

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ-ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Υπολείμματα αντιοξειδωτικών και μυκητοκτόνων
από μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις σε μήλα**

ΜΟΥΛΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

**Πτυχιακή διατριβή που υποβάλλεται στο τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και
Αγροτικού Περιβάλλοντος ως μερική υποχρέωση για τη λήψη του πτυχίου Γεωπόνου**

ΒΟΛΟΣ 2003

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ-ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Υπολείμματα αντιοξειδωτικών και μυκητοκτόνων
από μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις σε μήλα**

ΜΟΥΛΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Εξεταστική επιτροπή

**Τσιρόπουλος Ν.
Επίκουρος Καθηγητής
Επιβλέπων**

**Νάνος Γ.
Επίκουρος Καθηγητής
Μέλος**

**Παπάς Α.
Καθηγητής
Μέλος**

ΒΟΛΟΣ 2003



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 55/1
Ημερ. Εισ.: 27-08-2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΦΠΑΠ
2003
ΜΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070113

...στην οικογένειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο.....	13
Η Μηλοκαλλιέργεια γενικά	13
1.1 Η μηλοκαλλιέργεια διεθνώς.....	14
1.2 Η μηλοκαλλιέργεια στην Ελλάδα.....	14
1.3 Η θρεπτική αξία του μήλου.....	15
1.4 Ποικιλίες μηλιάς.....	15
1.4.1 Red Delicious.....	15
1.4.2 Golden Delicious.....	16
1.4.3 Jonathan, Jonagold, Jonagored.....	16
1.4.4 Granny Smith.....	16
1.4.5 Royal Gala, Mondial Gala	17
1.4.6 Fuji.....	17
1.4.7 Φιρίκι.....	17
1.5 Οικονομική σημασία της μηλοκαλλιέργειας.....	17
1.6 Η σημασία της μηλοκαλλιέργειας στο ανατολικό Πήλιο	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο.....	19
Εποχή Συγκομιδής.....	19
Κριτήρια Συλλεκτικής Ωριμότητας.....	19
2.1 Στάδιο ωρίμανσης.....	20
2.2 Πρόγνωση του χρόνου συγκομιδής	21
2.3 Κριτήρια συλλεκτικής ωριμότητας.....	21
2.4 Δείκτες ωριμότητας για τα μήλα Ζαγοράς Πηλίου.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο.....	25
Συντήρηση Μήλων	25
3.1 Εισαγωγή.....	26
3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την συντήρηση	26
3.3 Τροποποιημένη ή ελεγχόμενη ατμόσφαιρα	27
3.4 ULO-Ultra Low Oxygen	28
3.5 Κατασκευή και λειτουργία μονάδας ελεγχόμενης ατμόσφαιρας	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο.....	31
Προβλήματα κατά τη συντήρηση των μήλων.....	31
4.1 Εισαγωγή.....	32
4.2 Καταπονήσεις από το περιβάλλον του ψυκτικού χώρου	32

4.3	Μετασυλλεκτικές σήψεις των μήλων	33
4.3.1	Φακιδική σήψη (Bulls eye rot)	34
4.3.2	Φουζικλάδι των ψυγείων	35
4.3.3	Κυανή σήψη (blue mold rot)	35
4.3.4	Σταχτιά ή τεφρά σήψη (gray mold rot)	36
4.3.5	Αντιμετώπιση μετασυλλεκτικών σήψεων	37
4.4	Φυσιολογικές ασθένειες των μήλων κατά τη συντήρηση.....	38
4.4.1	Επιφανειακό έγκαυμα των μήλων. Περιγραφή, παράγοντες που το επηρεάζουν, αντιμετώπιση.....	38
4.4.2	Πικρή στιγματώση των μήλων (bitter pit).....	42
4.4.3	Εσωτερική αποσύνθεση (internal breakdown)	42
4.4.4	Υάλωση μήλων (water core)	43
4.4.5	Άλλες φυσιολογικές ασθένειες των μήλων	43
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο.....	44
	Χημική Αντιμετώπιση Μετασυλλεκτικών Σήψεων	44
	και Επιφανειακού Εγκαύματος	44
5.1	Χημική αντιμετώπιση μετασυλλεκτικών σήψεων	45
5.1.1	Imazalil, περιγραφή και ιδιότητες.....	45
5.1.2	Thiabendazole (TBZ), περιγραφή και ιδιότητες.....	46
5.1.3	Συμπεριφορά - υπολειμματική δράση του imazalil & thiabendazole.....	48
5.1.4	Ανασκόπηση αναλυτικών μεθόδων (τεχνικών) για την διερεύνηση-.....	50
	προσδιορισμό υπολειμμάτων του imazalil & thiabendazole.	50
5.2	Αντιμετώπιση του επιφανειακού εγκαύματος με χημικά μέσα.....	52
5.2.1	Diphenylamine (DPA), περιγραφή και ιδιότητες	53
5.2.2	Συμπεριφορά & υπολειμματική δράση της διφαινυλαμίνης (DPA).....	54
5.2.3	Ανασκόπηση αναλυτικών μεθόδων (τεχνικών), για την διερεύνηση και προσδιορισμό υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης	55
5.3	Αναλυτικές μέθοδοι για την διερεύνηση και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης, του imazalil και του thiabendazole.....	57
5.4	Ευρωπαϊκή Ένωση και Μέγιστα αποδεκτά όρια υπολειμμάτων-MRLs (Maximum Residues Limits).....	57
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο.....	59
	Υπολείμματα Γεωργικών Φαρμάκων.....	59
	Σε Φυτικά Προϊόντα	59
6.1	Εισαγωγή.....	60
6.2	Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων.....	61
6.3	Αξιολόγηση (validation) των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων	62
6.4	Οργανικοί διαλύτες.....	64
6.5	Δειγματοληψία (sampling) & διατήρηση των δειγμάτων.....	65
6.5.1	Βέλτιστος αριθμός στοιχειωδών (αρχικών) δειγμάτων και εργαστηριακών δειγμάτων	65
6.5.2	Δειγματοληψία για τον έλεγχο υπολειμμάτων από φορτία.....	66
6.5.3	Δειγματοληψία από πειραματικά τεμάχια (supervised trials)	66
6.5.4	Διατήρηση (συντήρηση) των δειγμάτων.....	67
6.6	Διαδικασία ανάλυσης.....	67
6.7	Προετοιμασία των αναλυτικών δειγμάτων	67
6.8	Εκχύλιση (extraction).....	68
6.9	Καθαρισμός του εκχυλίσματος (Clean-up).....	69

6.9.1 Κατανομή μεταξύ δυο υγρών (liquid-liquid partitioning).....	69
6.9.2 Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography).....	70
6.9.3 Χρωματογραφία γέλης ή χρωματογραφία μοριακού διαχωρισμού (Gel Permeation Chromatography, ή size exclusion chromatography).....	70
6.9.4 Σαρωτική συναπόσταξη (sweep co distillation)	71
6.9.5 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).....	71
6.10 Συμπύκνωση του εκχυλίσματος (concentration)	72
6.11 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός (determination)	72
6.11.1 Αεριοχρωματογραφία (gas chromatography, GC).....	72
6.11.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)	74
6.11.3 Φασματογραφία μάζας (Mass Spectrometry, MS)	74
6.11.4 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV/VIS spectroscopy)	75
6.11.5 Ανοσοδοκιμασίες (Immunoassays).....	75
6.12 Βασικοί όροι στη χρωματογραφία στήλης.....	75
6.13 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	76
6.14...Πολύ-υπολειμματικές αναλυτικές μέθοδοι	77
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο.....	81
Υλικά και Μέθοδοι.....	81
7.1 Γενικά.....	82
7.2 Προέλευση των μήλων.....	82
7.3 Δειγματοληψία και μετασυλλεκτικές εφαρμογές.....	82
7.4 Συντήρηση μήλων.....	83
7.5 Μέτρηση ποιοτικών χαρακτηριστικών	83
7.6 Προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση υπολειμμάτων.....	84
7.7 Χημικά αντιδραστήρια.....	85
7.8 Εκχύλιση	86
7.9 Χρωματογραφική ανάλυση.....	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο.....	88
Αποτελέσματα.....	88
8.1 Γενικά.....	89
8.2 Επιλογή Χρωματογραφικών συνθηκών διαχωρισμού και ανάλυσης.....	90
α) Δοκιμές σε εισαγωγέα τύπου on column.	90
β) Δοκιμές σε εισαγωγέα τύπου split-splitless	90
γ) Χρωματογραφικός διαχωρισμός.....	91
8.3 Επιλογή μεθόδου εκχύλισης.....	92
8.3.1 Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα	92
8.3.2 Εκχύλιση με ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα.....	95
8.4 Ποσοτικοποίηση	99
8.5 Μετρήσεις υπολειμμάτων από μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις σε μήλα εμπορίου.....	101
8.6 Μετρήσεις υπολειμμάτων σε συντηρημένα μήλα	103
8. 6. 1 Μεταβολή υπολειμμάτων Diphenylamine στα μήλα	103
8. 6. 2 Μεταβολή υπολειμμάτων Imazalil στα μήλα	105
8. 6. 3 Μεταβολή υπολειμμάτων Thiabendazole στα μήλα.....	107

8.7 Μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών των μήλων κατά την συντήρηση	109
Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	115

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή μου κ. Νίκο Τσιρόπουλο για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Οι υποδείξεις, οι συμβουλές και η ενθάρρυνση του για την επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της εργασίας ήταν κάτι παραπάνω από πολύτιμες. Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γιώργο Νάνο για την ουσιαστική βοήθειά του στην πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους και την συγγραφή αυτής της εργασίας. Ευχαριστίες επίσης εκφράζονται στον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Παππά για τις χρήσιμες διορθώσεις του ως μέλος της εξεταστικής επιτροπής.

Πολλές ευχαριστίες εκφράζονται στον γεωπόνο, υποψήφιο Διδάκτορα κ. Δημήτρη Λύκα για την βοήθειά του στο πειραματικό μέρος και στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων.

Τέλος θερμά ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ενθάρρυνση και την συμπαράστασή τους.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία που ακολουθεί έγινε στα πλαίσια των καθηκόντων μου σαν φοιτητή του τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και το θέμα της αφορά τα υπολείμματα αντιοξειδωτικών και μυκητοκτόνων από μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις σε μήλα

Συγκεκριμένα μελετήθηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων της αντιοξειδωτικής ουσίας διφαινυλαμίνης και των μυκητοκτόνων imazalil και thiabendazole κατά την συντήρηση μήλων Ολοκληρωμένης Παραγωγής Ζαγοράς, μετά από μετασυλλεκτική εφαρμογή. Επιπλέον προσδιορίστηκαν υπολείμματα των παραπάνω ουσιών σε δείγματα μήλων του εμπορίου. Για τον λόγο αυτό έγινε προσπάθεια να αναπτυχθεί και να επικυρωθεί μία αναλυτική μέθοδος που θα προσδιόριζε ταυτόχρονα υπολείμματα και των τριών παραπάνω ουσιών, αφού δεν βρέθηκε στην βιβλιογραφία κάποια αναλυτική μέθοδος για ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων των diphenylamine, imazalil και thiabendazole.

Τα δείγματα μήλων που αναλύθηκαν προήλθαν από μηλέωνα που βρίσκεται στην ευρύτερη περιοχή της Ζαγοράς Πηλίου. Η εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων έγινε στις εγκαταστάσεις του Αγροτικού Συνεταιρισμού Ζαγοράς. Οι αναλύσεις των υπολειμμάτων έγιναν στο Εργαστήριο Χημείας και οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών στο Εργαστήριο Δενδροκομίας του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η εργασία χωρίζεται σε θεωρητικό και πειραματικό μέρος. Στο θεωρητικό μέρος δίδονται πληροφορίες για την οικονομική σημασία της μηλοκαλλιέργειας στην Ελλάδα γενικά και στο ανατολικό Πήλιο ειδικότερα (Κεφ. 1), για τα κριτήρια συγκομιδής των μήλων (Κεφ. 2), για τους τρόπους συντήρησης (Κεφ. 3) καθώς και για τα προβλήματα που εμφανίζονται κατά την συντήρησή τους (Κεφ. 4). Ιδιαίτερη έκταση δίνεται στην περιγραφή της φυσιολογικής ασθένειας ‘επιφανειακό έγκαυμα’ και των μυκήτων που προσβάλλουν τα μήλα μετασυλλεκτικά. Στο Κεφάλαιο 5 παρουσιάζονται τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα diphenylamine, imazalil και thiabendazole και γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση της συμπεριφοράς τους και της υπολειμματικής τους δράσης (κυρίως στα μήλα) καθώς και των αναλυτικών μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων τους. Στο Κεφάλαιο 6 περιγράφεται η διαδικασία προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε φυτικά προϊόντα.

Στο πειραματικό μέρος περιγράφεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε από την δειγματοληψία και την εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών ουσιών έως την ανάλυση των υπολειμμάτων τους (Κεφ. 7). Τέλος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εργασίας με βάση τα οποία στη συνέχεια ακολουθεί ο σχολιασμός και η εξαγωγή των συμπερασμάτων (Κεφ. 8 & 9).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου που θα επέτρεπε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων της αντιοξειδωτικής ουσίας diphenylamine και των μυκητοκτόνων imazalil και thiabendazole σε μήλα ώστε να μελετηθεί η υπολειμματική τους δράση κατά την περίοδο συντήρησής των μήλων. Τα παραπάνω φυτοπροστατευτικά προϊόντα εφαρμόζονται μετασυλλεκτικά στα μήλα πριν οδηγηθούν στην συντήρηση και χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές μηλοπαραγωγικές περιοχές του κόσμου και στην περιοχή της Ζαγοράς Πηλίου.

Οι καρποί που αναλύθηκαν συγκομίστηκαν από μηλέωνα της ευρύτερης περιοχής Ζαγοράς, δέχτηκαν την συνήθη μετασυλλεκτική μεταχείριση της διαβροχής με διάλυμα των μυκητοκτόνων και του αντιοξειδωτικού και κατόπιν συντηρήθηκαν σε κοινούς θαλάμους ψύξης. Η παρακολούθηση της τύχης των φυτοπροστατευτικών ουσιών πραγματοποιήθηκε με έλεγχο των υπολειμμάτων τους στα συντηρούμενα μήλα μετά από 31, 64, 87 και 123 ημέρες συντήρησης.

Για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των υπολειμμάτων των diphenylamine, imazalil και thiabendazole χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD). Μετά από δοκιμές επιλέχθηκε και εφαρμόστηκε εκχύλιση των δειγμάτων με ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα και συμπύκνωση σε τελικό διαλύτη τον οξικό αιθυλεστέρα. Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκαν και βρέθηκαν 84-102 % και 4-12 % αντίστοιχα και για τα τρία μόρια, τιμές ικανοποιητικές για τις αναλύσεις υπολειμμάτων. Σαν όρια προσδιορισμού (Limit of Quantification, LOQ) της μεθόδου, θεωρήθηκαν τα 0,05 mg/kg για τη diphenylamine, τα 0,25 mg/kg για το thiabendazole και τα 0,25 mg/kg για το imazalil.

Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων των diphenylamine, imazalil και thiabendazole, στα μήλα αμέσως μετά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση, βρέθηκαν πιο χαμηλές από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs) που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα υπολείμματα σε μήλα, τα οποία είναι 5 mg/kg και για τις τρεις ουσίες. Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων των τριών φυτοπροστατευτικών ουσιών ήταν: diphenylamine, $3,20 \pm 0,44$ mg/kg, imazalil, $2,30 \pm 0,50$ mg/kg, & thiabendazole, $1,53 \pm 0,31$ mg/kg. Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων και των τριών ουσιών μειώθηκαν με τον χρόνο συντήρησης έτσι ώστε μετά από δύο μήνες συντήρησης να παραμένει στους καρπούς

το 75 %, 95,7 % & 89,6 % της αρχικής συγκέντρωσης των diphenylamine, imazalil και thiabendazole, αντίστοιχα. Μετά από τέσσερις μήνες συντήρησης παρέμενε στους καρπούς το 60,4 %, 81,3 % & 67,4% της αρχικής συγκέντρωσης των diphenylamine, imazalil και thiabendazole, αντίστοιχα.

Όσον αφορά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των συντηρούμενων μήλων, έγιναν μετρήσεις για την σκληρότητα της σάρκας, την περιεκτικότητα σε διαλυτά στερεά συστατικά (Δ.Σ.Σ.) και την εξωτερική ποιότητα των καρπών. Η σκληρότητα της σάρκας μειώθηκε με τον χρόνο συντήρησης, περισσότερο όμως στους καρπούς που δέχτηκαν την μετασυλλεκτική χημική μεταχείριση σε σύγκριση με καρπούς που πλύθηκαν μόνο με κρύο νερό (μάρτυρας). Η περιεκτικότητα σε Δ.Σ.Σ. αυξήθηκε όπως ήταν αναμενόμενο κατά την διάρκεια της συντήρησης περισσότερο όμως στους καρπούς του μάρτυρα. Όσον αφορά την εξωτερική ποιότητα των καρπών, δεν παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις ή μειονεκτήματα στους καρπούς κατά την διάρκεια της συντήρησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

Η Μηλοκαλλιέργεια γενικά



1.1 Η μηλοκαλλιέργεια διεθνώς

Η καλλιέργεια της μηλιάς είναι διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο. Καταλαμβάνει την τρίτη θέση στα οπωροφόρα δέντρα, με ετήσια παγκόσμια παραγωγή περίπου 47.000.000 τόνους. Η Κίνα καταλαμβάνει την πρώτη θέση στην παραγωγή μήλων, καλύπτοντας το 41% της παγκόσμιας παραγωγής. Οι ΗΠΑ βρίσκονται στη δεύτερη θέση και ακολουθούν η Τουρκία, η Γαλλία, η Ιταλία, η πρώην Σοβιετική Ένωση, η Γερμανία, η Αργεντινή, η Χιλή κ.α.

Οι καλύτερες και πιο διαδεδομένες ποικιλίες μηλιάς στο κόσμο, είναι οι: Red Delicious, Golden Delicious & Jonathan στις ΗΠΑ, η Cox's Orange Pipin στην Αγγλία, η Bella di Boskoop στην Ολλανδία, η Renetta del Canada στη Γαλλία, η Granny Smith στην Αυστραλία και η McIntosh στον Καναδά (Κουκουργιάννης, 1997).

Στην Ε.Ε. η ετήσια παραγωγή μήλων κυμαίνεται από 7.500.000 έως 9.000.000 τόνους. Η παραγωγή του 2001 εκτιμήθηκε στους 7.497.016 τόνους μειωμένη κατά 9% σε σχέση με αυτή του 2000. Οι ποικιλίες Jonagored & Granny Smith παρουσίασαν μείωση, ενώ αντίθετα αύξηση παρουσίασαν οι ποικιλίες Gala, Fuji, Braeburn & Pink Lady (Κουκουργιάννης, 2001)

1.2 Η μηλοκαλλιέργεια στην Ελλάδα

Η συνολική έκταση το 1992 ήταν 182.000 στρέμματα, το δε 1996 περιορίστηκε σε 137.000 στρέμματα. Παρά τη μείωση της έκτασης η παραγωγή διατηρήθηκε στα ίδια σχεδόν επίπεδα. Αυτό οφείλεται στον εκσυγχρονισμό της καλλιέργειας με πιο παραγωγικές ποικιλίες, εμβολιασμένες σε πιο κατάλληλα υποκείμενα (Κουκουργιάννης, 1997). Η παραγωγή του 2001 εκτιμήθηκε στους 216.000 τόνους μειωμένη κατά 25% σε σχέση με το 2000 (Κουκουργιάννης, 2001). Η Ελλάδα με μέση παραγωγή 300.000 τόνους/έτος, θεωρητικά είναι αυτάρκης σε μήλα, όμως τα τελευταία χρόνια, παρατηρούνται εισαγωγές μήλων καθόλη τη διάρκεια του έτους από ΗΠΑ, Τουρκία, Ισπανία, Χιλή, Ν.Αφρική κ.α. Μικροποσότητες μήλων εξάγονται κυρίως από τη Ζαγορά του Πηλίου.

1.3 Η θρεπτική αξία του μήλου

Ο κυριότερος ίσως λόγος διάδοσης και καλλιέργειας της μηλιάς σε πάρα πολλές περιοχές του κόσμου, είναι η υψηλή θρεπτική αξία του καρπού της δηλαδή του μήλου. Το μήλο πέρα από την ωραία γεύση του, καλύπτει τις ανάγκες του ανθρώπινου οργανισμού σε βιταμίνη Α και μερικώς σε βιταμίνες C & E . Επιπλέον προμηθεύει τον ανθρώπινο οργανισμό με κυτταρίνες και ημικυτταρίνες που διευκολύνουν τη πέψη και βοηθούν στην καλή λειτουργία του παχέος εντέρου. Ένα νωπό μήλο βάρους 200 gr περιέχει κατά μέσο όρο τα παρακάτω θρεπτικά στοιχεία (Gebhardt *et al.*, 1995):

Νερό	84%	Κάλιο	244mg
Ενέργεια	125cal	Βιταμίνη Α	110IU
Υδατ/κες	32gr	Θειαμίνη	0,04mg
Ασβέστιο	15mg	Ριβοφλαβίνη	0,03mg
Φώσφορος	15mg	Νιασίνη	0,2mg
Σίδηρος	0,4mg	Ασκορβικό οξύ	12mg

Πίνακας 1. Θρεπτική αξία του μήλου

Το 70% της ποσότητας των βιταμινών που περιέχει το μήλο βρίσκονται στο φλοιό και στην σάρκα ακριβώς λίγα χιλιοστά κάτω από τον φλοιό.

1.4 Ποικιλίες μηλιάς

Στον Εθνικό Κατάλογο από το 1991 έως το 1995 έχουν καταχωρηθεί 47 ποικιλίες μηλιάς. Οι κυριότερες καλλιεργούμενες και προτεινόμενες ποικιλίες είναι η Red Delicious, η Golden Delicious, η Mutsu, η Jonathan, Jonagold, Jonagored, η Granny Smith, η Gala, και η Fuji, οι οποίες και περιγράφονται στη συνέχεια.

1.4.1 Red Delicious



Προέρχεται από την Delicious, η οποία δημιουργήθηκε στις ΗΠΑ (1872). Η Red Delicious έχει πολλές παραλλαγές-κλώνους κανονικούς ή spur. Όλες σχεδόν οι παραλλαγές της Red Delicious παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες στα χαρακτηριστικά του δέντρου και του καρπού. Κανονικοί κλώνοι (Standard) είναι οι: Starking Delicious, Imperial Double, Red Delicious, Topred Delicious, Richared,

Classic Delicious κ.α. Είναι ποικιλίες μέσης – ζωηρής βλάστησης, πλαγιόκλαδες, μπαίνουν σχετικά αργά στην παραγωγή, το αραίωμα είναι απαραίτητο. Καρποφορούν σε λαμβούρδες και μικτούς βλαστούς, η παραγωγή είναι μέση έως μεγάλη, συχνά παρενιαυτοφορούν, και πριν τη συγκομιδή σημειώνεται καρπόπτωση. Είναι ευαίσθητες στο φουζικλάδιο. Ο καρπός είναι μέσου– μεγάλου μεγέθους, κωνικός, με πέντε χαρακτηριστικές μαστοειδείς αποφύσεις στην περιοχή του κάλυκα, επίχρωμα κόκκινο με ραβδωτές αποχρώσεις. Η σάρκα είναι λευκή, γλυκιά, με άρωμα και εξαιρετική γεύση. Οι standard κλώνοι της Red Delicious ξεχωρίζουν για την υψηλή ποιότητα, μέγεθος, σχήμα, χρώμα και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του καρπού τους. Συνιστώνται κυρίως για τις ημιορεινές-ορεινές ζώνες, όπως η περιοχή της Ζαγοράς Πηλίου. Ποικιλίες spur είναι οι: Starkimson, Redchief, Oregon, Scarlet κ.α.

1.4.2 Golden Delicious



Είναι η πιο διαδεδομένη ποικιλία στο κόσμο. Ο καρπός της είναι κίτρινος μέσου-μεγάλου μεγέθους, σφαιρικός-κωνικός, με λευκοκίτρινη, τραγανή, χυμώδη, σχεδόν γλυκιά-υπόξινη σάρκα. Έχουν δημιουργηθεί και κλωνικές επιλογές της G.Delicious οι οποίες είναι ανθεκτικές στην εσχάρωση του φλοιού και είναι κατάλληλες για όλες τις περιοχές. Αυτές είναι οι G.Delicious B και η Smoothee.

1.4.3 Jonathan, Jonagold, Jonagored



Η Jonathan διαδόθηκε στην περιοχή της Φλώρινας. Η Jonagold και η Jonagored διαδίδονται σε ημιορεινές-ορεινές περιοχές, αν και η Jonagored το 2001 παρουσίασε μείωση 27% εξαιτίας εκριζώσεων, χαμηλών αποδόσεων, και των δυσμενών συνθηκών κατά την ανθοφορία-καρπόδεση (Κουκουργιάννης, 2001).

1.4.4 Granny Smith



Είναι πράσινη υπόξινη ποικιλία με ιδιαίτερα ποιοτικά γνωρίσματα. Τα τελευταία χρόνια έχει περιορισθεί η ζήτηση μήλων αυτής της ποικιλίας ενώ προτιμάται στις χώρες της κεντρικής και βόρειας Ευρώπης. Δεν συνιστάται για ορεινές περιοχές.

1.4.5 Royal Gala, Mondial Gala



Προέρχονται από μεταλλαγές της ποικιλίας Gala. Είναι σημαντικές πρώιμες ποικιλίες, σχετικά νέες στην χώρα μας. Το λαμπερό κόκκινο επίχρωμα καλύπτει το 60-100% του καρπού, ανάλογα με τη περιοχή προέλευσης (πεδινή-ορεινή).

1.4.6 Fuji



Ποικιλία ιαπωνικής προέλευσης. Συνιστάται για πεδινές-ημιορεινές περιοχές. Έχει πολλές παραλλαγές-κλώνους με πιο ενδιαφέρουσα τη Naga Fu 6. Ο καρπός είναι μισοκόκκινος, γλυκός και εύχυμος.

1.4.7 Φιρίκι

Ελληνική παραδοσιακή ποικιλία του Πηλίου που μπαίνει αργά στη καρποφορία. Ο καρπός είναι μικρός, κυλινδρικός, αρωματικός, γλυκός, εύγευστος, με κόκκινη απόχρωση στο μέρος που ηλιάζεται.

1.5 Οικονομική σημασία της μηλοκαλλιέργειας

Οι κυριότερες μηλοπαραγωγικές περιοχές της Ελλάδας βρίσκονται στους νομούς: Ημαθίας, Πέλλας, Κοζάνης, Φλώρινας, Καστοριάς, Αρκαδίας και Μαγνησίας(Κουκουργιάννης, 1997). Η παραγωγή και εμπορία μήλων αποτελούν σημαντικό τομέα της εθνικής οικονομίας, αποδίδοντας υψηλή πρόσοδο στους καλλιεργητές. Η εξαγωγή ελληνικών μήλων και η προώθησή τους σε ξένες αγορές γίνεται σε πολύ μικρό βαθμό αφού κάτι τέτοιο προϋποθέτει υψηλή ποιότητα, άψογη συσκευασία, ανταγωνιστικότητα και σταθερότητα σε όλη τη διάρκεια της διάθεσης του προϊόντος. Μηλοπαραγωγικές περιοχές της χώρας μας, όπως η Ζαγορά Πηλίου και η Αρκαδία, έχουν πετύχει αναγνώριση των μήλων τους από την Ε.Ε. ως προϊόν Π.Ο.Π.(Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης), ενώ άλλες περιοχές έχουν αναγνωρίσει τα μήλα τους ως Π.Ο.Π. από το υπουργείο γεωργίας. Η δυνατότητα παραγωγής ελληνικών μήλων υψηλής ποιότητας τα οποία μπορούν να καταλάβουν μια αξιόλογη θέση στις διεθνείς αγορές είναι δεδομένη. Υπάρχει εμπειρία και γνώση, απαιτείται όμως βελτίωση σε τομείς όπως η συντήρηση

(ψυκτικοί χώροι, CA κ.λ.π.) συσκευασία, εμπορία, καθώς και η εισαγωγή νέων καλλιεργητικών τεχνικών, ώστε η μηλοκαλλιέργεια να παραμείνει δυναμική καλλιέργεια, να εξελιχθεί και τα ελληνικά μήλα να γίνουν ανταγωνιστικά στις διεθνείς αγορές.

1.6 Η σημασία της μηλοκαλλιέργειας στο ανατολικό Πήλιο

Η συστηματική μηλοκαλλιέργεια στον Ν. Μαγνησίας, με επίκεντρο τις ορεινές περιοχές του Πηλίου, όπως η Ζαγορά άρχισε στις αρχές του '50 ενώ ο αγροτικός συνεταιρισμός Ζαγοράς παράγει και προσφέρει μήλα από το 1916. Στην περιοχή υπήρχε παράδοση στην καλλιέργεια μήλων και η τοπική ποικιλία Φιρίκι ήταν ήδη γνωστή στους καταναλωτές μήλων για τουλάχιστον 200 χρόνια. Το σύνολο σχεδόν των μηλεώνων είναι παραδοσιακοί, σε επικλινή εδάφη, σε σπορόφυτα υποκείμενα και διαμόρφωση σε ελεύθερο κύπελλο, με μεγάλο ύψος που συνεπάγεται υψηλό κόστος παραγωγής. Τα τελευταία χρόνια γίνεται ανανέωση της καλλιέργειας, όπως φυτεύσεις σε υποκείμενο MM106 και νέες ποικιλίες (Gala, Red Chief κ.α.). Η βασική όμως τάση των παραγωγών και των οργανώσεων τους είναι η διατήρηση της ποικιλίας Starking Delicious, η οποία ανέδειξε την περιοχή.

Ο ρόλος του Αγροτικού Συνεταιρισμού Ζαγοράς είναι καθοριστικός για την παραγωγή προϊόντος ποιότητας, την κοινή διαχείριση και την οργάνωση της εμπορίας. Διαθέτει σύγχρονο διαλογητήριο και 54 ψυκτικούς θαλάμους με απλή ψύξη και με ελεγχόμενη ατμόσφαιρα.

Με κατοχυρωμένο εμπορικό σήμα "ΖΑΓΟΡΙΝ" (καν. ΕΕΚ 1107/96) και προστατευόμενη ονομασία προέλευσης, τα μήλα ΖΑΓΟΡΙΝ διατίθενται στην εσωτερική αγορά αλλά και σε αγορές του εξωτερικού όπως στις χώρες της Ε.Ε., Αραβικές, Ισραήλ, Κύπρος κ.α. διαφημίζοντας τη χώρα μας.

Η πλειοψηφία των νοικοκυριών της περιοχής του ανατολικού Πηλίου απασχολείται αποκλειστικά με τη γεωργία, με κεντρική ή μοναδική δραστηριότητα την καλλιέργεια των μήλων, που αποτελεί και την κύρια πηγή του εισοδήματός τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

Εποχή Συγκομιδής Κριτήρια Συλλεκτικής Ωριμότητας



2.1 Στάδιο ωρίμανσης

Το στάδιο ωρίμανσης κατά τη συγκομιδή επηρεάζει τόσο τη διάρκεια συντήρησης των καρπών όσο και την ποιότητα των καρπών, δηλαδή την φυσική και χημική σύσταση του καρπού, καθώς και την εκδήλωση-ένταση φυσιολογικών ασθενειών και αλλοιώσεων (επιφανειακό έγκαυμα, μετασυλλεκτικές σήψεις κ.α.).

Στα μήλα διακρίνονται δύο στάδια ωρίμανσης:

- Το στάδιο συλλεκτικής ωριμότητας ή στάδιο ωρίμανσης για συγκομιδή.
- Το στάδιο ωρίμανσης για κατανάλωση.

Στο στάδιο ωρίμανσης για συγκομιδή, ο καρπός δεν τρώγεται ευχάριστα, έχει αποκτήσει όμως την ικανότητα να ωριμάσει κανονικά όταν απομακρυνθεί από το δέντρο. Τα μήλα είναι κλημακτηρικοί καρποί και όταν αρχίσουν να ωριμάζουν αναπτύσσουν το ενζυμικό σύστημα παραγωγής αιθυλενίου, της ορμόνης που προάγει την ωρίμανση των καρπών.

Στη μετασυλλεκτική μεταχείριση των μήλων επιδιώκεται πάντοτε η διατήρηση της ποιότητας των καρπών. Ο βαθμός ωρίμανσης του καρπού κατά τη συγκομιδή παίζει πολύ σπουδαίο ρόλο στη μετέπειτα ζωή του. Πολύ πρόωμη συγκομιδή πρέπει να αποφεύγεται γιατί οι καρποί δεν αποκτούν πλήρως τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και επιπλέον παρουσιάζουν σε μεγάλο βαθμό τη φυσιολογική ασθένεια του επιφανειακού εγκαύματος. Αλλά και η πολύ όψιμη συγκομιδή πρέπει να αποφεύγεται γιατί οι υπερώριμοι καρποί έχουν μειωμένη συντηρησιμότητα και σε σύντομο χρονικό διάστημα υποβαθμίζεται η ποιότητα τους που εκδηλώνεται κυρίως με μαλάκωμα της σάρκας και την εκδήλωση διαφόρων φυσιολογικών ασθενειών.

Η επιλογή του σταδίου συγκομιδής πρέπει να γίνεται πάντοτε ανάλογα με τη μέθοδο συντήρησης που εφαρμόζεται (κοινή ψύξη, CA, ULO). Καρποί που προορίζονται για μακρά συντήρηση πρέπει να συγκομίζονται σε στάδιο που δεν έχει αρχίσει η παραγωγή αιθυλενίου, ενώ οι καρποί που προορίζονται να διατεθούν σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη συγκομιδή συνιστάται να αφήνονται περισσότερο χρόνο στο δέντρο για να αποκτούν υψηλότερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

2.2 Πρόγνωση του χρόνου συγκομιδής

Η πρόγνωση του χρόνου συγκομιδής είναι χρήσιμη όχι μόνο για τον παραγωγό ο οποίος πρέπει να οργανώσει την συγκομιδή του, αλλά και για όλους όσους ασχολούνται με τη μεταφορά, αποθήκευση και συντήρηση σε ψυκτικούς χώρους, μεταποίηση και εμπορία των μήλων. Για την πρόγνωση του χρόνου έναρξης συγκομιδής των μήλων χρησιμοποιούνται: α) η ημερομηνία συγκομιδής, β) η καρπική περίοδος, και γ) οι μονάδες θερμότητας (Σφακιωτάκης, 1995).

α) Η ημερομηνία συγκομιδής τείνει να είναι η ίδια για μια ποικιλία σε μια ορισμένη περιοχή, κάθε χρόνο.

β) Η μέση χρονική περίοδος από την πλήρη άνθιση μέχρι την έναρξη συγκομιδής, ονομάζεται καρπική περίοδος και θεωρείται σχετικά σταθερό κριτήριο πρόγνωσης της ημερομηνίας συγκομιδής για τα μήλα. Η καρπική περίοδος της ποικιλίας Starking Delicious για παράδειγμα είναι 145-150 ημέρες (Βασιλακάκης, 1999).

γ) Πρόγνωση του χρόνου συγκομιδής γίνεται και με τον αριθμό των μονάδων θερμότητας (θερμοημέρες) από την πλήρη άνθιση μέχρι την συγκομιδή. Ως μονάδα θερμότητας θεωρείται 1 °C (ή °F) για κάθε ημέρα πάνω από μια βασική θερμοκρασία (Σφακιωτάκης, 1995).

