

ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* EN VINOS: PLAGUICIDAS, COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Oliva, J.*, Martínez, G., Cermeño, S., Cámara, M.A. y Barba, A.

Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología, Universidad de Murcia.
Facultad de Química, Campus de Espinardo s/n, 30100 (Murcia).
Teléfono: 868887482, *e-mail: josoliva@um.es

PALABRAS CLAVE: Biodisponibilidad, vino, fungicidas, compuestos fenólicos, actividad antioxidante.

Los compuestos fenólicos presentes en los vinos son componentes endógenos que diversos estudios han demostrado que tienen un efecto beneficioso para la salud, ya que muestran citotoxicidad selectiva sobre las células de cáncer, pueden compensar la aterosclerosis e impedir el desarrollo de enfermedades coronarias (Iriti y Varoni, 2014; Obrenovich et al., 2011; Walter et al., 2008; Xiang et al., 2014). También estos compuestos son los responsables de la capacidad antioxidante de los vinos, que impiden el desarrollo de radicales libres en el organismo. Frente a estos componentes beneficiosos para la salud, también podemos encontrar en el vino compuestos exógenos, cómo residuos de plaguicidas que pueden producir riesgos toxicológicos en el consumidor. Estos residuos de plaguicidas pueden aparecer en los vinos procedentes de su aplicación en la vid y posterior transferencia al mosto y vino, aunque los distintos procesos enotécnicos normalmente eliminan parte de ellos (Fernández et al., 2005; Oliva et al., 2007a). También la presencia de estos residuos puede producir alteraciones en la fermentación y en la calidad organoléptica de los vinos (García et al., 2004; Oliva et al., 2011 y 2015; Mulero et al., 2015).

La ingestión de todos estos productos endógenos y exógenos no presupone que nuestro organismo los absorba en su totalidad, ya que, lo que se produce es un proceso conocido como “ADME” o absorción, distribución, metabolismo y eliminación del compuesto en el organismo (Figura 1). La absorción es por tanto la barrera que debe superar la sustancia para llegar a su diana celular y la biodisponibilidad el proceso que mide esa capacidad de superación.

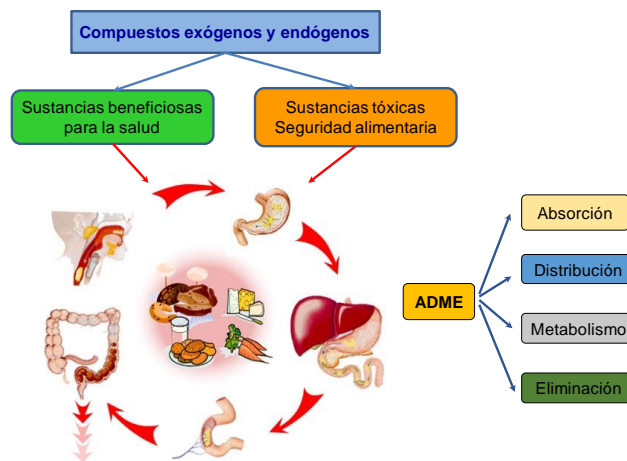


Figura 1.- Esquema del proceso ADME

Todos estos procesos se ven influenciados por factores externos como: temperatura ambiental, tiempo de exposición, etc.; o bien por la naturaleza de la sustancia química, y también por factores propios de cada individuo (edad, sexo, dotación genética, estado de salud, estado nutricional, estilos de vida, vía principal de absorción, etc.) (Ramírez y Lacasaña, 2001). Por ello, resulta de gran interés estudiar los porcentajes de estas sustancias que nuestro organismo podría incorporar a su metabolismo, obteniendo por una parte un modelo de absorción de los compuestos beneficiosos y por otra, el control de forma más real sobre aspectos toxicológicos de los residuos de plaguicidas dentro del concepto de seguridad alimentaria.

¿QUÉ ES LA BIODISPONIBILIDAD?

La biodisponibilidad alude a la porción de la dosis de un fármaco administrado de manera exógena, que llega hasta el órgano o tejido en el que lleva a cabo su acción. Desde un punto de vista toxicológico podemos asegurar que es conveniente conocer la biodisponibilidad de una sustancia peligrosa, ya que ésta “mide el acceso fisicoquímico de un tóxico a los procesos biológicos de los organismos” (US EPA, 2006); este concepto podría ampliarse también a xenobióticos como los plaguicidas, y a compuestos propios de los alimentos que presentan efectos beneficiosos, y que ingerimos habitualmente.

