

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia

Curso 2023/24

Determinación de plaguicidas en muestras de vinos. Riesgo en la ingesta.

Sergio González Barreto

(alu0100953473@ull.edu.es)

Teresa María Borges Miquel

Ruth Rodríguez Ramos

Índice

Indice	2
Datos referidos a la memoria:	3
Resumen	4
Abstract	4
Introducción	5
Objetivos	6
Material y métodos	8
1.- Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones	8
2.-Materiales	8
3.-Equipos	9
3.1.-Instrumentos	9
3.2.- Aparatos	9
4.- Programas informáticos	9
5.- Muestras analizadas	9
6.- Procedimientos experimentales	9
6.1.- Método QuEChERS	9
6.2.- Separación cromatográfica mediante GC-MS/MS	10
Resultados y discusión	12
1.- El método QuEchERS en análisis de vinos:	13
2.- Plaguicidas y vinos para la salud	15



Facultad de Farmacia

Universidad de La Laguna

Conclusiones	16
Bibliografía	17



Datos referidos a la memoria:

Número de páginas de la memoria	18
Número de palabras totales de la memoria sin contar resumen, abstract, pie de tablas o figuras y referencias.	2301
Número de palabras del resumen	115
Número de palabras del abstract	113

Resumen

El vino es un elemento muy importante en la cultura y gastronomía de Canarias. Para evitar el deterioro de las uvas y cuidarlo de las plagas se usan constantemente fitosanitarios con distintos componentes. Estos plaguicidas pueden ser perjudicial para la salud del consumidor, y es uno de los puntos que trataremos de estudiar.

Durante este proceso hemos analizado, a través del método QuEChERS y GC-MS/MS, un total de 41 muestras de vino tinto procedente de la Macaronesia, con el fin de comprobar la concentración de los fitosanitarios en el producto final. De esta manera compararemos con la normativa vigente si las muestras analizadas cumplen los requisitos y si son o no nocivos para la salud.

Abstract

Wine is a very important drink in the gastronomy of the Canary Islands. To prevent the deterioration of the grapes and protect them from pests, phytosanitary products with different components are constantly used. These pesticides can be harmful to the health of the consumer, and this is one of the points that we will try to study. During this process we have analysed, through the QuEChERS and GC-MS/MS method, a total of 41 samples of red wine from Macaronesia, in order to check the concentration of phytosanitary products. In this way, we will compare with current laws if the samples analysed meet the requirements and whether or not they are harmful for us.

Introducción

Desde hace muchos años el vino es un elemento muy importante en la cultura de las Islas Canarias y de la Macaronesia. Los primeros constructores de la vid procedían de tierras andaluzas y de Portugal, y es aquí cuando comienza a desarrollarse una gran unión entre Madeira y Canarias, ya que su situación geográfica es muy similar.

Fue a partir del siglo XVI cuando se introdujeron las técnicas europeas en las islas, y con la llegada de la filoxera, se determinó que las plantaciones de Canarias tenían una elevada supervivencia a las plagas. Al principio se intentaron desarrollar las técnicas antiguas de cultivo, pero debido a las condiciones meteorológicas hubo que innovar y desarrollar nuevos métodos.

Tras 1550 el mercado vinícola de Canarias comienza a establecer contactos con Europa, generándose una gran demanda del exterior, llegando a denominarse como las “Islas del Vino”.

Desde entonces el comercio en las islas es muy grande y se ha expandido a lo largo del mundo, se han generado grandes cambios y nuevas técnicas de cultivo.

En este estudio se han seleccionado muestras de distintos vinos tintos de Canarias y Azores con el fin de determinar las cantidades de plaguicidas que hay en ellos. Para llevarlo a cabo lo primero es saber que son los plaguicidas, que según la RAE se define como “toda sustancia o ingrediente activo, así como las formulaciones o preparados, que estén destinados a combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales, o a prevenir su acción, así como favorecer o regular la producción vegetal, conservar los productos o destruir los vegetales indeseables”(16)

Sabemos que el uso de fertilizantes está ligado a favorecer la producción de vegetales, evitando así que muchas plagas acaben con el cultivo o que depositen algunas bacterias que sean perjudiciales para el consumidor. En este caso, se añaden durante la etapa de crecimiento de los viñedos, para favorecer la maduración de la uva, y con ello conseguir el vino mediante la etapa de fermentación.

