

Universidad Nacional de Cuyo
Facultad de Ciencias Agrarias

METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS BENCIMIDAZOLES EN VINOS

TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Irma Alejandra Molina
Mendoza, 2012

METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS BENCIMIDAZOLES EN VINOS

TESIS DE GRADO LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Irma Alejandra Molina

Ruta 15 Km 24, Luján de Cuyo, Mendoza

Cel: (0261)155612341

irmamolina07@hotmail.com

Directora de Tesis: Ing. Agr. Lucía Vignoni

Co- Directora: Mgter. Ing Agr. Laura Cánovas

Comité evaluador: Presidente: Dra. Alejandra Beatriz Camargo

Vocal: Dr. Ing. Agr. Juan Carlos Formento

Vocal: Ing. Agr. Hugo Galiotti

Vocal suplente: Lic. Qca. Rosa Medina

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por darme fuerza para luchar por el logro de este objetivo, por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de toda mi carrera y mis proyectos.

A mis amigos y compañeros de trabajo que me acompañaron y me alentaron para que pudiera terminar el texto final.

A la Ing. Agr. Lucía Vignoni y Mgter. Ing. Agr. Laura Cánovas quienes con su amistad y sabiduría me apoyaron en la culminación de la investigación

A la Lic. Maria Eugenia Buljan y al Ing Juan Carlos Najul por permitirme difundir los conocimientos obtenidos en el laboratorio de Residuos de Plaguicidas de INTI Mendoza y permitirme utilizar sus instalaciones, equipos e insumos.

A todas aquellas personas que en alguna forma participaron en mis estudios y me enseñaron con su ejemplo.

Y a Dios que me dio la fortaleza para terminar mi carrera.

RESUMEN

En los últimos 10 años, la Argentina se ha incorporado a los países exportadores de vinos, en el decimoprimer lugar con productos de excelente calidad (INV, 2011). Entre los atributos que conforman los aspectos de calidad e inocuidad de los vinos se destaca el cumplimiento de los Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas permitidos por las diversas legislaciones según el destino comercial de los mismos. Para los productos procesados, se considera como LMR el establecido para el producto en bruto. Por ejemplo, para productos procesados como el vino se aplica los LMR establecidos en la uva (The Australian Wine Research Institute, 2012). En Argentina, el Instituto Nacional de Vitivinicultura no establece LMR de plaguicidas para el vino por lo que se consideran los LMR establecidos para uva por SENASA en su Resolución 934/10.

En la actualidad, benomil y carbendazim son los fungicidas bencimidazoles más utilizados en el cultivo de la vid para controlar la podredumbre de los racimos. El problema mayor se presenta cuando son necesarias aplicaciones en épocas muy cercanas a cosecha, permitiendo el pasaje de residuos de estos fungicidas desde uvas al mosto y luego al vino. En nuestro país está legislada la cantidad máxima de estos plaguicidas en uva en fresco, 3 ppm para benomil al igual que para carbendazim (SENASA, Resolución 934/10). El *Codex alimentarius* establece un LMR de 3 ppm para carbendazim en uva en fresco y no establece un LMR para el benomil. La Unión Europea establece un LMR de 0,5 ppm para el benomil y carbendazim (suma de benomil y carbendazim expresado como carbendazim). De esta manera es importante su determinación para evitar rechazos y de esta forma proteger la imagen y calidad de la producción nacional y garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar una metodología analítica validada en vegetales, basada en el método de Jullie Fillion, 1998, para la determinación de residuos de plaguicidas bencimidazoles (benomil y carbendazim) en vinos. Este método consiste en una extracción con acetato de etilo, posterior conversión del benomil a carbendazim y concentración e inyección en cromatógrafo líquido de alta resolución y detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

Los parámetros que se evaluaron fueron: selectividad, linealidad, exactitud y precisión. Los valores obtenidos cumplieron con los criterios de aceptación establecidos por el SENASA en su Resolución 138/2002, el *Codex alimentarius*, 1999 y Quatrocchi, 1992. Con esto se puede concluir que se obtuvo un método confiable con el cual controlar los niveles de contaminación de benomil y carbendazim en los vinos. Esto es una herramienta importante para la industria vitivinícola ya que para proteger la imagen y calidad de sus productos y garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores, deberá implementar programas de monitoreo de residuos de plaguicidas para prevenir que éstos se encuentren en el producto terminado.

ÍNDICE:

Capítulo I: MARCO TEORICO

Introducción	1
1 Plaguicidas	2
1.1 Definición	2
1.2 Toxicidad de los plaguicidas	2
1.3 Clasificación de los plaguicidas	3
1.4 Residuos de plaguicidas	4
1.5 Bencimidazoles	6
1.5.1 Benomil	6
1.5.2 Carbendazim	7
1.5.3 Clasificación	7
1.5.4 Propiedades físico-químicas	7
1.5.5 Propiedades toxicológicas	9
1.5.5.1 Toxicocinética de plaguicidas bencimidazoles	10
1.5.5.2 Toxicodinámica de plaguicidas bencimidazoles	11
1.5.5.3 Efectos en la salud	12
2 Análisis de residuos de plaguicidas en alimentos	13
2.1 Introducción	13
2.2 Extracción y clean-up de residuos de plaguicidas	14
2.3 Concentración de los analitos de interés	16
2.4 Análisis cromatográfico	16
2.5 Determinación de residuos de plaguicidas bencimidazoles	18
3 Vinos	23
3.1 Introducción	23
3.2 La vitivinicultura argentina	24
3.3 Residuos de plaguicidas en el vino	27
3.4 Residuos de plaguicidas bencimidazoles en el vino	28
3.5 Marco legal: Bencimidazoles y el vino	30
4 Objetivos	33
5 Hipótesis de trabajo	33

Capítulo II: MARCO EXPERIMENTAL

1 Materiales y Métodos	34
1.1 Materiales y equipos de laboratorio	34
1.2 Método analítico seleccionado	34
1.3 Parámetros evaluados	36
1.3.1 Selectividad	36
1.3.2 Linealidad	36
1.3.3 Precisión	37
1.3.4 Exactitud	37
2 Resultados y Discusión	37
2.1 Determinación de la selectividad del método analítico	37
2.2 Determinación de la linealidad de la curva de calibración	40
2.3 Precisión del método	41
2.4 Exactitud del método	42
3 Conclusiones	44

Capítulo III: BIBLIOGRAFÍA

45

Capítulo IV: ANEXOS

Anexo 1	49
Anexo 2	55

INTRODUCCIÓN

La seguridad alimentaria es un tema de creciente interés social, ya que todos los ciudadanos, como consumidores, estamos expuestos a los tóxicos o sustancias potencialmente tóxicas presentes en los alimentos, y afectados por las prácticas empleadas en la producción, procesado, preparación, conservación y manejo de los alimentos (Cameán y Repetto, 2006).

A los contaminantes se les ha dado una categoría especial dentro de la toxicología de alimentos, ya que son compuestos que en un momento dado podrían poner en peligro la salud del consumidor, sobre todo por que no se espera encontrarlos como parte de una dieta; sin embargo varios de estos compuestos son necesarios para garantizar alimentos y evitar hambrunas. Los contaminantes pueden ser muy variados, plaguicidas, metales tóxicos, elementos radioactivos, antibióticos, hormonas, etc (Valle Vega, 2000).

La incidencia de intoxicaciones humanas a partir de residuos de plaguicidas en alimentos normalmente es baja. Sin embargo, el interés del consumidor permanece siendo elevado. La toxicidad aguda de estos compuestos es solo marginalmente relevante en el campo de la toxicología alimentaria, ya que ordinariamente se está expuesto a bajos niveles de plaguicidas. Sin embargo, en la exposición crónica a través del consumo de alimentos que contengan residuos de plaguicidas, los riesgos toxicológicos se centran en su potencial carcinógeno, mutágeno y teratógeno, así como en su posible actividad como disruptores endócrinos (Cameán y Repetto, 2006).

Además, actualmente ocupa uno de los primeros lugares de discusión a nivel mundial dado que afectan la comercialización libre de alimentos tanto entre países como dentro de sus propios límites, por entidades oficiales y privadas (Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina , 2011).

Es importante entonces, contar en nuestro medio con herramientas analíticas que permitan determinar residuos de plaguicidas en alimentos, de manera de comprobar el cumplimiento de las normativas vigentes, permitiendo así a las empresas, mejorar la competitividad de sus productos en el mercado interno como externo y garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores.

1. PLAGUICIDAS

1.1 Definición

Según el *Codex Alimentarius*, un "plaguicida" es cualquier sustancia destinada a impedir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o piensos, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. El término excluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios y medicamentos veterinarios.

Las preparaciones de los plaguicidas incluyen, además del principio activo (Henao y Nieto, 2003):

- Sustancias transportadoras, usualmente diluyentes.

- Aditivos que modifican las propiedades físico-químicas, otorgándole características tales como absorción, retención y adhesión. Hay que tener en cuenta las consecuencias de estas sustancias, que, por sí solas, constituyen gran parte del producto comercial y sus potenciales efectos adversos a veces pueden exceder el de los ingredientes activos.

- Otras sustancias que pueden tener efectos adversos y que también están presente en los plaguicidas son las impurezas

1.2 Toxicidad de los plaguicidas

La toxicidad de los plaguicidas depende de varios factores, su concentración en la formulación, el vehículo que acompaña al principio activo, el tipo de formulación (gas, líquido, sólido), los medios de aplicación y de empleo (pulverización, dispersión, etc.) y las condiciones de utilización. Pero el factor principal que condiciona la toxicidad de estos productos depende de la vía de penetración y su posterior efecto en el organismo (Derache, 1990):

- La penetración por *vía respiratoria* es la más peligrosa ya que el aire de los pulmones y la sangre circulante están en contacto directo con el plaguicida.

- La penetración por *vía dermal* depende de la afinidad del producto (liposolubilidad) por la barrera cutánea, el estado de la piel y de la superficie expuesta.

- La penetración por *vía oral* es excepcional (suicidios, accidentes) para cantidades importantes, pero si debe considerarse en el caso de ingestiones repetidas de pequeñas cantidades.
- Finalmente factores como la edad, sexo, factores genéticos, enfermedades previas, pueden modificar considerablemente la toxicidad de los plaguicidas.

Una vez dentro del organismo, los tóxicos son eliminados normalmente por el aire espirado, las heces o la orina. En la mayoría de los casos sufren previamente una metabolización, especialmente en el hígado; a pesar de que generalmente estas transformaciones terminan en productos hidrosolubles, menos tóxicos y por lo tanto fácilmente eliminables; en algunos casos pueden formarse metabolitos intermedios más tóxicos o reactivos que el producto original. Estos productos y/o sus metabolitos pueden almacenarse en ciertos órganos o tejidos como el adiposo donde se concentran fácilmente (Derache, 1990).

La toxicidad también se puede medir a través de *la Dosis Letal Media* (DL_{50}), que representa la cantidad de sustancia necesaria para matar el 50% de los animales de un lote experimental, sólo es válida para la especie ensayada (rata, conejo, perro, etc.) y para una determinada vía de administración (oral, dermal, respiratoria); se expresa en mg o g del producto por kg de animal.

1.3 Clasificación de los Plaguicidas

Es importante conocer las tres formas principales de clasificar los plaguicidas (Henaó y Nieto, 2003):

- 1) Según el tipo de organismo que se desea controlar podemos mencionar: Insecticidas, Fungicidas, Herbicidas, Rodenticidas, Nematicidas, etc.
- 2) Según el grupo químico: Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos, Piretroides, Bencimidazoles, Tiocarbamatos, etc.
- 3) Según la toxicidad aguda: La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado - sujeta a actualizaciones periódicas - una clasificación de plaguicidas según el grado de peligrosidad, entendiendo ésta como su capacidad de producir daño agudo a la salud cuando se dan una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto. Esta clasificación se basa en la DL_{50} aguda, por vía oral o dérmica en ratas (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación toxicológica de los productos fitosanitarios

Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación Líquida DL ₅₀ Aguda (mg/kg)		Formulación Sólida DL ₅₀ Aguda (mg/kg)	
	Oral	Dermal	Oral	Dermal
Clase Ia Producto sumamente peligroso	20 o menos	40 o menos	5 o menos	10 o menos
Clase Ib Producto muy peligroso	21 a 200	41 a 400	6 a 50	11 a 100
Clase II Producto moderadamente peligroso	201 a 2000	401 a 4000	51 a 500	101 a 1000
Clase III Producto poco peligroso	2001 a 3000	Mayor a 4001	501 a 2000	Mayor a 1001
Productos que normalmente no ofrecen peligro	Mayor a 3001		Mayor a 2001	

Fuente: Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 2011

1.4 Residuos de plaguicidas

Según el *Codex alimentarius* por "residuo de plaguicida" se entiende cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción, y las impurezas consideradas de importancia toxicológica.

El uso de plaguicidas trae como consecuencia la aparición de residuos de dichos productos sobre los vegetales en el momento de cosecha y que pueden ocasionar efectos tóxicos en los seres vivos. Es por ello que en la actualidad la mayoría de los países tienen establecidas listas legales de Límites Máximos de Residuos (LMR) de diversos plaguicidas en distintos productos agrícolas, especialmente frutas y hortalizas.

El LMR es la cantidad máxima de residuo de un determinado plaguicida sobre un determinado producto agrícola permitida por Ley. Es decir que es la concentración permitida de un residuo de plaguicida en un alimento que puede aceptarse para el consumo humano o animal a largo plazo. Se expresa en miligramo (mg) de plaguicida por kilogramo (kg) de peso de alimento en fresco (ppm) (Coscolla, 1993).

Para su determinación se tienen en cuenta dos criterios: uno toxicológico y otro agronómico. Esto es lógico puesto que, por una parte, la ingestión diaria de residuos de plaguicidas ha de ser tal que se tenga la seguridad de que no provocará efectos nocivos (criterio toxicológico) y, por otra, el

plaguicida ha de lograr una eficacia adecuada sobre la plaga a combatir con la menor utilización posible (criterio agronómico) (Coscolla, 1993).

El *criterio toxicológico* tiene en cuenta la ingestión diaria del plaguicida a lo largo de toda una vida, sin que se produzcan efectos adversos a la salud de los consumidores, según los conocimientos que actualmente se poseen. Se establecen las siguientes etapas para su determinación (Coscolla, 1993):

- se obtiene el NOEL (*non observed effect level*), que representa la cantidad de plaguicida que, ingerido diariamente durante toda la vida de los animales en experimentación, no les provoca efectos nocivos. Se expresa en mg de plaguicida por kg de peso del animal y día (mg/kg y día).

- para poder extrapolar el dato obtenido de animales en laboratorio a la especie humana se divide el NOEL 100 veces, porque es la cifra que se toma como coeficiente de seguridad. Esto se debe a que se considera que el hombre puede ser más sensible a los residuos que los animales en experimentación, hasta 10 veces más y que mientras que los animales en los lotes en experimentación son homogéneos, la población humana es heterogénea y puede haber mayor sensibilidad en ciertos individuos como niños, ancianos, enfermos, etc. 10 veces más. Se obtiene así la Ingesta Diaria Admisible (IDA), que se expresa como mg de plaguicida por kg de peso del hombre y día (mg/kg y día). Según la FAO/OMS representa la cantidad de residuo de plaguicida que, ingerida diariamente durante una vida entera, no muestra riesgos apreciables.

- luego se determina el “nivel permisible” de residuo para el hombre en alimentos. Para esto se multiplica la IDA por el peso promedio del hombre (se estima en 60kg) y se divide por el factor alimentario (promedio *per cápita* del consumo del alimento que se sospecha que contiene los residuos de plaguicida en consideración). Representa el máximo nivel toxicológico que nunca puede superarse y se expresa en mg de plaguicida por kg de alimento (mg/kg o ppm).

