Cinerea* τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε καρπούς τομάτας, φράουλας, δαμασκηνιάς και σε σταφύλια, ωστόσο η επίδραση του όζοντος ήταν πιο έντονη *in vivo*.

Σε *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση κατά 75% στη βλάστηση και τελικά νέκρωση των κονιδίων του μύκητα *B. cinerea* μετά από 8 h έκθεση στο θάλαμο ψυχρής συντήρησης (0 °C, Σ.Υ. 95%) με όζον (0,3 ppm) σε σχέση με αυτά που εκτέθηκαν σε θάλαμο που εφαρμοζόταν το σύστημα της καταλυτικής οξειδωσίας του αιθυλενίου (μάρτυρας). Επίσης καταγράφηκε σημαντική

αναστολή της μυκηλιακής ανάπτυξης του μύκητα *B. cinerea* παρουσία όζοντος, όμως ο μύκητας επαναδραστηριοποιήθηκε μετά από την έξοδο των καλλιεργειών από τον θάλαμο ψυχρής συντήρησης.

Σε *in vivo* πειράματα σε τεχνητά μολυσμένους καρπούς παρατηρήθηκε μείωση κατά 56% του ποσοστού των καρπών που προσβλήθηκαν από την ασθένεια της τεφράς σήψης, με τον μύκητα *B. cinerea*, μετά από 4 μήνες ψυχρή συντήρηση σε θάλαμο με όζον (0,3 ppm) σε σχέση με αυτά που εκτέθηκαν σε θάλαμο που εφαρμοζόταν το σύστημα της καταλυτικής οξειδωσης του αιθυλενίου (μάρτυρα). Επιπλέον, στους καρπούς που συντηρήθηκαν με όζον και εμφάνισαν συμπτώματα της ασθένειας παρεμποδίστηκε η σποριοποίηση του μύκητα και παρατηρήθηκε ο σχηματισμός σκληρωτίων, γεγονός που συνδέεται με την αδυναμία του μύκητα να αναπτυχθεί στην εμπλουτισμένη με όζον ατμόσφαιρα. Αυτή η επίδραση του όζοντος στην παρεμπόδιση ανάπτυξης του μύκητα είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς συμβάλλει στην αποτροπή της μετάδοσης της ασθένειας από καρπό σε καρπό με επαφή κατά τη διάρκεια της συντήρησης (αποφυγή δημιουργίας φωλιών) περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό τις ποσοτικές απώλειες (Μηνάς, 2010).

Η προέκθεση καρπών τομάτας και ακτινιδίων σε όζον για διάφορα χρονικά διαστήματα ενίσχυσε την αντοχή των καρπών στην προσβολή από τον μύκητα *B. cinerea* (Tzortzakis et al., 2008). Αυτό πιθανά να συνδέεται με το γεγονός ότι το όζον επάγει τη βιοσύνθεση φαινολικών ουσιών που είναι υπεύθυνες για την αύξηση της ανθεκτικότητας των σταφυλιών σε σήψεις κατά τη συντήρηση, όπως η φυτοαλεξίνη ρεσβερατρόλη (Sarig et al., 1996).

Η αποτελεσματικότητα του όζοντος στην αντιμετώπιση των σήψεων επηρεάζεται από το είδος του παθογόνου και του συντηρούμενου φρούτου ή λαχανικού, τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία συντήρησης. Γι' αυτό είναι απαραίτητο να ερευνηθούν και να προσδιοριστούν οι άριστες συνθήκες εφαρμογής (διάρκεια εφαρμογής και συγκέντρωση) για κάθε οπωροκηπευτικό ώστε να είναι αποτελεσματικό και ταυτόχρονα να μην υποβαθμίζει την ποιότητα των προϊόντων. Ενδεικτικά με τα έως τώρα ερευνητικά δεδομένα το όζον βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει καθόλου ή επηρεάζει θετικά την ποιότητα των μήλων, των αχλαδιών, της τομάτας, του ακτινιδίου, του μπρόκολου και του μαρουλιού. Αντίθετα, υπάρχουν αναφορές για υποβάθμιση της ποιότητας της φράουλας, του αγγουριού και των μανιταριών (Gonzalez- Barrio et al., 2006).

Τα τελευταία χρόνια καταβάλλονται ερευνητικές προσπάθειες στην κατεύθυνση αξιοποίησης του όζοντος για τη μείωση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων που υπάρχουν σε γεωργικά προϊόντα, όπως φρούτα και λαχανικά.

Πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι το όζον διαλυμένο σε νερό προκαλεί ταχεία διάσπαση εντομοκτόνων ουσιών, όπως το carbofuran, phorate, malathion και diazinon, αλλά και ζιζανιοκτόνων, όπως η ατραζίνη. Είναι επίσης γνωστό πως το όζον, σε εφαρμογές στον αέρα των θαλάμων συντήρησης, σε διάφορες συγκεντρώσεις μείωσε τη συγκέντρωση των φυτοπροστατευτικών ουσιών azinphosmethyl, captan, mancozeb, fenhexamid, pyraclostrobin από την επιφάνεια των μήλων και των σταφυλιών. Δεν είχε όμως κανένα αποτέλεσμα στα iprodione και boscalid, ακόμη και μετά από έκθεση σε πολύ υψηλή συγκέντρωση όζοντος. Είναι γνωστό ότι αρκετά υποπροϊόντα που σχηματίζονται από τη διάσπαση των φυτοφαρμάκων μπορεί να είναι μερικές φορές περισσότερο τοξικά.

2.9 Εφαρμογή MCP στη συντήρηση φρούτων και λαχανικών

Το αιθυλένιο αποτελεί σημαντικό παράγοντα της μετασυλλεκτικής μεταχείρισης των φρούτων, των λαχανικών καθώς και των ανθοκομικών ειδών με ανεπιθύμητες συνήθως επιδράσεις. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται αναστολείς του αιθυλενίου, οι οποίοι επιβραδύνουν ως ένα βαθμό τη δράση του.

Ο θειοθειικός άργυρος (STS), είναι ένα πολύ δραστικό ανασταλτικό της δράσης του αιθυλενίου στους φυτικούς ιστούς. Εξασφαλίζει πολλές φορές αντιμικροβιακές δράσεις στους φυτικούς ιστούς.

Το 1-Methylcyclopropane είναι η πιο αποτελεσματική χημική ένωση που προέρχεται από μια ομάδα χημικών ενώσεων ενεργού κυκλοπροπανίου και βασίζεται στην ενεργή συγκέντρωση και στην σταθερότητα. Αυτό θα είναι πιθανόν ο αναστολέας του αιθυλενίου, μια επιλογή για το άμεσο μέλλον και θα κατέχει σημαντικό δυναμικό, για το εμπόριο. Στην ενεργή του συγκέντρωση δεν έχει έντονη μυρωδιά και δεν έχει αναφερθεί να έχει τοξικές ιδιότητες. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος έκθεσης, τόσο χαμηλότερη είναι η απαιτούμενη συγκέντρωση.

Έχει διαπιστωθεί ότι το 1-MCP προστατεύει εντελώς το γαρίφαλο και την μπανάνα όταν δίνεται σ' αυτά μία 24ωρη έκθεση σε 0,5 nl/l. Οι μπανάνες προστατεύονται για 12 ημέρες στους 22°C αλλά γίνονται ευαίσθητες ξανά σε 5 ημέρες στους 35°C.

Στα βερίκοκα διαπιστώθηκε ότι η εφαρμογή 1 μl/l 1-MCP για 4ώρες και σε θερμοκρασία 20°C προκάλεσε αναστολή της δράσης του αιθυλενίου και μείωσε το ρυθμός αναπνοής κατά την αποθήκευση, στους 0 και 20°C (Fan, 2000).

Η μεταχείριση με το 1 – MCP παρατηρείται να μειώνει το «επιφανειακό» (scald) και το «μαλακό έγκαυμα» (soft scald), την παραγωγή αιθυλενίου (έως 99,9%) και την αναπνοή (έως 48%) των καρπών, καθώς και το ρυθμό αποικοδόμησης των οργανικών οξέων. Αντίθετα, διατηρεί την αντίσταση της σάρκας στην πίεση (ΑΣΠ) σχεδόν αμετάβλητη κατά τη συντήρηση και υψηλότερα τα διαλυτά στερεά συστατικά (ΔΣΣ) του χυμού, την περιεκτικότητα του φλοιού σε καροτενοειδή και ανθοκυάνες, καθώς και τα αντιοξειδωτικά χαρακτηριστικά (φαινολικές ουσίες, φλαβονοειδή, τιμή FRAP, τιμή DPPH) των καρπών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Καταπονήσεις κατά τη Συντήρηση

3.1 Αλλοιώσεις μήλων στα ψυγεία

Στα φρούτα και λαχανικά ακόμη και μετά την αποκοπή τους από το φυτό συνεχίζεται η φυσιολογική δραστηριότητα (αναπνοή, διαπνοή). Η συνέχιση της φυσιολογικής δραστηριότητας οδηγεί στην ωρίμανση και τελικά γήρανση, με σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας. Τα προϊόντα αυτά, ανάλογα με το ρυθμό της φυσιολογικής δραστηριότητας μετά την απομάκρυνση από το φυτό, διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

I. Κλιμακτηρικά: Αυτά εκδηλώνουν μια έντονη φυσιολογική δραστηριότητα η οποία οδηγεί στην ωρίμανση, γι' αυτό το λόγο μπορεί να γίνει η συγκομιδή τους πριν από την πλήρη ωρίμανση (μπανάνα, μήλο, αχλάδι, τομάτα).

II. Μη κλιμακτηρικά: Αντίθετα, η φυσιολογική δραστηριότητα είναι πολύ περιορισμένη γι αυτό πρέπει να συλλέγονται στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας (σταφύλια - εσπεριδοειδή) ή στο στάδιο της αποδεκτής εμπορικής ποιότητας (μαρούλι, σπαράγγι κ.λ.π).

Πέραν όμως των φυσιολογικών αλλοιώσεων που υφίστανται οι καρποί, αλλοιώσεις εμφανίζονται και λόγω των επικρατουσών συνθηκών εντός των ψυκτικών χώρων, όπως: η θερμοκρασία, το μειωμένο οξυγόνο, το αυξημένο διοξείδιο του άνθρακα όπως έχουν ήδη προαναφερθεί, καθώς και η δράση του αιθυλενίου και σε παρουσία χημικών ουσιών.

Το αιθυλένιο σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του 1 ppm, επισπεύδει την αποσύνθεση και μειώνει τη μετασυλλεκτική ζωή των οπωροκηπευτικών. Το αιθυλένιο παράγεται στα μήλα με αυτοκαταλυτικό τρόπο θέτοντας σε λειτουργία το μηχανισμό ωρίμανσης των καρπών ακόμα κι όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Η έκθεση των καρπών σε αμμωνία (λόγω διαφυγών) είναι δυνατό να προκαλέσει μόνιμες βλάβες στους ιστούς οι οποίοι αποκτούν σκούρο χρώμα γύρω από τα φακίδια. Καθώς και η έκθεση των καρπών σε αυξημένες συγκεντρώσεις διφαινυλαμίνης προκαλεί σχηματισμό μαύρων κηλίδων και αποχρωματισμούς κατά θέσεις του φλοιού και στην κοιλότητα του κάλυκα.

3.2 Μετασυλλεκτικές παθήσεις καρπών

Φαία σήψη

Προσβάλλει κυρίως τους καρπούς και τα άνθη. Μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ζημιές και με μετασυλλεκτική σήψη των καρπών. Οι καρποί προσβάλλονται σ' όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους αλλά πιο ευπαθείς είναι όταν πλησιάζουν στην ωρίμανση. Η μόλυνση γίνεται συνήθως από πληγές ή λύσεις της συνέχειας του επιδερμικού ιστού. Αρχικά τα συμπτώματα είναι μια μικρή καφετιά κηλίδα με απροσδιόριστα όρια, η οποία μεγαλώνει ταχύτατα και στην επιφάνεια και σε βάθος και γίνεται στρογγυλή με σαφώς καθορισμένα όρια. Οι ιστοί στο χώρο που καταλαμβάνει η κηλίδα γίνονται μαλακοί και διαλύονται με ελαφρά πίεση ενώ εμφανίζονται σε ομόκεντρους κύκλους γκριζωπές ή κιτρινοκάστανες μάζες μυκηλίου που μοιάζουν με μικρά μαξιλαράκια. Μέσα σε 3-5 μέρες ολόκληρος ο καρπός καλύπτεται από μάζες σπορίων και σαπίζει. Προοδευτικά αφυδατώνεται ζαρώνει και μούμιοποιείται και μπορεί να εξακολουθεί να είναι προσκολλημένος στο δέντρο ή να πέσει στο έδαφος. Τέτοιοι μούμιοποιημένοι καρποί παραμένουν αναλλοίωτοι καθ' όλη τη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα γιατί είναι καλυμμένοι από μια σκληρή μαύρη κρούστα η οποία αποτελείται από τα εξωτερικά στρώματα του μυκηλίου. Στην περίπτωση όψιμης προσβολής που δεν έχει προλάβει να εκδηλωθεί πριν τη συγκομιδή, εμφανίζονται στους ψυκτικούς χώρους όπου διατηρούνται οι καρποί. Η ασθένεια στη χώρα μας προκαλείται από τα εξής δύο είδη μυκήτων:

- Το *Monilia cinerea f. mali* , με τέλεια μορφή *Monilinia laxa* και
- Το *Monilia fructigena* με τέλεια μορφή *Monilinia fructigena*.

Η αντιμετώπιση της ασθένειας στη μηλιά εστιάζεται κυρίως στην καταστροφή των αρχικών εστιών μόλυνσης (μούμιοποιημένοι καρποί) από τα δέντρα ή το έδαφος με ένα καλό όργωμα και παράχωμα στα βαθύτερα στρώματα.

Προστασία των καρπών από εντομολογικές προσβολές που είναι τα κύρια αιτία δημιουργίας πληγών μέσω των οποίων μολύνονται από τη φαία σήψη. Αποφυγή κάθε παράγοντα που μπορεί να δημιουργήσει υπερβολική υγρασία, ιδίως στο εσωτερικό της κόμης , όπως πυκνή βλάστηση, άφθονη αζωτούχος λίπανση κακός αερισμός κ.λ.π. Κατά τη διάρκεια της βλάστησης οι ψεκασμοί είναι απαραίτητοι ώστε να προφυλαχθούν τα δέντρα στη διάρκεια των ευπαθών ιδιαίτερος σταδίων της (Θανασουλόπουλος, 1987)

Κυανή σήψη (Blue mold rot)

Παθογόνο: *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium sp.*. Πρόκειται για μετασυλλεκτικές σήψεις που προκαλούν πολύ σοβαρές ζημιές (έως 100%). Πρόσθετη ζημιά προκαλείται και από το αιθυλένιο που παράγουν οι παθογόνοι μύκητες, το οποίο λόγω του ότι αυξάνει την αναπνοή των καρπών, μειώνει τη διάρκεια ζωής και των υγιών καρπών που βρίσκονται στην ίδια αποθήκη με τους προσβεβλημένους καρπούς. Οι μετασυλλεκτικές αυτές σήψεις λαμβάνουν μεγάλη έκταση όταν η συγκομιδή γίνεται με υγρό και βροχερό καιρό. Στην επιφάνεια των προσβεβλημένων καρπών παρατηρείται αρχικά μια ελαφρά βυθισμένη υδαρής κηλίδα, η οποία επεκτείνεται ταχύτατα σε ολόκληρο τον καρπό.

Στη συνέχεια, αναπτύσσεται μία χαρακτηριστική μπλε ή πράσινη εξάνθιση, η οποία καλύπτει σιγά-σιγά ολόκληρο τον καρπό. Οι προσβεβλημένοι καρποί αναδύουν μια χαρακτηριστική οσμή σήψης. Σε περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας, ο προσβεβλημένος καρπός αποσυντίθεται ολοκληρωτικά, λόγω και δευτερογενών μολύνσεων από σαπροφυτικούς μικροοργανισμούς (μύκητες - βακτήρια). Σε περιβάλλον χαμηλής σχετικής υγρασίας, ο προσβεβλημένος καρπός αφυδατώνεται, συρρικνώνεται και μουμιοποιείται.

Η είσοδος των μυκήτων στους καρπούς γίνεται από πληγές, οι οποίες δημιουργούνται κατά τη συγκομιδή, τη διαλογή ή τη συσκευασία. Επάνω στους καρπούς, οι μύκητες σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές καρποφορίες και τα σπόριά τους. Τα σπόρια (κονίδια) ελευθερώνονται με τον αέρα ή με ελαφρά μετακίνηση και μεταφέρονται στους υγιείς καρπούς. Η κυριότερη πηγή μόλυσματος είναι οι προσβεβλημένοι καρποί στους χώρους συσκευασίας και αποθήκευσης. Οι σήψεις ευνοούνται από υψηλή θερμοκρασία (22 – 24°C), ενώ σε χαμηλότερες επιβραδύνονται (Παναγόπουλος, 2007).

Λευκή σήψη (White rot)

Παθογόνο: *Botryosphaeria dothidea*

Η λευκή σήψη προσβάλλει μόνο τους καρπούς και το ξύλο. Οι νέες προσβολές εμφανίζονται στα κλαδιά με τη μορφή μικρών κηλίδων ή φλυκταινών στις αρχές του καλοκαιριού. Οι κηλίδες στους καρπούς αρχικά είναι μικρές, ελαφρώς βυθισμένες, καστανού χρώματος και μπορεί να περιβάλλονται με κόκκινη άλω. Καθώς η σήψη επεκτείνεται, ο πυρήνας σαπίζει και τελικά προκαλείται ολική σήψη

του καρπού. Σε ποικιλίες κόκκινων μήλων, κατά τη σήψη, οι καρποί μπορεί να αποκτήσουν ανοικτό καφέ χρώμα. Λόγω αυτού του φαινομένου, η ασθένεια αναφέρεται ως λευκή σήψη (Παναγόπουλος, 2007).

Πικρή κηλίδωση (Bitter pit)

Είναι μη παρασιτική ασθένεια των καρπών της μηλιάς προκαλεί σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας της παραγωγής. Η ασθένεια αρχίζει εσωτερικά στη σάρκα κάτω από την επιδερμίδα του καρπού και τελικά προκαλεί επιφανειακές αλλοιώσεις. Αργότερα οι κηλίδες αποκτούν πιο έντονο χρώμα από εκείνο του υπόλοιπου καρπού και τελικά παίρνουν χρώμα καστανό μέχρι μαύρο. Καθώς τα προσβεβλημένα κύτταρα νεκρώνονται, χάνουν υγρασία και συρρικνώνονται, η επιδερμίδα βυθίζεται στις αντίστοιχες θέσεις και έτσι στην επιφάνεια του καρπού σχηματίζονται κυκλικές ή ελαφρά γωνιώδεις κηλίδες. Οι τυπικές κηλίδες της προσβολής, που σχηματίζονται συνήθως κατά τους δύο ή τρεις πρώτους μήνες της αποθήκευσης, έχουν χρώμα βαθύ καστανό μέχρι μαύρο, διάμετρο 2-10 mm (αναλόγως της ποικιλίας), είναι ελαφρά βυθισμένες και συχνά εντοπίζονται στο κορυφαίο τμήμα των καρπών. Με την αποφλοιώση του καρπού αποκαλύπτονται κάτω από τις κηλίδες μικρές κυκλικές ή ωοειδείς μάζες, ξηρού, καστανού, σπογγώδους ιστού, που έχει υπόπικρη γεύση. Πολλές φορές, λόγω της συρρίκνωσης του σπογγώδους ιστού, σχηματίζονται μικρές κοιλότητες κάτω από τις κηλίδες. Μερικές φορές, ιδιαίτερα σε ορισμένες ποικιλίες, καστανές σπογγώδεις κηλίδες εμφανίζονται και σε βαθύτερα στρώματα μέσα στη σάρκα που αποκαλύπτονται με τον τεμαχισμό του καρπού.