Para los residuos de plaguicidas este valor viene implícito en los estudios de toxicidad por ingestión que se realizan en los animales de experimentación al registrar una sustancia, pero en ellos, se aplica la sustancia en estado puro sin mezclar con los alimentos y se ha demostrado ampliamente en el campo farmacéutico que la presencia de los alimentos puede disminuir sensiblemente, o en algunos casos aumentar, la biodisponibilidad de un xenobiótico en el organismo. Por tanto, el estudio de la biodisponibilidad de una sustancia embebida en el medio que llega al organismo es esencial para determinar la dosis que realmente penetra en él y juzgar su capacidad de afectar al consumidor a través de los alimentos. En el caso de productos endógenos, éstos ya se encuentran incluidos en la estructura del alimento, por lo que únicamente se estudia el porcentaje dializado en la matriz original en la que se encuentra.

La biodisponibilidad depende fundamentalmente de la vía de administración; así, el mayor grado lo presenta la vía intravascular (intravenosa o intrarterial), a continuación la vía intramuscular y sublingual, seguidas por la oral. Además, en la vía oral, es en la que mayores interacciones se encuentran (Hodgson y Smart, 2001; Ross et al., 2001). Los factores que influyen en la biodisponibilidad oral son: pH, vaciado gástrico, motilidad intestinal, presencia y naturaleza de la matriz alimenticia, metabolismo presistémico, microflora bacteriana, etc.

En nuestro caso, nos interesa el efecto del vino como matriz alimenticia, ya que los residuos de plaguicidas y los compuestos fenólicos en la dieta nunca penetran aisladamente. Además, se debe tener en cuenta la influencia de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias, sobre todo su estructura y su liposolubilidad, que determinarán en gran medida su capacidad para atravesar las barreras biológicas.

En general, se suelen utilizar dos modelos para el estudio de la biodisponibilidad oral, *in vivo* e *in vitro* (Figura 2). Los modelos *in vivo* con animales de experimentación son los más fácilmente correlacionables con los humanos, de hecho se puede aplicar el mismo factor de seguridad citado en los estudios toxicológicos de registro de una sustancia, pero plantean problemas de coste, tiempo y ética (Timchalk et al., 2002). En cambio, los *in vitro* son aceptables en el estadio inicial de una investigación por ser buenos indicadores de lo que ocurre en un medio fisiológico y por contra son mucho más económicos, sencillos y rápidos (Poet et al., 2003).

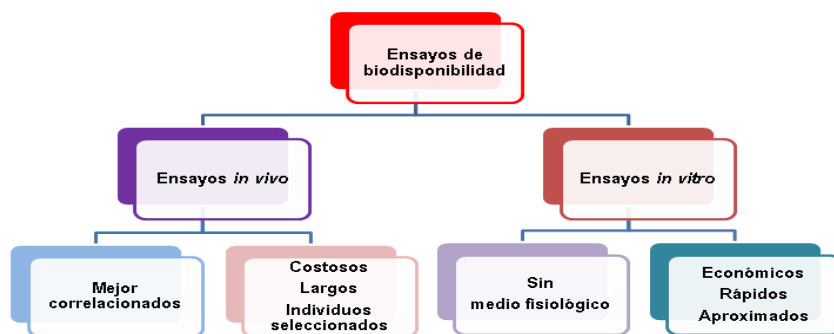


Figura 2.- Tipos de ensayos de biodisponibilidad.