El *criterio agronómico* se establece a través de ensayos de campo con el fin de conocer el residuo real del plaguicida objeto de estudio que queda sobre los alimentos, cuando son tratados bajo Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Se entiende por BPA las condiciones de empleo de un plaguicida, necesarias y suficientes, para lograr el grado de protección deseado respecto al parásito o a la enfermedad combatida. Dicho en otras palabras, se trata de conseguir una eficacia en la protección fitosanitaria del cultivo, y al mismo tiempo, minimizar los riesgos toxicológicos y ambientales. Ello se consigue eligiendo las alternativas menos contaminantes, tratando sólo cuando sea necesario, no superando las dosis recomendadas, respetando ciertos plazos de seguridad tras la aplicación, etc. El residuo de plaguicida que quede aplicado en los ensayos a campo debe ser inferior al nivel permisible y es el que normalmente se toma como LMR (Coscolla, 1993).

Se debe tener en cuenta que el LMR es un concepto meramente legal, más que estrictamente toxicológico. Por otra parte las cifras que los expresan están en continuos cambios en el tiempo y en el espacio. En el tiempo porque continuamente hay nuevos aportes científicos, aparecen nuevas plagas y disminuye la gravedad de otras, se amplían las autorizaciones de uso de algunos plaguicidas, se reducen las de otros, algunos se retiran, aparecen plaguicidas nuevos, etc. Y en el espacio porque entre los distintos países hay diferencias, además de la dieta media, sobre todo en los criterios de BPA y en las autorizaciones de plaguicidas (Coscolla, 1993).

1.5 Bencimidazoles

Los fungicidas pertenecientes a este grupo son sistémicos, es decir que atraviesan la cutícula y translocan vía floema hacia otros puntos distantes de la planta. Estos controlan hongos endófitos o de crecimiento interno como: *Fusarium*, *Monilia*, *Botritis*, etc. (Ascomycetes) (Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 2011).

Este grupo de fungicidas tienen poco efecto inhibitorio en la germinación de esporas de hongos sensibles, pero dependiendo de la concentración y del medio de cultivo, alteran el desarrollo del tubo germinativo, la multiplicación celular e inhiben fuertemente el crecimiento de las hifas y de los haustorios de los hongos sensibles (Derache, 1990).

1.5.1 Benomil (BEN)

Es un fungicida sistémico. Su acción es preventiva y curativa, controlando a los hongos patógenos antes de su penetración en las plantas o bien cuando la infección recién se ha producido. Este compuesto es rápidamente degradado a carbendazim, siendo éste último su principal producto de degradación (Figura 1) (Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 2011).

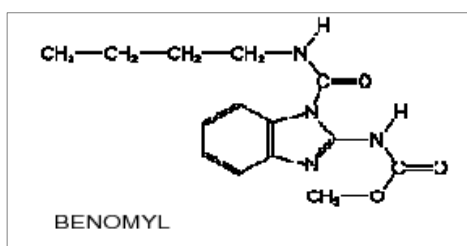


Figura 1: Estructura química del Benomil (Metil 1-butilcarbamoil-2-bencimidazol-carbamato)

Fuente: Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 2011.

1.5.2 Carbendazim (CAZ)

Es un fungicida polivalente y sistémico, que se absorbe por los órganos verdes y las raíces de los vegetales siendo su persistencia de acción de 2 a 3 semanas (Figura 2) (Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 2011).

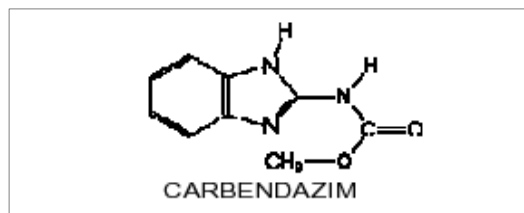


Figura 2: Estructura química del Carbendazim (2-metoxicarbamoil-bencimidazol ó metil bencimidazol-2-ilcarbamato)

Fuente: Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 2011

1.5.3 Clasificación

El Benomil y Carbendazim se clasifican (Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 2011):

- según el organismo que se desea controlar: hongos, Fungicidas
- según el modo de acción: Fungicidas sistémico
- según la estructura química del principio activo: Fungicidas bencimidazoles
- según su toxicidad aguda (del producto formulado):

Benomil: Productos que normalmente no ofrecen peligro

DL₅₀ oral aguda > 10000 mg/kg (rata)

Carbendazim: Productos que normalmente no ofrecen peligro

DL₅₀ oral aguda >15000 mg/kg (rata)

1.5.4 Propiedades físico-químicas

Para determinar la peligrosidad de los plaguicidas se deben conocer cuales son sus propiedades físicas y químicas (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, ENVIROMENTAL HEALTH CRITERIA 148 Benomyl, ENVIROMENTAL HEALTH CRITERIA 149 Carbendazim, 1993 (IPCS; EHC 148 y EHC 149, 1993)):

- *Presión de vapor*: determina su volatilidad, consiste en el flujo del compuesto hacia la fase aire y supone uno de los mecanismos de pérdida de masa hacia la atmósfera. Su mayor o menor intensidad depende de la presión de vapor del compuesto, de manera que los compuestos con alta presión de vapor tenderán a volatilizarse.
- *Solubilidad en agua*: es el primer factor a considerar en el proceso de lixiviado de los plaguicidas en el suelo hacia los mantos freáticos. La mayoría de los plaguicidas químicos son de bajo peso molecular y poco soluble en agua (en general se puede decir que los compuestos con baja solubilidad y alta presión de vapor difícilmente contaminarán las aguas subterráneas).
- *Coefficiente de partición octanol- agua (Kow)*: es una propiedad importante porque esto puede proporcionar un indicio de la solubilidad de éstos residuos en diferentes solventes y permite conocer si la sustancia es liposoluble lo cual indica que se concentrará a través de la cadena alimentaria en material biológico lipídico.
- *Coefficiente de reparto*: es la retención del plaguicida debida a la adsorción por el suelo, esto no afecta a la cantidad total del plaguicida presente en el suelo pero puede disminuir e incluso eliminar la cantidad disponible para el transporte.

En la Tabla 2 se presentan las propiedades fisicoquímicas del Benomil y Carbendazim.

Tabla 2: Propiedades fisicoquímicas de Benomil y Carbendazim

Propiedad	Plaguicida	
	Benomil ₁	Carbendazim ₂
Estado físico	Sólido en polvo cristalino	Sólido cristalino
Color	Blanco	Blanco
Densidad	No establecida	1,21 g/cm ³ a 20°C
Presión de vapor a 20°C	< 5 x 10 ⁻⁶ Pa	< 1 x 10 ⁻⁷ Pa
Coefficiente de partición octanol/agua	1,4	1,49
Solubilidad a 25°C:		
Agua	Ninguna	Dispersable
Metanol	Soluble	Soluble
Acetona	Soluble	Soluble
Tolueno	Soluble	Soluble
Coefficiente de reparto	entre 1000 y 3600	entre 1000 y 3600

Fuente: 1: Fichas Internacionales de Seguridad química 1994 y IPCS; EHC 148 1993

2: Bayer Crops Science, Hoja de seguridad 2005 y IPCS; EHC 149 1993

Benomil (BEN) y carbendazim (CAZ) tienen baja presión de vapor y baja solubilidad en agua, son solubles en acetona, tolueno y metanol.

En estudios de campo se ha puesto de manifiesto que BEN y CAZ quedan retenidos en la capa superficial del suelo (tienen una intensa adsorción en el suelo). En la evaluación realizada en un modelo de selección, basado en datos de adsorción y persistencia, se puso de manifiesto que no había riesgo de lixiviación. En los Estados Unidos se han efectuado análisis de agua de pozos que confirman esto, puesto que no se encontraron trazas de BEN ni CAZ en ninguno de los 212 pozos muestreados, por esto es de suponer que estén fuertemente adsorbidos en los sedimentos (IPCS; EHC 148 y EHC 149, 1993).

El valor del periodo de vida media da una idea acerca de la persistencia del plaguicida. Cuando un plaguicida resiste los procesos de transformación y además no se evapora será muy persistente y potencialmente podrá contaminar las aguas subterráneas. Esto es particularmente cierto si el plaguicida es altamente soluble en agua y no permanece adsorbido en el suelo. En el medio ambiente, el BEN se transforma rápidamente en carbendazim, con una vida media de 2 y 19 h en el agua y en el suelo, respectivamente. El CAZ se descompone en el medio ambiente, con una vida media de 6 a 12 meses en el suelo desnudo, de 3 a 6 meses en el césped y de 2 y 25 meses en el agua en condiciones aerobias y anaerobias, respectivamente. La descomposición se debe sobre todo a la acción de los microorganismos. No se ha observado que estos fungicidas se acumulen en ningún sistema biológico (IPCS; EHC 148 y EHC 149, 1993).

1.5.5 Propiedades Toxicológicas

El BEN y el CAZ son clasificados como productos que normalmente no ofrecen peligro. Benomil tiene una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 0,01 mg/kg de peso corporal (ppm), el carbendazim tiene una IDA de 0,03 mg/kg de peso corporal (ppm) (CODEX, 2010).

En la Tabla 3 se muestra la información toxicológica de los bencimidazoles en estudio.

Tabla 3: Información toxicológica del benomil y carbendazim.

Toxicidad		Producto	
		Benomil	Carbendazim
DL ₅₀ oral aguda para ratas		Mayor a 10000 mg/kg	Mayor a 15000 mg/kg
Irritación		Puede causar irritaciones en ojos, nariz, garganta y piel	Puede causar irritaciones en ojos, nariz, garganta y piel
Riesgos Ambientales	Abejas	Ligeramente tóxico	Virtualmente no tóxico
	Aves	Prácticamente no tóxico	Prácticamente no tóxico
	Peces	Extremadamente tóxico	Moderadamente tóxico

Fuente: Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina, 2011

1.5.5.1 Toxicocinética de plaguicidas bencimidazoles

Es el estudio del conjunto de procesos dentro del organismo vivo que determinan la cantidad de tóxico que será capaz de tomar contacto con el sistema biológico específico con el que reacciona. Incluye los procesos de absorción, distribución, metabolismo o biotransformación y eliminación y determina la disponibilidad biológica del tóxico (Valle Vega, 2000).

-Absorción: BEN y CAZ se absorben fácilmente tras la exposición oral y respiratoria, pero mucho menos después de una exposición cutánea. Una vez que ingresan al organismo, se *distribuyen* por el flujo sanguíneo y llegan a diferentes órganos y sistemas. Los órganos en los que estos bencimidazoles son detectados en mayor cantidad son: el hígado, testículos y riñones (IPCS; EHC 148 y EHC 149, 1993).

-Metabolismo: los animales superiores han desarrollado un número de sistemas metabólicos que convierten los agentes xenobióticos liposolubles en metabolitos hidrosolubles capaces de ser excretados por las vías de eliminación. A esta actividad bioquímica se le ha denominado proceso de biotransformación, el cual se ha dividido a su vez en dos grandes grupos de actividad enzimática: reacción de Fase I y Fase II (Valle Vega, 2000):

- Reacciones fase I: La función de este tipo de reacciones, es modificar la estructura química de la molécula, por introducción de grupos funcionales como son hidroxilo, amino, carboxilo

entre otros. También, se puede obtener una mayor polaridad del agente xenobiótico por exposición de grupos funcionales como es el proceso de hidrólisis.

- **Reacciones de fase II:** Este tipo de reacciones metabólicas son de biosíntesis por lo cual requieren de un gasto energético. Las reacciones de fase II también se denominan como reacciones de conjugación, involucran la adición a los compuestos xenobióticos de moléculas endógenas, las cuales generalmente son polares y de alta disponibilidad por parte del organismo. El propósito final es de obtener moléculas polares y con bajo coeficiente de partición lípido/agua, para que se facilite su excreción al disminuir substancialmente su carácter lipofílico.

En los sistemas animales el BEN se descompone formando CAZ y éste se metaboliza a (5-hidroxi-1H-bencimidazol-2-il)-carbamato (5-HBC) y otros metabolitos polares, que se excretan rápidamente. No se ha observado que el BEN o CAZ se acumule en el organismo (IPCS; EHC 148 y EHC 149, 1993).

- *Eliminación:* BEN y CAZ se excretan por la orina y las heces (IPCS; EHC 148 y EHC 149, 1993).

1.5.5.2 Toxicodinámica de plaguicidas bencimidazoles

Es el estudio de la interacción de la sustancia tóxica con el tejido o la célula. Se refiere a los efectos tóxicos que provocan en el organismo humano (Henao y Nieto, 2003).

A partir de estudios bioquímicos se estableció el modo de acción de estos fungicidas. Benomil se degrada a carbendazim bajo condiciones naturales y es este último compuesto el que ejerce realmente la acción antimicótica ya que posee afinidad por la tubulina del hongo patógeno. Se forma un complejo carbendazim-tubulina (proteína estructural de los microtúbulos que forman las fibras del huso mitótico), debido a que el carbendazim tiene una analogía estructural con las bases púricas (adenina, guanina) por lo que sustituiría estas bases en los ácidos nucleicos provocando anomalías en la transmisión de información genética. Este complejo es irreversible y bloquea el ensamblaje de los microtúbulos impidiendo de esta manera el proceso de división celular y los mecanismos de transporte intracelulares (Derache, 1990).

Si bien BEN y CAZ tienen una toxicidad selectiva para distintas especies, que se explica por que se unen de manera distinta a los microtúbulos de las especies específicas en las que actúan y en las que no, son citotóxicos y esto implica un riesgo potencial de efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos para seres humanos (Derache, 1990).

1.5.5.3 Efectos en la salud

Si bien el BEN y CAZ son de baja toxicidad aguda, están relacionados con múltiples efectos crónicos en la salud. Los efectos incluyen toxicidad hepática, toxicidad para el desarrollo como malformaciones en los ojos del feto, malformaciones en el cerebro y aumento de la mortalidad y efectos reproductivos (principalmente en los testículos). Ambos fungicidas son considerados posibles cancerígenos para seres humanos (RAP-AL, 2008):

Toxicidad aguda: BEN y CAZ poseen baja toxicidad aguda en los mamíferos, pero la exposición puede provocar enrojecimiento e irritación en la piel y ojos de las personas así como alergias. El contacto por inhalación produce síntomas como calambres abdominales, pesadez, salivación, sudoración, náuseas y vómitos. Por ingestión, produce náuseas y vómitos.

No es inhibidor de colinesterasa.

Toxicidad crónica:

- *Efectos cancerígenos:* la Environmental Protection and Toxic Substances (EPA) clasifica al BEN y CAZ como posibles cancerígenos para seres humanos. Las pruebas sobre el efecto cancerígeno son limitadas, por ausencia de datos en seres humanos. Por su parte, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) los considera “no clasificables en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos”, pero ha propuesto reevaluar su clasificación.
- *Efectos reproductivos:* diversas pruebas en animales de laboratorio han mostrado que estos fungicidas pueden tener consecuencias en la reproducción. En una investigación con ratas, las crías mostraron una disminución en su supervivencia y fertilidad, en los machos se detectaron constantes disminuciones en el tamaño de los testículos y de las glándulas adicionales. También se presentó una baja en la actividad de sus espermatozoides.
- *Efectos teratogénicos:* la EPA los clasifica como teratogénicos, con evidencias de malformaciones congénitas en los ojos y el cerebro, y aumento de mortalidad infantil. Además, destaca sus efectos reproductivos (testiculares) y la formación de tumores. Asimismo, pueden ocasionar disfunciones en la fertilidad y defectos congénitos.
- *Efectos mutagénicos:* la mayoría de los estudios in vitro en células de mamíferos pone en evidencia efectos mutagénicos de estos fungicidas. Dos documentos muestran que el BEN y CAZ son responsables del aumento de la incidencia de anomalías en los cromosomas. En pruebas in vitro hubo evidencia de que causan aneuploidia (una aberración en los cromosomas).
- *Efectos endocrinos.* según la EPA- Illinois, BEN y CAZ son probables disruptores endocrinos.

2. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS

2.1 Introducción

El uso inadecuado de plaguicidas, así como el desconocimiento de las BPA por parte de los agricultores, aumentan la probabilidad de encontrar residuos de plaguicidas en los alimentos, lo cual obliga a realizar monitoreos permanentes y controles rigurosos a los tratamientos fitosanitarios. De igual forma se ha generado la necesidad de desarrollar y validar metodologías analíticas idóneas y confiables con el fin de evaluar la presencia de estos residuos en los alimentos y valorar así el riesgo asociado al medio ambiente y a la salud de los consumidores (Araujo y Dallos, 2006).

