

## **Residues of organophosphorus pesticide in must and grape wine**

**Gretty Ettiene, Avismelsi Prieto, Deisy Medina, Ignacio Buscema  
Luis Sandoval y Lisbeth Unda**

*División de Postgrado, Facultad de Ingeniería  
Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia  
Centro Vitícola del Estado Zulia*

### **Abstract**

Must and wine are beverages of great worldwide consumption subject to regulations on pesticide residues which may get to them as a result of applying pesticides for plague control in vineyards. The organophosphorus insecticides are of common used in Venezuela due to their high efficiency, nevertheless, their toxicity may affect human beings that drink the contaminated beverages. That is why, the analysis of the residues and knowledge of the persistence of these substances in must and wine, is of main interest. This work measured the persistence of the organophosphorus insecticides monocrotophos, dimethoate, malathion and parathion throughout their course from grapes of the Malvasia Istria vineyards treated with the mentioned insecticides, up to the derived drinks of must and wine. Analyses of the residues of insecticides in the must and wine were carried out using liquid-solid extraction with graphitized carbon black and capillary gas chromatography. Degradation of the four insecticides, measured in the must, followed a first order kinetics with a half-lives ranging from 0.50 to 3.83 days. The transformation of must into wine, caused a considerable diminution (>75%) in the insecticides concentration.

**Key words:** Persistence, insecticide, must, wine.

## **Residuos de insecticidas organofosforados en mosto y vino de uvas**

### **Resumen**

El mosto y el vino son bebidas de gran consumo mundial sujetas a regulaciones de residuos de plaguicidas que puedan llegar a ellas como consecuencia de su aplicación contra plagas que atacan los viñedos. Los insecticidas organofosforados son muy usados en Venezuela por su alta eficiencia, sin embargo debido a su toxicidad pueden afectar al humano que ingiere las bebidas contaminadas. De aquí que el análisis de residuos y el conocimiento de su persistencia en mosto y vino sea de fundamental interés. En este trabajo se evaluó la persistencia de los insecticidas organofosforados monocrotophos, dimethoate, malathion y parathion en su trayectoria desde las uvas de plantas de la variedad Malvasia Istria, tratadas con los insecticidas, hasta las bebidas derivadas mosto y vino. Los análisis de residuos en el mosto y vino se realizaron utilizando extracción líquido-sólido con carbón grafitado y cromatografía gaseosa capilar. La degradación de los cuatro insecticidas, medidos en el mosto, siguió una cinética de primer orden, con tiempos de vida media entre 0.50 y 3.83 días. La transformación de mosto a vino, causó una considerable disminución (>75 %) en la concentración de los insecticidas.

**Palabras clave:** Persistencia, insecticidas, mosto, vino.

## Introducción

En los últimos años la producción agrícola se ha tecnificado, logrando notables aumentos en la calidad y rendimiento de los cultivos. Entre esos adelantos que la tecnología ha aportado, se encuentra el uso de insecticidas, los que han permitido controlar las plagas e incrementar la productividad agrícola [1].

Los insecticidas organofosforados son actualmente muy usados en Venezuela a raíz de la prohibición de uso de los insecticidas organoclorados que tienen una alta persistencia en el ambiente y son altamente tóxicos. Los organofosforados han resultado ser muy eficientes en el control de plagas con un costo relativamente bajo, pero igualmente son sustancias tóxicas, es por ello que su uso debe ser moderado, no sólo como control ambiental sino también para proteger la salud del hombre.

Los insecticidas organofosforados actúan inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa, enzima que cataliza la hidrólisis de la acetilcolina, la cual se acumula y produce síntomas tóxicos. Cuando la acumulación de la acetilcolina sobrepasa los niveles letales tolerados por los organismos, se produce desde asfixia hasta la muerte [2].

