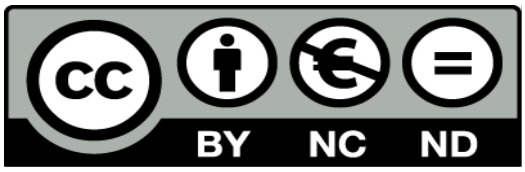
UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Nuevas aportaciones al conocimiento y utilización de productos fitosanitarios para el control de enfermedades de la vid. Evaluación de posibles efectos sobre la fermentación y elaboración de vinos de calidad
Autor/es
Luis Vaquero Fernández
Director/es
María Teresa Martínez Soria, Jesús Sanz Asensio y Purificación Fernández Zurbano
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico
2009-2010



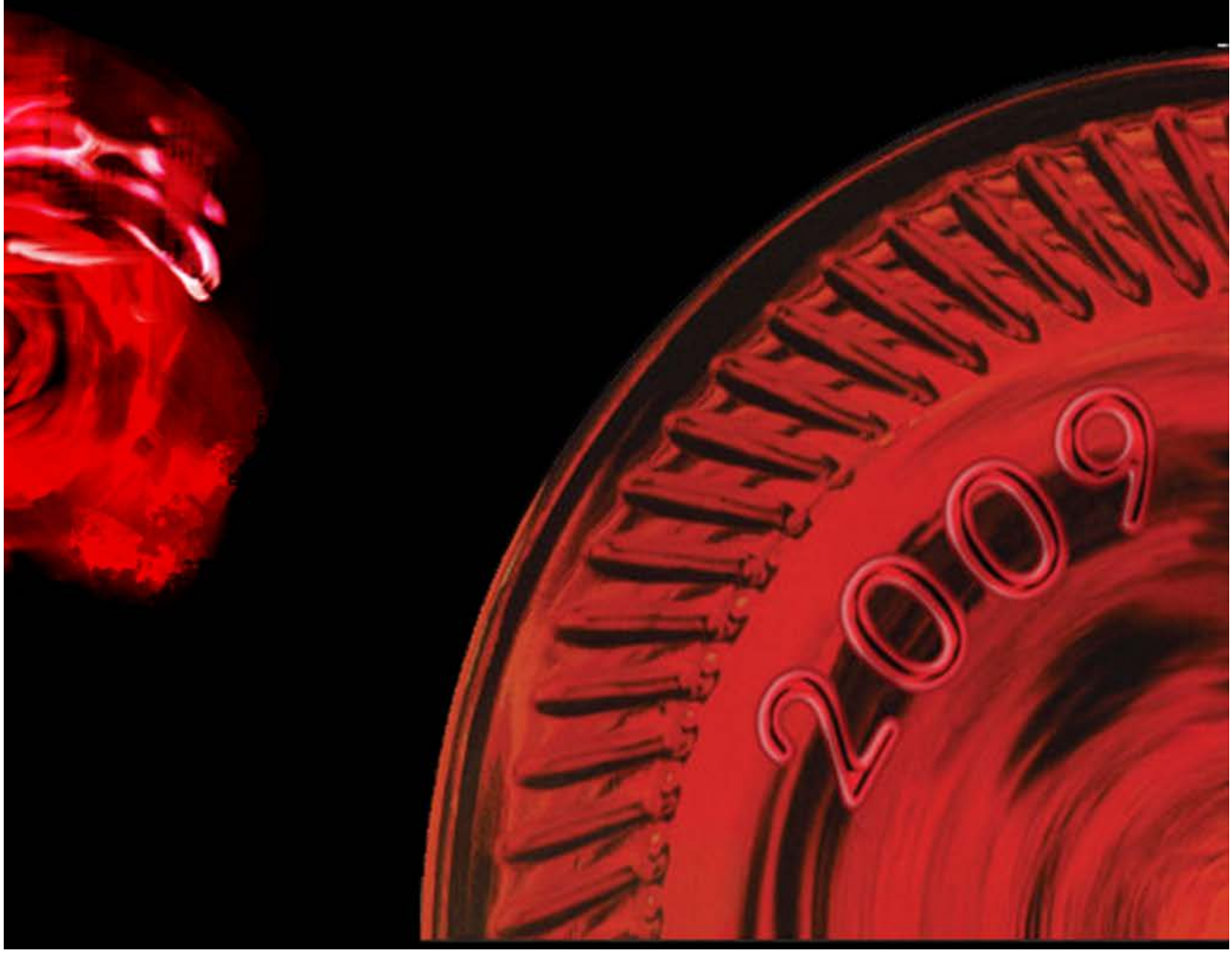
Nuevas aportaciones al conocimiento y utilización de productos fitosanitarios para el control de enfermedades de la vid. Evaluación de posibles efectos sobre la fermentación y elaboración de vinos de calidad, tesis doctoral
de Luis Vaquero Fernández, dirigida por María Teresa Martínez Soria, Jesús Sanz Asensio y Purificación Fernández Zurbano (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia
Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2013
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Nuevas aportaciones al conocimiento y utilización de productos fitosanitarios para el control de enfermedades de la vid. Evaluación de posibles efectos sobre la fermentación y elaboración de vinos de calidad

Tesis Doctoral **Luis Vaquero Fernández**



Diseño de portada: Daniel López Martínez

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE LA RIOJA
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA

Nuevas aportaciones al conocimiento y utilización de productos fitosanitarios para el control de enfermedades de la vid. Evaluación de posibles efectos sobre la fermentación y elaboración de vinos de calidad

LUIS VAQUERO FERNÁNDEZ

D. Jesús Sanz Asensio, **Dª. María Teresa Martínez Soria** y **Dª. Purificación Fernández Zurbano**, Profesores Titulares de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja.

Hacen constar:

Que la memoria "**Nuevas aportaciones al conocimiento y utilización de productos fitosanitarios para el control de enfermedades de la vid. Evaluación de posibles efectos sobre la fermentación y elaboración de vinos de calidad**" ha sido realizada por el licenciado **LUIS VAQUERO FERNÁNDEZ** en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja y reúne las condiciones legales para obtener el Título de Doctor.

Logroño, 2010.

Fdo: J. Sanz Asensio Mª T. Martínez Soria

P. Fernández Zurbano

Quiero manifestar mi agradecimiento a la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de La Rioja por la beca de Formación de Personal Investigador recibida.

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Investigaciones Agrarias a través del proyecto VIN00-054-C2-01, por el proyecto AGL2005-02313/ALI dentro del Plan Nacional de Investigación Científica Desarrollo e Innovación Tecnológica por el Ministerio de Educación y Ciencia y fondos FEDER, por la Comunidad Autónoma de La Rioja a través del proyecto ANGI 2004/18 dentro del Plan Riojano de I+D+I.

También quisiera agradecer a la Universidad de La Rioja, Bodegas Mateos S.L, Bodegas Dinastía Vivanco, Asociación de Enólogos de La Rioja y BASF Española, S.A. (Luis Carlos Mateo García) por su apoyo y colaboración en este trabajo.

Me gustaría desde estas líneas expresar mi agradecimiento por la colaboración y ayuda prestada en la realización de esta Tesis Doctoral a las siguientes personas:

A mis directores de Tesis Jesús, Puri y Mayte por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo y confiar en mí en todo momento, por el conocimiento que me han transmitido durante este tiempo además de su ayuda, apoyo y ánimo.

A mis compañeros de laboratorio por compartir conmigo su tiempo y buenos momentos, y por brindarme su apoyo durante todos estos años, desde los primeros Ana A., Rubén S., Pili B., Óscar E., José Alfredo, Álvaro G., Alejandro P., Fernando R., Ana S., hasta los más recientes Ana G., Ruth B., Azucena, Pilar C., Vanesa, Pilar M., David C., Celia, Tao, y muy especialmente a Gorka E., Lydia, Miguel S., Patricia R., Gustavo, Laura L., José David, M. Pilar S., José Miguel, Daniel R., Iván S., Judith y Rodrigo, por su apoyo incondicional, ánimos y amistad, y por los buenos momentos compartidos de cafés, comidas, etc.

Al personal docente e investigador del Departamento de Química.

A los miembros del PAS (Servicio de Laboratorios, Auxiliares de Servicios Generales, Administrativos…) del Edificio CCT, por su ayuda y por ser magníficos compañeros de trabajo.

A mis amigos de toda la vida, compañeros de la carrera de Química (*KMK*) y de Enología (*la Sexta*), y *venerados* por estar siempre a mi lado y su constante apoyo y amistad.

A mi familia por sus ánimos, comprensión, afecto y cariño.

ÍNDICE

Capítulo I: Introducción **1**

1. Plaguicidas: Generalidades 3
   1.1. Conceptos generales 3
   1.2. Clasificación 5
   1.3. Composición, denominaciones y formas de presentación 13
   1.4. Aspectos toxicológicos 16
   1.5. Utilización de plaguicidas 18
   1.6. Reglamento sobre el uso sostenible de productos fitosanitarios 22
2. Enfermedades de la vid causadas por hongos 23
   2.1. Podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) 24
   2.2. Mildiu (*Plasmopara viticola*) 26
   2.3. Oídio (*Uncinula necator*) 27
3. Fungicidas 30
4. Residuos de plaguicidas en uvas y vinos 31
   4.1. Normativa legal. Límite Máximo de Residuos 32
   4.2. Factores que determinan el contenido en residuos 35
   4.3. Problemática de los residuos en uvas y vinos 37
      4.3.1 Alteraciones en la calidad organoléptica de los vinos 37
      4.3.2 Interferencias en el proceso de fermentación 37
      4.3.3 Toxicidad para el consumidor 41
      4.4.4 Recomendaciones 42
5. Producción Integrada 43
6. Análisis de productos fitosanitarios en muestras agroalimentarias 49
   6.1. Extracción 50
      6.1.1 Extracción en fase líquida 50
      6.1.2 Extracción en fase sólida 56
      6.1.3 Extracción con fluidos supercríticos 67
   6.2. Purificación 69
   6.3. Determinación 71
      6.3.1 Cromatografía de gases 72
      6.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución 79

7. Fitorreguladores y efectos 82
8. Compuestos estudiados 85
8.1. Diclofluanida 85
8.2. Metalaxil 86
8.3. Penconazol 86
8.4. Pirimetanil 87
8.5. Prohexadiona de calcio 88

Capítulo II: Objetivos 91

Capítulo III: Materiales y métodos 95

1. Aparatos e instrumentos 97
1.1. Cromatógrafo de gases con detector nitrógeno-fósforo (GC-NPD) 97
1.2. Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (CG-MS) 98
1.3. Concentradores 98
1.4. Agitadores 99
1.5. Centrífugas 99
1.6. Balanza analítica 99
1.7. Estufas 100
1.8. Aparatos para extracción 100
2. Reactivos y disoluciones 101
3. Muestras sintéticas y reales 102

Capítulo IV: Estudios preliminares 105

1. Condiciones cromatográficas 107
2. Selección de patrón interno 108
3. Método de confirmación 109

Capítulo V: Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de fungicidas en muestras enológicas 111

1. Extracción líquido-líquido para mostos y vinos 113
   1.1. Selección de las variables de extracción 113
      1.1.1 Tipo de disolvente orgánico 114
      1.1.2 Volumen de disolvente 115
      1.1.3 Cantidad de sal 116
      1.1.4 Tiempo de extracción 116
   1.2. Características analíticas del método 117
   1.3. Selectividad 119
   1.4. Recuperación, precisión y exactitud 119
   1.5. Evaluación del efecto matriz 120
   1.6. Validación del método en muestras reales 124
      1.6.1 Características analíticas del método 124
      1.6.2 Selectividad 126
      1.6.3 Recuperación, precisión y exactitud 126
      1.6.4 Evaluación del efecto matriz en muestras reales 127
2. Extracción en fase sólida para mostos y vinos 130
   2.1. Selección de las variables de extracción 130
      2.1.1 Eluyente y volumen de eluyente 130
      2.1.2 Etapa de lavado 133
      2.1.3 Volumen de ruptura 137
   2.2. Validación del método 138
      2.2.1 Selectividad 138
      2.2.2 Calibración, linealidad, límites de detección y cuantificación 140
      2.2.3 Recuperación, exactitud y precisión 142
   2.3. Evaluación del efecto matriz 143
3. Comparación de métodos de extracción en matrices reales 144
4. Extracción sólido-líquido para uvas 148
   4.1. Procedimiento de extracción 148

4.1.1 Lavado de la superficie (método 1) 149
4.1.2 Extracción de fungicidas retenidos en el hollejo (método 2) 149
4.1.3 Extracción de fungicidas en la baya (método 3) 150
4.2. Validación de los métodos 150
4.2.1 Selectividad 150
4.2.2 Calibración, linealidad, límites de detección y cuantificación 151
4.2.3 Recuperación, exactitud y precisión 154
4.2.4 Evaluación del efecto matriz 155
4.3. Estudio de retención de los fungicidas en uvas tintas 156
4.4. Estudio de distribución de los fungicidas en uvas tintas 160

Capítulo VI: Estudios de fermentaciones 165

1. Fermentaciones en laboratorio de mosto sintético en presencia de pirimetanil 167
1.1. Introducción 167
1.2. Preparación y toma de muestras 167
1.3. Efecto de la fermentación alcohólica sobre el contenido de pirimetanil 169
1.3.1 Contenido de 5.0 mg L^{-1} en pirimetanil (LMR) 169
1.3.2 Contenido de 2.5 mg L^{-1} en pirimetanil (LMR / 2) 170
1.3.3 Estudio cinético de la disipación de residuos 172
1.3.4 Análisis de residuos en levaduras 174
1.4. Efecto del contenido de pirimetanil sobre la fermentación alcohólica 175
2. Fermentaciones en laboratorio de mosto real en presencia de pirimetanil 177
2.1. Introducción 177
2.2. Preparación y toma de muestras 178
2.3. Efecto de la fermentación alcohólica sobre el contenido de

Pirimetanil 179
2.3.1 Contenido de 5.0 mg L^{-1} en pirimetanil (LMR) 179
2.3.2 Estudio cinético de la disipación de residuos 180
2.3.3 Análisis de residuos en levaduras 181
2.4. Efecto del contenido de pirimetanil sobre la fermentación alcohólica 182
3. Fermentaciones en bodega 184
3.1. Introducción 184
3.2. Proceso de vinificación y toma de muestras. Determinación de parámetros enológicos convencionales 185
3.3. Análisis sensorial 188
3.4. Vinificación de uvas variedad Tempranillo año 2004 190
3.4.1 Tratamiento y elaboración 190
3.4.2 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación 191
3.4.3 Análisis de residuos de pirimetanil 194
3.4.4 Análisis sensorial 196
3.5. Vinificación de uvas variedad Tempranillo año 2005 196
3.5.1 Tratamiento y elaboración 196
3.5.2 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación 197
3.5.3 Análisis de residuos de pirimetanil 201
3.5.4 Análisis sensorial 203
3.6. Vinificación de uvas variedad Tempranillo año 2006 204
3.6.1 Tratamiento y elaboración 204
3.6.2 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación 206
3.6.3 Análisis de residuos de pirimetanil 209
3.6.4 Análisis sensorial 211
4. Fermentaciones de uvas procedentes de cepas tratadas con prohexadiona de calcio 212
4.1 Introducción 212
4.2 Vinificación de uvas variedad Tempranillo (año 2004) 213
4.2.1 Tratamiento y elaboración 213
4.2.2 Efectos en campo 214

4.2.3 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación 215
4.2.4 Coordenadas de color 217
4.2.5 Análisis sensorial 217
4.3 Vinificación de uvas variedad Tempranillo (año 2005) 219
4.3.1 Tratamiento y elaboración 219
4.3.2 Efectos en campo 220
4.3.3 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación 221
4.3.4 Coordenadas de color 222
4.3.5 Análisis sensorial 223
4.4 Discusión 224

Conclusiones 229

Bibliografía 235

Anexos 265

CAPÍTULO I:
INTRODUCCIÓN

1. PLAGUICIDAS: GENERALIDADES

1.1. Conceptos generales

El incremento constante de la población mundial requiere de una producción muy elevada de alimentos, por lo que la protección de cultivos contra el ataque de parásitos y de otros agentes biológicos es más que necesaria. El empleo de plaguicidas en la agricultura es imprescindible para mejorar su potencial económico, permitiendo la protección de los cultivos en áreas en las que no sería posible, aumentando el periodo de desarrollo de las plantas, incrementando el periodo de almacenamiento post-cosecha, reduciendo los costes de producción de los alimentos y disminuyendo el riesgo de aparición de plagas (FAO 2003).

El Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas, aprobado por el Consejo de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) en noviembre de 1985 y su versión revisada en noviembre de 2002, define el término de **plaguicida** como "cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otro modo en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, maderas y productos de la madera o alimentos para animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en sus cuerpos. Este término incluye sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o los utilizados para evitar su caída prematura y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y/ o transporte".

El Real Decreto 3349/83 de 30 de noviembre de 1983 sobre "Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas" define plaguicida o pesticida como aquellas sustancias o

ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados que contengan uno o varios de ellos, destinados a cualquiera de los fines siguientes (BOE 1983):

- Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales o prevenir su acción.
- Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos.
- Conservar los productos vegetales, incluida la protección de maderas.
- Destruir los vegetales indeseables.
- Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.
- Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a vegetales.

Siendo un ingrediente activo todo producto orgánico o inorgánico; natural, sintético o biológico; con una determinada actividad plaguicida y con un grado de pureza establecido.

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 también incluye cualquier derivado suyo, como productos de conversión, metabolitos, productos de reacción e impurezas consideradas de importancia toxicológica (FAO 2003).

Límite máximo para residuos (LMR) de plaguicida es la concentración máxima de residuos de un plaguicida en la superficie o la parte interna de productos alimenticios, expresada en mg kg^{-1}, recomendada por la Comisión del Codex Alimentarius, para que se permita legalmente el uso de estos productos alimenticios en el consumo humano y en los piensos para consumo animal. Los LMR tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos sean toxicológicamente aceptables (FAO 2003).

1.2. Clasificación

La clasificación de los plaguicidas puede realizarse empleando distintos criterios, como por ejemplo: destino de su aplicación, acción específica, constitución química, modo de acción, grado de toxicidad, tipo de presentación, etc. Las clasificaciones más comúnmente empleadas se basan en su toxicidad, en su acción específica y en su constitución química.

Según el destino de su aplicación pueden considerarse:

- Productos fitosanitarios: los destinados a su utilización en el ámbito dela sanidad vegetal o el control de los vegetales.
- Plaguicidas de uso ganadero: los destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
- Plaguicidas de uso en la industria alimentaria: los destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.
- Plaguicidas de uso ambiental: los destinados al saneamiento de locales u otros establecimientos públicos o privados.
- Plaguicidas de uso en higiene personal: aquellos preparados útiles para la aplicación directa sobre el cuerpo humano.
- Plaguicidas de uso doméstico: cualquier preparado destinado para aplicación por personas no especialmente cualificadas, en viviendas o locales habitados.

Atendiendo a su acción específica sobre una plaga los plaguicidas pueden clasificarse en:

- Insecticidas (sobre isnsectos)
- Acaricidas (sobre ácaros)
- Fungicidas o anticriptogámicos (sobre hongos)
- Nematocidas (sobre nematodos)
- Bactericidas (sobre bacterias)
- Rodenticidas (sobre roedores)
- Avicidas (aves, pájaros)
- Herbicidas (malas hierbas)
- Molusquicidas o helicidas (caracoles)
- Fitorreguladores

- Específicos post-cosecha y simientes
- Protectores de maderas, fibras y derivados

Desde el punto de vista de su constitución química, los plaguicidas pueden clasificarse en diversos grupos: inorgánicos, clorofenoles, carbamatos, derivados de urea, dinitrocompuestos, organoclorados, organofosforados, organometálicos, piretroides y triazinas (Plaza 2007). Siendo los más importantes los siguientes:

- Inorgánicos: los primeros plaguicidas que se utilizaron fueron los compuestos inorgánicos, cuya elevada toxicidad para el hombre hacía prever que fuesen nocivos para otras especies. Son principalmente arsenitos y arseniatos, compuestos de cobre y magnesio, azufre, polisulfuros, fluoruros y cianuros. Debido a su bajo coste algunos de ellos se siguen utilizando en nuestros días, sin embargo presentan una elevada toxicidad y capacidad de acumulación.

- Clorofenoles: utilizados como herbicidas, fungicidas y bactericidas. Debido a su elevada fitotoxicidad se emplean poco en agricultura (p.ej. pentaclorofenol en Figura I-1).Este compuesto en la actualidad está en desuso dada la problemática ocasionada en la industria vinícola respecto a los efectos negativos que ocasionan los cloroanisoles, derivados desmetilados de pentaclorofenol.

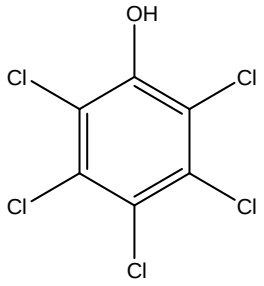


Figura I-1*: Estructura química de penclarofenol*

- Dinitrofenoles: derivados del dinitrifenol. Actúan inhibiendo la fosforilación oxidativa en la etapa final de la glucólisis, de forma que impiden el uso de la energía producida en las etapas previas. Su selectividad es baja, siendo tóxicos para la mayoría de las especies (p.ej. dinocap en Figura I-2).

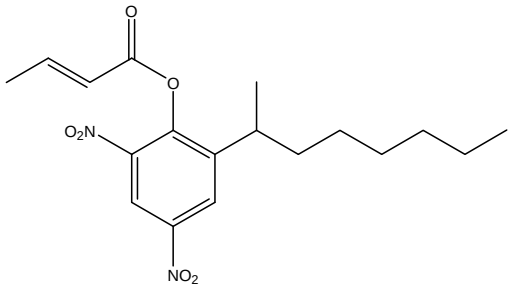


***Figura I-2**: Estructura química de dinocap*

- Organofosforados: como su propio nombre indica son derivados del ácido fosfórico y tiofosfórico. Penetran en el organismo mediante absorción cutánea, inhalación o ingestión. Su mecanismo de acción es una carbamilación reversible de la enzima *acetilcolinesterasa*, que implica una acumulación de acetilcolina en el sistema nervioso central, provocando distintos grados de toxicidad en los humanos (EPA 1999a; Esteve 2007). Este tipo de plaguicidas es el más usado en la actualidad, empleándose tanto con fines agrícolas como en el hogar, jardinería y veterinaria. Como ejemplos encontramos el metilparation (prohibido en UE) y el clorpirifos en la Figura I-3.