La Comunidad Europea (CE), la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) han convertido al monitoreo y control de los plaguicidas en actividades prioritarias para determinar la calidad y seguridad de los alimentos y han establecido LMR. Desde el punto de vista analítico, supone un reto alcanzar los niveles de detección esperados a consecuencia de los cada vez mas restrictivos LMR establecidos, además de la complejidad de las matrices de origen alimentario. Por lo que es imprescindible desarrollar métodos de análisis a partir de técnicas analíticas avanzadas de gran sensibilidad y especificidad (Grimalt Brea, 2009).

Tradicionalmente, se ha utilizado tanto la cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*, LC) acoplada a detectores de ultravioleta (UV), de diodos (*Diode Array Detector*, DAD) y fluorescencia (*Fluorescence Detector*, FD) para plaguicidas de alta polaridad o inestabilidad térmica; y la cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) acoplada a detectores de captura de electrones (*Electrón Capture Detector*, ECD), detectores específicos de fósforo o nitrógeno (*Nitrogen Phosphorous Detector*, NPD) o espectrómetro de masas (*Mass Spectrometry*, MS), para el análisis de plaguicidas mas apolares, con cierta estabilidad térmica y volatilidad. De ellas, la técnica que se ha aplicado más ampliamente ha sido GC-MS debido a su buena sensibilidad y selectividad. Sin embargo, el desarrollo de nuevas interfases capaces de acoplar la técnica separativa LC a la MS, ha permitido su implantación progresiva en el campo del análisis de residuos de plaguicidas, llegando a alcanzar el mismo status de aplicación que la técnica GC-MS, especialmente porque en las últimas décadas la industria de los fitosanitarios se ha dedicado hacia el desarrollo de plaguicidas más polares e inestables térmicamente (Grimalt Brea, 2009).

Es muy importante establecer criterios de elección del método analítico, así como la técnica analítica que mejor se ajuste a las necesidades del problema que se desea afrontar. Las técnicas analíticas más empleadas en el análisis de plaguicidas comprenden tres etapas:

- Extracción y separación o eliminación de interferentes (clean-up)
- Concentración de los analitos de interés.
- Análisis cromatográfico (separación de los analitos empleando cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acopladas a detectores selectivos para la determinación, identificación y cuantificación de residuos de plaguicidas).

2.2 Extracción y clean-up de residuos de plaguicidas

El reto en la extracción de plaguicidas es maximizar la recuperación de los analitos y minimizar las interferencias. El análisis de plaguicidas en alimentos está sujeto a la complejidad de la matriz y a las concentraciones bajas a las cuales estos compuestos están presentes. Por lo tanto, la extracción de los residuos constituye el paso más crítico. Este paso consiste en la extracción de los analitos desde su matriz con un solvente orgánico apropiado y la remoción de sustancias que podrían causar interferencias mediante varios pasos de limpieza con el objetivo de presentar el material en una forma que pueda analizarse más fácilmente (Ramírez Milla, 2009).

La extracción selectiva de analitos se basa en sus diferentes características y propiedades químicas y físicas, como: peso molecular, carga, solubilidad, polaridad y volatilidad. Para realizar la extracción existe una gran variedad de solventes orgánicos disponibles que permiten una homogenización fácil durante la agitación. La polaridad es el factor más importante en la elección del solvente para una aplicación en particular. La acetona, el acetonitrilo y el acetato de etilo han mostrado proporcionar altas recuperaciones para un amplio intervalo de plaguicidas. La co-extracción de proteínas, azúcares y otros compuestos polares suele incrementar junto con la cantidad de agua en el extracto; así, los solventes que eviten el agua dan una mayor selectividad (Ramírez Milla, 2009).

Las técnicas de extracción de plaguicidas más comunes son las siguientes:

1) *Extracción con solventes*

- Extracción sólido-líquido para el tratamiento de muestras sólidas
- Extracción líquido-líquido para el tratamiento de muestras líquidas

Es la técnica más usada, principalmente por la facilidad de uso y la amplitud de aplicación. El proceso de extracción varía ligeramente dependiendo si la muestra es líquida o sólida. Las muestras sólidas se homogenizan antes de la extracción mediante la molienda, mezclado, agitado o pulverizado (en las muestras líquidas no es necesario este tratamiento). Después, una porción se licua o agita con un solvente orgánico (o con una mezcla de diferentes solventes orgánicos). Luego a la fase orgánica se le agrega sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar el agua

presente en la muestra, posteriormente se procede a una etapa de centrifugación o filtración para eliminar otras interferencias (Grimalt Brea, 2009). En la figura 3 se muestra una extracción con solventes.

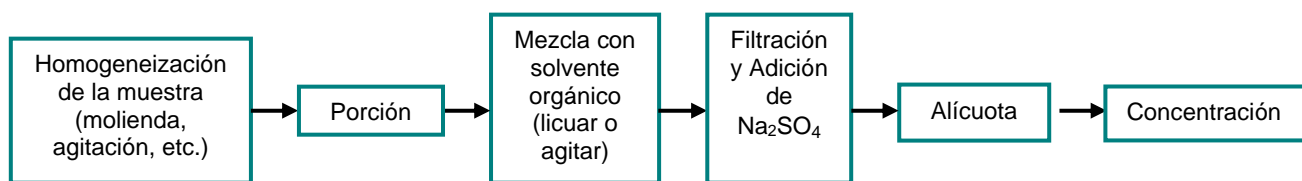


Figura 3: Esquema de una extracción con solventes

2) Tratamiento de muestra mediante adsorción en superficies sólidas

- Extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction, SPE*): Esta técnica consiste en extraer los residuos de plaguicidas disueltos en una matriz acuosa al pasarla a través de un soporte sólido, previamente acondicionado, donde quedan retenidos los plaguicidas y eluir posteriormente con solvente. La elección de la fase sólida depende de la polaridad del plaguicida y de la matriz. Algunas de las que se utilizan son octadecilsilano (C₁₈) y florisil. (López Monzón, 2007)
- Microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction, SPME*): Esta técnica permite realizar la extracción y preconcentración de los analitos volatilizables presentes en una muestra de manera simultánea. En SPME distinguimos una primera etapa de separación de los analitos desde la muestra a la fibra de sílice fundida, y una segunda fase de desorción de los analitos en el vial con solvente orgánico o en inyector de GC (Figura 4) (López Monzón, 2007).

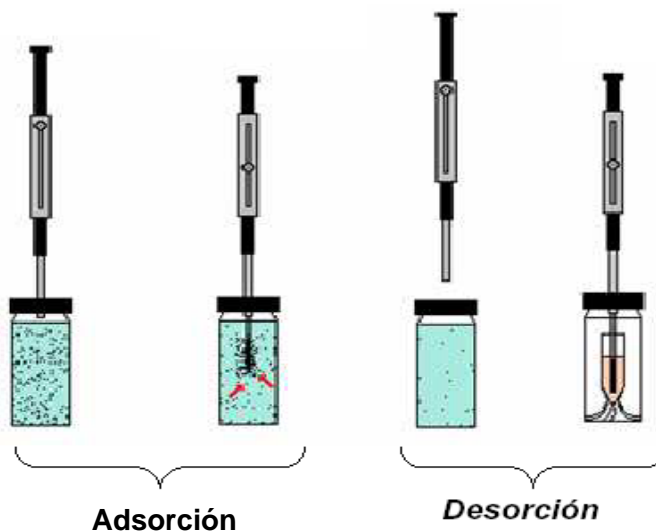


Figura 4: Esquema del proceso en SPME

Fuente: Monzón, 2007

3) *Extracción instrumental con solventes*: Como alternativa a la extracción con solventes mediante métodos manuales se han desarrollado diversas técnicas, buscando generalmente la disminución del coste de procesamiento, tanto en tiempo como en cantidad de solventes. Dentro de este grupo se pueden considerar la extracción con fluidos supercríticos (*Supercritical-Fluid Extraction (SFE)*), extracción con líquidos a alta presión (*Pressurized-Liquid Extraction (PLE)*), y extracción mediante el uso de microondas (*Microwave-Assisted Extraction (MAE)*). Estas técnicas son menos comunes que las mencionadas anteriormente (Grimalt Brea, 2009).

2.3 Concentración de los analitos de interés

Generalmente es necesario evaporar o concentrar el extracto para disminuir el volumen del solvente y para reducir los límites de detección. La fase orgánica se evapora para obtener un volumen pequeño; el residuo se re-disuelve en solventes orgánicos (o mezcla de ellos) y posteriormente se inyecta en el sistema de GC o HPLC (Grimalt Brea, 2009).

2.4 Análisis cromatográfico

Según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) “La cromatografía es un método físico de separación en la cual los componentes de una muestra son distribuidos entre dos fases, una de cual es inmóvil (fase estacionaria) mientras el otro se mueve en una dirección definida (fase móvil)”. La fase móvil puede ser un líquido (Cromatografía Líquida), un gas (Cromatografía Gaseosa) o un fluido supercrítico (Cromatografía Supercrítica-fluida). La fase estacionaria puede ser un sólido, un gel o un líquido retenido sobre un sólido (Quatrochi y col., 1992)

La cromatografía agrupa diversos métodos que permiten separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija a una columna o superficie sólida. De esta manera los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la estacionaria. Los componentes que son retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. Después que la mezcla ha sido separada en el cromatógrafo, cada uno de los componentes se identifica por un detector. Para detectar los componentes separados se miden los cambios que se producen en una serie de propiedades físicas o químicas diferentes. El detector registra los cambios que se producen en alguna propiedad del eluyente que pasó por él. A medida que estos cambios son registrados y reproducidos en forma de gráfica, se observa la aparición de una serie de picos a lo largo del tiempo (cromatograma) (Grimalt Brea, 2009).

A continuación se detalla la clasificación de las modalidades cromatográficas en función de varios parámetros (Quatrochi y col., 1992):

- La naturaleza de la fase móvil: si la fase móvil es un gas, la modalidad cromatográfica se denomina gaseosa (GC) y si es un líquido, cromatografía líquida (LC). A este último grupo pertenecen la cromatografía en capa delgada (TLC), la cromatografía líquida de columna abierta y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, High performance liquid chromatography).
- La naturaleza de la fase estacionaria: si la fase estacionaria es un sólido y la fase móvil un líquido la cromatografía se denomina cromatografía líquido-sólido (LSC). Análogamente existirán una cromatografía líquido-líquido (LLC), gas-líquido (GLC) y gas-sólido (GSC).
- El fenómeno que ocurre dentro de la columna: así, la cromatografía puede clasificarse en modalidades de afinidad y por tamaño molecular. Entre las primeras se encuentran la cromatografía en fase normal, en fase ligada o reversa y la de intercambio iónico. Entre las segundas se encuentra la cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de filtración por gel (GPC) o de permeación por gel (GFC).

La GC es una técnica basada en la separación de compuestos en función de su volatilidad y afinidad por la fase estacionaria. Esta fase se sitúa dentro de una columna. A diferencia de los otros tipos de cromatografía la fase móvil es un simple carrier del soluto y prácticamente no influye en la separación. En GC los detectores diferencian la muestra de la fase móvil (gas inerte), por tal

motivo cualquier dispositivo que mida una propiedad física del soluto (conductividad térmica, ionización de una llama, captura de electrones) es apropiado como detector (Quatrochi y col., 1992).

La LC es una técnica de separación que permite separar físicamente los distintos componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En este caso la fase móvil es un líquido o mezcla de varios líquidos. La fase estacionaria por su parte puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico empacadas dentro de una columna metálica. En HPLC no es tan simple encontrar un detector, ya que la fase móvil no es inerte, por ello es necesario encontrar dispositivos que diferencien el soluto en solución de la fase móvil. Los más difundidos son los detectores ultravioleta (UV), de arreglo de diodos (DAD), de fluorescencia, de índice de refracción y electroquímicos. En HPLC la fase móvil es el parámetro fundamental que gobierna la separación, así modificando la composición de la fase móvil es posible separar sustancias polares, iónicas, ionizables y no polares (Quatrochi y col., 1992).

2.5 Determinación de residuos de plaguicidas bencimidazoles

Para poder controlar los niveles de bencimidazoles en alimentos existen diferentes métodos de identificación, la mayoría de ellos se basan en técnicas de confirmación cromatográfica.

La cromatografía gaseosa se emplea para separar mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles, pero suele presentar grandes dificultades si las sustancias a analizar no son volátiles, si se descomponen a altas temperaturas o poseen alto peso molecular (Quatrochi y col., 1992). Debido a la inestabilidad térmica de los bencimidazoles, éstos no pueden ser analizados por cromatografía de gases, a menos que hayan sido transformados previamente a derivados térmicamente estables, siendo este uno de los motivos por lo que frecuentemente se emplea HPLC acoplada a distintos detectores para su determinación. En este punto se destaca que el benomil es un compuesto altamente inestable, por lo que en casi todas estas técnicas es casi inmediatamente convertido a carbendazim durante el proceso analítico siendo éste último el compuesto usado para su determinación (López Monzón, 2007).

Los primeros métodos utilizados para determinar bencimidazoles fueron los espectrofotométricos, los cuales identifican y cuantifican estos compuestos en soluciones acuosas y orgánicas a 286nm con la desventaja de su baja especificidad y sensibilidad. Otros estudios se han enfocado en establecer la cinética y los mecanismos de conversión del benomil a sus productos de degradación, entre ellos su metabolito más estable, el carbendazim (Araujo y Dallos, 2006).

En los últimos años se han reportado varias metodologías para la determinación de bencimidazoles en alimentos por HPLC:

- HPLC-FLD (detector de fluorescencia): esta técnica utiliza la extracción por SPME, en la que las muestras son calentadas y agitadas a una velocidad constante de 600 r.p.m, la fibra de SPME se sumerge en la muestra acuosa durante 40 minutos a 60°C y la desorción de los compuestos se realiza en un *via*l conteniendo 50µl de metanol y durante 10 minutos. Luego una porción del extracto se inyecta en el HPLC (López Monzón, 2007)
- HPLC-DAD: La muestra es acidificada con ácido clorhídrico (HCl), para la conversión del benomil a carbendazim. Posteriormente la extracción de los residuos se realiza con acetato de etilo, el extracto obtenido se concentra y se realiza su limpieza por GPC. Por último, el eluido obtenido se concentra, se filtra y se inyecta en el HPLC (Araujo y Dallos, 2006).
- GC/MS o LC/MS: se utiliza el método “QuEChERS” de extracción rápido, sencillo, barato, efectivo, robusto y seguro (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Es un método multiresiduo que consiste en una extracción con acetonitrilo y posterior adición de sulfato de magnesio, cloruro de sodio, citrato de sodio dibásico sesquihidratado y citrato de sodio tribásico dihidrato (Sales Buffer de Citrato - pH 5-5,5). La limpieza se realiza adicionando la fase sólida de aminas primaria/secundaria (Primary and Secondary Amine, PSA) a la mezcla de extracción (SPE dispersiva), en lugar de pasar el extracto a través de un cartucho o columna empaquetada con esta fase sólida (sólo es aplicable para la extracción de carbendazim) (Lehotay, 2007). Esta técnica necesita estar acoplada al LC-MS o GC-MS lo cual implica contar con una infraestructura adecuada y equipos muy costosos (Araujo y Dallos, 2006).

Es importante conocer algunos conceptos fundamentales de HPLC así como los principales componentes del equipo. Siguiendo a Quatrochi y col., 1992 se desarrollará una breve explicación de los mismos:

En cuanto al flujo, existen dos modalidades de trabajo en cromatografía HPLC:

- *Isocrática*, el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo fase móvil a alta presión a través de la columna a un flujo constante. La muestra a analizar y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna (este tipo de modalidad es la que se utiliza en el análisis de bencimidazoles).
- *Gradiente*, se llama así a la variación de la composición de la fase móvil (contenido porcentual de los componentes) durante la separación. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria.