Uno de los principales cultivos frutícolas del Estado Zulia es la uva, con una superficie de producción de uvas que supera las 400 hectáreas [3]. Actualmente la viticultura zuliana está en expansión, diversificando su producción con la introducción de variedades de uvas para vino, pero los problemas por plagas y enfermedades son factores limitantes ya que disminuyen el vigor de la planta y reducen o destruyen la producción, constituyéndose la aplicación de insecticidas organofosforados en una actividad rutinaria en gran cantidad de granjas vitícolas [4]. Esta actividad puede traer como consecuencia que altos niveles de insecticidas organofosforados puedan presentarse en las uvas al momento de la cosecha, especialmente cuando los ingredientes activos poseen altas estabildades. Por otra parte residuos de éstos insecticidas pueden persistir en los mostos y vinos obtenidos a partir de dichas uvas, lo que se traduce en un riesgo de contaminación para los consumidores de mosto y vino de uvas [5].

En este trabajo se determinaron los residuos de cuatro insecticidas organofosforados (monocrotophos, dimethoate, malathion y parathion) en muestras de mosto y vino preparadas a partir de uvas de la variedad Malvasia Istria que fueron tratadas en el campo de cultivo con una dosis de los citados insecticidas. También se describe la cinética de persistencia de los cuatro insecticidas en las muestras de mosto.

## Materiales y Métodos

### Reactivos

Se utilizaron estándares de insecticidas de alta pureza (Dr. Ehrenstorfer), para preparar soluciones madres de 1000 µg/mL de cada insecticida en acetato de etilo grado HPLC (Baker). Las soluciones patrón de calibración se prepararon por dilución de las soluciones madres en acetato de etilo. Las soluciones patrón de los insecticidas empleados en el salpicado se prepararon en metanol grado HPLC (Baker). La acetona empleada fue grado HPLC (Fisher). El sulfato de sodio anhidro y el trifenilfosfato fueron grado análisis (Riedel de Haën). El ácido acético glacial empleado en la extracción fue grado análisis (BDH). La bentonita sódica fue empleada como clarificante (Littorale Oenologic, S.A.), el metabisulfito de sodio empleado como antiséptico fue grado análisis. En el procedimiento de extracción se emplearon cartuchos de 250 mg de carbón grafitado (Supelco).

### Equipos

Los análisis efectuados en este trabajo se realizaron en un cromatógrafo gaseoso, Auto System Perkin Elmer, equipado con un detector nitrógeno-fósforo, un muestreador automático Perkin Elmer, una columna capilar de 30 m x 0.53 mm x 1.2 µm de espesor de película de 5% fenil metil silicona AT-5 (Alltech). El registro de los cromatogramas y la integración del área de los picos se realizó con un computador personal, equipado con un software Nelson 2000. El inyector y el detector se operaron a 250 y 280°C respectivamente. Las muestras se inyectaron en el modo split less. El programa de temperatura del horno fue 60°C por 0.80 min; rampa 1: 40 °C/min hasta 100°C; rampa 2: 3.5 °C/min hasta 230°C; rampa 3: 8 °C/min hasta 280°C sostenido

por 1 min. Se empleó helio como gas de arrastre a 10 mL/min e hidrógeno y aire como gases del detector a 1.70 y 100 mL/min, respectivamente. El umbral de trabajo del detector fue 0.75 mV.

### Estudio de Persistencia

El estudio fue realizado sobre plantas de uva de la variedad Malvasia Istria cultivadas en el Centro Vitícola del Estado Zulia. Se empleó un diseño experimental totalmente al azar con cuatro repeticiones y un control. El área total de cultivo para el estudio fue de 288 m<sup>2</sup>. Cada repetición abarcó un grupo de cinco plantas de uvas. La aplicación de los insecticidas fue realizada en Marzo de 1996. Los insecticidas se aplicaron por aspersión de sus formulaciones comerciales a las dosis recomendadas por el fabricante: Inisan 60 (conteniendo 55% de Monocrotophos como ingrediente activo) a 1.3 L/ha (715 g/ha de ingrediente activo), Sistemín 40 (40% de Dimethoate) a 1.6 L/ha (640 g/ha de i.a), Malathion 57 (57% de Malathion) a 1.8 L/ha (1026 g/ha de i.a), Parathion 50 (50% de Parathion Etilico) a 1.3 L/ha (624 g/ha de i.a). El muestreo de las uvas se efectuó tomando del control y de cada repetición un peso aproximado de 2 Kg de uvas. El primer muestreo se realizó una hora después de la aplicación de los insecticidas (cuando estaban secas las plantas). Se repitieron los muestreos los días 1, 3, 5, 7, 12, 16, 21 y 26 después de la aplicación. Las muestras de uvas se guardaron en bolsas de polietileno y se trasladaron al laboratorio para su inmediato procesamiento.