2.3 Κριτήρια συλλεκτικής ωριμότητας

Τα κριτήρια συλλεκτικής ωριμότητας στηρίζονται σε μια ή περισσότερες μετρήσεις, που μας βοηθούν να προσδιορίσουμε ότι οι καρποί έχουν φτάσει στο κατάλληλο στάδιο για συγκομιδή, ικανοποιώντας ένα ελάχιστο παραδεκτής ποιότητας για άμεση διάθεση ή για συντήρηση. Τα πλέον γνωστά κριτήρια συλλεκτικής ωριμότητας των μήλων, είναι:

➤ Μέγεθος και σχήμα χαρακτηριστικό της ποικιλίας

Το μέγεθος του καρπού και το σχήμα του είναι χαρακτηριστικό της ποικιλίας, επηρεάζεται όμως και από πολλούς άλλους παράγοντες οπότε δεν μπορεί να αποτελέσει από μόνο του ασφαλές κριτήριο.

➤ Ευκολία απόσπασης του καρπού

Η δύναμη που απαιτείται προκειμένου ο καρπός να αποσπαστεί από το καρποφόρο όργανο είναι κριτήριο αρκετά καλό αν συνδυαστεί με την εμπειρία του παραγωγού καθώς και με άλλα κριτήρια.

➤ **Χρώμα βασικό και επίχρωμα**

Οι χρωστικές, χλωροφύλλες και καροτινοειδή δίνουν το βασικό χρώμα στον φλοιό, το οποίο με την ωρίμανση, μετατρέπεται σε διάφορες διαβαθμίσεις, από βαθύ πράσινο, σε ανοικτό πράσινο, πρασινοκίτρινο ή κίτρινο, και το οποίο σε ορισμένες ποικιλίες μπορεί να αποτελέσει ασφαλές κριτήριο ωρίμανσης. Ο προσδιορισμός του βασικού χρώματος του φλοιού και του επιχρώματος (κόκκινο) γίνεται με το μάτι, με χρήση χρωματικών χαρτιών και με ειδικά όργανα, τα χρωματομέτρα.

➤ **Τεστ γεύσης, άρωμα**

Δαγκώνοντας ο άνθρωπος το μήλο μπορεί να αντιληφθεί τη σκληρότητα της σάρκας, την γλυκύτητα, την οξύτητα, τη στυφότητα και το άρωμα. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα κριτήρια.

➤ **Αντίσταση της σάρκας στην πίεση**

Με την ολοκλήρωση της αύξεσης και την ωρίμανση του καρπού αρχίζει το μαλάκωμα της σάρκας το οποίο χρησιμοποιείται ως κριτήριο ωριμότητας. Η αντίσταση της σάρκας στην πίεση μετρείται με ειδικά όργανα, τα πιεσόμετρα (Effegi, Chattillon κ.α.).

Εκτός από τα παραπάνω κριτήρια που βασίζονται στην μέτρηση φυσικών κυρίως χαρακτηριστικών, υπάρχουν και τα ακόλουθα χημικά χαρακτηριστικά, που χρησιμοποιούνται ως κριτήρια ωριμότητας:

➤ **Διαλυτά στερεά συστατικά(δ.σ.σ.)**

Κατά την ωρίμανση των καρπών γίνεται υδρόλυση του αμύλου και αυξάνεται η περιεκτικότητα των σακχάρων. Τα σάκχαρα αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των διαλυτών στερεών συστατικών και προσδιορίζονται εύκολα με διαθλασίμετρο στον χυμό του καρπού. Στα μήλα τα δ.σ.σ. πρέπει να είναι πάνω από 11 μέχρι και 14%, ανάλογα με την ποικιλία. Το κριτήριο αυτό σε συνδυασμό με το χρώμα μπορεί να αποτελέσει ασφαλές κριτήριο ωρίμανσης των μήλων.

➤ **Τεστ ιωδίου**

Η μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα που συμβαίνει κατά την ωρίμανση, αρχίζει από την περιοχή των σπερμάτων και προχωράει προς τον φλοιό του καρπού. Με το τεστ ιωδίου που είναι πρακτικό και πολύ εύκολο να εφαρμοστεί μπορεί ο παραγωγός να προσδιορίσει την περιεκτικότητα του καρπού σε άμυλο. Η εκτίμηση βασίζεται στην σκούρα μπλε χρώση του αμύλου, που παίρνουν τα κύτταρα, όταν έρθουν σε επαφή με διάλυμα ιωδίου σε ιωδιούχο κάλιο. Για ορισμένες ποικιλίες μηλιάς έχουν καθιερωθεί

δείκτες με την βοήθεια των οποίων οι παραγωγοί προσδιορίζουν το στάδιο συλλογής για συντήρηση με ελεγχόμενη ατμόσφαιρα.

➤ **Μέτρηση αναπνοής-εσωτερική συγκέντρωση αιθυλενίου**

Η συγκομιδή των μήλων πρέπει να γίνεται πριν να έχει αρχίσει η κλιμακτηρική αύξηση της αναπνοής. Στο στάδιο αυτό οι καρποί πάνω στο δέντρο φτάνουν σε ένα κλιμακτηρικό ελάχιστο, σημείο χαρακτηριστικό της αναπνευστικής δραστηριότητας, που δείχνει ότι έχουν εξασφαλισθεί όλες οι βιολογικές προϋποθέσεις για μια κανονική εξέλιξη των καρπών, και αν απομακρυνθούν από το δέντρο μπορούν να εξελιχθούν κανονικά με το σύνδρομο φαινόμενο της ωρίμανσης που καταλήγει στο στάδιο της οργανοληπτικής ωριμότητας (Dilley, 1965 & Dilley, 1968).

Στην πράξη προσδιορίζουμε καλύτερα το στάδιο της φυσιολογικής ωριμότητας με μετρήσεις της εσωτερικής συγκέντρωσης αιθυλενίου, και με τη βοήθεια αέριου-χρωματογράφου. Η συγκομιδή των μήλων που προορίζονται για μακρά συντήρηση, πρέπει να γίνεται πριν η εσωτερική συγκέντρωση αιθυλενίου υπερβεί τις τιμές 0,1-0,5 ppm. Μεταξύ της εσωτερικής συγκέντρωσης αιθυλενίου και της περιεκτικότητας σε δ.σ.σ. παρατηρείται στενή συσχέτιση.

2.4 Δείκτες ωριμότητας για τα μήλα Ζαγοράς Πηλίου

Από τους Ε.Σφακιωτάκης & συνεργάτες (1997), πραγματοποιήθηκε έρευνα με σκοπό την μελέτη διαφόρων δεικτών συλλεκτικής ωριμότητας με τους οποίους θα μπορούσε να γίνει πρόγνωση της συντηρησιμότητας και κυρίως της ευαισθησίας στη φυσιολογική ασθένεια του επιφανειακού εγκαύματος (E.E.), μήλων Ζαγοράς(Starking Delicious), διαφόρων υψομέτρων και διαφόρων εποχών συγκομιδής.

Οι δείκτες ωρίμανσης που εκτιμήθηκαν κατά τη συγκομιδή ήταν ο αριθμός ωρών με θερμοκρασίες κάτω των 12,5°C μέχρι τη συγκομιδή, η αντίσταση της σάρκας του καρπού στην πίεση, τα δ.σ.σ., η εσωτερική συγκέντρωση αιθυλενίου, και ο δείκτης αμύλου-ιωδίου.

Η μελέτη της συντηρησιμότητας των καρπών και η εκτίμηση των προσβολών του E.E. έδειξε ότι το E.E. περιορίστηκε σημαντικά στους καρπούς που είχαν εκτεθεί για περισσότερες από 100 ώρες σε θερμοκρασίες κάτω των 12,5°C και δεν εμφανίσθηκε καθόλου στους καρπούς που συγκέντρωσαν 150 ώρες < 12,5°C.

Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την υπόθεση ότι τα μήλα κατά την εποχή ωρίμανσης στο δέντρο, έχουν ανάγκη από μια περίοδο σκληραγώγησης με την έκθεση στις χαμηλές

θερμοκρασίες του φθινοπώρου ($<12,5^{\circ}\text{C}$) ώστε να είναι σε θέση να υποστούν την επίδραση των θερμοκρασιών συντήρησης (0°C) χωρίς να πάθουν ζημιές από το ψύχος, που εκδηλώνονται με το Ε.Ε.

Από τα δεδομένα της έρευνας προτάθηκε ότι το στάδιο συγκομιδής για την ποικιλία Starking Delicious στην περιοχή Ζαγοράς, είναι κατάλληλο όταν ικανοποιηθούν οι ακόλουθες τιμές κατωφλίου (Σφακιωτάκης & συνεργάτες, 1997) :

- ✓ **Ώρες θερμοκρασιών κάτω των $12,5^{\circ}\text{C}$: >125**
- ✓ **Αιθυλένιο(ppm) : < 1.0**
- ✓ **Δείκτης αμύλου-ιωδίου: 3-4**
- ✓ **Διαλυτά στερεά συστατικά: $>11,5\%$**
- ✓ **Συνεκτικότητα σάρκας: $>6,5$ kg**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

Συντήρηση Μήλων



3.1 Εισαγωγή

Ένας από τους κύριους παράγοντες που συντέλεσαν στην επέκταση της μηλοκαλλιέργειας στην Ελλάδα, είναι η δυνατότητα συντήρησης των μήλων για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη συγκομιδή, μέσα σε εμπορικά ψυγεία. Με τη συντήρηση σε ψυγεία επιδιώκεται η διατήρηση καρπών καλής ποιότητας επί μακρό χρονικό διάστημα, η ομαλή τροφοδοσία της αγοράς και η επιμήκυνση του χρόνου επεξεργασίας όταν τα μήλα προορίζονται για μεταποίηση.

Οι καρποί των περισσότερων εμπορικών ποικιλιών συγκομίζονται από τα τέλη Αυγούστου έως τέλη Οκτωβρίου και μπορούν να διατηρηθούν υπό συνθήκες κανονικής ατμόσφαιρας σε κοινά ψυγεία από 2 μέχρι 6 μήνες δηλαδή μέχρι και το Μάρτιο. Τους υπόλοιπους 3-4 μήνες υπάρχει ένα κενό το οποίο καλύπτεται με εισαγωγές μήλων από χώρες του εξωτερικού. Τελευταία και στην Ελλάδα άρχισε να εφαρμόζεται η συντήρηση μήλων υπό συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας παρατείνοντας τον χρόνο συντήρησης και διακίνησης των μήλων πέραν των 7 μηνών. Για παράδειγμα καρποί της ποικιλίας "Starking Delicious" συντηρούνται στα εμπορικά ψυγεία με κοινή ψύξη 4-5 μήνες και με ελεγχόμενη ατμόσφαιρα πάνω από 7 μήνες.

3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την συντήρηση

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την συντήρηση των μήλων στα ψυγεία είναι οι εξής:

Συγκομιδή. Το στάδιο συλλεκτικής ωριμότητας και οι χειρισμοί της συγκομιδής έχουν μεγάλη επίδραση στη συντήρηση. Η συγκομιδή στο κατάλληλο στάδιο ωριμότητας και η προσεκτική συγκομιδή, χωρίς να τραυματίζονται οι καρποί, αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις για μια καλή συντήρηση.

Πρόψυξη. Η αφαίρεση της θερμότητας αγρού με την πρόψυξη είναι απαραίτητη ενέργεια για την εφαρμογή οποιασδήποτε μεθόδου συντήρησης. Καθυστερημένη πρόψυξη προδιαθέτει τους καρπούς για περιορισμένη συντήρηση.

Φυτουγεία. Η κατάσταση φυτουγείας τόσο των καρπών όσο και των χώρων συντήρησης επηρεάζει τη συντήρηση. Ψεκάσμοι των χώρων συντήρησης πριν από το γέμισμα των θαλάμων με κατάλληλα διαλύματα (φορμόλη 2%) ή επικάλυψη των

τοιχωμάτων των θαλάμων με μυκητοστατική βαφή περιορίζει πολύ την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.

Μετασυλλεκτικές συνθήκες περιβάλλοντος. Μεγάλη επίδραση στη συντήρηση έχουν οι συνθήκες του περιβάλλοντος όπου διατηρούνται οι καρποί και κυρίως ο έλεγχος της θερμοκρασίας, σχετικής υγρασίας και σύστασης του ατμοσφαιρικού αέρα σε οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα και αιθυλένιο. Η θερμοκρασία συντήρησης στους ψυκτικούς χώρους κυμαίνεται μεταξύ 0 °C και 5 °C ανάλογα με την ποικιλία. Για καρπούς της ποικιλίας "Starking Delicious", συνιστάται συντήρηση στους 0 °C τόσο σε κοινά ψυγεία όσο και σε ψυγεία με ελεγχόμενη ατμόσφαιρα. Η σχετική υγρασία στους ψυκτικούς χώρους ενδείκνυται να είναι 95%. Η συντήρηση των μήλων στην Ελλάδα γίνεται κατά κύριο λόγο υπό συνθήκες κανονικής ατμόσφαιρας (κοινά ψυγεία), και σε μικρότερο βαθμό υπό συνθήκες ελεγχόμενης ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

3.3 Τροποποιημένη ή ελεγχόμενη ατμόσφαιρα

Οι όροι τροποποιημένη ατμόσφαιρα και ελεγχόμενη ή ρυθμιζόμενη ατμόσφαιρα (CA-controlled atmosphere) χρησιμοποιούνται για συντήρηση σε περιβάλλον με μειωμένη συγκέντρωση O₂ και αυξημένη συγκέντρωση CO₂. Η πρώτη διαφέρει από τη δεύτερη στο ότι κάτω από συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας υπάρχει συνεχής ρύθμιση με διάφορα μέσα και η σύσταση της ατμόσφαιρας σε CO₂ και O₂ παραμένει σταθερή σε ορισμένα επίπεδα, ενώ κάτω από συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας μειώνεται η σύσταση του αέρα σε O₂ και αυξάνεται σε CO₂ αλλά η τελική σύσταση δεν παραμένει σταθερή και εξαρτάται από την αναπνευστική δραστηριότητα των καρπών και από τη διάχυση των αερίων δια μέσου των φυσικών φραγμάτων που περιβάλλουν τους καρπούς. Η τροποποιημένη ή ελεγχόμενη ατμόσφαιρα χρησιμοποιούνται πάντα συμπληρωματικά με την εφαρμογή του ψύχους.

Με την μείωση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου παρατηρούνται οι ακόλουθες ευνοϊκές επιδράσεις στη διατήρηση της ποιότητας των καρπών:

1. Μειώνονται οι μεταβολικές αντιδράσεις των καρπών και κυρίως η αναπνοή, περιορίζονται οι απώλειες της ποιότητας και παρατείνεται η ζωή των καρπών.

2. Επιβραδύνεται η ωρίμανση και κυρίως το μαλάκωμα της σάρκας, η διάσπαση της χλωροφύλλης και οι άλλες φυσιολογικές αντιδράσεις που συνοδεύουν την ωρίμανση των καρπών.

3. Παρατηρείται αισθητή μείωση της παραγωγής αιθυλενίου, και παρεμποδίζεται η δράση του που προκαλεί το μαλάκωμα της σάρκας των καρπών.

Απ'την άλλη, πολύ χαμηλή συγκέντρωση O₂ μπορεί να δημιουργήσει αναερόβιες συνθήκες εντός των κυττάρων, στους ιστούς των καρπών με ανάλογη υποβάθμιση τους.

Η διατήρηση της ποιότητας και η αύξηση της συντηρησιμότητας των μήλων με αυξημένη συγκέντρωση CO₂ οφείλεται στην ανασταλτική επίδραση του CO₂ στην αναπνοή και κυρίως στο ένζυμο της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης.

Στα πλαίσια της συντήρησης μήλων υπό συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας, οι περισσότερες εμπορικές ποικιλίες συντηρούνται ικανοποιητικά με σύσταση αέρα, O₂:1-2,5%, και CO₂:0,5-3% ,όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (Βασιλακάκης, 1999):

Ποικιλία	Θερμοκρασία °C	O ₂ (%)	CO ₂ (%)
Red Delicious	0	1.1-1.5	2-3
Golden Delicious	1	1,0	2-3
G.Smith	0	1,0-1.5	0.5-1
Gala	0	1,0	0.5-1
Jonagold	1	1,0-2.5	2-3
Fuji	0	2,0-2.5	2

Πίνακας 2. Συνθήκες συντήρησης ελεγχόμενης ατμόσφαιρας.

3.4 ULO-Ultra Low Oxygen

Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου μειωθεί σημαντικά (0,75-1,5%), τότε μιλάμε για ελεγχόμενη ατμόσφαιρα με πολύ μειωμένο οξυγόνο ή ULO-CA. Η συντήρηση των μήλων παρατείνεται ακόμη περισσότερο, οι καρποί διατηρούν την φρεσκάδα τους και την καλή ποιότητά τους και περιορίζονται ή δεν εμφανίζονται διάφορες φυσιολογικές ασθένειες των καρπών. Έτσι η χρησιμοποίηση χημικών ουσιών για καταπολέμηση του επιφανειακού εγκαύματος στα μήλα μπορεί να αποφευχθεί με τη χρησιμοποίηση ULO-CA (Sfakiotakis *et al.*, 1993). Σε τέτοιες συνθήκες η σύσταση του ατμοσφαιρικού αέρα εντός του ψυκτικού χώρου, ρυθμίζεται για το O₂ και το CO₂ αντίστοιχα σε 1,5+1,5%, 1+1%, ή ακόμα και 0,75+0,75%. Η συντήρηση με ULO-CA γίνεται πιο αποτελεσματική από ότι με κοινή CA, είναι όμως πιο δαπανηρή και έχει βρεθεί ότι οι καρποί ορισμένων ποικιλιών υπό συνθήκες ULO δεν αναπτύσσουν ικανοποιητικό άρωμα.

Τελευταία εφαρμόζεται και μια καινούργια τεχνική συντήρησης γνωστή σαν **ILOS-Initial Low Oxygen Stress**. Οι καρποί αποθηκεύονται σε ατμόσφαιρα 0,5% ή 0,25% O₂ στους 1°C για δυο εβδομάδες και στη συνέχεια οδηγούνται σε CA με 3 ή 1,5% O₂ για το υπόλοιπο της συντήρησης (*http 1.*). Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται καλύτερη συντήρηση και περιορισμός του scald χωρίς χρήση διφαινυλαμίνης (Truter *et al.*, 1994).

3.5 Κατασκευή και λειτουργία μονάδας ελεγχόμενης ατμόσφαιρας

Οι μόνιμες εγκαταστάσεις CA εξασφαλίζουν τον ακριβή έλεγχο της στεγανότητας που απαιτείται για μακρά συντήρηση μήλων. Η επιβάρυνση από την κατασκευή θαλάμων CA ανέρχεται σε μικρό ποσοστό του συνολικού κατασκευαστικού κόστους ενός κοινού ψυγείου. Το επιπλέον αυτό κόστος καλύπτει κυρίως δαπάνες για στεγανοποίηση και κατασκευή μικρότερων θαλάμων.

Τα σύγχρονα ψυγεία CA κατασκευάζονται συνήθως με έναν όροφο με ατομικούς θαλάμους, αρκετά υψηλούς, ώστε να δέχονται στοίβες παλετοκιβωτίων, και με αρκετό άνοιγμα ώστε να επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση του αέρα.

Σήμερα προτιμάται η κατασκευή θαλάμων με προκατασκευασμένα τοιχώματα (panels). Η στεγανότητα επιτυγχάνεται με έγχυση διογκωμένης πολυουρεθάνης στις εσωτερικές επιφάνειες, με την τοποθέτηση ειδικών στεγανωτικών ουσιών (σιλικόνες) στους αρμούς, και με ειδικής κατασκευής πόρτες που εξασφαλίζουν μόνωση και στεγανότητα. Ιδιαίτερη φροντίδα πρέπει να λαμβάνεται για τη στεγανότητα του δαπέδου.

Οι μεταβολές της θερμοκρασίας, που προκαλούνται με τη λειτουργία του συστήματος ψύξης, δημιουργούν διαστολές και συστολές του αέρα που καταλήγουν σε διαφορές πίεσεως και επιδεινώνουν το πρόβλημα της στεγανότητας. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ανακουφιστικές βαλβίδες που συντελούν στην εξισορρόπηση των πιέσεων και αναπνευστικοί σάκοι που απορροφούν τις διαφορές πίεσης.

Η μείωση του οξυγόνου επιτυγχάνεται με δύο συστήματα. Στο πρώτο σύστημα, της συνεχούς ανανέωσης, το μείγμα με τη μειωμένη συγκέντρωση O₂ που παράγεται από τη γεννήτρια εισάγεται στο θάλαμο και συνεχώς ανανεώνει τον αέρα του ψυγείου έως ότου φθάσει την επιθυμητή συγκέντρωση. Στο δεύτερο σύστημα ο αέρας από το χώρο του θαλάμου έρχεται στη γεννήτρια και με την κατάλληλη επεξεργασία (αφαίρεση O₂, προσθήκη ή αφαίρεση CO₂, αφαίρεση C₂H₄ κ.λ.π.) επιστρέφει στο θάλαμο με το κατάλληλο μείγμα. Η λειτουργία της γεννήτριας συνεχίζεται έως ότου το μίγμα έχει την

επιθυμητή σύσταση. Για την λειτουργία των παραπάνω συστημάτων χρησιμοποιούνται γεννήτριες αζώτου και γεννήτριες διαχωρισμού αερίων διαφόρων τύπων. Ειδικοί αναλυτές(υπερύθρων, παραμαγνητικοί), ελέγχουν αυτόματα τις συγκεντρώσεις των αερίων αμέσως μετά τη πλήρωση των θαλάμων.

Το ψυκτικό σύστημα για τις μονάδες CA είναι το ίδιο, όπως και στα κοινά ψυγεία. Η θερμοκρασία διατηρείται κοντά στους 0 °C, και η σχετική υγρασία στο 95%. Η κυκλοφορία του αέρα κατά τη συντήρηση πρέπει να είναι στο εύρος 0,01-0,02 m³/ sec/τόνο προϊόντος (Σφακιωτάκης, 1995).



Εικόνα 1: Μονάδα ελεγχόμενης ατμόσφαιρας

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

Προβλήματα κατά τη συντήρηση των μήλων



4.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μήλα μπορούν να συντηρηθούν σε εμπορικά ψυγεία με κοινή ψύξη 4-5 μήνες και με ελεγχόμενη ατμόσφαιρα πάνω από 7 μήνες που μπορεί να φτάσει και τους 10 μήνες ανάλογα με την ποικιλία. Η συλλογή των καρπών σε ακατάλληλο στάδιο ωριμότητας σε συνδυασμό με τη μη εφαρμογή αρίστων συνθηκών συντήρησης έχουν ως αποτέλεσμα τη γρήγορη υποβάθμιση της ποιότητας και την εμφάνιση διαφόρων μορφών αλλοιώσεων. Οι αλλοιώσεις αυτές διακρίνονται σε καταπονήσεις λόγω του περιβάλλοντος του ψυκτικού χώρου, φυσιολογικές ασθένειες και παρασιτικές ασθένειες (σήψεις από παθογενή αίτια)

4.2 Καταπονήσεις από το περιβάλλον του ψυκτικού χώρου

Στις καταπονήσεις από το περιβάλλον του ψυκτικού χώρου περιλαμβάνονται αλλοιώσεις που οφείλονται σε παράγοντες όπως, η θερμοκρασία, η σύσταση του αέρα σε O_2 και CO_2 , η παρουσία άλλων χημικών ουσιών κ.α.

1.Θερμοκρασία. Το σημείο πήξεως στα μήλα που εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε σάκχαρα και άλλους παράγοντες, βρίσκεται γύρω στους $-1,5\text{ }^{\circ}C$. Μετά από ελαφρό πάγωμα παρατηρούνται αποχρωματισμοί στο φλοιό των καρπών κατά θέσεις. Οι παγωμένοι ιστοί όταν εκτεθούν σε θερμοκρασίες $> 0^{\circ}C$ λιώνουν, οι μεσοκυττάριοι χώροι γεμίζουν με υγρά και τα μήλα μαλακώνουν και αποκτούν αλευρώδη υφή. Γενικά οι ζημιές είναι πιο σοβαρές στους καρπούς που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο ωριμότητας.

2. Μειωμένο O_2 . Σε ακραίες περιπτώσεις πολύ μειωμένου οξυγόνου, η καταπόνηση στους καρπούς είναι σοβαρή αφού δημιουργούνται μέσα στους ιστούς αναερόβιες συνθήκες που επιφέρουν μη αντιστρεπτές αντιδράσεις στο μεταβολισμό των κυττάρων.

3.Αυξημένο CO_2 . Η ζημιά από την καταπόνηση της υψηλής συγκέντρωσης του CO_2 εκδηλώνεται στα μήλα με το σύμπτωμα της καστανής καρδιάς. Η "καστανή καρδιά των μήλων" (core flush/brown core) είναι μια φυσιολογική ασθένεια η οποία έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες ποικιλίες μήλων, όπως στην Granny Smith, McIntosh, Cox's Orange Pippin. Εκδηλώνεται με ελαφρά ρόδινο ή καστανωπό χρωματισμό στην περιοχή της σάρκας γύρω από τα σπέρματα που επεκτείνεται με διάχυτη μορφή προς τα έξω. Η ανωμαλία αυτή, προκαλείται εκτός από την αυξημένη συγκέντρωση CO_2 , από χαμηλή θερμοκρασία ή γηρασμό.

4. Η δράση του αιθυλενίου. Το αιθυλένιο ασκεί καθοριστικό ρόλο στη συντήρηση των μήλων επάγοντας την ωρίμανση των καρπών κατά την κλημακτηρική άνοδο της αναπνοής. Το αιθυλένιο παράγεται στα μήλα με αυτοκαταλυτικό τρόπο θέτοντας σε λειτουργία τον μηχανισμό ωρίμανσης των καρπών, ακόμα και όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η μειωμένη θερμοκρασία συντήρησης επιβραδύνει τη δράση και την παραγωγή του αιθυλενίου, χωρίς όμως να την αναστέλλει τελειώς. Ο εξαερισμός του ψυκτικού χώρου περιορίζει την συσσώρευση και την δράση του αιθυλενίου, αλλά παρουσιάζει τεχνικά προβλήματα εφαρμογής στην πράξη (Σφακιωτάκης, 2002).

5. Ζημιές από διαφονές αμμωνίας. Η έκθεση των καρπών σε αμμωνία είναι δυνατόν να προκαλέσει μόνιμες βλάβες στους ιστούς οι οποίοι αποκτούν σκούρο χρώμα γύρω από τα φακίδια. Στις κόκκινες ποικιλίες η χημική αντίδραση με την αμμωνία προκαλεί αλλαγή των χρωστικών από κόκκινο σε μπλε μελανό. Τα συμπτώματα σε μήλα της ποικιλίας Golden Delicious εμφανίζονται με πράσινο-λαδί κηλίδες γύρω από τα φακίδια.

6. Ζημιές από διφαινυλαμίνη. Αυξημένες συγκεντρώσεις διφαινυλαμίνης (DPA) είναι δυνατόν να δράσουν τοξικά και να προκαλέσουν ζημιές στους καρπούς. Τα συμπτώματα εμφανίζονται με μαύρες κηλίδες ή αποχρωματισμούς κατά θέσεις του φλοιού και κυρίως στη κοιλότητα του κάλυκα όπου συσσωρεύεται ποσότητα DPA μετά την εφαρμογή στα μήλα (Σφακιωτάκης, 1995).

4.3 Μετασυλλεκτικές σήψεις των μήλων

Τα μήλα κατά την αποθήκευσή τους, η οποία μπορεί να φτάσει τους 6-10 μήνες μετά τη συγκομιδή, είναι ευπαθή σε έναν αριθμό παθογόνων, που εμφανίζονται μετασυλλεκτικά. Παρά τους σύγχρονους τρόπους συντήρησης κάθε χρόνο καταγράφονται απώλειες οφειλόμενες σε διάφορα παθογόνα. Οι περισσότερες από αυτές τις απώλειες αποδίδονται στους μύκητες : *Penicillium spp.* (μπλε μούχλα), *Botrytis cinerea Pers.* (γκρίζα μούχλα), *Fusicladium dentriticum* (φουζικλάδι), *Gloeosporium album* (φακιδική σήψη) καθώς και μύκητες των γενών : *Monilinia*, *Alternaria*, αλλά και άλλων μυκήτων (Παναγόπουλος, 1997).

Οι μετασυλλεκτικές σήψεις στα μήλα είναι δύσκολο να αναγνωριστούν μόνο μέσω των συμπτωμάτων. Συνήθως απαιτείται απομόνωση και αναγνώριση του αιτιογόνου παράγοντα.

Οι μύκητες οι οποίοι προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις στα μήλα μπορούν να χωριστούν σε δυο κύριες ομάδες: Σε αυτούς που προκαλούν σήψεις αμέσως μετά τη συγκομιδή και σε αυτούς που προκαλούν σήψεις στον αγρό. Οι μετασυλλεκτικές σήψεις που αποδίδονται στους μύκητες της δεύτερης ομάδας συνήθως είναι αποτέλεσμα μολύνσεων που συνέβησαν στον αγρό αλλά ήταν ήπιες ή δεν παρατηρήθηκαν κατά τη συγκομιδή. Ο έλεγχος αυτών των ασθενειών βασίζεται στην προστασία των καρπών από μολύνσεις πριν τη συγκομιδή.

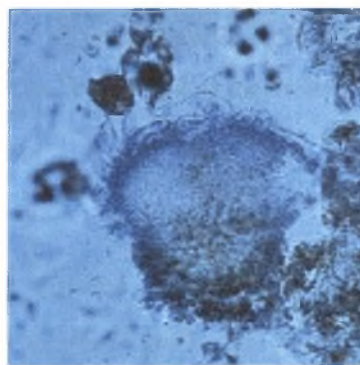
Οι κυριότερες παρασιτικές ασθένειες, περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.

4.3.1 Φακιδική σήψη (Bulls eye rot)

Είναι η πιο σοβαρή σήψη των μήλων με ζημιές μέχρι και 60-70%. Το παθογενές αίτιο είναι ο ασκομύκητας *Pezizula alba* με ατελή μορφή τον *Gloeosporium album* (*Coelomyces*), συν. *Phlyctena vagabunda*. Παρουσιάζονται καστανές κηλίδες, κυκλικές, με ελάχιστο βάθος, γύρω από ένα φακίδιο, που αργότερα συνήθως συνενώνονται μεταξύ τους. Στο κέντρο των κηλίδων παρατηρείται ανοικτός χρωματισμός που σκουραίνει προς την περιφέρεια. Η μόλυνση αρχίζει από τον Μάιο στον οπωρώνα, διευκολύνεται από τραύματα στους καρπούς και ευνοείται από υψηλή σχετική υγρασία κοντά στη συλλογή των καρπών. Τα συμπτώματα αρχίζουν από τέλη Αυγούστου-αρχές Σεπτεμβρίου κατά τη συντήρηση όπου υπάρχει υψηλή υγρασία.



Εικ.2: Προσβολή από γλοιοσπόριο



Εικ.3: *Gloeosporium album*-ακέρβουλο

4.3.2 Φουζικλάδι των ψυγείων

Η ασθένεια οφείλεται στον μύκητα *Venturia inaequalis* με ατελή μορφή-παρασιτική φάση, τον *Spilocaea pomi* (συν. *Fusicladium dentriticum*). Οι μολύνσεις γίνονται λίγο πριν ή κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως κατά την αποθήκευση.

Οι κηλίδες στις περιπτώσεις αυτές είναι συνήθως κυκλικές με σαφή όρια, πολύ μικρές έχουν διάμετρο μέχρι 0.6 cm, χρώμα καστανό ή μαύρο και συχνά γυαλιστερή επιφάνεια γιατί η εφυμενίδα τους δεν σχίζεται. Το μυκήλιο του παθογόνου αναπτύσσεται μόνο ανάμεσα στην εφυμενίδα και την επιδερμίδα, εγκαθίσταται και σχηματίζει άφθονους, βραχείς, όρθιους, καστανούς κονιδιοφόρους. Οι μολύνσεις είναι πρωτογενείς όταν γίνονται από τα ασκοσπόρια του μύκητα και δευτερογενείς όταν γίνονται από τα κονίδια του. Υψηλή σχετική υγρασία και θερμοκρασία 16-24°C θεωρούνται συνθήκες άριστες για μόλυνση ενώ η επώαση της αρρώστιας διαρκεί περίπου 9-17 ημέρες. Υγρό και βροχερό καλοκαίρι ευνοεί όψιμες προσβολές των καρπών και ζημιές στα ψυγεία (Παναγόπουλος, 1997).



Εικ.4: Προσβολή από φουζικλάδι



Εικ.5: *Spilocaea pomi*-κονιδιοφόροι

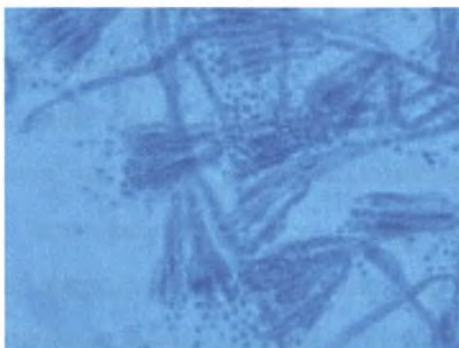
4.3.3 Κυανή σήψη (blue mold rot)

Παθογόνο: *Penicillium expansum*. Πολύ σοβαρή και συνήθης μετασυλλεκτική ασθένεια των μήλων. Οι καρποί εμφανίζουν αρχικά κυκλικές υδατώδεις, ανοικτού καστανού χρώματος κηλίδες, οι οποίες μεγαλώνουν σε έκταση και βάθος. Οι προσβεβλημένοι ιστοί αποκτούν μαλακή υδαρή υφή και στην επιφάνεια των κηλίδων, σε προχωρημένο στάδιο της προσβολής, εμφανίζονται κατά θέσεις οι κονιδιοφόροι του παθογόνου με τη μορφή μικρών στρογγυλών πυκνών εξανθήσεων, αρχικά λευκού και τελικά μπλε-πράσινου χρώματος. Το παθογόνο είναι κυρίως παράσιτο πληγών και ευνοείται από την υψηλή υγρασία και θερμοκρασία. Αναπτύσσεται ευκολότερα στους πολύ

ώριμους καρπούς. Οι μολύνσεις γίνονται συνήθως κατά τη συγκομιδή και τη συσκευασία των καρπών και αρχίζουν από πληγές του καρπού, από το ποδίσκο ή τα φακίδια.



Εικ.6: Προσβολή από κυανή σήψη



Εικ.7: *Penicillium expansum*-κονιδιοφόροι & κονίδια

4.3.4 Σταχτιά ή τεφρά σήψη (gray mold rot)

Το παθογόνο αίτιο είναι ο μύκητας *Botrytis cinerea*. Οι καρποί τις περισσότερες φορές μολύνονται κατά τη διάρκεια της αναπτύξεώς τους πάνω στο δέντρο. Το παθογόνο μπαίνει από τη κορυφή του καρπού ή από το ποδίσκο, εγκαθίσταται εκεί και δημιουργεί μια ξηρή καστανή κηλίδα ή παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση. Η μόλυνση δραστηριοποιείται συνήθως στην αποθήκη προκαλώντας σχετικά μαλακή καστανή σήψη. Η σταχτιά μούχλα που δημιουργείται, αποτελείται από τους κονιδιοφόρους και τα κονίδια του μύκητα. Μολύνσεις μπορούν να γίνουν και από πληγές που δημιουργούνται κατά τη συγκομιδή και συσκευασία των καρπών. Μέσα στην αποθήκη η ασθένεια μεταδίδεται από τους προσβεβλημένους στους υγιείς γειτονικούς τους καρπούς και μπορεί να προκαλέσει την καθολική καταστροφή των αποθηκευμένων καρπών γιατί ο μύκητας αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 1-30°C.