Para realizar este procedimiento hemos usado el método QuEChERS y GC-MS/MS, y determinaremos si al consumirlo se están ingiriendo plaguicidas y en que cantidad, y de esta manera si se rige por la normativa vigente o si la supera. Este método aparece por primera vez en el año 2003 de la mano de Michelangelo Anastassiades y Steven J. Lethohay, con el fin de buscar un

procedimiento por el cual se analicen los pesticidas que sean capaces de generar un menor riesgo para la salud.

Analizando sus siglas, el método se define como un proceso rápido (Quick), fácil (Easy), barato (Cheap), efectivo (Effective), robusto (Robust) y seguro (Sure). El método consta de dos fases, la de extracción, ya sea sólido- líquido o líquido-líquido, y una fase de limpieza del producto restante.

Cuando hablamos del método Quechers nos referimos a un procedimiento muy versátil, ya que se puede usar para determinar los plaguicidas en distintos alimentos, ya sea cereales, frutas y verduras ricas en aguas, como en vinos. Hoy en día hay dos modalidades que son métodos oficiales de análisis de organizaciones internacionales de estándares. En la modalidad europea el tampón usado es citrato, y en la americana se usa ácido acético-acetato, que se añaden para conseguir extractos más limpios.

A través de la Ley 1107/2009 (12), se regula la forma de aplicar los fertilizantes en todos aquellos productos del comercio europeo, explicándose el uso de los mismos ,y se hace con el fin de proteger los vegetales y aumentar el crecimiento de los mismos. En el artículo 53 se hace especial hincapié que el periodo máximo de uso no puede sobrepasar los 120 días.

Según el reglamento 396/2005(13), se establecen los límites máximos de residuos admisibles en alimentos y piensos, así como productos vegetales.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la presencia de residuos de plaguicidas en muestras de vino tinto comercializados en la Macaronesia, haciendo uso del método oficial para analizar estos compuestos en productos agroalimentarios. Así mismo, se pretende comparar los datos obtenidos con los recogidos en la legislación vigente con el fin de conocer si su consumo pudiera suponer un riesgo para la salud.

Para lograr este objetivo principal, se establecen otros objetivos específicos:

- Aplicar el método QuEChERS para la extracción de residuos de plaguicidas en muestras de vino tinto.
- Utilizar cromatografía de gases (GC) acoplada a un sistema de detección de espectrometría de masas (MS) para la separación y detección de los compuestos de interés.
- Verificar la validación de la metodología analítica previamente desarrollada con los correspondientes parámetros de calibración y estudios de recuperaciones.
- Determinar los compuestos fitosanitarios en las muestras analizadas.
- Presentar y analizar los resultados obtenidos.

Material y métodos

1.- Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones

- Estándares analíticos de plaguicidas de pureza superior al 95,9% (Sigma-Aldrich Chemie y Dr. Ehrenstorfer). Trifenilfosfato (TTP) usado como estándar interno de pureza 99,7% (Dr.Ehrenstorfer). Durante el desarrollo del trabajo, se utilizó una disolución que contenía 114 plaguicidas a una concentración de 10 mg/L en acetona, y otras disoluciones de concentraciones diferentes, obtenidas mediante dilución de la anterior empleando volúmenes apropiados de una mezcla de ciclohexano/acetato de etilo (9:1, v/v). Se procedió de la misma forma para el TPP. Todas las disoluciones se almacenaron a -18 °C en la oscuridad.
- Acetonitrilo (ACN) de grado de cromatografía líquida (LC)-espectrometría de masas (MS) (Merck).
- Acetona de grado LC (Merck).
- Ciclohexano de grado GC-MS (Merck).
- Acetato de etilo de grado de cromatografía líquida de alta eficacia (Sigma-Aldrich Chemie)
- Kits de extracción de QuEChERS, que contienen: sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄), cloruro sódico (NaCl), citrato trisódico dihidratado e hidrogenocitrato disódico sesquidratado (Agilent Technologies).
- Kits de dSPE de QuEChERS, que contienen: amina primaria secundaria (PSA), octadecilsilano (C18) y MgSO₄ (Agilent Technologies)

2.-Materiales

- Vasos de precipitados de distintos volúmenes: 25, 50, 100 y 250 mL (DURAN).
- Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL (VWR Internacional)
- Puntas desechables de plástico para pipetas automáticas de distintos volúmenes (Gilson).
- Filtros de jeringa de membrana de politetrafluoroetileno de 0,20 µm del tamaño del poro y 15 mm de diámetro (Macherey-Nagel)
- Viales de vidrio de 2 mL para GC-MS (Agilent Technologies).