Para la preparación del mosto y el vino las uvas se estrujaron y prensaron. Obtenido el mosto se le adicionó metabisulfito de sodio a una dosis de 200 mg/L y bentonita a 1.5 g/L. El mosto se dejó en reposo durante 30 minutos, posteriormente 20 mL se centrifugaron a 2000 r.p.m, durante 20 minutos. Se tomaron 10 mL de este mosto claro y se sometieron al análisis de residuos de insecticidas. El mosto restante se dejó en reposo durante 24 horas a 18°C. Cumplido este tiempo fue desfogado y seguidamente se realizaron mediciones de Grados Brix (Sólidos Solubles) con la finalidad de realizar la corrección de azúcar (Chaptalización). Obtenidos los valores de Grados Brix se corrigió la relación 17 gramos de azúcar producen 1° de alcohol. Se adicionó la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a una dosis

de 0.15 g/L para el inicio de la fermentación, un mes después los vinos se filtraron y porciones de 10 mL se sometieron al análisis de residuos de insecticidas.

### Procedimiento de Extracción

La extracción líquido-sólido se realizó según la metodología de Prieto y colaboradores [6]. El cartucho fue acondicionado con 5 mL de acetato de etilo/acetona (80:20), 1 mL de acetona y 14 mL de ácido acético 2% p/v. Seguidamente se pasaron a través del cartucho 50 mL de las muestras diluidas con agua desionizada de mosto o vino relación (10:40) a un flujo de 5 mL/min. El cartucho se secó al vacío por 5 minutos y luego se eluyeron los insecticidas con 2 porciones de 0.5 mL de acetona y 3 porciones de 2.5 mL de acetato de etilo/acetona (80:20). Los extractos se recogieron en viales conteniendo 1 gramo de sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el extracto hasta 1 mL, con una corriente de nitrógeno a 35°C. Se salpicó con trifenil fosfato (Estándar Interno) y se inyectó por duplicado 1 µL en el cromatógrafo gaseoso.

### Ensayo de Recuperación

La eficiencia del método de extracción se determinó calculando los porcentajes de recuperación. Para ello, muestras de mosto y vino comerciales se salpicaron con una solución metanólica de los insecticidas y se sometieron al procedimiento de extracción líquido-sólido con carbón grafitado, antes descrito. Las recuperaciones se realizaron para niveles de 0.01, 0.05 y 0.5 µg/mL.

### Resultados y Discusión

El estudio de recuperación de los cuatro insecticidas mostró eficiencia entre 78 y 106% para los tres niveles de concentración evaluados con un coeficiente de variación promedio de 4%. Estos valores reflejan una adecuada exactitud y precisión para la metodología de análisis utilizando la extracción líquido-sólido con cartuchos de carbón grafitado y cromatografía gaseosa capilar. La Figura 1 muestra un cromatograma típico de un extracto de vino.

Los datos obtenidos para las concentraciones (µg/mL) de los residuos de insecticidas obte-