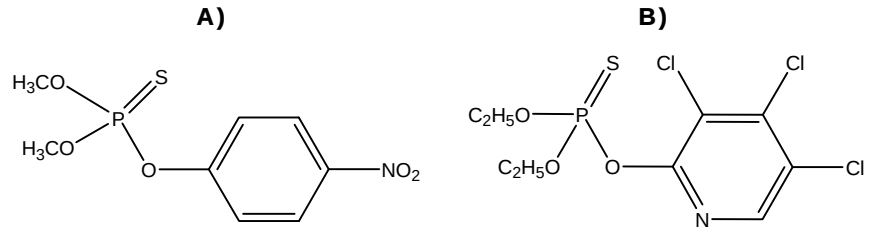


***Figura I-3**: Estructura química de A) metilparation y B) clorpirifos*

- Carbamatos: son derivados del ácido carbámico, desarrollados más recientemente que los organofosforados, provocan al igual que éstos una carbamilación reversible de la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, mientras que en el caso de los plaguicidas organofosforados, la inhibición era irreversible, con carbamatos esto no es así, lo que conlleva una importante disminución de su toxicidad (Moore y col. 1998). Son productos sintéticos de estructura análoga al alcaloide Fisostigmina, procedente de la *Physostigma venenosum*. Estos

compuestos tienen un amplio espectro de acción insecticida y pueden ser absorbidos por el hombre por inhalación e ingestión, siendo la absorción cutánea la ruta menos tóxica. Algunos plaguicidas de tipo carbamato están considerados por la Environmental Protection Agency (EPA) como cancerígenos (EPA 1999b). Estos plaguicidas son muy utilizados en el hogar, jardinería y principalmente en agricultura. En la Figura I-4 se muestra la estructura del N-metilcarbamato etiofencarb (prohibida en UE).

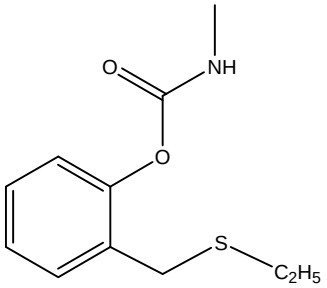


***Figura I-4**: Estructura química de etiofencarb*

• Tiocarbamatos: son derivados del ácido tiocarbámico, inestable en su forma libre, por lo que se formulan sales del mismo. Al ser portadores de iones metálicos, bloquean al ácido lipoico, relacionado con el metabolismo energético como aceptor de hidrógeno en la oxidación del piruvato. Son por lo general poco tóxicos (p.ej. Tiram en Figura I-5).

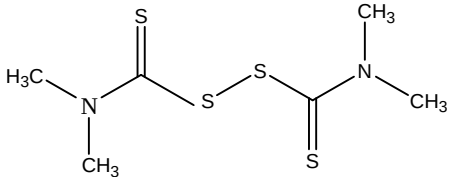


***Figura I-5**: Estructura química de tiram*

• Organoclorados: estos plaguicidas se caracterizan por tener átomos de cloro en su estructura. Fueron ampliamente utilizados en el siglo XX, pero debido a la elevada acumulación en tejidos grasos, persistencia en el medio ambiente y toxicidad, la mayoría de ellos fueron retirados del mercado y se prohibió su uso en países desarrollados. Según el Reglamento 850/2004 del Parlamento Europeo

y del Consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes, queda prohibida la producción, comercialización y uso de las siguientes sustancias: Aldrin, Chlordane, Dieldrin, Endrin, Heptachlor, Hexachlorobencene, Mirex, Toxafen y DDT, solas, en preparados o como constituyentes de artículos (DOUE 2004). A pesar de ello, debido a su efectividad y bajo coste, estos compuestos siguen empleándose abundantemente en países en vías de desarrollo. En la Figura I-6 se muestra la estructura de lindano y de endosulfán (prohibidos en UE).

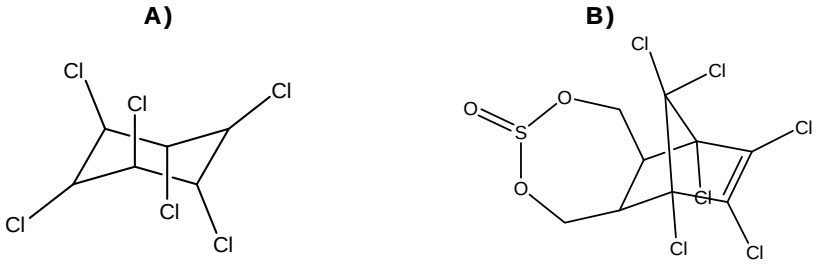


***Figura I-6**: Estructura química de A) lindano y B) endosulfán*

• Imidazoles: derivados del imidazol y la glioxalina. Su efecto fungicida radica en la inhibición de la biosíntesis de esteroles, indispensables para la estabilización de la membrana celular. Presentan baja toxicidad tanto para las plantas como para mamíferos (p.ej. procloraz en Figura I-7).

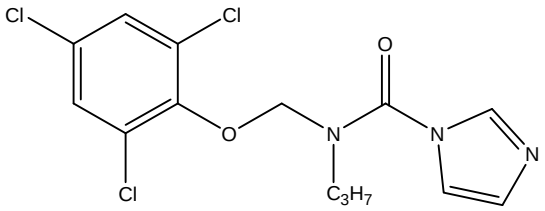


***Figura I-7**: Estructura química de procloraz*

• Benzimidazoles: derivados del benzimidazol. Al tener una estructura tal que interfiere con las bases púricas, actúan como inhibidores en la síntesis de ácidos nucleicos. Otro mecanismo complementario en su acción fungicida parece ser el

bloqueo del consumo de oxígeno por el hongo. Son poco tóxicos por lo que se utilizan como pesticidas de post cosecha (p.ej. benomilo en Figura I-8).

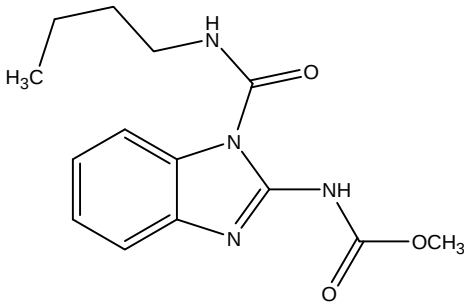


Figura I-8*: Estructura química de benomilo*

• Heterocíclicos con oxígeno y azufre: se trata de un grupo heterogéneo, de acción fungicida y acaricida, cuyo efecto se debe a la inhibición de la síntesis del ácido ribonucleico, lo que afecta directamente a la síntesis de proteínas. Son poco tóxicos (p.ej. drezoloxón, terrazol, vitavax, morestán en Figura I-9).

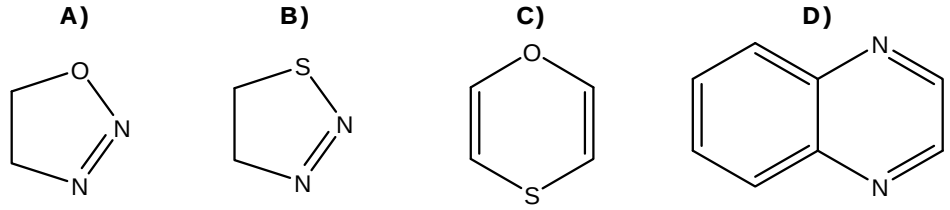


Figura I-9*: Estructura química de A) drezoloxón; B)terrazol; C)vitavax y D) morestán*

• Triazinas y triazoles: se emplean principalmente como herbicidas y fungicidas. Derivados de la 1,3,5 - triazina y del 1,2,4 – triazol. Actúan como inhibidores de la síntesis de esteroles, principalmente del ergosterol (p.ej. penconazol). Las triazinas se encuentran entre los plaguicidas más utilizados en el mundo. Estos herbicidas y sus metabolitos pueden contaminar el medioambiente, dependiendo de sus propiedades físico-químicas y el entorno en el que se encuentren. La atrazina, el componente principal de esta familia, se ha encontrado en el medioambiente hasta tal punto que su uso ha sido prohibido en algunos países

como Italia y Alemania (Barra y col. 2000), siendo sustituido por la terbutilazina. En la Figura I-10 se muestra la estructura del triadimefon (prohibido en UE).

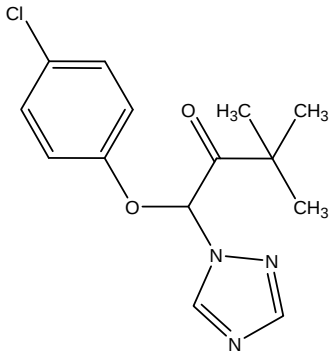


Figura I-10: *Estructura química de triadimefon*

• Derivados de acilalaninas: utilizados como fungicidas específicos para hongos del tipo oomicetos. Actúan inhibiendo al hongo por la interferencia con la síntesis del ARN ribosomal a nivel celular, previniendo de la liberación, movimiento y germinación de zoosporas e inhiben el crecimiento micelial del hongo (p.ej. metalaxil).

• Sulfamidas: Presentan un amplio espectro de eficacia (incluyendo oomicetos). Poseen un modo de acción multi-localizado, actuando sobre los procesos de respiración, y actividad preventiva y curativa (p.ej. diclofluanida).

• Piretroides: son compuestos derivados del ácido crisantémico, cuyo éster cetoalcohólico le proporciona propiedades insecticidas (Ware 1994). Son muy efectivos para un gran número de plagas y muestran una toxicidad muy selectiva para insectos, siendo poco tóxicos para los mamíferos y las aves (Ray 1997, Gray y Soderlund 1985). Mantienen abiertos los canales de sodio de las membranas neuronales, despolarizándolas e impidiendo su correcto funcionamiento. En la Figura I-11 se muestra la estructura general de los piretroides.

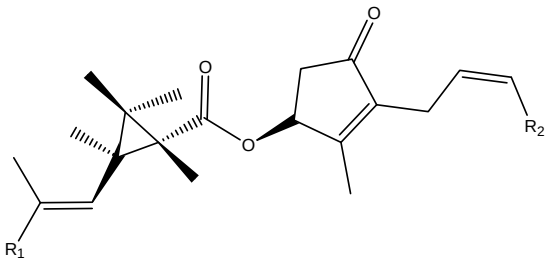


Figura I-11: *Estructura química general de piretroides*

Según su modo de acción se consideran sistémicos aquellos que penetran en los tejidos de la planta y se desplazan por ellos actuando en sitios lejanos de donde fueron aplicados y en los órganos que, por el crecimiento, aparecen después de la aplicación. De acuerdo con esta definición, se denominan plaguicidas penetrantes o de sistemia traslaminar, a aquellos que aun penetrando en los tejidos de la planta, no se desplazan por ellos y ejercen su actividad únicamente en el sitio donde fueron aplicados.

En el caso los fungicidas, se consideran curativos a los que eliminan al hongo patógeno después de que se haya establecido en los tejidos del huésped, siendo de contacto o preventivos los que previenen la infección inhibiendo al patógeno antes de que éste haya penetrado en la planta huésped y se haya establecido en sus tejidos.

Resumiendo los conceptos expuestos, se diferencian dentro de los fungicidas dos grandes grupos: el de los sistémicos y penetrantes con propiedades curativas y preventivas y el de los de contacto que, por no penetrar en los tejidos de la planta, sólo tienen propiedades protectoras y preventivas. A las ventajas de los fungicidas curativos (sistémicos o penetrantes), se debe añadir la de que por penetrar en los tejidos de la planta no son lavados fácilmente por las lluvias (transcurrido un cierto tiempo después de su aplicación), pero no se debe tampoco olvidar que su empleo, independientemente del aspecto económico, queda condicionado por su especificidad de acción (normalmente combaten una o dos enfermedades), y sobre todo, por el peligro potencial de la rápida aparición de resistencias (Coscollá 2004).

1.3. Composición, denominaciones y formas de presentación

Los plaguicidas están compuestos por la materia o principio activo, los ingredientes inertes, los coadyuvantes o mejorantes y los aditivos. El producto activo plaguicida es obtenido por la industria química en un grado de pureza variable. Este producto "puro" no es apto para su empleo agrícola y debe acondicionarse antes en una formulación, que contiene la materia activa (producto "puro") junto con otros componentes, como disolventes, diluyentes (sólidos o líquidos) y coadyuvantes que mejoran la acción del principio activo (emulsionantes, estabilizantes).

La materia activa es el único componente que tiene eficacia para combatir plagas. Un mismo producto comercial puede estar compuesto por dos o más materias activas, reforzando la acción contra una misma plaga o ampliarla a varias plagas diferentes.

Los ingredientes inertes no aportan en general ninguna cualidad específica, siendo su misión básica la de dar cuerpo al producto, facilitando su formulación comercial. Los coadyuvantes o mejorantes, si bien no tienen una acción directa sobre las plagas, influyen en la eficacia de la materia activa, aumentando, por ejemplo, el poder mojante o adherente al producto. Los aditivos como colorantes, repulsivos, vomitivos tienen por finalidad reforzar las medidas de seguridad sanitaria en el empleo de los productos fitosanitarios

La identificación de los productos fitosanitarios se puede hacer por el nombre comercial, que es el que le asigna la empresa que lo produce o comercializa, el nombre químico de la materia activa que entra en su composición y el nombre común, utilizado para simplificar el normalmente complicado nombre químico, que con carácter internacional se acuerda dar a la materia activa. Dado que en el mercado se pueden encontrar productos con diferentes nombres comerciales conteniendo la misma materia activa aunque con distintos coadyuvantes, aditivos u otros ingredientes inertes, es imprescindible identificar los productos fitosanitarios por el nombre común de la materia activa que entra en su composición. Dicho nombre también debe figurar obligatoriamente en los

envases de todos los productos comercializados; a él es al que se hace referencia cuando se indican los productos adecuados para combatir una plaga determinada y con él debe ser solicitado en el comercio: cambiar de producto es cambiar de materia activa, no de nombre comercial.

Los productos comerciales se pueden presentar bajo formas distintas (existen más de 70 tipos diferentes de formulaciones) que deben venir especificadas en las etiquetas. Las más utilizadas en el viñedo son:

Sólidas:

- Para aplicar directamente: Polvo para espolvoreo (DP).
  Granulado (GR).
- Para diluir en agua: Polvo mojable (WP).
  Polvo soluble (SE).
  Microencapsulados (CS).
  Gránulos solubles (SG).

Líquidas (se aplican diluidas en agua):

- Líquido emulsionable (EC).
- Emulsión concentrada (EW):
- Suspensión concentrada o “flow” (SC).
- Líquido soluble (SL).
- Líquido para ultrabajo volumen (ULV).

Otras: fumigantes, prolentes, etc.

Las aplicaciones en espolvoreo (DP) respecto a las aplicaciones en líquido (WP, SL, EC, EW, SC, etc.) tienen las ventajas de no necesitar agua, facilidad de penetrar en sitios recónditos del racimo, no aportan agua a la planta lo que favorece el no desarrollo de podredumbres, etc., pero tienen los inconvenientes de requerir mayores cantidades de formulado por ser menos concentrados, tener mayor efecto de deriva, mayor efecto negativo sobre la entomofauna útil, mayor incomodidad para el aplicador, etc. Por ello se suelen preferir las aplicaciones en líquido. Además hay plaguicidas que no son eficaces en espolvoreo y sí en pulverización. Las aplicaciones sólidas de granulados se efectúan especialmente al suelo (gusanos grises, castañeta, caracoles, etc.) y

tienen la ventaja de que no forman polvo. Las formulaciones microencapsuladas, se aplican en pulverización convencional, pero aumentan la persistencia de la materia activa.

La dosis de aplicación (que también debe venir en las etiquetas) en el caso de los polvos espolvoreables (DP) y de los gránulos (GR) se da en kg del producto comercial por hectárea (ha). Si se trata de polvos mojables (WP) y de líquidos emulsionables (EC), que deben ser aplicados previa su disolución en agua, la dosis de empleo puede venir en cantidad de producto comercial a emplear por hectárea o en el porcentaje a diluir en agua (Coscollá 2004).

Las características del plaguicida deben reflejarse en el envase a utilizar y están reguladas por la Reglamentación Técnica Sanitaria sobre plaguicidas (BOE 1983). Entre otras características constan en la etiqueta:

- Nombre comercial del producto y número de inscripción en el Registro Oficial.
- Nombre y dirección del fabricante.
- Nombre de la materia activa y su contenido en porcentaje.
- Peligrosidad para las personas, fauna terrestre y acuícola, indicando su símbolo de toxicidad. Por ejemplo: Tóxico por ingestión, Corrosivo, Irritante para los ojos, provoca quemaduras, etc.
- Menciones de los consejos usuales de prudencia para el empleo, por ejemplo: No comer, ni beber, ni fumar durante la utilización; utilizar ropa de protección y guantes adecuados; quitarse inmediatamente la ropa manchada o salpicada, etc.
- Cultivos en los que está autorizado.
- Parásitos que controla.
- Dosis, modo de empleo y plazo de seguridad.
- Contenido neto del envase.
- Fecha de fabricación y límite de comercialización si no se puede garantizar su estabilidad en almacén durante un mínimo de dos en condiciones normales.
- Antídotos utilizables en caso de intoxicación recomendaciones médicas para casos de intoxicación o accidente.

1.4. Aspectos toxicológicos

La mayor preocupación en cuanto al uso de plaguicidas por parte del consumidor, y en consecuencia de las Administraciones Públicas de los diversos países, corresponde a los problemas de orden toxicológico, bien directamente por el riesgo de su consumo alimenticio o indirectamente por el perjuicio que puedan ocasionar al medio ambiente (Cormis 1991). La aplicación de plaguicidas en agricultura entraña un riesgo tóxico inherente al producto empleado, conocido como toxicidad propia de la molécula plaguicida, que se define como la cualidad de una sustancia y sus metabolitos para ocasionar, a ciertas dosis, perjuicios en la salud debido a acciones químicas o físico-químicas. La determinación previa de su toxicidad, y sus consecuencias inmediatas o remotas, es obligada hoy en día cada vez que un nuevo producto sale al mercado (Barbera, 2004). En referencia a este aspecto, se distingue:

- Toxicidad oral aguda: se refiere a la ingestión "de una sola vez" de un producto pesticida tóxico. Se expresa en términos de Dosis Letal Media (DL_{50}), cantidad de tóxico que es necesario ingerir de una sola vez para producir la muerte del 50 % de los individuos que forman el lote del ensayo. Está expresado en mg de tóxico por kg de peso del individuo ensayado.

- Toxicidad dérmica: riesgos toxicológicos debidos al contacto y absorción del pesticida por la piel. Se mide por DL_{50} dérmica aguda, cantidad de plaguicida, expresada en mg kg^{-1}, que en contacto con la piel durante 24 horas produce la muerte del 50 % de los individuos del lote de ensayo, en un plazo de 14 días.

- Toxicidad por inhalación: efectos toxicológicos producidos por una atmósfera contaminada debida a vaporizaciones o suspensiones de formulación gaseosa, líquida o sólida en polvo. Se expresa en valores de Concentración Letal media (CL_{50}) , y se define como la cantidad de tóxico en mg L^{-1} que pueda causar la muerte del 50 % de los individuos en ensayo e indicando además, el tiempo de exposición a dicha atmósfera.

También se consideran otras clases de riesgo: efectos en piel, ojos, sensibilización dérmica, neurotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis.

El riesgo de ingerir en una dosis única la cantidad equivalente a la DL_{50} sólo puede ocurrir en caso de accidente, error o ignorancia. Por ello, se averiguan los niveles de riesgo del plaguicida a través de las dietas alimenticias preparadas con varias dosis del tóxico, mediante su administración diaria a los animales ensayados a lo largo del tiempo. Con esto, se encuentran la toxicidad a corto y medio plazo (toxicidad subcrónica) y a largo plazo (toxicidad crónica).

Los efectos tóxicos en hombres y animales están en función del centro de acción y la vía de absorción. La clasificación toxicológica ha variado a lo largo de los años. En el Real Decreto 162/1991 aparecen las siguientes categorías en función de su toxicidad aguda sobre ratas, expresada en DL_{50} o CL_{50} y diferenciando según sean preparados sólidos o líquidos.

- Nocivos: pueden entrañar riesgos de gravedad limitada.
- Tóxicos: Entrañan riesgos graves, agudos o crónicos e incluso la muerte.
- Muy tóxicos: pueden entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos e incluso la muerte. Su utilización y empleo debe estar controlado y efectuado únicamente por personal especializado bajo normas estrictas.

Ha desaparecido la categoría de “baja peligrosidad”, y se registran algunos plaguicidas sin que se les asigne clasificación toxicológica. Esto significa que ne condiciones de uso, su peligrosidad es inferior a las de los nocivos, aunque no significa que sean inocuos, pues todos los plaguicidas deben aplicarse con unas mínimas precauciones.

Para la fauna terrestre y acuícola se clasifican en las siguientes categorías:

- Categoría A: productos inocuos para la fauna.
- Categoría B: productos medianamente peligrosos, cuyo empleo con carácter masivo o en aplicaciones repetidas o inadecuadas, pueden entrañar riesgo grave para la fauna.

- Categoría C: productos muy peligrosos, cuya autorización debe estar restringida a la aplicación en determinados cultivos y cumpliendo condiciones estrictas.

1.5. Utilización de plaguicidas

Al igual que la mejora en las técnicas de cultivo y mecanización, la química ha contribuido notablemente en el avance de la agricultura. En el momento que el hombre abandona su sistema de vida nómada y pasa a ser sedentario, alrededor del 8000 a.C., aparece la agricultura como principal fuente de obtención de alimentos, y directamente relacionada con ella, está la aparición de plagas y enfermedades de los cultivos.

En los años 60, la FAO estimaba que para procurar un nivel de nutrición correcta a la población mundial, debería haberse duplicado la producción de alimentos en los años 80 y triplicado para el 2000. Una de las medidas para conseguir este reto es la protección de las plantas para el suministro de alimentos, y así evitar las graves pérdidas sufridas a escala mundial. Además, los modelos económicos actuales de rentabilidad, implican el empleo generalizado de técnicas que aumenten o garanticen los rendimientos de la producción vegetal.

Las pérdidas más importantes son producidas por los parásitos de origen animal (nematodos, insectos y arácnidos), hongos y mala hierbas. Se hace necesario disminuirlas por diferentes medios: culturales, químicos y biológicos. Actualmente, los medios químicos son los más utilizados debido a su mayor eficacia, poniéndose en práctica mediante la aplicación de plaguicidas.

El objetivo principal de la lucha se centrará por tanto en aquellas plagas cuyo ataque se repita todos los años. Por otra parte, las exigencias climatológicas, tanto de la planta como del parásito, varían a lo largo de sus respectivos ciclos de desarrollo, y por consiguiente será necesario conocer: la fenología de la planta y fechas en las que se producen las distintas fases de su desarrollo;

biología de los parásitos que la afectan; y datos climáticos asociados a cada fase (Santos 1997).

Sin embargo el uso de plaguicidas no puede ser anárquico, precisa conocer con exactitud y objetividad su evolución en el medio ambiente. Para ello, es necesario realizar controles que permitan identificar y cuantificar los residuos que estos compuestos pueden dejar en los productos agrícolas destinados a la alimentación.

La Unión Europea representa actualmente, con una venta anual de aproximadamente 320.000 toneladas de sustancias activas, una cuarta parte del mercado mundial. Los principales tipos de productos son los fungicidas (casi un 43% del mercado), seguidos por los herbicidas (36%), los insecticidas (12%) y otros plaguicidas (9%). La industria fitosanitaria europea da empleo en Europa a unas 35.000 personas.

Atendiendo a los datos hechos públicos por las autoridades comunitarias, la agricultura es, con diferencia, el sector que más recurre a los productos fitosanitarios. Lo cierto es que su utilización, además de que aporta ventajas económicas y sociales, también plantea efectos adversos, en algunos casos irreversibes, derivados de la exposición directa o indirecta del hombre y del medio ambiente a esas sustancias.

