

## CONTROL ANALÍTICO DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN VINO

L. Pérez-Mayán, G. Castro, I. Rodríguez\*, M. Ramil, R. Cela

Institute of Food Analysis and Research (IIAA). CHROMCHEM GI-1626 research group.

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science.

Universidade de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

\* isaac.rodriguez@usc.es

## Introducción

Tradicionalmente, la calidad de los vinos se ha asociado de forma exclusiva a parámetros sensoriales. Así, las denominaciones de origen, a través de sus consejos reguladores, controlan las características organolépticas de los vinos previamente a autorizar su comercialización.

Dentro del sector primario, la producción de uva para vinificación es la práctica agrícola con una mayor tasa de empleo de fungicidas orgánicos por hectárea de cultivo [1]. La aplicación de insecticidas tiene una importancia creciente para controlar plagas que pueden incidir directamente en la productividad de la viña y/o servir como vectores de virus que afecten negativamente al viñedo [2]. Al igual que ocurre en el caso de cualquier otro cultivo, el listado de pesticidas orgánicos autorizados en el viñedo, y sus niveles máximos de residuos (MRLs) en uva de vinificación, se encuentran recogidos en la normativa de la Unión Europea [3]. No obstante, como producto elaborado, el vino no está sometido a la legislación anterior. Por tanto, desde un punto de vista legal, no existen MRLs aplicables directamente a este alimento. Este vacío legal no implica que distribuidoras, importadores y los propios consumidores ejerzan presión sobre el sector productivo para reducir los residuos de plaguicidas de síntesis en el vino. A modo de ejemplo, la OIV (Organización Internacional de la Vid y el Vino) establece como recomendación no sobrepasar en vino el 10% de los MRLs permitidos en uva de vinificación [4].

## Control analítico de residuos de plaguicidas en vino

La Figura 1 muestra la distribución de una selección de cuatro fungicidas empleados en el control de las principales enfermedades que afectan al viñedo (fenhexamida- botritis; metalaxyl e iprovalicarb- mildium; tebuconazole- oidio). Los datos mostrados corresponden a un conjunto de 86 vinos comerciales producidos entre los años 2014 y 2018. Para los cuatro fungicidas, las concentraciones máximas encontradas se sitúan por debajo de los MRLs establecidos en uva; sin embargo, las frecuencias de detección son relativamente elevadas, y los niveles medidos son similares a los obtenidos para vinos elaborados en años previos [5]. Actualmente, las técnicas de espectrometría de masas en tándem ofrecen las mejores prestaciones en cuanto a límites de cuantificación y selectividad para la determinación de residuos de compuestos fitosanitarios en vinos. Teniendo en cuenta los principios activos de uso más común, nos encontramos con la necesidad de usar, al menos, dos técnicas de separación e ionización ortogonales para cubrir el análisis de estos compuestos en métodos *target*.

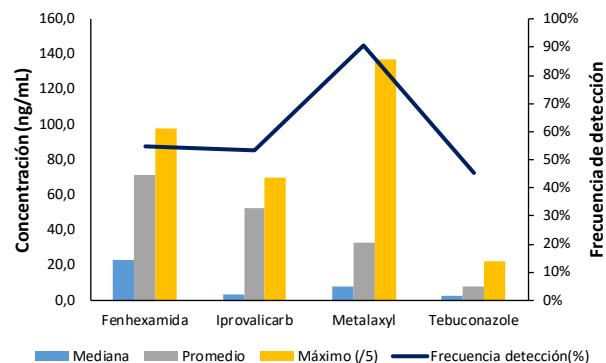


Figura 1. Resumen de concentraciones (ng/mL) y frecuencias de detección de cuatro fungicidas en una población de 86 muestras de vino.

A modo de ejemplo, los principios activos habitualmente empleados en este sector como el par Folpet-Phtalimida (producto de degradación de la materia activa comercial) son difícilmente determinables mediante LC-ESI-MS/MS. Compuestos antibottríticos, ej. iprodiona cuyo uso ha sido prohibido desde la campaña del año 2019 [6], son también más accesibles empleando una metodología de GC-EI-MS, simple o en tándem, en lugar de LC-ESI-MS/MS. Por otro lado, la determinación de fungicidas o insecticidas más polares como carbendazim o clotianidin, no se puede llevar a cabo mediante GC. Un reto común a los laboratorios de control que tratan con este tipo de muestras es simplificar los análisis y su coste. Por tanto, el desarrollo de un protocolo común de preparación de muestra seguido del análisis del mismo extracto mediante GC-EI-MS(MS/MS) y LC(UPLC)-ESI-MS/MS puede suponer una aproximación efectiva en el caso de pesticidas de polaridades medias y bajas.