Los ensayos *in vitro* de biodisponibilidad oral se realizan frecuentemente con montajes de bolsas y cánulas en laboratorio para imitar los compartimentos gastrointestinales y vasos del organismo, con cultivos celulares o con membranas de diálisis (Artursson y Borchardt, 1997). La alternativa habitual es el uso de una membrana semipermeable a modo de intestino delgado, porque es el epitelio donde se produce mayoritariamente la absorción oral, al ser el más preparado celularmente por la presencia de sus microvellosidades (Miller et al., 1981; Gil-Izquierdo et al., 2002; Bollinger et al., 2005). Esta membrana se coloca dentro de un dispositivo adecuado, de manera que se dispone en un lado la disolución a estudiar, en nuestro caso el vino, y se mide su aparición en el lado opuesto, o sea, en el interior de la membrana, una vez que ha logrado traspasar la superficie de la membrana por difusión pasiva. La permeabilidad de esta membrana es el factor fundamental para que estos experimentos sean correlacionables, ya que la característica esencial de las membranas biológicas es que son semipermeables (Camenisch et al., 1998). Para estudiar este proceso adecuadamente, hay disponibles membranas comerciales, celulósicas, de permeabilidad aproximada a las condiciones fisiológicas y en monocapa, como el epitelio intestinal. Además, la integridad y viabilidad de la membrana deben ser vigiladas durante todo el proceso.

¿QUÉ METODOLOGÍA UTILIZAMOS?

El protocolo de ensayo de la biodisponibilidad *in vitro* utilizado, consistió en una simulación de la digestión gástrica de la muestra con pepsina porcina y posterior simulación de digestión intestinal con pancreatina porcina; la absorción intestinal se simuló por diálisis con membrana de celulosa (Miller et al., 1981; Payá et al., 2013). En la Figura 3 se expone un esquema del procedimiento.

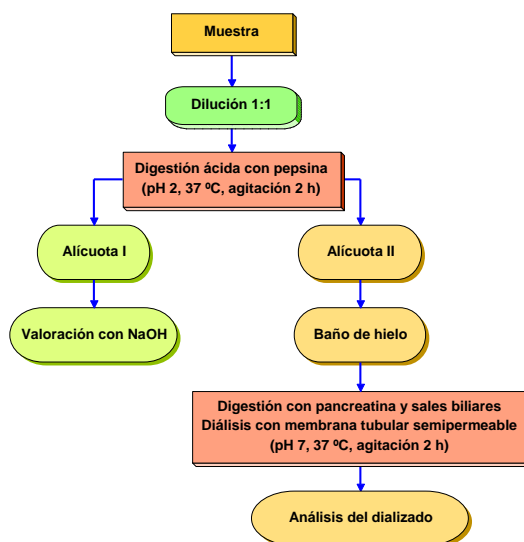


Figura 3. *Protocolo del ensayo de biodisponibilidad in vitro.*

La metodología de determinación de los residuos de plaguicidas en los vinos y los dializados, previamente validada, consistió en una extracción multiresidual con el método Quechers y posterior análisis por cromatografía de gases y líquido con detector de espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS/MS) (Payá et al., 2007; Oliva et al., 2007b).

La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por cromatografía líquida acoplada a un detector de fotodiodos (LC-DAD), por inyección directa del vino o dializado, excepto los estilbenos que se extrajeron previamente con acetato de etilo. Los antocianos se cuantifican como cianidina-3 rutinósido a 510 nm., los flavonoles como rutina a 360 nm, los estilbenos como resveratrol a 320 nm y los derivados hidroxicinámicos como ácido clorogénico a 320 nm (Mulero et al., 2015).

La capacidad captadora de radicales libres de las muestras se analizó con el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por espectrofotometría a 515 nm (Mulero et al., 2015).

¿QUÉ RESULTADOS HEMOS OBTENIDO?

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha realizado diversos estudios de biodisponibilidad *in vitro*, tanto de plaguicidas de distintas familias, cómo de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en vinos.

Como muestra de los resultados obtenidos podemos comentar, para los residuos de plaguicidas, que cuando se estudia la influencia de la matriz en el proceso para cuatro insecticidas (flufenoxuron, lufenuron, piriproxifen y fenoxicarb), tanto con estándares (en disolvente) como con uva y vino, se produce diálisis a partir de niveles de 50 $\mu\text{g/g}$ hasta 100 $\mu\text{g/g}$ en vino y de 70 $\mu\text{g/g}$ hasta 100 $\mu\text{g/g}$ en uva. En cambio, en los estándares se observó diálisis desde 5 $\mu\text{g/g}$ hasta 100 $\mu\text{g/g}$. Los porcentajes de diálisis encontrados en los ensayos no superaron el valor de 4% en vino y 2% en uva. En cambio en los estándares llegaron hasta 19% (figuras 4 y 5).