Η πικρή κηλίδωση είναι μία μη παρασιτική ασθένεια που οφείλεται σε φυσιολογικές διαταραχές λόγω έλλειψης ασβεστίου. Σημαντικό ρόλο έχουν οι συνθήκες που επικρατούν στους οπωρώνες πριν από τη συγκομιδή. Η πικρή κηλίδωση είναι δυνατόν να εκδηλωθεί και προ τη συγκομιδής, αλλά είναι κυρίως μια μετασυλλεκτική ασθένεια που εμφανίζεται κατά την αποθήκευση των μήλων. Η ασθένεια είναι σοβαρότερη σε καρπούς από νεαρά δένδρα, ιδιαίτερα με μικρή καρποφορία, παρά σε καρπούς από ενήλικα δένδρα.

Η ασθένεια αντιμετωπίζεται ικανοποιητικά με διαφυλλική λίπανση διαλύματος νιτρικού ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,75 - 1% ή χλωριούχου ασβεστίου ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,45 - 0,6%. Συνήθως τρεις ψεκασμοί είναι αρκετοί (Βασιλακάκης, 2006).

Επιφανειακό έγκαυμα (Superficial scald)

Το επιφανειακό έγκαυμα αναπτύσσεται τόσο στο ψυγείο όσο και μετά την εξαγωγή των μήλων από μακρά συντήρηση στους 0°C και τη διατήρησή τους σε θερμοκρασία δωματίου για λίγες ημέρες. Τα συμπτώματα της ασθένειας εμφανίζονται στην επιδερμίδα του καρπού η οποία χάνει το φυσιολογικό της χρώμα σε διάσπαρτες θέσεις ή στην επιφάνεια του καρπού και αποκτά χρώμα καφετί στις κόκκινες ποικιλίες ή καφέ – μαύρο στις πράσινες ποικιλίες. Η εμφάνιση επιφανειακού εγκαύματος οφείλεται στην παραγωγή μιας πτητικής τοξικής ουσίας από τον φλοιό του καρπού που λέγεται α-φαρνεζίνη.

Στα μήλα ποικιλίας Granny Smith ο φλοιός γίνεται υδαρής χωρίς η σάρκα να επηρεάζεται σε βάθος. Το επιφανειακό έγκαυμα είναι ασθένεια των χαμηλών θερμοκρασιών. Δεν εμφανίζεται όταν οι καρποί συντηρούνται στους 4°C αλλά εμφανίζεται όταν συντηρούνται στους 0°C.

Πρώιμα συγκομιζόμενοι καρποί είναι περισσότερο ευαίσθητοι στο επιφανειακό έγκαυμα και τα συμπτώματα γίνονται περισσότερο έντονα καθώς παρατείνεται η συντήρηση των μήλων (Thomai, 1996).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών σε φυτικά προϊόντα

4.1 Γενικά

Ως υπολείμματα (residues) γεωργικών φαρμάκων θεωρούνται ουσίες ή μίγματα ουσιών που βρίσκονται στην τροφή των ανθρώπων ή των ζώων που προέρχονται από τη χρησιμοποίηση γεωργικών φαρμάκων. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται και οι ουσίες που είναι προϊόντα διάσπασης, μεταβολισμού (σχετικοί μεταβολίτες) ή χημικής αντίδρασης εφόσον είναι τοξικολογικά σημαντικές (FAO,1981).

Ανάλογα με την ποσότητα υπολειμμάτων που απαντάται στις καταναλωθείσες ποσότητες γεωργικών προϊόντων και όχι μόνο, η τοξικότητα των ουσιών διακρίνεται σε οξεία, υποξεία, υποχρόνια και χρόνια. Η τοξικότητα μιας ουσίας είναι η ενδογενής ιδιότητα μίας χημικής ένωσης να προκαλεί βλάβες στον άνθρωπο και στους άλλους οργανισμούς μη στόχους, αλλά και τη λειτουργία οικοσυστημάτων σε συγκεκριμένες συνθήκες (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Για πρακτικούς λόγους έχει καθιερωθεί από τους διεθνείς οργανισμούς ένας όρος που μας δίνει μία εκτίμηση της τοξικότητας για κάθε ουσία. Ο όρος αυτός είναι η Ημερήσια Αποδεκτή Δόση (Acceptable Daily Intake – ADI) που ορίζεται ως η ποσότητα της ουσίας σε mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα που μπορεί να καταναλώσει ένας άνθρωπος ή άλλο ζώο για όλη του τη ζωή χωρίς βλάβη της υγείας του. Ο καθορισμός της ADI είναι σχετικά δύσκολος και γίνεται αφού εκτιμηθεί η ποσότητα NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) και με τη βοήθεια ενός συντελεστή ασφαλείας. Έτσι η ADI μπορεί να είναι από NOAEL/100 μέχρι NOAEL/1000, όταν υπάρχουν ιδιαίτεροι λόγοι προβληματισμού για την τιμή NOAEL (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Για να προστατεύεται η υγεία των καταναλωτών και να διευκολύνεται το διεθνές εμπόριο, καθιερώθηκε ο όρος Μέγιστο Αποδεκτό Όριο Υπολειμμάτων (Maximum Residue Limit, MRL) που εκφράζεται σε mg δραστικής ουσίας/kg προϊόντος για κάθε συνδυασμό καλλιέργειας- φυτοφαρμάκου. Για τον καθορισμό του MRL ενός φαρμάκου σε κάποιο γεωργικό προϊόν λαμβάνεται υπόψη η τιμή ADI, το βάρος του ανθρώπου και το ποσοστό συμμετοχής του προϊόντος στην καθημερινή διαίτα ενός λαού, θεωρώντας ότι ο μέσος όρος ισχύει και για κάθε άτομο. Για να είναι η συγκέντρωση υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων ίση ή μικρότερη από τα καθορισμένα MRLs καθορίζεται και ο χρόνος της τελευταίας επέμβασης από τη

συγκομιδή, δηλαδή το μεσοδιάστημα μεταξύ της τελευταίας επέμβασης και της συγκομιδής του προϊόντος που είναι γνωστό ως PHI (Pre Harvest Index) (Ζιώγας & Μάρκογλου, 2010).

Ακόμα πρέπει να επισημανθεί ότι τα επίπεδα των προς προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε δείγματα φυτικής προέλευσης είναι χαμηλά, της τάξεως $\mu\text{g}/\text{kg}$. Πρόκειται δηλαδή για ιχνοανάλυση, εφόσον πρέπει να προσδιοριστούν πολύ μικρές ποσότητες του γεωργικού φαρμάκου. Επομένως η ανάλυση υπολειμμάτων είναι πολύ δύσκολη σε σχέση με τις άλλες κατηγορίες ανάλυσης και απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό που να κατανοεί σε βάθος τη σημασία κάθε σταδίου της εργασίας. Σταθμό στην επιστήμη της ανάλυσης των υπολειμμάτων αποτέλεσε η ανάπτυξη των χρωματογραφικών τεχνικών, δηλαδή της αέριας χρωματογραφίας, της υγρής χρωματογραφίας καθώς και η χρήση εξειδικευμένων ανιχνευτών καθώς και η ανάπτυξη συζευγμένων χρωματογραφικών συστημάτων με ανιχνευτή φασματογραφίας μαζών (GC-MS και LC-MS).

4.2 Η τύχη των υπολειμμάτων

Η ποσότητα των υπολειμμάτων που παραμένει σε ένα γεωργικό προϊόν εξαρτάται από το είδος του προϊόντος, τις μετεωρολογικές συνθήκες, το φυτοπροστατευτικό προϊόν που χρησιμοποιήθηκε και το χρόνο που μεσολάβησε από την εφαρμογή του.

Οι παράγοντες, οι οποίοι, σε συνδυασμό με το χρόνο, καθορίζουν την υποβάθμιση των υπολειμμάτων μιας δραστικής ουσίας στους φυτικούς ιστούς, διακρίνονται σε διεργασίες αποικοδόμησης (βιολογική, χημική, και φωτοχημική αποικοδόμηση), διεργασίες μετακίνησης (εξάτμιση, πρόσληψη από τα φυτά κ.α.). Ιδιαίτερη επίδραση στην υποβάθμιση των υπολειμμάτων έχουν επίσης και οι κλιματικοί παράγοντες όπως το φαινόμενο της αραίωσης λόγω της ανάπτυξης του φυτικού ιστού (Λόλας, 2003).

- Πτητικοποίηση: τις πρώτες ημέρες μετά την επέμβαση, ορισμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα παρουσιάζουν μείωση των υπολειμμάτων που μπορεί να φτάσει το 60% ή και παραπάνω. Αυτό οφείλεται στο ό,τι το φυτοπροστατευτικό προϊόν παραμένει ακόμα στην επιφάνεια του φυτού και δεν έχει διεισδύσει στους ιστούς.
- Μεταβολισμός: οι ουσίες που εισέρχονται στους φυτικούς ιστούς υπόκεινται σε μεταβολισμό σχηματίζοντας συνήθως απλούστερες ενώσεις, τους μεταβολίτες. Αναφερόμενοι στη μεταβολική τύχη των φυτοπροστατευτικών

προϊόντων μέσα στα φυτά μπορούμε να πούμε ότι διακρίνεται σε τέσσερα στάδια. Το πρώτο στάδιο αποτελούν, ανάλογα με το φυτοπροστατευτικό προϊόν, οι διάφορες ενζυματικές μεταβολές στο μόριο του φυτοπροστατευτικού προϊόντος που το καθιστούν λιγότερο δραστικό, ενώ σε ορισμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ενεργοποιούν τα μόρια τα οποία έτσι αποκτούν δράση. Το δεύτερο στάδιο είναι ο σχηματισμός συμπλόκων με συστατικά του κυττάρου, όπως γλουταθειόνη, γλυκόζη ή αμινοξέα. Στο τρίτο στάδιο τα φυτά μεταφέρουν τα σύμπλοκα και ακινητοποιούν με δέσμευση τους σε κυτταρικά συστατικά (π.χ. λιγνίνη) ή αποθήκευση τους στα χυμοτόπια ή ακόμα και στα κυτταρικά τοιχώματα. Εκεί μπορούν να συμβούν κι άλλες αλλαγές (τέταρτο στάδιο) και σχηματίζονται τα αδιάλυτα ή/και δεσμευμένα υπολείμματα. Αντίθετα στους ζωικούς οργανισμούς τα σύμπλοκα αυτά είναι πολικά και στις περισσότερες περιπτώσεις αποβάλλονται. Από τα μέχρι σήμερα γνωστά φαίνεται ότι οι σπουδαιότερες μεταβολικές αντιδράσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα φυτά είναι δύο ειδών:

Οξειδώσεις (Οξειδωση, Αναγωγή, Υδροξυλίωση, Απαλκυλίωση) και Υδρόλυση – Σχηματισμός Συμπλόκων.

- Αποικοδόμηση (degradation): της ουσίας, η οποία περιλαμβάνει κάθε μεταβολή στη δομή του μορίου ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος που μπορεί να γίνει φυσικά, χημικά και φωτοχημικά κι έχει σαν αποτέλεσμα τη λύση δεσμών και δημιουργία νέων μικρότερων μορίων.
- Ανάπτυξη του φυτού: με το διπλασιασμό του βάρους ενός καρπού υποδιπλασιάζεται η συγκέντρωση των υπολειμμάτων ακόμα κι αν δεν υπάρχει καμία αποικοδόμηση τους. Η μείωση της συγκέντρωσης μιας ουσίας με την παραπάνω διαδικασία είναι σημαντική διεργασία σε προϊόντα με γρήγορη και μεγάλη αύξηση του καρπού όπως στα κολοκυνθοειδή.
- Κλιματικοί παράγοντες: η θερμοκρασία επηρεάζει την ταχύτητα εξάτμισης, της διείσδυσης, της μετακίνησης και του μεταβολισμού των υπολειμμάτων στο φυτό. Η βροχή μπορεί να απομακρύνει τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που βρίσκονται στην επιφάνεια, ενώ η αυξημένη σχετική υγρασία αυξάνει την ταχύτητα διείσδυσης στους ιστούς. Ο άνεμος επηρεάζει την εξάτμιση και μπορεί επίσης να απομακρύνει ποσότητα σκευάσματος που έχει εναποτεθεί σε

στερεά μορφή. Η ηλιακή ακτινοβολία προκαλεί φωτολυτικές διασπάσεις και συνεπώς μείωση της ποσότητας των υπολειμμάτων.

4.3 Προσδιορισμός των υπολειμμάτων

Τα στάδια για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, είναι τα εξής:

- Δειγματοληψία
- Επεξεργασία κι αποθήκευση
- Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος
- Επιλογή αναλυτικής μεθόδου
- Εφαρμογή αναλυτικής μεθόδου
- Διασφάλιση ποιότητας αναλυτικών μετρήσεων

4.4 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία έχει σαν στόχο την απόκτηση μιας κατάλληλης αλλά κι αντιπροσωπευτικής ποσότητας προϊόντος από το σύνολο, για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων, λαμβάνοντας υπόψη τον ιδιαίτερο σκοπό της ανάλυσης. Οι FAO/WHO έχουν εκδώσει δύο σχετικές οδηγίες. Η μια αφορά στις πειραματικές εφαρμογές φυτοφαρμάκων (supervised trials) και τις δειγματοληψίες που γίνονται για μελέτες αποδόμησης και τον καθορισμό τη ημερομηνίας της τελευταίας εφαρμογής πριν τη συγκομιδή. Η δεύτερη αφορά στον συνιστώμενο τρόπο δειγματοληψίας σε φορτία του εμπορίου.

Σε πειράματα αγρού ο «μάρτυρας», δηλαδή δείγμα από τεμάχιο που έγινε επέμβαση με φυτοπροστατευτικό προϊόν αλλά διατηρήθηκε σε συνθήκες απλής ψυχροσυντήρησης, πρέπει να λαμβάνεται σε επαρκή ποσότητα κάθε φορά που γίνεται δειγματοληψία και να μη γίνεται δειγματοληψία από τα περιθώρια του πειραματικού τεμαχίου του μάρτυρα, έτσι ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις από γειτονικά τεμάχια. Οι γενικοί κανόνες που ισχύουν για τη λήψη όλων των δειγμάτων είναι:

-Επιλογή απόλυτα υγιών φυτών ή μέρη αυτών (καρπών στην προκειμένη περίπτωση) με κανονική ανάπτυξη, όπως ακριβώς θα συγκομιζόταν για κατανάλωση.

-Αποφυγή απομάκρυνσης των επιφανειακών υπολειμμάτων (σκούπισμα, πλύσιμο κ.λ.π.) κατά τη λήψη ή συσκευασία των δειγμάτων.

-Λήψη επαρκούς ποσότητας για όλες τις πιθανές επαναλήψεις των αναλύσεων στο εργαστήριο.

-Αποφυγή επιμόλυνσης των δειγμάτων κατά τη λήψη και μεταφορά.

Για το σκοπό αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιούνται απολύτως καθαρά εργαλεία, να αποφεύγεται η επαφή των δειγμάτων με χέρια ή ρούχα που ήρθαν σε επαφή με φυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα δείγματα να μην εκτίθενται σε ακραίες καιρικές συνθήκες και να μη μεταφέρονται μαζί με σκευάσματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Ειδική προσοχή πρέπει να δίνεται στη συλλογή των δειγμάτων του μάρτυρα που πρέπει να λαμβάνονται πριν από τα άλλα δείγματα, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση τους από τα εργαλεία ή τα χέρια.

4.5 Επεξεργασία δειγμάτων κι αποθήκευση

Αντιπροσωπευτικό μέρος του δείγματος, που προκύπτει από το αρχικό δείγμα με την τεχνική της συνεχούς μείωσης με τεταρτημόρια, στο εργαστήριο ομογενοποιείται και μέρος του μεταφέρεται σε ειδικά σακουλάκια (αναλυτικό δείγμα), τα οποία αποθηκεύονται σε καταψύκτες σε θερμοκρασία -22°C . Στην αποθήκευση η αποικοδόμηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων πραγματοποιείται με εξαιρετική ταχύτητα. Πρέπει να επισημανθεί ότι τα δείγματα πρέπει να αναλύονται το ταχύτερο δυνατό μετά τη συλλογή τους, ώστε να αποφευχθούν φυσικές και χημικές μεταβολές.

4.6 Επιλογή αναλυτικής μεθόδου

Για την επιλογή μιας αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω:

1. Η διεθνής βιβλιογραφία, δηλαδή οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί στο συγκεκριμένο αντικείμενο.
2. Η αξιολόγηση μιας μεθόδου από πολλά συνεργαζόμενα εργαστήρια συγχρόνως (collaborative study).
3. Η δυνατότητα που παρέχει η μέθοδος για ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων της μιας ουσιών.
4. Η ικανότητα της μεθόδου για προσδιορισμό ουσιών σε συγκεντρώσεις αρκετά μικρότερες από το ανώτατο επιτρεπτό όριο (MRL).

5. Η ικανότητα προσαρμογής της μεθόδου σε ένα μέσο εργαστήριο ανάλυσης υπολειμμάτων εφοδιασμένο με όργανα ρουτίνας.
6. Ο σκοπός της ανάλυσης, αν δηλαδή η ανάλυση γίνεται για έλεγχο, έρευνα, επιβολή κυρώσεων κ.α., καθώς και οι απαιτήσεις για ταχύτητα ή ακρίβεια.

4.7 Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων διακρίνονται σε πολυδύναμες (multi-residue methods) και εξειδικευμένες (specific methods).

Οι πολυδύναμες ή πολυυπολειμματικές μέθοδοι επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών φυτοφαρμάκων (μέχρι και 200) κυρίως της ίδιας οικογένειας. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για προκαταρκτικό έλεγχο (screening) των γεωργικών προϊόντων, όμως μόνες οι πολυδύναμες μέθοδοι δεν αρκούν για την επισήμανση και τον προσδιορισμό του συνολικού ρυπαντικού φορτίου ενός δείγματος (Λέντζα – Ρίζου, 2000). Οι εξειδικευμένες ή μονουπολειμματικές μέθοδοι είναι αυτές με τις οποίες προσδιορίζεται ένα μόνο φυτοφάρμακο ή και ορισμένες μόνο συγγενείς ουσίες. Για μεγαλύτερο από το ήμισυ του αριθμού των κυκλοφορούντων φυτοφαρμάκων, απαιτείται η χρήση εξειδικευμένων μεθόδων ανάλυσης. Οι έλεγχοι και τα πιστοποιητικά ελέγχου υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων έχουν ισχύ μόνον όσον αφορά τα υπολείμματα που είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

4.8 Αναλυτική μεθοδολογία

Από τη στιγμή που θα παραλειφθεί ένα δείγμα στο εργαστήριο και μέχρι τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων, ακολουθείται μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος
2. Εκχύλιση
3. Διήθηση
4. Καθαρισμός
5. Συμπύκνωση
6. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

1. Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος

Το δείγμα που φτάνει στο εργαστήριο και πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του αρχικού φορτίου, υφίσταται μείωση και ομογενοποιείται με εργαστηριακούς ομογενοποιητές. Από το ομογενοποιημένο δείγμα λαμβάνεται εις διπλούν μια μικρή ποσότητα που προορίζεται για ανάλυση (αναλυτικό δείγμα) και μια ανάλογου βάρους ποσότητα αποθηκεύεται στον καταψύκτη ως αντίδειγμα. Η ποσότητα του δείγματος που αποθηκεύεται είναι συνήθως 50-70 g, το οποίο αποθηκεύεται σε αποστειρωμένο σακουλάκι.

2. Εκχύλιση

Η εκχύλιση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα φυτοφάρμακα διαχωρίζονται από τους φυτικούς ιστούς με κατάλληλα εκχυλιστικά διαλύματα. Η επιλογή των εκχυλιστικών μέσων είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία μιας ανάλυσης. Επιδίωξη είναι το μέσο να διαθέτει μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα, ώστε να μπορεί να αποδεσμεύσει τα μόρια των φυτοφαρμάκων από τα σύμπλοκα των ιστών, παράλληλα όμως να είναι αρκετά εκλεκτικό ώστε να αποφεύγεται η εκχύλιση ανεπιθύμητων ουσιών από το υπό μελέτη υπόστρωμα (= το προς ανάλυση προϊόν), ώστε το εκχύλισμα να είναι όσο το δυνατό πιο καθαρό.