La cromatografía líquida puede clasificarse según el fenómeno que ocurre dentro de la columna (modalidades de afinidad):

- *Cromatografía de fase normal*, se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar (el compuesto polar es retenido por la fase estacionaria).
- *Cromatografía de fase reversa*, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es un solvente relativamente polar (como el agua, metanol o acetonitrilo). Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía se prepara uniendo a la superficie de la partícula base de silicagel (se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos de características polares; los silanoles) a determinados grupos funcionales como el octilosilano (C₈), octadecilsilano (C₁₈), fenilo, ciano (CN), amino, diol, etc. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza no polar (el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir o salir de la columna), mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente (el componente más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes). En la cromatografía de fase reversa el mecanismo de separación es una mezcla de un proceso de adsorción-partición (interacciones hidrofóbicas). La principal ventaja de las separaciones en fase reversa es que el agua se puede utilizar como fase móvil, y además es barata y no es tóxica (este tipo de modalidad es la que se utiliza en el análisis de bencimidazoles).

En HPLC además de regular el flujo de trabajo, según la sustancia a separar, también es necesario tener en cuenta:

- *Presión*: la utilización de alta presión incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión, mejorando la resolución de la cromatografía.
- *Temperatura*: calentando las columnas cromatográficas, en general, disminuye la viscosidad del solvente y las presiones necesarias para conseguir flujos más rápidos son menores. Al aumentar la temperatura, disminuyen los tiempos de retención y se mejora la resolución puesto que aumenta la velocidad de difusión del soluto. Por el contrario, el aumento de la temperatura puede disminuir la vida de la columna.

El *tiempo de retención*, es el tiempo medido entre la inyección y la elusión de la concentración máxima del analito (máxima señal). Se considera una propiedad característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. Este tiempo sirve como primera base para la identificación del pico ya que, en condiciones controladas y constantes, el analito reproduce en cada inyección, el tiempo en el que produce una señal en el equipo.

Un cromatógrafo líquido de alta eficacia consta de diversos componentes como son reservorios de fase móvil, bomba de alta presión, sistema de inyección de muestra, columna, un detector y un procesador de información (Figura 5):

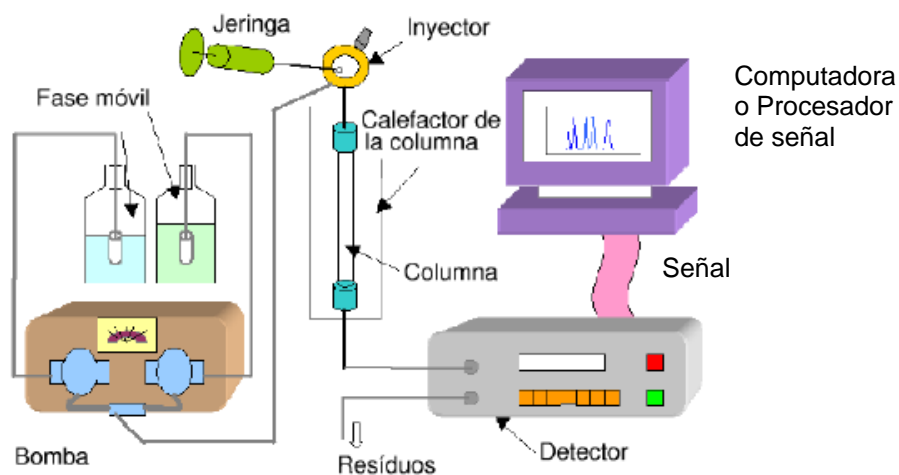


Figura 5: Componentes de un Cromatógrafo Líquido (HPLC)

Fuente: Araujo, 2006.

- **Reservorio de la fase móvil y sistema de desgasificación:** El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Debe colocarse algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones. Generalmente son frascos de vidrio de 1l de capacidad. Los solventes deben ser filtrados antes de introducirlos en el recipiente debido a que las partículas en suspensión pueden bloquear los filtros y tuberías del instrumento, acelerar el desgaste de sellos y rotores del inyector, etc. La filtración se efectúa por medio de membranas de 0,22 o 0,45 μ m de porosidad en equipos de filtración por vacío. Además de la filtración, la fase móvil debe desgasificarse por ello los equipos HPLC habitualmente están provistos de un sistema desgasificador para eliminar las burbujas de gases disueltos (éstos pueden producir inconvenientes como oscilaciones en la línea de base y en los tiempos de retención, pérdida de sensibilidad en algunos detectores, entre otros).
- **Sistemas de bombeo:** Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna. Están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico (acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón). Para este método se utiliza una bomba cuaternaria que posee dos pistones que absorben la fase móvil de recipientes que se encuentran a baja

presión y la envían a la columna a alta presión a través de un sistema de válvulas. Se obtiene así altas presiones y flujos constantes y sin pulsos.

- Sistema de inyección: El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. Hay inyectores manuales y automáticos. En este método se utiliza un inyector manual con loop de 100 μl de capacidad.
- Columnas: En la cromatografía de líquidos se usan columnas empaquetadas, son tubos de acero inoxidable o plástico que poseen una longitud de 5-30 cm y un diámetro interno de 1-5mm. El tamaño de partícula normal para HPLC es de 3-20 μm . Al disminuir el tamaño de partícula los picos son más estrechos y la resolución aumenta. Los soportes de las fases estacionarias para HPLC son partículas de sílice. Para la determinación de bencimidazoles se utilizan columnas de fase reversa.
- Detector: se utiliza el detector de arreglo de diodos (DAD). En los dispositivos convencionales la red de difracción se ubica antes de la celda, la que recibe luz monocromática seleccionada por la red. En los DAD se emplea un sistema óptico invertido; la celda se ilumina con luz blanca (es decir no monocromada) y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible que es un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio (cada uno de los cuales mide un cierto intervalo de longitudes de onda). De esta forma, se consigue medir no sólo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real. Ofrece algunas ventajas como permitir hacer barridos a distintas longitudes de onda de cada uno de los componentes separados, permitir la visualización del espectro UV-Visible (190-600nm) en todo momento del análisis, determinar el máximo de absorbancia para todos los analitos e identificar compuestos (Figura 6).

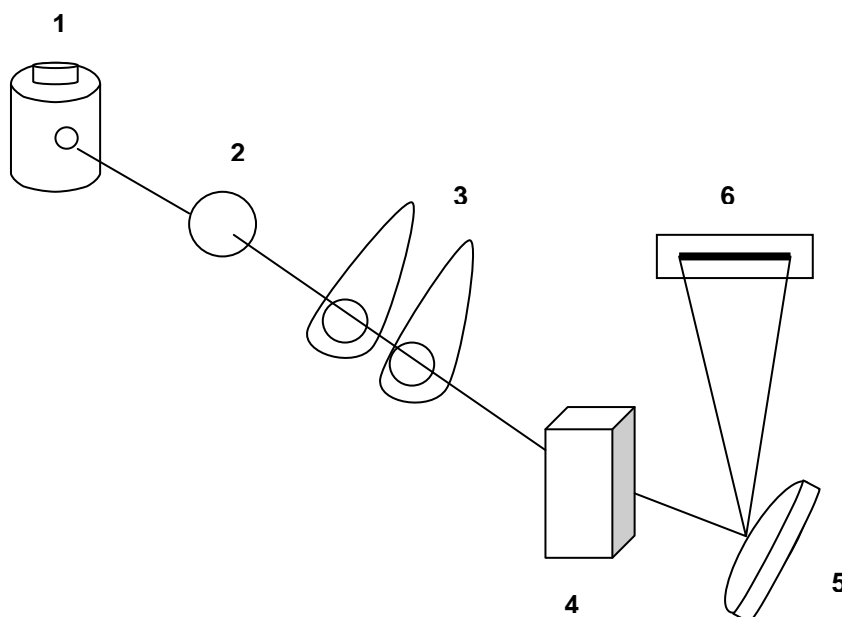


Figura 6: Esquema de un DAD compuesto por: 1. Lámpara (de Deuterio: Rango UV; de Tungsteno: Rango Visible), 2. Sistema de lentes, 3. Obturador, 4. Celda, 5. Red de difracción y 6. Ordenamiento de fotodiodos

Fuente: Quatrochi y col., 1992

3. VINOS

3.1 Introducción

El vino es un producto totalmente natural, que proviene de un fruto, la uva, y que se obtiene mediante un proceso natural, la fermentación, realizada por levaduras que transforman los azúcares de la uva en alcohol etílico y dióxido de carbono.

El Código Alimentario Argentino establece el siguiente artículo:

Art 1092 - Se entiende por Uva para vinos, el fruto fresco, maduro, sano y limpio de la *Vitis vinifera* L en sus distintas variedades y que una vez cosechado no ha sufrido proceso de fermentación o deshidratación alguno, ni ningún otro que modifique sus propiedades y condiciones naturales.

En nuestro país la Ley General de Vinos N° 14878 establece en su artículo 17 lo siguiente: “A los efectos de la presente ley, se considerará vinos genuinos a los obtenidos por la fermentación alcohólica de la uva fresca y madura o del mosto de la uva fresca, elaborado dentro de la misma zona de producción. A este efecto, la reglamentación fijará los grados Baumé de las uvas, según las zonas y condiciones climáticas”.

La vid pertenece a la familia de las Vitáceas, lianas o arbustos de aspecto sarmentoso y provisto de zarcillos. En particular, en el género *Vitis* se distingue la especie *Vitis vinífera*, a la que pertenecen la gran mayoría de las variedades utilizadas para vinificar.

Las uvas adecuadas son la clave indispensable para el éxito en la elaboración de vino, y de forma muy especial, para un vino de mesa de alta calidad. Hay diferencias entre variedades y origen; por tanto no es muy útil intentar tabular detalladamente todos los componentes conocidos de cada vino (Boulton, 2002). En la Tabla 4 aparecen clasificados los compuestos, y la estimación aproximada de su porcentaje.

Tabla 4: Estimación aproximada de los porcentajes normales, en peso, de los componentes del vino.

Compuestos	Vinos de mesa secos	
	Fermentación sin orujo	Fermentación con orujo
Agua	86	85
Sales orgánicas	0,2	0,2
Hidratos de carbono	3	4
Alcoholes	10	10
Ácidos	0,7	0,6
Fenoles	0,01	0,1
Compuestos nitrogenados	0,1	0,05
Lípidos	0,01	0,02
Terpenoides	0,01	0,015
Otros compuestos volátiles	0,1	0,1
Varios	0,5	0,1
Total	100	100

Fuente: Boulton, 2002

3.2 La vitivinicultura argentina

Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) los diferentes países de la Unión Europea representan el 59,5% de la superficie de viñedos mundial. De la producción de uva mundial alrededor del 70% se dirigió a la elaboración de vinos (OIV, 2011).

Los principales países productores de vino son Francia, Italia y España. En América el mayor productor es Estados Unidos y en Sudamérica es Argentina seguido de Chile (OIV, 2011).

La República Argentina, actualmente, posee una superficie cultivada con vid de 223.034 ha. representando el 2,81 % de la superficie mundial. En el país se observa un predominio de variedades de vinificar que representan el 93,20% del total implantado, las variedades de mesa constituyen el 5,03% de la superficie y las pasas el 1,68% (Gráfico 1) (INV, 2011).

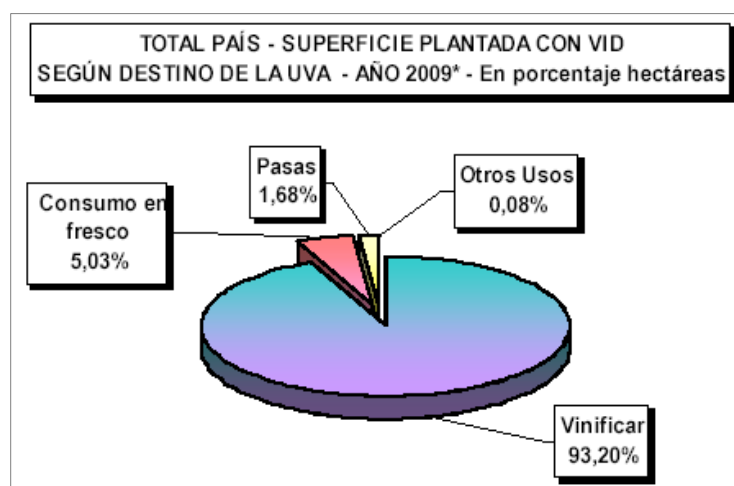


Gráfico1: Superficie plantada con vid en el país según destino de la uva, Año 2009

Fuente: INV, 2011

De un total de 26.175 viñedos, las provincias Mendoza y San Juan representan el 86% del total de viñedos y el 92% de la superficie. En el encepado prevalecen las variedades de vinificar y en éstas las tintas como resultado de la adecuación de las hectáreas plantadas hacia variedades de alta calidad enológica para hacer frente a la demanda de vinos de calidad y así cumplimentar los requerimientos tanto del mercado interno como externo. El 98,65% de la superficie plantada con vid en Mendoza es con variedades de vinificar (Gráfico 2) (INV, 2011).

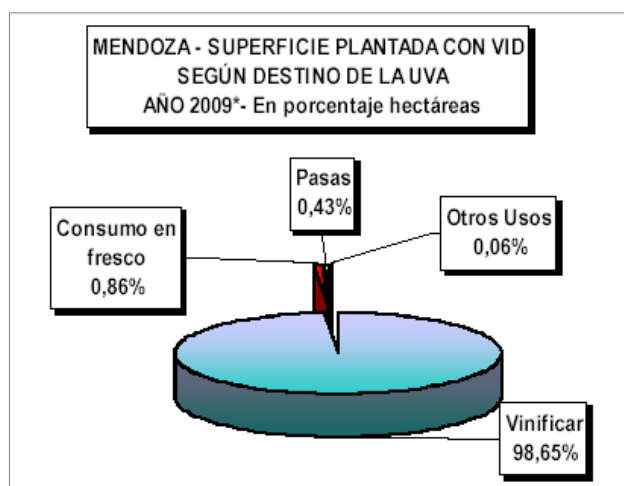


Gráfico 2: Superficie plantada con vid en Mendoza según destino de la uva, Año 2009

Fuente: INV, 2011

La reducción del mercado interno en la década del 90, debido a la disminución del consumo, ha generado un sostenido incremento de las exportaciones de vinos, que ha sido acompañada con una mejora en la tecnología de elaboración utilizada. Esto ha hecho que en los últimos 10 años la República Argentina se haya incorporado a los países exportadores de vinos, en el decimoprimer lugar con productos de excelente calidad (INV, 2011).

Todos estos cambios en la composición, calidad y oferta de vinos, ha multiplicado las oportunidades de negocios, favorecidas por el reconocimiento de las características cualitativas de los vinos argentinos en el exterior, que se encuentran comprendidos en franjas de precios que les permiten competir en los mercados tradicionalmente consumidores de vinos de otras regiones productoras (INV, 2011).

Esta inserción en los mercados internacionales generó una notable innovación en la Vitivinicultura Argentina, motivada principalmente por la necesidad de adecuarse a las nuevas exigencias de los mercados importadores. Para ello, la industria vitivinícola argentina realizó un proceso de reconversión hacia viñedos de alta calidad enológica para brindar materias primas adecuadas para la elaboración de vinos conforme a las exigencias de los mercados externos (variedades de color tales como Malbec, Bonarda, Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot y Tempranillo entre otras, y en las variedades blancas el Chardonnay y Sauvignon Blanc); incorporó nuevas tecnologías sin perder de vista el objetivo de continuar con la inserción en los mercados internacionales (INV, 2011).

Los principales mercados para los vinos argentinos son Rusia, Estados Unidos, Paraguay, Reino Unido, Canadá y Brasil (INV, 2011).

El volumen total exportado durante el primer semestre 2011 fue de 1.713.757,07 hl con un crecimiento del 11,02%, con relación al mismo período del año anterior.

El Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) dio a conocer un anticipo del informe sobre los volúmenes de vinos argentinos exportados durante el mes de Junio 2011, el volumen exportado fue de 353.863,77 hl con un aumento del 28,56%, con referencia al mismo mes del año 2010. El 65,11% del volumen exportado correspondió a vinos varietales, el 33,50 % a vinos sin mención varietal, el 1,21% a vinos espumosos y el 0,18% a otros (Gráfico 3).

Se comercializaron 70.725,97 hl de vinos exportados a granel (28,87%) y 174.266,95 hl de vinos fraccionados (71,13%).