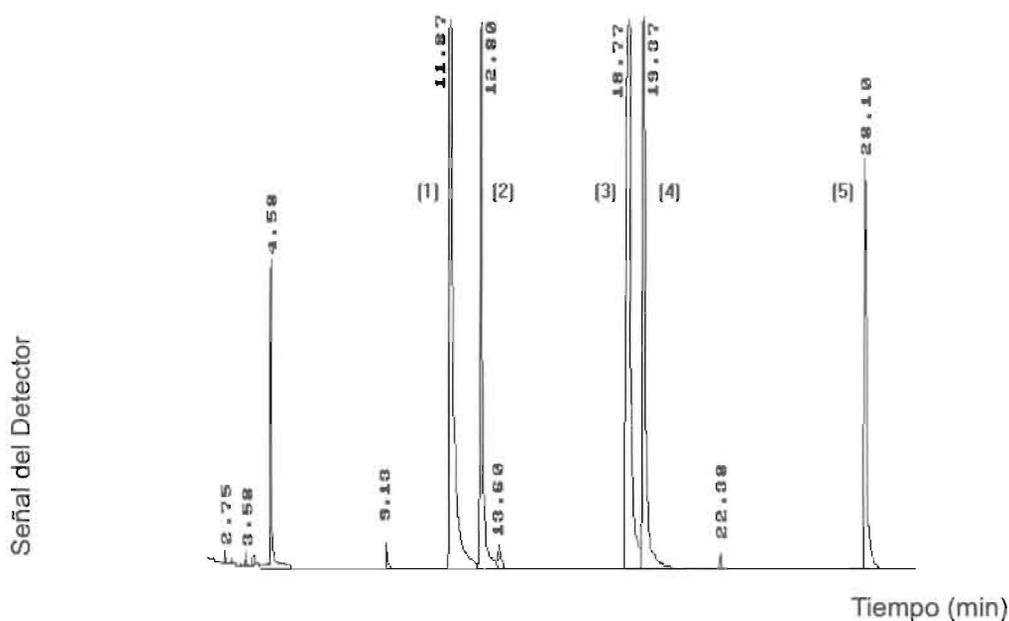


Figura 1. Cromatograma típico de la determinación de los insecticidas organofosforados de un extracto de vino. (1) Monocrotophos, (2) Dimethoate, (3) Malathion, (4) Parathion y (5) Trifenilfosfato.

nidos en las muestras de mosto y vino de uvas son mostrados en la Tabla 1.

#### Persistencia de Monocrotophos

La concentración de monocrotophos entre los días uno y cinco se incrementó con respecto a la concentración inicial, este comportamiento puede deberse a la adhesión de monocrotophos a las uvas, seguido de permeación del insecticida en el fruto, lo que permitió que estos residuos persistieran en el mosto [7]. El día siete después de la aplicación la concentración disminuyó en un 23 % con respecto a la concentración inicial. El día doce se observó un nuevo incremento en la concentración de monocrotophos. Este comportamiento no ideal pudiera ser el resultado de la competencia entre los factores antagónicos: la degradación química del insecticida (que disminuye la concentración) y la permeación del fruto por el insecticida (que aumenta su concentración). A partir del día dieciséis las concentraciones de monocrotophos disminuyeron rápidamente. En la Figura 2 se observa la disminución de las concentraciones residuales de monocrotophos con respecto al tiempo.

La tasa de disminución de los residuos de monocrotophos en el mosto mostró una cinética

de primer orden (Figura 3) con un tiempo de vida media de 3.83 días. La ecuación de regresión lineal para la dosis aplicada fue:

$$Y = -0.721 - 0.181t.$$

El coeficiente de correlación fue:  $r = -0.835$ , con probabilidad de significancia estadística  $P \leq 0.01$  indicando una alta correlación negativa entre los residuos de monocrotophos con respecto al tiempo. La transformación de los mostos a vino causó una reducción considerable de los residuos de monocrotophos de un 92% de su concentración promedio en el mosto de origen.

#### Persistencia de Dimethoate

La concentración de dimethoate en el mosto del día cero fue de  $0.239 \mu\text{g/mL}$ , un incremento se observó al día siguiente de la aplicación, este comportamiento puede deberse a la penetración de dimethoate a la uva, lo que es característico de los insecticidas sistémicos [7]. Una rápida disipación de los residuos fue observada a partir del día dieciséis (Figura 2). Las concentraciones de dimethoate estudiadas en el mosto mostraron altas tasas de disminución con una cinética de primer