Οι περισσότερες φυτικές ουσίες είναι πολικές, με εξαίρεση τους κηρούς και τα έλαια. Οι παλαιότερες πολυδύναμες μέθοδοι χρησιμοποιούσαν μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας, ώστε πολικές και μη πολικές ουσίες να εκχυλίζονται ταυτόχρονα. Συνέπεια της χρήσης τέτοιων μιγμάτων ήταν η ταυτόχρονη συνεκχύλιση φυτικών ιστών και η δημιουργία γαλακτωμάτων.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η επιλογή του κατάλληλου εκχυλιστικού μέσου στις πολυϋπολειμματικές μεθόδους. Από τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που μπορεί να έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγική διαδικασία ή μετασυλλεκτικά ή να περιέχονται στο δείγμα σαν συνέπεια προγενέστερων χρήσεων και ρύπανσης του περιβάλλοντος, άλλα είναι πολικά άλλα μη πολικά κι άλλα μέσης πολικότητας. Επομένως, το εκχυλιστικό μέσο πρέπει να έχει την κατάλληλη σύνθεση ώστε να μπορεί να εκχυλίσει ουσίες με διαφορετική πολικότητα.

Για να πετύχουμε ικανοποιητική εκχύλιση χρησιμοποιούμε ομογενοποιητή μεγάλων ταχυτήτων (4000-5000 στροφές/λεπτό). Η εκχύλιση των φυτικών ιστών πραγματοποιείται είτε σε κλειστά δοχεία τύπου «omni mixer» είτε σε ανοικτά τύπου «ultra turax».

Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας, το διχλωρομεθάνιο, η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Το ακετονιτρίλιο δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα λόγω της μεγάλης του πολικότητας, ωστόσο είναι περισσότερο τοξικό και για το λόγο αυτό έχει αντικατασταθεί από την ακετόνη. Η ακετόνη εξατμίζεται ευκολότερα, είναι λιγότερο τοξική, αλλά έχει μεγάλη συνεκχυλιστική ικανότητα. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι κατάλληλος για εκχύλιση πολικών και μη πολικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων και γενικά δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα από την ακετόνη. Συχνά χρησιμοποιούνται και μίγματα διαλυτών όπως οξικός αιθυλεστέρας με εξάνιο, ισοπροπανόλη με τολουόλιο κ.α.

3. Διήθηση

Το προϊόν της εκχύλισης αποτελείται από τους φυτικούς ιστούς τεμαχισμένους σε πολύ μικρά σωματίδια (στερεή φάση) και την υγρή φάση. Για το λόγο αυτό διηθείται, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια.

4. Καθαρισμός του εκχυλίσματος

Το εκχύλισμα που λαμβάνεται από τη φάση της εκχύλισης περιέχει τον/τους διαλύτη/διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση, το νερό που περιέχεται στους ιστούς, φυτικές ουσίες που έχουν συνεκχυλιστεί (χρωστικές, κηροί, αιθέρια έλαια κ.α.). Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών ουσιών, θα πρέπει να απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες ουσίες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι καθαρισμού του εκχυλίσματος ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φυτοπροστατευτικού προϊόντος και των συνεκχυλισμάτων.

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι:

Κατανομή μεταξύ δύο υγρών (εκχύλιση υγρού-υγρού), χρωματογραφία προσρόφησης, χρωματογραφία πηκτής ή μοριακού διαχωρισμού, εκχύλιση στερεάς φάσης, σαρωτική συναπόσταξη.

5. Συμπύκνωση

Ο τελικός όγκος του διαλύματος που παραλαμβάνουμε από το στάδιο του καθαρισμού απαιτείται συνήθως να συμπυκνωθεί σε μικρό όγκο 1-10 ml. Η συμπύκνωση γίνεται είτε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως μέχρι 40°C, για να μη διασπάται η ουσία, είτε με ρεύμα

καθαρού αζώτου όταν πρόκειται για μικρούς όγκους πτητικών διαλυτών. Στην περίπτωση που μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί αλλαγή διαλύτη, η συμπύκνωση γίνεται μέχρι ξηρού κι έπειτα προστίθεται ο νέος διαλύτης.

6. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

Από τη δεκαετία του 1970 και μετά η μεθοδολογία προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων γνώρισε αλματώδη πρόοδο που βασίζεται κυρίως στη χρήση εξειδικευμένων τεχνικών. Οι τεχνικές αυτές είναι κυρίως η αέρια χρωματογραφία (GC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η φασματογραφία μάζας (MS).

4.9 Ενόργανες τεχνικές προσδιορισμού υπολειμμάτων

Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

Με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, μικρή ποσότητα (1-2 μ l) από το καθαρό εκχύλισμα εγχύεται στην κορυφή θερμαινόμενης ειδικής στήλης χρωματογραφίας τοποθετημένης σε κλίβανο. Το εκχύλισμα μεταπίπτει σε αέρια φάση. Ένα αδρανές αέριο (συνήθως άζωτο ή ήλιο) κινείται μέσα στη στήλη και παρασύρει τους ατμούς δείγματος. Ο χρόνος παραμονής κάθε ουσίας στη στήλη (χρόνος κατακράτησης) είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων της και είναι το κριτήριο για τον ποιοτικό προσδιορισμό. Το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται από κατάλληλα όργανα στην έξοδο της στήλης, είναι το κριτήριο για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Το σήμα καταγράφεται υπό μορφή κορυφής. Το ύψος της κορυφής ή καλύτερα η επιφάνεια χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για φυτοπροστατευτικά προϊόντα που έχουν ικανοποιητική πτητικότητα και θερμική σταθερότητα. Τα βασικά μέρη ενός συστήματος αέριας χρωματογραφίας είναι οι φιάλες παροχής αερίων (οβίδες), ο εγχυτής, ο φούρνος, η χρωματογραφική στήλη, ο ανιχνευτής και το καταγραφικό. Ο εγχυτής είναι το εξάρτημα μέσα στο οποίο γίνεται η έγχυση του δείγματος. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι τριχοειδείς, διαμέτρου 0,22-0,50 mm και μήκους 15-50m. Η πολικότητα των στηλών είναι καθοριστική για την ανάλυση. Η χρησιμοποίηση στηλών διαφορετικής πολικότητας, συνίσταται σαν η πιο απλή κι

αξιόπιστη μέθοδος ταυτοποίησης κι επιβεβαίωσης των χρωματογραφικών ευρημάτων.

Ο ανιχνευτής είναι το εξάρτημα που ανιχνεύει τις ουσίες στην έξοδο της στήλης. Οι ανιχνευτές είναι είτε εξειδικευμένοι για ορισμένα άτομα των μορίων ή μη εξειδικευμένοι. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία για αναλύσεις υπολειμμάτων, είναι:

- Ανιχνευτής αζώτου – φωσφόρου (NPD) που είναι εξειδικευμένος για ουσίες που περιέχουν άζωτο ή φώσφορο στο μόριο τους.
- Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων (ECD) είναι πολύ ευαίσθητος ανιχνευτής για πολλές ενώσεις και γι' αυτό τα εκχυλίσματα που θα προσδιοριστούν με αυτόν πρέπει να είναι πολύ καθαρά, χρησιμοποιείται κυρίως για αναλύσεις ενώσεων που περιέχουν O, S, P και αλογόνα.
- Ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας (FPD) χρησιμοποιώντας το κατάλληλο φίλτρο φωσφόρου ή θείου προσδιορίζονται ουσίες που περιέχουν στο μόριο τους φώσφορο ή θείο. Είναι ανιχνευτής πολύ εξειδικευμένος, υστερεί όμως σε ευαισθησία.

Το καταγραφικό καταγράφει υπό μορφή κορυφής το σήμα. Στα σύγχρονα όργανα όλες οι παράμετροι ρυθμίζονται με σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή όπου καταγράφονται και οι κορυφές. Με κατάλληλο software γίνεται η επεξεργασία των χρωματογραφικών σημάτων και προκύπτουν τα αποτελέσματα.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται γενικά για φυτοφάρμακα που δε μπορούν να προσδιοριστούν με αέρια χρωματογραφία, είτε λόγω θερμικής αστάθειας, είτε λόγω χαμηλής πτητικότητας, είτε λόγω μεγάλης πολικότητας. Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας έχει αρκετά κοινά σημεία με την αέρια χρωματογραφία, όμως διαφέρει στο ό,τι η ουσία παραμένει στην ίδια κατάσταση που είχε κατά την έγχυση, η δε κινητή φάση είναι υγρή (διαλύτης ή μίγμα διαλυτών και νερού και ρυθμιστικών διαλυμάτων).

Διακρίνονται δύο μορφές της τεχνικής:

- Κανονικής φάσης (Normal Phase, NP)
- Αντίστροφης φάσης (Reversed Phase, RP)

Κριτήριο της μιας ή της άλλης επιλογής, είναι η σχετική πολικότητα μεταξύ της σταθερής φάσης (του υλικού πλήρωσης της στήλης) και της κινητής φάσης.

Στην έξοδο της στήλης είναι συνδεδεμένος ο ανιχνευτής. Χρησιμοποιείται κυρίως ο ανιχνευτής απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV/Vis) σταθερού ή ποικίλου μήκους κύματος (200-350 nm). Μειονεκτεί σε σχέση με τους ανιχνευτές της αέριας χρωματογραφίας στο ό,τι είναι μη εκλεκτικός κι όχι αρκετά ευαίσθητος. Μια σύγχρονη βελτιωμένη μορφή του, ο ανιχνευτής υπεριώδους με φωτοδιόδους UV-Diode Array Detector (UV-DAD), είναι περισσότερο εκλεκτικός, μικρής όμως ευαισθησίας.

Φασματογραφία Μάζας (Mass Spectrometry, MS)

Με την τεχνική αυτή τα οργανικά μόρια οδηγούνται σε ένα χώρο όπου βομβαρδίζονται με ηλεκτρόνια, με συνέπεια την αποικοδόμηση τους και το σχηματισμό μοριακών ιόντων. Τα μοριακά ιόντα μετατρέπονται περαιτέρω σε κατιόντα και ουδέτερα μέρη. Τα θετικά φορτισμένα ιόντα διαχωρίζονται σε ένα μαγνητικό πεδίο και καταγράφονται ποσοτικά. Ο διαχωρισμός των ιόντων βασίζεται στη σχέση μάζας: ηλεκτρικού φορτίου και η όλη διαδικασία οδηγεί στην καταγραφή του φάσματος μάζας. Σήμερα οι φασματογράφοι μάζας είναι συζευγμένοι με τα συστήματα αέριας και υγρής χρωματογραφίας παίρνοντας τη θέση των ανιχνευτών.

4.10 Αξιολόγηση μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων

Αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης και η εξέταση της ανταπόκρισής της προς προδιαγραφές (specifications) για να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (fitness for purpose).

-Ορθότητα (accuracy)

Σύμφωνα με τον ΕΛΟΤ, η ορθότητα μιας μεθόδου είναι το ποσοστό προσέγγισης των αποτελεσμάτων που επιτυγχάνονται με αυτή τη μέθοδο σε διαφορετικά δείγματα σε σχέση με την πραγματική τιμή. Η διαφορά μεταξύ πειραματικής και πραγματικής τιμής που αντιστοιχεί στην απόλυτη ακρίβεια (ή απόλυτο σφάλμα), μπορεί να οφείλεται σε τυχαίο ή καθορισμένο σφάλμα. Η ορθότητα εκφράζεται με το ποσοστό επανάκτησης (recovery rate) που προκύπτει συνήθως από πειράματα ανάκτησης. Συγκεκριμένα γνωστή ποσότητα του υπό μελέτη φαρμάκου προστίθεται σε ένα

αλεσμένο δείγμα που είναι γνωστό ότι δεν περιέχει τέτοια υπολείμματα. Το δείγμα αναλύεται με την υπό δοκιμή μέθοδο, γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός των υπολειμμάτων που ανιχνεύθηκαν και η ποσότητα που θα προσδιοριστεί συγκρίνεται με την ποσότητα που έχει προστεθεί. Ποσοστό ανάκτησης 100% είναι η ιδανική περίπτωση. Όμως αυτό δεν είναι πάντα δυνατό. Τα αποδεκτά εύρη επανάκτησης κυμαίνονται από 70-110%.

-Ακρίβεια (precision)

Σύμφωνα με τον ΕΛΟΤ, ο όρος ακρίβεια της μεθόδου είναι η δυνατότητα να επιτυγχάνονται επαναλήψιμα αποτελέσματα από τον ίδιο αναλυτή, κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας πρέπει να γίνουν τουλάχιστον 5 ίδιες αναλύσεις. Η επαναληψιμότητα εκτιμάται με την % σχετική τυπική απόκλιση (RSD). Μια ακόμη εκτίμηση της ακρίβειας είναι διά της αναπαραγωγιμότητας (reproducibility), η οποία εκφράζει την ικανότητα της αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων από άλλους αναλυτές σε βάθος χρόνου και εκτιμάται η % σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα προκύπτουν και αυτές από πειράματα ανάκτησης.

-Εξειδίκευση (specificity)

Είναι η ικανότητα της μεθόδου να επιτρέπει με αξιοπιστία τον προσδιορισμό του μητρικού μορίου και των μεταβολιτών που πρέπει να προσδιοριστούν. Η εξειδίκευση δηλώνει ακόμα τον αριθμό των ουσιών που μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο.

-Ευαισθησία (sensitivity)

Η ευαισθησία δείχνει τη μικρότερη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί. Όσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία τόσο μικρότερο είναι το όριο ανίχνευσης. Η ευαισθησία δίνεται συνήθως ως η κλίση της καμπύλης αναφοράς.

-Εκλεκτικότητα (selectivity)

Είναι η ικανότητα μιας αναλυτικής μεθόδου να προσδιορίζει μια ουσία (αναλυτής) παρουσία άλλων ουσιών.

-Γραμμικότητα του ανιχνευτή (Linearity)

Συνήθως οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στους προσδιορισμούς υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων δε δίνουν ευθύγραμμη απόκριση σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων. Είναι απαραίτητο να προσδιοριστούν ακριβώς τα εύρη των συγκεντρώσεων, στα οποία η απόκριση των ανιχνευτών είναι ανάλογη της πραγματικής συγκέντρωσης στο δείγμα. Αυτά τα εύρη είναι η γραμμικότητα της μεθόδου υπό τις δεδομένες συνθήκες.

-Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Detection Limit-DL, Limit of Quantitation-LOQ or Limit of Determination-LOD)

Οι διάφορες μέθοδοι επιτρέπουν την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων που υπάρχουν στο δείγμα πάνω από κάποια συγκέντρωση. Αν το όργανο δεν αποκρίνεται για κάποιο φυτοφάρμακο σε κάποιο δείγμα, αυτό δε σημαίνει ότι το δείγμα δεν περιέχει καθόλου το εν λόγω φυτοφάρμακο, αλλά ότι ίσως είναι τέτοια η συγκέντρωση του που δεν μπορεί να ανιχνευθεί. Σε αυτήν την περίπτωση μιλάμε για μη ανιχνεύσιμα υπολείμματα. Η ελάχιστη ποσότητα κάθε φυτοφαρμάκου που είναι δυνατόν να ανιχνευθεί με κάθε μέθοδο είναι στοιχείο μεγάλης σημασίας, μεγαλύτερης σημασίας είναι όμως η ελάχιστη ποσότητα η οποία μπορεί να προσδιοριστεί (ποσοτικά).

Όριο ανίχνευσης (DL): είναι η ελάχιστη συγκέντρωση στο δείγμα που μπορεί να ανιχνευθεί ποιοτικά με την εν χρήσει μέθοδο. Πρακτικά θεωρείται ως όριο ανίχνευσης η ποσότητα του συστατικού που δίνει σήμα διπλάσιο ή τριπλάσιο από το θόρυβο του σήματος.

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOD ή LOQ): είναι η ελάχιστη συγκέντρωση που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με αξιοπιστία (ακρίβεια και ορθότητα). Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού ορίζεται η ποσότητα εκείνη του συστατικού που μας δίνει σήμα δεκαπλάσιο από τον θόρυβο και καλύπτει τις απαιτήσεις αξιοπιστίας. Σε κάθε άλλη περίπτωση ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού λαμβάνεται το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο από τα πειράματα ανάκτησης προκύπτει ικανοποιητική ακρίβεια και ορθότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Περιγραφή πειράματος

5.1 Σκοπός

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν

α) η αξιολόγηση μιας αναλυτικής μεθοδολογίας για τον έλεγχο υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών ουσιών στο μήλο και ιδιαίτερα τεσσάρων ουσιών, τριών εντομοκτόνων (chlorpyrifos-ethyl, deltamethrin και indoxacarb) και ενός μηκυτοκτόνου (boscalid).

β) η παρακολούθηση των υπολειμμάτων των ανωτέρω ουσιών στα μήλα κατά τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης και την καταγραφή της υποβάθμισης τους με το χρόνο, καθώς και κατά το στάδιο της «ζωής στο ράφι».

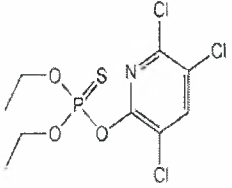
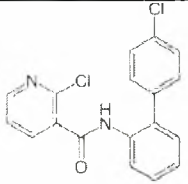
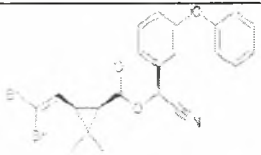
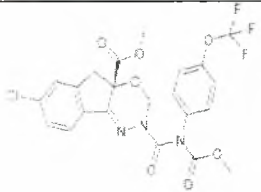
γ) η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης των συνθηκών της ψυχοσυντήρησης (ψυχοσυντήρηση σε ατμόσφαιρα όξοντος και ψυχοσυντήρηση χωρίς όξον) στην υποβάθμιση (απομείωση) των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών ουσιών.

5.2 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα και οι εφαρμογές τους στα μήλα

Τα εμπορικά σκευάσματα που εφαρμόστηκαν μετασυλλεκτικά (με εμβάπτιση) στα μήλα ήταν τα ακόλουθα:

- Dursban 480 EC, το οποίο περιέχει 48% δραστική ουσία chlorpyrifos-ethyl, υπό μορφή γαλακτοποιήσιμου πυκνού εναιωρήματος. Η εμβάπτιση έγινε σε υδατικό διάλυμα του παραπάνω σκευάσματος με δόση 100 mL/100 L νερού.
- Bellis WG, το οποίο περιέχει 25,2% δραστική ουσία boscalid, υπό μορφή εναιωρηματοποιήσεων κόκκων. Η εμβάπτιση έγινε σε υδατικό διάλυμα του παραπάνω σκευάσματος με δόση 100g σκόνης/100 L νερού.
- Decis Protech 1,5 EW, το οποίο περιέχει 1,5% δραστική ουσία deltamethrin, υπό μορφή εναιωρήματος. Η εμβάπτιση έγινε σε υδατικό διάλυμα του παραπάνω σκευάσματος με δόση 165 ml/ 100 L νερού.
- Steward 30 WG, το οποίο περιέχει 30% δραστική ουσία indoxacarb, υπό μορφή εναιωρηματοποιήσιμων κόκκων. Η εμβάπτιση έγινε σε υδατικό διάλυμα του παραπάνω σκευάσματος με δόση 33 gr σκόνης/100 L νερού.