Εικ.8: Προσβολή από Βοτρώτη



Εικ.9: *Botrytis cinerea*-κονιδιοφόρος

4.3.5 Αντιμετώπιση μετασυλλεκτικών σήψεων

Η διατήρηση των δενδροκομείων σε καλή κατάσταση υγείας (προστατευτικοί ψεκασμοί, μέτρα υγιεινής, ορθολογική αζωτούχος λίπανση κ.α.) είναι ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης πολλών μετασυλλεκτικών σήψεων πριν ακόμα την συγκομιδή.

Τα μέτρα αντιμετώπισης ευρείας εφαρμογής για πολλές μετασυλλεκτικές ασθένειες περιλαμβάνουν την υγιεινή και μεθόδους που διατηρούν την ακεραιότητα των συγκομιζόμενων καρπών. Τραυματισμένοι, μολωπισμένοι και υπερώριμοι καρποί είναι πάντα πιο ευπαθείς σε πολλούς μύκητες που προκαλούν μετασυλλεκτικές σήψεις και δεν θα πρέπει να οδηγούνται στους ψυκτικούς χώρους με τους υγιείς καρπούς.

Σημαντικός παράγοντας είναι και η λήψη μέτρων υγιεινής στα συσκευαστήρια και στις αποθήκες. Τα μέτρα αυτά περιλαμβάνουν ασβέστωμα χώρων ή ψεκασμούς με φορμόλη εμπορίου, 2-3%.

Στη μείωση της εμφάνισης σήψεων κατά τη συντήρηση, βοηθά η ταχεία ψύξη αμέσως μετά τη συγκομιδή γιατί οι χαμηλές θερμοκρασίες μειώνουν και το ρυθμό ανάπτυξης των μυκήτων και τις διαδικασίες γηρασμού των καρπών.

Με την εφαρμογή ελεγχόμενης ατμόσφαιρας κατά τη συντήρηση, αναστέλλεται και η ανάπτυξη των μετασυλλεκτικών ασθενειών. Η CA όχι μόνο συντελεί στην καλή φυσιολογική κατάσταση των ιστών και στην διατήρηση της αντοχής τους σε προσβολές παθογόνων, αλλά έχει και άμεση δυσμενή επίδραση στην ανάπτυξη των παθογόνων οργανισμών. Για παράδειγμα η ανάπτυξη του μύκητα *Botrytis cinerea* σε 2% O₂ (σε θρεπτικά διαλύματα PDA ή καρπούς) περιορίζεται κατά 15% σε σχέση με την αύξηση που παρουσιάζει ο μύκητας σε αέρα (21%), ενώ αναστέλλεται δραστικά η αύξηση του σε συγκέντρωση 1% (Σφακιωτάκης, 1995).

Η παρουσία αιθυλενίου στον ψυκτικό χώρο επιταχύνει την ωρίμανση και τον γηρασμό των καρπών, συντελώντας έμμεσα στην μείωση της ανθεκτικότητας τους σε προσβολές μυκήτων. Διευκολύνει δε, τη βλάστηση των σπορίων σε πολλά είδη μυκήτων. Αυτή η δράση του αιθυλενίου αποφεύγεται με κατάλληλο εξαερισμό.

Για την φακιδική σήψη έχει αναφερθεί σαν μέθοδος αντιμετώπισης η θερμοθεραπεία, δηλαδή πλύσιμο των καρπών με ζεστό νερό 45°-50° C για 3' (ανώνυμος, 1985). Γενικά η εμβάπτιση σε ζεστό νερό 45°-50° C ή η εμβάπτιση σε αραιό διάλυμα χλωρίνης, έχει βρεθεί ότι περιορίζει την ανάπτυξη σήψεων σε χρονιές με μικρό ποσοστό μολύνσεων (Γ.Νάνος & συνεργάτες, 2001).

Η χημική αντιμετώπιση των μετασυλλεκτικών σήψεων, γίνεται τόσο πριν τη συγκομιδή όσο και μετά από αυτή πριν την είσοδο των καρπών στους ψυκτικούς χώρους. Η εφαρμογή μυκητοκτόνων πριν τη συγκομιδή έχει προληπτικό κυρίως χαρακτήρα μπορεί όμως να είναι και ουσιαστική όπως στην περίπτωση του φουζικλαδίου. Σ' αυτή την περίπτωση η εφαρμογή μυκητοκτόνων, προστατευτικών (χαλκούχα, captan, dodine κ.α.) και διασυστηματικών (benomyl κ.α.) αρχίζει από την άνθιση. Για την καταπολέμηση μυκητολογικών προσβολών σε καρπούς που πρόκειται να διατηρηθούν επί μακρό σε ψυγεία συνιστώνται επεμβάσεις αμέσως μετά τη συλλογή με κατάλληλα μυκητοκτόνα. Η μετασυλλεκτική εφαρμογή μυκητοκτόνων περιγράφεται αναλυτικότερα σε επόμενη ενότητα.

4.4 Φυσιολογικές ασθένειες των μήλων κατά τη συντήρηση

Κατά τη συντήρησή τους, τα μήλα, υφίστανται αλλοιώσεις που οφείλονται στη δράση διαφόρων παραγόντων προσυλλεκτικά και μετασυλλεκτικά. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι κλιματικές συνθήκες πριν ή κατά τη συγκομιδή, το στάδιο ωρίμανσης κατά τη συγκομιδή, η θρεπτική κατάσταση των καρπών κ.α. Οι αλλοιώσεις αυτές χαρακτηρίζονται σαν φυσιολογικές ασθένειες των μήλων και περιγράφονται παρακάτω.

4.4.1 Επιφανειακό έγκαυμα των μήλων. Περιγραφή, παράγοντες που το επηρεάζουν, αντιμετώπιση.

Το επιφανειακό έγκαυμα (E.E) ή η μαλακή αυτοδηλητηρίαση των μήλων (superficial scald, scald) όπως αλλιώς λέγεται, είναι μια από τις πιο διαδεδομένες φυσιολογικές ασθένειες των μήλων, και προκαλεί σημαντικές ζημιές κατά τη συντήρησή τους. Οι πιο ευαίσθητες ποικιλίες είναι οι Granny Smith, η Starking Delicious, η Stayman και λιγότερο η Golden Delicious.

Η ασθένεια εκφράζεται στην επιδερμίδα του καρπού η οποία χάνει το φυσιολογικό της χρώμα σε διάσπαρτες θέσεις στο πράσινο τμήμα του φλοιού και αποκτά χρώμα καφετί στις κόκκινες ποικιλίες ή καφέ-μαύρο στις πράσινες ποικιλίες. Σε προχωρημένο στάδιο η προσβολή επεκτείνεται στη σάρκα του καρπού. Οι καρποί φαίνονται σαν να έχουν κυλιστεί ή να έχουν ακουμπήσει σε μια καυτή μεταλλική πλάκα. Σε πλήρη εξέλιξη οι κηλίδες είναι

περισσότερο βαθουλές λόγω της έντονης διαπνοής των κατεστραμμένων ιστών. Το ποσοστό προσβολής μπορεί να φτάσει το 30-40% των αποθηκευμένων καρπών.

Το Ε.Ε. εμφανίζεται συνήθως μετά τη συντήρηση και την έξοδο των καρπών από το ψυγείο, παρατηρείται όμως και κατά τη συντήρηση, ειδικά στους πρώιμα συγκομισμένους καρπούς. Η ποικιλία Starking Delicious είναι αρκετά ευπαθής όταν συντηρείται για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Από πολλούς ερευνητές η φυσιολογική αυτή ασθένεια έχει αποδοθεί στη ζημιά των υποδερμικών κύτταρων, κατόπιν οξειδωτικών αντιδράσεων και σχηματισμό προϊόντων που είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση συμπτωμάτων (καφέτιασμα) στον φλοιό του καρπού (Bain & Mercer 1963, Huelin & Goggiola 1970, Anet 1972).

Ο μεταχρωματισμός του φλοιού αποδίδεται σε οξείδωση ενός τερπενίου, μιας πτητικής ουσίας (α-Farnesene), που αποτελεί συστατικό του κηρώδους περιβλήματος του φλοιού. Τα προϊόντα οξείδωσης της ουσίας αυτής καταστρέφουν τα κύτταρα της επιδερμίδας η οποία καφετιάζει. Κατά τη θεωρία αυτή πιστεύεται ότι οι καρποί είναι εφοδιασμένοι με φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες (α-τοκοφερόλη) οι οποίες με τη συντήρηση εξαντλούνται και προκαλείται η οξείδωση της ουσίας αυτής. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες επιδρούν θετικά στον περιορισμό της ανωμαλίας (Anet 1974, Meir και Bramlage 1988, Gallerani *et al.*, 1990).

Κατά τους Huelin και Goggiola (1986) οι καρποί που δεν φτάνουν το κατάλληλο στάδιο ωρίμανσης, είναι πιο ευαίσθητοι στο Ε.Ε από τους ώριμους. Καρποί που συγκομίστηκαν νωρίς παρουσίασαν αυξημένη ένταση των συμπτωμάτων του Ε.Ε, ενώ μειωμένη ένταση είχαν οι όψιμα συγκομισμένοι καρποί (Anet 1972, Βασιλακάκης κ.α. 1988, Sfakiotakis *et al.*, 1993).

Τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του Ε.Ε. στα μήλα δίνουν ενδείξεις ότι η φυσιολογική ασθένεια οφείλεται σε ζημιά από χαμηλές θερμοκρασίες (chilling injury) κατά τη συντήρηση των καρπών στους 0°C. Η υπόθεση αυτή δεν έχει μελετηθεί πλήρως και αποτελεί μια νέα προσέγγιση εξήγησης του φαινομένου. Υπέρ της υπόθεσης αυτής (ότι το Ε.Ε. οφείλεται στη ζημιά του καρπού από τις χαμηλές θερμοκρασίες κατά τη συντήρηση) συνηγορεί το γεγονός ότι το Ε.Ε. μειώνεται με την εφαρμογή των μεταχειρίσεων που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ζημιάς από τις χαμηλές θερμοκρασίες. Το Ε.Ε. περιορίζεται με την περιοδική θέρμανση καρπών κατά τη συντήρησή τους (Smith 1959), την υψηλή θερμοκρασία (38°C) για 4 ημέρες πριν τη συντήρηση (Lurie *et al.*, 1990) τη συντήρηση σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα κ.α.

Η ανάπτυξη του Ε.Ε. σχετίζεται με την ποικιλία, την ημερομηνία συγκομιδής, τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν πριν από τη συγκομιδή, και τις συνθήκες συντήρησης των καρπών. (Lau 1990, Βασιλακάκης κ.α. 1988, Ingle και D' Souza 1989, Sfakiotakis *et al.*, 1993). Συνθήκες που διευκολύνουν την ανάπτυξη του Ε.Ε. είναι: η πρόωμη ή καθυστερημένη συγκομιδή, ξηροθερμικός καιρός λίγο πριν τη συγκομιδή, όψιμη υπερβολική αζωτούχος λίπανση, παρατεταμένη διατήρηση σε θερμοκρασία κοντά στους 0°C, η υπερβολική συγκέντρωση CO₂ στο ψυκτικό θάλαμο κ.α. Τα συμπτώματα δεν διακρίνονται κατά τον χρόνο συγκομιδής, αλλά εμφανίζονται μετά από μερικούς μήνες συντήρησης (3-4) σε κοινά ψυγεία και επιδεινώνονται μετά την έξοδο των καρπών από το ψυγείο. Για την ανάπτυξη της ανωμαλίας φαίνεται να είναι κρίσιμη η περίοδος 30-40 ημερών μετά τη συγκομιδή και τοποθέτηση στους ψυκτικούς χώρους.

Συνοψίζοντας, η αντιμετώπιση του Ε.Ε. επιτυγχάνεται κυρίως με τα ακόλουθα μέτρα:

1. Συγκομιδή των καρπών στο κατάλληλο στάδιο ωριμότητας.
2. Εφαρμογή αντιοξειδωτικών ουσιών και κυρίως της διφαινυλαμίνης (DPA).
3. Συντήρηση σε κατάλληλα ψυγεία με εξαερισμό για την απομάκρυνση των πτητικών ουσιών.
4. Συντήρηση σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα και κυρίως με χαμηλό οξυγόνο (ULO).

Για ποικιλίες που είναι ευπαθείς εφαρμόζεται όψιμη συγκομιδή εφόσον δεν χειροτερεύουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του καρπού και δεν έχει προχωρήσει η ωρίμανση δηλαδή διατηρείται μειωμένη η εσωτερική συγκέντρωση αιθυλενίου.

Από πειραματική εργασία που πραγματοποιήθηκε με καρπούς ποικιλίας Starking Delicious, με σκοπό την πρόγνωση του χρόνου συγκομιδής μήλων Ζαγοράς Πηλίου, σε σχέση με την ανάπτυξη επιφανειακού εγκαύματος, με τη χρήση δεικτών ωριμότητας, προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα (Σφακιωτάκης, Θωμάι, Νάνος & Μπόλλα, 1997):

Τα μήλα κατά την εποχή ωρίμανσης στο δέντρο έχουν ανάγκη από μια περίοδο σκληραγώγησης με την έκθεση στις χαμηλές θερμοκρασίες του Φθινοπώρου (<12,5°C) ώστε να είναι σε θέση να υποστούν την επίδραση των θερμοκρασιών συντήρησης (0°C) χωρίς να πάθουν ζημιές από το ψύχος που εκδηλώνονται με το Ε.Ε.

Για τις συνθήκες της περιοχής της Ζαγοράς προτείνεται η συγκομιδή να γίνεται όταν οι καρποί έχουν υποστεί έκθεση >125 ωρών χαμηλών θερμοκρασιών (<12,5°C) και τιμές κατωφλίου για τους δείκτες:

1. Εσωτερική συγκέντρωση αιθυλενίου < 1 ppm
2. Δείκτης αμύλου > 3
3. Διαλυτά στερεά συστατικά > 11,5%
4. Συνεκτικότητα σάρκας > 6,5 kg

Επίσης αποθήκευση των καρπών αρχικά στους 4 °C επί 20-60 ημέρες και κατόπιν αποθήκευση στους 0 °C περιορίζει την εμφάνιση του E.E. (3) ή κατά άλλους ερευνητές (Pirreti *et al.*, 1994) προαποθήκευση στους 20 °C για 10 ημέρες πριν τη συντήρηση στους 0°C μείωσε την εμφάνιση E.E. σε μήλα Granny Smith. Άλλη έρευνα σε μήλα Granny Smith, έδειξε ότι καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5 °C για 200 ημέρες ή στους 5 °C & 0°C εναλλάξ ανά 20ήμερα και για συνολική διάρκεια 60 ημερών, δεν παρουσίασαν συμπτώματα E.E. (Vasilakakis *et al.*, 1995).

Ο εξαερισμός που εφαρμόζεται για απομάκρυνση των πτητικών ουσιών από τα ψυγεία περιορίζει την ένταση της προσβολής, αλλά δεν δίνει πάντα ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο Δενδροκομίας του Α.Π.Θ. με συντήρηση μήλων Starking σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα στον έλεγχο του επιφανειακού εγκαύματος μήλων Ζαγοράς. Δραστική μείωση του E.E επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ελεγχόμενης ατμόσφαιρας με μειωμένο οξυγόνο(ULO:1,5%+1.5%) (Νάνος κ.α. 2001).

Από πείραμα πού έγινε σε μήλα ποικιλίας Granny Smith & I.D.Red Delicious ως προς τη μέθοδο συντήρησης, προέκυψε ότι: Καρποί και των δύο ποικιλιών, αποθηκευμένοι σε συνθήκες ULO(1%+1%) εμφάνισαν πολύ λίγο ή καθόλου E.E. διατηρώντας παράλληλα καλύτερη συνοχή στη σάρκα, καλύτερο χρώμα, και υψηλότερη οξύτητα σε σύγκριση με καρπούς διατηρημένους σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, που εμφάνισαν E.E. αλλά είχαν κατά την έξοδο από το ψυγείο υψηλότερη συγκέντρωση δ.σ.συστατικών(SS) (Manseka & Vasilakakis, 1994).

Για τον περιορισμό του E.E. συνήθως εφαρμόζονται στους καρπούς μετασυλλεκτικά, αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η διφαινυλαμίνη κ.α. Η χημική αντιμετώπιση του E.E. με εφαρμογή DPA και άλλων χημικών ουσιών περιγράφεται αναλυτικότερα σε επόμενη ενότητα. Οποσδήποτε όμως, ο έλεγχος του E.E. είναι πιο αποτελεσματικός όταν γίνεται με συνδυασμό των παραπάνω μέτρων αντιμετώπισης, δηλαδή, συγκομιδή στο κατάλληλο στάδιο ωριμότητας + συντήρηση σε CA ή ULO + μικρές δόσεις DPA, που συνήθως δεν μπορεί να αποφευχθεί.



Εικόνα 10



Εικόνα 11



Εικόνα 12

Εικόνες 10,11,12: Συμπτώματα επιφανειακού εγκαύματος σε *Starking delicious*, *G.Smith* & *Golden Delicious* αντίστοιχα. Πηγή:([http 4](#)),([http 5](#))

4.4.2 Πικρή στιγμάτωση των μήλων (bitter pit)

Η αλλοίωση παρουσιάζεται αρχικά με μικρούς πυρήνες από νεκρωτικά υποδερμικά κύτταρα σε βάθος 1-6 χιλ. Κατά τη συγκομιδή δεν υπάρχουν εμφανή συμπτώματα. Η ανωμαλία αναπτύσσεται κατά τη συντήρηση και πρώτα στη περιοχή του κάλυκα. Στη συνέχεια τα νεκρωτικά αυτά κύτταρα αναπτύσσονται προς την εξωτερική επιφάνεια η οποία καθιζάνει και σχηματίζονται έτσι φελλώδεις-σπογγώδεις νεκρωτικές κηλίδες σκοτεινού κοκκινωπού χρώματος.

Πιστεύεται ότι η πικρή στιγμάτωση προκαλείται προς το τέλος της περιόδου αυξήσεως του καρπού στον οπωρώνα, από έλλειψη ασβεστίου και κυρίως από ανταγωνισμό μεταξύ φύλλων και καρπών ως προς το στοιχείο αυτό, που δημιουργείται κάτω από ορισμένες συνθήκες, οπωσδήποτε όμως σε συσχετισμό με την παρουσία και άλλων στοιχείων όπως του μαγνησίου, καλίου και αζώτου.

Για την αντιμετώπιση του προβλήματος συνιστώνται: ισορροπημένη λίπανση, καθώς και 3-4 διαφυλλικές λιπάνσεις με ασβεστούχα λιπάσματα πριν τη συγκομιδή, κανονικά ποτίσματα, συγκομιδή στο κατάλληλο στάδιο, και εμβαπτίσεις μετασυλλεκτικά σε διάλυμα χλωριούχου ή νιτρικού ασβεστίου (Σφακιωτάκης, 1995).

4.4.3 Εσωτερική αποσύνθεση (internal breakdown)

Αποτελεί πρόβλημα κυρίως των πρώιμων ποικιλιών που ωριμάζουν νωρίς τους καρπούς τους. Η εσωτερική αλλοίωση αρχίζει με μαλάκωμα της σάρκας, που με τον καιρό αποκτά αλευρώδη υφή και καφετιάζει. Σε προχωρημένο βαθμό της αλλοίωσης η επιδερμίδα

καθιζάνει στο σημείο της βλάβης. Η πιο ώριμη πλευρά του καρπού αλλοιώνεται περισσότερο προς την περιοχή του κάλυκα. Θεωρείται ανωμαλία γηρασμού αλλά μπορεί να οφείλεται και στις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, συγκομιδή σε ακατάλληλο στάδιο, μειωμένη περιεκτικότητα ασβεστίου στους καρπούς κ.α. Για την αντιμετώπιση της ανωμαλίας συνιστώνται: συντήρηση σε CA με μειωμένο CO₂, ψεκασμοί με CaCl₂ όπως και για την πικρή στιγμάτωση, κ.α.

4.4.4 Υάλωση μήλων (water core)

Είναι φυσιολογική ανωμαλία που αφορά περισσότερο τις συνθήκες του οπωρώνα παρά τις συνθήκες συντήρησης. Οι πιο ευπαθείς ποικιλίες είναι οι R.Delicious, Jonathan. Η σάρκα στο εσωτερικό της φαίνεται σαν βρεγμένη και παρουσιάζει υαλώδη όψη. Σε προχωρημένο στάδιο ο φλοιός είναι θαμπός και η σάρκα σπογγώδης. Οι προσβεβλημένοι καρποί καταρρέουν γρήγορα κατά τη συντήρηση. Η ανωμαλία φαίνεται να προκαλείται από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες και έντονο ηλιακό φως, διαταραχή του μεταβολισμού, και αυξημένη συσσώρευση σορβιτόλης στους καρπούς (Σφακιωτάκης, 1995). Περιορισμός της υάλωσης γίνεται με συγκομιδή στο σωστό χρόνο και ψεκασμούς παρόμοιους με αυτούς που γίνονται για την πικρή στιγμάτωση.

4.4.5 Άλλες φυσιολογικές ασθένειες των μήλων

α) Δερμάτωση ή σκουριά (russeting). Παρουσία σκωριόχρωμων στιγμάτων ή ραβδώσεων στην επιδερμίδα των καρπών. Παρουσιάζεται κυρίως στην ποικιλία Golden Delicious

β) Περιφακιδική κηλίδωση. Παρόμοια με την πικρή στιγμάτωση.

γ) Μαλακή αυτοδηλητηρίαση (soft scald).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

Χημική Αντιμετώπιση Μετασυλλεκτικών Σήψεων και Επιφανειακού Εγκαύματος



5.1 Χημική αντιμετώπιση μετασυλλεκτικών σήψεων

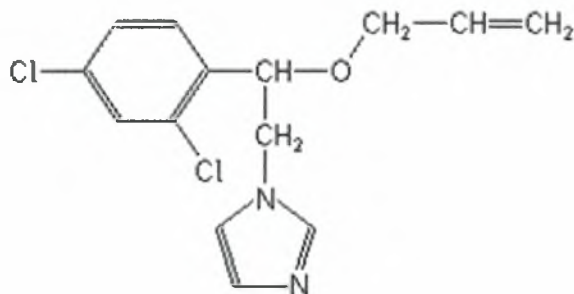
Για την καταπολέμηση μυκητολογικών προσβολών σε καρπούς που πρόκειται να διατηρηθούν επί μακρό σε ψυγεία, συνιστώνται επεμβάσεις αμέσως μετά τη συλλογή με κατάλληλα μυκητοκτόνα. Από ένα ευρύ φάσμα μυκητοκτόνων των οποίων η δράση κατά μετασυλλεκτικών σήψεων μηλοειδών, έχει μελετηθεί, κυρίως χρησιμοποιούνται τα εξής: το benomyl ή το vincosolin για *Botrytis*, benomyl ή imazalil για *Penicillium*, captan ή metalaxyl + carbendazim για *Phytophthora*, thiabendazole (TBZ) για *Gloeosporium*, iprodione για *Botrytis*, *Monilinia*, *Alternaria* κ.α.

Η εφαρμογή των μυκητοκτόνων στους καρπούς, γίνεται πριν εισαχθούν στα ψυγεία με εμβάπτιση (dipping), διαβροχή ή ψεκασμό (drenching) και τελευταία με ένα σύστημα ομίχλης (thermofogging) που έχει αναπτυχθεί. Τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται με τη μορφή υδατικών διαλυμάτων ή μετά από ενσωμάτωση σε κηρούς με υδατοδιαλυτή βάση.

Από τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των μετασυλλεκτικών σήψεων των μήλων, περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω το **imazalil** και το **thiabendazole (TBZ)**, των οποίων η διερεύνηση των υπολειμμάτων αποτελεί μέρος του αντικείμενου αυτής της διατριβής.

5.1.1 Imazalil, περιγραφή και ιδιότητες.

Το imazalil, [(+/-) - allyl 1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazol-1-yl ethyl ether] κατά UPAC, ανήκει στην κατηγορία των αζόλων και ειδικά στα ιμιδαζόλια ή ιμιδαζόλες. Τα μυκητοκτόνα αυτής της κατηγορίας περιέχουν έναν ακόρεστο πενταμελή δακτύλιο με δύο άτομα αζώτου, στις θέσεις 1 και 3. Σύμφωνα με τον τρόπο δράσης τους, οι ιμιδαζόλες κατατάσσονται στα μυκητοκτόνα-αναστολείς της σύνθεσης εργοστερόλης (The Pesticide Manual, 1994).



Σχήμα 1. Imazalil. Πηγή:(<http> 2)

Χρήσεις. Το imazalil είναι ένα διασυστηματικό, με προστατευτική και θεραπευτική δράση μυκητοκτόνο. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση πολλών μυκητολογικών ασθενειών σε φρούτα, λαχανικά και καλλωπιστικά: π.χ. ωίδιο σε κολοκύθια και καλλωπιστικά, ωίδιο σε τριανταφυλλιές, ασθένειες αποθηκών (*Penicillium, Gloeosporium, Rhomopsis*, κ.α.) σε εσπεριδοειδή, μηλοειδή, μπανάνες και σπόρους πατάτας. Επίσης χρησιμοποιείται για την επικάλυψη σπόρων, και για την καταπολέμηση ασθενειών (*Fusarium, helminthosporium*) σε σιτηρά. Ιδιαίτερα δρα ενάντια σε ανθεκτικές στην βενζιμιδαζόλη φυλές φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Φυτοτοξικότητα. Δεν είναι φυτοτοξικό όταν χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες.

Συνδυαστικότητα. Συνδυάζεται με τα περισσότερα άλλα φυτοφάρμακα, αλλά δεν συνδυάζεται με πολύ αλκαλικές ουσίες.

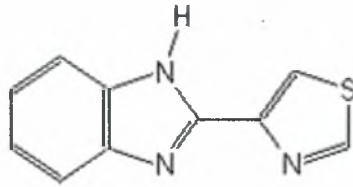
Τοξικότητα στα θηλαστικά. Οξεία από στόματος LD₅₀ για επίμυες 227-343, για σκύλους >640 mg/Kg. Οξεία από δέρματος LD₅₀ για επίμυες 16 mg/L αέρα (με 200g/L EC). NOEL για επίμυες και σκύλους 2,5 mg/Kg b.w. ημερησίως. ADI (JMPR) 0.03 mg/Kg [1991]. Κατηγορία τοξικότητας WHO II, EPA II.

Οικοτοξικότητα. Πτηνά: Οξεία από στόματος LD₅₀ για φασιανούς 2000 mg/kg. Ψάρια: LC₅₀ (96 ώρες) για ιριδίζουσα πέστροφα 1.5 mg/L. Μέλισσες: Μη επικίνδυνο για τις μέλισσες. LD₅₀ (κατάποση) 40 mg/μέλισσα.

Συμπεριφορά στο περιβάλλον. Ζώα: Στους επίμυες, μετά από στοματική χορήγηση, το 90% αποβάλλεται με τη μορφή μεταβολιτών, μέσα σε 4 ημέρες. Έδαφος και νερό: DT₅₀ 30-170 ημέρες (Λέντζα-Ρίζου, 2000β).

5.1.2 Thiabendazole (TBZ), περιγραφή και ιδιότητες

Το thiabendazole, (2-(4-thiazoly)-1H-benzimidazole) κατά UPAC, ανήκει στην ομάδα των βενζιμιδαζολών. Οι ενώσεις αυτής της ομάδας μυκητοκτόνων ασκούν την μυκητοτοξική τους δράση, αναστέλλοντας τον μεταβολισμό του νουκλεϊνικού οξέος και τη σύνθεση πρωτεϊνών στα βλαστάρινα σπόρια των μυκήτων (παρεμποδιστές σχηματισμού των μικροσωληναρίων της μιτωτικής ατράκτου). Ο συντακτικός τύπος του thiabendazole φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 2. Thiabendazole. Πηγή: ([http 2](#))

Χρήσεις. Προστατευτικό μυκητοκτόνο που καταπολεμά ένα ευρύ φάσμα μυκήτων όπως: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Corticium*, *Diplodia*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Gloeosporium*, *Oospora*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria*, *Thielaviopsis*, *Verticillium* και άλλους, σε καλλιέργειες αβοκάντο, μπανάνας, φασολιού, ραδικιού, κερασιού, πορτοκαλιού, βαμβακιού, κολοκυνθοειδών, μάνγκο, μηλοειδών, πατάτας, ρυζιού, φράουλας, καπνού, τομάτας, σταριού, και άλλων καλλιεργειών. Χρησιμοποιείται επίσης για τον έλεγχο μυκητολογικών ασθενειών σε αποθηκευτικούς χώρους για φρούτα και λαχανικά (Μπαλαγιάννης, 1994).

Φυσικοχημικές ιδιότητες. Σε καθαρή μορφή είναι άχρωμη σκόνη, με σημείο τήξεως 304-350 °C και αμελητέα πτητικότητα σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαλυτότητα του στο νερό κυμαίνεται από 10 gr/L σε pH =2 έως <50mg/L σε pH =5-12. Σε κανονικές συνθήκες είναι σταθερό στην υδρόλυση, στο φως και τη θερμότητα.

Φυτοτοξικότητα. Δεν είναι φυτοτοξικό όταν χρησιμοποιηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες.

Μορφήσκευασμάτων. Βρέξιμη σκόνη (WP) ή πυκνό εναιώρημα (SC).

Συνδυαστικότητα. Δεν συνδυάζεται με χαλκούχα μυκητοκτόνα και με φάρμακα υψηλής αλκαλικής αντίδρασης.

Τοξικότητα στα θηλαστικά. Έχει μικρή τοξικότητα. Στο σύστημα κατάταξης της EPA, με βάση την οξεία τοξικότητα κατατάσσεται στην III κατηγορία. Σε επίμυες το LD₅₀ κυμαίνεται, δια μέσου στόματος σε 500-5000 mg/Kg, δια μέσου δέρματος σε 2000-20000 mg/Kg, ενώ δια μέσου αναπνευστικής οδού σε 0,2-2 mg/L αέρα. Έχει χαμηλή τοξικότητα στα ψάρια και δεν είναι τοξικό στις μέλισσες. Η ημερήσια αποδεκτή δόση (ADI-Acceptable Daily Intake), που αποτελεί τοξικολογικό δείκτη των γεωργικών φαρμάκων, βρέθηκε μετά από πειράματα ότι είναι 0,1 mg/Kg ζώντος βάρους (The Pesticide Manual, 1994).

Μεταβολισμός στα θηλαστικά. Το TBZ υφίσταται υδροξυλίωση στη θέση 5. Το 87% της δραστικής ουσίας αποβάλλεται με τα ούρα μέσα σε 24 ώρες.

5.1.3 Συμπεριφορά - υπολειμματική δράση του imazalil & thiabendazole

Η αποτελεσματικότητα της χρήσης των μυκητοκτόνων που προαναφέρθηκαν, καθώς και η υπολειμματική τους δράση εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο διάλυμα που εφαρμόζεται, η μέθοδος εφαρμογής του μυκητοκτόνου (εμβάπτιση-ψεκασμός κ.λ.π.), ο τύπος του διαλύματος (υδατικό, με κηρό κ.λ.π.), η διάρκεια της εφαρμογής και η θερμοκρασία του διαλύματος. Άλλοι παράγοντες είναι η ποικιλία των μήλων και οι συνθήκες αποθήκευσης, ψύξης και συντήρησης.

Πολλές μελέτες έχουν γίνει γύρω από τη διερεύνηση των υπολειμμάτων του imazalil και του thiabendazole στα μήλα. Παρακάτω αναφέρονται περιληπτικά, αλλά ενδεικτικά, κάποια τέτοια πειραματικά αποτελέσματα ερευνών. Πολλές από τις μελέτες που αναφέρονται παρακάτω αλλά και άλλες βρίσκονται συγκεντρωμένες στην ανασκόπηση της E. Papadopoulou-Mourkidou, (1991).

Από μελέτη της συμπεριφοράς των υπολειμμάτων διασυστηματικών μυκητοκτόνων, μεταξύ των οποίων και του thiabendazole, τα οποία εφαρμόστηκαν σε μήλα πριν αποθηκευτούν σε ψυγεία, προέκυψαν τα παρακάτω στοιχεία (Cano *et al.*, 1987a). Καρποί των ποικιλιών Golden Delicious και Starking εμβαπτίστηκαν σε υδατικό διάλυμα thiabendazole και αποθηκεύτηκαν στους 2°C και 0°C αντίστοιχα. Υπολείμματα μετρήθηκαν αμέσως μετά τη μεταχείριση, μετά από 37 μέρες και μετά από 174 μέρες αποθήκευσης. Στους καρπούς και των 2 ποικιλιών, τα υπολείμματα του thiabendazole εντοπίστηκαν κυρίως στο φλοιό, ενώ στη σάρκα η συγκέντρωσή τους εμφανιζόταν μειωμένη από έξω προς τα μέσα. Επίσης το thiabendazole παρουσίασε τη μικρότερη εμμονή στους αποθηκευμένους καρπούς από όλα τα άλλα μυκητοκτόνα που εξετάστηκαν. Ο ρυθμός ελάττωσης του thiabendazole ήταν υψηλότερος στα μήλα Starking από ότι στα μήλα Golden Delicious.

Η συντήρηση μήλων σε ψυγεία με συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, επηρεάζει και την υπολειμματική δράση των μυκητοκτόνων που έχουν εφαρμοστεί μετασυλλεκτικά. Βρέθηκε ότι υπολείμματα του thiabendazole, (όταν εφαρμόστηκε μετασυλλεκτικά), μειώθηκαν γρηγορότερα σε μήλα που αποθηκεύτηκαν σε κανονικές συνθήκες ψύξης, από ότι σε μήλα που αποθηκεύτηκαν σε ψυγεία με ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (Rondelli *et al.*, 1985, Curto *et al.*, 1985).

Από τους Bertolini *et al.*, (1995) κατασκευάστηκε μια πειραματική διάταξη, για μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις μήλων αποθηκευμένων σε παλέτες, με τη μέθοδο της

νέφωσης (fog). Η μέθοδος δοκιμάστηκε με την εφαρμογή thiabendazole (TBZ) σε στεγνά και σε βρεγμένα μήλα ποικιλίας "Abbondanza". Η μεταχείριση με νέφωση ήταν πιο αποτελεσματική ενάντια στο μύκητα *Phlyctaena vagabunda* Desm. (συν. *Gloeosporium album* Oster.) απ' ό τι η μεταχείριση με εμβάπτιση στο ίδιο μυκητοκτόνο. Τα υπολείμματα του μυκητοκτόνου στους καρπούς μετρήθηκαν αμέσως μετά τη εφαρμογή. Τα επίπεδα των υπολειμμάτων του TBZ βρέθηκαν να είναι 1,83 mg/Kg (μέθοδος εμβάπτισης), και 2,60/4,90 mg/Kg (μέθοδος νέφωσης με μικρή και μεγάλη δόση αντίστοιχα). Σημαντική απόκλιση υπήρχε και στην εναπόθεση στα δυο άκρα του καρπού (μίσχος-κάλυκας) κατά την εφαρμογή με νέφωση, με διαφορές 3,72 mg/Kg και 7,12 mg/Kg στις δύο συγκεντρώσεις εφαρμογής: 1,5 και 3 g m⁻³ αντίστοιχα. Η διάρκεια της μεταχείρισης, και το βρέξιμο των καρπών πριν την εφαρμογή, δεν επηρέασαν ουσιαστικά τα αποτελέσματα.