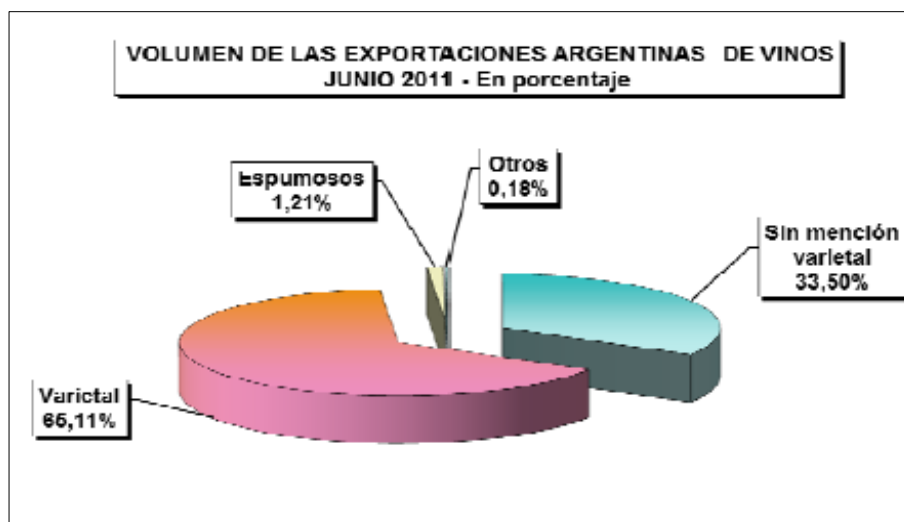


Gráfico 3: Volumen de las exportaciones argentinas de vinos- Junio 2011

Fuente INV , 2011

3.3 Residuos de plaguicidas en el vino

El uso de fitofármacos en el cultivo de la vid pueden provocar consecuencias toxicológicas, como en todo cultivo destinado a consumo humano o forrajes; problemas en la comercialización del producto, cuando los residuos superan las tolerancias exigidas para un determinado mercado; problemas en la fermentación y problemas en la calidad final del vino. Para evitar que se presenten estos problemas, el productor vitivinícola debe disponer de la información necesaria para utilizar, en su viñedo, los plaguicidas en forma racional (Becerra, 2008).

La viticultura argentina, en especial en la provincia de Mendoza, se ve favorecida en el aspecto fitosanitario, ya que las aplicaciones de plaguicidas al cultivo se hacen necesarias solamente para el tratamiento de tres enfermedades: oidio, peronóspora y podredumbre de los racimos. Un aspecto particular es el referido a los insectos y ácaros, los cuales no se hallan presentes o se encuentran en equilibrio en el viñedo, de modo que no alcanzan niveles de daño económico en el cultivo. Debido a esta situación, los insecticidas y acaricidas prácticamente no se aplican (Becerra, 2008). Cabe aclarar que, en estos últimos años, el SENASA declaró la presencia de la plaga *Lobesia botrana* en los cultivos de vid en Argentina. Posteriormente dispuso el alerta fitosanitario e implementó una serie de medidas de prevención con el fin de contener y erradicar esta plaga. *Lobesia botrana* es una polilla cuyo alimento principal es la vid, por este motivo es que se la conoce comúnmente como la "polilla de la vid". En nuestro país es considerada, tanto desde el punto de vista técnico como legal, una plaga "cuarentenaria", ya que no se la encontraba en territorio nacional hasta su detección, y podría generar un fuerte impacto en la economía regional cuyana (ISCAMEN, 2011).

Algunos fungicidas que se utilizan en el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas son (Becerra, 2008). :

- Dicarboximidas (iprodione y procimidione) para el control de la podredumbre de los racimos.
- Ftalamidas cloradas (captan y folpet) para el control de peronóspora de la vid.
- Fungicidas inhibidores del Ergosterol (feranimol, miclobutanil y penconazole) para el control del oidio de la vid.
- Ditiocarbamatos (zineb, maneb y mancozeb) para el control de enfermedades en general.
- **Bencimidazoles** (*benomil y carbendazim*) para el control de la podredumbre de los racimos.

3.4 Residuos de plaguicidas bencimidazoles en el vino

Los fungicidas bencimidazoles más utilizados en el cultivo de la vid son el benomil y el carbendazim. Registrados para controlar podredumbre de los racimos, son productos sistémicos con actividad preventiva y curativa, de amplio espectro y forma de acción muy específica ya que bloquean la división celular a nivel de los microtúbulos (Becerra, 2008).

A diferencia del Mildiu y del Oidio que se nutren exclusivamente de tejidos vivos, el hongo de la podredumbre de los racimos (*Botrytis cinerea*) puede vivir perfectamente nutriéndose de tejidos desprendidos de las plantas. Las plantas sólo se infectan con este patógeno si están sensibilizadas por alguna herida producida durante su período de desarrollo. En la vid, la *Botrytis* ataca los racimos y las uvas y, en condiciones favorables, incluso los brotes. Los racimos sólo son susceptibles durante la floración y justo después de ella. Las uvas son sensibles a la *Botrytis* cuando alcanzan un contenido de azúcar del 6% (lo que suele ocurrir justo después del envero). Los tallos sólo son afectados cuando la infección en las uvas es muy severa o cuando la planta presenta desórdenes fisiológicos debidos a la falta de calcio o de magnesio. Las heridas en la planta son el camino de entrada de la infección de este hongo y por esta razón siempre se recomienda una aplicación de fungicida después de una granizada (Urbaso, 2003).

Para ocasionar infección este hongo necesita agua libre o una muy alta humedad relativa, un rango de temperaturas favorables para la esporulación, de 15°C a 26°C, aunque es capaz de reproducirse incluso a bajas temperaturas (período de riesgo).

Si el período de riesgo se mantiene unos días después de la floración o del envero se debe considerar, en función de la sensibilidad de la variedad de cultivo, el realizar un tratamiento preventivo. Esto se hace totalmente necesario en caso de que en este período se produzca una granizada (Urbaso, 2003).

Es una de las enfermedades más destructivas cuando las condiciones son favorables para su desarrollo, ya que su incidencia se concentra principalmente en los racimos en los estadios fenológicos cercanos a la cosecha. El ataque de *Botrytis* no sólo incide negativamente sobre el peso del racimo, sino que, además, perjudica en gran medida la calidad de los mostos y del vino. En los mostos, produce degradación de azúcares, modificación de los equilibrios ácidos, degradación de compuestos nitrogenados, carencia de vitaminas, y aparición de una actividad enzimática característica, la lacasa, que modifica de manera irreversible el potencial inicial de los mostos. Sobre el vino, las alteraciones generadas por la podredumbre gris inciden drásticamente en el sabor y el color. Provoca una alteración importante en el color original, pudiendo, en casos extremos, hacer virar los colores rojos de los vinos tintos hacia el marrón. Conlleva la desaparición de aromas afrutados que, normalmente, se miden por el nivel de terpenoles (Linalol y Geraniol). Variable según el grado de ataque, esta pérdida de aromas viene acompañada de la aparición de sabores indeseables a fenol, iodo y moho. En resumen, el ataque de *Botrytis* provoca una oxidación prematura del vino, lo vuelve frágil, y limita sus posibilidades de conservación (López Fernández, 1998).

La remanencia sobre uvas a cosecha de fungicidas empleados en el viñedo para la protección contra enfermedades depende de diversos factores: dosis, técnica de aplicación, número de intervenciones fitosanitarias y tiempo entre última aplicación y cosecha. El problema mayor se presenta con la lucha contra la podredumbre gris, ya que pueden ser necesarias aplicaciones en épocas muy cercanas a cosecha. El pasaje de residuos de fungicidas desde uvas a cosecha al mosto y luego al vino depende de las propiedades físico-químicas de los principios activos, principalmente su solubilidad en agua y en la solución hidroalcohólica del vino. Para aquellos productos insolubles en estos medios, la eliminación de residuos depende del tipo de vinificación (blanco o tinto), y de los procesos de eliminación de borras, eliminándose entre un 70 a 90% de los mismos en el vino terminado. En cambio, para los fungicidas solubles (por ejemplo los bencimidazoles), estos procesos no influyen en la misma forma en la disminución de residuos, por lo que estos bajan entre un 40-50% en el producto final. El productor vitícola debe entonces tener en cuenta los siguientes consejos: utilizar los plaguicidas en forma racional; respetar los correspondientes períodos de carencia y evitar aplicaciones innecesarias en épocas muy cercanas a cosecha (Becerra, 2008).

Los bencimidazoles son solubles en medio ácido acuoso, lo que significa que pueden pasar del mosto al vino. Sin embargo, no existen efectos indeseables sobre las levaduras, y los vinos resultantes no presentan alteraciones del gusto. Los residuos de estos fungicidas son de orden higiénico-sanitario, ya que la estabilidad de estos residuos es muy marcada en el vino terminado. Por lo tanto, es importante evitar la contaminación excesiva de uvas por tratamientos muy tardíos y/o con dosis elevadas. No obstante, si es necesario aplicar plaguicidas porque las condiciones

climáticas predisponen al desarrollo de enfermedades hay que evitar aquellos productos que producen problemas en la fermentación y en la calidad final del vino, como así también aquellos de degradación muy lenta o de gran estabilidad en el vino terminado (Becerra, 2008).

3.5 Marco Legal: Bencimidazoles y el Vino

Entre los atributos que conforman los aspectos de calidad e inocuidad de los vinos se destaca el cumplimiento de los Límites Máximos de Residuos (LMR) de plaguicidas permitidos por las diversas legislaciones según el destino comercial de los mismos.

Los productos procesados como el vino por lo general no tienen establecidos LMR. Para los productos procesados, se considera como LMR el establecido para el producto en bruto. Por ejemplo, para productos procesados como el vino se aplica los LMR establecidos en la uva (The Australian Wine Research Institute, 2012). En Argentina, el INV no establece LMR de plaguicidas para el vino por lo que se consideran los LMR establecidos para uva por SENASA en su Resolución 934/10. Para la exportación se consideran los valores legislados en los países de destino. Benomil y carbendazim son los fungicidas bencimidazoles más utilizados en el cultivo de la vid para controlar la podredumbre de los racimos. La presencia de estos residuos en una cantidad superior a los límites establecidos en el vino implica una disminución de su calidad y un riesgo para el consumidor.

En nuestro país está legislada la cantidad máxima de estos plaguicidas en uva en fresco, 3 ppm para benomil al igual que para carbendazim (SENASA, Resolución 934/10).

El *Codex Alimentarius* establece un LMR de 3 ppm para carbendazim en uva en fresco y no establece un LMR para el benomil. La Unión Europea establece un LMR de 0,5 ppm para el benomil y carbendazim (suma de benomil y carbendazim expresado como carbendazim).

En caso de exportaciones de vinos, si se conoce el destino de la producción, es importante conocer las tolerancias del país importador y no aplicar productos que no tengan registro en el país de destino. De esta manera se pueden evitar rechazos y además proteger la imagen y calidad de la producción nacional (Becerra, 2008).

La implementación de BPA así como programas de control y monitoreo de residuos de plaguicidas son procedimientos cada vez más requeridos en el mercado de vinos.

Realizar el análisis de *Residuos de plaguicidas bencimidazoles* en vinos producidos en el país, permite a las empresas vitivinícolas, mejorar la competitividad de sus productos en el mercado interno como externo y garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores.

Por lo dicho anteriormente, resulta de gran interés contar en nuestro medio con herramientas analíticas que permitan determinar los niveles de bencimidazoles en vino de manera de comprobar el cumplimiento de las normativas vigentes en materia de residuos de plaguicidas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar una metodología analítica validada en vegetales, basada en el método de Jullie Fillion, 1998 (The Determination of Benomil in Apples and in Plant Material by LC-UV and LC-MS), para la determinación de residuos de plaguicidas bencimidazoles en vinos. Este método consiste en una extracción con acetato de etilo, posterior conversión del benomil a carbendazim y concentración e inyección en HPLC-DAD Fase Reversa. El resultado final para esta técnica se expresa como la suma de benomil y carbendazim expresado como carbendazim. El mismo fue elegido porque es un método sencillo, en una sola extracción se puede extraer BEN y CAZ, porque resulta más práctico y rápido adaptar en el laboratorio un método que ya ha sido puesto a punto en otra matriz y por disponibilidad de equipamiento. Es importante resaltar que no hay un método oficial para la determinación de BEN y CAZ en vinos.

La selección de un método de análisis debe basarse en que proporcione información confiable sobre la naturaleza y composición de los materiales sometidos al análisis. Los métodos de análisis tienen ciertos atributos que tienen que ser considerados cuando se selecciona el método más apropiado para resolver un problema específico, tales como exactitud, precisión, especificidad, sensibilidad, confiabilidad y practicidad. No siempre es posible, ni siquiera deseable, optimizar todos estos atributos para un análisis dado. Finalmente, el analista debe evaluar toda la información a mano y decidir frente a consideraciones prácticas como tiempo de análisis, costo por análisis, riesgo de errores y nivel de experiencia requerida del analista para su desempeño satisfactorio. Como mínimo los datos de desempeño proporcionados por un método deben incluir la siguiente información: separación del analito de las sustancias interfirientes, el nivel más bajo de medición de la concentración del analito, una medida razonable de precisión obtenible dentro del laboratorio a niveles funcionales del analito en la matriz y la exactitud de la medición del analito a niveles típicos de concentración. En otras palabras, se requieren especificidad (selectividad), capacidad de ser reproducido y exactitud (Garfield, 1993).

Para demostrar que un método es adecuado para la aplicación que se pretende es preciso determinar mediante estudios de laboratorio sus parámetros de desempeño, tales como: límite de detección, límite de cuantificación, selectividad, linealidad, precisión y exactitud, entre otros (Fabro, 2009).

Para la evaluación de esta metodología es necesario determinar su selectividad, linealidad, precisión y exactitud.

La selectividad del método es la propiedad del mismo de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes presentes en la matriz de la muestra (Quatrochi y col., 1992).

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la mínima y la máxima concentración de analito, para la cual el método es probado y dentro del cual se puede efectuar la cuantificación del analito por interpolación en una curva estándar (Quatrochi y col., 1992). Para la determinación de este parámetro se prepara una serie de diluciones del estándar del analito de concentración conocida, se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión lineal $Y = b \cdot X + a$ (Quatrochi y col., 1992). En el eje de las "x" aparecerá la concentración de analito y en el eje de las "y" la respuesta analítica, que para métodos cromatográficos corresponde al área del pico bajo la curva (Fabro, 2009). Independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión como el coeficiente de regresión lineal (o coeficiente de determinación), la pendiente de la curva, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación simple lineal (r) (Quatrochi y col., 1992).

La precisión de un método está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea (Quatrochi y col., 1992). El parámetro estadístico que caracteriza a la precisión es la desviación estándar (s) o, más comúnmente, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV %). Para este estudio se deben realizar como mínimo diez repeticiones (Fabro, 2009). En muchos casos es importante indicar el intervalo de confianza de la medida, es decir, el rango en el cual puede definirse la probabilidad de que éste "capture" con la probabilidad indicada el parámetro μ (límites de confianza para el método). Cuando el número de muestras es pequeño (menos de 30), las medidas independientes, y la distribución normal, puede calcularse de acuerdo a la distribución "t de Student" (Quatrochi y col., 1992).

La exactitud indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero (Fabro, 2009). Matemáticamente suele expresarse como recuperación, que expresa el porcentaje de analito presente en la muestra. Esta diferencia debe ser lo más pequeña posible, es decir, la recuperación del analito debe acercarse al 100% (en el análisis de trazas no siempre se alcanzan recuperaciones tan elevadas). Para determinarlo se utiliza un ensayo t de Student para saber si el valor obtenido (media) no difiere significativamente del valor verdadero. Un diseño habitual emplea al menos 3 concentraciones del analito, preparadas por triplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema (Quatrochi y col., 1992).

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Evaluar una metodología analítica validada en vegetales para la determinación de residuos de plaguicidas bencimidazoles en vinos.

Objetivos Específicos:

- Obtener un modelo de calibración del método para la cuantificación de bencimidazoles en vinos.
- Realizar ensayos de precisión y exactitud del método.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

“Es posible determinar residuos de plaguicidas bencimidazoles en vinos utilizando una metodología analítica validada en vegetales”

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Materiales y equipos de laboratorio

Para la ejecución de los ensayos se utilizaron vino tinto Malbec y blanco Torrontés de sendas marcas comerciales obtenidos en un comercio local.