Métodos de análisis *non-target*

La utilización de pesticidas, en especial fungicidas, en viticultura no sólo es intenso, sino que además es altamente dinámico. Las modificaciones introducidas por la legislación, y la frecuente aparición de fenómenos de resistencia en el viñedo, obligan al sector a variar continuamente los principios activos aplicados. Desde el punto de vista analítico, esta realidad implica, bien la necesidad de actualizar continuamente las metodologías de tipo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), bien el trabajar con métodos abiertos, normalmente basados en espectrometría de masas exactas, que permitan registrar señales de MS y/o MS/MS para un número ilimitado de compuestos. Los registros así obtenidos pueden ser revisados para el *screening* de nuevos fitosanitarios. La figura 2 muestra un posible esquema de trabajo adaptado al *screening* sistemático de residuos de fitosanitarios de

naturaleza orgánica en muestras de vino. El éxito del mismo depende en gran medida de la existencia de bases de datos con relaciones  $m/z$  exactas correspondientes a espectros de EI-MS, ESI-MS y ESI-barrido de iones producto.

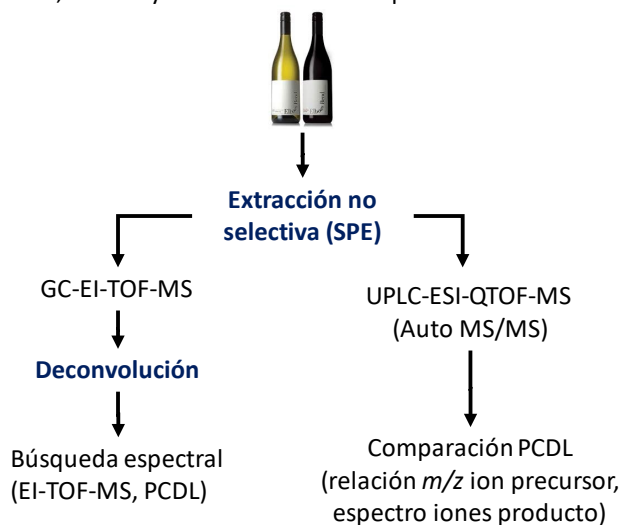


Figura 2. Diagrama de flujo propuesto para el *screening* de residuos de fitosanitarios en muestras de vinos.

Los resultados obtenidos al aplicar el protocolo anterior a tres vinos comerciales se muestran en la figura 3. Los datos presentados se limitan a compuestos a niveles de concentración por encima de 5 ng/mL. Además de los procedimientos de *screening*, el extracto obtenido fue procesado siguiendo un procedimiento de tipo *target* que cubre la determinación de 60 principios activos.

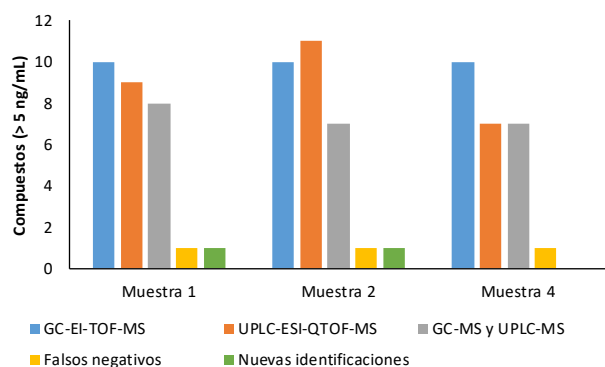


Figura 3. Resultados de la búsqueda de residuos de fitosanitarios en vinos comerciales siguiendo un procedimiento de *screening* no dirigido.

Utilizando librería de masas exactas (EI-MS y ESI-barrido de iones producto), sin datos de tiempos de retención, se detectaron la mayoría de los compuestos cubiertos mediante el protocolo dirigido (MRM), a excepción de un insecticida presente en los tres vinos procesados. Este compuesto representa un ejemplo de un falso negativo y refleja una limitación de la aproximación de minado de datos empleado en el protocolo de *screening non-target*. Por otro lado, los procesos de *screening* indicaron la presencia de un nuevo fitosanitario (valifenalato) en dos de las tres muestras, que no había sido incluido en la lista de transiciones del método *target*.