Σε πειραματική μελέτη που έγινε στις ΗΠΑ, διερευνήθηκαν τα υπολείμματα του TBZ σε μήλα, σε συνάρτηση με την μέθοδο εφαρμογής του μυκητοκτόνου. Το TBZ εφαρμόστηκε με ποικίλους τρόπους: 1) Μια εμβάπτιση σε υδατικό διάλυμα 500, 890, 1000, 1080, 2000 ppm στους 15-18°C και 40-45-50-55°C. 2) Μια εμβάπτιση σε υδατικό διάλυμα 500, 540, 1000, 1080, 2159 ppm μαζί με διφαινυλαμίνη. 3) Μια εμβάπτιση 500, 540, 1000, 1080, 2159 ppm μαζί με ethoxyquin (2700 ppm). 4) Εφαρμογή με έναν ψεκάσμο 500, 1080, 2159 ppm στους 15-18°C και 55°C. 5) Μια εφαρμογή με ενσωμάτωση σε κηρό, σε δόσεις: 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 ppm. 6) Δύο εφαρμογές με εμβάπτιση, μία πριν και μία μετά την αποθήκευση, σε διάφορες συγκεντρώσεις. Το υψηλότερο ποσοστό υπολειμμάτων μετρήθηκε κατά τις διπλές εφαρμογές (περίπτωση 6), δεν ξεπέρασε όμως τα 9 ppm ενώ κατά τις απλές εφαρμογές η μέγιστη συγκέντρωση υπολειμμάτων που μετρήθηκε ήταν 5.88 ppm (1000 ppm+ethoxyquin). Όταν μετά από μεταχειρίσεις TBZ (1000ppm) +ethoxyquin, εφαρμόστηκε ξέπλυμα των καρπών ή/και πλύσιμο και βούρτσισμα, η μείωση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 55 και 79%. Αυτό έδειξε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση του TBZ παραμένει στον φλοιό και στην εξωτερική στιβάδα της σάρκας των καρπών (<http> 3).

Σε άλλη πειραματική μελέτη, μήλα των ποικιλιών Golden Delicious και Starking εμβαπτίστηκαν για 1 λεπτό σε υδατικό διάλυμα imazalil σε ποσοστό 1g/L. Τα υπολείμματα του imazalil αμέσως μετά τη μεταχείριση ήταν 4.90 και 3.80 ppm στα Golden και Starking αντίστοιχα και μειώθηκαν σε 1.20 και 1.0 ppm αντίστοιχα μετά από 155 ημέρες αποθήκευσης στους 2°C και 0°C αντίστοιχα. Στους καρπούς και των δυο ποικιλιών τα υπολείμματα του imazalil βρέθηκαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στο φλοιό ενώ η μείωσή τους ήταν προοδευτική στη σάρκα από έξω προς τα μέσα (Cano *et al.*, 1987β). Ο χρόνος

ημίσειας ζωής του imazalil στο φλοιό καρπών Starking, βρέθηκε να κυμαίνονται από 82 έως 84 ημέρες, ενώ στα Golden ήταν 64 ημέρες. Από τα ίδια στοιχεία προκύπτει ότι το imazalil παρουσιάζει μικρότερη εμμονή, σε σύγκριση με μυκητοκτόνα της ομάδας των βενζιμιδαζολών, στα μήλα που συντηρήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Τα επίπεδα και ο ρυθμός μείωσης των υπολειμμάτων του imazalil σε αποθηκευμένα μηλοειδή, επηρεάζονται από τον τύπο της μεταχείρισης (dip, drench, spray), απ' το αν τα φρούτα έχουν επάλειψη με κερί και από την ποικιλία τους (FAO, 1984, FAO, 1985).

Σε δοκιμές που έγιναν στις Η.Π.Α., μήλα της ποικιλίας Red Delicious που εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα 0,5 g/L υδατοδιαλυτής σκόνης του imazalil, περιείχαν μετά από ένα μήνα αποθήκευσης 1,48 ppm imazalil. Όταν η εμβάπτιση έγινε χρησιμοποιώντας γαλακτοποιήσιμο πυκνό διάλυμα (DC) του imazalil, τα υπολείμματα ανιχνεύθηκαν στο επίπεδο των 1,08 ppm. Τα υπολείμματα αυτά αυξήθηκαν αναλογικά όταν η συγκέντρωση του imazalil στο γαλάκτωμα της εμβάπτισης αυξήθηκε από 0,5 σε 1,0 g/L (FAO, 1985).

Σε άλλη περίπτωση, μήλα ποικιλίας Golden Delicious εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα imazalil 0,5g/L και αποθηκεύτηκαν κάτω από (CA) συνθήκες για 7 μήνες. Η ποσότητα imazalil στα φρούτα μειώθηκε πολύ αργά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και περισσότερο από το 80% των συνολικών υπολειμμάτων ανακτήθηκε ακόμα και μετά από 7 μήνες αποθήκευσης. Τα επίπεδα υπολειμμάτων του imazalil κυμάνθηκαν από 1,55 έως 2,00 ppm (FAO, 1985). Οι Lopez & Riba,(1999) επίσης ανίχνευαν υψηλότερα ποσοστά imazalil στο φλοιό αχλαδιών που συντηρήθηκαν σε συνθήκες CA-LO, σε σύγκριση με αχλάδια που συντηρήθηκαν σε κοινή ψύξη. Ειδικότερα η συγκέντρωση του imazalil στον φλοιό των αχλαδιών μειώθηκε από 6 mg/Kg σε 3,6 mg/Kg μετά από 8 μήνες συντήρησης σε κοινή ψύξη, και από 5,6 mg/Kg σε 5,1 mg/Kg μετά από 8 μήνες συντήρησης σε συνθήκες CA-LO. Στη σάρκα όμως των αχλαδιών δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα υπολειμμάτων ανεξάρτητα από το σύστημα συντήρησης που χρησιμοποιήθηκε.

5.1.4 Ανασκόπηση αναλυτικών μεθόδων (τεχνικών) για την διερεύνηση-προσδιορισμό υπολειμμάτων του imazalil & thiabendazole.

Η εξέλιξη της τεχνικής της χρωματογραφίας, συνοδεύτηκε από την ανάπτυξη και εφαρμογή διαφόρων αναλυτικών μεθόδων, για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων πολλών γεωργικών φαρμάκων. Για το imazalil και το thiabendazole έχουν αναπτυχθεί και

δοκιμασθεί πολλές αναλυτικές τεχνικές, κάποιες από τις οποίες περιγράφονται περιληπτικά παρακάτω.

Από τον Wynants (1977), προτάθηκε ο προσδιορισμός του imazalil σε εσπεριδοειδή, με χρήση GC και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (EC) ή ιονισμού φλόγας (FID), ενώ για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε μίγμα εξανίου και ισοαμυλικής αλκοόλης (5:95). Οι Greenberg & Resnic (1977) χρησιμοποίησαν για την εκχύλιση ακετονιτρίλιο και μια στήλη Florisil για το cleanup. Με τροποποίηση της μεθόδου του Wynants, εκτιμήθηκε η συγκέντρωση του imazalil σε γκρεμπ-φρουτς από τους Stein *et al.*, (1981). Ο Camps Alemany *et al.*, (1980) εισήγαγε μια μέθοδο με χρήση GLC, για ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων των imazalil & thiabendazole.

Μια άλλη μέθοδος εφαρμόστηκε από τον J.R. King *et al.*, (1988), για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων του imazalil σε ντομάτες και πιπεριές, με χρήση αέριας χρωματογραφίας και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ενώ χρησιμοποιήθηκε γυάλινη στήλη πλήρωσης. Η εφαρμογή του imazalil έγινε μετασυσλεκτικά και η ανάλυση μετά από σύντομη αποθήκευση των καρπών. Η εκχύλιση έγινε με πετρελαϊκό αιθέρα και ακολούθησε cleanup. Οι ανακτήσεις από φορτισμένα δείγματα κυμάνθηκαν μεταξύ 90,1 και 95,7% σε δείγματα ντομάτας, ενώ σε δείγματα πιπεριάς μεταξύ 73,6 και 79,2%.

Μια απλή και αξιόπιστη μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων του imazalil σε ολόκληρα λεμόνια, από τους Y. Yamazaki & T. Ninomiya (1996). Η εκχύλιση του imazalil έγινε από δείγματα (10gr) λεπτοτεμαχισμένων λεμονιών με προσθήκη 50 ml οξικού αιθυλεστέρα, ομογενοποίηση και φιλτράρισμα. Μετά από συμπύκνωση μέχρι ξηρού και διάλυση σε 2ml dichloromethane ακολούθησε cleanup με εκχύλιση στερεής φάσης-SPE σε silica και τελική έκλυση του imazalil με μεθανόλη. Η ανάλυση έγινε σε αέριο-χρωματογράφο (GC) με τριχοειδή στήλη τύπου HP-1 και ανιχνευτή NPD. Οι ανακτήσεις σε τέσσερα επίπεδα φόρτισης κυμάνθηκαν μεταξύ 93,3 και 97,8% με τιμές SD 0,2 έως 2,8 ενώ το όριο ανίχνευσης ήταν 0,05mg/Kg.

Από άλλους ερευνητές (J. Garrido *et al.*, 1997), εφαρμόστηκε μια μέθοδο για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων του imazalil και του carbendazim σε πολλά είδη φρούτων μεταξύ των οποίων και μήλα. Η αναλυτική μεθοδολογία βασίστηκε σε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και περαιτέρω ανάλυση με HPLC-UV για το carbendazim και με GC-NPD για το imazalil. Τα επίπεδα ανίχνευσης ήταν 0,01 mg/Kg για το carbendazim και 0,005mg/Kg για το imazalil. Το ποσοστό ανάκτησης ήταν πάνω από 77% για το carbendazim και πάνω από 92% για το imazalil.

Από τους S. Navickiene & M.L.Ribeiro (1999) προτάθηκε μια απλή και γρήγορη αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων του imazalil και του thiabendazole σε πορτοκάλια (φλοιό και ολόκληρο καρπό). Η εκχύλιση περιλαμβάνει ομογενοποίηση του δείγματος με οξικό αιθυλεστέρα-εξάνιο (10ml, 1:1,v/v) για 20 λεπτά, λήψη της οργανικής φάσης και ακολούθως ανάλυση σε αέριο-χρωματογράφο με τριχοειδή στήλη και θερμοιονικό ανιχνευτή. Δεν χρειάστηκε στάδιο cleanup, γεγονός που επιτάχυνε ακόμα περισσότερο την διαδικασία. Τα ποσοστά ανάκτησης για τα δύο μυκητοκτόνα σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων, κυμάνθηκαν μεταξύ 79% και 103% με τιμές RSD από 1,7 έως 7,2. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 0,2 mg/Kg.

Οι Lopez & Riba (1999) εφάρμοσαν μια μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων του αντιοξειδωτικού ethoxyquin και των μυκητοκτόνων imazalil και iprodione, στον φλοιό και τη σάρκα αχλαδιών ποικιλίας Blanquilla. Η εκχύλιση έγινε με μεθανόλη, το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού, έγινε επαναδιάλυση σε διαιθυλαιθέρα και μετά από καθαρισμό αλλαγή διαλύτη σε τολουόλιο. Η ανάλυση έγινε σε αέριο χρωματογράφο με στήλη πλήρωσης και ανιχνευτή NPD.

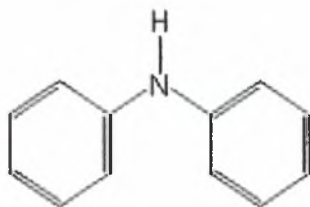
5.2 Αντιμετώπιση του επιφανειακού εγκαύματος με χημικά μέσα

Η αντιμετώπιση του επιφανειακού εγκαύματος (E.E.) με χημικά μέσα γίνεται με εφαρμογή αντιοξειδωτικών ουσιών αμέσως μετά τη συγκομιδή ή με ψεκάσμο των δέντρων λίγο πριν τη συγκομιδή. Γι' αυτό το σκοπό έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διάφορες χημικές ουσίες, περισσότερο πειραματικά παρά στην γεωργική πράξη. Τέτοιες ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά προς τη διφαινυλαμίνη και το ethoxyquin, είναι: γυβεριλίνη GA₃ σε προσυλλεκτικούς ψεκασμούς, εμβαπτίσεις σε ασκορβικό οξύ μετασυλλεκτικά (Vasilakakis *et al.*, 1995), χρήση ατμών αιθανόλης (Γ.Νάνος κ.α., 2001), καθώς και ένα σκεύασμα, το Semperfresh (επενδυτικό-εστερικής βάσης σουκρόζη με εδώδιμα αντιοξειδωτικά), χωρίς όμως να έχει σημειωθεί ουσιαστικός έλεγχος του E.E. (Bauchot *et al.*, 1995).

Οι ουσίες που κυρίως χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του E.E. είναι η διφαινυλαμίνη (DPA) και το ethoxyquin η χρήση του οποίου έχει απαγορευτεί σε πολλές χώρες μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα.

5.2.1 Diphenylamine (DPA), περιγραφή και ιδιότητες

Συνώνυμα: N-phenylbenzenamine, phenylaminobenzene, N-phenylaniline. Η διφαινυλαμίνη είναι μια αντιοξειδωτική ουσία η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στην αντιμετώπιση του Ε.Ε. σε μήλα και αχλάδια σε όλο τον κόσμο. Έχει μοριακό τύπο $C_{12}H_{11}N$ και το συντακτικό τύπο που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 3. diphenylamine. Πηγή: ([http 2](#))

Κάποιες φυσικές ιδιότητες της διφαινυλαμίνης είναι: Σημείο ζέσης: $302^{\circ}C$, Πίεση ατμών: 1mm Hg στους $108^{\circ}C$. Έχει την μορφή λευκών κρυστάλλων ή σκόνης. Σαν ασθενής βάση που είναι δεν συνδυάζεται με ισχυρά οξέα.

Τοξικότητα. Τοξικό και ερεθιστικό. Πιθανή μεταλλαξιγόνος δράση και πιθανή τερατογόνος δράση. Προκαλεί βλάβες όταν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή καταποθεί ή μετά από εισπνοή. Κατά τη χρήση θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ασφαλείας (μάσκα, γάντια κ.λ.π.). Η μέση θανατηφόρος δόση (LD_{50}) με εφάπαξ από στόματος λήψη για τα θηλαστικά έχει οριστεί στα 3200 mg/Kg και για επίμυες στα 1750 mg/Kg. Η διφαινυλαμίνη έχει χαρακτηριστεί με τις εξής φράσεις R (Risk Phrases): R23 (τοξικό όταν εισπνέεται), R24 (τοξικό σε επαφή με το δέρμα), R25 (τοξικό σε περίπτωση κατάποσης), R33 (κίνδυνος αθροιστικών επιδράσεων), R50 (πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς), R53 (πιθανές μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον) ([http 9](#)).

Η διφαινυλαμίνη κυκλοφορεί στην ελληνική αγορά με το σκεύασμα: No scald DPA 32 EC, με 31,8% δρώσα ουσία.

Η εφαρμογή της διφαινυλαμίνης γίνεται συνήθως αμέσως μετά τη συγκομιδή, με ψεκάσμο (spray), εμβάπτιση (dip), διαβροχή (drench) ή thermofogging. Χρησιμοποιούνται διαλύματα διφαινυλαμίνης, συγκέντρωσης 500-2000 ppm και εν συνεχεία οι καρποί οδηγούνται στους ψυκτικούς χώρους. Η εφαρμογή DPA είναι χωρίς αποτέλεσμα αν καθυστερήσει για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη συγκομιδή.

5.2.2 Συμπεριφορά & υπολειμματική δράση της διφαινυλαμίνης (DPA)

Η συμπεριφορά και η υπολειμματική δράση της διφαινυλαμίνης έχει μελετηθεί αρκετά σε διάφορες χώρες και από πολλούς ερευνητές. Αποτελέσματα τέτοιων μελετών βρίσκονται συγκεντρωμένα και δημοσιευμένα σε ανασκοπήσεις (Paradouroulou-Mourkidou, 1991). Στην Ελλάδα απουσιάζουν μελέτες για την υπολειμματική δράση και τη συμπεριφορά της διφαινυλαμίνης.

Η υπολειμματική δράση της διφαινυλαμίνης μελετήθηκε από τον Johnson *et al.*, (1997) σε μήλα των ποικιλιών Red Delicious και Granny Smith, τα οποία αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας μετά την εφαρμογή. Η εφαρμογή της διφαινυλαμίνης έγινε μετασυλλεκτικά, στις μέγιστες επιτρεπόμενες δόσεις (2000 ppm για καρπούς Red Delicious και 2200 ppm για καρπούς Granny Smith) για ανίχνευση υπολειμμάτων στους καρπούς, και σε δεκαπλάσιες ποσότητες (20000 ppm και 22000 ppm αντίστοιχα) για ανίχνευση υπολειμμάτων στο χυμό, σε νωπό και ξηρό μούστο των φρούτων. Τα μήλα αποθηκεύτηκαν συνολικά για εννέα μήνες σε συνθήκες (CA) και σε όλους τους ελέγχους που έγιναν τα υπολείμματα της διφαινυλαμίνης δεν ξεπέρασαν το όριο των 10 ppm, ούτε στους ολόκληρους καρπούς ούτε στο χυμό και στον μούστο.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η διφαινυλαμίνη παραμένει συγκεντρωμένη κυρίως στο φλοιό των καρπών, ενώ ελάχιστη συγκέντρωση μπορεί να ανιχνευτεί στη σάρκα σε βάθος μεγαλύτερο του 1 mm (Harrey and Elark, 1959). Άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι 14 μέρες μετά την εφαρμογή η κατανομή της διφαινυλαμίνης περιορίστηκε κυρίως σε στρώμα 1 mm των καρπών, και ειδικότερα, 37% στην επιδερμίδα και 6% στην υποδερμίδα (Hanekon *et al.*, 1976).

Για να εμποδιστεί η ανάπτυξη επιφανειακού εγκαύματος, βρέθηκε ότι απαιτείται ελάχιστη συγκέντρωση DPA, 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ στον φλοιό των καρπών (Huelin, 1968). Από άλλη μελέτη προέκυψε ότι απαιτείται αρχική συγκέντρωση DPA 3,5 ppm, στον φλοιό των καρπών για επαρκή έλεγχο του επιφανειακού εγκαύματος σε μήλα Granny Smith (Hanekon *et al.*, 1976).

Η συγκέντρωση της διφαινυλαμίνης στα μήλα και τα επίπεδα των υπολειμμάτων κατά την περίοδο της αποθήκευσης, βρέθηκε ότι εξαρτώνται από τη μορφή του σκευάσματος που χρησιμοποιείται, από τις εφαρμοζόμενες δόσεις, από τη μέθοδο εφαρμογής (εμβάπτιση, ψεκασμός, thermofoogging), από τη θερμοκρασία του διαλύματος εφαρμογής και των καρπών, την ποικιλία μήλων και τις συνθήκες αποθήκευσης (Johnson *et al.*, 1980, FAO, 1979, FAO, 1984).

Έχει βρεθεί ότι υψηλότερη θερμοκρασία στο διάλυμα εμβάπτισης αυξάνει τη συγκέντρωση υπολειμμάτων DPA. Όταν η θερμοκρασία καρπών κυμάνθηκε από 13⁰C μέχρι 22⁰C δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις συγκεντρώσεις υπολειμμάτων, τα υπολείμματα όμως βρέθηκαν σε μικρότερη συγκέντρωση όταν η θερμοκρασία των εμβαπτιζόμενων καρπών ήταν 4⁰C (Lee *et al.*, 1984).

Εφαρμογή DPA σε μήλα Granny Smith με τη μέθοδο thermofogging έδειξε μεγαλύτερη συγκέντρωση αρχικών υπολειμμάτων σε σχέση με εφαρμογές που έγιναν με εμβάπτιση ή ψεκάσμο. Όμως μετά από 1-2 μήνες αποθήκευσης η συγκέντρωση των υπολειμμάτων ήταν μικρότερη από 3 ppm (Chapon *et al.*, 1987).

Επίσης παρατηρήθηκε ότι η διφαινυλαμίνη είχε πιο μακρά υπολειμματική δράση σε μήλα Red Delicious, από ότι σε μήλα Granny Smith, Jonathan ή Rome Beauty, όταν εφαρμόστηκε σε μήλα όλων των παραπάνω ποικιλιών με εμβάπτιση, στον ίδιο χρόνο και στην ίδια συγκέντρωση (Lee *et al.*, 1984).

Η συμπεριφορά και κατανομή της διφαινυλαμίνης μελετήθηκαν σε μήλα ποικιλίας 'Stayman red' με εφαρμογή με fogging και με τη βοήθεια ειδικής διάταξης (Bertolini *et al.*, 1995). Η αντιμετώπιση του επιφανειακού εγκαύματος ήταν αποτελεσματική, χρησιμοποιήθηκε όμως μεγαλύτερη ποσότητα DPA και ανιχνεύτηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις υπολειμμάτων μετά από 5 μήνες αποθήκευσης συγκριτικά με τα αποτελέσματα εφαρμογής DPA στα ίδια μήλα, με εμβάπτιση.

Στα πλαίσια ενός προγράμματος ελέγχου των υπολειμμάτων στα τρόφιμα από το υπουργείο υγείας της Ισπανίας (1995), ελήφθησαν 100 δείγματα φρούτων (μήλων & αχλαδιών) από 10 διαφορετικά supermarkets, από τον Ιανουάριο έως τον Ιούνιο. Κατά την ανάλυση ανιχνεύθηκαν υπολείμματα DPA, σε 14 και 20 δείγματα μήλων και αχλαδιών αντίστοιχα. Μόνο σε 2 και 3 δείγματα μήλων και αχλαδιών αντίστοιχα, η συγκέντρωση της DPA ξεπέρασε το 50% του αντίστοιχου MRL (Ισπανικά MRL: 3mg/kg για τα μήλα και για τα αχλάδια.). (J. Garrido *et al.*, 1998)

5.2.3 Ανασκόπηση αναλυτικών μεθόδων (τεχνικών), για την διερεύνηση και προσδιορισμό υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης

Οι J.G. Allen & K.J. Hall (1980) εφάρμοσαν δυο μεθόδους προσδιορισμού υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης στον φλοιό μήλων, κατά τη διάρκεια ενός πειράματος συντήρησης των μήλων. Έχει βρεθεί ότι η παρουσία της διφαινυλαμίνης στα μήλα περιορίζεται στον φλοιό των καρπών και σε βάθος περίπου 1mm. Γι' αυτό το λόγο η εκχύλιση και των δύο μεθόδων έγινε σε φλοιό καρπών ενώ μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις

χρησιμοποιήθηκε και η σάρκα. Η πρώτη μέθοδος περιελάμβανε εκχύλιση σε συσκευή Soxhlet με πετρελαϊκό αιθέρα, καθαρισμό, παραγωγοποίηση και ανάλυση σε GC με γυάλινη στήλη πλήρωσης και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Η δεύτερη μέθοδος περιελάμβανε ατμοαπόσταξη / εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα σε συσκευή Veith & Kivus, και ανάλυση σε GC με ανιχνευτή NPD και στήλη: 1m, 3mm i.d., γυάλινη με ένα μίγμα από 3% OV-17 & 0,02% Epicote 1001 on 80-100 mesh Gas-Chrom Q. Η δεύτερη αναλυτική μέθοδος (ατμοαπόσταξη / εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα) αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική από την πρώτη, πιο σύντομη και απλή στην εφαρμογή, καθώς και πιο οικονομική ως προς τον απαιτούμενο εξοπλισμό και τους διαλύτες.

Οι Johnson *et al.*, (1997), διερεύνησαν την υπολειμματική δράση της διφαινυλαμίνης σε μήλα ποικιλιών Red Delicious και Granny Smith εφαρμόζοντας την αναλυτική μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω:

Η διερεύνηση των υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης έγινε τόσο σε δείγματα ολόκληρων καρπών όσο και σε δείγματα χυμού, αλλά και σε δείγματα μούστου από τα μήλα. Τα δείγματα 25gr, εκχυλίστηκαν με ακετόνη σε ομογενοποιητή και ακολούθησε φιλτράρισμα. Το εκχύλισμα αναμίχθηκε με νερό και ακολούθησε κατανομή μεταξύ δυο υγρών με προσθήκη εξανίου. Μετά τη λήψη του εκχυλίσματος (σε εξάνιο) έγινε αλλαγή διαλύτη σε διχλωρομεθάνιο, παραγωγοποίηση της διφαινυλαμίνης με τριφθορο-ακετικό ανυδρίτη και ανάλυση σε σύστημα αέριου χρωματογράφου / φασματογράφου μάζας. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ήταν 0,08 ppm για τους ολόκληρους καρπούς, το χυμό και τον νωπό μούστο, και 0,4 ppm για τον ξηρό μούστο. Ο μέσος όρος των ανακτήσεων κυμάνθηκε από 75,2% (ξηρός μούστος – Red Delicious) έως 94% (ολόκληροι καρποί - Granny Smith).

Μια απλή και σύντομη αναλυτική μέθοδος εφαρμόστηκε από τους L.Yu *et al.*, (1997) για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό υπολειμμάτων κάποιων χημικών μορίων μεταξύ των οποίων και της διφαινυλαμίνης. Η ανάλυση έγινε σε δείγματα μήλων, πορτοκαλιών, σπανακιού και κονσερβοποιημένων ροδακίνων. Η διαδικασία της εκχύλισης βασίστηκε πάνω στην CDFA (California Department of Food and Agriculture) πολύ-υπολειμματική μέθοδο (Joe, 1988; Luke *et al.*, 1981). Η εκχύλιση των δειγμάτων (50gr) έγινε με 100ml ακετονιτρίλιο και μετά από συμπύκνωση έγινε αλλαγή διαλύτη σε ακετόνη (1ml). Η ανάλυση έγινε σε σύστημα GC/MS, με τριχοειδή στήλη τύπου: HP-5 MS. Το όριο ανίχνευσης για τη διφαινυλαμίνη ήταν 8 ppb, και οι ανακτήσεις σε 5 επίπεδα φορτίσεων για όλα τα προϊόντα, κυμάνθηκαν από 70% έως 129% με CVs από 0,8% έως 22%.

Για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης σε μήλα και αχλάδια, οι J. Garrido *et al.*, (1998) εφάρμοσαν μια απλή, ταχεία και οικονομική μέθοδο. Η εκχύλιση της διφαινυλαμίνης από τα δείγματα (10gr) έγινε με ακετόνη (20ml), ακολούθησε καθαρισμός με κατανομή μεταξύ δυο υγρών και εκχύλιση με εξάνιο (30ml). Η ανάλυση έγινε σε GC με ανιχνευτή NPD και η μέθοδος αξιολογήθηκε με φορτίσεις σε 4 επίπεδα συγκεντρώσεων. Το όριο ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθόδου ήταν 0,005mg/Kg, και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού 0,01mg/Kg. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 80% και 100%. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση 100 δειγμάτων μήλων και αχλαδιών στα πλαίσια του προγράμματος ελέγχου των υπολειμμάτων στα τρόφιμα από το υπουργείο υγείας της Ισπανίας το 1995.

5.3 Αναλυτικές μέθοδοι για την διερεύνηση και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης, του imazalil και του thiabendazole

Οι περισσότερες αναλυτικές τεχνικές που αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης, ή του imazalil ή του thiabendazole ξεχωριστά. Κάποιες από αυτές εφαρμόστηκαν και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων δύο εκ των παραπάνω ουσιών, δηλαδή ή των δύο μυκητοκτόνων, ή της διφαινυλαμίνης και ενός μυκητοκτόνου. Παρ' όλα αυτά δεν βρέθηκε αναλυτική τεχνική στην βιβλιογραφία που να διερευνά και να προσδιορίζει υπολείμματα και των τριών ουσιών μαζί.

5.4 Ευρωπαϊκή Ένωση και Μέγιστα αποδεκτά όρια υπολειμμάτων-MRLs (Maximum Residues Limits)

Το πρώτο σχετικό νομοθέτημα της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων στα φρούτα και τα λαχανικά, ήταν η οδηγία 76/895/ΕΟΚ το 1976. Επιστέγασμα των κοινοτικών πρωτοβουλιών στο τομέα αυτό αποτελεί η 90/642/ΕΟΚ οδηγία του Συμβουλίου, όπως τροποποιήθηκε με τις 93/58/ΕΟΚ και 94/30/ΕΟΚ οδηγίες, με την οποία θεσμοθετείται ο επιστημονικά τεκμηριωμένος καθορισμός MRLs για όλες τις δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για φυτοπροστασία στη Κοινότητα, και επιβάλλεται η υποχρεωτική αποδοχή τους από τις χώρες-μέλη. Τα όρια αυτά αφορούν κάθε εδάδιμο γεωργικό είδος μεμονωμένα και αναλυτικά, όπως αυτά καθορίζονται από το παράρτημα της οδηγίας. Για τον καθορισμό των νεότερων αυτών ορίων ελήφθησαν υπόψη

μόνο επιστημονικά δεδομένα και γενικά τέθηκαν και ακολουθήθηκαν αυστηρές διαδικασίες (Λέντζα-Ρίζου, 1994).

Η Ε.Ε. ζητάει από τα κρατικά εργαστήρια να ελέγχουν στα φυτικά προϊόντα ενώσεις για τις οποίες έχει θεσπίσει MRLs. Η νομοθεσία της Ε.Ε. καλύπτει μέχρι τώρα, όσον αφορά τα MRLs, περίπου 170 δραστικές ουσίες ενώ οι Ευρωπαϊκές χώρες έχουν και εθνικά MRLs για τις περιπτώσεις που δεν καλύπτονται από τη κοινοτική νομοθεσία. Για την Ελλάδα όπου δεν υπάρχουν κοινοτικά MRLs γίνονται αποδεκτά τα MRLs των διεθνών οργανισμών FAO/WHO. Επιπλέον, η Ε.Ε. έχει εκδώσει, κατευθυντήριες οδηγίες (guidelines) για τις αναλύσεις φυτικών προϊόντων για υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών (Μηλιάδης, 2001).

Τα MRLs των imazalil & thiabendazole για τα μήλα, έχουν οριστεί από την Ε.Ε. στα **5 mg/kg** ([http 7](#)) και για τις δύο ουσίες ενώ από τον FAO στα **5** και **10 mg/kg** αντίστοιχα ([http 8](#)). Η Ε.Ε. έχει ορίσει και όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOD) για τις αναλύσεις των υπολειμμάτων του imazalil & thiabendazole στις συγκεντρώσεις **0,02 & 0,05mg/kg** αντίστοιχα. ([http 7](#)).

Το **MRL της διφαινυλαμίνης** για τα μήλα έχει οριστεί από την Ε.Ε. στα **5 mg/Kg** ([http 7](#)), από τον FAO στα 5mg/Kg ([http 8](#)) ενώ στις ΗΠΑ το MRL είναι τα 10 mg/Kg. Η Ε.Ε. έχει ορίσει σαν **LOD** στις αναλύσεις των υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης τα **0,05mg/kg** ([http 7](#)).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο

Υπολείμματα Γεωργικών Φαρμάκων Σε Φυτικά Προϊόντα



6.1 Εισαγωγή

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

Με την κατανάλωση γεωργικών προϊόντων που περιέχουν υπολείμματα φυτοφαρμάκων ο ανθρώπινος οργανισμός δέχεται μικροποσότητες τοξικών ουσιών, που διακρίνονται από οξεία, υποξεία ή υποχρόνια, και χρόνια τοξικότητα. Οι επιπτώσεις είναι συνάρτηση των τοξικολογικών ιδιοτήτων κάθε φυτοφαρμάκου και της συγκέντρωσης του στα τρόφιμα.

Για πρακτικούς λόγους έχει καθιερωθεί από τους διεθνείς οργανισμούς ένας όρος που μας δίνει μια εκτίμηση της τοξικότητας για κάθε ουσία. Ο όρος αυτός είναι η Ημερήσια Αποδεκτή Δόση (Acceptable Daily Intake-ADI) που ορίζεται σαν 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 NOEL (No Observable Effect Level) και με τη βοήθεια ενός συντελεστή ασφαλείας. Έτσι η ADI μπορεί να είναι από NOEL/100 μέχρι NOEL/1000, όταν υπάρχουν ιδιαίτεροι λόγοι προβληματισμού για τη τιμή NOEL (Παπαδοπούλου Μουρκίδου, 1991β).

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 στη καθημερινή διαίτα ενός λαού, θεωρώντας ότι ο μέσος όρος ισχύει και για κάθε άτομο.

Οι αναλύσεις υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων αποτελούν μια δύσκολη και εξειδικευμένη κατηγορία χημικής ανάλυσης. Κάτω από την πίεση της κοινής γνώμης για την παρακολούθηση των τοξικολογικών και οικολογικών επιπτώσεων εξαιτίας της χρήσης γεωργικών φαρμάκων, αυξήθηκαν οι απαιτήσεις για ένα πιο αυστηρό έλεγχο των φυτικών προϊόντων. Υπάρχει η τάση τα ανώτατα επιτρεπτά όρια να ελαττώνονται μετά από

επανεξετάσεις, με αποτέλεσμα να υπάρχει διαρκής απαίτηση για την αύξηση της ευαισθησίας των μεθόδων, με συνέπεια να πολλαπλασιάζονται τα αναλυτικά προβλήματα επιτυχούς προσδιορισμού.

Ακόμα πρέπει να επισημανθεί ότι τα επίπεδα των προς προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε δείγματα φυτικής προέλευσης είναι χαμηλά, της τάξεως mg/kg ή και μερικές φορές μg/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.

6.2 Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων

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.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων διακρίνονται σε πολυδύναμες (multi-residue methods) και εξειδικευμένες (specific methods) (Λέντζα-Ρίζου, 2000α).

Πολυδύναμες ή πολύ-υπολειμματικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν για να διευκολύνουν τον έλεγχο ρουτίνας (monitoring) των γεωργικών προϊόντων. Είναι αυτές που 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, 2000α).

Εξειδικευμένες ή μόνο –υπολειμματικές μέθοδοι (specific or single residue methods), 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 όσο αφορά τα υπολείμματα που είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

6.3 Αξιολόγηση (validation) των μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων

Οποιαδήποτε μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων, ακόμα και αν χρησιμοποιείται ευρέως, πρέπει να αξιολογείται και να ελέγχεται από τον αναλυτή ή το εργαστήριο που πρόκειται να την χρησιμοποιήσει για πρώτη φορά. Ο έλεγχος αυτός γίνεται μελετώντας τα παρακάτω στοιχεία.

1) Ποσοστό επανάκτησης (ανάκτησης, recovery rate)

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 προσδιορισθεί συγκρίνεται με τη ποσότητα που έχει προστεθεί. Ποσοστό επανάκτησης 100% είναι η ιδανική περίπτωση. Όμως αυτό δεν είναι πάντα δυνατό. Τα αποδεκτά εύρη επανάκτησης κυμαίνονται από 70-110% (*http 7*). Το ποσοστό επανάκτησης στην ουσία είναι η απόδοση της μεθόδου.

2) Εξειδίκευση (specificity)

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

3) Ορθότητα (accuracy)

Σύμφωνα με τον ΕΛΟΤ, ο όρος accuracy αποδίδεται **ορθότητα**. Η ορθότητα μιας μεθόδου είναι το ποσοστό προσέγγισης των αποτελεσμάτων που επιτυγχάνονται με αυτή τη μέθοδο σε διαφορετικά δείγματα σε σχέση με τη 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.

4) Ακρίβεια (precision)

Σύμφωνα με τον ΕΛΟΤ, ο όρος precision αποδίδεται **ακρίβεια**. 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).

5) Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)

Αναπαραγωγιμότητα είναι η ικανότητα της αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων από άλλα ανεξάρτητα εργαστήρια. Για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας, συνήθως το ίδιο δείγμα διαιρείται σε υποδείγματα και αναλύεται από δύο ή περισσότερα εργαστήρια. Εκτιμάται η % σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων.