Πίνακας 1: Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα – Δραστικές Ουσίες

Μοριακός Τύπος	Δραστική Ουσία	Κατηγορία	Σκεύασμα	Δράση
	Chlorpyrifos-ethyl	Οργανοφωσφορικά	Dursban 480 EC	Αναστέλλει τη δραστηριότητα του <u>ενζύμου</u> ακετυλοχολινεστεράση.
	Boscalid	Καρβοξαμίδια	Bellis WG	Αναστέλλει τη δραστηριότητα του <u>ενζύμου αναγωγή ηλεκτρικό-ουμπικινόνη</u> .
	Deltamethrin	Συνθετικά Πυρεθροειδή	Decis Protech 1,5 EW	Μη διασυστηματικό ισχυρό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου
	Indoxacarb	Οξαζιαδίνες	Steward 30 WG	Δρα στους διαύλους ιόντων νατρίου και στους νευροάξονες των νευρικών κυττάρων

Το chlorpyrifos-ethyl ανήκει στην ομάδα των οργανοφωσφορικών παραγώγων είναι ένα μη διασυστηματικό εντομοκτόνο κι ακαρεοκτόνο επαφής, στομάχου και ασφυκτικό, ευρέως φάσματος δράσης, αποτελεσματικό κατά κολεόπτερον, δίπτερον, ομόπτερον και λεπιδόπτερον σε πολλές καλλιέργειες.

Το boscalid ανήκει στην ομάδα των καρβοξαμιδικών, είναι μυκητοκτόνο με διασυστηματικές ιδιότητες και είναι αποτελεσματικό για την καταπολέμηση ασθενειών προκαλούμενων από φυτοπαθογόνα των γενών: *Botrytis*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Monilia* καθώς και ωιδίων σε πολλές καλλιέργειες οπωροφόρων, κηπευτικών και καλλωπιστικών.

Το deltamethrin ανήκει στην ομάδα των πυρεθροειδών, είναι μη διασυστηματικό ισχυρό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου. Είναι αποτελεσματικό σε ευρύ φάσμα εντόμων και σε πολλές καλλιέργειες.

Το indoxacarb ανήκει στην ομάδα των οξαδιαζινών, είναι εντομοκτόνο επαφής και στομάχου αποτελεσματικό στην καταπολέμηση των λεπιδοπτέρων σε πολλές καλλιέργειες. Δρα στους διαύλους ιόντων νατρίου και στους νευροάξονες των

νευρικών κυττάρων. Δρα στα προνυμφικά στάδια των εντόμων και οι προνύμφες σταματούν να τρέφονται, παραλύουν και πεθαίνουν.

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία επελέγησαν με βάση τα εφαρμοζόμενα προϊόντα στα μήλα κατά τις τελευταίες επεμβάσεις πριν τη συγκομιδή τους.

5.3 Μεταχειρίσεις, Ψυχοσυντήρηση και Δειγματοληψία

Το πείραμα έγινε σε μήλα της ποικιλίας Granny Smith, από την περιοχή της Ζαγοράς Πηλίου και η ψυχοσυντήρηση τους στις εγκαταστάσεις του Αγροτικού Συνεταιρισμού Ζαγοράς Πηλίου.

Επειδή ο σκοπός του πειράματος ήταν η πορεία των υπολειμμάτων στα μήλα για το χρονικό διάστημα και τις συνθήκες της ψυχοσυντήρησης των μήλων προτιμήθηκε η εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων να γίνει μετασυλλεκτικά ώστε να εκμηδενιστεί η παράμετρος της παραλλαγής των ψεκασμών αγρού, αλλά και να αποφευχθεί η πιθανή απομείωση των υπολειμμάτων στους καρπούς μέχρι τη συγκομιδή τους και την εισαγωγή τους στη ψυχοσυντήρηση. Η εφαρμογή έγινε μια ημέρα μετά τη συγκομιδή των μήλων (Οκτώβριος 2012) με εμβάπτιση τους σε υδατικό διάλυμα των προαναφερομένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε θερμοκρασία διαλύματος 23-24 °C και για χρονικό διάστημα εμβάπτισης 4 min. Τα μήλα μετά την εμβάπτιση αφέθηκαν στον περιβάλλοντα χώρο για περίπου 50-60 min για να στεγνώσουν και κατόπιν τοποθετήθηκαν σε κλούβες και σε παλέτα και εισήχθησαν στη ψυχοσυντήρηση σε θερμοκρασία 0 ± 1 °C και σχετική υγρασία 90-95 %. Το σύνολο των εμβαπτισμένων μήλων διαιρέθηκε στα δύο και αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικούς θαλάμους ψυχοσυντήρησης. Η μισή ποσότητα μήλων τοποθετήθηκε σε θάλαμο ψυχοσυντήρησης με ατμόσφαιρα όζοντος συγκέντρωσης 50-60ppb και η άλλη μισή ποσότητα σε κοινό θάλαμο ψύξης (δύο πειραματικές μεταχειρίσεις). Έτσι το πείραμα έχει δύο πειραματικές μεταχειρίσεις, που είναι τα εμβαπτισμένα μήλα που διατηρήθηκαν σε απλή ψυχοσυντήρηση (μάρτυρας) και αυτά που διατηρήθηκαν σε ψυχοσυντήρηση σε ατμόσφαιρα όζοντος. Και στις δύο μεταχειρίσεις δεν υπήρξε καμία άλλη μετασυλλεκτική επεξεργασία στα μήλα του πειράματος στους θαλάμους ψυχοσυντήρησης τους.

Η παρακολούθηση της πορείας των υπολειμμάτων στα μήλα και των δύο μεταχειρίσεων έγινε με ανάλυση μήλων που λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά

διαστήματα μετά την εισαγωγή τους στη ψυχοσυντήρηση και για ένα χρονικό διάστημα περίπου έξι μηνών. Συγκεκριμένα οι δειγματοληψίες στα συντηρούμενα μήλα (κοινές δειγματοληψίες και για τις δύο μεταχειρίσεις) πραγματοποιήθηκαν μετά από 15, 50, 75, 82, 100, 125, 157, 180 και 187 ημέρες ψυχοσυντήρησης. Δείγματα επίσης ελήφθησαν και κατά την ημέρα της εμβάπτισης λίγο πριν την εισαγωγή των μήλων στην ψυχοσυντήρηση (ημέρα 0). Επίσης, κατά τη δειγματοληψία στις 75, 150 και 180 ημέρες ψυχοσυντήρησης ελήφθησαν επιπλέον δείγματα μήλων τα οποία αφέθηκαν σε συνθήκες δωματίου υπό σκιά για μια εβδομάδα (ζωή στο ράφι) και μετά πραγματοποιήθηκε η ανάλυσή τους για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων, προσομοιάζοντας με αυτό τον τρόπο τις συνθήκες κατανάλωσης του προϊόντος.

Σε κάθε δειγματοληψία και για κάθε μεταχείριση λαμβάνονται 15 μήλα συνολικού βάρους ~4 kg τα οποία ακολούθως χωρίζονται σε 3 υποδιαιρούμενα σύνολα (3 επαναλήψεις a, b,c) ώστε να ελεγχθεί η παραλλακτικότητα για κάθε δειγματοληψία. Όλα τα δείγματα μήλων επεξεργάστηκαν εντός των 24 ωρών από την έξοδό τους από τη ψυχοσυντήρηση και τα αναλυτικά δείγματα τοποθετούνταν στον καταψύκτη μέχρι την ανάλυσή τους.

Για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων στο φυτικό ιστό των καρπών ελέγχθηκε αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού των υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb στα υπό μελέτη υποστρώματα μήλων με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή δέσμμευσης ηλεκτρονίων (Gas Chromatography – electron capture detector, GC-ECD) μετά από εκχύλισή τους με κατανομή στην ακετόνη.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με Microsoft Office Excel 2007.

5.4 Προετοιμασία των δειγμάτων για ανάλυση

Τα συλλεχθέντα δείγματα (αρχικό δείγμα) των μήλων μεταφέρονταν στο εργαστήριο, όπου ακολουθούσε ζύγιση, καταγραφή των μεγεθών (αριθμός και βάρος), μείωση του αρχικού δείγματος σε εργαστηριακό δείγμα με τη μέθοδο των τεταρτημορίων, τεμαχισμός κι ομογενοποίηση με κοινό οικιακό blender. Στη συνέχεια, μέρος από το ομογενοποιημένο εργαστηριακό δείγμα (περίπου 50-70g) μεταφέρονταν σε αποστειρωμένα σακουλάκια (αναλυτικό δείγμα), αναγράφονταν τα στοιχεία του δείγματος και φυλάσσονταν στην κατάψυξη στους -22°C μέχρι την ανάλυσή τους.

(αναλυτικό δείγμα). Πρέπει να σημειωθεί ότι από όλους τους καρπούς πριν από την ομογενοποίηση τους γινόταν αφαίρεση των ποδίσκων συγκράτησης τους στο δέντρο.

5.5 Διαλύτες και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

Διαλύτες(κατηγορίας pesticide residues analysis):

Ακετόνη
Διχλωρομεθάνιο
Πετρελαϊκός αιθέρας
Τολουόλιο
Ισο- οκτάνιο
Τριμεθυλο-πεντάνιο

Πρότυπες ουσίες: chlorpyrifos-ethyl (καθαρότητας 99,5%), boscalid (καθαρότητας 97,5%), deltamethrin (καθαρότητας 98,5%) και indoxacarb (καθαρότητας 98,5) της εταιρείας Riedel-de Haën, (Seezle, Germany).

- Πρότυπα διαλύματα των παραπάνω ουσιών. Παρασκευάστηκαν μητρικά πρότυπα διαλύματα 1000 µg/ml σε μεθανόλη και από αυτά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας 100 µg/ml σε μεθανόλη τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων μικρότερης συγκέντρωσης (0,001 – 0,10 µg/mL) για τη βαθμονόμηση του χρωματογραφικού σήματος. Επίσης, από τα μητρικά πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν και πρότυπα διαλύματα εργασίας 10 µg/ml σε μεθανόλη για τα πειράματα ανάκτησης.

Πρότυπα διαλύματα των παραπάνω ουσιών σε εκχύλισμα υποστρώματος μήλου για να ελεγχθεί το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος (matrix effect) στη χρωματογραφική ανάλυση. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος συγκέντρωσης 0,001 µg/ml, 0,005 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,05 µg/ml και 0,10 µg/ml.

Για τα πειράματα των ανακτήσεων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μάρτυρα, τα οποία φορτίστηκαν με την κατάλληλη ποσότητα πρότυπου διαλύματος εργασίας. Κάθε φόρτιση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν (τρεις επαναλήψεις).

5.6 Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

- ✓ Ηλεκτρική συσκευή blender για την κοπή και πολτοποίηση των μήλων.
- ✓ Ομογενοποιητής Ultra Turrax, στην εκχύλιση των φυτικών ιστών.
- ✓ Φυγόκεντρος, στη φυγοκέντρηση των εκχυλισμάτων.
- ✓ Συσκευή συμπίκνωσης με ρεύμα αζώτου στην ξήρανση – συμπίκνωση του εκχυλίσματος.
- ✓ Σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή ECD.

Για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογράφου της Agilent με ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων (ECD) και εισαγωγή splitless. Ο διαχωρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου HP-5 (5% phenyl-methylpolysiloxane) 30m x 0.32mm x 0.25μm. Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε H/Y με το πρόγραμμα Chem Station. Οι συνθήκες λειτουργίας του οργάνου ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία «splitless».
- Θερμοκρασία εγχυτή 230 °C.
- Όγκος έγχυσης δείγματος 1 μL.
- Θερμοκρασία ανιχνευτή 320 °C.
- Αέρια ανιχνευτή: H₂ (6,0 mL/ min), make up N₂ (60 mL/ min).
- Φέρον αέριο άζωτο, με ροή 1.7 mL/ min.
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης: αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 50 °C και διατήρησή της για 1,0 min. Αύξηση με ρυθμό 20 °C/ min μέχρι τους 180 °C και παραμονή για 1,0 min, αύξηση με ρυθμό ανόδου 3 °C/ min μέχρι τους 200 °C και διατήρησή της για 6min, αύξηση με ρυθμό ανόδου 6 °C/ min μέχρι τους 250 °C και παραμονή για 8 min. Τέλος, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 10 °C/ min μέχρι τους 275 °C και διατήρησή της για 5 min. Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού προγράμματος της ανάλυσης ήταν 45 min.

Για την επιβεβαίωση των χρωματογραφικών ευρημάτων σχετικών με τα chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογράφου της Hewlett Packard με στήλη διαφορετικής πολικότητας, τύπου BPX-35 και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων.

5.7 Διαδικασία εκχύλισης δειγμάτων

Για την ανάλυση των δειγμάτων των μήλων και για τον προσδιορισμό των chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος στα πλαίσια της αναλυτικής μεθοδολογίας προσδιορισμού υπολειμμάτων (FAO, 1996).

Ζύγιση 5 g ιστού ομογενοποιημένου δείγματος μήλων μέσα σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρωσης.

Προσθήκη 10 mL ακετόνης, 10 mL πετρελαϊκού αιθέρα και 10 mL διχλωρομεθανίου και ομογενοποίηση σε Ultra Turrax (8000rad/min) για 60 sec.

Φυγοκέντρωση των σωλήνων για 5 min.

Λήψη 200 μL εκχυλίσματος εισαγωγή σε φιαλίδια χρωματογραφίας και μεταφορά τους σε συσκευή συμπύκνωσης με ρεύμα αζώτου για συμπύκνωση μέχρι ξηρού.

Προσθήκη 1mL ισοοκτανίου-τολουολίου (9:1) και ανακίνηση.

Χρωματογραφική ανάλυση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα – Συζήτηση

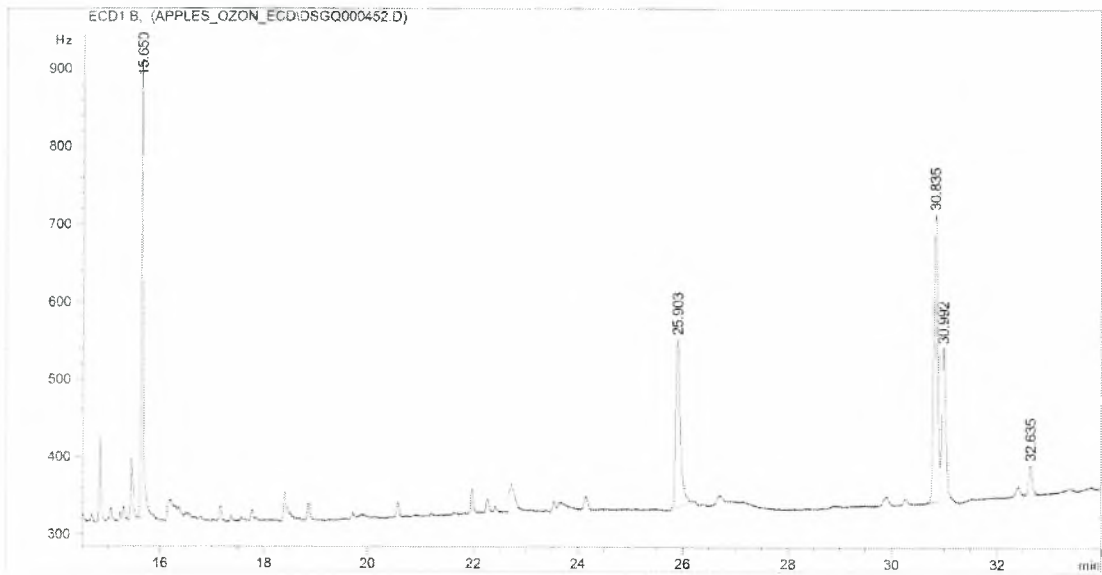
6.1 Ποιοτική ανάλυση

Η ταυτοποίηση των chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb στα χρωματογραφήματα του συστήματος GC-ECD έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης τους. Οι χρόνοι κατακράτησης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων της μελέτης με τις εφαρμοζόμενες χρωματογραφικές συνθήκες είναι: 15,60 για το chlorpyrifos-ethyl, 25,80 για το boscalid, 30,80 για το deltamethrin, 31,0 για το indoxacarb I και 32,6 για το indoxacarb II, όπως φαίνεται και στα χρωματογραφήματα (Εικόνες 1, 2).

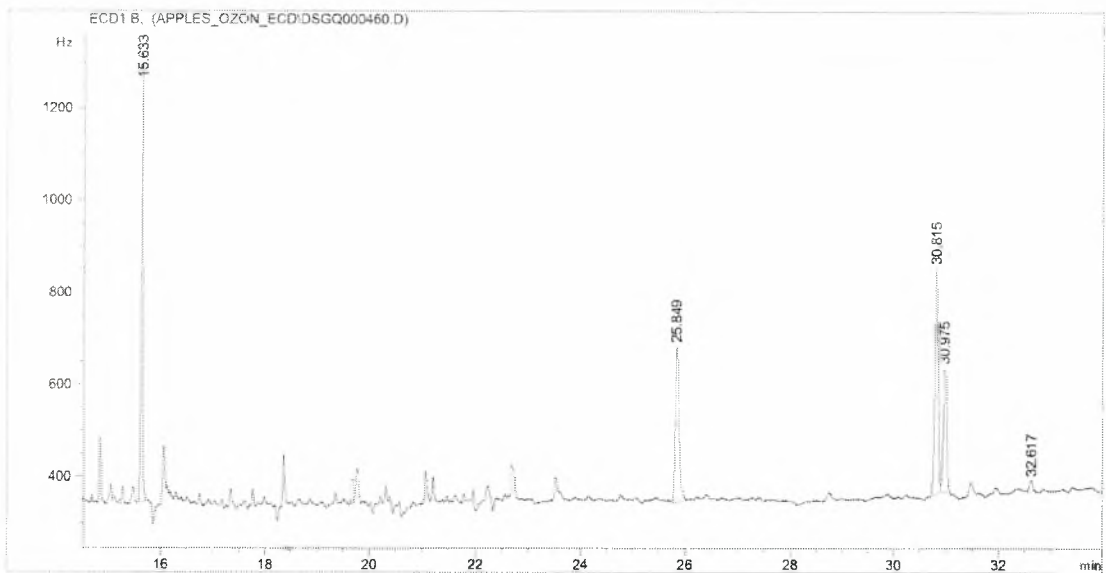
6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των τεσσάρων φυτοπροστατευτικών ουσιών στα δείγματα μήλου έγινε με την τεχνική του εξωτερικού προτύπου με τη χρήση καμπύλης αναφοράς. Παρήχθησαν οι καμπύλες αναφοράς με χρήση προτύπων διαλυμάτων σε διαλύτη ισοπεντάνιο-τολουόλιο αλλά και σε εκχύλισμα υποστρώματος και μελετήθηκαν η γραμμικότητα και η ευαισθησία του ανιχνευτή και αφετέρου η επίδραση του υποστρώματος για κάθε ουσία.

Για την ποσοτικοποίηση των χρωματογραφικών κορυφών χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος (επόμενη παράγραφος). Για την ουσία Indoxacarb ο ποσοτικός προσδιορισμός αφορά το άθροισμα των δύο ισομερών I και II.



Εικόνα 1: Χρωματογράφημα διαλύματος πρότυπων ουσιών συγκέντρωσης 0,005 µg/mL.



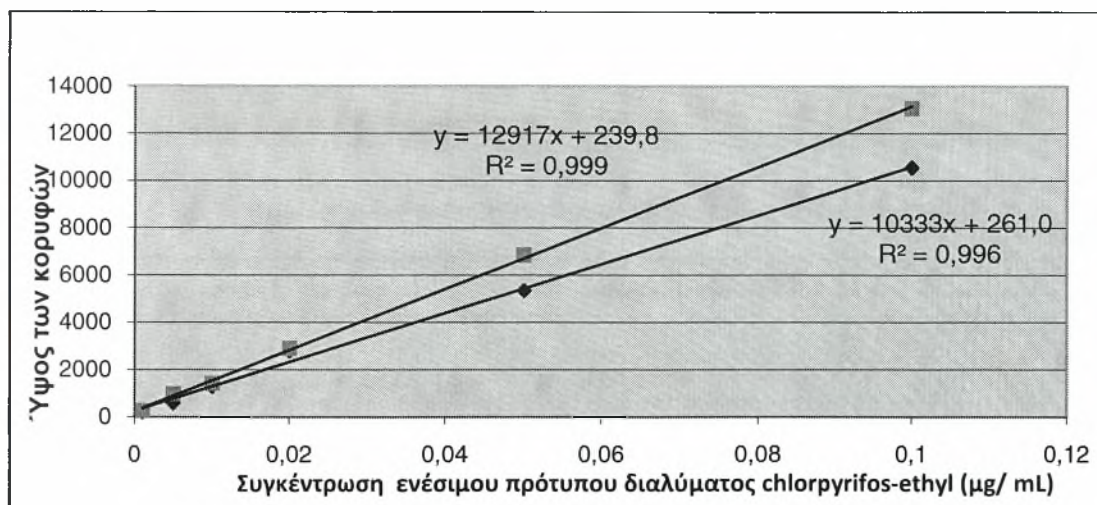
Εικόνα 2: Χρωματογράφημα διαλύματος πρότυπων ουσιών συγκέντρωσης 0,005 µg/mL σε εκχύλισμα υποστρώματος μήλου.