Tabla 1  
Residuos de insecticidas ( $\mu\text{g/mL}$ ) en mosto y vino de uvas

	Días después de la aplicación	Insecticidas			
		Monocrotophos $\bar{X}\pm S$	Dimethoate $\bar{X}\pm S$	Malathion $\bar{X}\pm S$	Parathion $\bar{X}\pm S$
Mosto	00	0.171 $\pm$ 0.083	0.239 $\pm$ 0.063	1.098 $\pm$ 0.195	0.425 $\pm$ 0.177
	01	0.224 $\pm$ 0.110	0.332 $\pm$ 0.110	0.389 $\pm$ 0.060	0.091 $\pm$ 0.014
	03	0.582 $\pm$ 0.447	0.093 $\pm$ 0.053	0.006 $\pm$ 0.005	ND
	05	0.386 $\pm$ 0.280	0.198 $\pm$ 0.052	ND	
	07	0.131 $\pm$ 0.042	0.100 $\pm$ 0.022		
	12	0.259 $\pm$ 0.068	0.041 $\pm$ 0.017		
	16	0.013 $\pm$ 0.001	0.011 $\pm$ 0.008		
	21	0.006 $\pm$ 0.006	ND		
	26	ND			
Vino	00	0.018 $\pm$ 0.010	0.042 $\pm$ 0.054	0.469 $\pm$ 0.256	0.003 $\pm$ 0.001
	01	ND	0.036 $\pm$ 0.023	0.054 $\pm$ 0.041	ND
	03	0.010 $\pm$ 0.01	0.046 $\pm$ 0.012	0.003 $\pm$ 0.001	
	05	ND	0.028 $\pm$ 0.001	ND	
	07	0.005 $\pm$ 0.003	0.029 $\pm$ 0.012		
	12	0.007 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.001		
	16	ND	ND		
	21				
	26				

orden (Figura 3) y un tiempo de vida media de 3.17 días. La ecuación de regresión lineal fue

$$Y = - 1.048 - 0.219t$$

Con un  $r = - 0.965$ , con probabilidad estadística  $P \leq 0.01$ . La conversión de mosto a vino causó una reducción de los residuos de dimethoate de un 92 % de su concentración promedio en el mosto de origen.

#### Persistencia de Malathion

La concentración de residuos de malathion en el mosto del día cero fue de 1.098  $\mu\text{g/mL}$ . Entre los días 1 y 7 después de la aplicación se observó una rápida disminución en la concentración de los residuos de malathion (Figura 2). Resultados similares se observaron en un estudio de persistencia de malathion en tomates cultivados en granja [8].

La tasa de disipación de malathion en mosto siguió una cinética de primer orden (Figura 3) y