El listado de materiales, equipos y preparación de soluciones utilizados puede consultarse en el anexo 1.

1.2 Método analítico seleccionado

Como se expuso antes, siendo la finalidad del trabajo evaluar una metodología analítica validada en vegetales (Jullie Fillion, 1998) para la determinación de Benomil y Carbendazim en vinos, es importante aclarar que si bien con este método se extrae BEN y CAZ, el BEN al ser poco estable es convertido a CAZ durante la extracción, para luego ser cuantificado. Es decir que se cuantifica como la suma de BEN y CAZ expresada como CAZ.

Previo a la detección de los bencimidazoles por cromatografía, se realiza un tratamiento especial de la muestra con el fin de extraer de la matriz los residuos de plaguicidas y eliminar todas aquellas sustancias interferentes presentes en el vino.

- Extracción

1. Pesar 10 g de vino en un vaso de precipitado y agregar 100 ml de acetato de etilo. Homogeneizar en agitador durante 5 minutos.
2. Dejar reposar 1 minuto para que se separen las fases. Filtrar con papel de filtro la fase superior (fase de acetato de etilo), transvasar cuantitativamente a un balón de destilación y concentrar en rotavapor a 35°C- 40°C hasta aproximadamente 1ml.
3. Transferir cuantitativamente el extracto obtenido a una probeta con tapón de 50 ml. Enjuagar el balón con 10 ml de acetato de etilo y añadir también a la probeta. Agregar 25ml de una solución de ácido clorhídrico 0,1N (HCl) y agitar vigorosamente 1 minuto.
4. Colocar la probeta en el baño de agua termostaticado a 80°C durante 1 hora (para la conversión de BEN a CAZ).
5. Sacar la probeta del baño y dejar que se enfríe hasta temperatura ambiente.

Clean-up

6. Transferir cuantitativamente el extracto a una ampolla de decantación. Enjuagar la probeta con 2 porciones de 10ml hexano y traspasar también a la ampolla. Agitar 1 minuto y dejar reposar hasta que se separen las fases. Recolectar la fase inferior en un vaso y descartar la fase superior.
7. Transferir la fase recolectada nuevamente a la ampolla. Agregar 25ml de acetato de etilo, agitar 1 minuto y dejar reposar hasta que se separen las fases. Recolectar la fase inferior en un vaso y descartar la fase superior.
8. Transferir la fase recolectada nuevamente a la ampolla. Agregar 25ml de una solución de carbonato de sodio 1M (Na_2CO_3) y mezclar. Chequear con papel indicador el pH (debe ser mayor o igual a 9).
9. Agregar 50ml de acetato de etilo. Agitar y dejar reposar hasta que se separen las fases. Recolectar la fase inferior en un vaso de precipitado y posteriormente recolectar la fase superior en un erlenmeyer. Transferir la fase inferior recolectada nuevamente a la ampolla. Repetir este paso con 30ml de acetato de etilo y luego con 15ml.
10. Agregar al erlenmeyer aproximadamente 5g de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), mezclar, filtrar con papel de filtro y recoger el filtrado en un balón de destilación.
11. Concentrar en rotavapor a 35°C- 40°C hasta aproximadamente 1ml. Agregar 5 ml de metanol y volver a concentrar hasta sequedad.
12. Agregar al balón con micropipeta 500 μl de metanol. Rotar suavemente el balón. Aspirar con la misma micropipeta y soltar varias veces el extracto para asegurar su disolución.
13. Preparar una jeringa descartable de 5 ml, con un filtro de nylon de 0,2 μm en su extremo y colocarla en un vial rotulado con el número de muestra. Traspasar con la micropipeta el extracto del balón a la jeringa y filtrarlo.
14. Inyectar 10 μl en el HPLC/DAD con una jeringa de inyección manual.

- Condiciones cromatográficas

- Flujo: isocrático 0,8 ml/min.
- Fase móvil constituida por: 30% de Acetonitrilo y 70% de Agua.
- Volumen de inyección: 10 μl

1.3 Parámetros evaluados

Para validar un método analítico existen muchas guías de referencia que describen los criterios de aceptación. En este trabajo se tomaron como guías los criterios de validación propuestos por el *Codex alimentarius* en su informe sobre Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas (1993), por SENASA en su resolución 138/2002 y por Quatrochi en el capítulo Validación de métodos (1992).

En primer término, se realizó una prueba blanco a fin de corroborar que la muestra no estaba contaminada con BEN y CAZ. Luego, para evaluar la eficiencia del método seleccionado, se procedió a la contaminación del vino con concentraciones conocidas de BEN y CAZ.

El límite de detección (LD) y cuantificación (LC) para el método fue determinado en estudios anteriores realizados por el Laboratorio de Residuos de Plaguicidas de INTI Mendoza, resultando ser el LD de 0,02 ppm y el LC es tres veces el LD para este método.

1.3.1 Selectividad

Para evaluar la selectividad se realizó un análisis simultáneo de un blanco de reactivos, el analito en un solvente adecuado, una matriz libre de analito y la misma matriz con el agregado de analito. Luego se evaluó el pico confirmando la identidad del analito.

En este caso el analito es el CAZ, debido a que si bien esta metodología extrae BEN y CAZ, el BEN es convertido a CAZ durante la extracción y por lo tanto el resultado final se cuantifica como CAZ. Las soluciones de CAZ y BEN se preparan a partir de un estándar o patrón puro (ver preparación en anexo 1). El estándar de BEN no es utilizado en los ensayos de selectividad ni linealidad pero si es utilizado en los ensayos de precisión y exactitud.

1.3.2 Linealidad

Para el estudio de la linealidad del método analítico se realizó una curva de calibración. Se prepararon soluciones de concentración conocida a partir del estándar de CAZ. Conjuntamente se determinó el rango lineal.

Se inyectaron cuatro niveles de concentración, por duplicado, de soluciones de CAZ. Las concentraciones elegidas fueron 0,2; 0,5; 1 y 2 ppm. Este rango de concentraciones fue elegido debido a que son concentraciones cercanas al LMR (0,5 ppm) legislado por la Comunidad Europea (CE). Para el análisis se emplearon las condiciones cromatográficas anteriormente descritas.

Con los datos de áreas obtenidos de cada inyección y las concentraciones de CAZ mencionadas, se ajustó un modelo de regresión simple lineal $y = \beta_0 + \beta_1 x$, graficando en el eje de las ordenadas la variable dependiente (área del pico) y en el de abscisas, la variable independiente (concentración de CAZ en ppm). Para esto se utilizó una planilla de cálculo Microsoft Excel (ver anexo 2). El SENASA en su resolución 138/2002 recomienda un valor de coeficiente de correlación mayor a 0,975 y Quatrochi un valor de coeficiente de determinación mayor a 0,99.

1.3.3 Precisión

Para evaluar la precisión del método se realizaron diez contaminaciones a muestras de vino en un nivel de 0,5 ppm (que es el LMR en uvas permitido por la CE) y se cuantificaron con la recta de calibración obtenida (ver cálculos en anexo 1). Se elige el criterio de aceptación descrito por el SENASA en su resolución 138/2002 para magnitudes mayores a 0,01mg/kg (ppm), aceptándose un coeficiente de variación menor al 12%.

1.3.4 Exactitud

Para evaluar la exactitud del método se realizaron contaminaciones de los vinos con 3 niveles de concentración y cada una de ellas se preparó por triplicado. Se contaminaron 9 muestras de vino a 0,2 ppm, 0,5 ppm y 1 ppm (estos niveles fueron elegidos por contener el LMR permitido por la CE) (ver cálculos en anexo 1). Los extractos obtenidos se inyectaron en el HPLC y se cuantificaron utilizando la curva de calibración obtenida. Se tomará como referencia el criterio de aceptación establecido por el *Codex alimentarius* para residuos de plaguicidas que considera recuperaciones aceptables a las comprendidas entre 70% y 120%.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 Determinación de la selectividad del método analítico

En las figuras 7, 8, 9, 10 y 11 se presentan los cromatogramas obtenidos y la producción de señales medibles para evaluar la selectividad del método analítico empleado en este ensayo. Para evaluar el pico y confirmar la identidad del analito, se observó el tiempo de retención y el espectro de absorción.

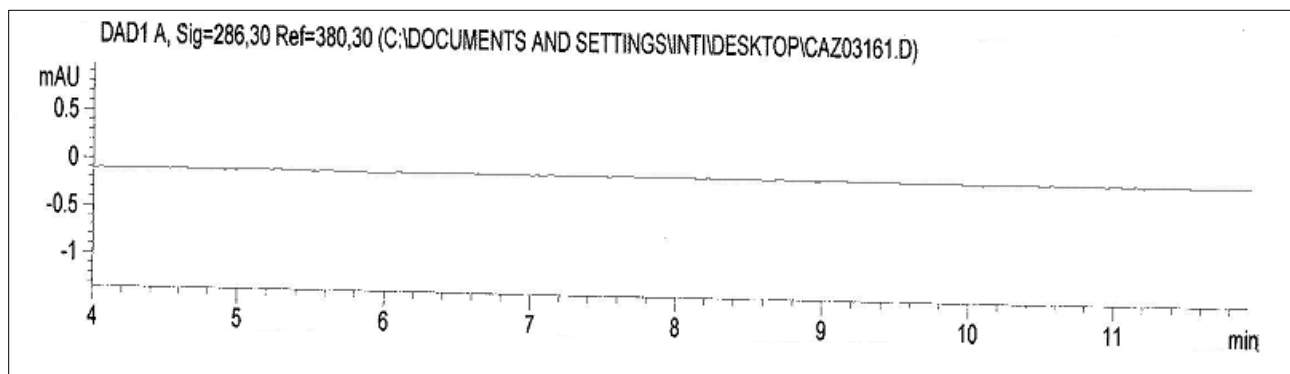


Figura 7: Cromatograma obtenido al inyectar metanol grado HPLC.

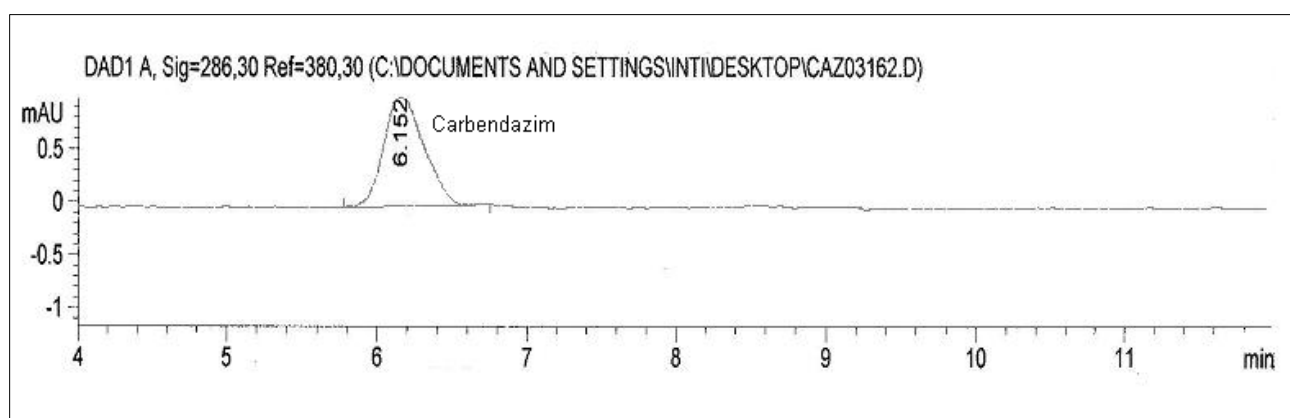


Figura 8: Cromatograma obtenido al inyectar el estándar de CAZ en metanol.

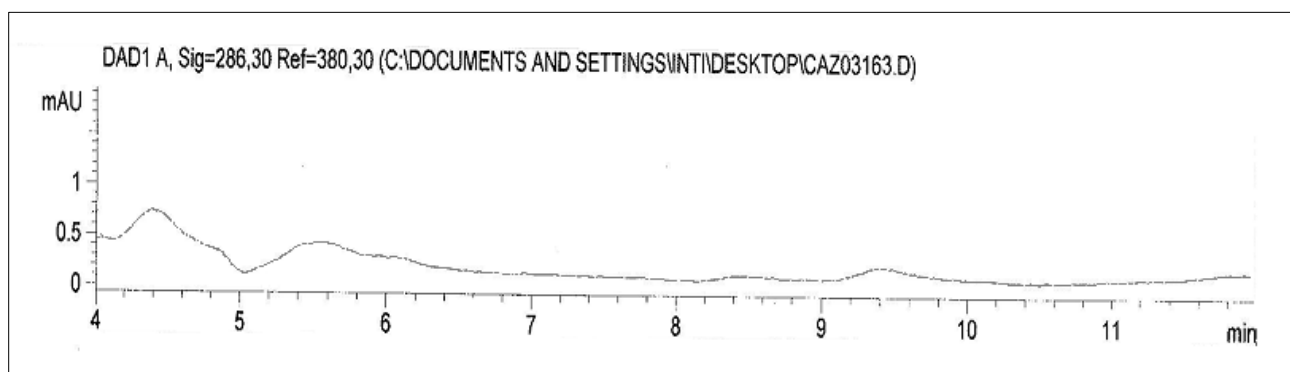


Figura 9: Cromatograma obtenido al inyectar un blanco de vino libre de CAZ.

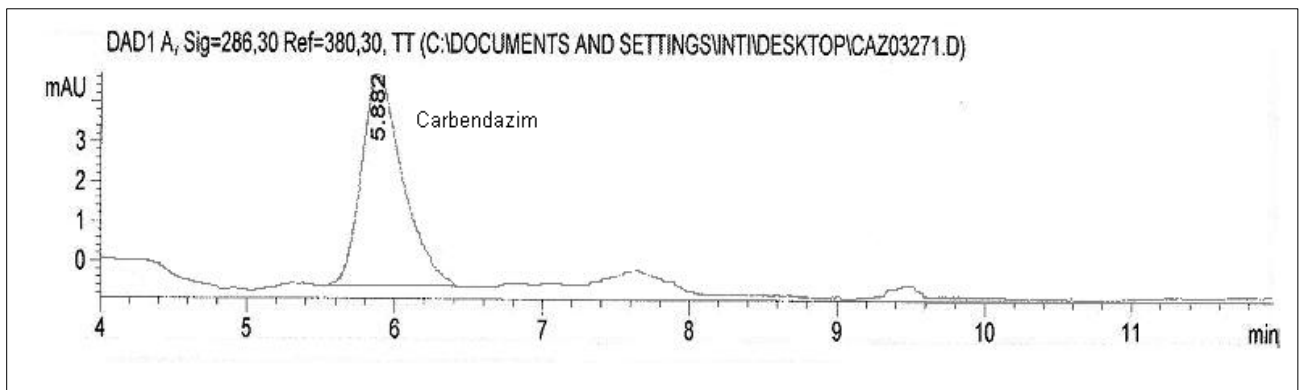


Figura 10: Cromatograma obtenido al inyectar el blanco de vino con el agregado de CAZ.