Los plaguicidas tienen un sinfín de aplicaciones prácticas, pero es en el ámbito agrícola donde se realiza un gasto superior. En el campo, son los herbicidas, los insecticidas y los fungicidas los más empleados. El número de familias y de productos químicos individuales existentes es muy alto, y casi puede afirmarse que, para cada plaga, para cada cultivo y para cada situación, época y lugar, existe un formulado plaguicida específico.

Los plaguicidas representan un buen negocio para los fabricantes, de aquí el interés en promocionar su uso. Sólo las multinacionales pueden asumir el coste del desarrollo de nuevos productos puesto que sacar nuevas moléculas químicas al mercado tiene un precio elevado por la cantidad de requisitos legales exigidos, que tienden a garantizar no sólo su eficacia sino también su seguridad

toxicológica y su ausencia de daños sobre el medio ambiente (siempre y cuando se emplee en las condiciones correctas y con las debidas precauciones). Se comprende que, una vez superados estos trámites, deseen que su artículo tenga mucho éxito.

Después de muchos años de crecimiento abusivo en el empleo y dependencia de los plaguicidas, la tendencia actual en los países más desarrollados es restringir todo lo posible su uso. Muchos productores y también bastantes fabricantes de estos plaguicidas son conscientes de esta necesidad ya que la experiencia ha demostrado, demasiadas veces, que la introducción en los ecosistemas de productos químicos agresivos para el control de una plaga arregla ese problema, pero genera otros nuevos con los desequilibrios asociados.

Conceptos como el manejo integrado de plagas (IPM, en sus siglas inglesas) va por este camino al potenciar métodos alternativos de control no basados exclusivamente en el empleo de plaguicidas. De ello se beneficia directamente el consumidor puesto que menos plaguicidas empleados significa menor cantidad de residuos remanentes en los alimentos.

El mercado europeo descendió 1.6 % respecto al 2005, en que ya bajó un 1.2 %. Después de descontar los efectos de la inflación y del tipo de cambio, el descenso real es equivalente a 4.1%. Las razones climáticas se encuentran en el origen fundamental de este descenso de mercado.

El crecimiento de fungicidas, ha sido liderado por la viña, y el de los insecticidas, fundamentalmente en Almería y Murcia, tiene mucho que ver con una mayor concienciación respecto al uso de productos ilegales.

Dentro de las ventas nacionales de fitosanitarios, La Rioja es el décimo mercado, con un total de 16909.8 miles de euros que corresponde a un 2.94 % del consumo total.

En la Figura I-12 se muestra la evolución del consumo de productos fitosanitarios en la década correspondiente a 1995-2005. En 2005, el consumo

de fitosanitarios se ha reducido un 12.69% en relación con 2004, año en el que alcanzó su máximo. Desde 1995 a 2005 el uso de fitosanitarios ha experimentado un incremento del 70.34 % que rompe el fuerte descenso iniciado a finales de la década de los ochenta.

Aunque en un principio la aplicación de las reformas de la Política Agraria Común (PAC) de 1992 contribuyó parcialmente a la reducción de su consumo, los procesos de intensificación agraria y, sobre todo, el aumento de su especificidad y eficacia, han agravado el problema al aumentar su consumo y su toxicidad.

En cifras absolutas, 1995 señala el punto más bajo del consumo en la década de los noventa (27.852 toneladas de ingrediente activo), pero los años posteriores muestran un fuerte incremento hasta 2004, año en el que consumo asciende hasta las 47.445 toneladas. Los últimos datos, del año 2005, vuelven a mostrar una tendencia a la baja con una disminución en el consumo de 6.023 Tm respecto al año anterior (que equivale a un descenso en kg ha^{-1} del 12.6%). En líneas generales, el consumo de fitosanitarios y la superficie de aplicación, muestran una tendencia inversa: más consumo sobre menos superficie (MARM 2008).

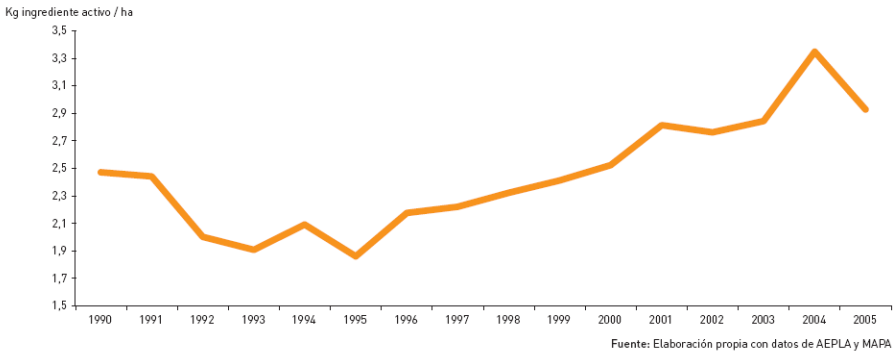


Figura I-12: *Consumo de productos fitosanitarios*

En general, el mayor porcentaje de ventas se atribuye a los herbicidas, seguidos por los fungicidas, similar en muchos casos a los insecticidas. La intensificación desigual de la agricultura en las Comunidades Autónomas se refleja en el uso de los fitosanitarios, mucho mayor en Canarias –más de 200 kg

por ha–, Cantabria, Comunidad Valenciana, Murcia y La Rioja. En la Figura I-13 se muestra el consumo de productos fitosanitarios en 2005 distribuido por productos y Comunidades Autónomas.

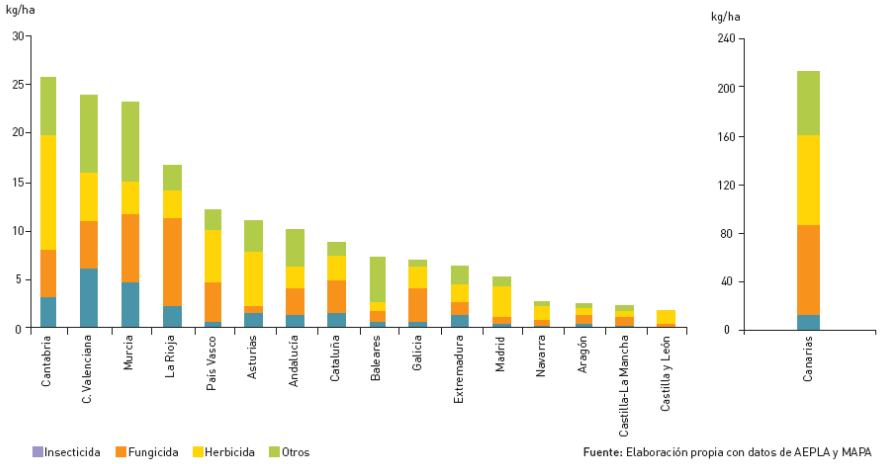


Figura I-13: *Consumo de productos fitosanitarios en 2005 por CCAA*

1.6. Reglamento sobre el uso sostenible de productos fitosanitarios

El uso de productos fitosanitarios está regulado en la legislación europea y española con el fin de realizar un uso correcto de los mismos y contribuir así a la reducción al mínimo los posibles daños que produzcan en el medio ambiente y en la salud de personas y animales. El marco legislativo sobre el uso de estos productos (Límites Máximos de Residuos-LMR) es el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, que modifica la Directiva 91/414/CEE, y en España el RD 280/1994, y sus respectivas modificaciones posteriores (Reglamentos CE nº 149/2008, 260/2008 y 299/2008 y RD 198/2000 y 290/2003). Se define "**residuo**" como "una o varias sustancias activas que se encuentren en o sobre vegetales o productos de origen vegetal, productos animales comestibles, o componentes del medio ambiente, que constituyan los restos de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus

metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción". Esta legislación establece las condiciones para la aprobación de los productos fitosanitarios y para el control de su uso a través de los Límites Máximos de Residuos que son admisibles en los productos agrícolas. De este modo se está protegiendo al consumidor y se crean las bases para un mercado único y homologado en la Unión Europea. También garantiza a los productores que –aplicando los fitosanitarios correctamente dentro de los límites establecidos– sus productos tienen cabida en el mercado comunitario.

La Comisión Europea (12 de julio de 2006) ha propuesto una nueva reglamentación para los productos fitosanitarios con el fin de simplificar los procedimientos de autorización de estos productos y armonizar su disponibilidad en los Estados miembros. Con esta legislación, considerada como una estrategia temática, se intenta conseguir una mayor eficacia en la protección de la salud humana, el bienestar animal y el medio ambiente, analizando con rigor las características de las substancias como, por ejemplo, su persistencia en el medio. Otro rasgo de esta propuesta es que favorece una evaluación comparativa y la sustitución de unas substancias por otras que ofrecen mayor seguridad. Por otra parte, se intensifican las medidas de control ya que los agentes implicados, entre ellos los agricultores, deberán tener un registro de las sustancias que utilizan y ponerlo a disposición, si así lo solicitasen, de los vecinos o de los encargados de la calidad del agua potable. La Directiva marco sobre el uso sostenible de fitosanitarios entró en vigor en el año 2009 (Directiva 2009/128/CE).

2. ENFERMEDADES DE LA VID CAUSADAS POR HONGOS

La podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), el mildiu (*Plasmopara viticola*) y el oídio (*Uncinula necator*) son los hongos más importantes en los que se centra la protección del viñedo.

2.1. Podredumbre gris (*Botrytis cinerea*)

La podredumbre gris está extendida por todos los viñedos españoles, causando los daños más importantes en la zona norte y en la costa mediterránea, ya que las condiciones climáticas, humedad principalmente y temperatura, son favorables para su desarrollo. Se la conoce por diferentes nombres según las zonas: "podredumbre gris", "podrido", "botritis", "gangrena", "pudrición", "podrit". En general, esta enfermedad afecta a la cantidad y a la calidad de la cosecha obtenida.

Los factores climáticos tienen una influencia muy importante en el desarrollo del hongo: la humedad es necesaria para que se produzca la germinación de las conidias, la cual se ve activada con temperaturas próximas a los 18 ºC, aunque puede realizarse con temperaturas comprendidas entre 0 y 40 ºC. Las heridas producidas en los granos por "las polillas del racimo", "el oídio", "el granizo", "los pájaros"..., favorecen extraordinariamente el desarrollo del hongo. Las variedades de racimos compactos y de epidermis fina del grano, son más sensibles al hongo, así como los viñedos con fuerte abonado nitrogenado, que provoca un exceso de vegetación y falta de aireación de los racimos. Variedades de racimo compacto como Garnacha son muy sensibles a este hongo. Los ataques en hojas y sarmientos no suelen tener importancia económica. Esta enfermedad afecta a los racimos en fechas próximas a la vendimia.

Los granos presentan el aspecto típico de "podridos" y sobre su superficie se desarrolla un moho de color grisáceo típico. El ataque puede ocasionar una disminución de calidad en los futuros vinos debido a que segrega una enzima llamada *Lacassa* que produce: la degradación u oxidación de los polifenoles (pardeamiento), la destrucción de la película que contiene las sustancias aromáticas y oxidación de las mismas, el aumento de fijación de SO_2 en los vinos, el aumento de acidez volátil, degradación de azúcares, pérdida de peso del racimo, modificación de los equilibrios ácidos, carencia de compuestos nitrogenados y vitaminas. Se ha comprobado que puede haber una pérdida de volumen, incremento del ácido glucónico, del glicerol y de compuestos como el

1-octen-3-ol dando lugar a notas aromáticas de champiñón, que son características de mostos y vinos elaborados con uvas infectadas por botrytis.

También puede ocasionar una disminución importante de la cosecha debido al aborto y rotura del fruto; en el primer caso las uvas no se desarrollan y en el segundo se produce la evaporación del agua y pérdida de los contenidos de la uva. Todos estos efectos tienen consecuencias importantes como son infecciones secundarias en las uvas (desarrollo de las bacterias acéticas; desarrollo de hongos secundarios nocivos: Trichotecium roseum, Penicillium ssp, Aspergillus ssp, Mucor ssp, etc.; y formación de micotoxinas); problemas en la fermentación por la carencia de nutrientes anteriormente citada, y por la formación de sustancias inhibidoras de la fermentación; problemas en la clarificación y en el filtrado por la formación de glucanos y ácidos mucosos de las pectinas; alteraciones organolépticas como cambios en color, falta de limpidez, olores a húmedo, tierra, champiñón, entre otros. En definitiva, todo esto conlleva a una pérdida de la calidad del mosto y el vino elaborado. En la Figura I-14 se observan los ataques en maduración en uvas tinta y blanca (Pérez Marín 2004).

A) B)

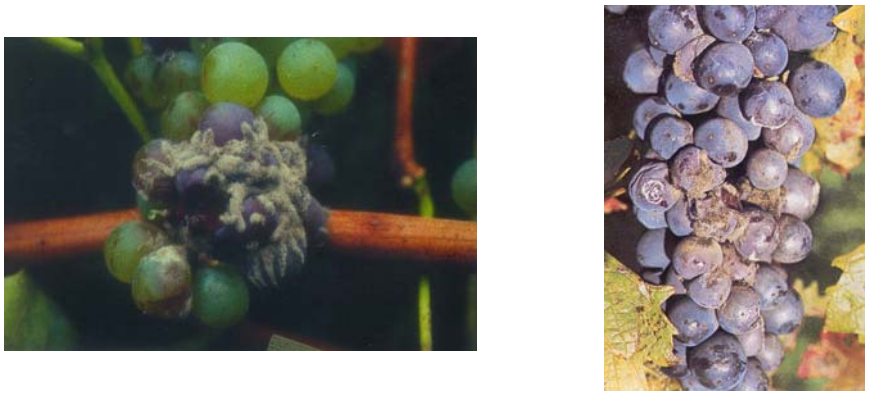


Figura I-14: *Ataque de Botrytis cinerea en maduración en uva A) blanca y B) tinta*

2.2. Mildiu (*Plasmopara viticola*)

Esta enfermedad es una de las mejor conocidas por los viticultores de todo el mundo debido a los daños tan graves y espectaculares que produce si las condiciones climáticas le son favorables, ya que puede atacar a todos los órganos verdes de la vid. Generalmente se la conoce por "mildiu", "mildeo" o "mildeu", aunque también como "niebla" o "añublo". Aunque las pérdidas económicas que genera pueden ser muy importantes, en la actualidad el riesgo es menor debido al mejor conocimiento de su biología, la existencia de productos sistémicos y penetrantes, y la mejor preparación de los viticultores.

Los factores climáticos tienen una influencia determinante en el desarrollo del hongo. Las condiciones necesarias para una contaminación primaria son: oosporas maduras, brotes de la vid de unos 10 cm, lluvia superior a 10 mm en 1 ó 2 días, Tª superior a los 12 ºC. Las condiciones necesarias para que se produzca una contaminación secundaria son: presencia de conidias u agua líquida (lluvia o humectación de las hojas superior a las 2 horas). Los ataques más graves del mildiu se producen cuando a un invierno húmedo le sigue una primavera y verano lluviosos, siendo la temperatura óptima para su desarrollo de 25 ºC. Bajo estas condiciones existe una buena supervivencia de las oosporas, germinación y posterior diseminación.

Los síntomas se manifiestan en hojas por las típicas "manchas de aceite" en el haz, que se corresponden en el envés con una pelusilla blanquecina si el tiempo es húmedo. Al final de la vegetación estas manchas adquieren forma de mosaico. Los ataques fuertes pueden producir una desecación parcial o total de las hojas e incluso una defoliación. Los brotes también pueden verse atacados y ser destruidos. En el racimo, ocasiona deformaciones del raquis o raspón, y recubrimiento de la típica pelusilla blanquecina en la baya. Cuando los granos superan el tamaño de un guisante no se oscurecen ni aparece la pelusilla blanquecina, sino que se arrugan, se pardean y finalmente se desecan, conociéndose por "mildiu larvado". Los ataques durante el período de floración-cuajado pueden ocasionar la pérdida total del racimo, mientras que los más

tardíos suelen afectar solamente a una parte del mismo. A partir del envero el hongo no ataca al racimo. El inóculo permanece en hojas caídas en otoño y las oosporas liberadas por estas hojas se activan y germinan en primavera. La enfermedad se transmite por el salpique de la lluvia y penetra por los estomas de las hojas. Asimismo, puede provocar otras consecuencias importantes debido a la rotura de la baya como puede ser el punto de entrada de otras enfermedades y la pérdida del volumen de mosto. De forma similar a la botrytis puede ocasionar la pérdida y alteraciones en el aroma y el color de los vinos, alteraciones microbianas en el vino y problemas en la clarificación y el filtrado. En la Figura I-15 se pueden observar los síntomas en hojas y granos (Pérez Marín 2004).

A) B)

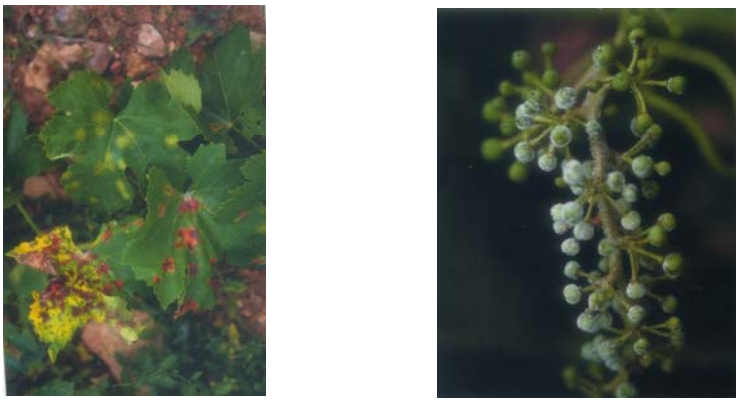


Figura I-15: *Síntomas de mildiu. A) Manchas en hoja. B) Pelusilla blanquecina en grano*

2.3. Oídio (*Uncinula necator*)

El oídio es una enfermedad ampliamente extendida en España que casi siempre hace acto de presencia, y que en algunos años de condiciones climáticas favorables para su desarrollo puede ocasionar, en variedades sensibles y zonas propensas, la pérdida total de la cosecha. Está presente en la mayor parte de los viñedos del mundo. En muchos aspectos es una enfermedad tan, o más importante que el “mildiu”, pues se presenta con mayor constancia.

Recibe distintos nombres comunes según las regiones “ceniza”, “cenicilla”, “polvillo”, “polvo”, “cendrada”, “cendrosa”, “sendreta”, “malura”, “roya”, “blanqueta”, “negra”, conociéndosela generalmente por oídio.

La temperatura, la humedad, y en menos medida la insolación, son los factores climáticos que condicionan el desarrollo del hongo. La temperatura es el factor climático que más influencia tiene en el desarrollo de la enfermedad. Alrededor de las 15 ºC comienza a ser favorable para su progreso vegetativo y su propagación, alcanzando el óptimo entre los 25 ºC y los 28 ºC, deteniendo su desarrollo a los 35 ºC y siendo letales las temperaturas superiores a 40 ºC. La humedad ambiental también influye en el desarrollo de la enfermedad, aunque en menor grado que la temperatura. La germinación de las conidias se ve favorecida por las humedades relativamente altas. Al contrario que en el caso del mildiu, las lluvias abundantes frenan el desarrollo del hongo. Parte del hongo se conserva durante el invierno en forma de peritecas en los sarmientos (fase sexuada) o en el interior de las yemas en forma de micelio (fase asexuada) protegido por las escamas; cuando éstas comienzan a desarrollarse en primavera también comienza a activarse el hongo. El viento dispersa las conidias que germinan rápidamente en los órganos verdes de la vid, constituyendo los focos primarios de infección.

El oídio puede atacar a todos los órganos verdes de la vid. En las hojas, los síntomas aparecen tanto en el haz como en el envés; en ambos casos suele observarse un polvillo blanco ceniciento, que puede limitarse a algunas zonas o bien ocupar toda la superficie de la hoja; debajo del polvillo se aprecian puntitos necrosados. En los ataques fuertes las hojas aparecen crispadas con los bordes hacia el haz. En brotes y sarmientos se manifiesta por manchas difusas de color verde oscuro, pasando a negruzco al endurecerse el brote. En los racimos, al principio los granitos aparecen con un cierto tinte plomizo, recubriéndose en poco tiempo del polvillo ceniciento, que si se limpia deja ver puntitos pardos sobre el hollejo.

Las consecuencias del ataque y desarrollo del oídio son la disminución de la superficie foliar, un mal desarrollo de los brotes y lignificado del sarmiento por lo que se produce una mal cuajado del fruto. Los daños más importantes se localizan en los racimos, ya que los ataques fuertes ocasionan la detención del crecimiento de la piel, por lo que es frecuente que ésta se agriete y lleguen a rajarse algunos granos; así se producen unos daños directos en la cantidad y la calidad de la cosecha y otros indirectos al favorecerse la penetración del hongo *Botrytis cinerea* (con las consecuencias que conlleva en la elaboración y en la calidad final del vino, comentado anteriormente), así como la podredumbre ácida. Los ataques fuertes también pueden producir un mal agostado de los sarmientos, con la consiguiente disminución de la acumulación de reservas en las yemas. Variedades como Tempranillo, Mazuelo, Garnacha, Malvasía y Viura son más sensibles al oídio (Pérez de Obanos 2004). En la Figura I-16 se observan los ataques en brotes y racimos.

A) B)

Figura I-16: *Síntomas de oídio. A) Manchas iniciales en el brote. B) Ataque en racimo*

3. FUNGICIDAS

El control químico para la prevención de las enfermedades provocadas por los hongos mencionados anteriormente se basa en la utilización de fungicidas. Son muchos los grupos que por su composición química se pueden clasificar los fungicidas, pero con carácter práctico para su utilización se distinguen dos clases: de contacto o preventivos y curativos. Cabe recordar que son fungicidas de contacto o preventivos los que por no penetrar en los tejidos vegetales únicamente ejercen su acción cuando se encuentran sobre la planta antes de que se produzca la infección. Es decir, que los tratamientos que se realicen con esta clase de fungicidas (tratamientos preventivos) deben efectuarse antes de que se presente la enfermedad que se quiere combatir.

Los fungicidas curativos, por penetrar en los tejidos vegetales, detienen o impiden el desarrollo del micelio del hongo dentro de estos tejidos. Si una vez dentro de la planta se desplazan por su interior tenemos los fungicidas curativos sistémicos y si no se desplazan los curativos penetrantes. Los fungicidas curativos también tienen un carácter preventivo en el sentido de que si se aplican antes de que se haya producido la infección, es decir, antes de que la espora del hongo haya germinado y penetrado el micelio (promicelio) en los tejidos, evitan el establecimiento de dicho micelio en el interior de la planta.

Un punto importante a destacar es que la acción curativa solamente tiene eficacia si los tratamientos se realizan dentro de un determinado plazo de tiempo (días u horas) contando a partir del momento en que se produjo la infección. En el caso de fungicidas antibotritis, este intervalo de tiempo queda reducido a unas pocas horas, por lo que se debe considerar que estos fungicidas tienen una acción más bien preventiva; por el contrario los fungicidas antimildiu, pueden impedir el desarrollo del hongo si se aplican bastante después de haberse producido la infección: 2-3 días, y 4-6 días según compuestos.

Por su forma de actuar los fungicidas podrían clasificarse en dos grupos:

• Multi-diana: son aquellos que actúan interfiriendo simultáneamente varios procesos vitales del hongo, como azufre, cobre, ditiocarbamatos, que aunque actúan como inhibidores respiratorios, afectan también otros procesos. Actúan esencialmente de forma preventiva, no son penetrantes (se eliminan por lavado de lluvias) con lo que su persistencia no es larga, pero hasta el presente no han presentado problemas de persistencia.