6) Γραμμικότητα του ανιχνευτή

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

7) 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.

8) Εκλεκτικότητα (selectivity)

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

9) Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Detection Limit -DL, & Limit Of Quantitation-LOQ ή 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 δεν 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 αυτή τη περίπτωση μιλάμε για μη ανιχνεύσιμα υπολείμματα (Λέντζα-Ρίζου, 2000α). Η ελάχιστη ποσότητα κάθε φυτοφαρμάκου που είναι δυνατόν να ανιχνευθεί με κάθε μέθοδο είναι στοιχείο πολύ μεγάλης σημασίας.

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

Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOD ή LOQ), είναι η ελάχιστη συγκέντρωση που μπορεί να προσδιορισθεί ποσοτικά με αξιοπιστία (ακρίβεια και ορθότητα). Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού ορίζεται η ποσότητα εκείνη του συστατικού που μας δίνει σήμα δεκαπλάσιο από το θόρυβο.

6.4 Οργανικοί διαλύτες

Στις αναλύσεις υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιούνται ευρύτατα οι οργανικοί διαλύτες σε φάσεις της ανάλυσης που περιγράφονται παρακάτω. Επομένως η γνώση της πολικότητας των διαλυτών είναι απαραίτητη. Παρακάτω δίνονται οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, κατά σειρά αύξουσας πολικότητας, θεωρώντας το νερό σαν πρότυπο πολικού διαλύτη.

Εξάνιο=πετρελαϊκός αιθέρας <κυκλοεξάνιο <τολουόλιο <βενζόλιο <διχλωρομεθάνιο <χλωροφόρμιο <διαιθυλαιθέρας <οξείκος αιθυλεστέρας <ακετόνη <αιθανόλη <μεθανόλη <ακετονιτρίλιο.

Δύο γειτονικοί στη λίστα διαλύτες είναι μεταξύ τους πολύ διαλυτοί. Όσο απομακρύνονται γίνονται μη αναμίξιμοι.

Ο κατάλληλος διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί στις φάσεις της ανάλυσης είναι εκείνος που θα έχει συγγενείς ιδιότητες και κυρίως παρόμοια πολικότητα με το υπό μελέτη φυτοφάρμακο, δεν θα εκχυλίζει άλλες ουσίες του υποστρώματος και θα είναι όσο το δυνατό λιγότερο τοξικός.

6.5 Δειγματοληψία (sampling) & διατήρηση των δειγμάτων

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

Σε κάθε περίπτωση η κυρίαρχη ιδιότητα που πρέπει να έχουν τα δείγματα που λαμβάνονται, είναι η αντιπροσωπευτικότητα. Η ορθότητα και η ακρίβεια μιας αναλυτικής μεθόδου δεν είναι ποτέ καλύτερη αυτών που καθορίζονται από τη δειγματοληψία και την προετοιμασία των δειγμάτων. Ακόμα και αν εφαρμόζεται η πιο ακριβής αναλυτική μέθοδος, θα καταλήξει σε λανθασμένα συμπεράσματα, αν η δειγματοληψία δεν έχει διενεργηθεί σωστά.

Η δειγματοληψία θα πρέπει να γίνεται από εκπαιδευμένο προσωπικό, σύμφωνα με τις αρχές δειγματοληψίας, τις οδηγίες από τους διεθνείς οργανισμούς (FAO, WHO, E.E. κ.λ.π.) και τις απαιτήσεις της εφαρμοζόμενης αναλυτικής μεθόδου. Τα δείγματα πρέπει να συσκευάζονται κατάλληλα ώστε να αποφεύγονται αλλοιώσεις, διαρροές (για υγρά δείγματα) και μολύνσεις των προϊόντων, και να οδηγούνται στον εργαστηριακό χώρο όσο το δυνατό πιο γρήγορα. Κάθε δείγμα πρέπει να φέρει σήμανση και να συνοδεύεται από πρωτόκολλο, που θα αναφέρεται στη φύση και τη προέλευση του δείγματος, την ημερομηνία και τον τόπο της δειγματοληψίας μαζί με πρόσθετες πληροφορίες που πιθανώς θα χρειασθούν κατά την ανάλυση.

6.5.1 Βέλτιστος αριθμός στοιχειωδών (αρχικών) δειγμάτων και εργαστηριακών δειγμάτων

Ο βέλτιστος αριθμός των στοιχειωδών δειγμάτων κυμαίνεται μεταξύ δέκα και είκοσι. Στην πράξη ο αριθμός των δέκα στοιχειωδών δειγμάτων ανά δειγματοληψία είναι ικανοποιητικός. Για τον προσδιορισμό του μέσου επιπέδου των υπολειμμάτων ενός φορτίου, η ανάλυση τριών επαναλήψεων εργαστηριακών δειγμάτων φαίνεται να είναι επαρκής.



Το **ολικό δείγμα (bulk sample)** δημιουργείται από την ενοποίηση και ανάμιξη των **αρχικών ή στοιχειωδών δειγμάτων (primary samples)**. Το ολικό δείγμα ή αντιπροσωπευτικό μέρος αυτού θα συγκροτήσει το **τελικό δείγμα (final sample)**. Το τελικό δείγμα που φτάνει στο εργαστήριο συνήθως υποδιαιρείται σε μικρότερα υποδείγματα. Ένα από αυτά είναι το **εργαστηριακό δείγμα (laboratory sample)**. Το εργαστηριακό δείγμα χωρίζεται σε δυο μέρη, το ένα από αυτά φυλάγεται ως μάρτυρας και ονομάζεται **αντιδείγμα**, ενώ το άλλο υποβάλλεται σε κατεργασία για την ανάλυσή του. Ο ελάχιστος αριθμός των 5 τεμαχίων του προϊόντος στο εργαστηριακό δείγμα μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητικός τόσο από θεωρητικής όσο και από πρακτικής άποψης.

Όσον αφορά τη μείωση από ολικό σε εργαστηριακό δείγμα, αυτή μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους, όπως είναι η μέθοδος των τεταρτημορίων ή με μηχανικά σύστήματα.

6.5.2 Δειγματοληψία για τον έλεγχο υπολειμμάτων από φορτία

Ο ελάχιστος αριθμός των αρχικών δειγμάτων καθορίζεται από το μέγεθος του **φορτίου (lot)** ή από τον αριθμό των containers. Χονδρικά, για ποσότητες φορτίων πάνω από 500kg, ο ελάχιστος αριθμός στοιχειωδών δειγμάτων που απαιτείται κυμαίνεται από 10-15. Για φορτία κάτω των 500kg απαιτούνται 3-5 στοιχειώδη δείγματα. Ο ελάχιστος αριθμός των 5 τεμαχίων του προϊόντος στο εργαστηριακό δείγμα μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητικός τόσο από θεωρητικής όσο και από πρακτικής άποψης. Ποσότητα 1kg μήλων, θεωρείται η ελάχιστη ικανή να αποτελέσει το εργαστηριακό δείγμα, από φορτίο μήλων.

6.5.3 Δειγματοληψία από πειραματικά τεμάχια (supervised trials)

Σε έρευνες υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε μήλα, με χρήση πειραματικών τεμαχίων, συνιστάται το ελάχιστο μέγεθος δείγματος από κάθε πειραματικό τεμάχιο να περιέχει 24 καρπούς από διαφορετικές θέσεις του δέντρου από τουλάχιστον 4 διαφορετικά δέντρα (FAO/WHO, 1986). Ειδική προσοχή πρέπει να δίνεται στα δείγματα του μάρτυρα (δείγματα από τεμάχια όπου δεν έγινε επέμβαση με το γεωργικό φάρμακο) τα οποία λαμβάνονται πριν από τα άλλα δείγματα ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση τους από τα εργαλεία ή τα χέρια. Γενικοί κανόνες που ισχύουν τόσο για τα κυρίως δείγματα όσο και για το μάρτυρα, είναι: 1) Επιλέγονται απολύτως υγιή φυτά ή μέρη αυτών και κανονικής ανάπτυξης, 2) Δεν απομακρύνονται τα επιφανειακά κατάλοιπα των γεωργικών φαρμάκων κατά τη λήψη ή συσκευασία των δειγμάτων, 3) Λαμβάνεται επαρκής ποσότητα για όλες τις

πιθανές επαναλήψεις, 4) Πρέπει να αποφεύγεται η επιμόλυνση των δειγμάτων κατά τη λήψη και μεταφορά-αποστολή.

6.5.4 Διατήρηση (συντήρηση) των δειγμάτων

Για τη διατήρηση του δείγματος στην αρχική του κατάσταση, πρέπει να ληφθούν ειδικά μέτρα ώστε να αποτρέψουμε μολύνσεις, απώλειες, διασπάσεις κ.λ.π. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στις αλλοιώσεις που μπορούν να προκαλέσουν η θερμοκρασία, το δοχείο φύλαξης, η ατμόσφαιρα και το φως. Συνήθεις τεχνικές για τη διατήρηση του δείγματος είναι: α) Επιλογή κατάλληλου δοχείου αποθήκευσης, β) Ψύξη του δείγματος, γ) Προσθήκη χημικών σταθεροποιητών, π.χ. αντιοξειδωτικών.

6.6 Διαδικασία ανάλυσης

Από τη στιγμή που φθάνει το δείγμα στο εργαστήριο και μέχρι τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων, ακολουθείται μια διαδικασία που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Προετοιμασία αναλυτικού δείγματος
- 2) Εκχύλιση
- 3) Καθαρισμός
- 4) Συμπύκνωση
- 5) Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

6.7 Προετοιμασία των αναλυτικών δειγμάτων

Ο σκοπός της προετοιμασίας του αναλυτικού δείγματος είναι η λήψη μιας πλήρως αντιπροσωπευτικής μερίδας του εργαστηριακού δείγματος ή ένα συγκεκριμένο μέρος αυτού ανάλογα με το σκοπό της ανάλυσης. Σε ειδική οδηγία της Ε.Ε. ορίζεται το μέρος του γεωργικού προϊόντος στο οποίο αναφέρονται τα MRLs, και επομένως το μέρος στο οποίο πρέπει να γίνει η ανάλυση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα MRLs αναφέρονται σε ολόκληρα προϊόντα όπως αυτά κυκλοφορούν στο εμπόριο π.χ. ολόκληρα μήλα.

Το εργαστηριακό δείγμα αλέθεται και ομογενοποιείται με εργαστηριακούς ομογενοποιητές, με τη χρήση κοινών ηλεκτρικών 'blenders' οικιακής χρήσεως ή απλή ανάμιξη, ανάλογα με το φυτικό προϊόν. Από το ομογενοποιημένο δείγμα παίρνουμε μια μικρή ποσότητα που προορίζεται για ανάλυση. Αυτό είναι το **αναλυτικό δείγμα**. Στις παλαιότερες μεθόδους το αναλυτικό δείγμα ήταν της τάξεως των 100-250 g. Σήμερα με την

αύξηση της ευαισθησίας των μεθόδων, και την τάση για περιορισμό του όγκου των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, το αναλυτικό δείγμα είναι της τάξεως των 15-50 g (Λέντζα-Ρίζου, 2000α).

Για παράδειγμα, στην περίπτωση δείγματος μήλων, γίνεται επιλογή κάποιων καρπών από το εργαστηριακό δείγμα, και στη συνέχεια αλέθονται τα δύο αντιδιαμετρικά τεταρτημόρια του κάθε καρπού. Ακολουθεί ομογενοποίηση του αλεσμένου δείγματος και λήψη του αναλυτικού δείγματος.

Αν η ανάλυση των δειγμάτων δεν γίνει άμεσα πρέπει να αποθηκευτούν σε ψύξη ή κατάψυξη (-20°C) όπου η αποικοδόμηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων θεωρείται ότι πραγματοποιείται με εξαιρετικά χαμηλή ταχύτητα.

6.8 Εκχύλιση (extraction)

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, ώστε το εκχύλισμα να είναι όσο το δυνατό πιο καθαρό. (Υπόστρωμα είναι το προς ανάλυση προϊόν.)

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.

Σήμερα υπάρχει η τάση για χρήση ενός μόνο διαλύτη. Χρησιμοποιούνται διαλύτες ειδικής ποιότητας, όπως διαλύτες με προδιαγραφές καθαρότητας pesti-grade ή HPLC-grade, ή κοινοί διαλύτες διπλοαπεσταγμένοι σε γυαλί. Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι για εκχύλιση διαλύτες είναι το διχλωρομεθάνιο, ο πετρελαϊκός αιθέρας το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη, και ο οξικός αιθυλεστέρας. Το ακετονιτρίλιο δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα, είναι όμως περισσότερο τοξικό και εξατμίζεται δυσκολότερα από την ακετόνη. Η ακετόνη εξατμίζεται ευκολότερα (είναι περισσότερο πτητική) λιγότερο τοξική και σχετικά φθηνή,

έχει όμως μεγάλη συνεκχυλιστική ικανότητα. Ο οξικός αιθυλεστέρας είναι κατάλληλος για εκχύλιση πολικών και μη πολικών φυτοφαρμάκων και δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα από την ακετόνη. Τα κριτήρια επιλογής ενός διαλύτη εκχύλισης είναι: **1)** Η έλλειψη αντίδρασης μεταξύ του διαλύτη και των γεωργικών φαρμάκων, **2)** Η πολικότητα του διαλύτη προς εκείνη του γεωργικού φαρμάκου, **3)** Η διαλυτότητα των γεωργικών φαρμάκων στους διάφορους διαλύτες, **4)** Η τοξικότητα του διαλύτη, **5)** Η πτητικότητα του διαλύτη, **6)** Η καθαρότητα του διαλύτη, **7)** Το κόστος του διαλύτη.

Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης πρέπει να ελέγχεται και η μόνη αξιόπιστη μέθοδος είναι με δείγματα που προέρχονται από αγρό στον οποίο έγινε η εφαρμογή ραδιοσημασμένων μορίων του υπό μελέτη φυτοφαρμάκου (Λέντζα-Ρίζου, 2000α). Τις περισσότερες φορές η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης ελέγχεται με απλές δοκιμές ανάκτησης.

Το προϊόν της εκχύλισης που αποτελείται από τους φυτικούς ιστούς τεμαχισμένους σε πολύ μικρά σωματίδια (στερεή φάση) και την υγρή φάση, διηθείται, ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά σωματίδια. Η διήθηση γίνεται είτε με φυσική ροή πάνω από τεμάχιο ύαλου χαλαζία ή υαλοβάμβακα ειδικής καθαρότητας, είτε υπό κενό σε χωνιά εφοδιασμένα με χάρτινο ηθμό.

6.9 Καθαρισμός του εκχυλίσματος (Clean-up)

Η διαδικασία καθαρισμού είναι ίσως το πιο σημαντικό στάδιο στην ανάλυση υπολειμμάτων, αφού το εκχύλισμα που παραλαμβάνουμε από το προηγούμενο στάδιο περιέχει εκτός από την απειροελάχιστη ποσότητα γεωργικού φαρμάκου και πολλά συνεκχυλίσματα (coextractives) τα οποία προέρχονται από το φυτικό υπόστρωμα. Η συγκέντρωσή τους είναι 10^5 ή και μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του γεωργικού φαρμάκου (Μηλιάδης, 1989). Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι αμίνες, φαινόλες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, φυτικά λίπη και έλαια, χλωροφύλλη. Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων, θα πρέπει να απαλλαγούμε από όσον δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό ανεπιθύμητων ουσιών. Αυτός είναι ο σκοπός της φάσης του καθαρισμού. Ο καθαρισμός γίνεται με τις εξής τεχνικές:

6.9.1 Κατανομή μεταξύ δυο υγρών (liquid-liquid partitioning)

Σαν τέτοια υγρά χρησιμοποιούνται μη αναμιξιμοί διαλύτες κυρίως ο πετρελαϊκός αιθέρας και το διχλωρομεθάνιο. Στον πετρελαϊκό αιθέρα (διαλύτης μη πολικός) διαλύονται

μόνο οι μη πολικές ενώσεις ενώ στο διχλωρομεθάνιο (διαλύτης μέσης πολικότητας) διαλύονται ουσίες μεγαλύτερου εύρους πολικότητας. Υπάρχουν μαθηματικές σχέσεις που καθορίζουν την κατανομή των ουσιών στα συστήματα διαλυτών. Χρησιμοποιείται κυρίως η έννοια του συντελεστή κατανομής (P) στο δεδομένο σύστημα διαλυτών. P(p-value) είναι το εκατοστιαίο ποσοστό που διαλύεται στην μη πολική φάση ενός μίγματος διαλυτών ίσου όγκου. (Λέντζα-Ρίζου, 2000α) Όταν για την τελική φάση της μεθόδου χρησιμοποιούνται εξειδικευμένοι ανιχνευτές όπως ο FPD ή ο NPD, ο καθαρισμός με κατανομή δυο μη αναμίξιμων διαλυτών είναι συνήθως επαρκής.

6.9.2 Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography)

Όταν χρησιμοποιούνται ευαίσθητοι και μη εξειδικευμένοι ανιχνευτές (π.χ. ECD), συνήθως απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός του εκχυλίσματος. Η πλέον διαδεδομένη τεχνική είναι η χρωματογραφία προσρόφησης (χρωματογραφία στήλης). Σε στήλη χρωματογραφίας (γυάλινη στήλη με κατάλληλη διάμετρο), τοποθετείται το προσροφητικό υλικό (florisil, αλουμίνα, silica gel, άνθρακας κ.α.). Το συμπυκνωμένο εκχύλισμα ή κλάσμα του, εκλούεται με κατάλληλο σύστημα στο προσροφητικό υλικό και συλλέγονται διάφορα κλάσματα του συστήματος έκλουσης. Σαν συστήματα έκλουσης χρησιμοποιούνται συνήθως μίγματα δύο ή τριών διαλυτών σε διάφορες αναλογίες. Η επιλογή τόσο του προσροφητικού υλικού όσο και του συστήματος έκλουσης εξαρτάται κυρίως από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φυτοφαρμάκων που πρόκειται να προσδιορισθούν, καθώς και από τη μέθοδο τελικού προσδιορισμού που καθορίζει και την επιζητούμενη καθαρότητα του τελικού εκχυλίσματος.

6.9.3 Χρωματογραφία γέλης ή χρωματογραφία μοριακού διαχωρισμού (Gel Permeation Chromatography, ή size exclusion chromatography)

Είναι χρήσιμη τεχνική για τον διαχωρισμό των φυτοφαρμάκων από λιπώδη και ελαιώδη υποστρώματα. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί μια στήλη πληρωμένη με κατάλληλου μεγέθους πόρων ρητίνη, συνήθως γέλη (gel) πολυστυρενίου. Το μέγεθος των πόρων της ρητίνης καθορίζει την ταχύτητα απομάκρυνσης των ουσιών. Η γέλη εκλούεται με οργανικούς διαλύτες. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό βάρος κάθε ουσίας. Μεγαλομοριακές ενώσεις όπως τα λίπη και η χλωροφύλλη, εκλούνται πρώτες και απομακρύνονται, ενώ τα φυτοφάρμακα που συνήθως είναι μικρομοριακές ενώσεις, εκλούνται αργότερα. (Λέντζα-Ρίζου, 2000α)

6.9.4 Σαρωτική συναπόσταξη (sweep co distillation)

Κατά τη τεχνική αυτή το συμπυκνωμένο εκχύλισμα μεταφέρεται σε θερμαινόμενο γυάλινο σωλήνα που περιέχει καθαρή ύαλο χαλαζία, η οποία συγκρατεί πολλές ανεπιθύμητες ουσίες. Τα πτητικά φυτοφάρμακα παρασύρονται από ένα αδρανές αέριο (άζωτο) και ένα διαλύτη προς ένα ψυχόμενο σκεύος που περιέχει κατάλληλο διαλύτη.

6.9.5 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Βασίζεται στην εκχύλιση μεταξύ μιας στερεάς και μιας υγρής φάσης. Σαν στερεά φάση χρησιμοποιούνται γη των διατόμων ή συναφή προϊόντα (συνθετικές κυρίως ρητίνες), πολικά ή μη πολικά σκευασμένα σε φυσιγγία διαφόρου μεγέθους. Τέτοια φυσιγγία κυκλοφορούν ετοιμόχρηστα στο εμπόριο (φυσιγγία octa-silane C₈, octadecyl-silane C₁₈, κ.α.) Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται όλο και περισσότερο, εξαιτίας της βελτίωσης της τεχνολογίας, της ευκολίας χειρισμού των δειγμάτων, της ταχύτητας χειρισμού και της οικονομίας σε διαλύτες. Οι κύριοι στόχοι της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι ο καθαρισμός, η συμπύκνωση της δραστικής ουσίας και η αλλαγή διαλύτη από πολικό σε μη πολικό ή το αντίστροφο, πριν την ανάλυση. Η εκχύλιση στερεάς φάσης πραγματοποιείται σε 4 απλά στάδια:

1ο. Ενεργοποίηση της στερεάς φάσης του φυσιγγίου: Προετοιμάζουμε το υλικό του φυσιγγίου (τη στατική φάση) για να αλληλεπιδράσει με το δείγμα μας. Αυτό γίνεται με τη διέλευση κατάλληλου διαλύτη, ο οποίος ακολουθείται από τη διέλευση διαλύτη παρόμοιας φύσεως με τον διαλύτη του προς καθαρισμό δείγματος.

2ο. Προσθήκη δείγματος. Το δείγμα διέρχεται μέσω του ενεργοποιημένου φυσιγγίου όπου κατακρατούνται ποσοτικά οι δραστικές ουσίες που μας ενδιαφέρουν αλλά και μερικά συστατικά του υποστρώματος με ασθενείς διαμοριακούς δεσμούς.

3ο. Καθαρισμός δραστικής ουσίας. Με διέλευση κατάλληλων διαλυτών γίνεται απομάκρυνση από τη στερεή φάση του φυσιγγίου ανεπιθύμητων συστατικών του υποστρώματος χωρίς να εκλούεται η δραστική ουσία που μας ενδιαφέρει.

4ο. Έκλυση δραστικής ουσίας. Με τη διέλευση του κατάλληλου διαλύτη ή μίγματος διαλυτών από το φυσιγγίο στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η ποσοτική έκλυση της δραστικής ουσίας.

Υπάρχουν 3 γενικοί μηχανισμοί εκχύλισης στερεάς φάσης: ο μη πολικός, ο πολικός, και αυτός της ιοντοανταλλαγής. Η επιλογή του υλικού προσροφήσεως (από μια μεγάλη ποικιλία που κυκλοφορεί στο εμπόριο με τη μορφή φυσιγγίων, C₁₈, C₈, Si, PRS, Florisil,

κ.α.) στηρίζεται βασικά στις δραστικές ομάδες που υπάρχουν στο μόριο του φαρμάκου και στη σύνθεση του υποστρώματος.

6.10 Συμπύκνωση του εκχύλισματος (concentration)

Με σκοπό να αυξηθεί η ευαισθησία της ανάλυσης, το καθαρό εκχύλισμα συμπυκνώνεται σε μικρό όγκο (1-10 mL). Η συμπύκνωση γίνεται είτε σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό (rotary evaporator), είτε με ρεύμα καθαρού αζώτου, προκειμένου για μικρούς όγκους πτητικών διαλυτών. Στη περίπτωση που μετά τη συμπύκνωση ακολουθεί αλλαγή διαλύτη, η συμπύκνωση γίνεται μέχρι ξηρού και έπειτα προστίθεται ο νέος διαλύτης.

6.11 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός (determination)

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, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC, και η φασματογραφία μάζας. Τα τελευταία χρόνια γνωρίζουν ανάπτυξη οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι (ανοσοδοκιμασίες) (Λέντζα-Ρίζου, 2000α).

6.11.1 Αεριοχρωματογραφία (gas chromatography,GC)

Με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας, μικρή ποσότητα (1-5μL) 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, ήλιο, ή αργό) κινείται μέσα στη στήλη και παρασύρει τους ατμούς του δείγματος. Ο χρόνος παραμονής κάθε ουσίας στη στήλη (χρόνος κατακράτησης-retention time), 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. Μετρούμενο το ύψος της κορυφής και η επιφάνειά της χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Η GC χρησιμοποιείται κυρίως για φυτοφάρμακα που έχουν ικανοποιητική πτητικότητα και θερμική σταθερότητα. Μόρια που θερμοδιασπώνται δεν μπορούν να προσδιοριστούν με αέρια χρωματογραφία, παρά μόνο μετά από την παραγωγοποίησή τους σε άλλα μόρια πτητικά και σταθερά. Τα βασικά μέρη ενός αέριου χρωματογράφου είναι.

1) Ο **εγχυτής**, είναι το εξάρτημα μέσα στο οποίο γίνεται η έγχυση του καθαρού εκχυλίσματος. Οι εγχυτές μπορεί να είναι δυο τύπων: split-splitless ή on column.

2) Η **στήλη**, είναι από τα βασικότερα εξαρτήματα. Σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως οι τριχοειδείς στήλες, διαμέτρου 0,1-0,6 mm και μήκους 15-50 m. Η πολικότητα των στηλών είναι καθοριστική για την ανάλυση. Μια στήλη πολική συγκρατεί για μεγαλύτερο χρόνο τις πολικές ουσίες, οι οποίες, ως εκ τούτου έχουν μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης σε αυτές τις συνθήκες. Η χρησιμοποίηση στηλών διαφορετικής πολικότητας συνιστάται σαν η πιο απλή και αρκετά αξιόπιστη μέθοδος ταυτοποίησης-επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων. Η θερμοστάτηση της στήλης η οποία είναι τοποθετημένη μέσα σε κλίβανο (φούρνο), επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία διαχωρισμού. Γι' αυτό η θερμοκρασία της στήλης ελέγχεται με μεγάλη ακρίβεια καθ' όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Η στήλη είτε διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία (ισόθερμη χρωματογραφία), είτε μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα (θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία).

3) Ο **ανιχνευτής**, είναι το εξάρτημα εκείνο που πληροφορεί για το πότε μια ουσία βγήκε από τη στήλη και πόση είναι η ποσότητα της. Ως ευαισθησία του ανιχνευτή (sensitivity), ορίζεται ο λόγος της μεταβολής της αποκρίσεως του ανιχνευτή προς την αντίστοιχη μεταβολή της ποσότητας (ή συγκέντρωσης) της ουσίας που προσδιορίζουμε. Η ευαισθησία δίνεται συνήθως ως η κλίση της καμπύλης αναφοράς. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται κυρίως για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων είναι:

α) Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (Nitrogen-Phosphorus Detector, NPD). Είναι εξειδικευμένος για ουσίες που περιέχουν στο μόριο τους άζωτο ή φώσφορο.

β) Ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας (Flame-Photometric Detector, 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.

γ) Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD). Είναι πολύ ευαίσθητος ανιχνευτής για πολλές ενώσεις και γι'αυτό τα εκχυλίσματα που θα προσδιοριστούν με αυτόν πρέπει να είναι ιδιαίτερα καθαρά. Χρησιμοποιείται κυρίως για αναλύσεις ενώσεων που περιέχουν O, P, S και αλογόνα.

4) Το **καταγραφικό** είναι ένα σύστημα επεξεργασίας του σήματος απόκρισης του ανιχνευτή και καταγράφει υπό μορφή κορυφής το σήμα.

Πλέον όλες οι παράμετροι ρυθμίζονται με σύστημα ηλεκτρονικού υπολογιστή, όπου καταγράφονται και οι κορυφές, ενώ και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με κατάλληλο software.

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

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται γενικά για φυτοφάρμακα που δεν μπορούν να προσδιοριστούν με αεριοχρωματογραφία, είτε λόγω θερμικής αστάθειας, είτε λόγω χαμηλής πτητικότητας, είτε λόγω μεγάλης πολικότητας. Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας έχει αρκετά κοινά σημεία με την αέριο (έγχυση του δείγματος σε στήλη με κατάλληλο υλικό όπου παρασύρεται σε κατάλληλο ανιχνευτή). Όμως διαφέρει κατά το ότι 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).

Διακρίνουμε δυο 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 (από 200-350nm). Μειονεκτεί σε σχέση με τους ανιχνευτές της αεριοχρωματογραφίας κατά το ότι είναι μη εκλεκτικός και όχι αρκετά ευαίσθητος. Μια σύγχρονη μορφή του, ο Diode Array Detector (DAD), είναι περισσότερο εκλεκτικός, μικρής όμως ευαισθησίας.

6.11.3 Φασματογραφία μάζας (Mass Spectrometry, MS)

Η τεχνική αυτή κατ'αρχάς προτάθηκε σαν μέθοδος ταυτοποίησης-επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από την αέριο και τελευταία και από την υγρή χρωματογραφία. Τελευταία αρχίζει να χρησιμοποιείται και σαν ανεξάρτητος ανιχνευτής για ποσοτικό προσδιορισμό. Το σύστημα GC-MS αποτελεί μια από τις πιο επιτυχημένες συνδυαστικές τεχνικές ανάλυσης.

Κατά τη τεχνική αυτή, τα οργανικά μόρια οδηγούνται σε ένα χώρο όπου βομβαρδίζονται με ηλεκτρόνια με συνέπεια την αποδόμηση τους και τον 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 άρα στη μάζα της ουσίας. Η όλη διαδικασία οδηγεί στη καταγραφή του φάσματος μάζας (mass spectrum).

6.11.4 Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV/VIS spectroscopy)

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι βασίζονται στην ικανότητα διαφόρων ουσιών να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων. Μετριέται η απορρόφηση [οπτική πυκνότητα, (absorbance, A ή Abs)] ή η διαπερατότητα (transmittance, T) του δείγματος και βάσει αυτών γίνεται η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Απεικόνιση της απορρόφησης ή της διαπερατότητας συναρτήσει του μήκους κύματος λ (nm), δίνει το φάσμα απορρόφησης που είναι χαρακτηριστικό κάθε ουσίας (Λέντζα-Ρίζου, 2000α).

6.11.5 Ανοσοδοκιμασίες (Immunoassays)

Είναι βιοτεχνολογικές μέθοδοι που γνωρίζουν αρκετή διάδοση τα τελευταία χρόνια. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων παρουσιάζει η ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Η εντατική έρευνα των τελευταίων ετών και η αλματώδης πρόοδος οδήγησε στη παραγωγή εμπορικών συστημάτων άμεσης χρήσης της μεθόδου ELISA-kits, για διάφορα φυτοφάρμακα. (Λέντζα-Ρίζου, 2000α)

6.12 Βασικοί όροι στη χρωματογραφία στήλης

Παρακάτω δίνονται ορισμένοι βασικοί χρωματογραφικοί όροι:

- **Χρόνος ανάσχεσης ή κατακράτησης (retention time) t_R** , είναι ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της εισαγωγής του δείγματος στη στήλη και της εμφάνισης του μέγιστου της κορυφής στο χρωματογράφημα.
- **Ύψος κορυφής, h** , είναι η απόσταση μεταξύ του μέγιστου της κορυφής και της γραμμής βάσης του χρωματογραφήματος.
- **Πλάτος κορυφής, w** , είναι η απόσταση μεταξύ των σημείων τομής της γραμμής βάσης και των εφαπτόμενων στα σημεία καμπής των πλευρών της κορυφής, ενός χρωματογραφήματος. Ανάλογα ορίζεται το πλάτος κορυφής στο μισό ύψος, $w_{1/2}$.

6.13 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων αποτελεί το στάδιο στο οποίο απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, εφόσον είναι απαραίτητη η ταυτοποίηση των άγνωστων χρωματογραφικών κορυφών.

➤ Ποιοτική ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο απλούστερος τρόπος αναγνώρισης μιας άγνωστης χρωματογραφικής κορυφής είναι η σύγκριση του χρόνου κατακράτησης της, (**retention time**), με τους αντίστοιχους χρόνους γνωστών προτύπων ουσιών υπό ακριβώς ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες, ή ευκολότερα με τον προσδιορισμό του σχετικού χρόνου κατακράτησής της, (**relative retention time**) ως προς μια ένωση αναφοράς, ο οποίος παρουσιάζει καλύτερη επαναληψιμότητα. Η ποιοτική ανάλυση, δηλαδή η ταυτοποίηση των συστατικών ενός μίγματος, μπορεί ακόμα να γίνει με τη **μέθοδο του ‘εμβολιασμού’(spiking)**.

➤ Ποσοτική ανάλυση

Η ποσοτική ανάλυση γίνεται συνήθως με μια από τις παρακάτω μεθόδους:

1. Με εξωτερικά πρότυπα (**external standard analysis**)

Ο προσδιορισμός μπορεί να γίνει με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων με γνωστές τιμές συγκέντρωσης, που περιέχουν αυτή του δείγματος που αναλύεται.

2. Με εσωτερικά πρότυπα (**internal standard analysis**)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη προσθήκη γνωστής ποσότητας πρότυπης ουσίας στο υπό ανάλυση δείγμα. Ορισμένη ποσότητα προτύπου προστίθεται σε συνθετικά μίγματα που περιέχουν την προς ανάλυση ουσία, σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα μίγματα αυτά χρωματογραφούνται και σχεδιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης, μεταξύ της ποσότητας της ουσίας και του λόγου των κορυφών.

Άλλοι μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού είναι : η **μέθοδος προσθήκης (standard addition)** και η **μέθοδος εσωτερικής κανονικοποίησης (internal normalization)**.

Η ταύτιση όμως των χρόνων κατακράτησης δύο ουσιών δεν εξασφαλίζει και την χημική τους ταύτιση, γιατί αρκετές ενώσεις μπορεί να παρουσιάζουν ίδιους χρόνους κατακράτησης σε συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες. Έτσι η ταυτοποίηση μιας ουσίας απαιτεί επιπλέον στοιχεία. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους:

✓ Χρησιμοποίηση διαφορετικής χρωματογραφικής μεθόδου. Σημειώνεται ότι όλες οι τεχνικές ανίχνευσης εκτός της φασματογραφίας μάζας, είναι ευαίσθητες για ένα μόνο τμήμα του μορίου. Επειδή το τμήμα αυτό μπορεί να υπάρχει στα μόρια άλλων ενώσεων ο ανιχνευτής είναι δυνατόν να δώσει λάθος αποτελέσματα. Γι' αυτό το λόγο η χρήση της φασματογραφίας μάζας (MS) αποτελεί το καλύτερο μέσο ταυτοποίησης μιας χημικής ένωσης.

✓ Προσθήκη προτύπου ουσίας αναφοράς στο δείγμα. Μια ποσότητα προτύπου ουσίας, απ' αυτή που υποψιαζόμαστε ότι περιέχει το δείγμα, προστίθεται σε αυτό σε τέτοια αναλογία, ώστε να διπλασιάζεται η ποσότητα της στο δείγμα. Στη συνέχεια το νέο δείγμα εγχύεται στο χρωματογράφο. Εάν η υπόθεση είναι σωστή θα πρέπει η αρχική ύποπτη κορυφή του δείγματος να μεγαλώσει χωρίς να αλλάζει το σχήμα της.

Για την αποφυγή σφαλμάτων, παράλληλα με την ανάλυση του κυρίως δείγματος, αναλύονται και α) ένα τυφλό δείγμα αντιδραστηρίων (reagent blank), που περιέχει μόνο τους διαλύτες και τα αντιδραστήρια και β) ένας μάρτυρας (control sample), δηλαδή δείγμα που διαπιστωμένα δεν περιέχει τη δραστική ουσία που εξετάζουμε.