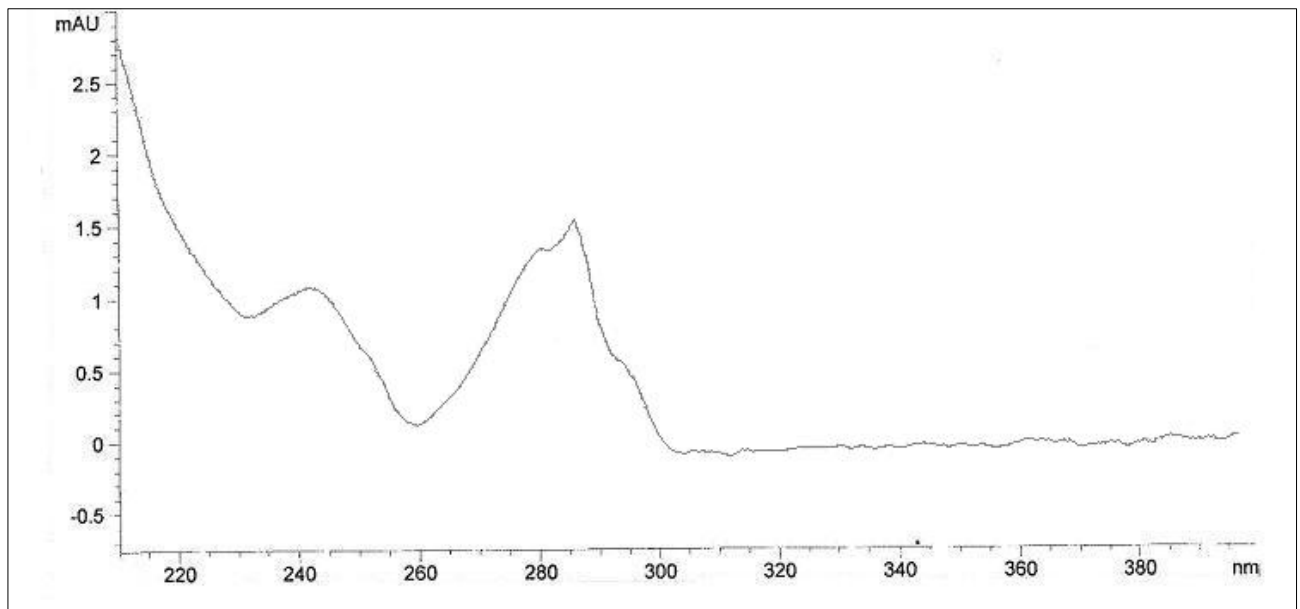


Figura 11: Espectro del CAZ.

En la figura 7 se observa la línea de base libre de interferencias al inyectar Metanol, que es el solvente con el que se prepararon los estándares. En la figura 8 se observa que el tiempo de retención para el estándar de CAZ fue de 6,152 minutos, tiempo aproximado en el que este plaguicida acusa señal en el detector en las condiciones cromatográficas dadas. También se observa el espectro de absorción característico del CAZ, que se caracteriza por tener una máxima de absorción a los 286 nanómetros (figura 11).

En la figura 9 puede observarse que el cromatograma obtenido al pasar la muestra blanco de vino no acusa la presencia de CAZ o algún otro pico que pudiera interferir en el análisis. En la figura 10

se observa el blanco de vino contaminado (la identificación de CAZ se realizó comparando el tiempo de retención y el espectro de absorción del analito en la muestra con el tiempo de retención y el espectro de absorción de una solución del estándar de CAZ puro).

Los datos obtenidos corresponden al plaguicida CAZ, no se observaron interferencias, y las señales medibles por el HPLC/DAD correspondieron solamente a este plaguicida.

2.2 Determinación de la linealidad de la curva de calibración

La representación gráfica de la recta de calibración obtenida, se muestra en el gráfico 4.

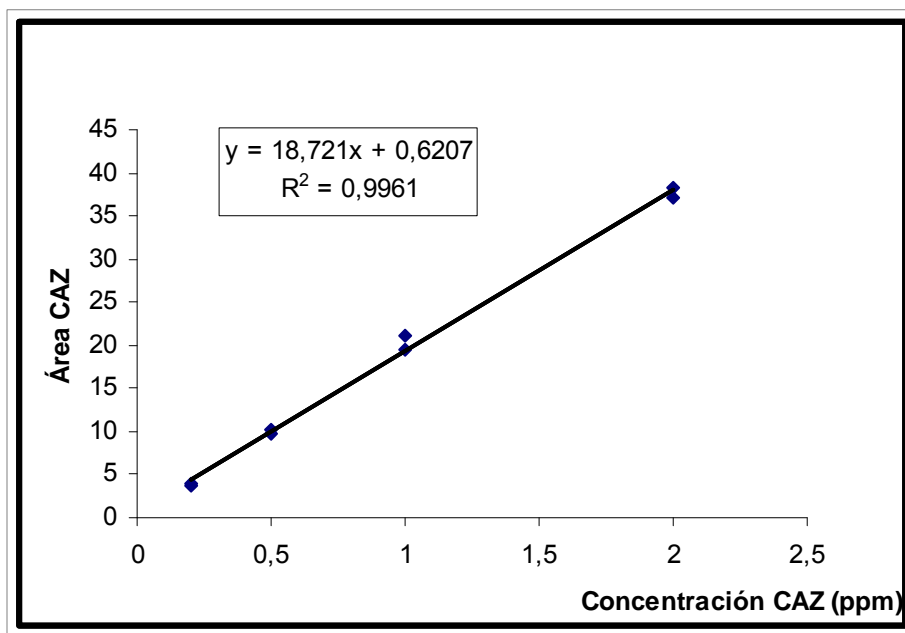


Gráfico 4: Ajuste con el modelo de regresión simple lineal. Curva de calibración del estándar Carbendazim para cuatro niveles de concentración.

El coeficiente de correlación simple lineal fue $r = 0,998$ lo que indicó una alta asociación positiva entre las variables área y concentración de CAZ. Además cumple con el criterio de los parámetros de validación de la resolución SENASA N°138/2002 que establece que el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0,975.

La ecuación del modelo de regresión simple lineal resultó $y = 18,721 x + 0,6207$. Esta ecuación permite predecir valores de área en función de valores de concentración de CAZ entre 0,2 ppm y 2 ppm.

El coeficiente de determinación para el CAZ fue $R^2 = 0,9961$; esto indica que el 99,61% de la variación de la variable área (variable y) es explicada por el modelo. Cumple con el criterio de los parámetros de validación de Quatrochi que establece que el R^2 debe ser mayor a 0,99.

Para evaluar la adecuación del modelo de regresión lineal propuesto, se realizó una prueba de hipótesis sobre el parámetro del modelo β_1 , es decir para la pendiente de la recta. Se probó la hipótesis científica de que exista regresión simple lineal. Las hipótesis fueron:

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Con un $\alpha = 0,05$ los resultados fueron $t_{\text{muestral}} = 38,94$ y $t_{\text{crítico}} = 2,447$; es decir $t_{\text{muestral}} > t_{\text{crítico}}$, por lo que se rechaza la hipótesis nula. Esto implica que existe regresión simple lineal entre ambas variables (concentración de CAZ y área), para las condiciones experimentales evaluadas.

2.3 Precisión del método

La cuantificación se realizó dividiendo los valores del área bajo la curva del pico de CAZ en el vino contaminado con el factor respuesta medio (obtenido en la curva de calibración) y la concentración de la muestra (el cálculo matemático figura en el anexo 1 punto 3.2).

Los resultados obtenidos para las diez repeticiones se observan en la Tabla 5.

Tabla 5: Resultados de las diez repeticiones

Muestra	Cuantificación de CAZ ppm
1	0,36
2	0,48
3	0,47
4	0,41
5	0,46
6	0,42
7	0,44
8	0,40
9	0,41
10	0,38
Media	0,42
DS	0,04
CV %	9,35

El CV% obtenido (9,35 %) fue aceptable ya que es menor al máximo establecido por la resolución SENASA N° 138/2002 para trazas en concentraciones mayores a 0,01ppm, CV% < 12%.

Se construyó un intervalo de confianza para un nivel de confianza de 0,95 para obtener un rango dentro del cual podamos suponer que se encuentra el verdadero valor promedio de CAZ. El intervalo obtenido fue:

$$IC_{0,95}: (0,39; 0,45)$$

Dicho intervalo tiene una probabilidad de 0,95 de contener el verdadero valor de la concentración promedio de CAZ.

2.4 Exactitud del método

Los porcentajes de recuperación para cada muestra se muestran en la Tabla 6

Tabla 6: Resultados de las recuperaciones obtenidas

Contaminación	Resultado (CAZ ppm)	% R
0,2	0,16	80
0,2	0,18	88
0,2	0,16	81
0,5	0,48	96
0,5	0,44	88
0,5	0,52	104
1	0,92	92
1	1,04	104
1	1,08	108
Media	-	93,42
DS	-	10,30
CV %	-	11,03

Puede observarse que para todas las determinaciones realizadas el porcentaje de recuperación entró siempre dentro del rango de 70 % – 120 % propuesto por el *Codex Alimentarius*.

A fin de evaluar si la exactitud del método fue adecuada, es decir, probar que los valores del porcentaje de recuperación (% R) se encuentran cercanos al 100%, se realizó una prueba de hipótesis donde las hipótesis planteadas fueron:

$$H_0: \mu_{\%R} = 100 \%$$

$$H_1: \mu_{\%R} \neq 100 \%$$

Se calculó un valor t experimental usando la fórmula propuesta por Quatrochi detallada a continuación:

$$t_{ob} = \frac{|\bar{R} - 100\%|}{RSD / \sqrt{n}}$$

Donde 100 % es el valor verdadero o esperado, es \bar{R} la recuperación media, RSD es la desviación típica y n es el número de repeticiones.

El t_{ob} fue de 1,91 menor al $t_{crítico} \pm 2,306$ para $V_{n-1} = 8$ y $\alpha/2 = 0,025$, por lo que se acepta la hipótesis nula planteada, y se concluye que el método presenta la exactitud requerida, es decir, se acepta el supuesto de que no existen diferencias significativas entre el valor medido y el 100 % de recuperación.

3. CONCLUSIONES

Se logró evaluar una metodología analítica para la determinación de bencimidazoles en vinos (basada en el método de Jullie Fillion, 1998) mediante el análisis de los parámetros selectividad, linealidad, precisión y exactitud.

En la selectividad del método, se pudo identificar el CAZ observando el tiempo de retención y el espectro de absorción del mismo. No se observaron interferencias por lo que esto permite concluir que la selectividad del método analítico fue la adecuada.

Bajo las condiciones dadas, se pudo establecer una respuesta lineal del método. Se obtuvo un coeficiente de correlación y un coeficiente de determinación acordes a lo establecido por SENASA en su Resolución 138/2002 y Quatrochi, 1992 respectivamente. Se evaluó la pendiente de la recta mediante una prueba de hipótesis con lo que se determinó que existe regresión simple lineal entre ambas variables (concentración de CAZ y área). De esto se concluye que el modelo de línea recta propuesto es el adecuado.

En la determinación de la precisión del método, el CV% obtenido cumplió con lo establecido por SENASA en su Resolución 138/2002 por lo que el método es preciso para determinar BEN y CAZ en vinos.

Con respecto a la exactitud del método, los valores de recuperación obtenidos fueron satisfactorios debido a que están dentro del rango recomendado por el *Codex alimentarius*; con lo que se concluye que el método es exacto para determinar BEN y CAZ en vinos.

Se obtuvo un método confiable con el cual controlar los niveles de contaminación de BEN y CAZ en los vinos. Esto es una herramienta importante para la industria vitivinícola ya que de esta manera se puede monitorear los niveles de estos residuos de plaguicidas en el producto terminado y de esta forma proteger la imagen y calidad de sus productos y garantizar la seguridad alimentaria de los consumidores.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que se cumple la hipótesis planteada, ya que fue posible determinar residuos de plaguicidas bencimidazoles en vinos utilizando una metodología analítica validada en vegetales.

ARAUJO, JOSÉ; DALLOS, JAIRO 2006. "Metodología para la determinación de residuos de fungicidas benzimidazólicos en fresa y lechuga por HPLC-DAD" [en línea] Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C. Colombia. www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/viewFile/839/1336 [Consulta: 15 de septiembre 2011]

BAYER CROPSSCIENCIE, 2005 "Hoja de seguridad Carbendazim" [en línea] www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/...nsf/.../hds_Derosal.pdf [Consulta: 16 de septiembre 2011]

BECERRA, VIOLETA 2008. "Residuos de pesticidas en el cultivo de la vid" [en línea] INTA. Argentina. www.inta.gov.ar/ediciones/idia/fruta/pdf/residuos.pdf [Consulta: 16 de septiembre 2011]

BOULTON, R; SINGLETON, V; BISSON, L; KUNKEE, R. 2002. "Teoría y práctica de la elaboración del vino" Capítulo 2 "Viticultura para elaboradores del vino" Ediciones Acribia S.A. Zaragoza, España. p 15-65.

CAMEÁN, A; REPETO, M. 2006 "Toxicología Alimentaria", Capítulo 1 "Introducción y conceptos" Ed. Diaz Santos, España. p 1-19

CASTILLO, S. 2010. Validación del método para determinar plaguicidas carbámicos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia en conservas de puré de tomate. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias. Mendoza, Argentina. 73 p. Bibliografía citada y consultada no expresamente citada.

CODEX ALIMENTARIUS FAO/OMS, 1997. "Límites máximos del codex para residuos de plaguicidas" [en línea] http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/pest_ref/pest-s.htm#E10E2 [Consulta: 18 de agosto 2011]

CODEX ALIMENTARIUS FAO/OMS, 1999 "Directrices sobre Buenas Prácticas en el Análisis de Residuos de Plaguicidas CAC/GL33-1999" [en línea] www.bvsde.paho.org/bvstox/e/fulltext/codex2a/codex2a.pdf [Consulta: 04 de enero 2012]

CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, 2010. Capitulo XIII Bebidas fermentadas. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. [Consulta: 15 de octubre 2011]

COSCOLLA, R 1993 "Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales." Ediciones Mundi Prensa, Madrid. p 85-92

DERACHE, R. 1990 "Toxicología y seguridad de los alimentos" Capítulo 13 "Toxicidad de residuos de pesticidas" Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. p 249-293.

FABRO M. 2009. "Validación de metodologías analíticas". Curso Teórico Práctico dictado el 24 de septiembre de 2009. INTI Frutas y Hortalizas.

FICHAS INTERNACIONALES DE SEGURIDAD QUÍMICA ,1994 "Hoja de seguridad Benomil" [en línea]

<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/301a400/nspn0382.pdf> [Consulta: 28 de diciembre 2011]

FILLION, JULIE. 1998. "The Determination of Benomyl in Apples and in Plant Material by LC-UV and LC-MS". Compliance, Laboratory Services and Regional Operations Division Pest Management regulatory Agency Health Canada- Method N° P-RE-029-98(1) BEH-Fv Págs.14.

GARFIELD F. 1993. "Principios de garantía de calidad para laboratorios analíticos" Edición Española. AOAC International. p 69 -79

GRIMALT BREA, SUSANA 2009. "Nuevas aportaciones de LC-MS con analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo en el análisis de residuos de plaguicidas y metabolitos en alimentos de origen vegetal" [en línea] Instituto Universitario de Plaguicidas y Agua, Universitat Jaume I Castellon de la Plana, España.

http://repositori.uji.es/xmlui/bitstream/handle/10234/9455/Nuevas_aportaciones_LC-MS.pdf?sequence=3 [Consulta: 01 de septiembre 2011]

GUÍA DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS PARA LA REPUBLICA ARGENTINA, 2011. Tomo I y II. Ed CASAFE. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes.

HENAO, SAMUEL; NIETO, OSCAR, 2003 "Aspectos generales sobre los plaguicidas y su efecto sobre el hombre y el ambiente" Publicación INCAP MDE-025.

INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA, 2011. "Exportaciones Argentinas de vinos" [en línea] http://www.inv.gov.ar/est_exportaciones.php?ind=2011 [Consulta: 16 de septiembre 2011]

INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA, 2011. "Vitivinicultura Argentina" [en línea] http://www.inv.gov.ar/vitiv_arg.php [Consulta: 16 de septiembre 2011]

INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA, 2010. "Registro de Viñedos y Superficie" [en línea] http://www.inv.gov.a/est_varios.php?que=rg_vinedos [Consulta: 16 de septiembre 2011]

INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA, 1989. "Ley General de Vinos N° 14.878" [en línea] <http://www.inv.gov.ar> [Consulta: 31 de enero 2012].

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1993 “Environmental Health Criteria 148 Benomyl” [en línea] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc148.htm> [Consulta: 10 de enero 2012]

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1993 “Environmental Health Criteria 149 Carbendazim” [en línea] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc149.htm> [Consulta: 10 de enero 2012]

INSTITUTO DE SANIDAD Y CALIDAD AGROPECUARIA MENDOZA, 2012 “Primer alerta para el control de la polilla de la vid” [en línea] www.iscamen.com.ar [Consulta: 10 de marzo 2012]

LEHOTAY, STEVEN 2007 “QUECHERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods” [en línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21643905> [Consulta: 28 de septiembre 2011]

LÓPEZ FERNÁNDEZ JUAN, 1998 “Fungicidas de utilización vitícola” [en línea] Novartis Agro S.A. Departamento de Investigación y Desarrollo, España
<http://4w.cajaduero.es/agro/public/cap7cone.htm> [Consulta: 31 de enero 2012].