• Mono-diana: son aquellos que afectan a un solo proceso vital (inhibidores de la respiración, inhibidores de la división celular, inhibidores de la síntesis de esteroles, etc.). Es decir, son más específicos en su forma de actuar. Suelen ser penetrantes o sistémicos, tiene mayor persistencia (incluso después de lluvias), en muchos casos acción curativa, pero presenta el riesgo de aparición de resistencias.

Un comentario especial merece un grupo de fungicidas de reciente aparición denominado estrobilurinas que son análogos sintéticos de moléculas naturales producidas por el hongo Strobilurus tenacellus (azoxistrobin, kresoxim-metil...). Además de su acción preventiva y en muchos casos curativa, tienen carácter penetrante y un amplio espectro de acción (Coscollá 2004).

4. RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN UVAS Y VINOS

Como consecuencia de los tratamientos fitosanitarios en el viñedo, aparecen en muchos casos residuos de plaguicidas en el momento de la recolección de la uva. Es un tema que va tomando una importancia creciente, por la preocupación que existe en la opinión pública a causa de la presencia de sustancias tóxicas en los alimentos y que se refleja en la actuación de las Administraciones y Autoridades públicas a nivel de normativa y controles. En el caso de la uva los tratamientos que influyen decisivamente en su contenido final en residuos son los que se realizan más próximos a la vendimia, como son los tratamientos fungicidas contra *Botrytis* y otras podredumbres.

4.1. Normativa legal. Límite Máximo de Residuos

Debido a la posible peligrosidad de los residuos de plaguicidas, ya que se trata de sustancias tóxicas, las Administraciones públicas han promulgado, en casi todos los países, normas con el fin de proteger la salud de los consumidores, y controlar el buen uso de los plaguicidas. En algunos casos se ha prohibido el uso de ciertos plaguicidas por la larga persistencia de sus residuos. Además de estas prohibiciones generales, un plaguicida sólo puede utilizarse en viñedo si está especialmente autorizado y homologado para este cultivo. En esa homologación se fijan sus condiciones de uso, y entre ellas se le asigna un determinado límite máximo de residuos.

El **límite máximo de residuos** (LMR) o "tolerancia" es la cantidad máxima de residuos de determinado plaguicida sobre determinado producto agrícola permitida por la ley. Es decir, la cantidad que no puede ser sobrepasada para que el producto pueda ser expuesto en circulación o comercializado. En su fijación intervienen tanto criterios toxicológicos como agronómicos.

La legislación española al respecto está contenida básicamente en el real Decreto 280/1994 por el que se establecen LMRs de plaguicidas y su control en productos vegetales, y en una serie de órdenes que se han publicado posteriormente y concretan esos LMR.

No obstante, se ha de tener en cuenta que si el mosto o vino ha de enviarse a otros países, estas "tolerancias" legales pueden ser distintas. En efecto para algunos plaguicidas de gran interés, los LMRs varían mucho según el país de destino, lo cual es un serio problema para el exportador y también para el productor, pues en el momento del tratamiento no sabe cuál va a ser su destino y, por lo tanto, si puede aplicar o no determinado plaguicida o, si lo aplica, el plazo de seguridad entre tratamiento y recolección.

Organizaciones internacionales como la FAO y la OMS de Naciones Unidas crearon el Codex Alimentarius (sistema de estándares para alimentos a nivel

mundial) y dentro de él, la Comisión Adjunta de Residuos de Plaguicidas (CCPR) para establecer los LMRs de plaguicidas en alimentos y piensos, examinar los métodos de muestreo y análisis, y desarrollar las listas de plaguicidas prioritarios en establecer sus LMR. La UE marca unas directrices que comprometen a los gobiernos, teniendo la libertad de aceptar o rechazar los LMRs del Codex. El número de LMRs del Codex aceptados es inferior al deseable, debido a los sistema legales que dificultan su aceptación en las distintas legislaciones de los diferentes países.

La determinación de los LMRs ha supuesto la utilización de un gran número de medidas de seguridad en lo que respecta a la salud pública, desde el más amplio conocimiento de la toxicidad de un producto, hasta estudios de degradación y persistencia del compuesto en las condiciones habituales de uso. Se pretende con ello que la ingestión diaria del plaguicida a lo largo de toda la vida, no provoque efectos adversos en la salud. Por tanto, los LMR se definen en función del Nivel Sin Efecto (NSE), definido como la cantidad de plaguicida que ingerido durante toda la vida, no provoca efectos nocivos observables en los animales de experimentación. Se expresa en miligramos de plaguicida por kilogramos del peso del animales y día (mg kg^{-1} $día^{-1}$).

Este valor se extrapola a la especie humana aplicando un coeficiente de seguridad (generalmente la centésima parte de este valor), con lo que se obtiene el valor correspondiente a la denominada **Ingestión Diaria Admisible (IDA),** que se define como la cantidad de residuo de un plaguicida por kilogramo de peso del hombre y día. Teniendo en cuenta el valor del IDA y la cantidad de un alimento concreto que puede ingerir una persona de peso normal, expresado en kilogramo por día (alrededor de 60 kg), se puede calcular el **Nivel Permisible (NP)**, expresado en mg kg^{-1}.

El plan de actuación aceptado en la mayoría de los países, es el de establecer los LMRs acogiéndose al concepto de **Buena Práctica Agrícola (BPA)**: los mismos plaguicidas deben utilizarse en las cantidades mínimas necesarias para lograr el control adecuado, de tal manera que deje un residuo equivalente a la

cantidad más pequeña practicable y que sea toxicológicamente aceptable. Pero no todos los países comparten este concepto (diferente clima, diferentes plagas, diferentes cultivos) y especialmente si la práctica implica mayores cantidades que las permitidas por sus Decretos sobre residuos.

Igualmente se acepta la imposición de un **Plazo de Seguridad (PS)**, que representa el plazo mínimo de días que deben transcurrir entre la última aplicación del plaguicida en cuestión y la recolección de frutos o partes comestibles del cultivo. Para el establecimiento del plazo de seguridad, se tienen en cuenta las curvas de disipación a lo largo del tiempo, específicas para cada vegetal y plaguicida, hasta que la cuantía de sus residuos sea similar a inferior a la señalada en los LMRs.

En la curva de disipación de un plaguicida, se consideran dos parámetros importantes: el denominado depósito inicial, cantidad de plaguicida que queda sobre el vegetal inmediatamente después del tratamiento, y su velocidad de degradación. En la Figura I-17 se muestra una curva de disipación típica.

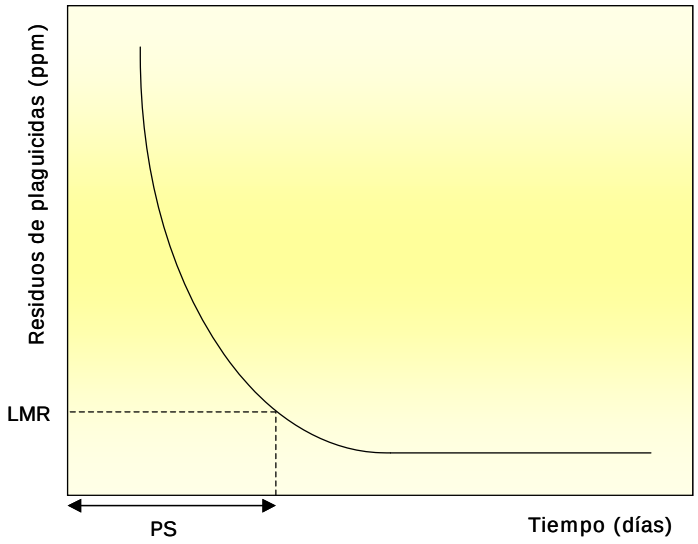


Figura I-17: *Evolución de los residuos de plaguicidas en función del tiempo*

4.2. Factores que determinan el contenido en residuos

El contenido en residuos en las uvas en el momento de vendimia depende tanto del depósito que queda inmediatamente después de la aplicación, como de lo que sucede entre ésta y la vendimia, pues durante este período tiene lugar una disipación progresiva de los residuos.

El depósito o cantidad de plaguicida que queda en las uvas al acabar la aplicación depende de varios factores:

- Dosis de plaguicida aplicado.
- Naturaleza química del plaguicida y de la formulación, que determinan una mayor o menor adherencia.
- Tipo de aplicación. En las aéreas hay mayores pérdidas por deriva que en las terrestres y también influye en ambos casos el tamaño de gota o de partícula, que cuanto menor sea, mayor será la deriva.
- Condiciones climáticas en el momento de aplicación. A mayor velocidad del viento mayor deriva, a mayor temperatura mayor evaporación, etc.
- Características del sustrato vegetal, es decir, tamaño de las bayas, compacidad del racimo, etc.

Este último factor es muy importante, pues hay que tener en cuenta que el residuo se expresa en proporción al peso: miligramos de plaguicida por kilogramo de producto vegetal (mg kg^{-1} = ppm, partes por millón). Por lo tanto, cuanto mayor superficie receptiva al plaguicida presente en el producto vegetal en relación a su peso, mayor será el depósito de plaguicida.

En el caso de la uva, al ser las bayas pequeñas en relación a otros tipos de frutas (manzanas, ciruelas, etc.), los depósitos son proporcionalmente mayores. Por ejemplo, a igualdad de dosis y de otros factores suelen ser el triple en uvas que en manzanas, porque aquéllas tienen triple superficie a igualdad de peso. De todas formas, una vez realizada la aplicación, ese depósito inicial va disminuyendo progresivamente con el tiempo, y en esa mayor o menor disipación intervienen varios factores, como:

- Crecimiento del racimo, ya que al aumentar de peso "diluye" el contenido en plaguicida, pues, como se ha comentado, el residuo se expresa en proporción al peso.

- Tipo de formulación aplicada, pues los depósitos procedentes de espolvoreos suelen ser menos tenaces que los procedentes de pulverizaciones. Dentro de esta últimas los plaguicidas formulados como emulsiones concentradas o líquidos emulsionables o flow suelen ser más persistentes que los formulados como polvos mojables, debido a los coadyuvantes que contienen. Las formulaciones microencapsuladas (CS) también aumentan la persistencia de los residuos.

- Lluvia y viento, que actúan mecánicamente arrastrando al plaguicida. Su acción depende de su intensidad, duración, tipo de plaguicida y formulación, momento en que tiene lugar tras la aplicación, pues si suceden al poco tiempo de realizarse el tratamiento el efecto de arrastre es mucho más notable que si ocurren pasados varios días. Normalmente una precipitación de 12-15 mm si es normal y 22-24 mm si es torrencial, obligan a repetir la aplicación, a no ser que se haya tratado con productos sistémicos o penetrantes.

- Volatilización del plaguicida, es decir, su paso al estado de vapor y disipación en la atmósfera. Es función de la tensión de vapor del plaguicida. En general los plaguicidas tienen bajas tensiones de vapor, pero algunos como el clorpirifos las tienen relativamente altas, lo que además facilita su penetración en el racimo, supliendo posibles defectos de aplicación. En la volatilización influyen también dos factores extrínsecos: la temperatura, pues a mayor temperatura mayor evaporación y la existencia de ligeras brisas que renuevan las cepas de aire del viñedo.

- La degradación química que depende de la estabilidad de la molécula del plaguicida (hay productos muy estables, otros fácilmente degradables) pero su velocidad está influida por otros dos factores externos: la temperatura que la

acelera y la radiación solar, pues la mayor parte de los plaguicidas son más o menos fotosensibles.

El contenido de residuos en el racimo disminuye con el tiempo según la influencia de estos factores. Su representación gráfica es la curva de disipación del plaguicida que nos representa la evolución de sus residuos en condiciones de campo.

4.3. Problemática de los residuos en uvas y vinos

Los residuos de los fungicidas aplicados en campo pueden pasar de las uvas al mosto y finalmente al vino durante el proceso de vinificación (Cabras y col., 2000, Navarro y col. 1999). Este hecho puede tener tres tipos de consecuencias:

4.3.1 Alteraciones en la calidad organoléptica de los vinos.

Puede suceder que los restos de azufre, en aquellos plaguicidas con azufre en su molécula, se reduzcan a ácido sulfhídrico (H_2S) y mercaptanos que se perciben aún a bajas concentraciones. Por ejemplo, los residuos de acefato (O,S-dimetil acetilfosforoamidotioato; fórmula: C4H10NO3PS) en ocasiones han provocado malos sabores, parecidos a los de la coliflor (Tousseau 1991).

Los plaguicidas pueden tener un efecto indirecto en las propiedades organolépticas, debido a que pueden provocar paradas de fermentación, deteriorando la calidad final del vino. Este problema se trata en el siguiente apartado.

4.3.2 Interferencias en el proceso de fermentación.

Residuos de determinados fungicidas pueden provocar diferentes efectos sobre la flora y el metabolismo de las levaduras, que tienen como consecuencia un retraso fermentativo o incluso paradas de fermentación.

En las últimas vendimias se ha comprobado según datos del Consejo Regulador de la Denominación de Origen Calificada Rioja, que en bodegas industriales y de cosecheros se producen paradas de fermentación en la elaboración de vinos tintos y no de forma generalizada en todos los depósitos de fermentación de la misma bodega o propiedad. De todos es conocido que el fenómeno de paradas de fermentación en los vinos se han producido desde la antigüedad hasta nuestros días, pero la causa eran bien conocida por el exceso de sobremaduración de las uvas y la falta de poder fermentativo de las levaduras en aquellos caldos con exceso de contenido en azúcar. Esta causa queda totalmente descartada debido a los controles que hoy en día se realizan en todas las denominaciones de Origen y la limitación que en casi la totalidad de las mismas existen en sus reglamentaciones en cuanto al contenido alcohólico de los caldos que producen, con graduaciones inferiores al 13.5 % en volumen. Así, se considera también que las paradas de fermentación en vinos tintos, están producidas por los residuos de plaguicidas que se aplican en los tratamientos de los viñedos y la función inhibidora que pueden ocasionar en la flora microbiana presente en la uva y posterior acción en los diferentes estadios de crecimiento de las mismas.

Por otro lado, mediante transformaciones físicas, químicas o biológicas de la propia fermentación de las pastas, despalilladas o sin despalillar, las materias activas de partida pueden originar otros productos secundarios o productos de degradación (metabolitos). Se ha comprobado que existe un cierto desconocimiento respecto a los posibles metabolitos que pueden aparecer en las distintas degradaciones de los plaguicidas utilizados en las aplicaciones en vid. Estudios realizados sobre degradaciones de otros plaguicidas en otras matrices permiten constatar que algunos metabolitos generados pueden resultar tan tóxicos para las levaduras o incluso más, que las propias materias activas.

De la aplicación indiscriminada de los productos fitosanitarios, sobre todo en fechas próximas a la vendimia, se han desarrollado episodios de paradas fermentativas y deficiencias en las elaboraciones que pueden afectar a las características organolépticas del vino, disminuyendo su calidad final (Cabanis y

Cooper 1991; Larue 1991; García Romeo 1996; Sala y col. 1996; Reulet y col. 1996; Cugier y Reulet 1997). Una parada o una ralentización de la fermentación alcohólica provoca presencia de azúcares residuales, aumento de acidez volátil (picado acético), formación de acetato de etilo, picado láctico, menor grado alcohólico, desequilibrios en la relación acidez total / ácido tartárico, oxidación, formación de ácido sulfhídrico y materias reductoras, pérdida de aromas, pérdida de estabilidad biológica, etc... Todo ello, en definitiva, deteriora la calidad final del vino elaborado

Durante la fermentación del mosto se suceden dos procesos, por un lado las levaduras metabolizan la glucosa obteniendo energía y por otro existe un proceso de crecimiento y multiplicación celular donde las levaduras sintetizan los compuestos químicos necesarios para su estructura celular; este proceso se ve limitado por la concentración de substratos limitantes o inhibido por los productos tóxicos generados por las levaduras (Gnaegi y col 1983). La presencia de distintas materias activas en las uvas puede generar problemas sobre la actividad celular de las levaduras perturbando el funcionamiento de las distintas reacciones enzimáticas por mecanismos de inhibición y por tanto pueden modificar la curva de desarrollo de la cinética de fermentación aumentando el tiempo de latencia. Preguntas que nos podríamos plantear son: ¿es la inhibición un proceso reversible? o ¿el sistema celular volverá a su estado inicial si desaparece la causa de la inhibición? La inhibición de la actividad fermentativa es el primer efecto que interesa a los enólogos, pero se ha constatado que ciertos fungicidas e insecticidas pueden modificar el metabolismo de las levaduras, aunque no lleguen a impedir la fermentación (Zironi y col 1991). El grado de demora en el inicio de las fermentaciones provoca un estado de anaerobiosis que, a parte de los fenómenos de oxidación que implican pérdidas de componentes aromáticos, induce a posibles peligros de contaminaciones bacterianas, de levaduras oxidativas y de mohos. Estas contaminaciones pueden modificar la composición fisico-química del sustrato original y alterar la diversidad de poblaciones levaduriformes a favor de levaduras no fermentativas, desviando por ello el correcto transcurso de la fermentación alcohólica provocando alteraciones de la calidad del vino (Cuinier 1996).

Generalmente la concentración de fungicidas que aparece en vendimia es menor que los LMRs permitidos y además los niveles de residuos decrecen durante algunas etapas del proceso fermentativo, pero puede haber excepciones principalmente cuando no son respetados los plazos de seguridad. Algunos estudios han comprobado la influencia en la composición aromática del vino (Oliva y col. 2008) por lo que hay que tratar de evitar las posibles incidencias que pueden ocurrir con su presencia evitando y/o reduciendo la cantidad de residuos todo lo posible. Para obtener un mosto limpio hay que recurrir a las buenas prácticas enológicas, pies de cubas correctos, decantación estática (con o sin clarificantes, p.ej. bentonita) y dinámica (centrifugación y filtración), desfangando con algún coadyuvante (p.ej. gelatina o gel de sílice) o la adición de levaduras frescas. Después de estas operaciones se observa una disminución de los residuos de plaguicida del mosto (Cabras y col. 1995, 1997, 1998, 2000a; Navarro y col. 1999; Fernández y col. 2005), probablemente debido a factores químicos, físico-químicos y metabólicos tales como la hidrólisis, la capacidad de sorción de las sustancias clarificantes y la acción de las propias levaduras. Los conocimientos actuales sobre los residuos permiten evaluar los efectos de diferentes técnicas de vinificación, sin olvidar el importante papel que tiene la técnica vitícola para reducir los residuos en origen, teniendo en cuenta los modos y épocas de tratamiento (BPA).

Algunos pesticidas como es el caso de la ftalimidas, captan y flopet producen retrasos fermentativos y/u otras alteraciones. A partir de una concentración en el mosto de 1 mg L^{-1}, interfieren significativamente en la fermentación, aumentando esta interferencia a medida que aumenta la concentración del fungicida. La diclofluanida interfiere a partir de 0.3 mg L^{-1}de concentración en el mosto. Por eso para las formulaciones a base de estos fungicidas se recomienda emplearlas sólo hasta el envero en viñedo para vinificación. No obstante, aparece descrito en la bibliografía que la presencia de algunos de estos compuestos puede estimular a las levaduras, en particular a la *Kloeckera apiculata* (Cabras y col. 1999). Es también posible la influencia de los fungicidas sobre la fermentación maloláctica, reduciendo poblaciones bacterianas y un menor consumo de málico (Cabras y col. 1999).

En resumen, dentro de las incidencias que provocan la presencia de plaguicidas en Enología podemos encontrar:

a) efecto sobre la flora microbiana de las uvas y el mosto

b) efecto sobre la cinética de la fermentación alcohólica

c) efecto indirecto sobre la composición del vino

d) efecto sobre la calidad del vino debido a modificaciones químicas

4.3.3 Toxicidad para el consumidor

Ya se ha hablado anteriormente de los aspectos toxicológicos de los plaguicidas. Este es el aspecto que tiene un mayor interés para el público en general, aunque por el momento sólo en algunos países como Canadá, EEUU, Suiza, Italia y Japón, se han establecido LMRs específicamente para vinos. Es decir, que la uva destinada a vinificación legalmente ha de tener un contenido en residuos que no supere el LMR de uva en general, independientemente de las modificaciones que sufran esos residuos durante el proceso de transformación. Para algunos pocos plaguicidas se han fijado LMRs distintos en uva según su destino sea mesa o vinificación.

Como se ha comentado en el apartado anterior dedicado a la influencia en la fermentación, es cierto que durante el proceso de vinificación tienen lugar disminuciones importantes en el contenido de residuos de muchos plaguicidas tanto en el mosto como en el vino elaborado. Estas disminuciones son variables según el tipo de plaguicida o materia activa del plaguicida y de los "acompañantes", y las características del proceso de vinificación. En primer lugar, en el prensado, estrujado o extracción del mosto según la solubilidad en agua del plaguicida, mostrará mayor afinidad por la fase líquida o por la fase sólida. Así los productos solubles en agua como los benzimidazoles, los residuos pasarán en grandes cantidades, mientras que las dicarboximidas, menos solubles, pasarán muy parcialmente y menos aún los poco solubles como el azufre. Posteriormente la clarificación del caldo produce en muchos casos

disminuciones importantes de residuos con la eliminación de las heces en suspensión.

4.4.4 Recomendaciones

Para evitar problemas de residuos hay que utilizar adecuadamente los plaguicidas en el viñedo, lo que significa:

- Emplear sólo los productos autorizados.
- No superar las dosis homologadas.
- Respetar escrupulosamente el plazo de seguridad entre tratamiento y recolección.

Estos datos han de constar obligatoriamente en la etiqueta del producto. En el caso de exportaciones, hay que en cuenta la normativa en el país de destino. Pudiera ocurrir que el país en cuestión no tuviera LMR para determinado plaguicida o lo tuviera muy bajo (inferior al español), entonces pueden presentarse problemas si se trata con ese plaguicida, lo que obligaría o bien a cambiar de plaguicida o a modificar el plazo real de seguridad considerando su curva de disipación.

Si se trata de países de la Unión Europea y el plaguicida en cuestión tiene el LMR armonizado para la vid pueden utilizarse en las mismas condiciones que figuran en la etiqueta española. Pero en el caso de que se trate de terceros países. O incluso países europeos, cuyo LMR sea menor que el español (o carezcan de LMR) es cuando hay que recurrir a las modificaciones citadas: mayor período de espera entre tratamiento y recolección o sustitución por otro plaguicida menos problemático.

Si se tienen en cuenta todas estas consideraciones creemos que los problemas de residuos de plaguicidas, tanto en uva de mesa, como de vinificación, pueden reducirse al mínimo.

5. PRODUCCIÓN INTEGRADA

La administración, dentro de las normativas de calidad, ha desarrollado un instrumento en apoyo a la comercialización de los productos que satisfagan la demanda marcada por los mercados más exigentes, que cuenta ya con un significativo reconocimiento por parte de los grandes importadores en el marco de la Unión Europea; se trata de la marca de garantía conocida como **Producción Integrada**. En España son ya casi 50000 hectáreas las que contemplan este sistema de producción, con seis comunidades autónomas al frente (Andalucía, Aragón, Baleares, Cataluña, Murcia y Valencia) y una legislación adaptada a las necesidades culturales de cada una de ellas. Dicha legislación está regulada a través de los decretos y las órdenes correspondientes, que establecen un reglamento genérico autonómico y tantos reglamentos como cultivos sobresalientes en el área en cuestión.