6.14...Πολύ-υπολειμματικές αναλυτικές μέθοδοι

Δεν είναι λίγες οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων που έχουν επινοηθεί και χρησιμοποιούνται είτε με την αρχική τους μορφή, είτε μετά από τροποποιήσεις. Όπως προαναφέρθηκε, οποιαδήποτε μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων, ακόμα και αν χρησιμοποιείται ευρέως, πρέπει να αξιολογείται και να ελέγχεται από τον αναλυτή ή το εργαστήριο που πρόκειται να την χρησιμοποιήσει για πρώτη φορά. Επίσης πρέπει να γίνονται έλεγχοι ανάκτησης (απόδοσης) κάθε φορά που μια αναλυτική μέθοδος εφαρμόζεται για την διερεύνηση των υπολειμμάτων ενός φυτοφαρμάκου, για πρώτη φορά έτσι ώστε να ελέγχεται η καταλληλότητα της μεθόδου ως προς το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο.

Όπως επίσης προαναφέρθηκε, οι αναλυτικές μέθοδοι, διακρίνονται σε: α) *εξειδικευμένες ή μόνο –υπολειμματικές μεθόδους* (specific or single residue methods), και β) *πολυδύναμες ή πολύ-υπολειμματικές μεθόδους* που χρησιμοποιούνται κυρίως σε ελέγχους ρουτίνας.

Παρακάτω περιγράφονται περιληπτικά κάποιες από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες πολύ-υπολειμματικές μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί, με χρήση αέριας-χρωματογραφίας.

➤ Πολύ-υπολειμματική μέθοδος για οργανοφωσφορούχες ενώσεις

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε στην Ολλανδία (M.W.H.C.A., 1988), για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων της ομάδας των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Διακρίνεται σε 4 υπομεθόδους, μία για διερεύνηση υπολειμμάτων σε φρούτα και λαχανικά, μία για ιστούς ζώων, μία για το γάλα και μία για δημητριακά.

Η υπό-μέθοδος για φρούτα και λαχανικά βασίζεται στην εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, παρουσία θειικού νατρίου, και έγχυση σε αέριο-χρωματογράφο με ανιχνευτή NPD, χωρίς να προηγηθεί clean-up.

Ειδικότερα, 50gr από το δείγμα ομογενοποιούνται για 2-3 λεπτά μαζί με 100 ml ethyl acetate και 50gr θειικό νάτριο. Το εκχύλισμα φιλτράρεται και είναι έτοιμο για έγχυση στο χρωματογράφο απευθείας ή μετά από συμπύκνωση σε περιστρεφόμενο συμπυκνωτή.

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με τη βοήθεια προτύπων διαλυμάτων των υπό ανάλυση ουσιών, τα οποία αναλύονται πριν και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων.

➤ Μια άλλη αναλυτική μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε επίσης στην Ολλανδία (M.W.H.C.A., 1988), εφαρμόστηκε για την ανίχνευση πολλών φυτοπροστατευτικών ουσιών, κυρίως οργανοχλωριωμένων (aldrin, captafol, captan, chlorothalonil, DDT-complex, dicofol, endosulfan, folpet, α -HCH, β -HCH, iprodione, quintozene, propachlor, tecnazene vinclozolin κ.α., σε φρούτα και λαχανικά όπως : μήλα, αχλάδια, φράουλες, σταφύλια, ντομάτες, αγγούρια, πιπεριές, φασόλια, σπανάκι, μαρούλι και πολλά άλλα.

Η μέθοδος βασίζεται σε εκχύλιση με μίγμα από τολουόλιο και προπανόλη-2. Η προπανόλη-2 απομακρύνεται με πλύσεις με νερό (διάλυμα θειικού νατρίου), και μετά από φιλτράρισμα της οργανικής φάσης του τολουολίου οι υπό ανάλυση ουσίες ανιχνεύονται με αέριο χρωματογράφο και ανιχνευτή ECD. Συχνά απαιτείται πρόσθετη διαδικασία καθαρισμού (clean up) του εκχυλίσματος.

Στον χρωματογράφο εγχύεται ποσότητα 1-5μl του εκχυλίσματος. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με συγκρίσεις των χρόνων κατακράτησης και των υψών των κορυφών των δειγμάτων με τα αντίστοιχα των προτύπων διαλυμάτων που έχουν αναλυθεί.

➤ Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση των υπολειμμάτων του imazalil, του thiabendazole και της διφαινυλαμίνης και αποτελεί αντικείμενο της παρούσας διατριβής, περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο

Υλικά και Μέθοδοι



7.1 Γενικά

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε μήλα Ολοκληρωμένης Παραγωγής Ζαγοράς, στα οποία εφαρμόστηκε η συνήθης μετασυλλεκτική μεταχείριση της διαβροχής με διάλυμα μυκητοκτόνων (imazalil+thiabendazole) και αντιοξειδωτικού (diphenylamine) και κατόπι συντηρήθηκαν σε κοινούς θαλάμους ψύξης. Η παρακολούθηση της τύχης των υπολειμμάτων των μυκητοκτόνων και του αντιοξειδωτικού, πραγματοποιήθηκε με ελέγχους στα συντηρούμενα μήλα μετά από 31, 64, 87 και 123 ημέρες συντήρησης.

7.2 Προέλευση των μήλων

Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα προέρχονται από μηλεώνα που βρίσκεται στην περιοχή Κοτρωνάκι, σε υψόμετρο πάνω από 750 m, στην ευρύτερη περιοχή της Ζαγοράς του Πηλίου, και ήταν παραγωγής 2002. Ο οπωρώνας απαρτίζεται από υγιείς, ηλικίας περίπου 40 ετών, μέσης παραγωγικότητας μηλιές που ανήκουν στη ποικιλία Starking Delicious και είναι εμβολιασμένες σε σπορόφυτα υποκείμενα. Ως επικονιαστής χρησιμοποιείται η ποικιλία Golden Delicious. Οι καλλιεργητικές περιποιήσεις περιλαμβάνουν άρδευση (1-3 φορές το χρόνο με αυλάκια), λίπανση, κλάδεμα και εφαρμογή φυτοπροστατευτικών μεθόδων πάντα στα πλαίσια της Ολοκληρωμένης Παραγωγής. Το έδαφος της περιοχής είναι αμμοπηλώδες με pH = 5-6.

7.3 Δειγματοληψία και μετασυλλεκτικές εφαρμογές

Οι καρποί που χρησιμοποιήθηκαν στη πειραματική διαδικασία συλλέχθηκαν από 6 διαφορετικά δέντρα μηλιάς του ίδιου μηλεώνα τυχαιοποιημένα όσον αφορά τη θέση του δέντρου. Συγκομίστηκαν όλοι οι καρποί από κάθε ένα από τα 6 δέντρα. Στην συνέχεια, αφού αφαιρέθηκαν οι μικρόκαρποι και οι προβληματικοί λόγω προσβολών καρποί, έγινε ομογενοποίηση του δείγματος με ανακάτεμα όλων των καρπών από όλα τα δέντρα. Η συγκομιδή πραγματοποιήθηκε στις 23/9/02.

Τα συγκομισθέντα μήλα μεταφέρθηκαν αμέσως στις κτιριακές εγκαταστάσεις του Αγροτικού Συνεταιρισμού Ζαγοράς, όπου μοιράστηκαν τυχαία και τοποθετήθηκαν σε μικρές πλαστικές κλούβες (περίπου 45 καρποί ανά κλούβα). Στη συνέχεια οι κλούβες τοποθετήθηκαν σε συσκευή Drencher για 30 δευτερόλεπτα, όπου έγινε πλύσιμο και διαβροχή των καρπών με το διάλυμα των μυκητοκτόνων και της αντιοξειδωτικής ουσίας.

Το διάλυμα της εφαρμογής περιείχε:

- **DPA (διφαινυλαμίνη) 31%, σε δόση 4,5 L/ton.**
- **Fruit Gard (TBZ 14% β/ο, Imazalil 10% β/ο) σε δόση 4 L/ton.**

Ένα μέρος των μήλων, που χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας, δεν δέχτηκε την παραπάνω μεταχείριση. Οι καρποί του μάρτυρα δέχτηκαν μόνο πλύσιμο με κρύο νερό.

Δείγμα καρπών που δέχτηκαν την παραπάνω μεταχείριση και δείγμα καρπών του μάρτυρα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, όπου ακολούθησε μέτρηση ποιοτικών χαρακτηριστικών, προετοιμασία των αναλυτικών δειγμάτων και προσδιορισμός των υπολειμμάτων. Οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν θεωρήθηκαν σαν αρχικές συγκεντρώσεις (συγκεντρώσεις σε χρόνο 0 ημέρες).

Τα υπόλοιπα μήλα οδηγήθηκαν στον χώρο συντήρησης την ίδια μέρα.

7.4 Συντήρηση μήλων

Η συντήρηση των μήλων πραγματοποιήθηκε στους ψυκτικούς θαλάμους του Αγροτικού Συνεταιρισμού Ζαγοράς. Οι κλούβες με τα μήλα τοποθετήθηκαν σε ψυγείο κοινής ψύξης, όπου καθημερινώς εισέρχεται το 5% της χωρητικότητας του θαλάμου κατά τη συγκομιδή των παραγωγών (πρόψυξη δεν πραγματοποιείται). Οι συνθήκες συντήρησης στο ψυγείο κοινής ατμόσφαιρας για τους τέσσερις μήνες που ακολούθησαν ήταν οι εξής:

- Θερμοκρασία: $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, με θετικές τιμές κατά την διάρκεια των δύο πρώτων μηνών και αρνητικές τιμές για το υπόλοιπο της συντήρησης.
- Σχετική Υγρασία: 90-95%.

Τα πείραμα οργανώθηκε με τρεις επαναλήψεις για κάθε ημερομηνία παρατήρησης (εφαρμογής και εξόδων). Το δείγμα κάθε επανάληψης αποτελούνταν από δώδεκα μήλα..

7.5 Μέτρηση ποιοτικών χαρακτηριστικών

Μετά την έξοδό τους οι κλούβες, αλλά και τα μήλα που δεν συντηρήθηκαν (0 ημέρες), μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Δενδροκομίας. Εκεί μετρούνταν η σκληρότητα των καρπών προσδιορίζονταν τα διαλυτά στερεά συστατικά (Δ.Σ.Σ. %) και γινόταν εκτίμηση της εξωτερικής τους ποιότητας. Οι μετρήσεις των ποιοτικών χαρακτηριστικών των καρπών

και η προετοιμασία των αναλυτικών δειγμάτων της 1ης, 2ης, και 4ης εξόδου. έγινε την επόμενη μέρα από τη έξοδο, ενώ της 3ης, την ίδια μέρα.

Για την μέτρηση της σκληρότητας ως αντίσταση της σάρκας στην πίεση χρησιμοποιήθηκε πιεσόμετρο τύπου Effegi (Εικόνα 13). Σε κάθε καρπό έγιναν δυο μετρήσεις, περιμετρικά σε ίσες περίπου αποστάσεις (αφού προηγουμένως είχε αφαιρεθεί ο φλοιός επιφανειακά) στον ισημερινό του καρπού. Η τελική τιμή της αντίστασης πίεσης του καρπού (Kg) προέκυπτε από τον μέσο όρο των δύο μετρήσεων.



Εικ.13. Πιεσόμετρο

Οι μετρήσεις της σκληρότητας της σάρκας έγιναν με δέκα επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση σε κάθε έξοδο.

Προσδιορισμός των διαλυτών στερεών συστατικών (Δ.Σ.Σ. %) έγινε στους καρπούς που δεν συντηρήθηκαν (0 ημέρες), στους καρπούς της πρώτης εξόδου (32 ημέρες μετά τη συγκομιδή) και στους καρπούς της τρίτης εξόδου (87 ημέρες μετά τη συγκομιδή). Για την μέτρηση των Δ.Σ.Σ. έγινε χρήση φορητού διαθλασίμετρου ATAGO (Εικόνα 14) με τοποθέτηση



Εικ.14. Φορητό διαθλασίμετρο

μιας σταγόνας χυμού στη γυάλινη πλάκα του οργάνου. Οι μετρήσεις των Δ.Σ.Σ. έγιναν με τρεις επαναλήψεις για κάθε μεταχείριση σε κάθε έξοδο.

Η εξωτερική ποιότητα των καρπών εκτιμήθηκε ως προς την ζημιά του φλοιού από σήψεις ή τυχόν άλλες καταπονήσεις. Δεν παρατηρήθηκαν μειονεκτήματα στον φλοιό των καρπών (καφέτιασμα, κατάρρευση, προσβολές από μύκητες κ.λ.π.) σε καμία μεταχείριση και σε καμία έξοδο.

7.6 Προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση υπολειμμάτων

Στη συνέχεια έγινε η προετοιμασία των δειγμάτων με την μείωση του αρχικού δείγματος, την ομογενοποίησή του και τη λήψη των αναλυτικών δειγμάτων, τα οποία αναλύονταν για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων εντός δύο ημερών στο Εργαστήριο Χημείας του Τμήματος Γεωπονίας.

Κάθε μήλο κόπηκε σε 4 τεταρτημόρια και τα δύο αντιδιαμετρικά τεταρτημόρια ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια οικιακών ομογενοποιητών (blenders).

Η ομογενοποίηση έγινε με εξαιρετική προσοχή με συνεχόμενη ανάδευση του δείγματος. Μέρος του ομογενοποιημένου δείγματος (50gr) μεταφέρθηκε σε ειδικό σακουλάκι (αναλυτικό δείγμα) όπου αναγράφηκαν τα στοιχεία του δείγματος.

Πραγματοποιήθηκαν με την παραπάνω διαδικασία πέντε αναλυτικά δείγματα για κάθε χοντρικό δείγμα (δηλαδή για κάθε επανάληψη). Από αυτά τα τρία αναλύθηκαν την ίδια ημέρα , ενώ τα υπόλοιπα αναλυτικά δείγματα αποθηκεύονταν σε καταψύκτη στους -20°C για επανάληψη των μετρήσεων, όπου τυχόν χρειαζόταν.

7.7 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην χημική κατεργασία των δειγμάτων είναι τα εξής:

➤ **Διαλύτες:** Ακετόνη (Acetone) / Pestigrade

Διχλωρομεθάνιο (Dichloromethane) / Pestigrade

Πετρελαϊκός αιθέρας (Petroleum ether) / Pestigrade

Οξικό αιθυλεστέρας (Ethyl acetate) / Pestigrade

Τολουόλιο (Toluene) / Pestigrade

Ισο-οκτάνιο (Trimethyl Pentane) / Pestigrade



➤ **Ξηραντικό:** Άνυδρο Θεικό νάτριο

➤ **Πρότυπες ουσίες:** Imazalil, Thiabendazole και Diphenylamine καθαρότητας >99,7%.

➤ **Πρότυπα διαλύματα (πυκνά) :** Αρχικά παρασκευάστηκαν πυκνά πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1000ppm του Thiabendazole, 500ppm του Imazalil και 485ppm της Diphenylamine σε ακετόνη. Από τα πυκνά πρότυπα διαλύματα, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των παραπάνω ουσιών συγκέντρωσης 50ppm με κατάλληλη αραιώση.

➤ **Μικτά πρότυπα διαλύματα:** Παρασκευάστηκαν δύο μικτά πρότυπα διαλύματα των Imazalil, Thiabendazole και Diphenylamine συγκέντρωσης 50ppm, ένα σε ακετόνη και άλλο ένα σε οξικό αιθυλεστέρα. Το μικτό πρότυπο διάλυμα των 50ppm σε ακετόνη καθώς και άλλα μικρότερης συγκέντρωσης, που παρασκευάστηκαν με αραιώσεις διαλύματα, χρησιμοποιήθηκαν για τις τεχνητές φορτίσεις του υποστρώματος στον έλεγχο της ανάκτησης.

➤ **Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης:** Από το μικτό διάλυμα των 50ppm σε οξικό αιθυλεστέρα παρασκευάστηκαν μικτά πρότυπα διάλυμα των Imazalil, Thiabendazole και Diphenylamine συγκέντρωσης 10, 5.0, 2.5, 1.1 και 0.5 ppm σε οξικό αιθυλεστέρα και σε

ισοοκτάνιο με κατάλληλες αραιώσεις, για να χρησιμοποιηθούν στον έλεγχο της γραμμικότητας και την ποσοτικοποίηση της απόκρισης του ανιχνευτή.

- **Πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης σε εκχύλισμα:** Παρασκευάστηκαν μικτά πρότυπα διάλυμα των Imazalil, Thiabendazole και Diphenylamine σε εκχύλισμα υποστρώματος μήλων μάρτυρα.

7.8 Εκχύλιση

A) Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα

Αρχικά ζυγίστηκαν με ακρίβεια 25gr ομογενοποιημένου δείγματος μέσα σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκαν 50 ml οξικού αιθυλεστέρα και κατόπιν προστέθηκαν 25g άνυδρου θεικού νατρίου και αναδεύτηκαν με γυάλινη ράβδο. Το μείγμα ομοιογενοποιήθηκε σε ομοιογενοποιητή τύπου Ultra Turrax (Εικόνα 13) στις 6000 rpm, για 3 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε δια μέσου διηθητικού χαρτιού που περιείχε και λίγο άνυδρο θεικό νάτριο και συλλέχτηκε το διηθημα.

Στη συνέχεια ποσότητα από το διηθημένο εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο και οδηγήθηκε προς έκχυση στον αέριο χρωματογράφο.

B) Εκχύλιση με ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα

Αρχικά ζυγίστηκαν με ακρίβεια 7,5 gr ομογενοποιημένου δείγματος μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρησης και προστέθηκαν 15 mL ακετόνης. Το μείγμα ομογενοποιήθηκε σε ομοιογενοποιητή Ultra Turrax (Εικόνα 13) στις 6000 rpm, για 1 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν στο μίγμα 15 mL διχλωρομεθάνιο και ακολούθησε ομογενοποίηση για 1 min. Τέλος στο μίγμα προστέθηκαν 15 mL πετρελαϊκού αιθέρα και η εκχύλιση συνεχίστηκε για ακόμα 1 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 2min στις 4000 rpm. Στη συνέχεια 25 mL από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκαν μέχρι



Εικ.13. Ultra Turrax

ξηρού σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα με μειωμένη πίεση, σε θερμοκρασία 40°C. Το ξηρό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 5 mL οξικού αιθυλεστέρα και ποσότητα του διαλύματος μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο προς έκχυση στον αέριο χρωματογράφο.

7.9 Χρωματογραφική ανάλυση

Για την ανάλυση των υπολειμμάτων Imazalil, Thiabendazole και Diphenylamine στα εκχυλίσματα των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας τύπου Hewlett-Packard 6890 (Εικόνα 14) με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD) και τριχοειδή χρωματογραφική στήλη (25 m x 0,33 mm i.d.) τύπου BPX 35, στην οποία συνδέθηκε προστήλη (γυάλινη τριχοειδή στήλη χωρίς στατική φάση) μήκους 2m.



Εικ. 14. HP 6890-GC system

Για την ταυτοποίηση των κορυφών χρησιμοποιήθηκαν επίσης οι παρακάτω στήλες διαφορετικής πολικότητας : τριχοειδής στήλη (30 m x 0,52 mm i.d.) τύπου BP-5 και τριχοειδής στήλη (30 m x 0,52 mm i.d.) τύπου HP- 1701 με τις ανάλογες προστήλες (2m x 0,32mm i.d.).

Η καταγραφή και επεξεργασία του χρωματογραφικού σήματος έγινε σε Η./Υ με το πρόγραμμα Chem Station της Hewlett-Packard.

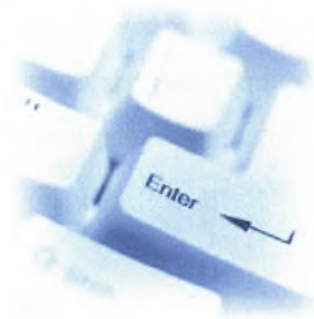
Οι συνθήκες λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου ήταν οι εξής:

- Εισαγωγέας split-splitless, σε κατάσταση pulsed splitless (40psi για 60s)
- Θερμοκρασία εισαγωγέα 240 °C,
- Όγκος έγχυσης δείγματος 2μl,
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα φούρνου:
 - Αρχική θερμοκρασία φούρνου 80°C (διατήρησή της για 2 min.),
 - Αύξηση με ρυθμό 12°C/min. μέχρι τους 220 °C,
 - Αύξηση με ρυθμό 6°C/min μέχρι τους 280°C, διατήρησή της στους 280°C για 4min,
 - Αύξηση με ρυθμό 20°C/min μέχρι τους 290°C, (διατήρησή της στους 290°C για 7min),
 - Συνολικός χρόνος ανάλυσης 35 min. Ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου (NPD)
- Θερμοκρασία ανιχνευτή 310°C,
- Καύσιμα ανιχνευτή: Αέρας 60mL/min, Υδρογόνο 3mL/min και ήλιο για makeup 10mL/min
- Φέρον αέριο, ήλιο

Για τις δοκιμές χρωματογραφικής έκχυσης χρησιμοποιήθηκε και ο εισαγωγέας on column σε θερμοκρασία ίδια με την αρχική θερμοκρασία του φούρνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο

Αποτελέσματα



8.1 Γενικά

Η προσέγγιση της επιλογής των σταδίων της αναλυτικής μεθόδου έγινε με το σκεπτικό της ανάπτυξης μίας μεθόδου σχετικά απλής που να μπορεί εύκολα και γρήγορα να εφαρμοσθεί στο εργαστήριο. Επιπλέον, να μπορεί η ίδια μέθοδος να εφαρμοσθεί για τον προσδιορισμό και άλλων φυτοπροστατευτικών ουσιών, που χρησιμοποιούνται προσυλλεκτικά στην μηλοκαλλιέργεια, ώστε να έχει ένα πολυδύναμο χαρακτήρα.

Η ανάλυση και ο προσδιορισμός των μετασυλλεκτικά εφαρμοζόμενων φυτοπροστατευτικών προϊόντων βασίστηκε στην τεχνική της αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (GC-NPD).

Αρχικά έγινε η επιλογή χρωματογραφικών συνθηκών ανάλυσης για την επίτευξη καλού χρωματογραφικού διαχωρισμού και ευαισθησίας του ανιχνευτή στις προς ανάλυση ουσίες. Επίσης δοκιμάστηκαν διάφορα χρωματογραφικά συστήματα, ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ευρημάτων με τη μέθοδο των δοκιμών σε διαφορετικά χρωματογραφικά συστήματα.

Όσον αφορά το στάδιο της εκχύλισης, δοκιμάστηκε αρχικά η εκχύλιση που χρησιμοποιείται γενικά για ουσίες που είναι ευαίσθητες στον ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD) και η οποία είναι δοκιμασμένη για πολλά οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Η εκχύλιση αυτή εφαρμόζεται με ομοιογενοποίηση του δείγματος με οξικό αιθυλεστέρα παρουσία θειικού νατρίου.

Σε δεύτερο στάδιο δοκιμάστηκε η εκχύλιση η οποία εφαρμόζεται σε πολλά φυτικά προϊόντα και περιλαμβάνει μια διαδικασία εκχύλισης με τρεις διαλύτες, δηλαδή ακετόνης, διχλωρομεθανίου και πετρελαϊκού αιθέρα.

Στο τελευταίο στάδιο ελέγχθηκαν οι μέθοδοι ως προς την ανάκτηση, την επαναληψιμότητα και την ευαισθησία τους για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων σε μήλα με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου.

8.2 Επιλογή Χρωματογραφικών συνθηκών διαχωρισμού και ανάλυσης

Δοκιμάστηκαν διάφορα χρωματογραφικά συστήματα έγχυσης, όπως έγχυση σε εισαγωγή *on column*, ή σε εισαγωγή *split-splitless*, με ενέσεις προτύπων διαλυμάτων σε διαλύτη. Επίσης δοκιμάστηκε η ανάλυση των ουσιών σε διάφορες τριχοειδείς στήλες με διαφορετική πολικότητα, όπως τριχοειδή στήλη σχεδόν άπολη με 5% μεθυλοπολυσιλοξάνιο (τύπος HP-5), στήλες μικρής – μέσης πολικότητας, όπως HP-1701 και BPX-35, οι οποίες πολύ συχνά χρησιμοποιούνται στην ανάλυση φυτοπροστατευτικών προϊόντων που αποκρίνονται σε ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου.

α) Δοκιμές σε εισαγωγή τύπου *on column*.

Το συγκεκριμένο σύστημα έγχυσης έχει το πλεονέκτημα ότι οι ουσίες αποτίθενται απευθείας στην κορυφή της στήλης σε χαμηλή θερμοκρασία και δεν υφίστανται το θερμοκρασιακό σοκ της αεριοποίησής τους όπως συμβαίνει στον εισαγωγή *split-splitless*. Επειδή το thiabendazole πρώτιστα, αλλά και το imazalil έχουν αυτά τα χαρακτηριστικά δοκιμάστηκε αυτός ο τύπος της έγχυσης.

Η ανάλυση προτύπων διαλυμάτων σε διαλύτη είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα, αλλά η ανάλυση προτύπων διαλυμάτων σε εκχύλισμα υποστρώματος έδειξε ότι μετά την πραγματοποίηση μικρού αριθμού ενέσεων συνέβαινε παραμόρφωση των κορυφών, ιδιαίτερα του imazalil και του thiabendazole. Αυτό συνέβαινε γιατί παρέμεναν στερεά υπολείμματα στην κορυφή της στήλης και επιδρούσαν αρνητικά στην χρωματογραφική ανάλυση.

Τέτοιου είδους προβλήματα είναι γνωστά στις απευθείας εγχύσεις στην κορυφή της στήλης και αντιμετωπίζονται με την αφαίρεση μικρού μέρους της προστήλης κάθε φορά. Επειδή το πρόβλημα αυτό παρουσιαζόταν μετά την έκχυση 5-6 διαλυμάτων εκχυλίσματος θεωρήθηκε ότι δεν ήταν δυνατό να στηριχτεί η αναπτυσσόμενη μέθοδος σε έκχυση *on column* και εγκαταλείφτηκε.

β) Δοκιμές σε εισαγωγή τύπου *split-splitless*.

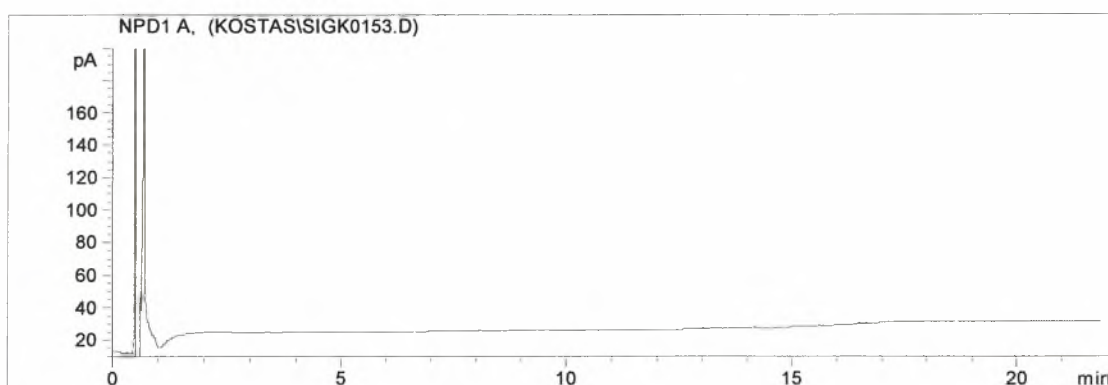
Ακολούθως δοκιμάστηκε η έγχυση σε εισαγωγή τύπου *split-splitless*, με τον οποίο το δείγμα αεριοποιείται και εισάγεται στην στήλη. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά καθώς χρησιμοποιήθηκε η τεχνική *pulsed-splitless* σύμφωνα με την οποία η εξαέρωση και η εισαγωγή του δείγματος γίνεται σε μεγαλύτερη πίεση εισαγωγής και ταχύτερα, έτσι ώστε να μην αλλοιώνονται ή καταστρέφονται τα θερμικά ευαίσθητα μόρια. Σαν θερμοκρασία του εισαγωγέα επιλέχτηκε η θερμοκρασία των 240°C.

γ) Χρωματογραφικός διαχωρισμός.

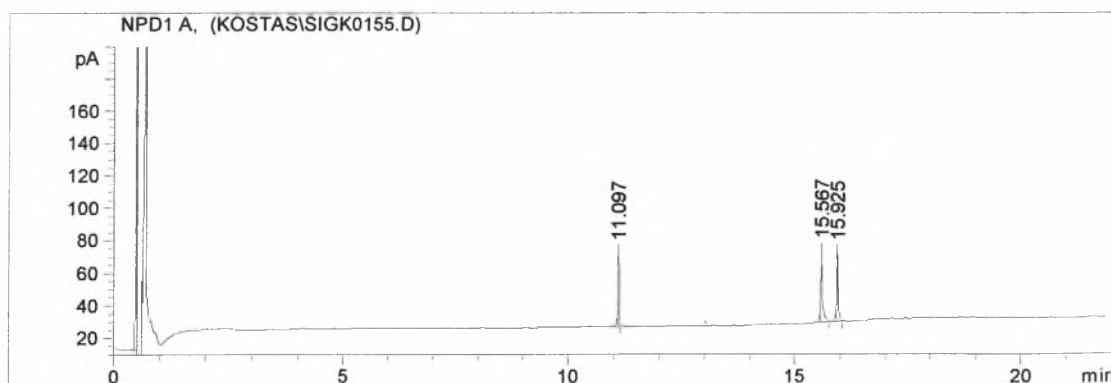
Οι δοκιμές έγιναν σε τρεις διαφορετικές χρωματογραφικές τριχοειδείς στήλες διαφορετικής πολικότητας. Έγιναν ενέσεις, προτύπων διαλυμάτων σε διαλύτη, σε εκχύλισμα υποστρώματος μάρτυρα καθώς και ενέσεις εκχυλίσματος μάρτυρα για τον έλεγχο των παρεμποδίσεων στους χρόνους κατακράτησης των προς ανάλυση ουσιών.

Στο **Σχήμα 4** παρουσιάζονται χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων μάρτυρα και φορτισμένου ιστού από όπου φαίνεται η απουσία παρεμποδίσεων και ο καλός διαχωρισμός των προς ανάλυση ουσιών .

α)



β)



Σχήμα 4: Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων: (α) μάρτυρα και (β) φορτισμένου ιστού σε επίπεδο 3mg/kg, κατόπιν εκχύλισης με τρεις διαλύτες και συμπύκνωση σε τελικό διαλύτη τριμεθυλοπεντάνιο/τολουόλιο (9:1).

Οι χρόνοι κατακράτησης (t_R) που αντιστοιχούν στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι οι ακόλουθοι: 11,1 (diphenylamine), 15,5 (thiabendazole) και 15,9 (imazalil).

Η ανάλυση έγινε σε χρωματογραφική στήλη HP-1701 με θερμοκρασιακό πρόγραμμα 80 °C (1 min), 10 °C/min at 270 °C (3 min) και με έκχυση με την τεχνική pulsed splitless σε εισαγωγή 260 °C.

Τα καλλίτερα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά παρουσιάστηκαν στις στήλες HP-1701 και BPX-35 (Σχήματα 4 & 7).

8.3 Επιλογή μεθόδου εκχύλισης

8.3.1 Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα

Οι δοκιμές εκχύλισης έγιναν με τεχνητές φορτίσεις υποστρώματος μάρτυρα σε επίπεδα 0,5, 1,0, 2.5, και 5.0 mg/kg νωπού ιστού. Η αξιολόγηση των ανακτήσεων έγινε με βάση την απόκριση και την επιφάνεια των κορυφών σε σχέση με την επιφάνεια των κορυφών προτύπων διαλυμάτων των ουσιών αυτών.

Τα επίπεδα φορτίσεων καθορίστηκαν με βάση τα MRLs που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για τα μήλα, τα οποία είναι 5mg/kg για τη diphenylamine το thiabendazole και το Imazalil. Επίσης, τα επίπεδα φορτίσεων καλύπτουν το εύρος των τιμών των συγκεντρώσεων που μετρήθηκαν στο πείραμα μας.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ανακτήσεων και της επαναληψιμότητας της μεθόδου με εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, συμπύκνωση και έκχυση του εκχυλίσματος στον χρωματογράφο. Οι τιμές είναι μέσοι όροι από τρεις επαναλήψεις.

	Φόρτιση σε επίπεδο 5,0 mg/kg		Φόρτιση σε επίπεδο 2,5 mg/kg	
	Ανάκτηση %	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %	Ανάκτηση %	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %
Diphenylamine	91	10	87	12
Imazalil	87	8	84	6
Thiabendazole	84	11	85	10

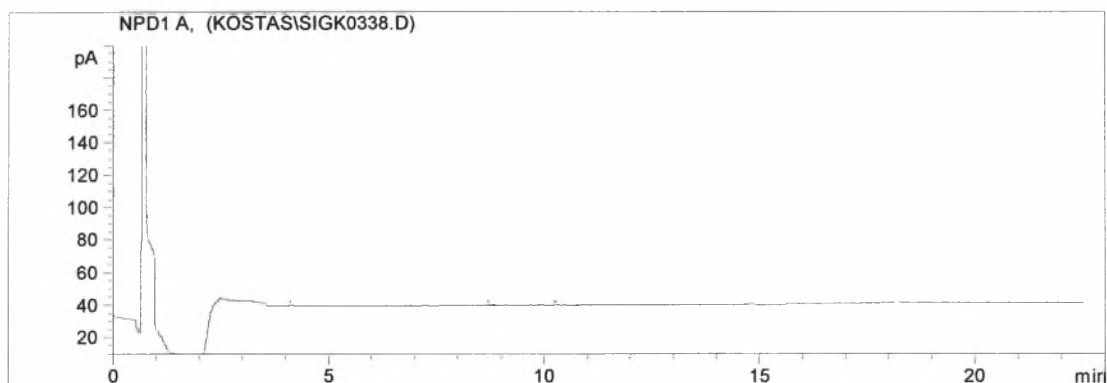
	Φόρτιση σε επίπεδο 0,5 mg/kg		Φόρτιση σε επίπεδο 1,0 mg/kg	
	Ανάκτηση %	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %	Ανάκτηση %	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %
Diphenylamine	92	9	92	11
Imazalil	92	7	86	9
Thiabendazole	90	10	87	6

Πίνακας 3. Αποτελέσματα ανάκτησης και σχετικής τυπικής απόκλισης, για τρεις επαναλήψεις, από την ανάλυση φορτισμένου, σε διάφορα επίπεδα, ιστού μήλου κατόπιν εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα και χρωματογραφικού προσδιορισμού.

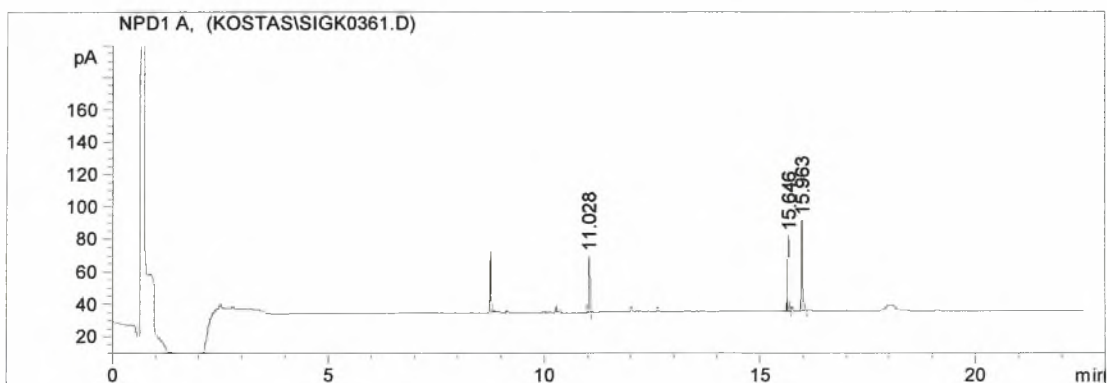
Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα η ακρίβεια της μεθόδου είναι ικανοποιητική για αναλύσεις υπολειμμάτων, καθώς οι τιμές των ανακτήσεων (μέση τιμή για τρεις επαναλήψεις) για τις προς μελέτη ουσίες είναι εντός της περιοχής 70-110% που θεωρούνται αποδεκτές, ενώ η επαναληψιμότητά παρουσιάζεται επίσης ικανοποιητική, καθώς η σχετική τυπική απόκλιση (για τρεις επαναλήψεις) κυμαίνεται από 6% έως 12%.