6.3 Πρότυπες καμπύλες - Επίδραση υποστρώματος

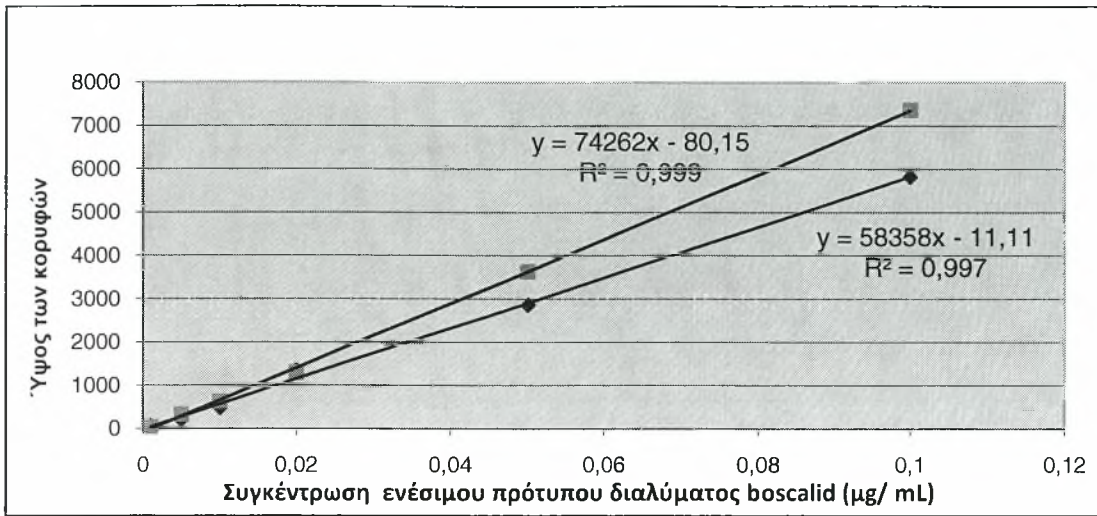
Στις τέσσερις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνες 3,4,5,6) παρουσιάζονται τα γραφήματα των καμπύλων αναφοράς (καμπύλες βαθμονόμησης – calibration curves), των chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb με χρήση πρότυπων διαλυμάτων σε διαλύτη καθώς και πρότυπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος για το σύστημα GC-ECD.

Επίσης, στα γραφήματα (Εικόνες 3,4,5,6) παρουσιάζονται και οι εξισώσεις συσχέτισης του χρωματογραφικού σήματος (ύψους των κορυφών) με τη συγκέντρωση των ενέσιμων διαλυμάτων καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης R^2 για κάθε εξίσωση, όπως προέκυψαν από την επεξεργασία με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

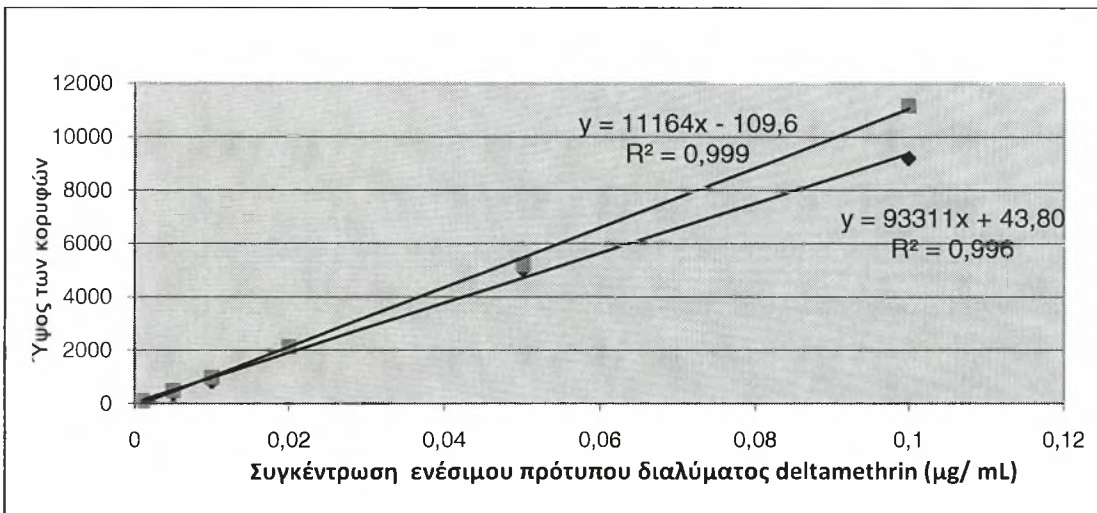
Οι χρωματογραφικές αποκρίσεις και για τις τέσσερις ουσίες παρουσιάζουν γραμμικότητα στην περιοχή συγκεντρώσεων μελέτης των φυτοπροστατευτικών ουσιών με πολύ καλές τιμές συντελεστών συσχέτισης, όπως εμφανίζονται στις αντίστοιχες εικόνες.



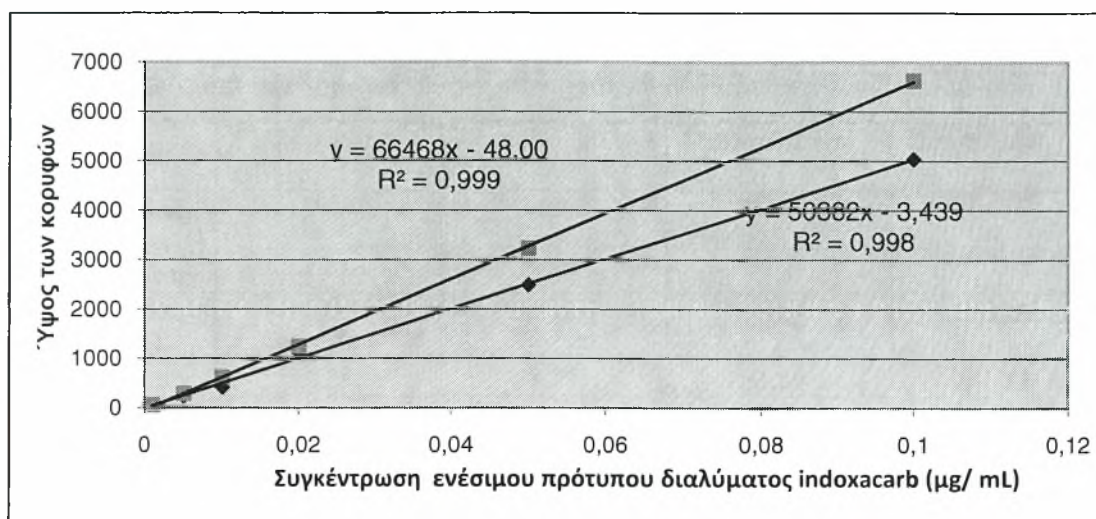
Εικόνα 3: Καμπύλη αναφοράς του συστήματος GC-ECD για πρότυπα διαλύματα chlorpyrifos-ethyl σε καθαρό διαλύτη (ρόμβοι) και σε εκχύλισμα υποστρώματος μήλου (τετράγωνα).



Εικόνα 4: Καμπύλη αναφοράς του συστήματος GC-ECD για πρότυπα διαλύματα boscalid σε καθαρό διαλύτη (ρόμβοι) και σε εκχύλισμα υποστρώματος μήλου (τετράγωνα).



Εικόνα 5: Καμπύλη αναφοράς του συστήματος GC-ECD για πρότυπα διαλύματα deltamethrin σε καθαρό διαλύτη (ρόμβοι) και σε εκχύλισμα υποστρώματος μήλου (τετράγωνα).



Εικόνα 6: Καμπύλη αναφοράς του συστήματος GC-ECD για πρότυπα διαλύματα indoxacarb σε καθαρό διαλύτη (ρόμβοι) και σε εκχύλισμα υποστρώματος μήλου (τετράγωνα).

Η αξιολόγηση της αναλυτικής μεθοδολογίας έγινε με τα πρότυπα διαλύματα σε εκχύλισμα υποστρώματος ώστε να γίνει έλεγχος για πιθανή επίδραση υποστρώματος στη χρωματογραφική απόκριση του ανιχνευτή στη ζώνη συγκεντρώσεων που αντιστοιχούσε στα επίπεδα των υπολειμμάτων στα μήλα των δειγματοληψιών μας. Αν σε κάθε ουσία ο λόγος της κλίσης της ευθείας σε εκχύλισμα υποστρώματος προς την κλίση της ευθείας σε διαλύτη είναι >1 , τότε έχουμε θετική επίδραση και αν είναι <1 αρνητική.

Όπως προκύπτει από τις καμπύλες βαθμονόμησης (σύγκριση κλίσεων μεταξύ της γραμμής τάσης σε εκχύλισμα υποστρώματος και της γραμμής τάσης των πρότυπων διαλυμάτων σε διαλύτη) για την κάθε ουσία χωριστά προκύπτει ότι υπάρχει θετική επίδραση του υποστρώματος στα επίπεδα των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν όπως φαίνεται και στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2). Η επίδραση αυτή κυμαίνεται από 20% για το deltamethrin έως 32% για το indoxacarb και επιβεβαιώνεται η ανάγκη χρήσης προτύπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα για τη βαθμονόμηση του χρωματογραφικού σήματος.

Πίνακας 2: Σύγκριση κλίσεων μεταξύ της γραμμής τάσης σε εκχύλισμα υποστρώματος και της γραμμής τάσης των πρότυπων διαλυμάτων σε διαλύτη

	Chlorpyrifos-ethyl	Boscalid	Deltamethrin	Indoxacarb
Κλίση ευθείας σε εκχύλισμα υποστρώματος	129176	74262	111645	66468
Κλίση ευθείας σε διαλύτη	103331	58358	93311	50382
Λόγος κλίσεων	1,25	1,27	1,20	1,32

6.4 Αξιολόγηση της μεθόδου

Η μέθοδος εκχύλισης και χρωματογραφικού προσδιορισμού των chlorpyrifos-ethyl, boscalid, delltamethrin και indoxacarb ελέγχθηκε ως προς την αξιοπιστία της με πειράματα ανάκτησης. Συγκεκριμένα, δείγματα μήλου (που ελέγχθηκαν για την απουσία των τεσσάρων ουσιών της μελέτης) εμβολιάστηκαν - φορτίστηκαν με γνωστή ποσότητα πρότυπου διαλύματος εργασίας των ουσιών αυτών, έτσι ώστε να προκύψουν τα εμβολιασμένα δείγματα σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (τρεις επαναλήψεις ανά επίπεδο).

Έπειτα, ακολούθησε η προαναφερόμενη μεθοδολογία εκχύλισης, ανάλυσης και προσδιορισμού της συγκέντρωσης των φυτοπροστατευτικών ουσιών που διερευνήθηκαν και σύγκριση της με τη συγκέντρωση εμβολιασμού για τον υπολογισμό της ανάκτησης και της επαναληψιμότητας.

Πίνακας 3: Ποσοστά ανάκτησης των chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) για n =3.

Δραστική ουσία	Επίπεδα εμβολιασμού			
	0,05 µg/g	0,20 µg/g	0,50 µg/g	1,0 µg/g
chlorpyrifos-ethyl	82 ± 9	94 ± 8	101 ± 6	94 ± 7
Boscalid	--	89 ± 8	95 ± 5	90 ± 9
Deltamethrin	79 ± 12	96 ± 10	103 ± 8	87 ± 9
Indoxacarb	--	94 ± 14	88 ± 11	78 ± 8

Οι τιμές ανάκτησης που προέκυψαν είναι ικανοποιητικές, διότι όταν η ανάκτηση κυμαίνεται μεταξύ 70% και 110% της συγκέντρωσης με την οποία φορτίστηκε το δείγμα τότε η ορθότητα της μεθόδου θεωρείται αποδεκτή και τα αποτελέσματα αξιόπιστα (Council Directive 94/43/EC, Greve, 1984). Επίσης οι τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων είναι <9% για το chlorpyrifos-ethyl, <8% για το boscalid, <12% για το deltamethrin και <14% για το indoxacarb τιμές οι οποίες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος που εφαρμόστηκε και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των τεσσάρων αυτών φυτοπροστατευτικών ουσιών σε μήλα εμφανίζει ικανοποιητική ακρίβεια.

Ως όρια ποσοτικοποίησης (Limits of Quantitation LOQ) ορίστηκαν, με βάση το δεκαπλάσιο του θορύβου χρωματογραφημάτων εκχυλισμάτων των υποστρωμάτων της μελέτης, αλλά και λαμβάνοντας υπόψη τη χαμηλότερη συγκέντρωση των πειραμάτων ανάκτησης με ικανοποιητική ορθότητα και ακρίβεια. Έτσι ως LOQ για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο ανάλυσης μήλων για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών ουσιών της μελέτης ορίζονται τα 0,05 mg a.i. /kg για το chlorpyrifos-ethyl, τα 0,20 mg a.i. /kg για το boscalid, τα 0,05 mg a.i. /kg για το deltamethrin και τα 0,20 mg a.i. /kg για το indoxacarb.

6.5 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων του chlorpyrifos-ethyl

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων μήλου του πειράματος ως προς το υπολειμματικό φορτίο των καρπών σε chlorpyrifos-ethyl στα μήλα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, που αποτελούν και τα δείγματα μάρτυρα, και στα μήλα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης με την επίδραση όζοντος παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5, αντίστοιχα, που ακολουθούν. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται η εξέλιξη των υπολειμμάτων του chlorpyrifos-ethyl για όλη τη διάρκεια του πειράματος και για τις δύο συνθήκες ψυχοσυντήρησης (με ή χωρίς ατμόσφαιρα όζοντος).

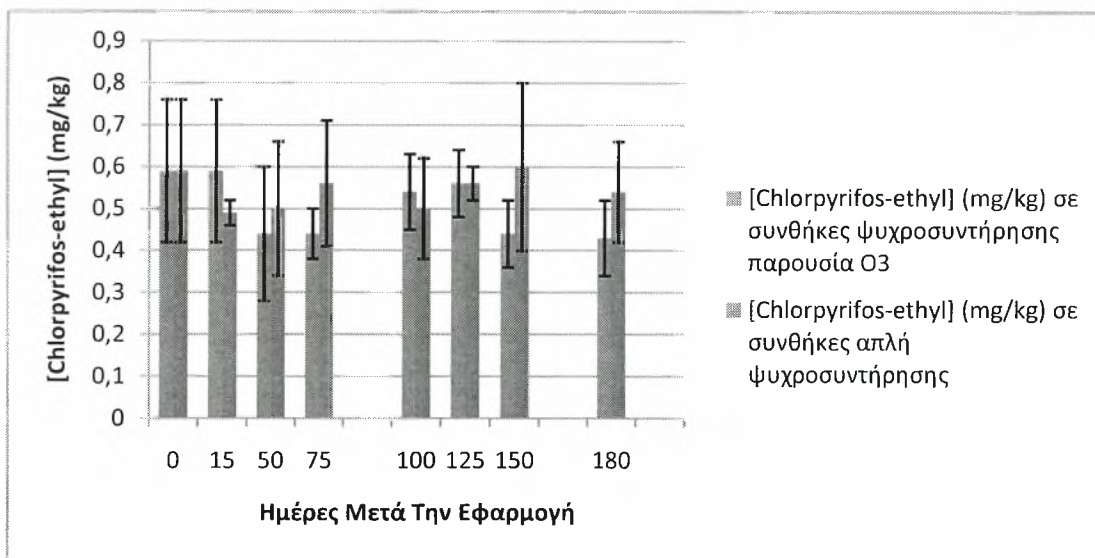
Η αρχική συγκέντρωση του chlorpyrifos-ethyl στα μήλα μετά την εμφάνιση των μύλων, βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,48 έως 0,78 mg a.i./kg, με μέση τιμή 0,59 mg a.i./kg, ενώ 180 ημέρες μετά την εφαρμογή δεν παρατηρήθηκε κάποια τάση συνεχούς απομείωσης της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας στα μήλα και των δύο μεταχειρίσεων. Συγκρίνοντας τις δύο μεταχειρίσεις χαμηλότερες τιμές υπολειμμάτων παρατηρούνται όταν στους θαλάμους υπάρχει η ατμόσφαιρα όζοντος, ιδιαίτερα στις 150 και 180 ΗΜΕ, αλλά αυτή η διαφοροποίηση δεν είναι έντονη.

Πίνακας 4: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl, τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith συντηρούμενα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης παρουσία όζοντος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (ΗΜΕ) και την εισαγωγή τους σε ψυχοσυντήρηση.

ΗΜΕ Ημέρες	Συγκέντρωση (mg/kg)	SD	RSD (%)
0	0,59	0,17	28,7
15	0,59	0,17	28,7
50	0,44	0,16	37,2
75	0,44	0,06	14,1
100	0,54	0,09	16,3
125	0,56	0,08	14,5
150	0,44	0,08	16,7
180	0,43	0,09	20,8

Πίνακας 5: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl, τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith συντηρούμενα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης απουσία όζοντος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και την εισαγωγή τους σε ψυχοσυντήρηση.

HME Ημέρες	Συγκέντρωση (mg/kg)	SD	RSD (%)
0	0,59	0,17	28,7
15	0,49	0,03	5,5
50	0,50	0,16	32,5
75	0,56	0,15	26,0
100	0,50	0,12	24,9
125	0,56	0,04	7,9
150	0,60	0,20	33,4
180	0,54	0,12	21,1



Εικόνα 7: Εξέλιξη της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων του Chlorpyrifos-ethyl σε μήλα συντηρούμενα σε διαφορετικές συνθήκες ψυχοσυντήρησης.

6.6 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων του boscalid

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων μήλου του πειράματος ως προς το υπολειμματικό φορτίο των καρπών σε boscalid στα μήλα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, που αποτελούν και τα δείγματα μάρτυρα, και στα μήλα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης με την επίδραση όζοντος παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 & 7 αντίστοιχα, που ακολουθούν, καθώς και στην Εικόνα 8.

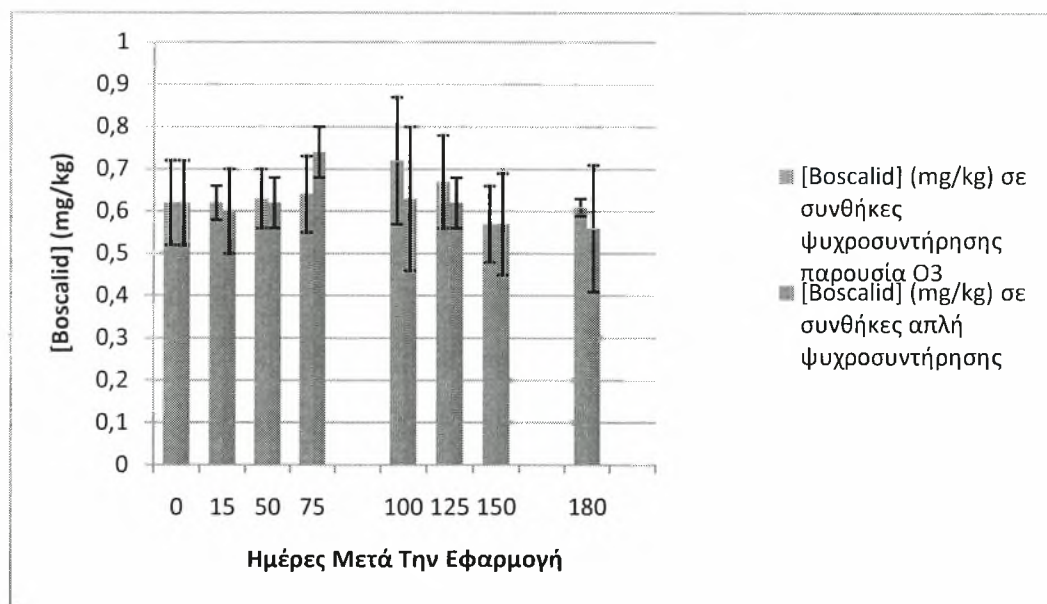
Η αρχική συγκέντρωση του boscalid στα μήλα μετά την εμβάπτιση των μήλων στο υδατικό διάλυμα βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,42 έως 0,63 mg a.i./kg, με μέση τιμή 0,62 mg a.i./kg. Καθόλη τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης (180 ημέρες) και στις δυο μεταχειρίσεις οι συγκεντρώσεις του boscalid παρέμειναν σταθερές, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8.