La OILB (Organización Internacional de Lucha Biológica e Integrada) define la producción integrada como el "sistema de producción sostenible de alimentos de alta calidad mediante métodos respetuosos con el medio ambiente y manteniendo los ingresos de la explotación" (OILB 1977).

Se puede definir la producción integrada de forma más amplia como un sistema de producción rentable de alimentos, que tiene en cuenta todos los factores productivos y que da prioridad a los métodos que respetan a la salud humana y el medio ambiente, con el objetivo de obtener productos de alta calidad, minimizar el uso de productos agroquímicos y disminuir los residuos. A diferencia de la producción ecológica, la producción integrada permite el uso de productos fitosanitarios de síntesis, pero de manera restringida y como la última solución. La producción integrada pretende utilizar los conocimientos y los métodos de la buena práctica agrícola, que junto con una planificación correcta y el desarrollo de las técnicas del manejo integrado de plagas, permita cumplir sus objetivos, que se pueden concretar en:

- Obtener productos de alta calidad

● Proteger la salud del consumidor y del productor

● Respetar el medio ambiente

● Respetar el ecosistema (fauna y flora)

● Minimizar el uso de fitosanitarios y abonos

● Conservar el medio rural y el paisaje, y asegurar la viabilidad económica

Para conseguir estos objetivos se elabora una norma técnica a cumplir, específica para cada cultivo, por tanto, se requiere un compromiso del agricultor con sus objetivos y una formación técnica adecuada. Estas normas definen unas bases técnicas y desarrollan obligaciones, recomendaciones y también prohibiciones en aspectos concretos como: biodiversidad, material vegetal, suelos, características de la plantación, manejo de la plantación, fertilización, manejo de la cubierta vegetal del suelo, riego, control de plagas y enfermedades, normas para el uso de la maquinaria de tratamientos, cuaderno de explotación y gestión de los envases de productos fitosanitarios. Además, en el caso del cultivo de la viña, hay un apartado específico para la vendimia. Todo esto pretende ofrecer las mejores condiciones para conseguir la máxima sostenibilidad del proceso productivo y la máxima calidad.

En base a estas definiciones, la Producción Integrada de uva tiene los siguientes objetivos:

● Promover una viticultura respetuosa con el medio ambiente que sea económicamente viable y que contemple las múltiples funciones de la agricultura en sus aspectos sociales culturales y recreativos.

● Asegurar la producción sostenible de uvas sanas de alta calidad y un contenido mínimo de residuos de plaguicidas.

● Proteger la salud de los viticultores durante la manipulación de los agroquímicos.

● Crear y mantener una gran diversidad biológica en el ecosistema del viñedo y sus alrededores.

● Dar prioridad a la utilización de los mecanismos de regulación naturales.

● Conservar y favorecer la fertilidad del suelo a largo plazo.

● Minimizar la contaminación de las aguas, el suelo y el aire.

Se debe seleccionar el plaguicida menos peligroso para humanos, ganado y el medio ambiente que proporcione un control efectivo de la plaga, el patógeno o la mala hierba.

Se establece una clasificación de los plaguicidas en base a los siguientes criterios:

● Toxicidad para los humanos.

● Toxicidad para los enemigos naturales clave.

● Toxicidad para otros enemigos naturales.

● Contaminación de las aguas superficiales y subterráneas.

● Capacidad de estimulación de las plagas.

● Selectividad.

● Persistencia.

● Falta de información completa sobre el plaguicida.

Según esto los plaguicidas se clasifican en las categorías “permitidos”, “permitidos con restricciones” y “no permitidos”.

España y, en particular, Andalucía, han sido pioneras en el desarrollo de estos programas, a partir de 1979 con la creación de las ATRIAS (Agrupaciones para el Tratamiento Integrado en Agricultura) en el cultivo del algodón, extendido posteriormente a otros cultivos (viña, olivar, frutales, hortícolas, etc.) En La Rioja desde finales de 2001 está regulada la Producción Integrada

mediante el Decreto 53/2001. La Rioja pretende potenciar una agricultura de calidad mediante la identificación de sus producciones en el mercado. A la agricultura ecológica y a la marca de garantía RC (Rioja Calidad) se suma ahora la Producción Integrada.

La Producción Integrada en el vino consiste en que la totalidad del proceso de producción tanto vitícola como enológico se realiza bajo conceptos ecológicos pero sin excluir la utilización de productos agroquímicos, los cuales son empleados racionalmente con el fin de obtener un producto sano a través de un proceso productivo que no afecte negativamente al medio ambiente (suelo, aire y agua) y la diversidad biológica. En España el viñedo se encuentra implantado, en algunas zonas, con carácter de monocultivo, en la que constituye su fuente de recursos económicos más importante, puede estimarse en más de 1200 millones de euros el valor medio anual de la uva para vinificación. La superficie de viñedo cultivada es alrededor de 1200000 hectáreas, de las cuales 1158000 hectáreas son de uva para vinificación, 38000 hectáreas para uva de mesa y 4000 hectáreas para uva de pasificación. Esto supone el 33.02 % de la superficie vitícola de la Unión Europea (3345000 hectáreas) y el 15.54 % de la superficie mundial. Sin embargo, con respecto a la producción europea de vino, solamente es el 16.64 % y respecto a la producción mundial el 10.74 %. En los últimos años, España ha pasado de una situación expedientaría, a una de relativo equilibrio entre producción y necesidades, debido fundamentalmente a la política de la Unión Europea y a la mejora cualitativa del viñedo, abandonándose la idea de una gran producción frente a una significativa mejora de las cualidades del vino. Es destacable la evolución del consumo de vino a nivel mundial. Se puede decir que se ha reducido el consumo de vinos corrientes y se ha incrementado el de vinos de calidad y ante una variada oferta de vinos, el consumidor opta por considerar atributos diferentes al exclusivo de la calidad organoléptica y contempla otros como la seguridad sanitaria o la elaboración respetuosa con el medio ambiente entre otros.

No se puede considerar por separado la lucha contra cada uno de los parásitos, sino que se debe tener una idea de conjunto de la protección

fitosanitaria de cada viñedo y ésta, además, entenderla incluida dentro del más amplio marco de una concepción global del cultivo, teniendo presentes sus intereses económicos y ecológicos.

La expresión "lucha integrada" es traducción de la inglesa "integrated control", que fue puesta en circulación con agrónomos y biólogos europeos y norteamericanos en la década de los años 50 para expresar la integración de la lucha química y de la lucha biológica.

"Lucha integrada contra plagas" ("integrated pest control"), "manejo integrado de plagas " ("integrated pest management") y "protección integrada de plantas" ("integrated plant protection") son expresiones que reflejan el cambio de matiz conceptual operado desde "lucha" hasta "manejo de plagas" o "protección de plantas".

El concepto de "lucha integrada" ha ido evolucionando y desde la definición de la FAO en 1967 como "sistema de protección contra los enemigos de los cultivos que, teniendo en cuenta el medio particular y la dinámica de las poblaciones consideradas, utiliza todas las técnicas y medios apropiados, de forma tan compatible como sea posible, con el objeto de mantener las poblaciones de plagas a niveles tales que sus perjuicios sean económicamente tolerables" ha sido sustituida (OILB/SROP, 1977) por la que se entiende como "un proceso de lucha contra organismos nocivos utilizando un conjunto de métodos que satisfagan las exigencias económicas, ecológicas y toxicológicas, dando un carácter prioritario a las acciones que fomentan la limitación natural de los enemigos de los cultivos y respetando los umbrales económicos del tratamiento".

La Directiva 91/414/CE la define como "la aplicación racional de un conjunto de medidas biológicas, biotecnológicas, químicas, de cultivo o de selección de vegetales de modo que la utilización de productos fitosanitarios químicos se limite al mínimo necesario para mantener la población de la plaga en niveles

inferiores a los que producirían daños o pérdidas inaceptables desde el punto de vista económico".

Como puede verse, la "protección integrada" se fundamenta en el conocimiento del medio ambiente y de la dinámica de las poblaciones de la biocenosis agraria, en la consideración del nivel o umbral económico de tratamiento y en la posibilidad de utilización de todas las técnicas y métodos apropiados para reducir las poblaciones de las plagas. Es la concepción actualmente más avanzada de protección fitosanitaria. Antes de llegar a ella se ha pasado por una serie de fases que se resume en:

- Lucha química indiscriminada, basada en un calendario de tratamientos, impuesto por la costumbre.

- Lucha aconsejada, siguiendo las informaciones de las Estaciones de Avisos.

- Lucha dirigida o razonada, con la introducción de umbrales de tolerancia económica y elección de plaguicidas según su repercusión ecológica.

- Protección Integrada, con el uso de todos los medios disponibles y limitación máxima e la lucha química.

La protección integrada ha surgido como respuesta al incremento de los tratamientos químicos y a la necesidad de limitar los efectos indeseables que conlleva el empleo de los plaguicidas, como pueden ser la aparición de nuevos parásitos (p.ej. en viña, los ácaros tetraníquidos), la intensificación del ataque de plagas ya existentes al actuar sobre los enemigos naturales, aparición de resistencias, aumento de los costes de la lucha química, y problemas de residuos de plaguicidas.

La protección integrada no desprecia la lucha química que, en el viñedo, actualmente es imprescindible, sino que limita su aplicación en los casos en que realmente es necesaria.

Antes de realizar la plantación debe comprobarse que las condiciones del medio son adecuadas para la plantación prevista y elegir tanto la variedad como el patrón procurando que su sensibilidad a los problemas fitosanitarios de la zona sea la menor posible. Se debe realizar una estimación del riesgo mediante un adecuado muestreo de las poblaciones de interés, así como determinar el umbral económico del tratamiento. A continuación se deben elegir los medios de protección adecuados: biológicos, culturales, genéticos, biotécnicos y químicos (estos últimos aplicados según los principios y recomendaciones mencionados).

Los productos fitosanitarios son recomendados por el Grupo de Trabajo de los Problemas Fitosanitarios de la Vid, que considera su toxicología, eficacia, efectos secundarios y residuos en uva. Sin embargo, la regulación normativa de su empleo en Producción Integrada corresponde a las autoridades competentes de cada Comunidad Autónoma.

6. ANÁLISIS DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS EN MUESTRAS AGROALIMENTARIAS

Disponer de la metodología analítica que permita la determinación de productos fitosanitarios es fundamental para obtener información necesaria sobre el nivel de residuos. Dado que las concentraciones en vinos son normalmente bajas, es necesario desarrollar métodos analíticos sensibles, seguros y precisos.

La introducción de nuevos plaguicidas, el incremento de su uso y la necesidad de controlar los residuos de estos compuestos han favorecido la mejora y la constante evolución de las metodologías analíticas utilizadas en su análisis. Los requerimientos crecientes de disminución de tiempo, costes y seguridad en las determinaciones conducen a la evolución de los métodos analíticos.

Los métodos analíticos aplicados a las determinaciones de los productos fitosanitarios en muestras enológicas (uvas, mostos y vinos) conllevan un primer proceso de tratamiento de muestra con una **extracción** de los compuestos de la

matriz y una **purificación** del extracto para posteriormente realizar la **determinación** de los mismos mediante diferentes técnicas, preferentemente cromatográficas (Angioni y col. 2005; Oliva y col. 2007).

6.1. Extracción

El método de extracción utilizado ha de ser el adecuado para la determinación conjunta de compuestos de variada polaridad en un rango de muestras cuyo contendido en agua, azúcares, grasas y otras sustancias es variable. Los métodos más utilizados, extracción en fase líquida, extracción en fase sólida y extracción con fluidos supercríticos, se explican a continuación.

6.1.1 Extracción en fase líquida

La extracción en fase líquida supone la transferencia de los analitos a determinar desde la matriz líquida o sólida a un disolvente orgánico de determinada polaridad, cuya elección influye en la eficiencia de la extracción. El modo por el cual se realiza la extracción también es importante, ya se trate de extracción por agitación mecánica, extracción tipo soxhlet, sistemas de temperatura y presión (extracción con disolventes presurizados –ASE- o con microondas) o desintegración de la muestra utilizando homogeneizadores de alta velocidad. En muchos casos, la simple agitación mecánica de la muestra en presencia del disolvente puede conducir a buenos resultados de extracción. Sin embargo, cuando se trata de extraer plaguicidas de tipo sistémico en matrices sólidas, es necesario recurrir a métodos más complejos.

Los disolventes que más se han empleado en el análisis de plaguicidas en muestras vegetales y otros alimentos han sido acetonitrilo, acetona y acetato de etilo. La ventaja de los dos primeros es su solubilidad en agua, por lo que el agente de extracción resulta en la mezcla de disolvente con el agua procedente de la muestra. Debido a su elevada polaridad, gran parte de la materia grasa permanece en la muestra sin extraer. Ambos disolventes presentan el problema de la dificultad de su eliminación, los extractos no pueden ser evaporados a sequedad directamente debido a su contenido acuoso, ya que algunos pesticidas podrían ser eliminados conjuntamente con el agua. Es por ello por lo que se

realiza un paso intermedio de partición líquido-líquido que, a la vez que permite la transferencia de los plaguicidas a un disolvente o mezcla de disolventes de bajo punto de ebullición inmiscible con el agua, realiza una purificación de determinados extractos. Para el análisis en uvas se han utilizado además de estos disolventes, otros como hexano, diclorometano y mezclas acetona / diclorometano (1:1) (Sala et al. 1997; Cabras et al. 2000b; Angioni et al. 2005; de Melo et al. 2006; Likas et al. 2007).

El método de extracción con acetonitrilo fue introducido por Mills y colaboradores en 1963 (Mills y col. 1963) y ha sido empleado con algunas modificaciones para la determinación de N-metil carbamatos, organoclorados y organofosforados (Hsu y col. 1991; Lagana y col. 1997); la separación de las fases acuosa y orgánica se consigue en estos casos por medio de la adición de NaCl o de tampón fosfato saturado con NaCl o mediante un paso intermedio de partición líquido-líquido en hexano previo a la purificación (Papadapoulou-Mourkidou y col. 1997; Fillion y col. 2000).

La acetona es más económica que el acetonitrilo, pero a la vez presenta más cantidad de especies coextraídas. El empleo de este disolvente y su aplicación en métodos multiresiduo fue propuesto por Luke y colaboradores en 1981 (Luke y col. 1981). Estos autores realizaban el paso de partición con una mezcla de éter de petróleo / diclorometano (1:1), una mezcla que proporciona las ventajas de ambos disolventes: el éter de petróleo es excelente para realizar una purificación previa del extracto en el análisis de plaguicidas no polares, ya que sólo los compuestos coextraídos de baja polaridad son transferidos al mismo junto con los pesticidas; el diclorometano es menos efectivo para la purificación pero permite el incremento en la recuperación de compuestos de polaridad más elevada que el éter de petróleo. El método de extracción de Luke es hoy en día uno de los métodos más utilizados. Para facilitar una buena mezcla de la muestra con los disolventes, se emplea un homogeneizador como *polytron* o *ultraturrax*. En ocasiones se sustituye el paso de la partición por una purificación en fase sólida (Fernández González y col. 2003; Rial Otero y col. 2003; Teixieira y col. 2004), o mejoran dicho paso mediante la adición de sales (Lee y Kwon 1999) o utilizando otros disolventes (Sannino y col. 1999).

Otro disolvente muy utilizado es el acetato de etilo, cuya principal ventaja es la de permitir eliminar el paso intermedio de partición, debido a su baja solubilidad en agua, de manera que la extracción se realiza de manera extremedamente rápida. Por otra parte. El empleo de este disolvente con la adición de sulfato de sodio anhidro (Leary 1971) a la muestra antes de la extracción permite mejorar las recuperaciones para plaguicidas polares. Como desventaja principal es el gran número de compuestos coextraídos para determinadas matrices (Lagana y col. 1997). El empleo de acetato de etilo como disolvente de extracción ha sustituido en muchos laboratorios de control de residuos al uso de acetona.

Para el análisis de plaguicidas en determinadas matrices sólidas y vegetales se utilizan también técnicas exhaustivas de extracción debido a las características de la muestra. Los sistemas de extracción clásicos que han sido más empleados son sohxlet y ultrasonidos (Greenberg 1981; Pérez Clavijo y col. 1996; Granby y col. 2004).

Recientemente se ha introducido una nueva técnica de extracción con líquidos denominada Accelerated Solven Extraction (ASE) o Extracción con Disolventes Presurizados, cuyo fundamento es similar a un soxhlet, empleando los disolventes líquidos convencionales a presiones y temperaturas elevadas, 1500-2000 psi y 50-200 ºC, respectivamente, para la extracción de plaguicidas en muestras sólidas de forma rápida y empleando menos cantidad de disolvente que en los métodos convencionales. En esta técnica, una cantidad de muestra del orden de 10 g se introduce en un recipiente de acero inoxidable junto con el disolvente, donde se le somete a un aumento de presión y temperatura durante un periodo de tiempo de 5 a 10 minutos. El aumento de presión y temperatura facilita la desorción del analito desde la matriz sólida al líquido de extracción. La principal desventaja es el requerimiento de un sistema especial que permita la presurización y el calentamiento, así como el control de ambos parámetros en el compartimento de la muestra. Una de las pricipales aplicaciones del sitema ASE ha sido en al análisis de plaguicidas en suelos y sedimentos (Berglof y col. 2000). Recientemente se están ampliando estas aplicaciones a otro tipo de

muestras como frutas y vegetales (Adou y col. 2001; Wennrich y col. 2001; Cho y col. 2008).

Otro sistema de extracción intensa es la extracción asistida por microondas (MAE). La aplicación de la radiación microondas para favorecer la extracción de compuestos orgánicos en diferentes matrices se viene empleando hace tiempo. Los principales factores que afectan a la extracción son temperatura, tiempo de extracción, cantidad de muestra y naturaleza y volumen del disolvente de extracción. Un aspecto importante es la realización de la extracción en sistemas abiertos o cerrados y se ha observado la eliminación del agua en sistemas abiertos por destilación, lo que hace más idóneo el sistema abierto para matrices con alto contenido en agua (Weichbrodt y col. 2000). Al igual que la técnica ASE, ha sido aplicada principalmente a suelos y sedimentos (Fuentes y col 2007; Wang y col 2007), pero también se ha utilizado en frutas y vegetales (Zheng 2004; Bouaid y col 2000).

El método de tratamiento más comúnmente utilizado para muestras líquidas es la **extracción líquido-líquido (ELL**) con disolventes orgánicos. Acetonitrilo, hexano, diclorometano, acetona o acetato de etilo son los más utilizados (Cabras y col. 1997; Oliva y col., 1999; Rial Otero y col. 2003; De Melo Abreu y col. 2005; Vaquero-Fernández y col. 2008). Los extractos se secan con sulfato sódico anhidro para eliminar los restos de agua. El proceso puede continuar con una concentración del extracto por evaporación del disolvente, que se suele realizar en rotavapor o en corriente de nitrógeno.

Para conseguir que el proceso sea satisfactorio, además de la selección adecuada de las condiciones técnicas de operación, la composición de las fases utilizadas desempeña un papel decisivo. Aunque se pueden emplear combinaciones de dos disolventes orgánicos inmiscibles, generalmente una fase es orgánica (la que permite la separación de los compuestos) y otra acuosa (suele ser la que inicialmente contiene las mezclas de compuestos a separar). Una vez realizada la extracción, el extracto es el que se utiliza en la determinación. La ELL en discontinuo (ELLd), consiste en un único equilibrio entre ambas fases. Los resultados obtenidos con esta técnica pueden mejorarse

modificando la relación de volúmenes, ya que esta variable actúa como factor multiplicativo de la relación de distribución.

La extracción está regida por la ley de distribución, propuesta por Berthelot y Jungfleisch y desarrollada por Nerst, la cual establece que en el equilibrio, la relación de solutos entre dos fases inmiscibles es constante, siempre que dicho soluto se encuentre en la misma forma en ambas fases (Cela y col. 2002).
Considerando el equilibrio:

$$A_{(a)} \Leftrightarrow A_{(o)}$$

donde A es el soluto distribuido entre la fase acuosa (a) y la orgánica (o), la constante que define este equilibrio se denomina constante de partición (o de reparto), K_d, y su expresión es:

$$K_d = \frac{(a_A)_o}{(a_A)_a}$$

siendo a_A la actividad del soluto en cada fase (que se relaciona directamente con la concentración, a través de los coeficientes de actividad). Para disoluciones diluidas, actividad y concentración coinciden. La constante es proporcional a la solubilidad relativa del soluto en ambas fases. La proporción de soluto extraído, depende no sólo de la constante de distribución, sino también de la relación de volúmenes de fase orgánica y acuosa.

Para realizar la extracción en discontinuo se utiliza un embudo de decantación, que es un recipiente, generalmente de vidrio, en forma de pera o cilíndrico. Se cierra al exterior con un tapón de vidrio o teflón situado en la parte superior y con una llave en la parte inferior. Su volumen debe ser dos o tres veces superior a la suma de los volúmenes de ambas fases, para que se pueda agitar adecuadamente el sistema. El tiempo que debe durar la agitación, es otro de los parámetros a optimizar en cada caso concreto, ya que depende del tiempo que tarda el sistema en alcanzar el equilibrio de distribución. El tiempo suele oscilar entre 30 segundos y 30 minutos. Si uno de los disolventes es muy volátil es necesario, durante la agitación, dejar escapar el exceso de presión invirtiendo el embudo y abriendo la llave. Cuando se alcanza el equilibrio, el sistema se deja en reposo hasta que las fases se separan, lo cual a veces puede

ser lento debido a que se forman emulsiones. El modo de recoger las fases una vez separadas dependerá de la densidad relativa de los disolventes utilizados.

Además de la extracción simple, también se utiliza la extracción por etapas, que consiste en realizar de modo secuencial un número determinado de extracciones simples retirando después de cada equilibrio la fase orgánica y poniendo en contacto la fase acuosa con un volumen nuevo de fase orgánica. Cuanto mayor es el valor de la constante de partición menor será el número de extracciones necesarias para conseguir la transferencia de los compuestos a la fase orgánica.

Esta metodología presenta las desventajas de emplear elevadas cantidades de disolvente, además de ser difícilmente automatizables. Otra desventaja es la del proceso de concentración para conseguir la sensibilidad requerida, que se puede evitar con la **microextracción líquido-líquido**. Esta técnica consiste en el empleo de bajos volúmenes de disolvente orgánico (del orden de microlitros) frente a la extracción líquido-líquido convencional. Para facilitar el paso de los analitos a la fase orgánica, la muestra acuosa se satura con sales, como puede ser el sulfato de sodio y fosfato amónico en determinada proporción (Sanz-Asensio y col. 1995). La elección del disolvente de extracción es importante, se han empleado disolventes como kaltron (1,1,2- triclorotrifluoroetano) o diclorometano, obteniéndose para algunos analitos bajos rendimientos de extracción, aunque estos se ven compensados sin embargo por la reproducibilidad del método y lo elevados factores de preconcentración que se obtienen. El empleo de disolventes de mayor polaridad o de mezclas da lugar a mejoras en la extracción de determinados analitos, como es el caso de mezclas de acetona / diclorometano o metil terbutil éter (Oliva y col. 2000; Forcada y col. 2000). Por otra parte el procedimiento global de extracción y análisis se realiza en un solo paso, de manera totalmente automatizada, otra ventaja frente a la extracción líquido-líquido convencional.