Στο **Σχήμα 5** παρουσιάζονται χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων μάρτυρα, προτύπου διαλύματος σε εκχύλισμα και εκχυλίσματος φορτισμένου ιστού κατόπιν εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα και χρωματογραφικής ανάλυσης του εκχυλίσματος.

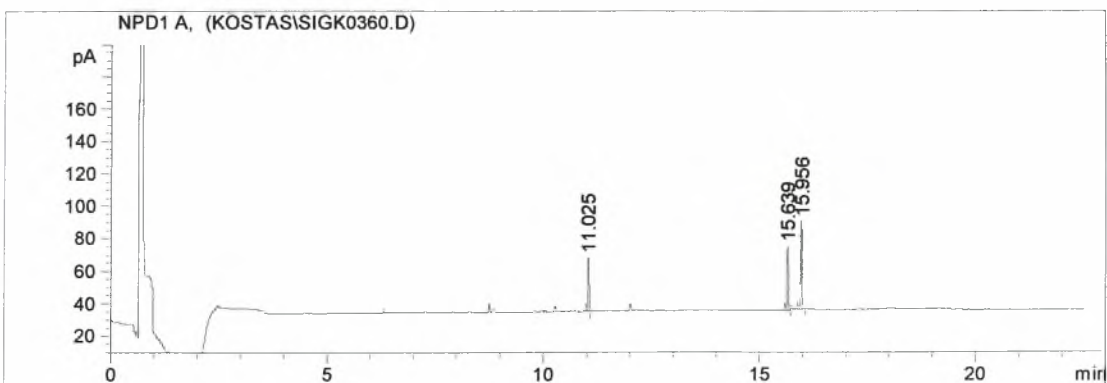
α)



β)



γ)



Σχήμα 5: Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων μάρτυρα (α), προτύπου διαλύματος σε εκχύλιση συγκέντρωσης 1,0 mg/kg με τελικό διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (β) και εκχυλίσματος φορτισμένου, σε επίπεδο 1,0 mg/kg, ιστού κατόπιν εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα και συμπύκνωση σε τελικό διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. (γ).

Η ανάλυση έγινε σε χρωματογραφική στήλη BPX-35 με θερμοκρασιακό πρόγραμμα 80°C (2 min), 10°C/min at 280°C και με έκχυση με την τεχνική pulsed splitless.

8.3.2 Εκχύλιση με ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα

Οι δοκιμές εκχύλισης με τρεις διαλύτες έγιναν με τεχνητές φορτίσεις υποστρώματος μάρτυρα σε επίπεδα 0,5, 1,0, 2.5, και 5.0 mg/kg νωπού ιστού. Η αξιολόγηση των ανακτήσεων έγινε με βάση την απόκριση και την επιφάνεια των κορυφών σε σχέση με την επιφάνεια των κορυφών προτύπων διαλυμάτων των ουσιών αυτών.

Τα επίπεδα φορτίσεων καθορίστηκαν όπως και προηγουμένως με βάση τις αυστηρότερες τιμές των MRLs διαφόρων Ευρωπαϊκών χωρών, τα οποία είναι 3mg/kg για τη diphenylamine και το thiabendazole και 5,0 mg/kg για το Imazalil. Επίσης, τα επίπεδα φορτίσεων καλύπτουν το εύρος των τιμών των συγκεντρώσεων που μετρήθηκαν στο πείραμα μας. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου ανάλυσης μήλου με εκχύλιση με τρεις διαλύτες, συμπύκνωση του εκχυλίσματος, παραλαβής του σε οξικό αιθυλεστέρα και χρωματογραφικό προσδιορισμό των diphenylamine, thiabendazole και imazalil.

	Φόρτιση σε επίπεδο 0,5 mg/kg		Φόρτιση σε επίπεδο 1,0 mg/kg	
	Ανάκτηση %	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %	Ανάκτηση %	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %
Diphenylamine	94	5	98	5
Imazalil	88	7	91	8
Thiabendazole	89	5	102	8

	Φόρτιση σε επίπεδο 2,5 mg/kg		Φόρτιση σε επίπεδο 5,0 mg/kg	
	Ανάκτηση %	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %	Ανάκτηση %	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD) %
Diphenylamine	90	12	89	4
Imazalil	96	10	91	8
Thiabendazole	88	8	84	5

Πίνακας 4. Αποτελέσματα ανάκτησης και σχετικής τυπικής απόκλισης, για τρεις επαναλήψεις, από την ανάλυση φορτισμένων, σε διάφορα επίπεδα, ιστού μήλου κατόπιν εκχύλισης με τρεις διαλύτες και συμπύκνωσης σε οξικό αιθυλεστέρα.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα τόσο οι τιμές των ανακτήσεων όσο και αυτές της σχετικής τυπικής απόκλισης βρίσκονται μέσα στα όρια που τίθενται για αναλύσεις υπολειμμάτων.

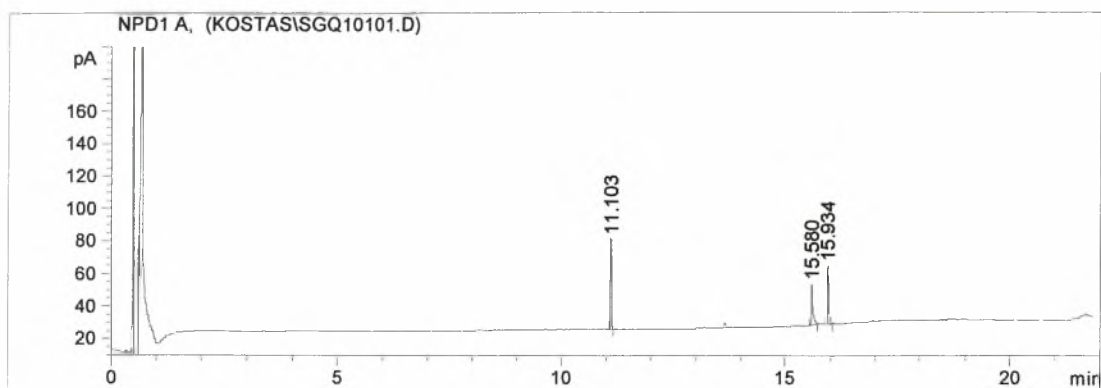
Στο **Σχήμα 6** παρουσιάζονται χρωματογραφήματα φορτισμένου ιστού, καθώς και προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 2,5 mg/kg σε εκχύλισμα με τελικό διαλύτη τριμεθυλοπεντάνιο/τολουόλιο (9:1) και οξικό αιθυλεστέρα.

Όπως φαίνεται στα 6(β) και 6(γ) η απόκριση του χρωματογραφικού ανιχνευτή σε κάθε κορυφή εξαρτάται για τις ουσίες Thiabendazole και Imazalil από τον τελικό διαλύτη, ενώ δεν διαφοροποιείται καθόλου για την ουσία Diphenylamine. Για το λόγο αυτό, καθώς η απόκριση είναι υψηλότερη όταν τελικός διαλύτης έγχυσης είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, επιλέχθηκε η αλλαγή του τελικού διαλύτη από τριμεθυλοπεντάνιο/τολουόλιο (9:1) σε οξικό αιθυλεστέρα, ώστε να επιτυγχάνονται χαμηλότερα όρια ανίχνευσης των Thiabendazole και Imazalil.

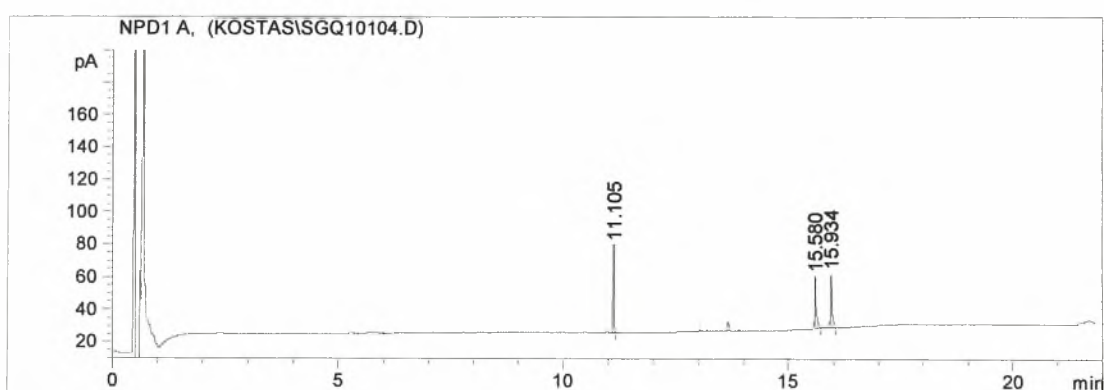
Η μέθοδος αυτή ανάλυσης μήλου δοκιμάστηκε και για τον προσδιορισμό και άλλων φυτοπροστατευτικών ουσιών που κυρίως χρησιμοποιούνται στην περιοχή Ζαγοράς κατά την τελευταία περίοδο πριν τη συγκομιδή των καρπών, όπως τα εντομοκτόνα chlorpyrifos ethyl (Reldan), quinalphos (Ecalux) και phosalone (Zolone).

Στο **Σχήμα 7** παρουσιάζονται χρωματογραφήματα εκχυλίσματος μάρτυρα, προτύπου διαλύματος σε εκχύλισμα και εκχυλίσματος φορτισμένου ιστού, κατόπιν εκχύλισης με ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα και συμπύκνωση σε τελικό διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα, όπου φαίνεται η επέκταση της μεθόδου ανάλυσης μήλου και στον προσδιορισμό και ορισμένων συχνά χρησιμοποιούμενων προσυλλεκτικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

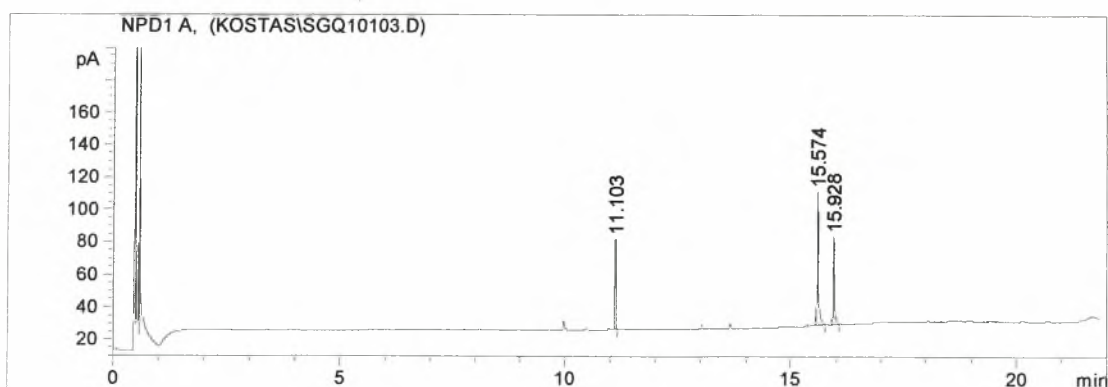
α)



β)

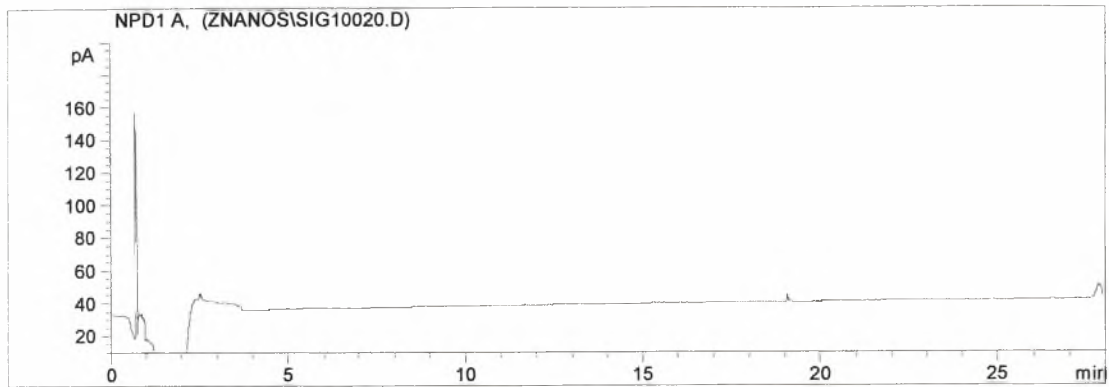


γ)

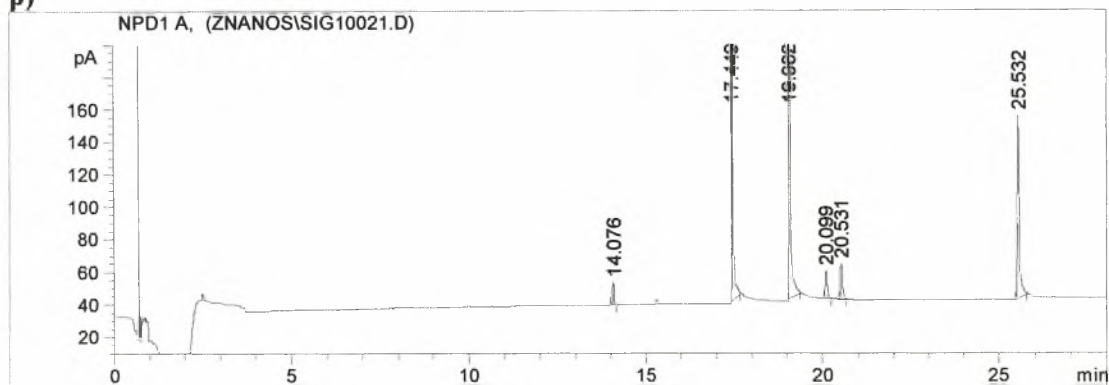


Σχήμα 6: Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων φορτισμένου ιστού σε επίπεδο 3 mg/kg (αντιστοιχεί σε συγκέντρωση τελικού διαλύματος 2,5 mg/kg) (α), προτύπου διαλύματος σε εκχύλιμα συγκέντρωσης 2,5 mg/kg με τελικό διαλύτη τριμεθυλοπεντάνιο/τολουόλιο (9:1) (β), και με τελικό διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (γ). Η εκχύλιση και η χρωματογραφική ανάλυση έγιναν με τις συνθήκες που περιγράφονται στο σχήμα 4.

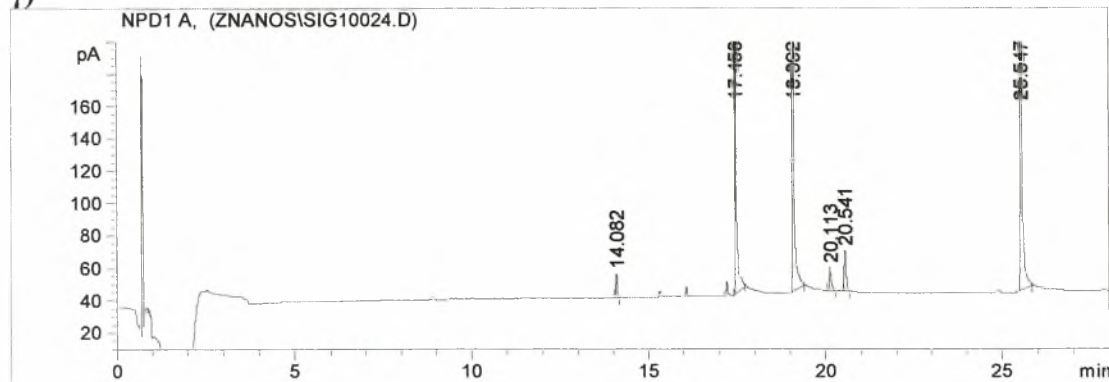
α)



β)



γ)



Σχήμα 7: Χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων μάρτυρα (α), προτύπου διαλύματος σε εκχύλισμα συγκέντρωσης 1,0 mg/kg (β) και εκχυλίσματος φορτισμένου, σε επίπεδο 1,0 mg/kg, ιστού κατόπιν εκχύλισης με ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα και συμπύκνωση σε τελικό διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (γ).

Οι χρόνοι κατακράτησης (t_R) αντιστοιχούν στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ως ακολούθως 14,1 (*diphenylamine*), 17,5 (*chlorpyrifos ethyl*), 19,1 (*quinalphos*), 20,1 (*thiabendazole*), 20,5 (*imazalil*) και 25,5 (*phosalone*).

Η ανάλυση έγινε σε χρωματογραφική στήλη BPX-35 με θερμοκρασιακό πρόγραμμα 80 °C (2 min.), 12 °C/min at 220 °C, 6 °C/min at 280 °C (4min), 20 °C/min at 290 °C (5 min) και με έκχυση με την τεχνική *pulsed splitless* σε εισαγωγή 240 °C.

8.4 Ποσοτικοποίηση

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των diphenylamine, thiabendazole και imazalil πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας την τεχνική του εξωτερικού προτύπου, χρησιμοποιώντας τη καμπύλη αναφοράς η οποία κατασκευάστηκε με μικτά πρότυπα διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων, συγκεκριμένα 0,5 – 1,0 – 2,5 – 5,0 και 10,0 mg/L.

Οι καμπύλες αναφοράς των Diphenylamine, Thiabendazole και Imazalil παρουσιάζονται στη συνέχεια (σχήματα 8, 9 και 10).

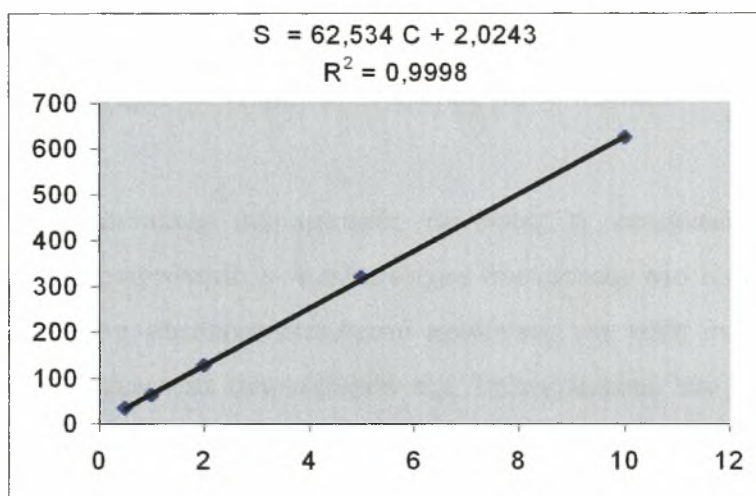
Κάθε καμπύλη αναφοράς περιγράφεται από την εξίσωση $S = k_a C + k_b$.

Όπου: ♦ S: η επιφάνεια της κορυφής της ουσίας στο χρωματογράφημα.

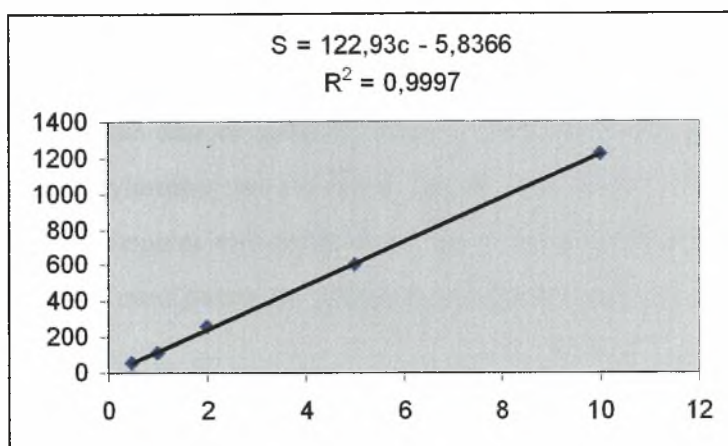
♦ C: η συγκέντρωση της ουσίας στα πρότυπα διαλύματα.

♦ k_a, k_b : σταθερές.

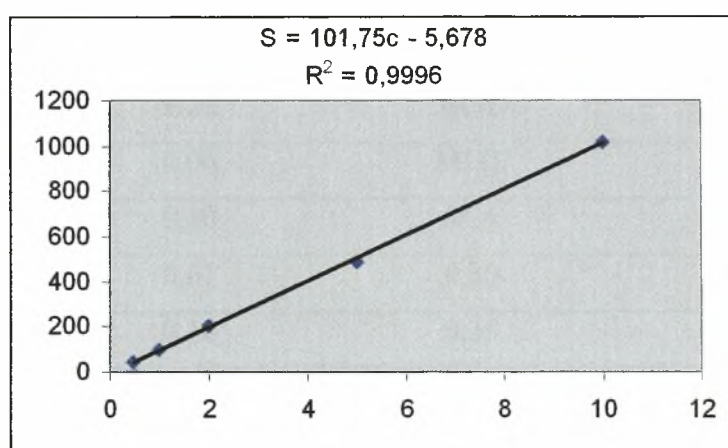
Οι εξισώσεις των ευθειών και οι αντίστοιχοι συντελεστές συσχέτισης που προέκυψαν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρατίθενται στα σχήματα 8, 9 και 10. Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης (correlation coefficient) είναι μεγαλύτερες του 0,99, θεωρούνται πολύ καλές και επιβεβαιώνουν τη γραμμικότητα του σήματος του ανιχνευτή στη περιοχή συγκρίσεων που εργαστήκαμε.



Σχήμα 8: Καμπύλη αναφοράς για τη diphenylamine.



Σχήμα 9: Καμπύλη αναφοράς για το thiabendazole



Σχήμα 10: Καμπύλη αναφοράς για το imazalil

Κάτω από καθορισμένες πειραματικές συνθήκες η επιφάνεια (εμβαδόν) των κορυφών είναι μέτρο της ποσότητας των αντιστοίχων συστατικών στο εξεταζόμενο δείγμα. Έτσι η συγκέντρωση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος για κάθε αναλυόμενο δείγμα υπολογίστηκε από την επιφάνεια των κορυφών της diphenylamine, του thiabendazole και του imazalil στα χρωματογραφήματα, χρησιμοποιώντας παράλληλα την καμπύλη αναφοράς. Οι συγκεντρώσεις των παραπάνω ουσιών στα μήλα εκφράζονται τελικά σε μg δ.ο. / kg νωπού ιστού (ppm w/w).

Σαν **όρια προσδιορισμού** (Limit of Quantification, LOQ) της μεθόδου, συντηρητικά υπολογιζόμενα με βάση ότι η σχέση σήματος προς θόρυβο ισούται με 10, θεωρήθηκαν τα 0,05 mg/kg για τη diphenylamine, τα 0,25 mg/kg για το thiabendazole και τα 0,25 mg/kg για το imazalil.

8.5 Μετρήσεις υπολειμμάτων από μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις σε μήλα εμπορίου.

Κατά το χρονικό διάστημα Μαρτίου-Απριλίου 2002 αναλύθηκαν δείγματα μήλων ποικιλίας Starking Delicious από το εμπόριο, διαφορετικής προέλευσης, για προσδιορισμό υπολειμμάτων της diphenylamine, του thiabendazole και του imazalil από μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5., και στο Σχήμα 11 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα από τις αναλύσεις μερικών δειγμάτων.

Δείγμα εμπορίου	Diphenylamine mg/kg	Thiabendazole mg/kg	Imazalil mg/kg
Δ -1	0,12	M.Π.	M.Π.
Δ - 2	0,32	0,28	0,37
Δ - 3	M.Π.	M.A.	M.A.
Δ - 4	0,06	M. Π.	M.Π.
Δ - 5	0,10	M.A	M.A.
Δ - 6	0,61	0,30	0,33
Δ - 7	0,18	0,35	0,34
Δ - 8	M. Π.	M.Π.	M.A.
Δ - 9	0,85	0,29	0,35
Δ - 10	0,29	0,30	0,44

Πίνακας 5: Υπολείμματα diphenylamine, thiabendazole και imazalil σε μήλα Starking Delicious του εμπορίου κατά την περίοδο Μαρτίου-Απριλίου 2002.

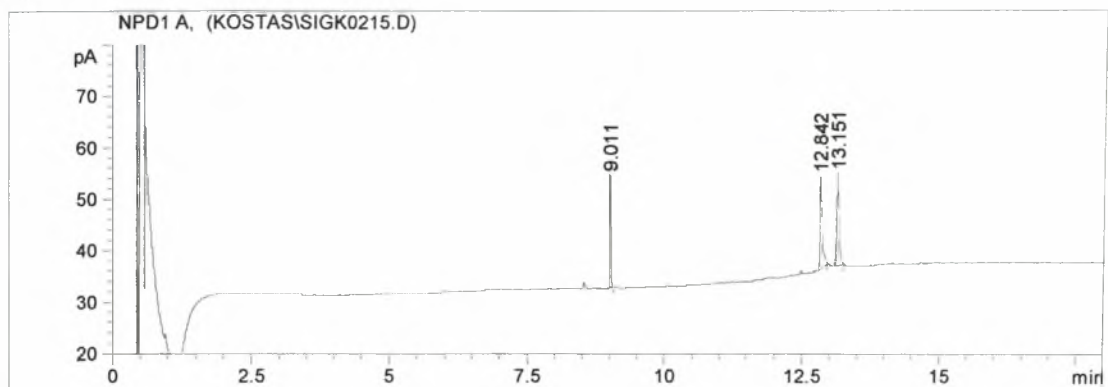
M.Π.: μη προσδιορίσιμα ή < LOQ, & M.A. : μη ανιχνεύσιμα ή < L.O.D.

Από τα δέκα δείγματα προσδιορίστηκαν υπολείμματα thiabendazole και imazalil σε πέντε δείγματα (50% των δειγμάτων), με συγκεντρώσεις αρκετά παρόμοιες καθώς περιέχονται μεταξύ 0,28 και 0,44 mg/kg.

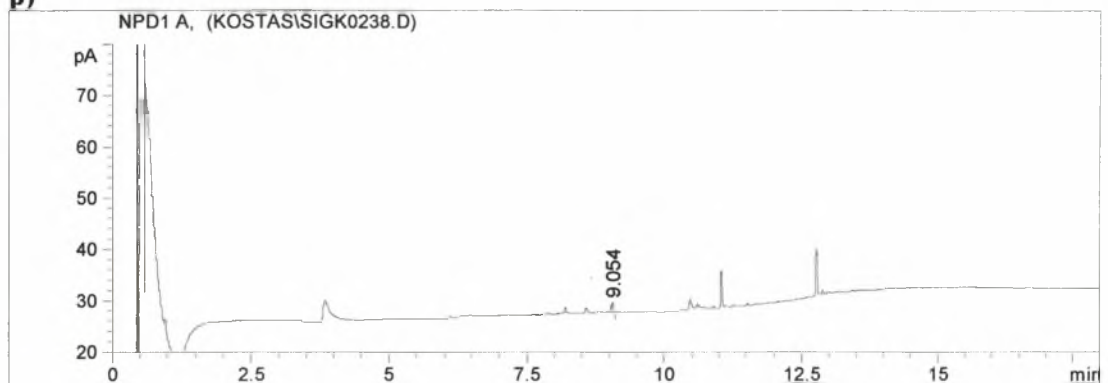
Υπολείμματα diphenylamine προσδιορίστηκαν σε οκτώ δείγματα (80% των δειγμάτων) με συγκεντρώσεις να κυμαίνονται από 0,06 έως 0,85 mg/kg.

Οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν είναι όλες σαφέστατα κάτω από τα MRLs για τις ουσίες αυτές στα μήλα. Συγκεκριμένα είναι όλες χαμηλότερες από 1mg/kg , γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στη μακρά περίοδο συντήρησης των μήλων που αναλύθηκαν (6 –7 μήνες).

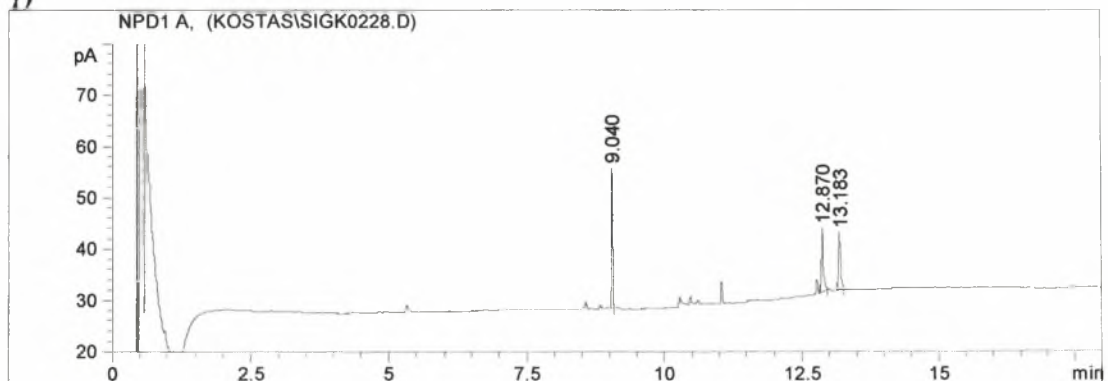
α)



β)



γ)



Σχήμα 11: Χρωματογραφήματα προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 0,5 mg/L (α), και δειγμάτων μήλων εμπορίου: (β) δείγματος Δ-8 και (γ) δείγματος Δ-6, κατόπιν εκχύλισης με τρεις διαλύτες και συμπύκνωση σε τελικό διαλύτη τριμεθυλοπεντάνιο/τολουόλιο (9:1).

Οι χρόνοι κατακράτησης (t_R) που αντιστοιχούν στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι οι ακόλουθοι: 9,0 (diphenylamine), 12,9 (thiabendazole) και 13,2 (imazalil).

Η ανάλυση έγινε σε χρωματογραφική στήλη HP-1701 με θερμοκρασιακό πρόγραμμα 80°C (1,2 min), 20°C/min at 200°C, 12°C/min at 270°C και με έκχυση με την τεχνική *pulsed splitless* σε εισαγωγή 260°C.

8.6 Μετρήσεις υπολειμμάτων σε συντηρημένα μήλα

8.6.1 Μεταβολή υπολειμμάτων Diphenylamine στα μήλα

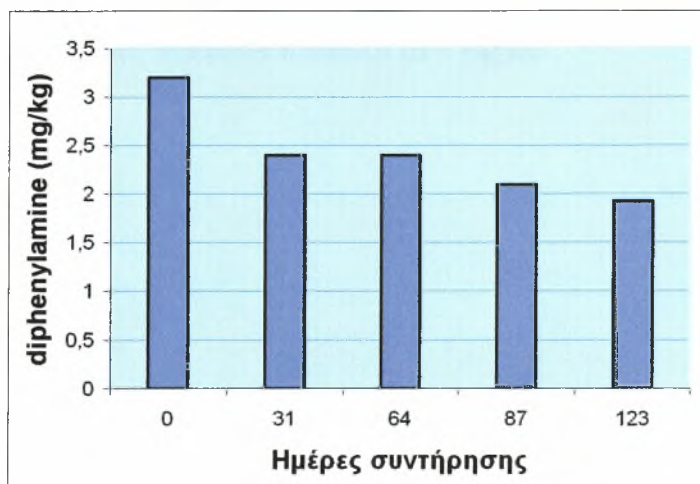
Οι μέσες τιμές των υπολειμμάτων της diphenylamine στα μήλα, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά τη συντήρησή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από 3 επαναλήψεις.

Στους παρακάτω πίνακες ως (0 ημέρες) θεωρείται η δειγματοληψία αμέσως μετά το πέρασμα των καρπών από το Drencher.

Διάστημα (ημέρες) αποθήκευσης	diphenylamine mg / kg \pm S.D.	R. S. D.
0	3,20 \pm 0,44	13,6 %
31	2,40 \pm 0,30	12,5 %
64	2,40 \pm 0,36	15,0 %
87	2,10 \pm 0,46	21,8 %
123	1,93 \pm 0,35	18,2 %

Πίνακας 6. Υπολείματα (mg/kg) της **diphenylamine** μετά τη μετασυλλεκτική της εφαρμογή σε μήλα, σε διάφορα χρονικά διαστήματα κατά τη συντήρησή τους.

Η μεταβολή των υπολειμμάτων της diphenylamine στα μήλα κατά την αποθήκευση παριστάνεται γραφικά στο σχήμα 12.



Σχήμα 12: Μεταβολή υπολειμμάτων της diphenylamine στα μήλα κατά την αποθήκευση.

Τα ποσοστά μείωσης των υπολειμμάτων της diphenylamine στα μήλα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά την συντήρησή τους από τη μέρα εισαγωγής τους στον ψυκτικό χώρο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

Ημέρες αποθήκευσης	Ποσοστό μείωσης υπολειμμάτων diphenylamine
0	-
31	25%
64	25%
87	34,3%
123	39,6%

Πίνακας 7. Ποσοστό μείωσης υπολειμμάτων της diphenylamine σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από την έναρξη συντήρησης των μήλων.

Παρατηρείται μια προοδευτική μείωση των υπολειμμάτων με την πάροδο του χρόνου. Η μείωση είναι αρκετά μεγάλη τον πρώτο μήνα της συντήρησης (25%) ενώ δεν παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων από τον πρώτο έως τον δεύτερο μήνα συντήρησης. Τελικά η μείωση των υπολειμμάτων την διφαινυλαμίνης φτάνει το 40% μετά από 4 μήνες συντήρησης. Η διφαινυλαμίνη παρουσιάζει την μικρότερη εμμονή στους καρπούς σε σύγκριση με τα imazalil και thiabendazole. Τα υπολείμματα της diphenylamine βρίσκονται σαφέστατα κάτω από το MRL που έχει ορίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για την ουσία αυτή στα μήλα και είναι τα 5 mg/kg.

8. 6. 2 Μεταβολή υπολειμμάτων Imazalil στα μήλα

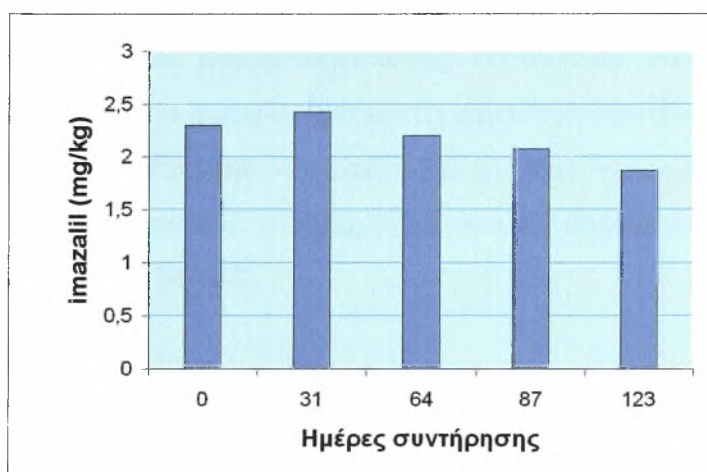
Οι μέσες τιμές των υπολειμμάτων του imazalil στα μήλα, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά τη συντήρησή τους παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από 3 επαναλήψεις.

Στους παρακάτω πίνακες ως (0 ημέρες) θεωρείται η δειγματοληψία αμέσως μετά το πέρασμα των καρπών από το Drencher.

Διάστημα (ημέρες) αποθήκευσης	imazalil mg/kg \pm S.D.	R. S. D.
0	2,30 \pm 0,50	21,7 %
31	2,43 \pm 0,68	28,0 %
64	2,20 \pm 0,26	12,0 %
87	2,07 \pm 0,29	14,4 %
123	1,87 \pm 0,32	17,2 %

Πίνακας 8. Υπολείμματα (mg/kg) του **Imazalil** μετά τη μετασυλλεκτική του εφαρμογή σε μήλα, σε διάφορα χρονικά διαστήματα κατά τη συντήρησή τους.