### Producción ecológica y determinación de trazas de pesticidas

Los productos de agricultura ecológica tienen una presencia creciente en los mercados y un valor añadido frente a los mismos ítems obtenidos siguiendo prácticas agrícolas convencionales. En este sentido, el vino no es una excepción. Los consejos reguladores de agricultura ecológica realizan controles exhaustivos sobre los principios activos empleados por sus asociados; sin embargo, la ausencia del empleo de un determinado plaguicida no garantiza que el producto obtenido esté libre del mismo. El vino representa uno de los mejores ejemplos de este paradigma. Por un lado, los viñedos suelen presentar una elevada concentración geográfica, lo que los hace susceptibles a fenómenos de contaminación cruzada por vía aérea. Por otro lado, las plantaciones tienen vidas medias de varias decenas de años. La garantía total de que la propia planta no almacena pequeños residuos de compuestos sistémicos, que se movilizan al principio de cada primavera, no existe. Con unos métodos de análisis cada vez más potentes no es de extrañar la detección de ciertos fungicidas a valores cuantificables en vinos con etiqueta de producción ecológica. Un ejemplo habitual es la cuantificación de trazas del fungicida metalaxyl, no solo en vinos comerciales [7], sino también en ensayos controlados de producción de uva y microvinificación posterior [8]. Así pues, los avances en la metodología analítica deberían ir paralelos a concienciar al sector de que la ausencia de residuos no sea tal vez el mejor criterio para obtener la etiqueta de producción ecológica. El establecimiento de un pequeño umbral de concentración permitido puede suponer una buena vacuna que evite posibles problemas legales y/o comerciales.

### Retos analíticos en el control de residuos de pesticidas en viticultura

A pesar de los avances espectaculares en espectrometría de masas, la determinación de ciertos pesticidas y/o sus productos de transformación en el vino escapan a las aproximaciones tradicionales de GC-MS y LC-fase reversa-MS. Independientemente de la potencia que ofrezca el espectrómetro de masas, aquellas especies que no sobrevivan a la etapa de aislamiento de la matriz y/o al proceso de separación cromatográfico pasarán inadvertidas al análisis.

A modo de ejemplo, el uso de fungicidas de tipo triazólico en viticultura está relativamente extendido, sobre todo en el control de enfermedades como el oidio. De forma paralela, se han calculado factores de transferencia de estos desde la uva al vino y, también se ha documentado la presencia de estos en el producto final (Figura 1). Sin embargo, apenas existen estudios relativos a sus porcentajes de transformación en 1,2,4-triazol. Una razón probable es la dificultad de determinar esta molécula polar, y no iónica, mediante métodos de LC en fase reversa o empleando columnas de modo mixto.

Otro ejemplo de un residuo apenas estudiado en vino es el Fosetyl. Su uso en viticultura, como complejo con aluminio,

está muy extendido. Sin embargo, recuperar esta especie polar e iónica de una matriz etanol-agua es incluso más complicado que en el caso de otras matrices de origen vegetal (ej. frutas) para las cuales los procedimientos de extracción con metanol acidificado (método QuPPE) resultan una opción viable.

Otro principio activo difícilmente controlable en el vino es el glifosato. A través del empleo de técnicas de inmunoensayo se ha alertado sobre la existencia de residuos de glifosato en un número significativo de muestras de vino [9]. Los niveles reportados no son relevantes en relación con el MRL del compuesto en uva de vinificación (500 ng/g, de acuerdo con la legislación europea). Sin embargo, el hecho de que la aplicación de glifosato se realice sobre el suelo del viñedo, normalmente antes de que broten las plantas, y la proliferación de noticias en relación con la toxicidad del herbicida ha dado cierta trascendencia a los datos, a la vez que ha despertado la curiosidad científica acerca del mecanismo de contaminación y la veracidad de una información no contrastada mediante una técnica de espectrometría de masas.