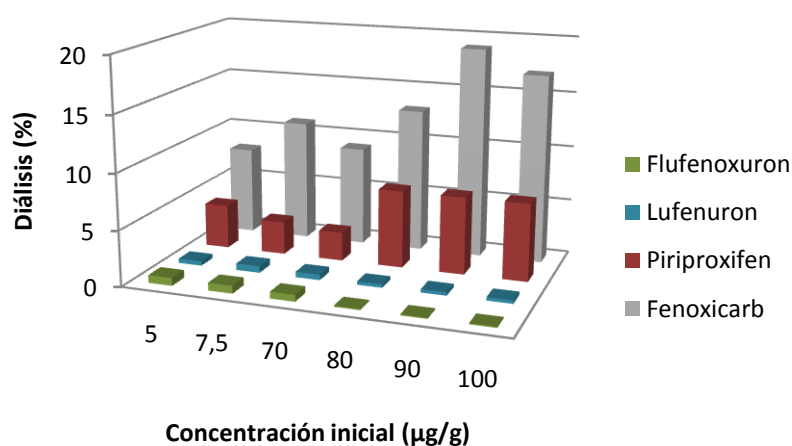


Figura 4.- Porcentajes de diálisis encontrados en estándares

El orden de dialización fue: fenoxicarb > piriproxifen > lufenuron > flufenoxuron. En función de los porcentajes dializados el efecto matriz se puede ordenar como: uva > vino > estándares. Los resultados indican que la biodisponibilidad de los compuestos se ve influida por su naturaleza fisico-química, concentración en la muestra, características de la matriz donde se estudia y selectividad de la membrana de diálisis (Payá et al., 2013).

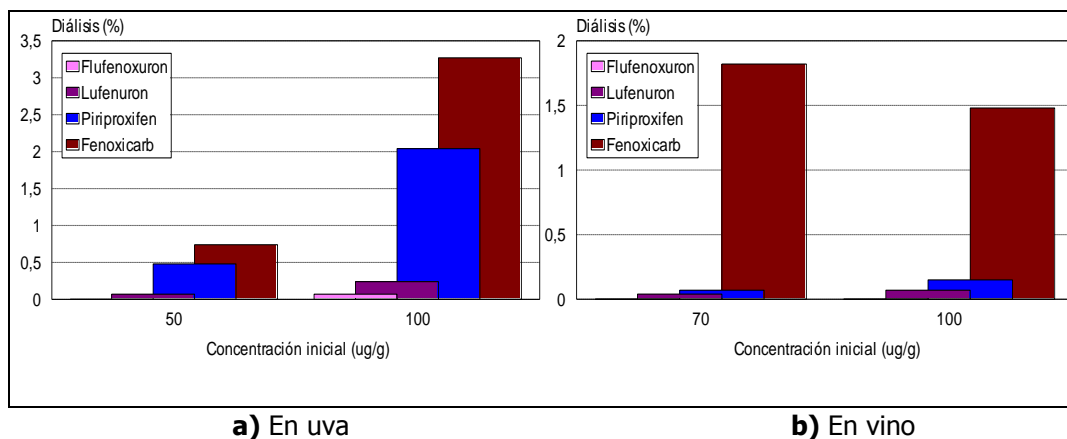


Figura 5.- Porcentajes de diálisis encontrados en uva y vino

No se detectó biodisponibilidad *in vitro* de los insecticidas cuando las muestras de uva y vino fueron fortificadas con niveles que abarcaban los residuos encontrados tras los tratamientos fitosanitarios y vinificación (0,05-1 µg/g). Por ello, se puede afirmar que *in vitro*, los niveles residuales de estos insecticidas determinados en uva y vino no superan la primera y principal barrera biológica del ingreso oral de xenobióticos, imposibilitando por tanto su llegada a un lugar de acción sistémico en el organismo humano.

En otro trabajo, incluido en un proyecto de investigación del Ministerio de Economía y Competitividad, se estudió las diferencias de biodisponibilidad de nueve fungicidas (ametroctadin, boscalid, ciazofamida, dimetomorph, fenhexamida, kresoxim-metil, mepanipirin, metrafenona y piraclostrobin) en estándares, uva y vino para concentraciones que oscilaron desde 0,1 hasta 10 ppm. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Porcentajes de dialización de fungicidas en uva, vino y estándares.