Una técnica de reciente desarrollo es la microextracción en una sola gota o "***single drop microextraction***" (SDME). Los analitos son extraídos por una gota de disolvente orgánico inmiscible con agua (1-3 µL) suspendida en la punta

de la aguja de una microjeringa dentro de la disolución. El proceso es asistido por agitación. Después de un tiempo, la gota se introduce en la jeringa para ser inyectada directamente en un sistema cromatográfico.

La SDME es un procedimiento muy atractivo porque es rápido (no necesita un preparación de muestra), económico, utiliza muy poco disolvente, no requiere un equipamiento sofisticado y elimina la posibilidad de contaminación entre muestras puesto que se utiliza una gota nueva fresca para cada extracción o muestra. Además, se consigue una alta concentración de los analitos al utilizar pequeñas cantidades de disolvente de extracción. Otras de las ventajas de esta técnica (frente a otras muy utilizadas como la microextracción en fase sólida o SPME) son la variedad de disolventes que se pueden utilizar, la posibilidad de utilizar distintas fases de extracción muy selectivas al combinar diferentes disolventes y la facilidad de cuantificar al introducir un patrón o estándar interno dentro de la propia gota (Romero y col. 2007). También es posible la introducción de un agente derivatizante en la gota. Está claro que la principal variable que se requiere optimizar en esta técnica es el tipo de disolvente. Otros parámetros a optimizar son el tiempo de extracción, la velocidad de agitación, el volumen de la gota, la posición de la gota, el volumen de muestra, la temperatura de extracción o la adición de sales. La SDME también puede funcionar en modalidad de espacio de cabeza (*head space*) o HS-SDME, en el caso de extracción de compuestos volátiles, además del modo de inmersión directa anteriormente comentado (DI-SDME). Esta técnica se ha utilizado recientemente para el análisis de pesticidas organofosoforados en agua y frutas, en éstas con una previa trituración y filtración y suspendiendo la gota en el jugo obtenido (Xiao y col 2007). También se ha utilizado la SDME para el análisis de diferentes clases de pesticidas (Amvrazi y Tsiropoulos 2008) y pesticidas organoclorados en vegetales (Zhang y col 2008) y vino (Liu y col 2006).

6.1.2 Extracción en fase sólida

La **extracción en fase sólida (SPE)** (Wong y col. 2003; Pang y col. 2006*;* Jiménez y col. 2007) y la microextracción en fase sólida (SPME) (Correia y col. 2000; Zambonin y col. 2004; Ravelo Pérez y col. 2007) son técnicas de

extracción que están tomando importancia en los últimos años. Los actuales esfuerzos por reducir el uso de disolventes orgánicos han facilitado que la Extracción Líquido-Líquido se sustituya en muchos casos por la Extracción en Fase Sólida o SPE (*Solid Phase Extraction*). Además de esta ventaja, la SPE presenta otras respecto a la ELL (Fritz 1999):

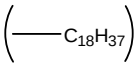
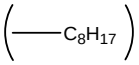
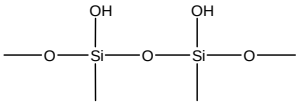
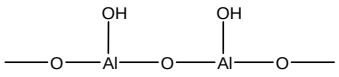
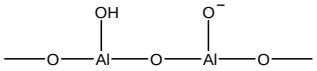
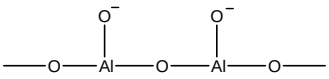
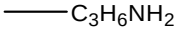
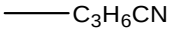
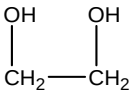
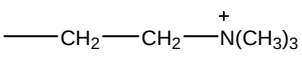
- Aumento del área de contacto entre fase y muestra lo que conlleva una mejor transferencia de materia.
- Una separación más fácil y rápida.
- Tienen lugar múltiples equilibrios.
- Mayor especificidad.
- Tiempos de análisis más cortos.
- Mayor automatización del proceso
- Posibilidad de trabajar on-line con técnicas cromatográficas

La SPE se lleva a cabo pasando una disolución que contiene los analitos sobre una fase sólida que retiene específicamente a esos analitos. En la Tabla I-1 se recogen las diferentes fases sólidas que se clasifican atendiendo a diferentes características químicas: polar y no polar; ácida, neutra o básica; hidrófila o hidrófoba y con afinidad catiónica o afinidad aniónica.

La fase sólida puede estar depositada en cartuchos, columna o discos de extracción. Los discos presentan una mayor superficie de adsorción que las columnas o los cartuchos pero no hay una tendencia especial al empleo de uno u otro soporte.

El soporte de la fase sólida puede ser desde un disco de papel de filtro químicamente modificado de unos pocos centímetros de diámetro, hasta el relleno de una pequeña columna; con forma de cartucho tubular de la forma de una jeringuilla hipodérmica o de un pequeño embudo. Se necesitan superficies grandes para retener elevadas cantidades de analito, de manera que la cantidad de fase sólida para la extracción depende tanto del volumen de muestra como de la cantidad de analito presente. Si la cantidad de fase sólida es demasiado pequeña, parte de analito puede pasar sin ser retenido. Esto se denomina *ruptura*.

Tabla I-1: *Fases sólidas para SPE*

Nombre	Identidad Soporte	Características
Octadecil		Hidrófoba, no polar
Octil		Hidrófoba
Sílice		Hidrófila, polar, neutra
Florisil	Silicato magnésico	Hidrófila, polar, básica
Alúmina A (ácida)		Hidrófila, polar, ácida, afinidad catiónica
Alúmina N (neutra)		Hidróflila, polar, neutra
Alúmina B (básica)		Hidrófila, polar, afinidad catiónica
Aminopropil		Hidrófila, polaridad moderada, afinidad catiónica, básica
Cyanopropil		Hidrófoba, casi no polar, neutra
Diol		Hidrófoba, casi no polar, neutra
Estireno divinilbenceno	Polímero de estireno divinilbenceno	Hidrófoba, neutra
Afinidad aniónica		Hidrófila, afinidad aniónica

El proceso de la SPE se puede dividir en cuatro etapas principales: acondicionamiento, retención de analitos, lavado y elución (Figura I-18):

1. *Acondicionamiento o activación.* Antes de llevar a cabo la retención de los analitos, la fase sólida se debe preparar y hacer compatible con la matriz de la muestra. Sin este pretratamiento la muestra puede fluir por canales a través de la fase sin tener prácticamente contacto con ésta. El acondicionamiento de la fase sólida requiere la adición de uno o varios disolventes que promuevan un mejor contacto superficial entre ambas fases. Según la fase sólida a utilizar se requieren unos u otros disolventes e incluso en algunos casos esta etapa no es necesaria.

2. *Retención de analitos*. Se adiciona la muestra pasando ésta a través del cartucho con ayuda de vacío. La velocidad o flujo de paso a través de la fase sólida debe ser lenta y constante para facilitar una retención óptima. El volumen máximo que se puede adicionar viene marcado para cada aplicación y condiciones de uso. El paso de la muestra se hace lentamente utilizando émbolos o sistemas de vacío que provocan una presión determinada. El flujo de paso de la muestra, puede afectar la retención de los compuestos. Generalmente, éste no suele exceder de 5 mL min^{-1}.

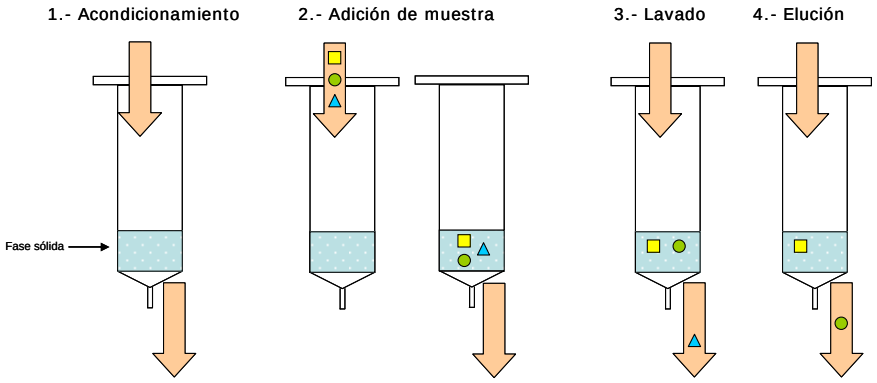


Figura I-18: *Etapas de SPE*

3. *Lavado*. Una buena elección del disolvente de lavado permite eliminar interferencias provenientes de la matriz retenidas en la fase junto con los analitos. Normalmente se usa agua con una pequeña proporción de disolvente orgánico (entre 5-20%) con el fin de poder eliminar todo tipo de interferencias, tanto orgánicas como inorgánicas, sin eluir parcialmente los analitos (de ahí que el contenido en disolvente orgánico no deba superar dicho porcentaje).

4. *Elución*. Los analitos retenidos se eluyen, normalmente, con una pequeña cantidad de disolvente orgánico siendo éste más adecuado para medidas analíticas. Debido a que en las etapas anteriores se han pasado por el cartucho disoluciones acuosas, en la elución pueden coexistir dos fases, acuosa y orgánica. Por ello, antes de eluir los analitos, se suele proceder al secado de la fase sólida mediante vacío o corriente de nitrógeno con el fin de eliminar los posibles restos de agua presentes en el cartucho. Es importante elegir el eluyente adecuado ya que debe eluir los analitos completamente de la fase sólida usando el menor volumen posible (Fritz 1999).

La fase sólida mas universal es octadecil o C_{18}. Otras fases utilizadas con buenos resultados para el análisis de plaguicidas son carbón poroso (CARB GR), poliestireno-divinilbenceno (LiChrolut® EN) y polidivilbenceno-co-N-vinilpirrolidona (Oasis®) (Jiménez y col. 2006; Molina Mayo y col. 200 7). Otras fases sólidas que han sido utilizadas en el tratamiento de muestras acuosas y que no están basadas en sílice, son las resines XAD (Louter y col. 1993). La retención de los analitos en los materiales de la SPE es debida, principalmente, a fuerzas de atracción de Van der Waals o fuerzas de dispersión.

Los disolventes más utilizados como eluyentes para uvas, mosto y vino son acetato de etilo, hexano, diclorometano y acetona (Jiménez y col. 2001; Melo y col. 2004; Vigna y col. 2006; Jiménez y col. 2007).Con la SPE se han evitado problemas como la incompleta separación de fases y la utilización de material más frágil y caro, como en el caso de la ELL que está siendo desplazada, en la mayoría de los casos, por nuevas técnicas.

La extracción en fase sólida resulta eficiente para su aplicación en los métodos de determinación de un amplio rango de compuestos en matrices sólidas con un contenido en agua medio-alto. En estos métodos la muestra se mezcla con una fase y los residuos se extraen por elución con disolvente orgánico en una columna cromatográfica o jeringas de plástico. Es lo que se conoce como **dispersión de matriz en fase sólida** (Matrix Solid Phase Dispersión - MSPD (Torres y col., 1995; Kristenson y col. 2006; García-Reyes y col. 2007, Bin-Liu y col 2007). Las fases sólidas dispersantes más empleadas son octadecilsilano, mientras que los eluyentes que más se utilizan son acetato de etilo o diclorometano. Se suele depositar la mezcla de muestra y fase sobre un lecho de florisil para permitir la purificación del extracto simultáneamente al eluir con el disolvente (García López y col 2008). Se han estudiado las distintas fases dispersantes C_{18}, C_8, C_2 y CN así como la mezcla con otras fases más polares (sílice, alúmina y florisil) para realizar una purificación de los extractos en extracción de plaguicidas en muestras vegetales (Torres y col. 1996), obteniendo los mejores rendimientos de extracción y una mayor pureza en los extractos con la mezcla de C_{18} y sílice. Anastassiades y col. (2003) desarrollaron una nueva técnica rápida y sensible para el análisis multiresiduo de plaguicidas en frutas vegetales basado en una extracción con acetonitrilo y sales (sulfato de magnesio), seguido de una dispersión con fase sólida PSA (amina primaria secundaria) y GCB (carbón grafitizado). Es lo que se conoce como QuEChERS ("Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Las cantidades de muestra y fase se reducen hasta gramos (0.5 a 2 g) y de disolvente hasta unos poco mililitros (10 mL). Se han publicado muchos métodos modificados basado en el QuEChERS (García-Reyes y col. 2007; Payá y col. 2007; Lesueur y col. 2008).

La **microextracción en fase sólida (SPME**) es una técnica de equilibrio que está basada en el reparto del analito entre la fase extractante, inmovilizada en una fibra de sílice fundida, y la matriz de la muestra. La desorción de los compuestos puede llevarse a cabo por efecto de la temperatura (desorción térmica) o por elución con disolventes (Pawliszyn y Arthur 1990).

Las principales ventajas de esta técnica son su simplicidad, "bajo coste", eliminación de consumo de disolventes orgánicos (menor impacto ambiental y menor riesgo para el analista), mayor poder de automatización y rapidez en la extracción comparada con las técnicas anteriores

En esta técnica, una pequeña proporción de fase de extracción dispersa en un soporte sólido se expone a la muestra por un periodo de tiempo definido, pasado el cual se produce un equilibrio entre las distintas fases. El número de fases que intervienen en el equilibrio son tres (matriz o muestra, fibra y fase gas) en el caso compuestos volátiles donde la fibra se expone en el espacio de cabeza (o *head space*), o dos si se trabaja en la modalidad de inmersión directa de la fibra en la disolución. Según los equilibrios de distribución del analito en las tres fases y los balances de materia se llega a la siguiente ecuación:

$$n_{fibra} = \frac{K_2 V_F V_L}{K_2 V_F + K_1 V_G + V_L} C_0$$

donde n_{fibra} es la cantidad de analito en la fibra, K_1 y K_2 son las constantes de equilibrio entre fase líquida y gas (en caso de *head space*) y la fibra y la fase líquida, V_L y V_F y V_G son los volúmenes de la fase líquida , de la fibra y de la fase gaseosa; y C_0 es la concentración inicial de analito en la matriz o muestra.

La masa extraída en la fibra es proporcional a la concentración inicial del analito, cuando se mantienen constantes los volúmenes de las fases. Además, la posición de la fibra en el sistema no influye en la cantidad extraída en el equilibrio. Al aumentar el volumen de muestra, aumenta la cantidad de analito extraída hasta alcanzar un valor a partir del cual la cantidad extraída no depende del volumen de muestra.

La SPME puede acoplarse a varios tipos de técnicas analíticas, CG y HPLC y se aplica a una variedad amplia de compuestos, tanto polares como no polares, en muestras gaseosas, líquidas o sólidas, especialmente para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles. Sin embargo, el instrumento más utilizado con SPME es el cromatógrafo de gases, con el que se utilizan fibras comerciales.

La fibra propiamente dicha es una fase estacionaria de polímeros unida a una varilla adjunta, con una cubierta protectora. Ésta se inserta en una jeringa diseñada con un sistema de émbolo que le permite ser introducida y sacada, y que además es posible reutilizar y reemplazar. Hay varios tipos de fibras comerciales y su utilización depende del tipo de compuesto seleccionado. La afinidad de la fibra por el analito en estudio es función de la polaridad de ambos. En general, los compuestos volátiles requieren un polímero más denso que otros compuestos menos volátiles. Con estos polímeros más densos, el proceso es de adsorción, ya que los analitos quedan en la capa superficial del polímero. Además, las fibras con rellenos más densos requieren más tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción, pero tienen mayor sensibilidad. En el caso de que el polímero sea menos denso, los analitos penetran también en los poros de éste, produciéndose un proceso de adsorción y absorción simultáneamente. Por este motivo, es habitual encontrar en la bibliografía ambos términos.

Las fibras están compuestas de diversas sustancias orgánicas, principalmente polímeros, y antes de utilizarlas debemos “acondicionarlas” para retirar todo tipo de contaminantes. Para ello, se introducen en el inyector el tiempo que determine el fabricante y a la temperatura señalada por éste, de forma que se eliminen los residuos que puedan estar adheridos a la fibra.

Sin embargo, las fibras tienen el inconveniente de ser frágiles y se rompen fácilmente, incluso pueden estropearse o dañarse con la inserción y agitación. Además, compuestos de elevado peso molecular, como son las proteínas, se pueden adsorber irreversiblemente, cambiando así las propiedades de la fase estacionaria, volviéndola inutilizable. La vida media de la fibra es aproximadamente de 100 extracciones, dependiendo de la matriz y del tipo de extracción utilizado, ya sea por espacio de cabeza o por inyección directa, en la que la fibra dura para un menor numero de extracciones.

La fase estacionaria actúa de esponja concentrando los analitos orgánicos de la matriz en su superficie durante la adsorción y los cuales posteriormente serán desorbidos para ser analizados (Figura I-19). La muestra se coloca en un vial, el cual está tapado con un séptum. Cuando la jeringa de SPME perfora el séptum y

la fibra entra en el vial es cuando se establece el equilibrio entre las distintas fases (matriz, fase gaseosa y fibra), una vez adsorbidos los analitos en la fase de la fibra, ésta se extrae y se lleva al inyector del cromatógrafo donde una vez introducida la fibra son desorbidos los analitos (Figura 1-20).

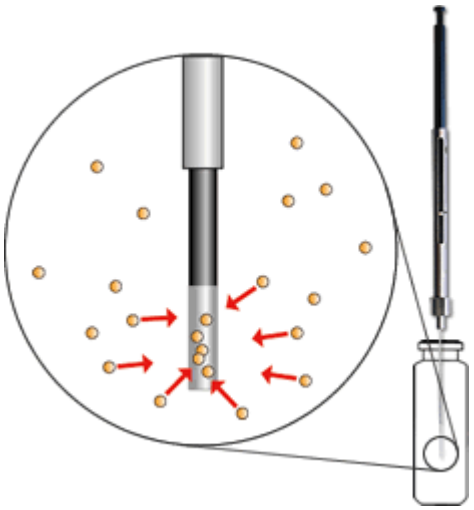


Figura I-19: *Diagrama de SPME (tomada de www.labhut.com)*

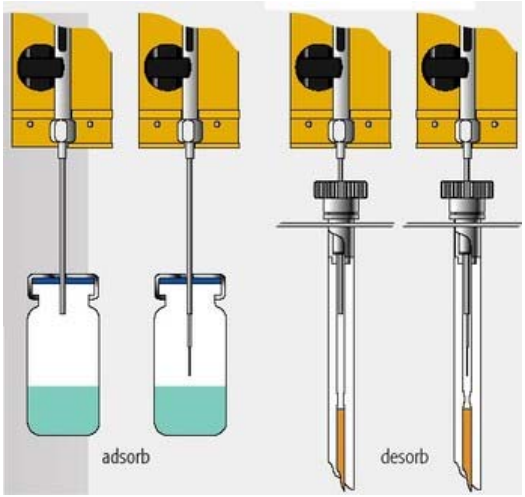


Figura I-20: *Procesos de absorción y desorción en HS-SPME (tomada de www.brechbuehler.com)*

La temperatura de desorción es aproximadamente igual al punto de ebullición del compuesto menos volátil, y el tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y de la proporción de flujo del gas portador alrededor de la fibra. La fibra se inserta en el inyector del cromatógrafo de gases y los analitos son volatilizados y transportados a la columna cromatográfica.

Tal y como se ha comentado anteriormente existen dos modos principales de emplear la fibra: espacio de cabeza (HS-SPME) e inmersión directa (DI-SPME). En espacio de cabeza la fibra no entra en contacto con la disolución (Figura I-21A), sólo se expone a la fase de vapor o gaseosa de la muestra y en la inmersión directa, la fibra se introduce directamente en la disolución (Figura I-21B).

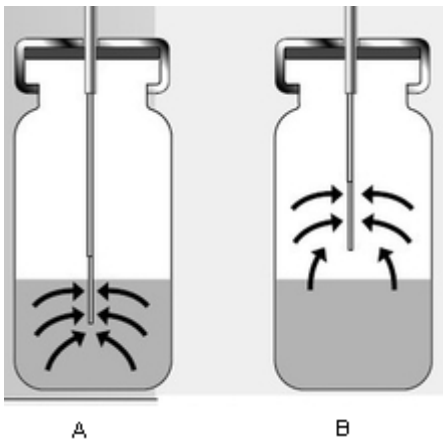


Figura I-21: *Modos de SPME: A) Inmersión directa B) Espacio de cabeza(tomada de www.brechbuehler.com)*

La eficacia de cada una de estas técnicas depende de las propiedades de los analitos y de la matriz de la muestra. En general DI-SPME es más sensible que HS-SPME pero para los analitos más volátiles se utiliza HS-SPME ya que de lo contrario, los compuestos no volátiles se concentran en la fibra y reducen su vida media así como la reproducibilidad de la extracción

Esta técnica de reciente utilización está dando buenos resultados en el análisis de plaguicidas en matriz acuosa. La extracción de fungicidas en mosto y/

o vino se realiza de forma directa por inmersión de la fibra en la matriz puesto que los compuestos a extraer poseen volatilidad media o baja. El proceso está asistido por agitación para favorecer el equilibrio de los analitos desde la disolución a la fase de la fibra. Los tipos de fibras para la extracción de plaguicidas en mosto y vino que más se utilizan son polidimetilsiloxano (PDMS) (Correia y col. 2001), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) (Millán y col. 2003) y poliacrilato (PA) (Zambonin y col. 2004).

Recientemente un nuevo método de extracción en fase sólida, ha sido introducido en el análisis de compuestos orgánicos en matrices agroalimentarias. La técnica se conoce como extracción por absorción sobre barra agitadora o "***stir bar sorptive extraction***" **(SBSE)**. Utilizando una varilla de agitación recubierta con una fase de silicona, los compuestos orgánicos pueden ser extraídos de muestras acuosas.

Su aplicación es muy sencilla, pues basta con introducir la barrita en la matriz que se desee analizar para que los compuestos sean retenidos por el absorbente, posteriormente estos se liberan por desorción térmica y se analizan mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Las características de la SBSE son similares a las de la SPME, pero tal como señalaron Baltussen y col. (1999), al tener una mayor superficie extractiva permite una sensibilidad 100 veces superior a la SPME. Estos imanes, comercializados con el nombre de Twister™ (Figura I-22), se componen de un imán encapsulado en una funda de vidrio que a su vez está recubierta por una capa de 55 o 219 μL de PDMS según se usen imanes de 10 o 40 mm de longitud. Se consiguen altos valores de sensibilidad, con límites de detección del orden de 0.1 ng L^{-1} (en muestras líquidas). La sencillez de la preparación de la muestra es otra característica fundamental. El secado tras el muestreo de un líquido es sencillo y rápido (Esteban 2003). Los imanes de 4 cm se suelen utilizar con volúmenes de muestra comprendidos entre 100 y 250 mL, mientras que los de 1 cm se utilizan con volúmenes comprendidos entre 1 y 50 mL.