Determinar residuos de glifosato a niveles de pocos ng/mL en muestras de vino, en particular en vinos tintos, no es tarea sencilla. Por un lado, los métodos de determinación directa, ej. usando columnas de LC de carbón o de modo mixto, exigen que el compuesto no forme complejos con cationes metálicos existentes en el propio vino, la columna y/o las conexiones del sistema de LC/UPLC. Probablemente, el uso de equipos bio-inertes combinados con sistemas de QqQ de alta gama presente las mejores garantías de éxito. Una opción más lenta, pero más asequible económicamente, es la derivatización con FMOC-Cl seguido de la determinación del compuesto mediante LC, en fase reversa, y MS/MS. El protocolo anterior implica el uso de un medio básico para llevar a cabo la reacción de derivatización. El problema de ajustar el pH de un vino a valores básicos (pH 10-11) radica en la precipitación de los componentes de la muestra. Solucionar este problema implica buscar de nuevo en la caja de herramientas del Químico Analítico. La figura 4 muestra las fotografías correspondientes a los extractos de un mismo vino aplicado de forma directa el proceso de derivatización con FMOC-Cl seguido de la concentración del producto de reacción (izquierda), y empleando un polímero impreso molecularmente (MIP) para el aislamiento del glifosato de la matriz de vino, previamente al proceso de derivatización y concentración del compuesto derivatizado (derecha).

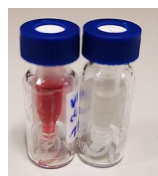


Figura 4. Extractos de vino tinto obtenidos durante el análisis de glifosato derivatizado con FMOC-Cl. Derivatización directa sobre el vino diluido (izquierda). Extracción previa usando un MIP seguida de derivatización con FMOC-Cl (derecha).

Combinando este tratamiento con una etapa de determinación mediante LC-(fase reversa)-ESI-MS/MS, empleando un equipo de gama media, es posible alcanzar límites de cuantificación a nivel de 1-2 ng/mL. La aplicación

de este protocolo a vinos comerciales permitió detectar, en algunos casos, la presencia de bajos niveles de concentración de este herbicida en el vino, figura 5. La cuestión por responder está en encontrar el mecanismo por el cual el herbicida alcanza este alimento.

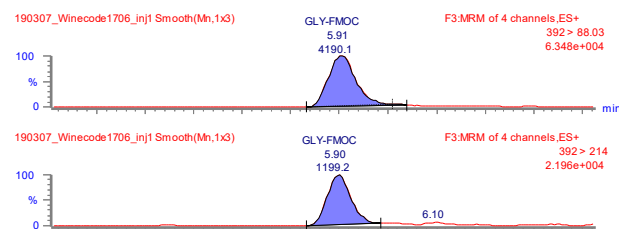


Figura 5. Cromatogramas correspondientes a la transición de cuantificación (392>88) y cualificación (392>214) para glifosato en una muestra de vino sin adición del herbicida.

### Conclusiones

Los métodos convencionales de GC-EI-MS y UPLC-ESI-MS/MS representan la opción más habitual para el control de fitosanitarios de polaridades medias y bajas en vinos comerciales. Adicionalmente, la detección de principios activos menos comunes, posibles productos de metabolización de fitosanitarios y el control de especies altamente polares requiere el diseño de nuevas estrategias analíticas, incluyendo el uso de metodologías de *screening* basadas en la espectrometría de masas exactas, el empleo de modos de separación alternativos a la fase reversa, y/o la aplicación de protocolos de extracción altamente selectivos, compatibles con la elevada complejidad y las características propias de la matriz del vino. La información proporcionada por estas nuevas aproximaciones es fundamental para interpretar el comportamiento de los fitosanitarios en el sistema uva-vino, a la vez que pueden servir de base a una futura legislación específica relativa a MRLs de fitosanitarios en vino.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio Español de Ciencia, Innovación y Universidades, y el Programa Interreg SUDOE de la Unión Europea (proyectos PGC2018-094613-B-I00 y SOE1/P2/F0246). L.P.M agradece un contrato predoctoral (FPU16/03942) al Ministerio de Educación.

### Referencias

- [1] Endure Deliverable DR1.23 Pesticide use in viticulture. [www.endure-network.eu/](http://www.endure-network.eu/)
- [2] F. Tacoli et al., *Crop Protection*, 111 (2018) 50-57.
- [3] <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/>
- [4] [www.oiv.int/es](http://www.oiv.int/es)
- [5] T. Rodríguez-Cabo et al., *J. Chromatogr. A*, 1442 (2016) 107-117.
- [6] Reglamento (UE) 2019/38 de 10 de Enero de 2019.
- [7] G. Castro et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 1139-1150.
- [8] [www.vinovert.eu](http://www.vinovert.eu)
- [9] T. Glaze et al., 2017, doi 10.13140/RG.2.2.25271.21925.