Matriz [ppm]	Uva			Vino			Estándares	
	2	5	10	2	5	10	5	10
Ametroctadin	6,00	9,51	9,15	9,56	16,90	10,21	3,95	6,69
Boscalid		7,26	5,59	9,37	11,51	6,41	4,49	10,96
Ciazofamida		2,09	3,15		5,69	3,62		
Dimetomorph	6,54	7,12	5,42	7,86	9,19	5,30	6,31	11,76
Fenhexamida	6,56	7,77	6,64	9,70	11,22	7,20	7,14	12,75
Kresoxim-metil						1,96		9,06
Mepanipirin		5,39	5,68	7,09	10,40	6,08	4,99	10,08
Metrafenona			4,07		8,82	5,03		6,76
Pyraclostrobin			3,42		7,63	4,31		5,05

En uva y vino la dialización se produce en algunos fungicidas a partir de 2 ppm, mientras que en las disoluciones estándar comienza a 5 ppm, e incluso para ciazofamida no se produce diálisis en éstas. Se observa que en ausencia de matriz (estándares) se produce una mayor diálisis a mayor concentración; no ocurre lo mismo en el caso de uva y vino, en los que algunos compuestos presentan menores porcentajes de dialización al aumentar la concentración. Este hecho puede ser debido al efecto que pueda ejercer la cantidad de azúcares (uva) o alcohol (vino) en el proceso de diálisis. En lo referente al efecto matriz en la máxima concentración, éste es mayor para uva, seguido del vino y por último los estándares, excepto para ametoctradin y ciazofamida donde no se observa esa influencia de la matriz. Cuando comparamos para cada matriz el porcentaje dializado de cada fungicida, éste tiene el siguiente orden: Estándar (Fenhexamida > Dimetomorph > Boscalid > Mepanipirin > Kresoxim-metil > Ametoctradin > Metrafenona > Piraclostrobin > Ciazofamida); Vino (Ametoctradin > Fenhexamida > Mepanipirin > Boscalid > Dimetomorph > Metrafenona > Piraclostrobin > Ciazofamida > Kresoxim-metil) y Uva (Ametoctradin > Fenhexamida > Boscalid > Mepanipirin > Dimetomorph > Metrafenona > Piraclostrobin > Ciazofamida > Kresoxim-metil).

En vinos procedentes de uvas Tempranillo y Graciano tratadas con algunos de estos fungicidas muestran que el vino elaborado con uva Graciano presenta un efecto matriz negativo, respecto al realizado con Tempranillo, aumentando el porcentaje dializado; circunstancia que puede ser debida a la distinta constitución de la matriz de ambas variedades de uva y por tanto de sus vinos (acidez total, azúcares residuales y grado alcohólico alcanzado) y por la concentración de los fungicidas en los vinos, ya que la diálisis está influenciada por la misma. Los porcentajes de diálisis oscilan entre un mínimo de 6.1% para kresoxim-metil en vino de Tempranillo, hasta un máximo de 36.6% para boscalid en el de Graciano. En los vinos de Tempranillo el plaguicida que más se dializa es mepanipirin, en cambio en Graciano es boscalid el que pasaría en mayor cantidad al torrente sanguíneo (Figura 6).

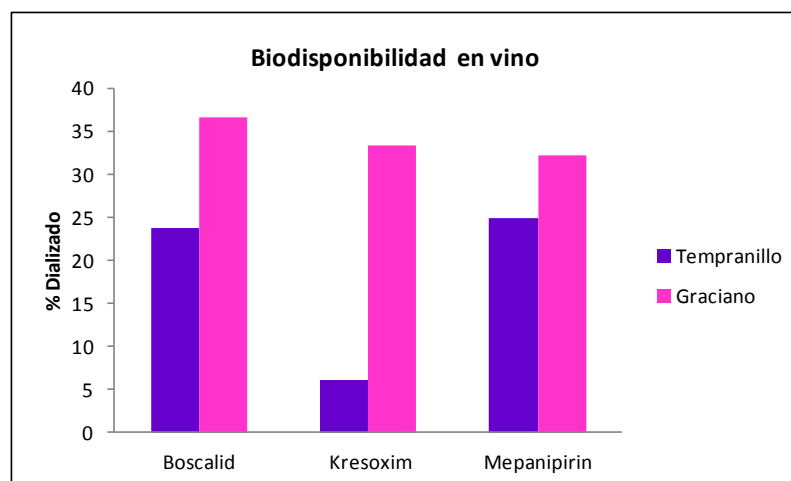


Figura 6.- Biodisponibilidad de los fungicidas en vino (% dializado).