Se trata de una técnica automatizable en GC, existe un sistema de desorción térmica comercial de la casa Gerstel). Los parámetros a optimizar son análogos

a los de la SPME. Aunque la SBSE está especialmente diseñada para inmersión directa, también se puede trabajar en el modo espacio en cabeza en cuyo caso recibe el nombre *de head space sorptive extraction* (HSSE). En esta aproximación, la barra magnética se puede mantener suspendida en el espacio en cabeza mediante un hilo metálico que atraviese el septum (Hernández Borges y col 2005). Sin embargo, el modo de inmersión es el que más aplicación tiene en el caso de la determinación de pesticidas en uvas y otras frutas, con una extracción previa con disolventes (Wennrich y col. 2001; Ochiai y col. 2005, Juan-García y col. 2004); en mosto, y en vinos (Sandra y col. 2001; Hoyasaka y col 2003; Guan y col. 2007).

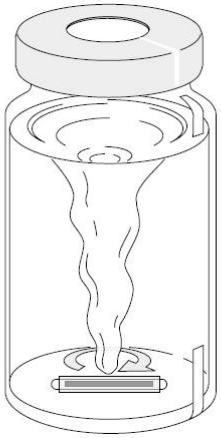


Figura I-22: *Dispositivo de extracción por absorción sobre barra agitadora (tomado de Esteban 2003).*

6.1.3 Extracción con fluidos supercríticos

La **extracción con fluidos supercríticos (SFE)** es una técnica de extracción sólido-gas. El fluido que se emplea como agente extractante es un gas, el cual se encuentra en determinadas condiciones de presión y temperatura en las que su estado físico no es propiamente ni líquido ni gasesoso, sino que posee las propiedades de ambos. Un fluido supercrítico se caracteriza por tener el poder de penetración de un gas a la vez que la solubilización de un líquido, éste debe ser inerte y las condiciones de presión y temperatura para la

obtención de un estado supercrítico no deben ser elevadas. El gas que más se emplea en SFE es el CO_2, debido a que se puede obtener fácilmente, es barato, no reactivo y presenta bajos puntos de presión y temperatura críticos. Sin embargo, se han utilizado otros gases como el trifluorometano en la extracción de plaguicidas organofosforados y nitrogenados (Hillman y Bachmann 1995). Las condiciones de presión y temperaturas deben ser optimizadas. El control de ambos parámetros proporciona un determinado grado de selectividad pudiendo, en algunos casos, elimiarse la coextracción de compuestos no deseados. Otro factor a tener en cuenta al realizar la selección de las condiciones críticas para la extracción es la posibilidad de degradación de determinados analitos en determinadas condiciones. Esto puede ser debido a la pequeña presencia de oxígeno en los recipientes de extracción y la reactividad del mismo a las condiciones supercríticas. Se puede evitar haciendo pasar un gas inerte antes de la introducción de muestra.

El agua puede causar a menudo problemas en la extracción con fluidos supercríticos dado que puede formar hielo en el sistema o arrastrar los analitos polares con mayor afinidad por la fase acuosa. Este problema se presenta en el análisis de plaguicidas en muestras de fruta y vegetales. Las soluciones que se han propuesto son varias: realizar la extracción sobre muestras liofilizadas o emplear un material que retenga los restos de agua y permita al mismo tiempo la dispersión de la muestra. Se han utilizado materiales como las tierras de diatomeas (Letohay y Eller 1995), sulfato de magnesio anhidro (Mendiola y col 2007) o polímeros (Kaihara y col. 2000).

A pesar de sus ventajas frente a otros gases de extracción, el dióxido de carbono no es muy adecuado para compuestos polares y es inefectivo cuando las interacciones matriz-analito son fuertes. Un método empleado para eliminar estos inconvenientes es la adición de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos y modificadores. El disolvente más utilizado es el metanol (Cho y col. 2008), aunque también han sido utilizados acetona y acetato de etilo. El método más sencillo es introducir el modificador es la inyección de la cantidad determinada en el interior de la celda de extracción cuando se trata de una

extracción estática. En el caso de una extracción dinámica es preferible la adición mediante bombeo.

Una vez los plaguicidas han sido extraídos de la matriz por el fluido supercrítico, son recogidos en una trampa que puede ser un líquido sobre el que se hace borbotear el gas efluente del sistema o un sólido que retenga los analitos que posteriormente han de ser eluidos empleando un disolvente adecuado. En el caso de emplear trampas líquidas, se debe tener en cuenta el posterior tratamiento del extracto así como las características de los analitos a determinar. De este modo, se ha empleado agua (López-Avila y col. 1996) para la retención de plaguicidas organoclorados en suelos. Sin embargo, tienen más aceptación como trampa las fases sólidas que la retención de un líquido. La fase más utilizada es la C_{18} (Mendiola y col 2007).

6.2. Purificación

La mayoría de los métodos de extracción citados no son selectivos únicamente para los compuestos que se desean determinar; al contrario, al tratarse de métodos multiresiduo, la extracción se realiza de manera que cubra un intervalo de polaridades elevado, con lo que al mismo tiempo que se extraen los analitos otros componentes de la matriz son extraídos; estos componentes pueden posteriormente interferir en el análisis. El paso intermedio de purificación se realiza para eliminar aquellas sustancias coextraídas, siempre y cuando el sistema de detección que posteriormente se empleará en la determinación no sea lo suficientemente selectivo para que dichas especies no interfieran en el análisis. De hecho muchos autores eliminan el paso intermedio de purificación (o también llamado "*clean up*") cuando la determinación posterior se realiza con espectrometría de masas, al poder seleccionar los iones de masa específica para cada especie a determinar simplificando de esta manera el método global de análisis multiresiduo, que suele ser bastante complejo. Sin embargo, el paso intermedio de purificación puede ser recomendable no sólo por la eliminación de interferencias, sino también por la mayor limpieza de las

muestras finales en los sistemas de determinación, con lo que se consigue un mejor mantenimiento del mismo.

La **cromatografía de adsorción** se basa en el mismo principio que la extracción en fase sólida, se trata de retener los compuestos de interés sobre un sólido adsorbente, mientras que la mayor parte de los compuestos coextraídos pasan a través de la columna de purificación. Los compuestos retenidos son posteriormente eluídos con un disolvente o mezcla de disolventes adecuados. La elección del sólido adsorbente se llevará a cabo en función de la naturaleza de la matriz y de los analitos a determinar.

El florisil es uno de los adsorbentes más utilizados para la purificación de extractos en el análisis de pesticidas (Ferrer y col 2005; Araoud y col 2007; Chen y Chen 2007; Sharif y col 2007), pero dependiendo del tipo de analitos y de la posterior determinación se han empleado otras fases: C_{18} en extractos de frutas y vegetales (Lal y col 2008); sílice para la purificación de extractos de frutas y vegetales (Navarro y col. 2002) o alúmina para el análisis de organofosforados y organoclorados (Yagüe y col 2005); o columnas de charcoal-celite para la purificación de N-metilcarbamatos en extractos vegetales (Nunes y col 1998). También se han empleado otras fases más específicas como pueden ser fases enlazadas con grupos amino, con las que se han obtenido buenos rendimientos de eficacia de purificación de muestras vegetales para el análisis multiresiduos QuEChERS con PSA como sorbente (Díez y col 2006; Martínez-Galera y col. 2008). Otra fase utilizada para pesticidas organoclorados es el negro de carbón (Barriada-Pereira y col 2007). La realización de varios pasos de purificación empleando fases diferentes también es una práctica común. Por ejemplo, se ha utilizado carbón grafitizado no poroso (GCB, fase reversa) seguido de una mezcla de intercambiador fuerte (SAX, una amina cuaternaria)y débil de aniones (PSA) para la determinación de 25 pesticidas de diferentes clases en lechuga, melocotones y trigo (Balinova y col. 2007); o también una combinación de carbón con una segunda etapa de grupos diol para el análisis de 35 pesticidas en olivas y aceites de oliva (Amvrazi y Albanis 2006).

El empleo de la **cromatografía de permeación en gel** (GPC) para la purificación de extractos de variada naturaleza es una de las técnicas más utilizadas en métodos multiresiduos. El tipo de relleno de la columna es generalmente geles de poliestireno, más conocidos como biobeds S-X2 o SX3. La separación en este caso se produce por diferencias en el peso molecular, discriminando de manera eficiente las moléculas relativamente pequeñas, como pueden ser los plaguicidas de otras especies coextraidas de mayor peso molecular, ya que estas últimas atraviesan la columna a mayor velocidad al no ser ralentizadas en los poros de la fase sólida. La principal ventaja de este método es que no se producen pérdidas de plaguicida por las adsorciones en la fase, aunque, dependiendo de la naturaleza del extracto la purificación puede no ser totalmente completa y puede ser necesario realizar posteriormente otro tipo de purificación más selectivo. Así, se han determinado 65 plaguicidas en matrices vegetales grasas (como avocado) purificando los extractos procedentes de ASE con una columna de GPC (Fernández-Moreno y col 2006); y también se ha aplicado una extracción con disolvente orgánico y adición de sales, seguido de una purificación con GPC para el análisis de 32 pesticidas en olivas (Guardia-Rubio y col 2007).

La **cromatografía líquida** también se ha utilizado como técnica de purificación de extractos. La técnica se ha aplicado a matrices grasas con columnas de fase normal, dada la eficiencia de ésta para la eliminación de grasas (Hernández y col. 2002).

6.3. Determinación

Las técnicas de análisis que se emplean en método multiresiduos deben cumplir unas características determinadas, deben permitir la separación, cuantificación y confirmación de un elevado número de compuestos generalmente en bajos niveles de concentración. Las técnicas cromatográficas permiten realizar este tipo de determinaciones. La posibilidad de acoplamiento de dichas técnicas con detectores más o menos selectivos cubre la casi totalidad de materias activas empleadas como plaguicidas y presentes en el mercado.

Dentro de las técnicas cromatográficas utilizadas en métodos analíticos cabe destacar la cromatografía gas-líquido o cromatografía de gases (GC). La mayor parte de los compuestos empleados como plaguicidas presentan unas características adecuadas para ser analizadas con esta técnica, ya que son fácilmente volatilizables a las temperaturas de trabajo y pueden ser detectados por medio de detectores específicos. Sin embargo, no todos los plaguicidas presentan estas características, ya sea por un elevado punto de ebullición, por elevada polaridad, o por ser térmicamente inestables, en cuyo caso la determinación se realiza por medio de otras técnicas cromatográficas, principalmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

6.3.1 Cromatografía de gases

En cromatografía gaseosa, la muestra se inyecta y se volatiliza pasando posteriormente a través de una columna cromatográfica. La elución por dicha columna se produce por el flujo de una fase móvil, en este caso un gas inerte. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. De los distintos tipos de cromatografía de gases que se pueden utilizar destacar la cromatografía gas-sólido y la cromatografía gas-líquido siendo ésta última la de mayor aplicación. La cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte o bien sobre la pared de la columna cromatográfica en columnas.

Los componentes básicos de un instrumento para la cromatografía de gases se muestran en la Figura I-23.

Los gases portadores más utilizados son: N_2, H_2, He, Ar/CH_4. La elección de los gases está con frecuencia determinada por el tipo de detector que se utiliza. No debe ser reactivo ni con el analito ni con la fase estacionaria, tampoco deber ser tóxico ni explosivo (excepto H_2).

En cromatografía gaseosa, los parámetros más importantes que afectan a la determinación son el sistema de inyección, la columna cromatográfica y el sistema de detección.

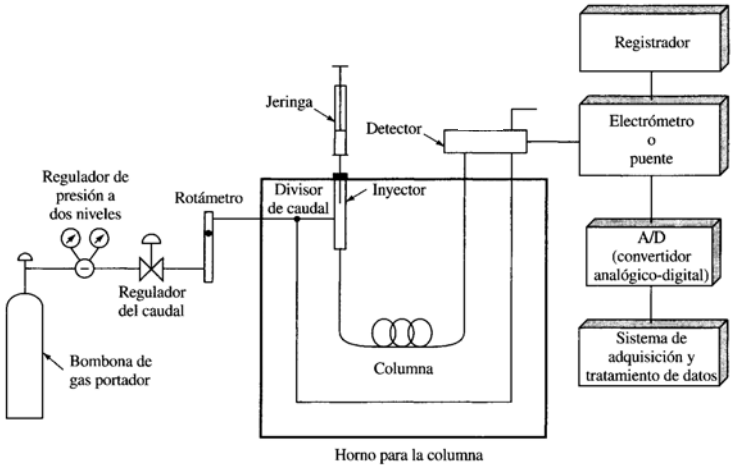


Figura I-23: *Cromatógrafo de gases (tomada de Skoog y col. 2001)*

En el portal de inyección la muestra se introduce de forma puntual y a través de un septum. La inyección de la muestra puede ser de dos maneras:

- Inyección con división de flujo (*split*): se trata de una inyección en la que la muestra se divide o fracciona. Una vez inyectada la muestra, se la muestra y se conduce a la zona de división de flujo en la que se divide en dos fracciones: la fracción mayor es enviada al exterior y la más pequeña es enviada a la columna. La relación entre ambas fracciones se denomina "relación de flujos o relación de *split*" y se controla con válvulas de división.

- Inyección sin división de flujo (*splitless*): es un método sin división de la muestra, empleando el mismo portal que en *split* pero cerrando la válvula que controla la división y toda la muestra inyectada pasa a la columna. Esta modalidad permite mayores sensibilidades introduciendo una mayor cantidad de muestra en la columna. Como inconvenientes hay que destacar el efecto del

disolvente, el cual puede solaparse con compuestos muy volátiles o producir ensanchamiento de las señales por lo que es adecuado establecer una temperatura inicial de la columna 10°C menor que el punto de ebullición del disolvente.

La cromatografía de gases aplicada a la determinación de residuos de plaguicidas utiliza principalmente inyección en modo sin división de flujo. Este tipo de inyección en modo splitless puede ser problemática para el caso de algunos plaguicidas polares o térmicamente inestables, ya que las superficies de vidrio activas en el inyector, a temperaturas elevadas pueden producir pérdidas de señal cromatográfica, ya sea debido a fenómenos de adsorción o a catalización de la degradación por dichas superficies.

Para solventar estos problemas, se pueden emplear otros sistemas de inyección. El inyector *on column* permite la deposición de la muestra directamente en la columna cromatográfica. Sin embargo, este sistema de inyección precisa de extractos muy purificados, ya que las impurezas se van depositando en la columna cromatográfica, disminuyendo la sensibilidad y la eficacia de la separación.

Otro sistema de inyección que permite la programación de la temperatura de la misma es el inyector a temperatura programable o PTV. Este sistema permite realizar la volatilización escalonada de los componentes de la mustra, de manera que los compuestos más pesados pueden quedar retenidos en el inyector, disminuyendo su entrada en columna y minimizando la contaminación de la misma, mientras que, los compuestos más volátiles o el disolvente de muestra pueden ser eliminados a través de la válvula de split. Este sistema se utiliza para realizar la inyección de volúmenes de muestra elevados, lo que incrementa la sensibilidad del método.

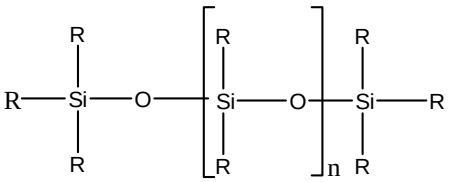
Otro sistema desarrollado recientemente es el inyector EPP “Electrinic Pressure Programmed” con el que se consigue eliminar los problemas de adsorción y degradación en el interior del inyector, al realizarse la inyección a presión elevada, con una rápida introducción de muestra que puede ser total (en

el modo splitless) o parcial (en modo split) y un mínimo contacto con las superficies del vidrio.

Debido principalmente a la eficacia de las columnas capilares y a la disminución de la velocidad relativa del análisis respecto a las columnas empaquetadas, la amplia aceptación de las primeras ha sido unánime a partir de su aparición. La gran ventaja de este tipo de columnas es la obtención de picos estrechos y altos por lo que los residuos de plaguicidas pueden ser determinados con una mejora de la sensibilidad.

En cuanto a la columna, existen varios tipos pero las más utilizadas son las columnas tubulares abiertas (capilares). En ellas, la fase estacionaria es una película uniforme de líquido de unas pocas décimas de micrómetro de espesor (entre 0.1 y 5 µm) que recubre el interior del tubo capilar. Esta fase, como se ha explicado anteriormente se encuentra en estado líquido, favoreciendo mecanismos de reparto. Existen numerosas fases para un mismo analito clasificadas por su polaridad. Aún así con sólo seis líquidos, que son los más frecuentemente usados, se pueden proporcionar separaciones satisfactorias para el 90% de las muestras.

Cinco de los líquidos son polidimetilsiloxanos que tienen la siguiente estructura general:



En el polidimetilsiloxano, los grupos –R son todos $–CH_3$ originando un líquido relativamente no polar. Si este metilo se va sustituyendo por grupos fenilo, cianopropilo y trifluoropropilo obtenemos líquidos de una polaridad mayor. Además de estas fases, también se encuentra el polietilenglicol que tiene gran utilidad para la separación de especies polares.

Por ello, la elección de la columna es una etapa crítica para el éxito de la separación. La polaridad de la fase estacionaria y de los solutos debe ser similar.

Las propiedades deseables para una fase líquida inmovilizada en una columna son: baja volatilidad, estabilidad química y químicamente inerte.

Las fases más utilizadas en el análisis de plaguicidas en uvas y vino son apolares, como polidimetilsiloxano (Schenck y col. 2002; Cabras y col. 2006) y la mezcla 95 % polidimetilsiloxano con 5 % polidifenilsiloxano (Likas y col. 2007; Payá y col. 2007), y de polaridad media como la mezcla 50% polidimetil 50% polidifenilsiloxano (Ruediger y col 2004).

En cromatografía de gases, el tiempo de retención se regula con la temperatura. Se puede decir que cada analito tiene una temperatura óptima de elución, o intervalo de temperaturas. Si la mezcla a analizar es excesivamente compleja, no existirá una única temperatura óptima y la mezcla tendrá que resolverse en un gradiente de temperaturas, de forma que los compuestos más volátiles eluyan a temperaturas bajas, mientras que los menos volátiles lo harán a temperaturas altas. También será preciso realizar un gradiente de temperaturas siempre que se empleen las inyecciones splitless u on-column.

Finalmente, una vez realizada la separación de los analitos, es necesario un sistema de detección. Los detectores más utilizados en cromatografía son:

- *Detector de ionización de llama (FID):* es uno de los más utilizados para el análisis de compuestos orgánicos ya que responde al número de átomos de carbono. Es universal, bastante sensible y tiene un compartimiento excelente. Los gases que efluyen de la columna cromatográfica son introducidos en una llama formada por hidrógeno y aire, y cuya conductividad eléctrica es permanente registrada. En el momento en que un compuesto de carbono se eluye de la columna, se quema en dicha llama y durante la reacción de combustión se generan electrones y otras especies cargadas que alteran la conductividad eléctrica de la llama.

- *Detector de conductividad térmica (TCD):* se basa en los cambios de conductividad térmica de la corriente de gas ocasionados por la presencia de moléculas de analito.
- *Detector de captura de electrones (ECD):* presenta alta selectividad para detectar compuestos que contienen halógenos, tal es el caso de los pesticidas organoclorados. Es muy sensible, pero en algunos casos, inestable. El efluyente de la columna se hace circular entre un pequeño núcleo de un metal radiactivo (normalmente Ni^{63}) que emite electrones (partículas β), y un electrodo cargado positivamente que los recibe. En el momento en que de la columna se eluye una especie de átomos electronegativos, capaces de "capturar" a dichos electrones, se detecta una disminución en la corriente del electrodo.
- *Detector de nitrógeno-fósforo (NPD):* es un detector selectivo de compuestos orgánicos que contienen fósforo y nitrógeno. Es similar a un pequeño FID al que se le ha incluido una perla de silicato dopado con un álcali, normalmente rubidio, y que actúa como catalizador de una reacción de formación de especies ciano o de óxidos de fósforo. En el transcurso de esta reacción se produce un cambio en las características de conductividad eléctrica de la pequeña llama que es registrado y amplificado. El detector no da respuesta a especies como el nitrógeno molecular, carbamatos, ureas, etc. Es posible regular el nivel de respuesta de N y P, y trabajar en un modo selectivo hacia el P (Ferreira 1997).

Además de estos sistemas de detección, la GC se puede acoplar con métodos espectrométricos siendo una herramienta muy potente para la identificación de componentes de mezclas complejas. Una de ellas es el acoplamiento de un cromatógrafo de gases con distintos tipos de espectrómetros de masas (GC-MS) de barrido rápido (Figura I-24).

La espectrometría de masas es capaz de proporcionar información referente a:

- Composición elemental de las muestras.

- Estructura de las moléculas.
- Composición cualitativa y cuantitativa de muestras complejas.
- Estructura y composición de superficies sólidas
- Relaciones isotópicas de átomos o moléculas de las muestras.

La espectrometría de masas se basa en los siguientes pasos:

1. La ionización de la muestra.
2. Separación de los iones con respecto su relación masa/carga (m/z)
3. Detección del número de iones con una determinada m/z.

La relación m/z del ión permite realizar la diferenciación de los distintos fragmentos, los cuales son característicos de las especies que se analizan. Esos fragmentos serán separados gracias a un analizador de masas, sometiendo esos iones a un campo eléctrico. La función de un analizador de masas es la de un monocromador, esto es, selecciona determinados iones con una relación m/z determinada.

Posteriormente pasa al sistema de detección dando una señal eléctrica que se traduce en el espectro de masas. Es preciso que el sistema se mantenga a vacío, con el fin de evitar el mayor número de colisiones que pueden provocar la destrucción de los fragmentos ionizados [*Skoog y col., 2001*].

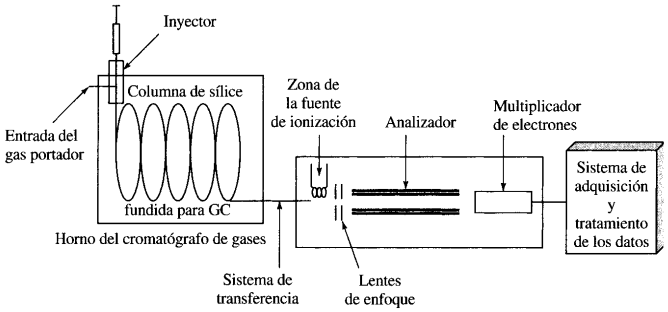


Figura I-24: *Cromatógrafo de gases acoplado con un espectrómetro de masas (tomada de Skoog y col., 2001)*

6.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución

El lecho cromatográfico en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) está constituido por una columna de entre 3 y 25 cm de longitud y con unos diámetros comprendidos entre 1 y 5 mm. En la mayor parte de los casos, son columnas empaquetadas, formadas por partículas finas y porosas. Los tamaños de partícula habituales son 5 μm.

La fase móvil es un líquido que circula a través de una columna en la que está contenida la fase estacionaria. Puede ser un disolvente puro, o una mezcla de varios disolventes. Puede ser también una disolución salina. El hecho de que la fase móvil sea un líquido tiene consecuencias muy importantes. En primer lugar, en un medio líquido existen interacciones intensas entre las moléculas y especies en él integradas y no es meramente un sistema de arrastre de los analitos (como ocurre en la cromatografía de gases), sino que va a jugar un papel muy importante en la retención. La retención cromatográfica en HPLC es función por tanto de las características de la fase móvil, fase estacionaria y analito.