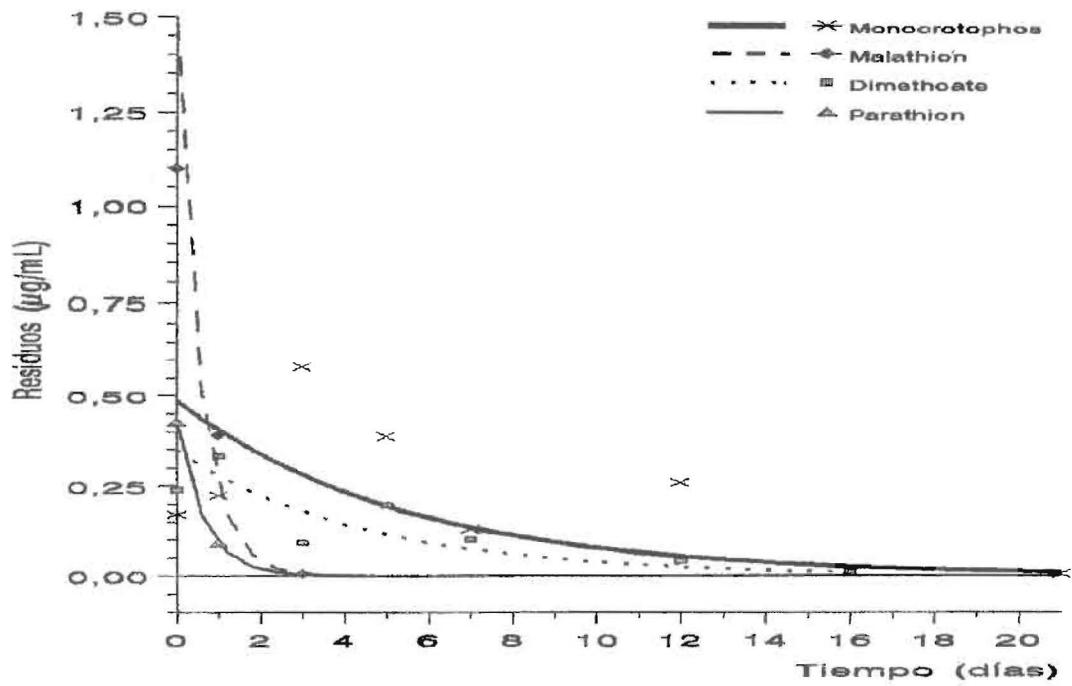


Figura 2. Tendencia en la disminución de la concentración de residuos de plaguicidas en mosto.

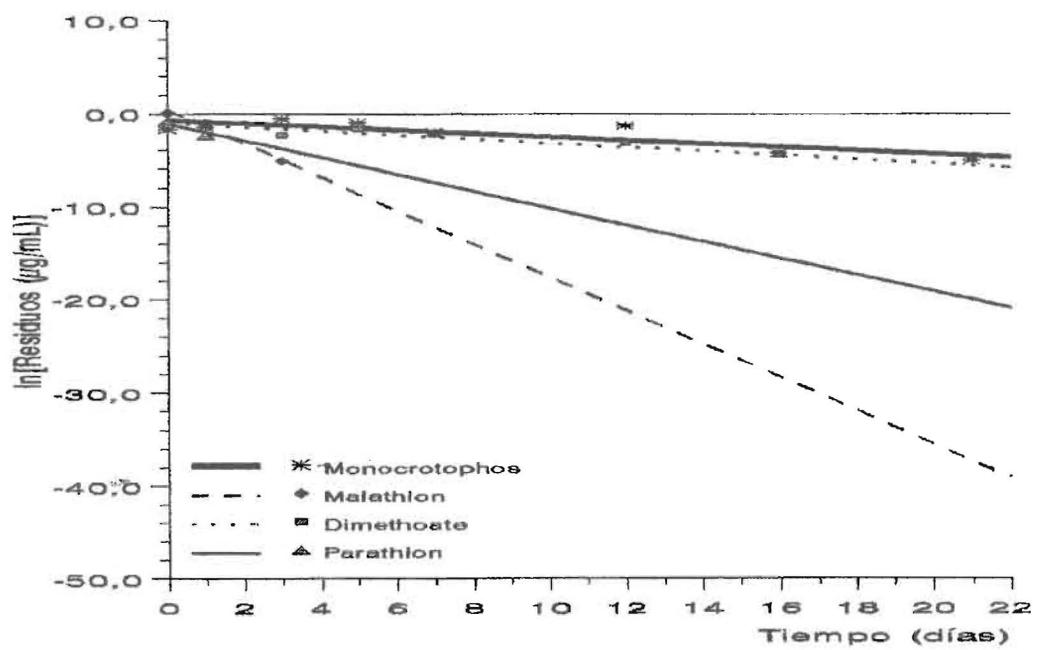


Figura 3. Demostración de una cinética de primer orden en la degradación de plaguicidas en mosto.

Tabla 2  
Efecto del tipo de insecticida sobre las concentraciones en mosto y vino ( $\mu\text{g/mL}$ )

	Insecticida	
	Sistémico	Contacto
Mosto	$0.162^a \pm 0.018$	$0.114^b \pm 0.018$
Vino	$0.013^a \pm 0.007$	$0.029^b \pm 0.007$

\* Medias asociadas con letras distintas (a, b) son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

un tiempo de vida media de 0.50 días. La ecuación de regresión lineal para la dosis aplicada fue:

$$Y = -0.105 - 1.401t$$

con un  $r = -0.983$ , con probabilidades de significancia estadística  $P \leq 0.01$ . El procedimiento de conversión de mostos en vino produjo una reducción de los residuos de malathion en un 75% respecto a la concentración promedio en el mosto.