LÓPEZ MONZÓN, AROA 2007 “Determinación de fungicidas bencimidazolicos en muestras líquidas medioambientales mediante el acoplamiento SPME-HPLC” [en línea] Universidad de las Palmas de Gran Canaria. España.
www.acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/3498/1/0595168_00000_0000.pdf [Consulta: 18 de agosto 2011]

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO, 2011. “Situación y estadísticas del sector vitivinícola mundial” [en línea] <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquessecteurvitivinicole> [Consulta: 16 de noviembre 2011]

QUATROCHI, O., 1992. “Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica” Impreso en Argentina. 407 p.

RAMÍREZ MILLA, LUCÍA 2009. “Determinación de pesticidas en vegetales mediante cromatografía de gases-espectrometría de masa/masa (GC-MS/MS)” [en línea] Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México www.jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10970.pdf [Consulta: 16 de noviembre 2011]

RED DE ACCIÓN EN PLAGUICIDAS Y SUS ALTERNATIVAS PARA AMÉRICA LATINA (RAP-AL), 2008. “Plaguicida con prontuario” [en línea]
http://www.rapal.org/articulos_files/Benomil_Enlace_81.pdf [Consulta: 15 de septiembre 2011]

REGLAMENTO DE LA C.E. SOBRE LMR DE CARBENDAZIM, 2011. Resolución N° 559/2011 de la comisión.

SENASA, 2010. Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas. Resolución 934/2010

SENASA, 2002. Requerimientos para la validación interna de métodos analíticos y presentación de informes de validación. Resolución 138/2002.

URBASO, 2003. "Modelo para el seguimiento del Oidio y la Botritis en la Vid" [en línea] Documento Técnico 11/05, Bilbao, España www.urbaso.com/dokutek/HToidio_botritis.PDF [Consulta: 28 de diciembre 2011]

THE AUSTRALIAN WINE RESEARCH INSTITUTE, 2012 "Maximum Residue Limits (MRLs)" [en línea] http://www.awri.com.au/industry_support/viticulture/agrochemicals/mrls/ [Consulta: 31 de enero 2012]

VALLE VEGA, PEDRO 2000. "Toxicología de los Alimentos" [en línea] Universidad Nacional Autónoma de México; Instituto Nacional de Salud Pública Centro Nacional de Salud Ambiental www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/toxicolo/toxico/toxico.pdf [Consulta: 31 de enero 2012]

WYSS GABRIELA, 2005 "Producción de uva y Fabricación de vino, Control de la Calidad y Seguridad en las Cadenas de Producción Orgánica" [en línea] Research Institute of Organic Agriculture FiBL and University of Newcastle upon Tyne, Switzerland http://orgprints.org/4928/1/14_VINO.pdf [Consulta: 28 de diciembre 2011]

ANEXO 1

1. MATERIALES

1.1 Equipamiento de laboratorio

- Balanza granataria Shimadzu
- Balanza analítica Sartorius
- Heladera Coventry
- Agitador Decalab
- Micropipeta Eppendorf de 100-1000 microlitros
- Micropipeta Socorex de 20-200 microlitros
- Rotavapor Yamato
- Baño de agua termostatzado
- Viales de vidrio de 5ml y 10ml
- Enlermeyer de 250ml
- Vaso de precipitado de 100ml y 250ml
- Matraz de 5 ml, 10 ml, 50 ml y 1000ml
- Probetas de 50ml y 100ml
- Balones de destilación de 250ml
- Ampollas de decantación de 250ml
- Papel de filtro con espesor de 150 μ m
- Embudos
- Filtros de membrana de nylon para jeringa de 0,2 μ m
- Tiras indicadoras de pH (0-14) Merck
- Jeringas descartables de 5 ml

1.2 Equipamiento cromatográfico utilizado

- Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución marca Hewlett Packard Serie Agilent 1100 (HPLC)
- Columna Analítica para HPLC, marca GL Siences Inc. Inertsil ODS-3 (C₁₈ 5 μ m; 4.6 x 150 mm)
- Detector de Arreglo de Diodos Hewlett Packard serie 1100 (DAD):
- Computadora para procesar los datos con Software "ChemStation".
- Puerto de Inyección manual con un loop de 100 μ l de capacidad.
- Jeringas de inyección manual marca Agilent de 50 μ l de capacidad.

1.3 Drogas y reactivos

- Acetona, grado p.a (para análisis), Alkemit
- Acetonitrilo, grado HPLC, JT Baker
- Agua, grado HPLC, Merck
- Agua destilada
- Acetato de etilo, grado p.a, Alkemit
- Metanol, grado HPLC, Merck
- Sulfato de sodio anhidro, grado p.a, Alkemit
- Hexano, grado p.a, Cicarelli
- Ácido clorhídrico, grado p.a, Cicarelli
- Carbonato de Sodio, grado p.a, Alkemit
- Estándar de Carbendazim, Accustandar, Pureza 99,9% (p/p)
- Estándar de Benomil, Accustandar, Pureza 98% (p/p)

2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

2.1 Soluciones para la extracción

- Solución de HCl 0,1N: Agregar 8,33 +/- 0,1ml de HCl a un matraz de 1 litro que tenga 500ml de agua destilada. Mezclar y enrasar con agua destilada.
- Solución de CO₃Na₂ 1M: Pesar 106 +/- 0,01g de CO₃Na₂ y colocarlo en matraz de 1 litro. Disolver y enrasar con agua destilada.

2.2 Soluciones cromatográficas

Fase móvil: Filtrar 1000ml de acetonitrilo (ACN) grado HPLC bajo sistema de vacío provisto de un filtro de nylon de poro de 0,22µm y luego colocarlo en el recipiente correspondiente a ACN en el equipo cromatográfico. Proceder de la misma manera con el agua grado HPLC pero utilizar filtro de nitrato de celulosa de poro de 0,22µm.

2.3 Soluciones estándares de CAZ y BEN

a) Preparación de solución inicial o madre de patrones

Para preparar la solución inicial se pesaron con exactitud 0,0100g (en balanza analítica) del patrón de plaguicida y se llevó a volumen final con 50ml con metanol grado HPLC. El cálculo de la concentración de esta solución se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{Pp(\mu g) \times Pur}{Vf(ml) \times 100}$$

Donde:

C= Concentración de la solución de patrón expresada en ppm ($\mu g / ml$)

Pp= Peso del patrón en μg

Pur/100= Pureza porcentual del patrón en % (g/g)

Vf= Volumen final de la solución en ml.

Cálculo de la solución madre de CAZ y BEN

	CAZ	BEN
Pureza	99% (p/p)	98% (p/p)
Peso	0,0099g	0,0102g
Corrección por Pureza	0,0099g	0,0104g
Volumen Final	50ml	50ml
Concentración Final	198ppm	208ppm

b) Preparación de soluciones de trabajo

Fueron preparadas a partir de la solución madre. Se tomaron diferentes volúmenes dependiendo de la concentración final deseada con micropipetas adecuadas.

Para el cálculo de las concentraciones finales se trabajó con la siguiente fórmula analítica:

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$

Donde:

V₁: Volumen necesario de la solución madre para que la solución final quede con la concentración deseada (expresado en μl).

C₂: Concentración de la solución final que se desea preparar (expresada en ppm).

V₂: Volumen final de la solución final que se desea preparar (expresado en μl).

C₁: Concentración de la solución madre de la que se parte para preparar las soluciones finales de trabajo (expresada en ppm).

Todas las diluciones preparadas fueron mantenidas a temperaturas inferiores a 0°C según especificaciones del certificado del estándar.

3. CALCULOS

3.1 Concentración final de la muestra

Para el cálculo de la concentración final de la muestra de vino se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Muestra} = \frac{PM}{VF}$$

Donde:

PM: Peso de la muestra de vino para el análisis (en g)

VF: Volumen del extracto final (en ml)

Para nuestro método es:

$$\frac{10 \text{ g Vino}}{0,5 \text{ ml VF}} = 20$$

3.2 Concentración de CAZ en la muestra

Se emplean las siguientes fórmulas:

$$FR = \frac{\text{Área}}{\text{concentración}}$$

Donde:

FR: Factor respuesta

Área: es el área bajo la curva del pico de CAZ en el cromatograma del estándar de concentración conocida.

Concentración: concentración de CAZ en ppm que se inyectó

$$\text{Concentración de CAZ (ppm)} = \frac{AM}{\overline{FR} \times \text{Conc. Muestra}}$$

Donde:

AM: Área bajo la curva del pico de CAZ en el cromatograma de la muestra.

\overline{FR} : Factor respuesta medio obtenido al promediar los factores respuestas individuales calculados en la recta de calibración.

Conc. muestra: Concentración de la muestra inyectada.

3.3 Cálculo para las contaminaciones

a) Precisión

Se contaminaron las diez muestras de vino con 250µl de cada estándar de 10ppm para un nivel de 0,25ppm debido a que en la extracción el BEN es totalmente convertido a CAZ, la suma de ambos dio un nivel final de 0,5ppm de CAZ en la muestra.

$$CAZ = \frac{10000 \times 0,25}{10} = 250 \text{ microlitro}$$

$$BEN = \frac{10000 \times 0,25}{10} = 250 \text{ microlitro}$$

b) Exactitud

Se contaminaron tres muestras de vino con 500µl de cada estándar de 2ppm para un nivel de 0,1ppm debido a que en la extracción el BEN es totalmente convertido a CAZ, la suma de ambos dio un nivel final de 0,2ppm de CAZ en la muestra. Para un nivel final de 0,5ppm se contaminaron tres muestras con 250µl de de cada estándar de 10ppm y para 1ppm se contaminaron tres muestras con 500µl de CAZ y BEN de 10ppm.

Para 0,2 ppm

$$CAZ = \frac{10000 \times 0,1}{2} = 500 \text{ microlitro}$$

$$BEN = \frac{10000 \times 0,1}{2} = 500 \text{ microlitro}$$

Para 0,5 ppm

$$CAZ = \frac{10000 \times 0,25}{10} = 250 \text{ microlitro}$$

$$BEN = \frac{10000 \times 0,25}{10} = 250 \text{ microlitro}$$

Para 1 ppm

$$CAZ = \frac{10000 \times 0,5}{10} = 500 \text{ microlitro}$$

$$BEN = \frac{10000 \times 0,5}{10} = 500 \text{ microlitro}$$

c) Recuperaciones

Matemáticamente se calcula como:

$$R = \frac{x_i}{x} \times 100$$

Donde:

R: recuperación.

x_i = valor obtenido

x = valor verdadero

ANEXO 2

CURVA DE CALIBRACIÓN CAZ

REGISTRO DE CALIBRACION DE CROMATOGRAFOS

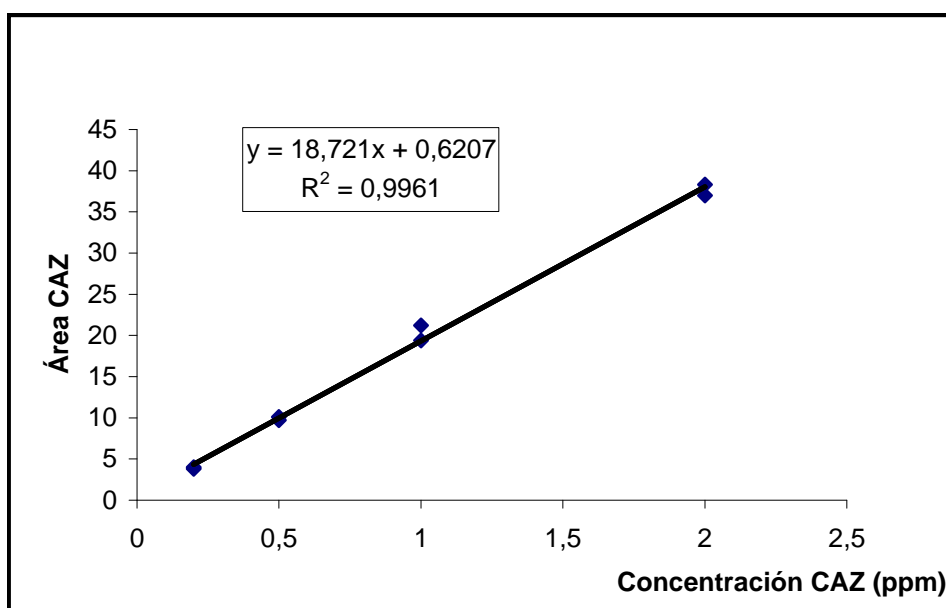
FECHA: 07/03/2012

PLAGUICIDA: Carbendazim

CROMAT: HPLC

conc	area	tr	w	fr	N	N/m
0,2	3,8	6,077	0,2333	19	3759	125
0,2	4	6,114	0,2267	20	4030	134
0,5	9,7	6,125	0,2289	19	3967	132
0,5	10,1	6,115	0,22	20	4280	143
1	21,2	6,114	0,2311	21	3878	129
1	19,4	6,129	0,2267	19	4049	135
2	37	6,147	0,2333	19	3846	128
2	38,3	6,128	0,2311	19	3895	130

Media Fr	20	N medio	N/m	50 % N/m
DS Fr	1	20	3963	1981
CV%	4			
tr medio	6,119	LIMITES FR	24	
tr + 0,5 min	6,619		16	
tr - 0,5 min	5,619			



Observaciones:

Cálculo de t para $\beta_1(\alpha=0,05)$

n° de Obs	Conc X	Area Y	X ²	Y ²	X . Y
1	0,2	3,8	0,04	14,44	0,76
2	0,2	4	0,04	16	0,8
3	0,5	9,7	0,25	94,09	4,85
4	0,5	10,1	0,25	102,01	5,05
5	1	21,2	1	449,44	21,2
6	1	19,4	1	376,36	19,4
7	2	37	4	1369	74
8	2	38,3	4	1466,89	76,6
Sumatoria	7,4	143,5	10,58	3888,23	202,66
Media	0,925	17,9375			
Sum al cuadr	54,76	20592,25			

($t_{\alpha/2}; n-2$)

$y=18,721x+ 0,6207$

n= 8

$\beta_1= 18,721$

$\beta_0= 0,6207$

Sxy= 69,9225

1061,9 ($\Sigma X \cdot \Sigma Y$)

Sxx= 3,735

Syy= 1314,19875

σ^2 0,86327125

5,1796275 ($Syy-\beta_1 \cdot Sxy$)
6 (n-2)

var (β_1)= 0,23113019

Desv. Típ. (β_1) 0,48076001

Para $\beta_1=0$ tmuestral= 38,9404268 (β_1/S_{β_1})

tcritico= 2,447

CÁLCULO DE PRECISIÓN

Muestra	Nivel de concentración	Concentración Muestra	Factor Respuesta Medio	Área	Cuantificación CAZ
1	0,5	20	20	145,9	0,36
2	0,5	20	20	193,5	0,48
3	0,5	20	20	186,1	0,47
4	0,5	20	20	163,2	0,41
5	0,5	20	20	185,6	0,46
6	0,5	20	20	169,3	0,42
7	0,5	20	20	176,9	0,44
8	0,5	20	20	158,8	0,40
9	0,5	20	20	165,7	0,41
10	0,5	20	20	150,3	0,38
Media					0,42
DS					0,04
CV %					9,35

CÁLCULO DE EXACTITUD

Muestra	Concentración Muestra	Factor Respuesta Medio	Área	Cuantificación CAZ	%R
0,2	20	20	63,8	0,16	80
0,2	20	20	70,3	0,18	88
0,2	20	20	65,1	0,16	81
0,5	20	20	192,7	0,48	96
0,5	20	20	175,5	0,44	88
0,5	20	20	180,6	0,52	104
1	20	20	366,1	0,92	92
1	20	20	415,3	1,04	104
1	20	20	433,2	1,08	108
Media				0,55	93,42
DS				0,37	10,30
CV %				67,58	11,03