3.-Equipos

3.1.-Instrumentos

- Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas en tándem (MS/MS), equipado con un analizador de triple cuadrupolo(OqO) y un inyector automático (Agilent Technologies).
- Balanza analítica Quintix 124-1S de precisión 0,1 mg y capacidad máxima de pesada de 120 g (Sartorius).
- Micropipetas de distintos volúmenes, desde 0,2 a 5000 µL, del modelo Transferpette (Brand).

3.2.- Aparatos

- Centrífuga modelo 5810 R con control de tiempo y temperatura, y velocidad máxima de 4400 rpm/3000 x g (Eppendorf).
- Evaporador de nitrógeno (Organomation N-Evaporation).

4.- Programas informáticos

- Microsoft® Office Word 2018 para la realización de la memoria del trabajo.
- Microsoft® Office Excel 2018 para la elaboración de las hojas de cálculo y el tratamiento de los datos.
- MassHunter Workstation (Agilent Technologies) para el control del equipo, visualización y tratamiento de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos.

5.- Muestras analizadas

Se analizaron 41 muestras de vino comercializadas en la Macaronesia. Fueron conservadas en un ultracongelador a -80 °C.

6.- Procedimientos experimentales

6.1.- Método QuEChERS

El método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe) es el procedimiento de extracción oficial aceptado por la Unión Europea, para el análisis simultáneo de distintos plaguicidas en muestras de vinos [European Standard EN 15662].

En primer lugar, se pesaron $10,0 \pm 0,1$ g de una muestra de vino en un tubo de centrífuga de 50 mL. Posteriormente se añadieron 100 μ L de estándar interno (IS) a 10 mg/L y

10 mL de ACN. A continuación, el tubo se agitó manualmente durante 1 minuto.

La mezcla se transfirió a un tubo de centrífuga que contenía el kit de extracción QuEChERS, compuesto por 4 g de sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$), 1 g de cloruro sódico ($NaCl$), el tampón de citrato (1 g de citrato trisódico dihidratado y 0,5 g de hidrogencitrato disódico sesquihidratado), y dos homogeneizadores cerámicos. Se agitó de nuevo durante 1 minuto y luego se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm (3000 xg). Una vez finalizada esta etapa se obtuvieron dos fases claramente separadas en el tubo, siendo la fase orgánica la que se encontraba en la parte superior.

Seguidamente, se llevó a cabo la etapa de limpieza o clean-up, para ello se transfirieron 6 mL del sobrenadante a un tubo de centrífuga de polipropileno de 15 mL, que contenía 150 mg de PSA, 150 mg de C18 y 900 mg de $MgSO_4$. Se agitó el tubo enérgicamente durante 1 minuto y posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm. A continuación, se tomaron 500 μ L del sobrenadante y se secaron en un evaporador de nitrógeno a 40 °C. Por último, el residuo obtenido se redisolvió en 500 μ L de mezcla de ciclohexano/ $EtOAc$ (9/1, v/v), se filtró y se inyectó en el sistema de GC-MS/MS. [ARTÍCULO FOODS (2.2. QuEChERS extraction procedure)]

6.2.- Separación cromatográfica mediante GC-MS/MS

Para el análisis cromatográfico se utilizó el sistema GC-MS/MS descrito anteriormente. Las condiciones de separación y detección empleadas fueron las previamente optimizadas por Santana-Mayor et al. [REFERENCIA FOODS].

La espectrometría de masas se realizó mediante ionización por impacto electrónico (EI), a una energía de -70 eV. La fragmentación de los iones precursores seleccionados de cada analito se realizó usando el nitrógeno como gas de colisión a un flujo de 1,50 mL/min.