Πίνακας 6: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων boscalid, τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith συντηρούμενα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης παρουσία όζοντος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και την εισαγωγή τους σε ψυχοσυντήρηση.

HME	Συγκέντρωση (mg/kg)	SD	RSD (%)
0	0,62	0,10	18,3
15	0,62	0,04	5,9
50	0,63	0,07	11,3
75	0,64	0,09	14,2
100	0,72	0,15	20,8
125	0,67	0,11	16,4
150	0,57	0,09	15,5
180	0,61	0,02	2,5

Πίνακας 7: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων boscalid τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith συντηρούμενα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης απουσία όζοντος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και την εισαγωγή τους σε ψυχοσυντήρηση.

HME	Συγκέντρωση (mg/kg)	SD	RSD (%)
0	0,62	0,10	16,1
15	0,60	0,11	18,3
50	0,62	0,06	9,9
75	0,74	0,06	7,4
100	0,63	0,17	26,9
125	0,62	0,06	9,8
150	0,57	0,12	21,0
180	0,56	0,15	26,8



Εικόνα 8: Εξέλιξη της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων του Boscalid σε μήλα συντηρούμενα σε διαφορετικές συνθήκες ψυχοσυντήρησης

6.7 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων του deltamethrin

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων μήλου του πειράματος ως προς το υπολειμματικό φορτίο των καρπών σε deltamethrin στα μήλα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, που αποτελούν και τα δείγματα μάρτυρα, και στα μήλα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης με την επίδραση όζοντος παρουσιάζονται στους Πίνακες 8 & 9 αντίστοιχα.

Η αρχική συγκέντρωση του deltamethrin στα μήλα μετά την εμβάπτιση των μήλων στο υδατικό διάλυμα βρέθηκε να είναι 0,09 mg a.i./kg, ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος διαπιστώθηκε ότι διατηρείτο σταθερή η συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας στα μήλα και μόνο κατά τις δύο τελευταίες δειγματοληψίες-αναλύσεις εμφανίστηκε μία μείωση κατά 0,01 mg a.i./kg που συντηρούνταν σε ψυχοσυντήρηση σε συνθήκες όζοντος.

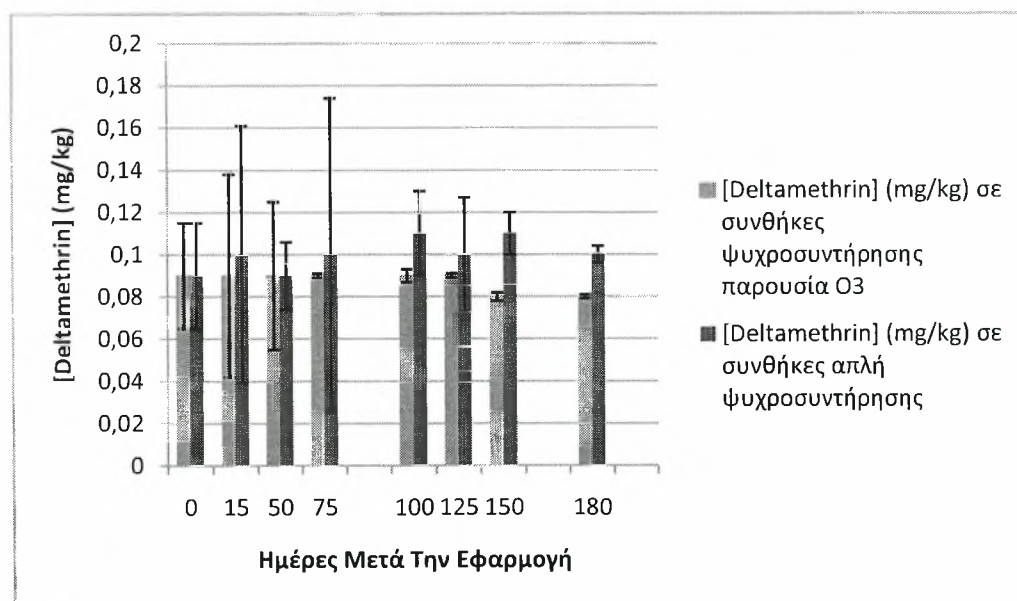
Για τα μήλα που συντηρήθηκαν σε θαλάμους απλής ψυχοσυντήρησης που αποτελούν και το μάρτυρα παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Πίνακας 8: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων deltamethrin, τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith συντηρούμενα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης παρουσία όζοντος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και την εισαγωγή τους σε ψυχοσυντήρηση.

HME	Συγκέντρωση (mg/kg)	SD	RSD (%)
0	0,09	0,025	2,76
15	0,09	0,048	5,28
50	0,09	0,035	4,03
75	0,09	0,001	0,70
100	0,09	0,003	2,89
125	0,09	0,001	0,96
150	0,08	0,002	2,82
180	0,08	0,001	0,75

Πίνακας 9: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων deltamethrin, τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith συντηρούμενα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης απουσία όζοντος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και την εισαγωγή τους σε ψυχοσυντήρηση.

HME	Συγκέντρωση (mg/kg)	SD	RSD (%)
0	0,09	0,025	2,8
15	0,10	0,061	6,3
50	0,09	0,016	1,7
75	0,10	0,074	7,2
100	0,11	0,02	18,2
125	0,10	0,027	2,8
150	0,11	0,01	9,9
180	0,10	0,004	4,3



Εικόνα 9: Εξέλιξη της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων του Deltamethrin σε μήλα συντηρούμενα σε διαφορετικές συνθήκες ψυχοσυντήρησης

6.8 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων του indoxacarb

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων μήλου του πειράματος ως προς το υπολειμματικό φορτίο των καρπών σε indoxacarb στα μήλα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, που αποτελούν και τα δείγματα μάρτυρα, και στα μήλα που είχαν συντηρηθεί σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης με την επίδραση όζοντος παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακες 10, 11).

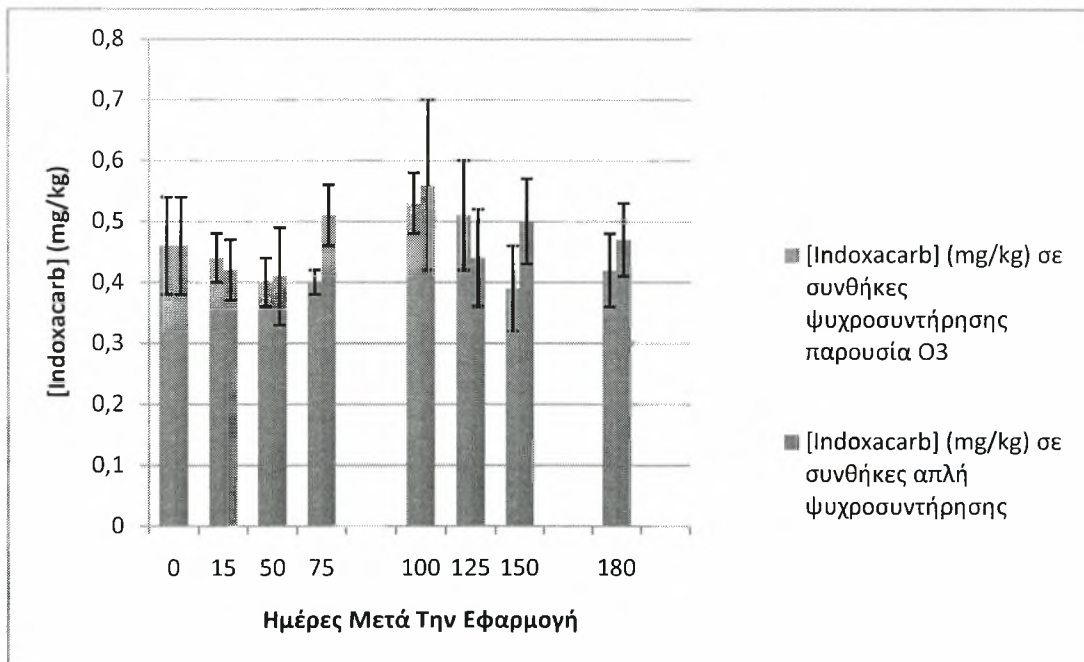
Η αρχική συγκέντρωση του indoxacarb στα μήλα μετά την εμβάπτιση των μήλων στο υδατικό διάλυμα βρέθηκε να είναι μεταξύ 0,33 και 0,48 mg a.i/kg με μέση τιμή 0,46 mg a.i/kg, ενώ κατά τις 180 ημέρες ψυχοσυντήρησης παρουσιάστηκαν αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις χωρίς να εμφανίζεται μια τάση μείωσης των υπολειμμάτων. Για τα μήλα που συντηρήθηκαν σε θαλάμους απλής ψυχοσυντήρησης που αποτελούν και το μάρτυρα παρατηρήθηκε η ίδια διακύμανση από πλευράς αυξομείωσης των τιμών της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας. Συγκεκριμένα, μετά από 180 ημέρες η μέση συγκέντρωση της δραστικής ουσίας έφτανε τα 0,47 mg a.i/kg από 0,46 mg a.i/kg που ήταν αρχικά. Ουσιαστικά παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του indoxacarb και στις δύο μεταχειρίσεις και δεν τείνει να μειώνεται.

Πίνακας 10: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων indoxacarb, τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith συντηρούμενα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης παρουσία όζοντος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και την εισαγωγή τους σε ψυχοσυντήρηση.

HME	Συγκέντρωση (mg/kg)	SD	RSD (%)
0	0,46	0,08	17,4
15	0,40	0,04	8,8
50	0,40	0,04	11,0
75	0,40	0,02	4,8
100	0,53	0,05	9,4
125	0,51	0,09	7,6
150	0,39	0,07	18,8
180	0,42	0,06	14,0

Πίνακας 11: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων indoxacarb, τυπική απόκλιση (SD) και σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith συντηρούμενα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης απουσία όζοντος σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και την εισαγωγή τους σε την ψυχοσυντήρηση.

HME	Συγκέντρωση (mg/kg)	SD	RSD (%)
0	0,46	0,08	17,4
15	0,42	0,05	12,9
50	0,41	0,08	20,7
75	0,51	0,05	9,8
100	0,56	0,14	21,5
125	0,44	0,08	17,7
150	0,50	0,07	13,2
180	0,47	0,06	12,0



Εικόνα 10: Εξέλιξη της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων του Indoxacarb σε μήλα συντηρούμενα σε διαφορετικές συνθήκες ψυχοσυντήρησης.

6.9 Υποβάθμιση των υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb σε μήλα αποθηκευμένα στο ράφι σε συνθήκες δωματίου

Στους Πίνακες 12 και 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με το υπολειμματικό φορτίο στα μήλα, τα οποία μετά την έξοδό τους από τη ψυχοσυντήρηση παρέμειναν για μία εβδομάδα στο ράφι και μετά αναλύθηκαν. Η γενική εικόνα που προκύπτει από τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι παρατηρούνται μικτές τάσεις, είτε υψηλότερων είτε χαμηλότερων τιμών συγκέντρωσης υπολειμμάτων, οι οποίες σε καμία περίπτωση δεν ξεπερνούν το $\pm 27\%$. Αναλυτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε ουσία.

Chlorpyrifos-ethyl

Τα δείγματα που παρέμειναν μια εβδομάδα επιπλέον των 75 ημερών, των 150 ημερών και των 180 ημερών σε συνθήκες δωματίου (στο ράφι) φαίνεται να έχουν κατά μέσο όρο μεγαλύτερη συγκέντρωση δραστικής ουσίας σε σχέση με αυτά που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης σε ατμόσφαιρα όζοντος. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται η μέση τιμή της δραστικής ουσίας να είναι 0,55 mg a.i./kg και παρουσιάζεται μια θετική διαφοροποίηση που κυμαίνεται από 12-24% (Πίνακας 12). Δε συμβαίνει το ίδιο όμως και στην περίπτωση των μήλων που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, όπου παρατηρείται η μέση συγκέντρωση υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl να είναι 0,49 mg a.i./kg. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται μια αρνητική διαφοροποίηση που κυμαίνεται από -4% έως -27% (Πίνακας 13).

Boscalid

Τα δείγματα που παρέμειναν μια εβδομάδα επιπλέον των 75 ημερών, των 150 ημερών και των 180 ημερών σε συνθήκες δωματίου (στο ράφι) φαίνεται να έχουν κατά μέσο όρο μικρότερη συγκέντρωση δραστικής ουσίας (0,59 mg a.i./kg) (σε σχέση με αυτά που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης σε ατμόσφαιρα όζοντος. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται μια αρνητική διαφοροποίηση που κυμαίνεται από -5 έως -11% (Πίνακας 12). Δε συμβαίνει το ίδιο όμως και στην περίπτωση των μήλων που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, όπου παρατηρείται μικρότερη συγκέντρωση υπολειμμάτων

boscalid σε σχέση με αυτά που παρέμειναν σε συνθήκες δωματίου που είχαν μέση συγκέντρωση 0,61 mg a.i./kg. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται διαφοροποίηση από 0% έως -9,6% (Πίνακας 13).

Τα δείγματα που παρέμειναν μια εβδομάδα επιπλέον των 180 ημερών σε συνθήκες δωματίου (στο ράφι) φαίνεται να έχουν κατά μέσο όρο μεγαλύτερη μεν συγκέντρωση έναντι της αρχικής αλλά μικρότερη αυτής που βρίσκονταν εντός ψυκτικού θαλάμου υπό την επίδραση του όζοντος όπως φαίνεται κι από τον πίνακα 12. Καθώς και έπειτα από 7 ημέρες (187 ημέρες δηλαδή) που βρίσκονταν σε συνθήκες δωματίου (στο ράφι) η μέση συγκέντρωση της δραστικής ουσίας παραμένει ίδια και συγκεκριμένα 0,58 mg a.i./kg, ενώ η ποσότητα της δραστικής ουσίας ήταν αρχικά 0,52 mg a.i./kg.

Deltamethrin

Τα δείγματα που παρέμειναν μια εβδομάδα επιπλέον των 75 ημερών, των 150 ημερών και των 180 ημερών σε συνθήκες δωματίου (στο ράφι) φαίνεται να έχουν κατά μέσο όρο μια ανεπαίσθητη αύξηση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας σε σχέση με αυτά που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης σε ατμόσφαιρα όζοντος (Πίνακας 12). Δε συμβαίνει το ίδιο όμως και στην περίπτωση των μήλων που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, όπου παρατηρείται μικρότερη συγκέντρωση υπολειμμάτων deltamethrin στα δείγματα μήλων που παρέμειναν σε συνθήκες δωματίου. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται διαφοροποίηση αρνητική (Πίνακας 13).

Συγκεκριμένα, μετά από 187 ημέρες που βρίσκονταν για μία εβδομάδα σε συνθήκες δωματίου (στο ράφι) η μέση συγκέντρωση της δραστικής ουσίας παρέμεινε σταθερή στα 0,09 mg a.i./kg για τα δείγματα που είχαν αποθηκευτεί σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης παρουσία όζοντος και 0,10 mg a.i./kg για τα δείγματα που είχαν αποθηκευτεί σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης (Πίνακες 12 & 13).

Indoxacarb

Τα δείγματα που παρέμειναν μια εβδομάδα επιπλέον των 75 ημερών, των 150 ημερών και των 180 σε συνθήκες δωματίου (στο ράφι) φαίνεται να έχουν κατά μέσο όρο μια εμφανή αύξηση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας σε σχέση με αυτά που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης σε ατμόσφαιρα όζοντος (Πίνακας 12). Η διαφοροποίηση των δειγμάτων αυτών κυμάνθηκε στο 2-15%. Δε συμβαίνει το ίδιο όμως και στην περίπτωση των μήλων που ήταν αποθηκευμένα σε

συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, όπου παρατηρείται μικρότερη συγκέντρωση υπολειμμάτων indoxacarb στα δείγματα μήλων που παρέμειναν σε συνθήκες δωματίου σε σχέση με τα δείγματα μήλων που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται διαφοροποίηση αρνητική της τάξεως του -4% έως -27%. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις, όπου τα μήλα αφέθηκαν στο ράφι, δηλαδή σε αυτά που είχαν συντηρηθεί σε απλή ψυχοσυντήρηση και σε αυτά που είχαν συντηρηθεί σε ψυχοσυντήρηση παρουσία όζοντος είχαν κατά μέσο όρο ίδια συγκέντρωση δραστικής ουσίας που ήταν 0,44 mg a.i./kg. (Πίνακας 13).

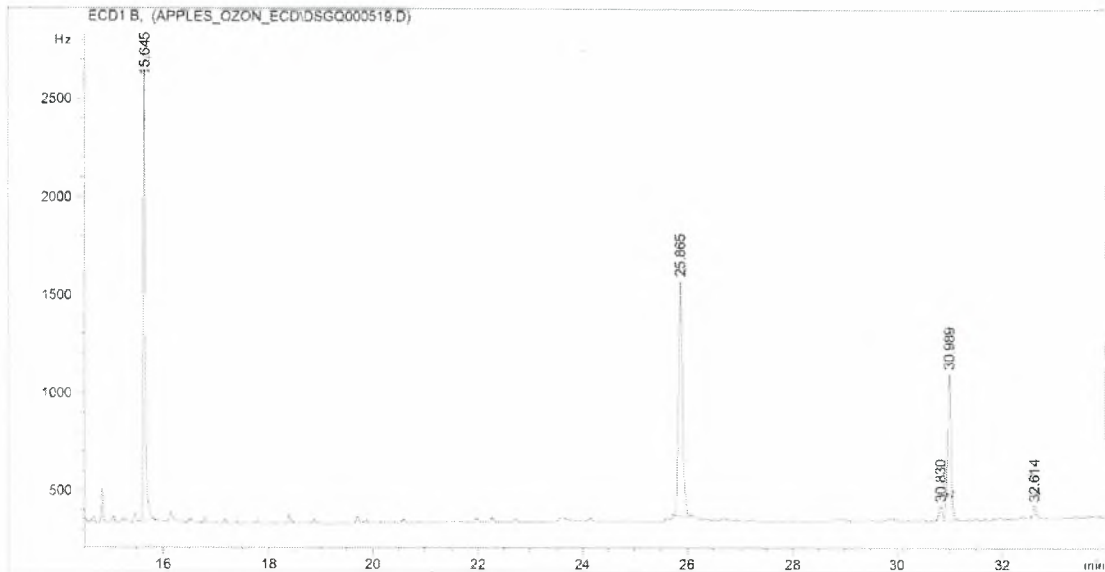
Πίνακας 12: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb, σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith, τα οποία συντηρήθηκαν σε ψυχορροσυντήρηση παιρυσία όζοντος για διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και παρέμειναν μετά την έξοδο τους στο ράφι σε συνθήκες δωματίου (HΣΡ) για 7 ημέρες.

% Διαφοροποίηση είναι η ποσοστιαία αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων στα μήλα μετά την παραμονή τους στο ράφι σε σχέση με τα επίπεδα υπολειμμάτων αμέσως μετά την έξοδό τους από τη ψυχορροσυντήρηση.