También se constata que las diferencias físico-químicas entre fungicidas influyen en el porcentaje dializado, sobre todo para kresoxim-metil (Martínez et al., 2015).

En el caso de metrafenona y fenhexamida se observa que los porcentajes dializados, calculados en función de la concentración inicial en el vino, son: 10,32 % y 26,6 % para metrafenona en vinos Tempranillo y Graciano respectivamente. Para los vinos con presencia de fenhexamida los porcentajes dializados fueron de 24,04 y 31,3 % para Tempranillo y Graciano (Tabla 2). Por lo tanto, en ningún caso la dialización producida supera un tercio de la cantidad inicial. Las concentraciones iniciales en los vinos fueron: 0,20 ppm para Tempranillo y 0,11 ppm para Graciano en los ensayos con presencia de metrafenona y 2,54 ppm para Tempranillo y 2,26 ppm para Graciano en los ensayos con presencia de fenhexamida. Los valores residuales encontrados en vinos son inferiores a los LMRs impuestos por la legislación europea (Oliva et al., 2013).

Tabla 2.- Biodisponibilidad de metrafenona y fenhexamida en vinos.

Vino	Fungicida	LMR *	[] inicial	[] dializado	% dialización
Graciano	Metrafenona	0,5	0,11	0,03	26,6
	Fenhexamida	5	2,26	0,73	32,3
Tempranillo	Metrafenona	0,5	0,2	0,02	10,32
	Fenhexamida	5	2,54	0,61	24,04

[] y LMR (ppm) *en uva

Por lo anterior, podemos concluir que, en general, la biodisponibilidad de los fungicidas estudiados es mayor en los vinos de Graciano que en los de Tempranillo. En los primeros, el comportamiento de los cinco fungicidas es similar; sin embargo, en los

segundos, metrafenona y kresoxim-metil son los que menos se dializan. En ningún caso la dialización supone más de un tercio del contenido inicial en el vino. Se constata que las diferencias físico-químicas de los fungicidas influyen en su mayor o menor dialización.

En relación con la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en vinos, en el mismo proyecto se determinaron los porcentajes de dialización en los vinos anteriores. En las Figuras 7 y 8 se muestran los porcentajes dializados de las distintas familias de compuestos fenólicos, del índice de Folin y la actividad antioxidante de los vinos de Tempranillo y Graciano.

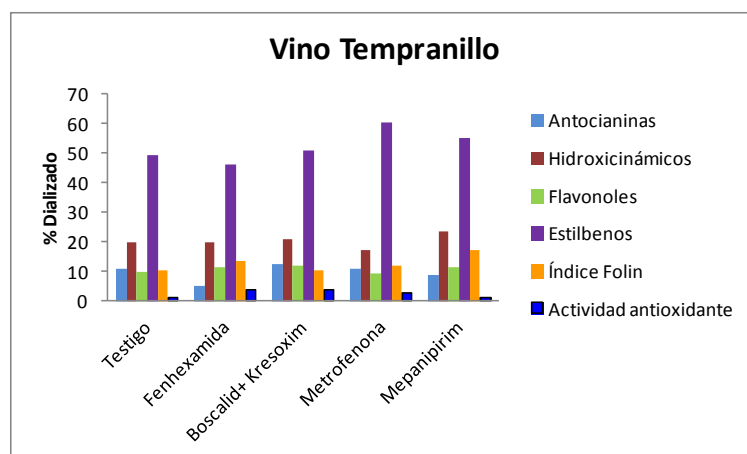


Figura 7.- Biodisponibilidad de compuestos fenólicos, índice de Folin y actividad antioxidante en vino Tempranillo (% dializado).

Para el vino variedad Tempranillo se observa que la presencia de residuos de fungicidas no afecta al porcentaje dializado con respecto al testigo, excepto para las antocianinas en presencia de fenhexamida y mepanipirín, donde se produce un descenso del mismo. Sin embargo, en vinos de Graciano si se produce un descenso de la biodisponibilidad en los vinos tratados frente al testigo, excepto para el índice de Folin. Para ambas variedades, los estilbenos son los compuestos fenólicos que presentan mayor porcentaje de dialización (cercano al 50%). Los menores porcentajes en los dializados corresponden a los niveles de actividad antioxidante, oscilando entre el 1,08 al 3,86 % (Cermeño et al., 2015).