La separación de los analitos se llevó a cabo en dos columnas iguales de sílice fundida (5% de fenil)-metilpolisiloxano (HP-5ms; 15 m \times 0,25 mM espesor de película \times 0,25 μ m, Agilent Technologies), conectadas en serie a través de una válvula de "blackflush".

Como gas portador se usó helio, a un flujo de 1,0 y 1,2 mL/min en la primera y segunda columna, respectivamente. La temperatura de la columna fue de

280 °C, y las inyecciones se realizaron en modo splitless a un volumen de 2 μ L.



Resultados y discusión

En este procedimiento se analizaron 8 plaguicidas encontrados en muestras de vino, con el fin de garantizar el cumplimiento de la normativa vigente.

La separación se realizó a través del equipo GC-MS/MS. Se seleccionaron los 8 iones precursores de los analitos presentes. Según las recomendaciones de la Unión Europea se seleccionaron la transición de mayor intensidad para la cuantificación y la de menor intensidad, para poder llevar a cabo la confirmación. Tras el análisis, se han obtenido resultados en el cromatograma de los compuestos seleccionados en el modo “multiple reaction monitoring” (MRM).

Con el objetivo de verificar si la metodología analítica, previamente desarrollada por Santana-Mayor et al. [ARTÍCULO FOODS], es correcta, se realizó un calibrado de la matriz en el rango de concentraciones que nos interesaba. Para ello, fue necesario enriquecer extractos de una matriz de vino tinto libre de residuos de plaguicidas a diferentes concentraciones, e inyectarlos cada uno por triplicado. Se puede considerar que existe una buena linealidad ya que todos los analitos, tienen un R2 superior o muy aproximado al 0,99.

Plaguicida	R2
Boscalida	0,994
Fludioxonil	0,992
Iprodiona	0,989
Kresoxim-metil	0,993
Metalaxil	0,994

Miclobutanil	0,992
Pirimetanil	0,994
Tebuconazol	0,988

FIGURA 1

1.- El método QuEChERS en análisis de vinos:

El vino es uno de los grandes intereses gastronómicos de nuestra cultura, y por lo tanto su análisis es de gran importancia. Mediante la aplicación del método QuEChERS se obtuvieron los siguientes resultados.

Analitos presentes	Recuperaciones (%)
Boscalida	89,3
Fludioxonil	94,9
Iprodiona	99,8
Kresoxim-metil	95,0
Miclobutanil	84,5
Metalaxil	73,5

Pirimetanil	91,9
Tebuconazol	88,4

FIGURA 2

Podemos deducir que de los 8 analitos ha estudiar, 4 de ellos han obtenido una recuperación superior al 90%. Es el metalaxil el analito que se ha recuperado en menor cantidad, en un 73,5 por ciento, y el mayor la iprodiona con un 99,8 por ciento.

Tras el análisis hemos visto que todas las muestras contienen al menos uno de los plaguicidas, y que todos ellos se encuentran en una concentración inferior a su LCL.

Para determinar si estos vinos son dañinos o no para la salud, hay que tomar el límite máximo de residuos (LMR) de la uva de vinificación ya que no existe para el vino en si. Los datos se recogen en la **FIGURA 3** y podemos deducir que ninguna de nuestras muestras analizadas supera el límite establecido.

Plaguicida	LMR(mg/Kg)
Boscalida	5,0
Fludioxonil	1,0
Iprodiona	20,0
Kresoxim-metil	1,0
Metalaxil	1,0

Miclobutanil	1,0
Pirimetanil	5,0
Tebuconazol	1,0

FIGURA 3

2.- Plaguicidas y vinos para la salud

Tras los resultados obtenidos podemos observar que la concentración de plaguicidas es muy baja en las muestras de vino, lo cuál nos dice que es apto para su consumo. Es cierto que habría que realizar un estudio más exhaustivo para poder asegurar que la larga exposición a estos fertilizantes no es nociva para la salud.

De la misma manera, cabe de destacar que el vino tinto posee grandes propiedades para el organismo humano, siempre que se use en la cantidad recomendada. Una de sus grandes propiedades es la prevención de la salud cardiovascular, la cual se limita a un pequeño consumo del mismo.