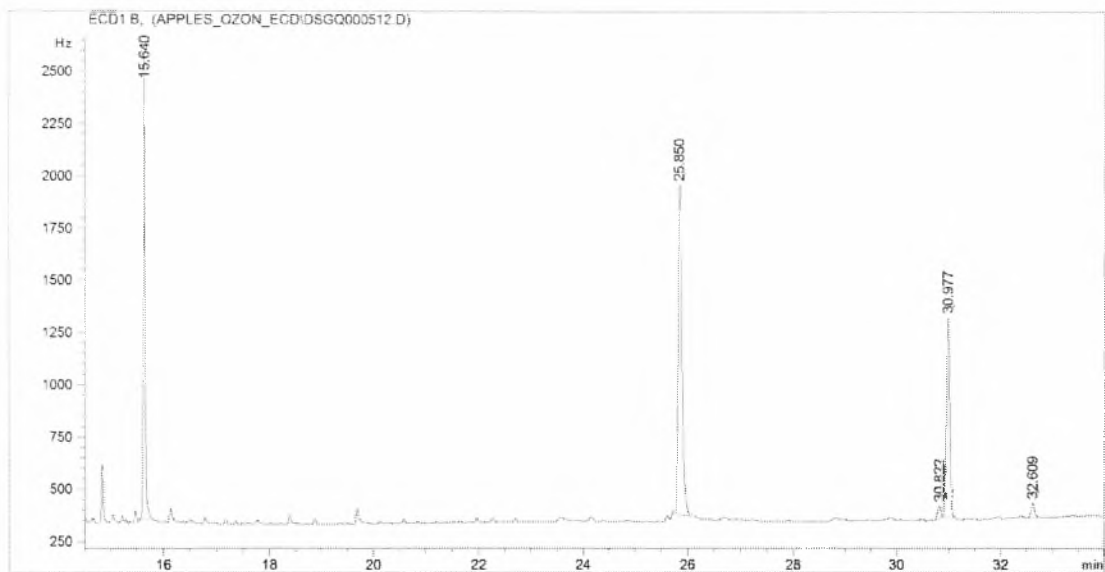
	Chlorpyrifos-ethyl			Boscalid			Deltamethrin			Indoxacarb		
	Συγκέντρωση (mg/kg)	RSD (%)	Διαφοροποίηση	Συγκέντρωση (mg/kg)	RSD (%)	Διαφοροποίηση	Συγκέντρωση (mg/kg)	RSD (%)	Διαφοροποίηση	Συγκέντρωση (mg/kg)	RSD (%)	Διαφοροποίηση
75 HME +7 HΣΡ	0,58	27,5	+24 %	0,63	33,1	-1%	0,10	14,53	+10%	0,46	36,90	+15%
150 HME +7 HΣΡ	0,50	7,8	+12%	0,64	12,8	+11%	0,08	3,51	0%	0,44	14,18	+11%
180 HME +7 HΣΡ	0,56	26,8	+23%	0,58	24,4	-5%	0,09	7,27	+13,5%	0,43	20,51	+2%
Μέση Τιμή	0,55			0,61			0,09			0,44		

Πίνακας 13: Μέση συγκέντρωση (n=3) υπολειμμάτων chlorpyrifos-ethyl, boscalid, Deltamethrin και indoxacarb, σχετική τυπική απόκλιση (RSD) σε μήλα Granny Smith, τα οποία συντηρήθηκαν σε ψυχορροσυντήρηση απουσία όζοντος για διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την εφαρμογή (HME) και παρέμειναν μετά την έξοδό τους στο ράφι σε συνθήκες δωματίου (HΣΡ) για 7 ημέρες.

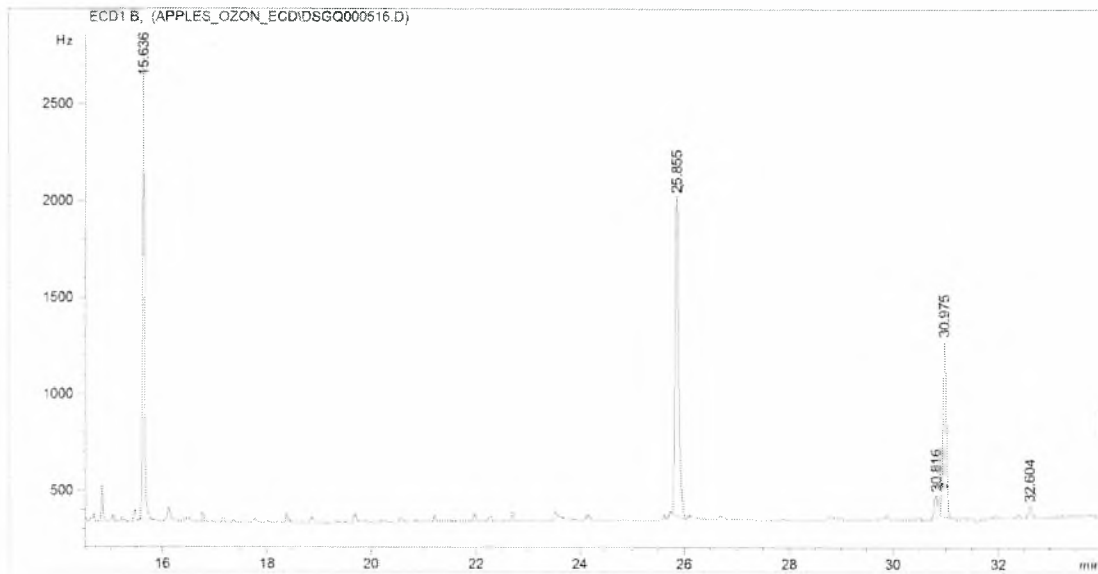
	Chlorpyrifos-ethyl			Boscalid			Deltamethrin			Indoxacarb		
	Συγκέντρωση (mg/kg)	RSD (%)	Διαφοροποίηση	Συγκέντρωση (mg/kg)	RSD (%)	Διαφοροποίηση	Συγκέντρωση (mg/kg)	RSD (%)	Διαφοροποίηση	Συγκέντρωση (mg/kg)	RSD (%)	Διαφοροποίηση
75 HME +7 HΣΡ	0,41	25,2	-26,8%	0,68	24,4	-8%	0,09	6,25	-11%	0,44	22,41	-16%
150 HME +7 HΣΡ	0,54	10,4	-11%	0,52	28,3	-9,6%	0,10	4,07	-10%	0,44	19,99	-27%
180 HME +7 HΣΡ	0,52	3,9	-3,8 %	0,56	14,1	0%	0,10	2,15	0%	0,45	11,15	-4%
Μέση Τιμή	0,49			0,59			0,10			0,44		



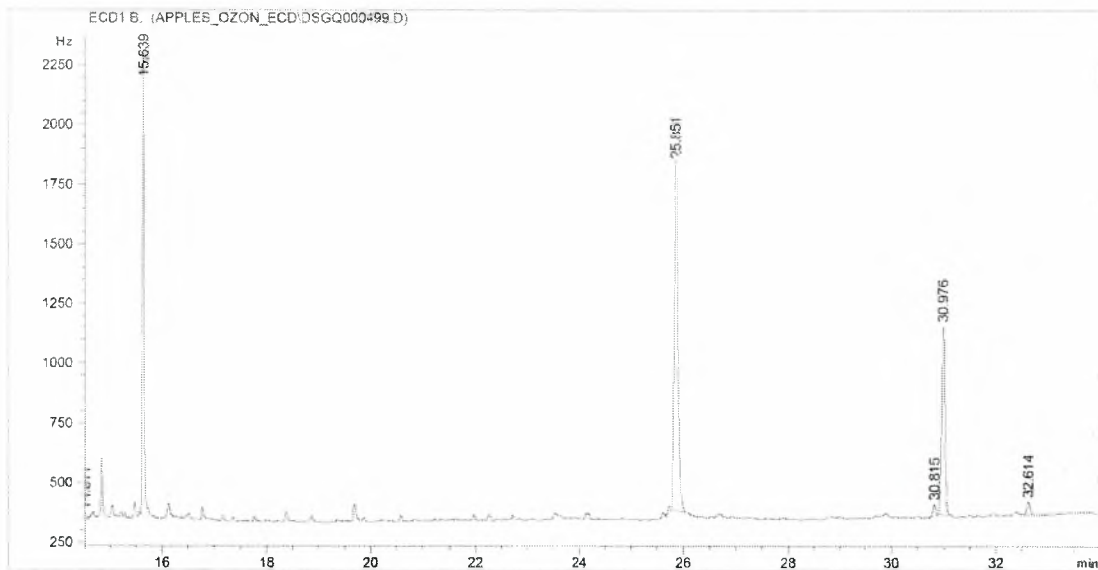
Εικόνα 11: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος μήλου που εμβαπτίστηκε κατά την 1^η ημέρα του πειράματος (16/10/2012).



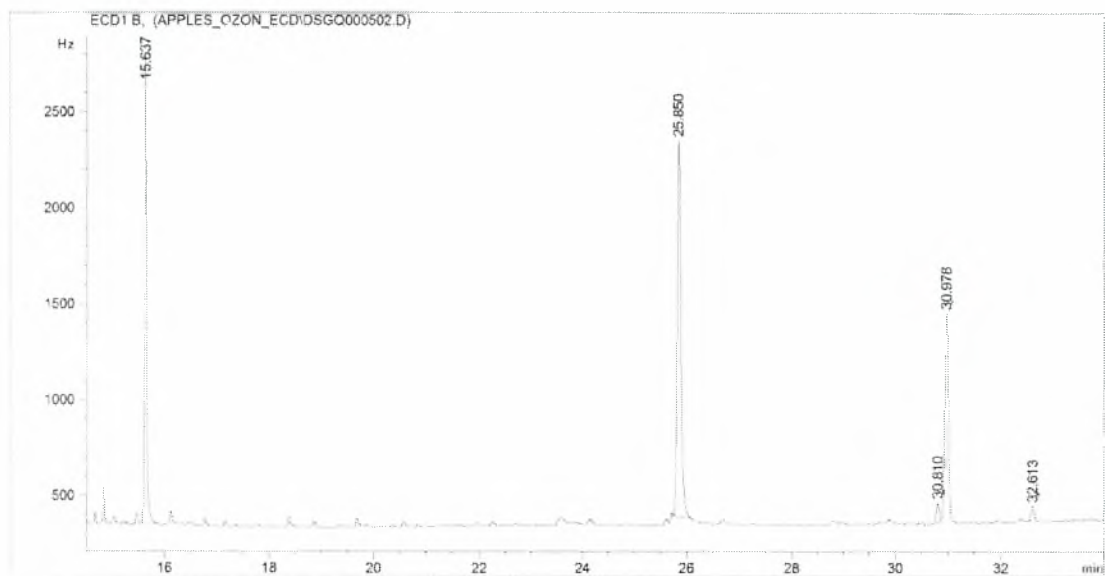
Εικόνα 12: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος μήλου που ήταν αποθηκευμένο σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης υπό την επίδραση όζοντος κατά την 25^η ημέρα του πειράματος (10/11/2012).



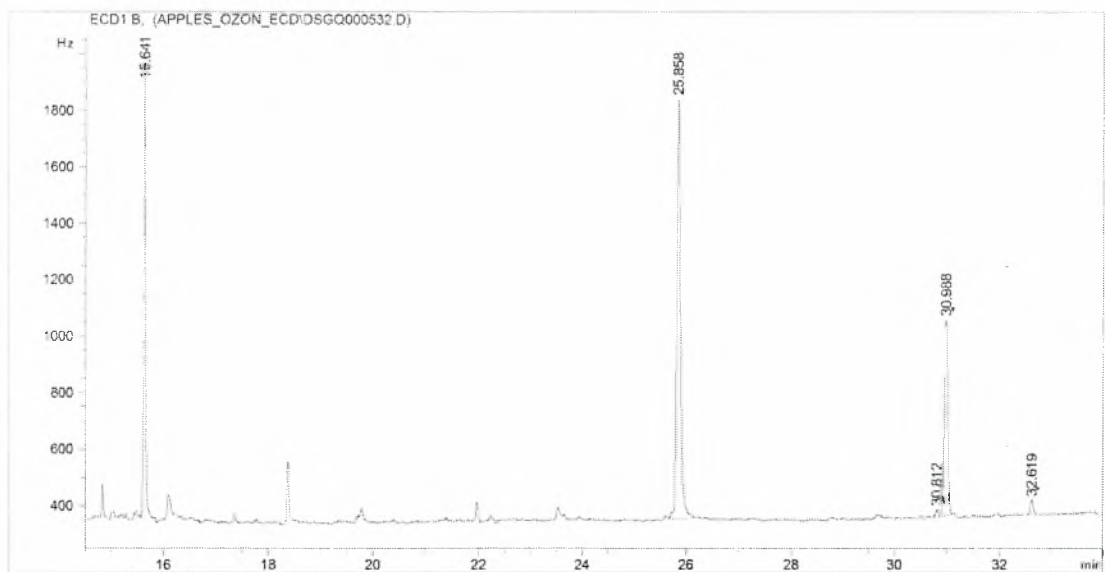
Εικόνα 13: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος μήλου που ήταν αποθηκευμένο σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης (μάρτυρας) κατά την 25^η ημέρα του πειράματος (10/11/2012).



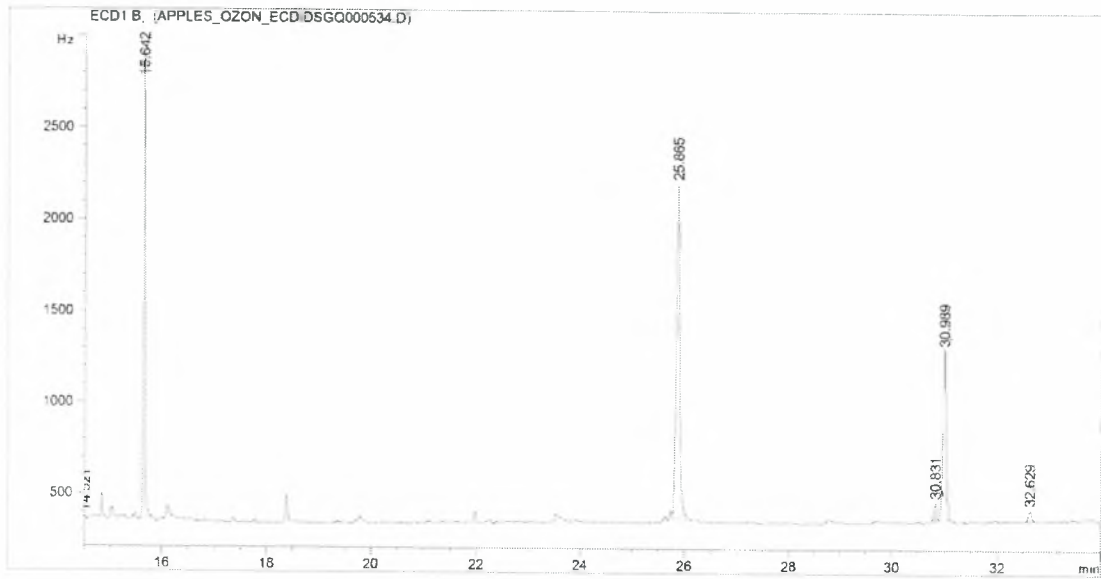
Εικόνα 14: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος μήλου που ήταν αποθηκευμένο σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης υπό την επίδραση όζοντος κατά την 75^η ημέρα του πειράματος (4/1/2013).



Εικόνα 15: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος μήλου που ήταν αποθηκευμένο σε συνθήκες απλής ψυχορυστήρησης (μάρτυρας) κατά την 75^η ημέρα του πειράματος (4/1/2013).



Εικόνα 16: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος μήλου που ήταν αποθηκευμένο σε συνθήκες ψυχορυστήρησης υπό την επίδραση όζοντος κατά την 180^η ημέρα του πειράματος (30/4/2013).



Εικόνα 17: Χρωματογράφημα εκχυλίσματος δείγματος μήλου που ήταν αποθηκευμένο σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης (μάρτυρας) κατά την 180^η ημέρα του πειράματος (30/4/2013).

6.10 Συζήτηση για την πορεία των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε φρούτα

Στην παράγραφο αυτή θα αναφερθούν τα αποτελέσματα επιλεγμένων βιβλιογραφικών αναφορών που σχετίζονται με την πορεία των υπολειμμάτων σε φρούτα κατά τα στάδια της μετασυλλεκτικής επεξεργασίας ή μεταποιητικών διεργασιών ή της ψυχοσυντήρησης και θα σχολιαστούν σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερη βαρύτητα θα δοθεί σε αποτελέσματα εργασίας όπου έχει εφαρμοστεί υποκαπνισμός σταφυλιών με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις όζοντος σε σχέση με τα χαμηλά αλλά διαρκή επίπεδα όζοντος που εφαρμόστηκαν κατά τη ψυχοσυντήρηση στην παρούσα εργασία.

Σε έρευνες που έγιναν, μελετήθηκε η επίδραση του πλυσίματος, του χρόνου αποθήκευσης και του ξεφλουδίσματος και της αποπυρήνωσης στην περιεκτικότητα - υπολειμματικότητα deltamethrin και chlorpyrifos σε μήλα καθώς και cypermethrin, diazinon, endosulfan, endosulfan sulfate, fenitrothion, fenpropathrin, iprodione, kresoxim-methyl, lambda-cyhalothrin, quinalphos, tolylfluanid και vinclozolin. Το πείραμα διήρκησε 78 ημέρες, τα δείγματα μήλων ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ και μελετήθηκε η απομείωση των παραπάνω φυτοπροστατευτικών ουσιών με τεχνικές που εφαρμόζονται από τους καταναλωτές προκειμένου να καταναλωθούν. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι απαιτείται μείωση της τάξης του 18-38%, ώστε να παραχθούν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα των πρακτικών επεξεργασίας, και ότι αυτό εξαρτάται από το είδος του φυτοφαρμάκου και την ποικιλία μήλων. Αρχικά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των φυτοφαρμάκων με το ξεφλούδισμα των μήλων. Περίπου 1-24% των φυτοπροστατευτικών αυτών ουσιών κατανεμήθηκαν στο χυμό του μήλου. Με απλό πλύσιμο δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των ανωτέρω ουσιών στα μήλα. Ωστόσο κατά την αποθήκευση (78 ημέρες σε $4\pm 2^{\circ}\text{C}$) μειώθηκαν σημαντικά οι συγκεντρώσεις των ουσιών diazinon, chlorpyrifos, fenitrothion, kresoxim-methyl and tolylfluanid κατά 25-69% της αρχικής ποσότητας των φυτοπροστατευτικών ουσιών (Rasmussen et al., 2003)

Ο Xi και οι συνεργάτες του (2009) πραγματοποίησαν πειράματα σε χυμό μήλου με σκοπό να μελετηθεί ο ρυθμός μείωσης deltamethrin και πυρεθροειδών γενικότερα καθώς και καρβαμιδικών έπειτα από επεξεργασία με ακτινοβολήση. Μελετήθηκε ο

ρυθμός αποδόμησης των υπολειμμάτων των παρασιτοκτόνων αυτών και βρέθηκε μεγάλη μείωση της ποσότητας του deltamethrin σε ποσοστό 67,84%, του permethrin σε ποσοστό 65,72%, του cyfluthrin σε ποσοστό 94,14%, του flucythrinate σε ποσοστό 72,41% ,όταν εφαρμόζονταν δόση ακτινοβολήσης 9 kGy Co-γ ακτινοβολίας. Όταν η δόση ακτινοβολήσης ήταν 7 kGy, ο ρυθμός αποικοδόμησης των καρβαμιδικών φυτοφαρμάκων ήταν 76,55% για το Primicarb και για το Carbofuran ήταν 63,17% .