#### Persistencia de Parathion

La concentración de parathion en el mosto del día cero fue de  $0.425 \mu\text{g/mL}$ . El día siguiente a la aplicación se observó una rápida disipación en la concentración residual del insecticida en un 79% (Figura 2), este comportamiento, al igual que en el caso de malathion, puede asociarse a procesos de volatilización por acción de las condiciones ambientales [7] y a la acción no sistémica o de contacto del insecticida [1]. El análisis de los residuos de parathion en mosto presentó una alta tasa de disminución después de la aplicación del insecticida, con una cinética de primer orden (Figura 3) y un tiempo de vida media de 0.76 días. La ecuación de regresión lineal para la dosis aplicada fue:

$$Y = -1.772 - 0.918t$$

con un  $r = -0.898$ , con una probabilidad de significancia estadística  $P \leq 0.01$ .

La transformación de mosto a vino causó una significativa reducción de los residuos de Parathion en un 75% respecto a la concentración media en el mosto.

El análisis de los valores encontrados para la vida media de los insecticidas en el mosto de

uvas, muestra que los insecticidas sistémicos monocrotophos y dimethoate persisten durante mayor tiempo que los insecticidas de contacto malathion y parathion. La prueba de Tukey, aplicada a las concentraciones medias de los insecticidas sistémicos y de contacto encontrados en el mosto muestra que existen diferencias significativas  $P \leq 0.05$  (Tabla 2).

Este comportamiento se justifica en base a que los insecticidas sistémicos al penetrar en el fruto, sufren en menor magnitud los efectos degradativos del ambiente externo que rodea la planta de uva y de allí que persistan por mayor tiempo. El comportamiento degradativo de los residuos de los insecticidas monocrotophos, dimethoate, malathion y parathion en su trayectoria desde la uva en planta hasta la obtención del vino es similar a la observada por Cabras y colaboradores para otros insecticidas organofosforados en un estudio realizado en Italia [5].

#### Conclusiones

1.- La degradación de los cuatro insecticidas estudiados, medidos en el mosto siguió una cinética de primer orden. Para una sola aplicación de los insecticidas sobre las uvas, el tiempo de vida media de éstos fue de 3.83 días para monocrotophos, 3.17 días para dimethoate, 0.50 días para malathion y 0.76 días para parathion.

2.- La transformación del mosto en vino, mediante el proceso de fermentación, causó una considerable disminución (>75%) de la concentración inicial de Monocrotophos, Dimethoate, Malathion y Parathion.

### Referencias Bibliográficas

1. Primo, Y. y Carrasco, D. "Química Agrícola II. Plaguicidas y Fitorreguladores". Ed. Alhambra, S.A., 1<sup>ra</sup>. Edición, España, 1977.
2. Martínez, I. "Toxicología Ambiental de los Insecticidas". Universidad del Zulia. Trabajo de Ascenso, 1974.
3. Araujo, F.; Nickel, W.; Sánchez, C. y Unda, L. "Avances de la evaluación en el potencial agronómico y enológico de nuevas variedades de uvas de vino". Revista de la Facultad de Agronomía 10 (2), 1993.
4. Avilán, L.; Leal, F. y Batista, D. "Manual de fruticultura. Principios y manejo de la producción". Tomo II. 2<sup>da</sup> Edición. Editorial América, C.A. Caracas, Venezuela, 1992.
5. Cabras, P.; Garau, V.; Pirisi, F.; Cubeddu, M.; Cabitza, F. and Spanedda, L. "Fate of some insecticides from vine of wine". J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 2603-2615.
6. Prieto, A.; Ettiene, G.; Medina, D. y Buscema, I. "Determinación de Residuos de Insecticidas Organofosforados en Vino mediante Extracción Líquido-Sólido con Carbón Grafitado". Resultados no publicados. Universidad del Zulia. Facultad de Agronomía, Departamento de Química. 1996.
7. Liapis, K.; Miliadis, G. and Aplada-Sarlis, P. "Persistencia of monocrotophos residuos in green house tomatoes". Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53: 303-308. 1994.
8. Molero, D. "Evaluación de residuos de Plaguicidas Organofosforados en tomates". Trabajo Especial de Grado. Universidad del Zulia, Facultad de Ingeniería, División de Postgrado. 1996.

Recibido el 10 de Diciembre de 1996

En forma revisada el 20 de Octubre de 1997