Los polifenoles favorecen el estado de la microbiota intestinal, evitando las posibles infección bacterianas. Otros estudios aseguran que el etanol del vino, a bajas dosis, puede metabolizar la glucosa, algo muy importante para pacientes que sufran diabetes mellitus tipo 2.

Otro componente importante es el resveratrol, un antioxidante presente en el vino, que según la Academia Americana del Corazón (AHA). Es capaz de mejorar la visión y sobretodo de reducir la presión arterial e incrementar los niveles de HDL.

Es de gran importancia saber que el elevado consumo del mismo puede general daño hepático, hipertensión, arritmia cardiaca e intoxicación alcohólica. Es decir, posee grandes propiedades, pero también puede generar malos hábitos y grandes enfermedades.

Conclusiones

Tras el estudio realizado y los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- El método QuEChERS es una técnica de amplio ámbito de uso que genera grandes resultados.
- El método es rápido y fácil de realizar, ya que simplifica el análisis de varias muestras a la vez.
- La linealidad obtenida del calibrado fue superior a 0,99.
- El porcentaje de recuperación de las muestras es muy elevado.
- Las concentraciones de los analitos son inferior al LCL.
- Todas las muestras analizadas poseen al menos un analito.
- Ninguna muestra supera el LMR establecido para las uvas de vinificación, y por tanto cumplen la normativa vigente.

Bibliografía

- (1) El viaje de Juba, Blog de la Biblioteca de Canarias, (14 de Noviembre de 2016), Biblioteca de la Universidad de La Laguna. Recuperado de <http://bibliotecadecanarias.blogspot.com/2016/11/vinos-de-canarias-historia-y-tradicion.html>
- (2) Piqueras, J. (2005). La filoxera en España y su difusión espacial: 1878- 1926. Cuad. de Geogr. 77: 101-136.
- (3) Directiva 2009/128/CE sobre el uso sostenible de los plaguicidas, orientada a reducir los riesgos ambientales y sanitarios y a mantener la productividad de los cultivos y mejorar el control del uso y distribución de plaguicidas; el Reglamento (CE) n.o 1107/2009 relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y el Reglamento (CE) n.o 1185/2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas, que dispone normas para la recopilación de información sobre las cantidades anuales de plaguicidas comercializadas y utilizadas en cada Estado miembro.
[http://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/78/los-productos-quimicos-y- los-plaguicidas](http://www.europarl.europa.eu/factsheets/es/sheet/78/los-productos-quimicos-y-los-plaguicidas)
- (4) Doménech, J., Plaguicidas Sus Efectos en la Salud Humana. Offarm, vol. 23, núm. 7, 2004, 9-156.
- (5) García, M., Blanco, A. (11 de Junio de 2017). España, campeona de Europa en el uso y abuso de químicos para la agricultura. El Confidencial. Disponible en: https://www.elconfidencial.com/tecnologia/ciencia/2017-06-11/uso-agroquimicos-agricultura-espana_1389564/
- (6) Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. 2003, 86, 412-431.
- (7) B. Socas-Rodríguez, J. González-Sálamo, A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado,. Recent advances and developments in the QuEChERS method,. En: Elena Ibañez, Alejandro Cifuentes. Comprehensive Analytical Chemistry. Estados Unidos: Elsevier; 2017. 319-374.

(8) Comité Europeo para la Estandarización (CEN). Método Estándar UNE-EN 15662:2019. Alimentos de origen vegetal. Método múltiple para la determinación de residuos de plaguicidas mediante análisis basados en GC y LC tras extracción con acetonitrilo y limpieza mediante SPE por dispersión. Método QuEChERS.

Universidad de La Laguna

(9) AOAC Official Method, 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate, AOAC Int., Gaithersburg, USA, 2007.

(10) SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.

(11) Base de Datos: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>

(12) BOE: Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino.

(13) Reglamento (UE) 2018/848 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CE) no 834/2007 del Consejo.

<https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/fitosanitarios/>

(14) Información sobre los beneficios del consumo de vino en el organismo: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/es/beneficios-del-vino-tinto#vista>

(15) Unirioja.es. [citado el 20 de junio de 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1987730>

(16) RAE: definición plaguicidas: <https://dpej.rae.es/lema/plaguicida>