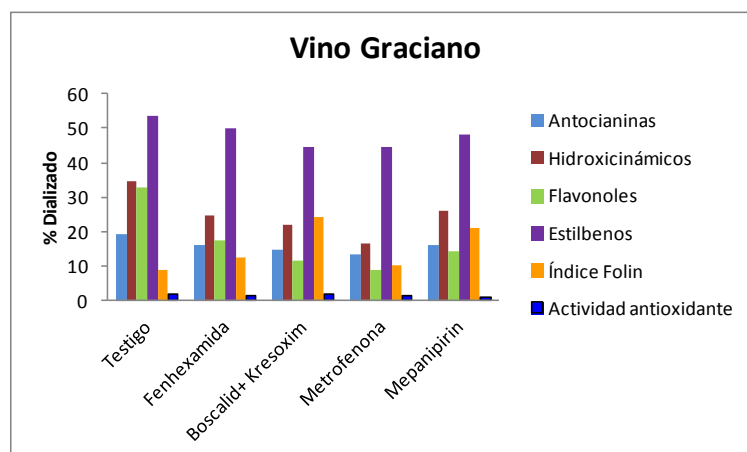


Figura 8.- Biodisponibilidad de compuestos fenólicos, índice de Folin y actividad antioxidante en vino Graciano (% dializado).

En lo referente a la influencia de la variedad de uva, se observa que para Graciano se produce un aumento considerable del porcentaje dializado con respecto a la Tempranillo, sobre todo en los vinos testigos y tratados con fenhexamida y mepanipirín.

En resumen, el porcentaje dializado depende de la variedad de vino, del grupo o familia de compuestos fenólicos y de la presencia de residuos de los fungicidas estudiados. Así, los mayores porcentajes de diálisis se producen para los estilbenos y los menores en la capacidad antioxidante. La elevada dialización de los estilbenos, compuestos altamente beneficiosos para la salud, es indicativa de que la mitad de cantidad ingerida pasa al torrente sanguíneo, llegando a los objetivos diana.

Esta línea de investigación proporciona datos y aspectos iniciales muy interesantes desde el punto de vista de seguridad alimentaria, en el caso de sustancias tóxicas como plaguicidas, y de aprovechamiento de las beneficiosas por nuestro organismo. Por ello, nuestro grupo de investigación sigue realizando estudios de otros plaguicidas en vinos y en otros alimentos vegetales, componentes de la dieta mediterránea.

AGRADECIMIENTOS.

Al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del Proyecto AGL2011-30378-C03-03.

BIBLIOGRAFÍA.

Artursson, P. y Borchardt, R. (1997). Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharmaceutical Research*, 14, 1655-1657.

Bollinger, D.W., Tsunoda, A., Ledoux, D., Ellersieck, M.R. y Veum, T.L. (2005). A comparison of the test tube and the dialysis tubing in vitro methods for estimating the bioavailability of phosphorus in feed ingredients for swine. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 3287-3294.

Camenisch, G., Folkers, G. y Waterbeemd, H. (1998). Shapes of membrane permeability-lipophilicity curves; extension of theoretical models with an aqueous pore pathway. *European Journal Pharmaceutical Sciences*, 6, 321-329.

Cermeño, S., Martínez, G., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M.A. y Barba, A. (2015). Biodisponibilidad in vitro de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en vinos tintos (var. Tempranillo y Graciano). *Libro de Resúmenes XIII Congreso Nacional de Investigación Enológica. Tarragona*.

Fernández, M.J., Oliva, J., Barba, A. y Cámara, M.A. (2005). Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 804-811.

García, M.A., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M.A., Pardo, F. y Díaz-Plaza E.M. (2004). Effect of fungicide residues on the aromatic composition of White wine inoculated with three *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52, 1241-1247.

Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P. y Tomás-Barberán, F.A. (2002). An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research Technology*, 214, 155-159.

Hodgson, E. y Smart, R. (2001). Introduction to biochemical toxicology. 3rd Edition, Ed. Appleton & Lange, Connecticut, USA, p. 588.