Σε πειράματα που έγιναν από τον Munitz και τους συνεργάτες του (2013) για τα κατάλοιπα του boscalid σε βατόμουρα αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού των υπολειμμάτων με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία με μικρο-σύλληψη ηλεκτρονίων (μ-ECD). Η υποβάθμιση του boscalid μελετήθηκε σε βατόμουρα ποικιλιών Emerald και Jewel (Concordia, Αργεντινή). Η υποβάθμιση του boscalid και στις δύο ποικιλίες βατόμουρων που μελετήθηκαν ήταν αυξανόμενη σε ταχύτητα και ο χρόνος ημίσειας ζωής για boscalid ήταν 5,3 έως και 6,3 ημέρες για την Emerald και Jewel, αντίστοιχα. Σε αχλάδια που ψεκάστηκαν με τα εντομοκτόνα teflubenzuron και triflumuron μελετήθηκε ο ρυθμός υποβάθμισης (μείωσης) και τα επίπεδα των υπολειμμάτων αυτών των δύο εντομοκτόνων ουσιών τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φρούτων στον οπωρώνα, όσο και κατά τη διάρκεια της συντήρησης των φρούτων σε ψυχρό θάλαμο ($0^{\circ}\text{C} \pm 1$) (Aplada-Sarlis et al., 1999) . Τα δύο εντομοκτόνα έδειξαν χαμηλούς ρυθμούς υποβάθμισης καθόσον 42 ημέρες μετά τον ψεκασμό οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων τους, που μετρήθηκαν στα αχλάδια, αντιστοιχούν στο 48% και στο 42% της αρχικής συγκέντρωσης απόθεσης για το teflubenzuron και για το triflumuron αντίστοιχα. Η παρακολούθηση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων στα αχλάδια κατά το χρονικό διάστημα της συντήρησής τους σε ψυχρούς θαλάμους (29 εβδομάδες) έδειξε ότι για μεν το triflumuron παρουσιάζεται μία σαφής μείωση της συγκέντρωσης του (μόνο 7% της αρχικής συγκέντρωσης παραμένει στο τέλος της αποθήκευσης), ενώ αντίθετα για το teflubenzuron δεν παρουσιάζεται σχεδόν καμία μεταβολή, δείχνοντας υψηλή σταθερότητα του μορίου αυτού στις συνθήκες της συντήρησης.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον έλεγχο των μετασυλλεκτικών αλλοιώσεων σε επιτραπέζια σταφύλια εφαρμόστηκε υποκαπνισμός με όζον υψηλής συγκέντρωσης, περίπου 10.000 $\mu\text{L/L}$, για δύο ώρες πέραν της εφαρμογής διοξειδίου

του θείου, ώστε να ελεγχθεί μετασυλλεκτικά η ανάπτυξη τεφράς σήψης που προκαλείται από το μύκητα *Botrytis cinerea* (Gabler et al., 2010) και καταγράφηκε η επίδραση του όζοντος στο υπολειμματικό φορτίο μυκητοκτόνων ουσιών. Σε σταφύλια που αποθηκεύτηκαν για 28 ημέρες στους 0,5°C αφού υπέστησαν υποκαπνισμό για μία ώρα με 2.500 ή 5.000 $\mu\text{L/L}$ όζοντος παρατηρήθηκε μείωση της ανάπτυξης μετασυλλεκτικής σήψης σε ποσοστό της τάξεως του 50%, ενώ όταν η συγκέντρωση όζοντος έφτασε τα 10.000 $\mu\text{L/L}$ παρατηρήθηκαν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα. Όσον αφορά στην επίδραση του όζοντος στο υπολειμματικό φορτίο τα υπολείμματα των μυκητοκτόνων fenhexamid, cyprodinil, pyrimethanil και pyraclostrobin μειώθηκαν κατά 68,5%, 75,4%, 83,7% και 100% αντίστοιχα σε σταφύλια που είχαν υποστεί υποκαπνισμό με όζον 10.000 $\mu\text{L/L}$ για μία ώρα, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων των iprodione και boscalid.

Με βάση λοιπόν τις μελέτες αυτές καθώς και με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνεται η σταθερότητα του boscalid στα φρούτα κατά τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης είτε αναφερόμαστε σε απλή ψύξη, είτε σε ψύξη σε ατμόσφαιρα όζοντος διαρκούς συγκέντρωσης χαμηλού επιπέδου (60 ppb), είτε σε ψύξη μετά από υποκαπνισμό με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις όζοντος (10000 ppb για μία ώρα).

Επίσης, όσον αφορά στις συγκεντρώσεις chlorpyrifos παρατηρείται σχετική μείωση κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της τάξεως του 27%, γεγονός το οποίο συνάδει με τις ήδη υπάρχουσες μελέτες, κατά τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης σε απλή ψύξη, είτε σε ψύξη σε ατμόσφαιρα όζοντος διαρκούς συγκέντρωσης χαμηλού επιπέδου (60 ppb), είτε σε ψύξη μετά από αποθήκευση σε απλή ψυχοσυντήρηση με την υψηλότερη δυνατή θερμοκρασία ($4\pm 2^\circ\text{C}$ για 78 ημέρες).

Όσον αφορά στη σχετική σταθερότητα που παρατηρήθηκε και στα άλλα γεωργικά φάρμακα της μελέτης στην παρούσα εργασία, αυτή αποδίδεται στη χαμηλή θερμοκρασία και στην απουσία ακτινοβολίας κατά τη συντήρηση των μήλων.

7. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία η αναλυτική μεθοδολογία που εφαρμόστηκε κι ελέγχθηκε για τον προσδιορισμό των chlorpyrifos-ethyl, boscalid, deltamethrin και indoxacarb σε μήλα ποικιλίας Granny Smith παρουσιάζεται αξιόπιστη, αφού τόσο η ορθότητα της όσο και η ακρίβεια της βρέθηκαν να έχουν ικανοποιητικές τιμές (ανάκτηση 70-110% και επαναληψιμότητα με RSD <14%).

Η αρχική συγκέντρωση του chlorpyrifos-ethyl στα μήλα μετά την εμβάπτιση των μήλων, βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,48 έως 0,78 mg a.i./kg, με μέση τιμή 0,59 mg a.i./kg, ενώ 180 ημέρες μετά την εφαρμογή δεν παρατηρήθηκε κάποια τάση συνεχούς απομείωσης της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας στα μήλα και των δύο μεταχειρίσεων. Συγκρίνοντας τις δύο μεταχειρίσεις χαμηλότερες τιμές υπολειμμάτων παρατηρούνται όταν στους θαλάμους υπάρχει η ατμόσφαιρα όζοντος, ιδιαίτερα στις 150 και 180 HME, αλλά αυτή η διαφοροποίηση δεν είναι έντονη.

Τα δείγματα που παρέμειναν μια εβδομάδα επιπλέον των 75 ημερών, των 150 ημερών και των 180 ημερών στο ράφι φαίνεται να έχουν κατά μέσο όρο ελαφρώς μεγαλύτερη συγκέντρωση δραστικής ουσίας σε σχέση με αυτά που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψυχοσυντήρησης σε ατμόσφαιρα όζοντος.

Η αρχική συγκέντρωση του boscalid στα μήλα μετά την εμβάπτιση των μήλων στο υδατικό διάλυμα βρέθηκε να κυμαίνεται από 0,42 έως 0,63 mg a.i./kg, με μέση τιμή 0,62 mg a.i./kg. Καθόλη τη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης (180 ημέρες) και στις δυο μεταχειρίσεις οι συγκεντρώσεις του boscalid παρέμειναν σταθερές. Τα δείγματα που παρέμειναν μια εβδομάδα επιπλέον των 180 ημερών σε συνθήκες δωματίου (στο ράφι) φαίνεται να εμφανίζουν μικτές τάσεις..

Η αρχική συγκέντρωση του deltamethrin στα μήλα μετά την εμβάπτιση των μήλων στο υδατικό διάλυμα βρέθηκε να είναι 0,09 mg a.i./kg, ενώ κατά τη διάρκεια του πειράματος διαπιστώθηκε ότι διατηρείτο σταθερή η συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας στα μήλα και μόνο κατά τις δύο τελευταίες δειγματοληψίες-αναλύσεις εμφανίστηκε μία μείωση κατά 0,01 mg a.i./kg που συντηρούνταν σε ψυχοσυντήρηση σε συνθήκες όζοντος. Για τα μήλα που συντηρήθηκαν σε θαλάμους απλής ψυχοσυντήρησης, που αποτελούν και το μάρτυρα, παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η αρχική συγκέντρωση του indoxacarb στα μήλα μετά την εμβάπτιση των μήλων στο υδατικό διάλυμα βρέθηκε να είναι μεταξύ 0,33 και 0,48 mg a.i/kg με μέση τιμή 0,40

mg a.i/kg, ενώ κατά τις 180 ημέρες ψυχοσυντήρησης παρουσιάστηκαν αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις χωρίς να εμφανίζεται μια τάση μείωσης των υπολειμμάτων τόσο για τα μήλα που συντηρήθηκαν σε ατμόσφαιρα όζοντος, όσο και για τα μήλα που συντηρήθηκαν σε θαλάμους απλής ψυχοσυντήρησης. Συγκεκριμένα, μετά από 180 ημέρες η μέση συγκέντρωση της δραστικής ουσίας έφτανε τα 0,47 mg a.i/kg από 0,46 mg a.i/kg που ήταν αρχικά. Ουσιαστικά παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του indoxacarb και στις δύο μεταχειρίσεις και δεν τείνει να μειώνεται.

Στα δείγματα που παρέμειναν μια εβδομάδα επιπλέον στο ράφι η διαφοροποίηση των δειγμάτων αυτών κυμάνθηκε αυξητικά στο 2-15% για τα μήλα από θαλάμους με όζον, ενώ στην περίπτωση των μήλων που ήταν αποθηκευμένα σε συνθήκες απλής ψυχοσυντήρησης, παρατηρείται μείωση στο 4-27%.

Σε γενικές γραμμές η εικόνα που καταγράφεται είναι ότι στη διάρκεια της ψυχοσυντήρησης δεν εμφανίζεται μια μειωτική τάση των συγκεντρώσεων των υπολειμμάτων των chlorpyrifos, boscalid, deltamethrin και indoxacarb, αλλά αντίθετα μια σταθερότητα των επιπέδων τους. Η σταθερότητα αυτή είναι πιο σαφής στην περίπτωση του boscalid και λιγότερο σαφής στην περίπτωση του chlorpyrifos. Από τις παρούσες συνθήκες του πειράματος, η σταθερότητα αποδίδεται στις χαμηλές θερμοκρασίες και στην απουσία ακτινοβολίας. Το όζον δεν φαίνεται να έχει επίδραση στην απομείωση των υπολειμμάτων, γεγονός που αποδίδεται είτε στη φύση των μορίων (π.χ. η δραστική ουσία boscalid, όπως έχει παρατηρηθεί κι από άλλες εργασίες), είτε στη χαμηλή συγκέντρωση όζοντος που εφαρμόστηκε.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι με την είσοδο των φρούτων στους θαλάμους ψυχοσυντήρησης θα πρέπει να φέρουν φορτία ουσιών χαμηλότερα των μέγιστων επιτρεπτών ορίων (MRLs), αφού κατά την αποθήκευσή τους δεν εμφανίζεται ιδιαίτερα σημαντική απομείωση τους, τουλάχιστον για τις φ.ο. της μελέτης.

Περαιτέρω μελέτες θα μπορούσαν να επεκταθούν στη μελέτη συνθηκών ψυχοσυντήρησης, με υψηλότερες συγκεντρώσεις όζοντος π.χ. δεκαπλάσια συγκέντρωση όζοντος, και ενδεχομένως να διευρυνθεί ο αριθμός των γεωργικών φαρμάκων της μελέτης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

- Aplada-Sarlis P.G., Miliadis G.E. (1999). Dissipation of teflubezuron and troflumuron residues in field-sprayed and cold stored pears. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 2926-2929.
- Barth M.M., Zhou C., Mercier J., Payne F.A. (1995). Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *J. Food Sci.*, 60: 1286-1288.
- Dickson R.G., Law S.E., Kays S.J., Eiteman M.A. (1992). Abatement of ethylene by ozone treatment in controlled atmosphere storage of fruits and vegetables. *American Society of Agricultural Engineering, Proc. International Winter Meeting*, 8: 1-9.
- FAO. Ministry of Public Health, Water and Sport. (June 1996). *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*. General Inspectorate for Health Inspection. Sixth Edition. Netherlands.
- Fletcher G.C. (2003). *Modified atmosphere of Sea food*. New Zealand Institute for Crop & Food Research Ltd.
- Forney C.F., Fan L., Hildebrand P.D., Song J. (2001). Do negative air ions reduce decay of fresh fruits and vegetables. *Proc. 4th International Conference on Postharvest*. *Acta Hort.*, 553: 421-424.
- Gabler F.M., Smilanick J.L., Mansour M.F., Karaca H. (2010). Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 55: 85-90.
- Gonzalez-Barrio R., Beltran D., Cantos E., Gil M.I., Espin J.C., Tomas-Barberan F.A. (2006). Comparison of ozone and UV-C treatments on the Postharvest Stilbenoid Monomer, Dimer, and Trimer Induction in Var. 'Superior' White Table Grapes. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 4222-4228.
- Harb J., Streif J., Bangerth K.F. (2008). Aroma volatiles of apples as influenced by ripening and storage procedures. *Acta Horticulturae*, 796: 93-103.

- Jones, A.L., Aldwinkle, H.S. (1991). Compendium of Apple and Pear Diseases. The American Phytopathological Society, United States of America.
- Juraske R., Fantke P., Ramirez A.C.R., Gonzalez A. (2012). Pesticide residue dynamics in passion fruits: Comparing field trial and modeling results. *Chemosphere*, 89: 850-855.
- Kweon, H.J., Kang, I.K., Kim, M.J., Lee J., Moon Y. S., Choi C., Choi D.G., Watkins C.B. (2013). Fruit maturity, controlled atmosphere delays and storage temperature affect fruit quality and incidence of storage disorders of 'Fuji' apples. *Scientia Horticulturae*, 157:60-64.
- Liew C.L., Prange R.K. (1994). Effect of ozone and storage temperature on post-harvest diseases and physiology of carrots (*Daucus carota* L.). *J.Am. Soc. Hort. Sci.*, 119:563–567.
- Margosan D.A., Smilanick J.L. (2000). Mortality of spores of *B. cinerea*, *Monilinia*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* after exposure to ozone gas, and a survey of the tolerance of produce to sporocidal ozone doses. Proc. of Postharvest Integrated Pest Management meeting, Univ. California, Davis, CA.
- Mullan, W. M. A. (2002). Science and technology of modified atmosphere packaging. <http://www.dairyscience.info/map-science.asp>
- Munitz M.S., Resnik S.L., Montii M.I.T. (2013). Method development and validation for boscalid in blueberries by solid-phase microextraction gas chromatography, and their degradation kinetics. *Food Chemistry*, 136:1399-1404.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Crisoto, C.H., Mansour, M. (2001). Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit. *Plant Dis.*, 85: 632–638.
- Palou L., Crisosto C.H., Smilanick J.L., Adaskaveg J.E., Zoffoli J.P. (2002) Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biol. Technol.*, 24: 39–48.
- Philips C.A. (1996). Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*, 31:463-479.

- Rasmussen R.R., Poulsen M.E., Hansen H.C.B. (2003). Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing. *Food Additives and Contaminants*, 20:1044-1063.
- Sarig P., Zahavi T., Zutkhi Y., Yannai S., Lisker N., Ben-Arie R. (1996). Ozone for control of postharvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 48:403–415.
- Scott Smith J., Hui Y.H. (2004). Functions of packaging. In Robertson & Soroka (editors). *Food processing* p. 102. Blackwell publishing, USA.
- Skog L.J., Chu C.L. (2001). Effect of ozone on qualities of fruits and vegetables in cold storage. *Can. J. Plant Sci*, 81: 773–778.
- Spalding D.H. (1968). Effects of ozone atmospheres on spoilage of fruits and vegetables after harvest. *Marketing Research Report*, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 756:11.
- Tahir I.I., Nybom H. (2013). Tailoring organic apples by cultivar selection, production system, and post-harvest treatment to improve quality and storage life. *HortScience*, 48: 92 – 101.
- Tzortzakis N.G., Singleton I., Barnes, J.D. (2007). Deployment of low-level ozone-enrichment for the preservation of chilled fresh produce. *Postharvest Biol. Technol.*, 43: 261–270.
- Tzortzakis N.G., Singleton I., Barnes J.D. (2008). Impact of low-level atmospheric ozone-enrichment on black spot and anthracnose rot of tomato fruit. *Postharvest Biol. and Technol*, 47:1–9.
- U.S. Food and Drug Administration (1997). Substances generally recognized as safe, proposed rule. *Federal Register*, 62:18937-18964.
- Yue T., Gao Z. (2009). Degradation of pyrethroids and carbamate pesticides in apple juice by irradiation. *Transactions of the Chinese Society of Agriculture Machinery*, 40: 121-124.

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ακριτίδης Κ., 1993. Ξήρανση – Αποθήκευση Γεωργικών Προϊόντων. 1^ο Κεφ. Εκδόσεις Γιαχρούδη. Θεσσαλονίκη: σελ.13.
- Αρβανιτογιάννης Ι.Σ. (2001). Συντήρηση τροφίμων. Τεχνολογία Μεταποίησης Τροφίμων. 1^ο Κεφ. University Studio Press. Θεσσαλονίκη: σελ.193.
- Βασιλακάκης Μ., 2010. Γενική και Ειδική Δενδροκομία. 17^ο Κεφ. Εκδόσεις Γαρταγάνης, Θεσσαλονίκη. σελ.275-295.
- Βασιλακάκης Μ., 2006. Μετασυλλεκτική Φυσιολογία – Μεταχείριση Οπωροκηπευτικών και Τεχνολογία. 4^ο, 6^ο Κεφ. Εκδόσεις Γαρταγάνης. Θεσσαλονίκη. σελ.187-189, 364.
- Ζιώγας Β.Ν., Μάρκογλου Α.Ν. (2010). Γεωργική Φαρμακολογία. 1^ο Κεφ. Εκτυπωτική Αττικής. Αθήνα: σελ.39, 42-43, 141, 334, 353, 366.
- Θανασουλόπουλος Κ, 1987. Εγχειρίδιο Διαγνωστικής στον Αγρό. Εκδόσεις Μαϊάνδρος.
- Κατσούλας Ν., Κίττας Κ., 2008. Εγκαταστάσεις Μετασυλλεκτικών Χειρισμών Αγροτικών Προϊόντων. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος: σελ.66-69.
- Κοτζεκίδου – Ρούκα Π., 2004. Μικροβιολογία Τροφίμων. 12^ο Κεφ. Εκδόσεις Παρατηρητής Α.Ε., Θεσσαλονίκη: σελ.209-211.
- Λάσκαρης Δ., Παπλωματάς Ε. (Eds) 1998. Οδηγός Αντιμετώπισης Ασθενειών των Φυτών. Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης – Ελληνική Φυτοπαθολογική Εταιρεία, Αθήνα, σελ.414-418.
- Λέντζα – Ρίζου Χ., (2000). Γεωργική Φαρμακολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Βόλος: σελ.180.
- Μηνάς Ι. (2010). Επίδραση του όζοντος στη μετασυλλεκτική συμπεριφορά καρπών ακτινιδιάς (*Actinidia deliciosa*, ποικ. 'Hayward') και στην ανάπτυξη της τεφράς σήψης. Μεταπτυχιακή διατριβή, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Παναγόπουλος Χ.Γ. (2007). Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων & Αμπέλου. 4η έκδοση βελτιωμένη & επαυξημένη, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, σελ.606-609.

- Tokli T. (1996). Επίδραση του σταδίου ωρίμανσης, της θερμοκρασίας, διαφόρων χημικών μεταχειρίσεων και συνθηκών συντήρησης στην ευαισθησία καρπών των ποικιλιών I.D.R. Delicious και G.Smith στο επιφανειακό έγκαυμα και βιοχημικές μεταβολές που σχετίζονται με αυτό. 1^ο Κεφ. Διδακτορική διατριβή Α.Π.Θ.. Θεσσαλονίκη.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

- <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/30599/apple>
- <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%AE%CE%BB%CE%BF>
- http://www.michigan.gov/documents/MDA_mod_04_21085_7.html#_Toc49173722
- <http://www.chemeng.ntua.gr/courses/sbt/files/%CE%A8%CE%A5%CE%9E%CE%97.pdf>
- <http://www.criogen.gr/elengxomeni-atmosfera>
- <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2510.pdf>



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000114995