Η μεταβολή των υπολειμμάτων του imazalil στα μήλα κατά την αποθήκευση παριστάνεται γραφικά στο σχήμα 13.



Σχήμα 13: Μεταβολή των υπολειμμάτων του imazalil στα μήλα κατά την αποθήκευση

Τα ποσοστά μείωσης των υπολειμμάτων του imazalil στα μήλα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά την συντήρησή τους από τη μέρα εισαγωγής τους στον ψυκτικό χώρο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**.

Ημέρες αποθήκευσης	Ποσοστό μείωσης υπολειμμάτων imazalil
0	-
31	-
64	4,3%
87	10%
123	18,7%

Πίνακας 9. Ποσοστό μείωσης υπολειμμάτων του imazalil σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από την έναρξη συντήρησης των μήλων.

Παρατηρείται μια προοδευτική μείωση των υπολειμμάτων με την πάροδο του χρόνου. Η μείωση είναι μικρή σε όλη την διάρκεια συντήρησης και τελικά δεν ξεπερνά το 20% της αρχικής συγκέντρωσης μετά από 4 μήνες συντήρησης. Το imazalil παρουσιάζει την μεγαλύτερη εμμόνη στους καρπούς, από τις τρεις χημικές ουσίες της μεταχείρισης. Η μεγαλύτερη εμμόνη του imazalil σε καρπούς ποικιλίας Starking σε σύγκριση με μυκητοκτόνα της ομάδας των βενζιμιδαζολών έχει επισημανθεί και από τους Cano *et al.*, (1987α). Τα υπολείμματα του imazalil, βρίσκονται οπωσδήποτε κάτω από το MRL που έχει ορίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για την ουσία αυτή στα μήλα και είναι τα 5 mg/kg, και μάλιστα αμέσως μετά από την μετασυλλεκτική μεταχείριση τα υπολείμματα του imazalil βρίσκονται σε επίπεδο χαμηλότερο του MRL/2.

8. 6. 3 Μεταβολή υπολειμμάτων Thiabendazole στα μήλα

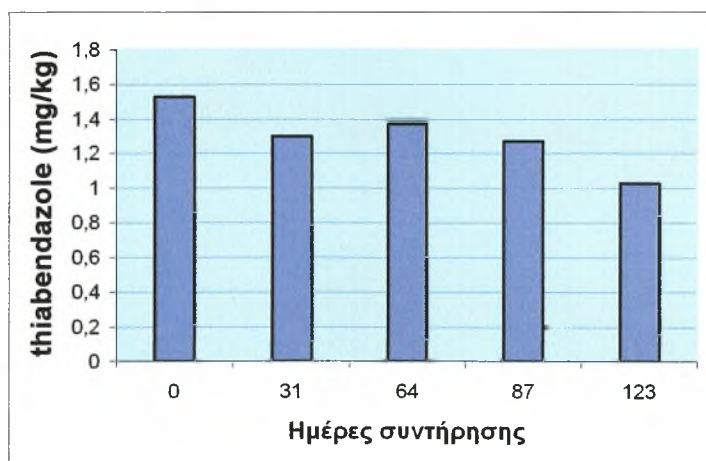
Οι μέσες τιμές των υπολειμμάτων του thiabendazole στα μήλα, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά τη συντήρησή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από 3 επαναλήψεις.

Στους παρακάτω πίνακες ως (0 ημέρες) θεωρείται η δειγματοληψία αμέσως μετά το πέρασμα των καρπών από το Drencher.

Διάστημα (ημέρες) αποθήκευσης	thiabendazole mg/kg \pm S.D.	R. S. D.
0	1,53 \pm 0,31	19,9 %
31	1,30 \pm 0,26	20,4 %
64	1,37 \pm 0,31	22,4 %
87	1,27 \pm 0,25	19,9 %
123	1,03 \pm 0,15	14,8 %

Πίνακας 10. Υπολείματα (mg/kg) του thiabendazole μετά τη μετασυλλεκτική του εφαρμογή σε μήλα, σε διάφορα χρονικά διαστήματα κατά τη συντήρησή τους.

Η μεταβολή των υπολειμμάτων του thiabendazole στα μήλα κατά την αποθήκευση παριστάνεται γραφικά στο σχήμα 14.



Σχήμα 14: Μεταβολή των υπολειμμάτων του thiabendazole στα μήλα κατά την αποθήκευση

Τα ποσοστά μείωσης των υπολειμμάτων του thiabendazole στα μήλα, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά την συντήρησή τους από τη μέρα εισαγωγής τους στον ψυκτικό χώρο παρουσιάζονται στον **Πίνακα 11**.

Ημέρες αποθήκευσης	Ποσοστό μείωσης υπολειμμάτων thiabendazole
0	-
31	15%
64	10,4%
87	17%
123	32,6%

Πίνακας 11. Ποσοστό μείωσης υπολειμμάτων του thiabendazole σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από την έναρξη συντήρησης των μήλων.

Παρατηρείται μια προοδευτική μείωση των υπολειμμάτων με την πάροδο του χρόνου. Η μείωση αυτή φτάνει το 32,6% μετά από 4 μήνες συντήρησης. Τα υπολείμματα του thiabendazole, βρίσκονται σε επίπεδα πολύ κατώτερα του MRL και του MRL/2 που έχει ορίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για την ουσία αυτή στα μήλα και είναι τα 5 mg/kg.

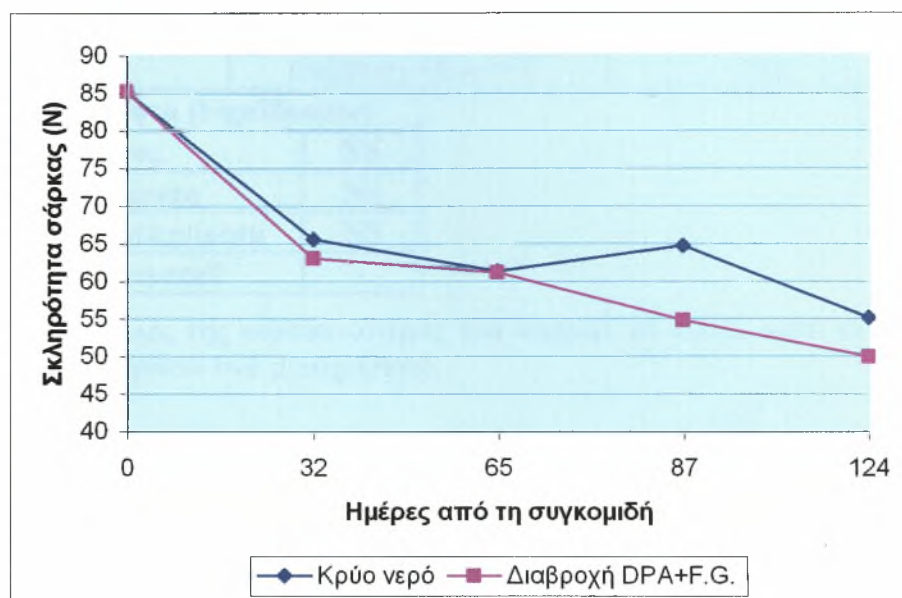
8.7 Μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών των μήλων κατά την συντήρηση

Στον Πίνακα 12 φαίνονται οι μεταβολές της σκληρότητας της σάρκας των καρπών κατά τη διάρκεια συντήρησης. Παρατηρείται μείωση της σκληρότητας της σάρκας η οποία ήταν σημαντική κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα συντήρησης για τους καρπούς και των δύο μεταχειρίσεων. Σημαντική ήταν η μείωση της σκληρότητας της σάρκας και στο διάστημα από 65 έως 87 ημέρες, ιδιαίτερα των καρπών που διαβρέχτηκαν με το διάλυμα DPA+Fruit Gard, ενώ την ίδια περίοδο οι καρποί της μεταχείρισης με κρύο νερό (μάρτυρας) δεν μαλάκωσαν. Περαιτέρω σημαντική μείωση της σκληρότητας μετρήθηκε στο διάστημα από 87 έως 124 ημέρες συντήρησης (ιδιαίτερα για τους καρπούς που διαβρέχτηκαν με κρύο νερό). Παρατηρείται δηλαδή καθυστέρηση ενός μήνα στο μαλάκωμα της σάρκας των καρπών του μάρτυρα σε σύγκριση με την μείωση της σκληρότητας των καρπών της χημικής μεταχείρισης. Τελικά το ποσοστό μείωσης της σκληρότητας της σάρκας μετά από συντήρηση 4 μηνών ήταν 35,3% (μεταχείριση με κρύο νερό) και 41,3% (μεταχείριση με DPA+F.G.), δηλαδή τα μήλα που δέχτηκαν την εφαρμογή των χημικών μαλάκωσαν περισσότερο από τα μήλα που πλύθηκαν μόνο σε κρύο νερό.

Ημέρες από τη συγκομιδή	Μεταχείριση	Σκληρότητα Σάρκας (N)
0	Κρύο νερό	85,26
	Διαβροχή DPA+F.G.	85,26
32	Κρύο νερό	65,56
	Διαβροχή DPA+F.G.	63,00
65	Κρύο νερό	61,34
	Διαβροχή DPA+F.G.	61,15
87	Κρύο νερό	64,77
	Διαβροχή DPA+F.G.	54,83
124	Κρύο νερό	55,17
	Διαβροχή DPA+F.G.	49,98
Σημαντικότητα (Significance)		
Χρόνος		***
Μεταχείριση		***
Χρόνος x Μεταχείριση		**
Ε.Σ.Δ.0,05 overall		4,1

Πίνακας 12. Μεταβολές της αντίστασης πίεσης (N) των μήλων (μέσος όρος (n=10) ανά μεταχείριση) κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

Στο **Σχήμα 15** παριστάνονται γραφικά οι μεταβολές της σκληρότητας των καρπών κάθε μεταχείρισης ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης με έναρξη την ημέρα 0 (συγκομιδή-23/9/02). Και εδώ φαίνεται η σημαντική μείωση της σκληρότητας των καρπών κατά τον 1ο μήνα συντήρησης, με ποσοστό μείωσης 23 % για τα μήλα που διαβρέχτηκαν με κρύο νερό και 26 % για τα μήλα που διαβρέχτηκαν με διάλυμα DPA+F.G.



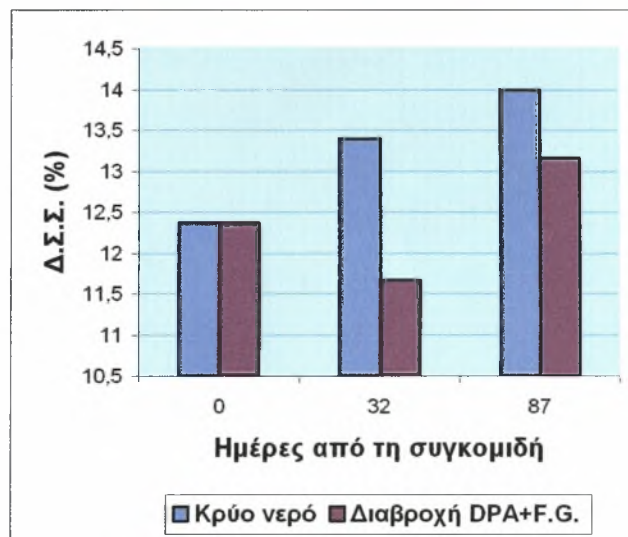
Σχήμα 15. Μεταβολές της σκληρότητας σάρκας των καρπών κάθε μεταχείρισης ως συνάρτηση του χρόνου συντήρησης με έναρξη την ημέρα συγκομιδής (0 ημέρες).

Η αντίσταση της σάρκας των καρπών στην πίεση κατά τη συγκομιδή ήταν μεγαλύτερη των 6,5 kg (63,7 N), η οποία αποτελεί σύμφωνα με έρευνα των Σφακιωτάκη & Συνεργάτες, (1997) τιμή κατωφλίου για την συγκομιδή και την ομαλή συντήρηση των μήλων στην περιοχή της Ζαγοράς.

Στον **Πίνακα 13** παρουσιάζονται οι μεταβολές της περιεκτικότητας (%) σε διαλυτά στερεά συστατικά (Δ.Σ.Σ.) των καρπών, κάθε μεταχείρισης, για διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά τη συντήρησή τους. Η περιεκτικότητα των διαλυτών στερεών συστατικών στους καρπούς αυξήθηκε όχι σημαντικά με τον χρόνο και η αύξηση αυτή ήταν μεγαλύτερη και πιο ταχεία στα μήλα που μεταχειρίστηκαν με κρύο νερό. Η μεταβολή της περιεκτικότητας των Δ.Σ.Σ. στους καρπούς σε συνάρτηση με τον χρόνο παριστάνεται γραφικά στο **Σχήμα 16**.

Ημέρες από τη συγκομιδή	Μεταχείριση	Διαλυτά Στερεά Συστατικά (Δ.Σ.Σ.) %
0	Κρύο νερό	12,4
	Διαβροχή DPA+F.G.	12,4
32	Κρύο νερό	13,4
	Διαβροχή DPA+F.G.	11,7
87	Κρύο νερό	14,0
	Διαβροχή DPA+F.G.	13,2
Σημαντικότητα (Significance)		
Χρόνος		NS
Μεταχείριση		NS
Χρόνος x Μεταχείριση		NS
E.Σ.Δ._{0,05} overall		-

Πίνακας 13. Μεταβολές της περιεκτικότητας των καρπών σε Δ.Σ.Σ. κατά τη συντήρηση (μέσοι όροι 3 επαναλήψεων ανά μεταχείριση).



Σχήμα 16. Γραφική παράσταση των μεταβολών της περιεκτικότητας των καρπών σε Δ.Σ.Σ. κατά την συντήρηση.

Η περιεκτικότητα σε Δ.Σ.Σ. κατά τη συγκομιδή ξεπερνούσε την τιμή των 11,5% η οποία αποτελεί σύμφωνα με έρευνα των Σφακιωτάκη & Συνεργάτες, (1997) τιμή κατωφλίου για τη συγκομιδή και την ομαλή συντήρηση των μήλων στην περιοχή της Ζαγοράς. Εξάλλου υψηλά Δ.Σ.Σ. στη συγκομιδή και μετά τη συντήρηση σημαίνουν καλά ανεπτυγμένα και νόστιμα γενικά φρούτα.

Η εξωτερική ποιότητα των καρπών εκτιμήθηκε ως προς τη ζημιά του φλοιού από σήψεις (προσβολές μυκήτων) ή άλλες καταπονήσεις. Δεν παρατηρήθηκαν μειονεκτήματα στους καρπούς (καφέτιασμα, κατάρρευση, προσβολές από μύκητες κ.λ.π.) κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι η μέθοδος ανάλυσης που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των μετασυλλεκτικά εφαρμοζόμενων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, diphenylamine, imazalil και thiabendazole στα μήλα, είναι αξιόπιστη αφού παρουσίασε καλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Συγκεκριμένα οι ανακτήσεις από φορτισμένα δείγματα κυμάνθηκαν για τη diphenylamine μεταξύ 89-98 % για το imazalil μεταξύ 88-96 % και για το thiabendazole μεταξύ 84-102 %, τιμές που βρίσκονται μέσα στο αποδεκτό εύρος για τις αναλύσεις προσδιορισμού υπολειμμάτων. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ήταν 4-12 % για την diphenylamine, 7-10 % για το imazalil και 5-8 % για το thiabendazole γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μέθοδος που εφαρμόστηκε παρουσιάζει καλή επαναληψιμότητα.

Η μέθοδος ανάλυσης που επιλέχθηκε στηρίχθηκε στην εκχύλιση με ακετόνη, διχλωρομεθάνιο και πετρελαϊκό αιθέρα και συμπύκνωση μέρους του εκχυλίσματος σε τελικό διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Με την επιλογή του οξικού αιθυλεστέρα ως τελικού διαλύτη επετεύχθη υψηλότερη απόκριση του ανιχνευτή και ως εκ τούτου χαμηλότερα όρια ποσοτικοποίησης για τα imazalil και thiabendazole.

Εκτός από την δυνατότητα που παρείχε η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος για προσδιορισμό υπολειμμάτων των diphenylamine, imazalil και thiabendazole, δοκιμάστηκε επιτυχώς και για τον προσδιορισμό και άλλων φυτοπροστατευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην περιοχή Ζαγοράς κατά την τελευταία περίοδο πριν τη συγκομιδή των καρπών, όπως τα εντομοκτόνα chlorpyrifos ethyl (Dursban), quinalphos (Ekalux) και phosalone (Zolone). Το γεγονός αυτό δείχνει την δυνατότητα επέκτασης της μεθόδου ανάλυσης και στον προσδιορισμό και άλλων (προσυλλεκτικά χρησιμοποιούμενων) φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα μήλα, έχει δηλαδή πολυδύναμο χαρακτήρα.

Επίσης η μέθοδος ανάλυσης που επιλέχθηκε είναι σχετικά απλή, μπορεί εύκολα και γρήγορα να εφαρμοσθεί στο εργαστήριο και απαιτεί χρήση μικρών όγκων διαλυτών.

Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων των diphenylamine, imazalil και thiabendazole, στα μήλα αμέσως μετά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση, βρέθηκαν πιο χαμηλές από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs) που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα υπολείμματα τους σε μήλα, τα οποία είναι 5 mg/kg και για τις τρεις ουσίες. Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων των τριών φυτοπροστατευτικών ουσιών αμέσως μετά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση [διαβροχή με διάλυμα DPA (31%, σε δόση 4,5 L/ton.)

+Fruit Gard (TBZ 14% β/o, Imazalil 10% β/o) σε δόση 4 L/ton.], βρέθηκαν: 3,20 mg/kg για τη diphenylamine, 2,30 mg/kg για το imazalil, και 1,53 mg/kg για το thiabendazole.

Μόνο τα υπολείμματα της διφαινυλαμίνης ξεπερνούσαν τα 3 mg/kg, τιμή που αποτελεί MRL για τα μήλα στην Ιταλία και την Ισπανία, ενώ μειώθηκαν σε 2,4 mg/kg μετά από τον πρώτο μήνα συντήρησης. Παρόμοια μείωση των υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης έχει παρατηρηθεί και σε μήλα ποικιλίας Granny Smith μετά από μετασυλλεκτική εφαρμογή με διαβροχή (2200 ppm), (Johnson *et al.*, 1997).

Τα υπολείμματα του thiabendazole βρέθηκαν χαμηλότερα των 3 mg/kg τιμή που αποτελεί MRL για τα μήλα στην Ιταλία και την Ισπανία και είναι το 'αυστηρότερο όριο' στην Ευρώπη.

Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων και των τριών ουσιών μειώθηκαν με τον χρόνο συντήρησης έτσι ώστε μετά από τέσσερις μήνες συντήρησης η μείωση να φτάσει το 39,6%, το 18,7 % και το 32,6 % της αρχικής συγκέντρωσης των diphenylamine, imazalil και thiabendazole, αντίστοιχα.

Υψηλά ποσοστά μείωσης των υπολειμμάτων της διφαινυλαμίνης έχουν εκτιμηθεί και σε άλλες έρευνες (Bertolini *et al.*, 1995) ακόμα και όταν η διφαινυλαμίνη εφαρμόστηκε σαν διάλυμα εμβάπτισης ή με την μέθοδο της νέφωσης .

Παραπλήσιο ποσοστό μείωσης των υπολειμμάτων του thiabendazole μετά από ένα μήνα συντήρησης (13,9%), εκτιμήθηκε σε μήλα ποικιλίας Red Delicious που εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα thiabendazole (1000ppm / 35 sec) από τους Cano *et al.*, (1987).

Η προοδευτική μείωση των υπολειμμάτων του imazalil κατά την συντήρηση των μήλων είναι παρόμοια με αυτή που εκτιμήθηκε σε έρευνα των Cano *et al.*, (1987). Το imazalil παρουσίασε μεγαλύτερη εμμονή στους καρπούς κατά την διάρκεια της συντήρησης σε σύγκριση με το thiabendazole. Παρ' όλα αυτά η συγκέντρωση των υπολειμμάτων του imazalil ήταν μετά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση και καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης μικρότερη από το MRL/2 που έχει θεσπίσει η Ε.Ε. για τα μήλα.

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι τα υπολείμματα των diphenylamine, imazalil και thiabendazole στα μήλα που συντηρήθηκαν ήταν σε χαμηλά επίπεδα, κάτω από τα ανώτατα όρια, λόγω χαμηλής συγκέντρωσης υπολειμμάτων αμέσως μετά τη μετασυλλεκτική μεταχείριση.

Όσον αφορά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των μήλων, η σημαντική μείωση της σκληρότητας της σάρκας των καρπών είναι συχνό πρόβλημα τα τελευταία έτη και πιθανόν να οφείλεται στην υπερβολική αζωτούχο λίπανση που εφαρμόζεται στις μηλιές. Η χρήση ελεγχόμενης ατμόσφαιρας ή συστημάτων αφαίρεσης του αιθυλενίου από τους χώρους

συντήρησης (περιοδικός εξαερισμός ή ανακύκλωση αέρα μέσω υπερμαγγανικού καλίου) θα καθυστερούσε ουσιαστικά την μείωση της σκληρότητας της σάρκας με αποτέλεσμα πιο τραγανά μήλα για μακρύτερο χρονικό διάστημα.

Η αύξηση (μη σημαντική) των Δ.Σ.Σ. κατά τη συντήρηση οφείλεται στη διάσπαση του αμύλου που περιέχονταν στους καρπούς κατά τη συγκομιδή και υδρολύθηκε ενζυμικά κατά τη ψυχοσυντήρηση. Δευτερευόντως η αύξηση οφείλεται και στην ελάχιστη απώλεια βάρους (νερού) η οποία από μετρήσεις των γεωπόνων του Αγροτικού Συνεταιρισμού Ζαγοράς είναι περίπου 2-3 % κατά τους 4 πρώτους μήνες της ψυχοσυντήρησης.

Γενικά τα μήλα κατά τη συγκομιδή τους είχαν άριστη ποιότητα με σκληρότητα σάρκας >8,5 kg και περιεκτικότητα σε Δ.Σ.Σ., 12,4%. Έτσι η συντήρηση τους για 4 μήνες ήταν άριστη χωρίς την παρουσία σήψεων ή φυσιολογικών ανωμαλιών ακόμα και στους καρπούς που δεν είχαν δεχτεί τη μεταχείριση με χημικές ουσίες. Είναι σημαντικό ότι μέχρι τουλάχιστον 4 μήνες συντήρησης, καρποί που συγκομίστηκαν με άριστη ποιότητα και δέχτηκαν τις συνήθεις μεταχειρίσεις διαλογής και συντήρησης, διατηρήθηκαν σε καλή κατάσταση χωρίς τη μετασυλλεκτική εφαρμογή αντιοξειδωτικών και μυκητοκτόνων.

Α. Ελληνική βιβλιογραφία

- ✚ Ανώνυμος, Σεπτέμβριος, 1985. Αλλοιώσεις των μήλων στα ψυγεία. Δ/νση Γεωργίας, Νομ., Λάρισας. Αριθ. Δελτίου, 195
- ✚ Βασιλακάκης, Μ.Δ., Δ. Γερασόπουλος, Γ. Νάνος, Ε. Σφακιωτάκης & Ο. Ντινόπουλος, 1988. Επίδραση του σταδίου ωρίμανσης κατά τη συγκομιδή στη συντηρησιμότητα και ποιότητα των μήλων ποικιλίας Granny Smith. Επιστ. Επετ. Του Τμήματος Γεωπονίας, Α.Π.Θ. 27: 84-103
- ✚ Βασιλακάκης, Μ., Μάρτιος, 1999. Ποιότητα Ελληνικών Μήλων. Γεωργία Κτηνοτροφία, 3/99. Σελ. 36-38, 41-49.
- ✚ Κουκουργιάννης, Β., Οκτώβριος, 1997. Η Μηλοκαλλιέργεια. Γεωργία-Κτηνοτροφία, 9/97 Αφιέρωμα: Μηλοειδή 1. Σελ. 6-13, 18-20.
- ✚ Κουκουργιάννης, Β., Ιούνιος, 2001. Μειωμένη η παραγωγή μήλων και αχλαδιών στην Ε.Ε. Γεωργία-Κτηνοτροφία, 6/01. Σελ. 14.
- ✚ Λέντζα-Ρίζου, Χ., 1994. Διεθνείς ρυθμίσεις για την προστασία καταναλωτών. Διαδικασία καθορισμού κοινοτικών ανώτατων ορίων υπολειμμάτων. Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στα αγροτικά προϊόντα. Επτάλοφος, ΑΒΕΕ, Αθήνα. Σελ.13-32, 33-57.
- ✚ Λέντζα-Ρίζου, Χ., Μάρτιος, 2000α. Γεωργική Φαρμακολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας. Βόλος. Σελ.208-210, 167-177, 180, 185-186.
- ✚ Λέντζα-Ρίζου, Χ., Μάρτιος, 2000 β. Ειδική Φαρμακολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας. Βόλος. Σελ.406.
- ✚ Μηλιάδης, Γ., 1989. Μελέτη μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων ζιζανιοκτόνων παραγώγων της ουρίας. Διδακτορική διατριβή, Α.Π.Θ. Σελ.7-10, 33-36.
- ✚ Μηλιάδης, Γ., 2001. Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Μέθοδοι και προτεραιότητες στην εργαστηριακή παρακολούθηση των περιβαντολλογικών επιπτώσεων από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Σεμινάριο από το Ανθρώπινο Δίκτυο Διάδοσης της Ε & Τ Γνώσης-ΕΠΙΕΤ II, 98 ΑΔ 60. Αθήνα-Θεσ/νίκη. Σελ.10-11.
- ✚ Μπαλαγιάννης, Π.Γ., 1994. Εγχειρίδιο γεωργικών φαρμάκων. Αθήνα-Πειραιάς.
- ✚ Νάνος, Γ., Ι. Παπούλια & Ι. Μπούτλα, Ιούλιος, 2001. Μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις φιλικές προς το περιβάλλον στα μήλα περιοχής Κοντού Ζαγοράς. Σελ.1-4
- ✚ Παναγόπουλος, Χ.Γ., 1997. Ασθένειες καρποφόρων δένδρων και αμπέλου. Εκδ. Α.ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ, Αθήνα, Γ' Έκδοση. Σελ. 43,46,74-77.

- ✚ Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, Ε., 1991. Γεωργικά Φάρμακα-Διδακτικές σημειώσεις, μέρος Ι, Έκδοση Υπηρεσίας Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσ/νικη. Σελ.121.
- ✚ Σφακιωτάκης, Μ.Ε., 1995. Μετασυλλεκτική Φυσιολογία και Τεχνολογία Νωπών Οπωροκηπευτικών Προϊόντων. Εκδόσεις τυροΜΑΝ, 1^η εκδ., Θεσσαλονίκη. Σελ. 228, 229, 249-253, 271-275, 333-335, 338-349.
- ✚ Σφακιωτάκης, Μ.Ε., Τ. Θωμαΰ, Γ. Νάνος, & Α. Μπόλλα, Μάιος, 1997. Πρόγνωση του χρόνου συγκομιδής μήλων Ζαγοράς Πηλίου, σε σχέση με την ανάπτυξη Επιφανειακού Εγκαύματος, με τη χρήση δεικτών ωριμότητας. Θεσσαλονίκη.
- ✚ Σφακιωτάκης, Μ.Ε., 2002. Ποιότητα, συλλεκτική ωριμότητα και συντήρηση μήλων. Γεωργία-Κτηνοτροφία 8, Σελ. 45-46, 54, 59,70

Β. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- ✚ Allen, J.G., & K.J. Hall, 1980. Methods for the determination of diphenylamine residues in apples. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 255-258.
- ✚ Anet, E.F.L.J., 1972. Superficial scald, a functional disorder of stored apples VIII. Volatile products from the auto oxidation of α -farnesene. *J. Sci. Food Agr.* 23: 605-608.
- ✚ Anet, E.F.L.J., 1974. Superficial scald, a functional disorder of stored apples IX. Apple antioxidants. *J. Sci. Food Agr.* 25: 299-304.
- ✚ Bain, J.M., & F.G. Mercer, 1963. The sub-microscopic cytology of superficial scald, a physiological disease of apples. *Austrial J. Biol. Sci.*, 16: 442-449
- ✚ Bauchot, A.D., P. John, Y. Soria & I. Recasens, 1995. Sucrose ester-based coatings formulation with food compatible antioxidants in the prevention of superficial scald in stored apples. *Journal of the American Soc. For Hort. Sci.*, 120:3, 491-496, 29 ref.
- ✚ Bertolini, P., A. Guarnieri & P. Venturi, 1995. Post-harvest fog treatment of apples: deposition patterns and control of *Phlyctaena vagabunda* and superficial scald. *Crop Protection. Vol. 14, No 5*, 345-348.
- ✚ Camps Alemany, A., Alberola Matoses, J., Cnnat Broseta, P., 1980. Simultaneous determination of imazalil and thiabendazole fungicides. EFCE Publ. Ser.1980, 12,31.
- ✚ Cano, P., J.L. De la Plaza & L. Munoz-Delgado, 1987 α . *J. Agric. Food Chem.* 35, 144-147.
- ✚ Cano, P., J.L. De la Plaza & L. Munoz-Delgado, 1987 β . *Pestic. Sci.* 19, 283-287.
- ✚ Chapon, J., C. Nghyen-The, & G. Bompeix, 1987. *Arboric. Fruit* 34, 52-55.
- ✚ Curto, O., P. Natali, G.P. Molinari, & A. Del Re, 1985. Trattamenti alla frutta dopo la raccolta. pp.73-84.
- ✚ FAO (1979). Pesticide Residues in Food: 1979 *Evaluations 20(Sup.)*, 253-266

- ✚ FAO (1984). Pesticide Residues in Food: *1984 Evaluations* 67, 355-373, 299-312
- ✚ FAO (1985). Pesticide Residues in Food: *1985 Evaluations, Part I, Residues* 72, 157-168.
- ✚ Gallerani, G., G.C.Pratella & R.A. Bundini, 1990. The distribution and role of natural antioxidant substances in apple fruit affected by superficial scald. *Adv. Hort. Sci.* 4: 144-146
- ✚ Garrido, J., M. de Alba, I. Jimenez, E. Casado, M.L. Folgueiras, 1997. Chromatographic analysis of imazalil and carbendazim in fruits. Method validation and residue monitoring program 1995. *Journal of Chromatography A.* 765, 91-97.
- ✚ Garrido, J., M. de Alba, I. Jimenez, E. Cadado, M.L. Folgueiras, 1998. Gas Chromatographic Determination of Diphenylamine in Apples and Pears: Method Validation and Results of Spanish Official Residue Monitoring Program 1995. *Journal of AOAC International.* Vol.81, No.3, 648-651.
- ✚ Gebhardt, S.E., R.H. Matthews, 1989. Nutritive Value Of Foods. *U.S. Department of Agriculture.* 18-19.
- ✚ Greenberg, R., & C. Resnick, 1977. A gas chromatographic method for determining imazalil residues in citrus fruit. *Pestic. Sci.*, 8, 59.
- ✚ Hanekon, A.N., J.L. Scheepers, & J.F. Villeiers, 1976. *Delicious Fruit Grower* 26, 402-403.
- ✚ Huelin, F.E., 1968. *J. Sci. Food Agric.* 19, 294-296.
- ✚ Huelin, F.E., & I.M. Goggiola, 1970. Superficial scald, a functional disorder of stored apples: IV. Effect of variety, maturity, oiled wraps and diphenylamine on the concentration of α -farnesene in the fruit. *J. Sci. Food Agric.* 19, 297-301.
- ✚ Ingle, M., & M.C D' Souza, 1989. Physiology and control of superficial scald of apples: A Review. *HortScience* 24(1): 28-32.
- ✚ Joe, T., 1988. Multi-Residue Pesticide Screens. California Department of Food and Agriculture. Sacramento, CA.
- ✚ Johnson, D.S., J.K. Allen, T.M. Warman, 1980. Post harvest application pf Diphenylamine and Ethoxyquin for the superficial scald of Bramley's Seeding Apples. *J. Sci. Food Agric.* 31, 1189-1194.
- ✚ Johnson, G., J. Geronimo, D. Hughes, 1997. Diphenylamine residues in apples (*Malus domestica* Borkh.) cider and pomace following commercial controlled atmosphere storage. *J. Agric. Food Chem.* 45, 976-979.
- ✚ King, J.R., W.G.H. Latham & D.H. Spalding, 1988. An analytical method for residues of imazalil in tomatoes and bell peppers after postharvest application and storage. *J. Agric. Food Chem.* 36, 520-523.

- ✚ Lau, O.L., 1990. Efficacy of diphenylamine, ultra low-oxygen and ethylene scrubbing on scald control in 'Delicious' apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(4): 541-547
- ✚ Lee, S., A. Velasquez, & H.J. Kaplan, 1984. *Hort Science* 19, 94-95.
- ✚ Lopez, M.L., & M. Riba, 1999. Residue levels of ethoxyquin, imazalil and iprodione in pears under cold-storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3228-3236.
- ✚ Luke, M.A., J.E. Froberg, G.M. Doose & H.T. Masumoto, 1981. Improved Multiresidue Gas Chromatographic Determination of Organophosphorus and Organohalogen Pesticides in Produce, Using Flame Photometric & Electrolytic Conductivity Detectors. *J. Assoc. of Anal. Chem. Vol.64*, 1187-1195.
- ✚ Lurie, S., J.D. Klein & R. Ben-Arie, 1990. Postharvest heat treatment as a possible means of reducing superficial scald after storage. *Journal of Hort. Sci.* 65(5): 503-509.
- ✚ Manseka, V.S., M. Vasilakakis, 1993. Effect of stage of maturity, postharvest treatments and storage conditions on superficial scald and quality of apples. *Acta-Horticulture. No.326*: 213-224.
- ✚ Meir, S., & W.J. Bramlage, 1988. Antioxidant activity in 'Cortland' apple peel and susceptibility to superficial scald after storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113(3): 412-418.
- ✚ Ministry of Welfare, Health and Cultural Affairs, Rijswijk-Netherlands, 1988. *Analytical methods for residues of pesticides. 5th edition, part I*, 3-5, 53-56.
- ✚ Navickiene, S., & M.L. Ribeiro, 1999. Rapid Method for the Determination of Thiabendazole and Imazalil Residues in Orange by Capillary Column Gas Chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.*, 22, (5) 303-304
- ✚ Papadopoulou-Mourkidou, E., 1991. Postharvest-applied Agrochemicals and their residues in fresh fruits and vegetables. *J. Assoc. of Anal. Chem. Vol.74, No.5*: 749-752,760-761.
- ✚ Pirreti, M.V., G. Gallerani, G.C. Pratella, 1994. Polyphenol fate and superficial scald in apple. *Postharvest Biology and Technology.* 4:3, 213-224; 27 ref.
- ✚ Rondelli, E., G.P. Molinari, P. Natali, F. Gorini & A. Del Re, 1985. Trattamenti alla frutta dopo la raccolta. pp.95-100
- ✚ Sfakiotakis, E., N. Niklis, G. Stavroulakis & T. Vassiliadis, 1993. Efficacy of controlled atmosphere and ultra low oxygen-low ethylene storage on keeping quality of 'Starking Delicious' apples. *Acta Horticulturae*, 326: 191-202
- ✚ Smith, W.H., 1959. Control of superficial scald in stored apples. *Nature (London)* 183: 760.
- ✚ Stein, E.R., W.W. Carter, & A.T. Murray, 1981. A modification of imazalil residue analysis in treated grapefruit. *J. Envir. Sci. Health, Part B*, 16, 427.
- ✚ Tomlin, C., Pesticide Manual. 10th Edition, 1994