Iriti, M. y Varoni, E. M. (2014). Cardioprotective effects of moderate red wine consumption: Polyphenols vs. ethanol. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(4), 193-202.

Martínez, G., Cermeño, S., Morales, A., Maestro, A., Oliva, J. y Barba, A. (2015). Biodisponibilidad in vitro de boscalid, kresoxim-metil y mepamipirin en vinos tintos (var. Tempranillo y Graciano). *Libro de Resúmenes XIII Congreso Nacional de Investigación Enológica. Tarragona*.

Miller, D.D., Schrickler, R.B., Rasmussen, R.R. y Van Campend, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal Clinical Nutrition*, 34(10), 2248-2256.

Mulero, J., Martínez, G., Oliva, J., Cermeño, S., Cayuela, J.M., Zafrilla, P., Martínez-Cacha, A. y Barba, A. (2015). Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. *Food Chemistry*, 180, 25-31.

Obrenovich, M.E., Li, Y., Parvathaneni, K., Yendluri, B.B., Palacios, H.H., Leszek, J. y Aliev, G., (2011). Antioxidants in health, disease and aging. *CNS and Neurological Disorders-Drugs Targets*, 10, 192-207.

Oliva, J., Payá, P., Cámara, M.A. y Barba, A. (2007a). Removal of famoxadone, fluquinconazole and trifloxystrobin residues in red wines: Effects of clarification and filtration processes. *Journal Environmental Science Health Part. B*, 42, 775-781.

Oliva, J., Payá, P., Cámara, M.A. y Barba, A. (2007b). Removal of pesticides from white wine by the use of fining agents and filtration. *Communications Agricultural Applied Biological Sciences (Ghent University)*, 72/2, 171-180

Oliva, J., Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A.M., Salinas, R. y Barba, A. (2011). Fungicide effects on ammonium and amino acids of Monastrell grapes. *Food Chemistry*, 129, 1676-1680.

Oliva, J., Mulero, J., Maestro, A., Girón, F. y Barba, A. (2013). Biodisponibilidad de metrafenona y fenhexamida en vinos tintos (var. Tempranillo y Graciano). *Libro de Resúmenes del VII Congreso de CYTA. Córdoba*, P-60.

Oliva, J., Martínez-Gil, A.M., Lorenzo, C., Cámara, M.A., Sálina, M.R., Barba, A. y Garde-Cerdán, T. (2015). Influence of the use of fungicides on the volatile composition of Monastrell red wines obtained from inoculated fermentation. *Food Chemistry*, 170, 401-406.

Payá, P., Anastassiades, M., Mack, G., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J. y Barba, A. (2007). Analysis of pesticide residues using the quick easy cheap effective rugged and safe (QUECHERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 389 (6), 1697-1714

Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M. C. y Barba, A. (2013). Influence of the matrix in bioavailability of flufenoxuron, lufenuron, pyriproxyfen and fenoxycarb residues in grapes and wine. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 419-423.

Poet, T.S., Wu, H., Kousba, A.A. y Timchalk, C. (2003). In vitro rat hepatic and intestinal metabolism of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and diazinon. *Toxicological Sciences*, 72, 193-200.

Ramírez, J.A. y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 4(2), 67-75.

Ross, J.H., Driver, J.H., Cochran, R.C., Thongsinthusak, T. y Krieger, R.I. (2001). Could pesticide toxicology studies be more relevant to occupational risk assessment? *Annals Occupational Hygiene*, 45, S5-S17.

Timchalk, C., Nolan, R.J., Mendrala, A.L., Dittenber, D.A., Brzak, K.A. y Mattsson, J.L. (2002). A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans. *Toxicological Sciences*, 66, 34-53.

US EPA. (2006). Terminology reference system. Ed. US EPA, Washington, DC, USA, <http://www.epa.gov/trs/>.

Walter, A., Etienne-Selloum, N., Brasse, D., Khallouf, H., Beretz, A. y Schini-Kerth, V.B. (2008). Intake of red wine polyphenols prevents tumor growth and neovascularization in a syngenic model of colon cancer. *Anticancer Research*, 28, 3534-3534.

Xiang, L.M., Xiao, L.Y., Wang, Y.H., Li, H.F., Huang, Z.B. y He, X.J. (2014). Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. *Food Chemistry*, 156, 258-263.