En segundo lugar, los medios líquidos pueden tener características muy diferentes. Pueden ser apolares, medianamente polares, polares e iónicos, por lo que el conjunto de fuerzas de interacción que se pueden poner en juego para regular la retención cromatográfica es igualmente grande. Por ejemplo, en fase reversa, podemos elegir una fase estacionaria apolar y una fase polar; la retención de un analito será en función de sus solubilidades en la fase estacionaria y en la fase móvil, y cuanto más apolar, más se retendrá. Para eluirlo de la columna, lo único que tendremos que hacer es disminuir la polaridad de la fase móvil, de forma que las solubilidades relativas del analito en ambas fases sean más parecidas.

Los componentes más importantes en HPLC son la fase móvil que circula, la columna, y el detector. La fase móvil se encuentra en el reservorio (o en varios, ya que en ocasiones interesa utilizar mezclas de composición variable), de

donde es aspirada por la bomba (puede haber varias, tantas como fases se quieran mezclar). La fase móvil debe estar desgasificada y limpia de partículas en suspensión. Aún así se coloca un filtro de metal sinterizado para proteger a la bomba. La bomba debe poder vencer altas presiones (varios cientos de Kg cm^{-2}) para impulsar un flujo constante (en torno a 1 mL min^{-1}) de fase móvil a través de todo el sistema. Todas las conexiones y tubos serán de acero. Es posible que en el análisis de una mezcla compleja no se pueda encontrar una única fase móvil que permita separar todos los componentes de la mezcla en tiempos razonables, algo equivalente a lo que ocurre con la temperatura en la cromatografía de gases. La solución a ese problema puede plantearse cambiando la composición de la fase móvil a lo largo del proceso cromatográfico, lo que da a lugar a lo que se conoce como separación en gradiente. El gradiente se realiza mezclando disolventes, generalmente uno de fuerza de elución baja con otro de fuerza de elución superior. La muestra debería ser introducida en la cabeza de columna ocupando un volumen infinitesimal y ocasionando una distorsión inapreciable del flujo. El volumen de muestra inyectado debe ser muy reproducible y conocido con el grado de precisión requerido. Para conseguir estos requisitos, la inyección se puede realizar con ayuda de una válvula (parecido a la inyección on-column de cromatografía de gases) o mediante el uso de un “loop” o bucle, basado en una válvula de seis vías. (Ferreira 1997).

Según el tipo de columna, se presentan los dos modos más importante en cromatografía líquida: fase normal y fase reversa. La fase normal es un sólido adsorbente de características polares y la fase móvil es un medio orgánico apolar o poco polar. El adsorbente más empleado es la sílica, por sus características de porosidad, superficie específica, resistencia mecánica, y facilidad de síntesis. En la fase reversa, como ya se ha comentado, la relación que se establece entre fase móvil y estacionaria es justamente la contraria a la encontrada en la fase normal: la fase estacionaria es apolar y la fase polar es más polar que ella. Las columnas se basan en sílica derivatizada, al hacer reaccionar los silanoles activos de la sílica con un trialquil clorosilano. De este modo, se consigue depositar químicamente un film orgánico, cambiando de forma radical las propiedades de la superficie de la sílica. Con el proceso de

derivatización se pueden conseguir casi cualquier tipo de polaridad. Los sustituyentes alquilos pueden ser grupos C_{18}, C_8, C_6, C_4, C_2, fenilos, CN...

En cuanto a detectores, se encuentran los de índice de refracción, conductividad, UV-VIS, electroquímicos y fluorescencia. La cromatografía líquida en fase reversa es la más utilizada, en detección con el detector de absorción molecular UV-VIS; principalmente el detector de red de diodos ya que permite una mayor selectividad y la posibilidad de confirmación mediante el espectro completo de la molécula. Se han descrito aplicaciones en frutas y vegetales (Caboni y col. 2005; de Melo Abreu y col. 2006). Algunos pesticidas no pueden ser determinados directamente con GC por no tener suficiente volatilidad o ser compuestos termolábiles como benomilo, carbendazima o tiofanato de metilo. Para este tipo de compuestos el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es particularmente útil. Las columnas más utilizadas para la separación de plaguicidas en uvas y vino son de fase reversa (C_{18}) y los sistemas de detección más usados para analizar estos compuestos son el Ultravioleta-Visible (UV-VIS) (con red de diodos) (de Melo Abreu y col. 2005; Angioni y col. 2006; Oliva y col. 2007; Vaquero-Fernández y col. 2008).

La aplicación de reacciones de derivatización, generalmente on line y postcolumna también es un aspecto importante en el desarrollo de métodos para el análisis de determinados plaguicidas como carbamatos y piretroides cuya determinación se realiza mediante una reacción de hidrólisis posterior a la separación y formación de un derivado fluorescente que se detecta en el detector de fluorescencia (Tseng y col. 2007; Parrilla Vázquez y col. 2008).

Los acoplamientos HPLC con espectrómetros de masas han alcanzado en las últimas décadas un importante desarrollo, una vez superadas las dificultades técnicas que permiten combinar el flujo de fase móvil que emerge de la columna de líquidos con el elevado vacío necesario para un analizador de masas. El desarrollo de interfases de acoplamiento a nivel comercial ha permitido la puesta en el mercado de interfases de ionización a presión atmosférica (API), entre las que se distinguen electrospray, ion spray e ionización química a presión

atmosférica (APCI). Se ha utilizado el acoplamiento HPLC-MS para casos en los que exista gran cantidad de interferencias o se necesite una elevada sensibilidad para poder determinar los límites de residuos legales y para pesticidas polares termolábiles se utiliza la espectrometría de masas (Sagratini y col 2007; Kruve y col. 2008). También se han desarrollado detectores que permiten la obtención de espectros MS/MS que han supuesto un incremento en la sensibilidad de la técnica (Pihlström y col. 2007; Sagratini y col. 2007). Recientemente se ha desarrollado la técnica UPLC "Ultra Performance Liquid Chromatography" en tándem con espectrometría de masas para la determinación de pesticidas en frutas y vegetales, y otros alimentos. Con esta técnica se obtiene una mayor eficiencia junto con menores tiempos de análisis por el uso de fases estacionarias de pequeño tamaño de poro (1.7 μm), y fases móviles a velocidades mayores y una instrumentación que opera a grandes presiones (15000 psi aprox). Se consigue una mayor resolución y un aumento en la respuesta, junto con menor ensanchamiento de picos (Leandro y col. 2007; Romero-González y col. 2008).

7. FITORREGULADORES Y EFECTOS

En los últimos años se ha asistido al desarrollo y aplicación importante de los reguladores de crecimiento en muchos cultivos, buscando un mejor dominio y control de los procesos fisiológicos de las plantas.

En la viña la experiencia es menor que en otros cultivos, por lo que es importante considerar algunos aspectos básicos de los reguladores de crecimiento, término que se aplica a una gran diversidad de sustancias, considerando como tal a todo compuesto orgánico, diferente de los nutrientes, que, con cantidades pequeñas es capaz de promover, inhibir o modificar de alguna manera un proceso fisiológico cualquiera de la vida vegetal. Los más utilizados se clasifican en los siguientes grupos: auxinas, giberelinas, citoquininas, inhibidores y retardantes, y etileno y generadores de etileno.

La utilización de reguladores de crecimiento no ofrece seguridad de obtener una respuesta adecuada, como sucede con otros productos fitosanitarios cuando se emplean las recomendaciones técnicas; la respuesta a los reguladores depende del estado fisiológico de la planta, determinado por un conjunto de factores: características genéticas de la variedad, presencia o no de virosis, condiciones de clima y suelo, técnicas de cultivo aplicadas, etc.; por ello, los resultados obtenidos con una misma sustancia, aplicada a las mismas dosis, pueden ser diferentes de un año a otro, o según las técnicas de cultivo empleadas.

La acción de una sustancia y, sobre todo, sus efectos después de una aplicación, deben considerarse por las modificaciones que pueden producir en el equilibrio hormonal o en un proceso.

Por lo indicado anteriormente, la utilización de los reguladores de crecimiento debe ir precedida de una experimentación en las condiciones particulares de cada zona vitícola (Sotés 2004).

Uno de los efectos que se persigue con el uso de reguladores de crecimiento es el control de la producción a través del aclareo de racimos. La teoría clásica para obtener uva de calidad aboga por un equilibrio entre cantidad y calidad, que se consigue limitando la producción de uva por hectárea. La obtención de un vino de calidad exige manejar producciones moderadas en la cepa y es de especial interés precisar la relación entre el nivel de rendimiento y el desarrollo vegetativo de la cepa. La limitación del rendimiento por la supresión de racimos en principio favorece la calidad del mosto y del vino, además de producir una mayor acumulación de reservas de la planta (Puertas y col 2003).

El aclareo es la supresión parcial de racimos, bien sea de forma manual o de forma química. El aclareo de racimos puede contribuir a equilibrar la producción de uva y a mejorar el proceso de maduración en campañas y condiciones climáticas y culturales poco favorables (García-Escudero y col. 1995). Además el aclareo constituye una firme alternativa para corregir en un año determinado los excesos de producción, lo que resulta interesante para zonas vitícolas que deben

ajustar sus rendimientos a las exigencias de una normativa legal, como puede ocurrir en denominaciones de origen u otras zonas amparadas por figuras de calidad (García de Luján 1992). En la mayor parte de los casos, produce una maduración más rápida de la uva y una mejora cualitativa, lo que depende muy estrechamente del periodo de realización del aclareo (García-Escudero 2000).

La época más efectiva para hacer el aclareo es el envero (Tardáguila y Bertamini 1993), ya que en ese momento se alcanza la parada vegetativa y los ápices de los pámpanos no son activos, por tanto los azúcares sintetizados por las hojas se acumularán sólo en los racimos.

También se constata un incremento del pH, del contenido de potasio, de antocianos y de carga aromática (Fregoni y Corazzina, 1984). La influencia del aclareo en el pH del mosto, al igual que en la acidez total, es menor que en la acumulación de azúcar. Algunos autores constataron que en las experiencias en las que se mejora la relación Superficie Foliar Total /Producción, muchas de ellas a través del aclareo de racimos, se obtiene un mayor contenido en antocianos y fenoles (Jackson y Lombard 1993). Asimismo, se ha encontrado que los mostos procedentes de la práctica del aclareo presentan mayor intensidad colorante (Puertas y col. 2003). El aclareo interviene en la cinética de la maduración con una mejora cualitativa de mostos y vinos en años y condiciones poco favorables; cuando se pretenden alcanzar niveles de calidad más elevados; cuando hay que cumplir la legislación respecto a producciones máximas; cuando la poda no ha sido la adecuada.

El aclareo manual es una operación muy costosa en cuanto a tiempo (aproximadamente 40 horas por hectárea) y mano de obra. Normalmente se suele realizar eliminando normalmente un mínimo del 30 % de la producción, dejando el racimo inferior en el brote.

En definitiva, el aclareo supone una mejora cualitativa del vino: aumento del grado alcohólico; aumento del nivel de antocianos; preferencia de los catadores por los vinos procedentes de parcelas sometidas a aclareo.

8. COMPUESTOS ESTUDIADOS

8.1. Diclofluanida

Es un fungicida empleado para el control de botrytis, mildiu y otros hongos que atacan a la vid. Actúa por contacto foliar con acción preventiva multipuntual. Interfiere en el mecanismo respiratorio del hongo. Pertenece a la familia de los N-trihalometiltio (N-diclorofluorometiltio-N',N'-dimetil-N-fenilsulfamida). Comercialmente formulado como WP (polvo mojable) 50% o DP (polvo para espolvoreo) 3 % denominado *Euparen 3*. En la Figura I-25 se muestra la estructura química del compuesto. En cuanto a su persistencia, se degrada rápidamente y tiene poca movilidad en suelo. El límite máximo de residuos para vid es de 10 mg kg^{-1} y tiene asignado un plazo de seguridad de 7 a 20 días según la formulación (The Pesticide Manual 1997). Actualmente está prohibido su uso en vid en la Unión Europea.

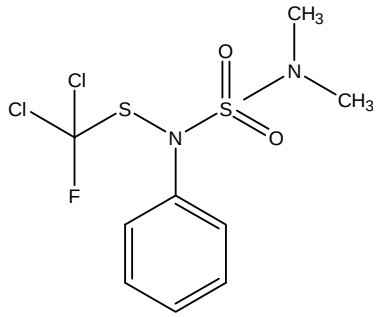


Figura I-25*. Estructura de Diclofluanida*

En la bibliografía se encuentran diferentes métodos de análisis para este compuesto. Mayoritariamente son métodos basados en una extracción en fase sólida y posterior determinación por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (Wong y col., 2003) o por cromatografía líquida de alta resolución (Rial Otero y col. 2003). Otros métodos utilizan la extracción líquido-líquido y posterior determinación por CG (Navarro y col. 2000), y la SPME con CG-ECD (Correia y col. 2000).

8.2. Metalaxil

Es un compuesto fitosanitario de la familia de las fenilamidas (Metil N-(metoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-DL-alaninato). Es empleado para el control del mildiu, actuando como fungicida sistémico con acción curativa y preventiva. Inhibe la síntesis proteica del hongo interfiriendo en la síntesis del ADN ribosomal. Comercialmente se encuentra formulado con otros compuestos como captan o folpet, como WP o GR (gránulos sin cebo) y llamado *Ridomil* o *Milor*. No se acumula en tejidos y suelos. Su estructura química se muestra en la Figura I-26. El LMR permitido en vid es de 2 mg kg^{-1}y el plazo de seguridad que tiene establecido es de 14 a 28 días según la dosis y formulación (The Pesticide Manual 1997). Dentro del sistema de producción integrada está permitido su uso en uva de vinificación hasta inicio de envero, aplicándose junto con folpet, manconzeb u óxido de cobre.

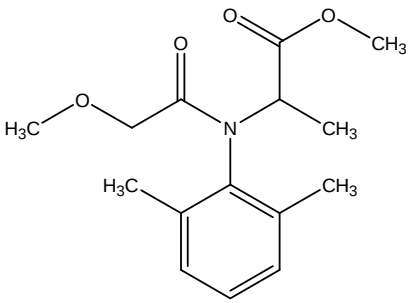


Figura I-26*. Estructura de Metalaxil*

Su análisis mayoritario se basa en una previa extracción liquido-líquido y determinación por CG con detectores MS y NPD (Navarro y col. 1999, 2000). También se han desarrollado métodos con extracción en fase sólida y posteriormente CG-MS (Wong y col. 2003).

8.3. Penconazol

Pertenece a la familia de los azoles (1-(2,4-dicloro-β-propilfenetil)-1H-1,2,4-triazol). Es utilizado para el control de oídio y otros hongos patógenos como

Ascomycetes y *Deuteromycetes* actuando de forma sistémica con acción preventiva y curativa. Inhibe la síntesis de ergosterol de la membrana celular del hongo frenando su desarrollo. Se encuentra formulado como WP al 10% con el nombre comercial *Topas*. Es bastante persistente. La Figura I-27 muestra su estructura química. El LMR para vid es de 0.2 $mg.kg^{-1}$ y el plazo de seguridad establecido es de 14 días (The Pesticide Manual 1997). Está permitida su aplicación hasta el inicio de envero en uva de vinificación en producción integrada.

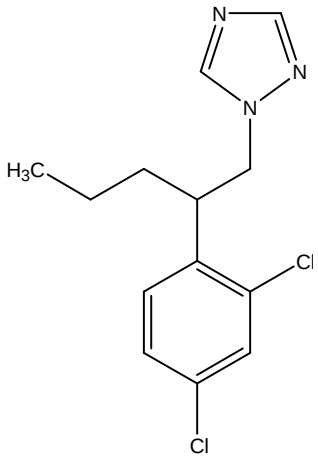


Figura I-27*. Estructura de Penconazol*

En la bibliografía revisada se encuentran como métodos de análisis: extracción líquido-líquido (Navarro y col. 1999), extracción en fase sólida y CG (Jiménez y col. 2001), y más recientemente la extracción en fase sólida y HPLC con red de diodos (Millán y col. 2003).

8.4. Pirimetanil

Fungicida empleado fundamentalmente para el control de la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) con acción curativa y preventiva. Es sistémico, inhibiendo las secreción de enzimas necesarias para la infección. Pertenece a la familia de las anilinopirimidinas (N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il)anilina). Se encuentra

formulado del tipo SC (suspensión concentrada) al 40% con el nombre comercial *Scala*. No se ha observado acumulación en tejidos y suelos, desaparece o degrada rápidamente. La estructura química se muestra en la Figura I-28. El límite máximo de residuos permitido en vid es de 5 mg kg^{-1} y el plazo de seguridad que tiene establecido es de 21 días (The Pesticide Manual 1997). Está permitido su uso en producción integrada.

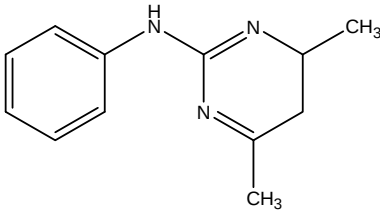


Figura I-28*. Estructura de Pirimetanil*

Los métodos de análisis usados son similares a los citados anteriormente para los otros compuestos: extracción líquido-líquido y determinación por cromatografía gaseosa (Navarro y col., 1999 y 2000) o por cromatografía líquida (Rial Otero y col., 2003) y extracción en fase sólida y CG-MS (Wong y col., 2003).

8.5. Prohexadiona de Calcio

La producción de uvas de calidad requiere el control de múltiples y variados parámetros. Es por ello, que en lo que se refiere a la vitivinicultura de calidad, está aumentando la preocupación por el control del rendimiento en la producción. Hasta el momento, parece innegable que bajos rendimientos de cosecha pueden proporcionar uvas de mayor calidad que las obtenidas con mayores rendimientos. En la actualidad, el aclareo de racimos (o vendimia en verde), como se ha comentado anteriormente en al Apartado 7, es una técnica ampliamente utilizada para reducir la producción en cepas vigorosas o en cepas que no han estado expuestas a condiciones climatológicas favorables. El aclareo de racimos produce un incremento en la Intensidad Colorante (IC), Índice de Polifenoles Totales (IPT) y antocianos (García Escudero y col. 2004).

Ya se ha comentado el uso de reguladores de crecimiento como método alternativo para el control de la producción. La prohexadiona de calcio (ProCa) (3-oxido-4-propionil-5-oxo-3-ciclohexen-carboxilato, en la Figura I-29) es un inhibidor de la biosíntesis de las giberelinas con limitada persistencia (Owens y Stover 1999). ProCa actúa bloqueando a dos dioxigenasas oxoglutarato-dependientes, que catalizan los últimos pasos de la ruta biosintética. La 3-β hydroxilación de la GA_{20} (inactiva) pasando a GA_1 (biológicamente activa) se encuentra especialmente inhibida por ProCa, lo que da como resultado una reducción del crecimiento longitudinal de los brotes en las plantas (Evans y col. 1999; Graebe 1987). ProCa se aplica fácilmente por pulverización y no constituye ningún riesgo aparente para los consumidores o para el medioambiente (Rademacher y Kober 2003). Se ha comprobado que la prohexadiona de calcio es captada normalmente y por completo en ocho horas después de su aplicación, y que se degrada en plantas con una vida media de unas pocas semanas y en el suelo con una vida media menor de una semana, sin que se produzca ningún metabolito tóxico (Ilias y Rajapakse 2005). ProCa se ha registrado para manzanas como Apogee® (27.5 % ProCa) en EEUU y como Regalis® (10 % ProCa) en Europa (Miller y Tworkoski 2003) por el fabricante BASF.

La prohexadiona de calcio se ha aplicado en árboles frutales con resultados satisfactorios (Basak y Rademacher, 2000; Bazzi *y* col. 2003; Gosch y col. 2003; Smit y col. 2005). Algunos estudios han revelado que la aplicación de prohexadiona de calcio también reduce la incidencia y la severidad del fuego bacteriano causado por la especie *Erwinia amylovora* (Fernando and Jones 1999; Momol y col. 1999), aunque el compuesto no tiene actividad bactericida.

Los primeros estudios que se encuentran acerca de ProCa en viña fueron realizados por Lo Giudice y col. (2003, 2004). Estos autores estudiaron el impacto de la aplicación de ProCa en cepas vigorosas de *Vitis vinifera*, especialmente en variedades Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay y Seyval.

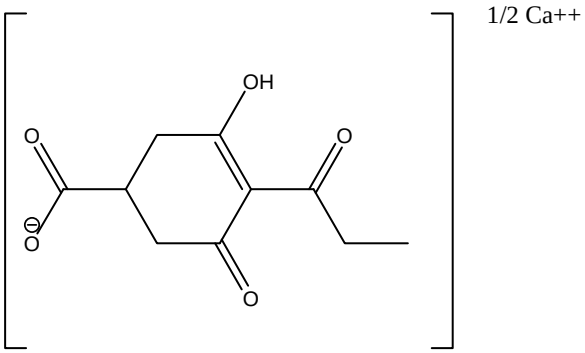


***Figura I-29**. Estructura de Prohexadiona de calcio*

Los compuestos más importantes para la calidad de las uvas tintas como los polifenoles (antocianos, flavonoles) se encuentran en los hollejos. Estos compuestos son responsables del color, astringencia, amargor y cuerpo de los vinos (Riberau-Gayon y col. 2002). La prohexadiona de calcio produce una reducción en el tamaño de la baya. Este hecho conlleva un incremento en la relación superficie/volumen, incrementando teóricamente la proporción de los precursores de aroma y flavor en el mosto y en el vino, con lo que se aumenta potencialmente la calidad del vino (Lo Giudice y col 2004). Además, una reducción en el tamaño de la baya y la producción de racimos menos compactos pueden disminuir la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* y otras podredumbres del racimo, particularmente en ambientes húmedos (Vail y Marois 1991).

En la variedad Cabernet Sauvignon, la reducción del tamaño y peso de la baya se relacionó con un incremento en la Intensidad Colorantre (absorbancia a 420 y 520 nm), antocianos totales y polifenoles totales. Los efectos observados en la composición de las uvas fueron generalmente positivos, pero el efecto en la calidad y las características organolépticas del vino final son todavía desconocidos (Lo Giudice y col. 2004).

CAPÍTULO II:
OBJETIVOS

Las paradas de fermentación en vinos tintos es un serio problema enológico en la *Denominación de Origen Calificada "Rioja"* como muestran las continuas descalificaciones de vinos, de acuerdo con los datos del Consejo Regulador. Un factor implicado en este problema es la presencia de residuos de productos fitosanitarios en las uvas vendimiadas y, por ello, en el mosto a fermentar.

El primer objetivo fundamental de este trabajo es el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de los fungicidas diclofluanida, metalaxil, penconazol y pirimetanil en uvas, en mosto y en el vino elaborado. Para conseguirlo se han planteado otros objetivos que se enumeran a continuación:

1. Selección de las variables del proceso de extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida de los compuestos estudiados.
2. Estudio del efecto de la diferente matriz en el tratamiento de muestra y cuantificación de los compuestos.
3. Estudio de validación de los métodos desarrollados.
4. Estudio de la influencia de la aplicación de productos fitosanitarios (fungicidas y reguladores de crecimiento) en campo sobre la fermentación y en el vino elaborado.
5. Análisis de residuos de productos fitosanitarios en las distintas muestras enológicas.
6. Diferenciación entre vinos obtenidos con uvas tratadas y uvas sin tratamiento.

CAPÍTULO III:
MATERIALES Y MÉTODOS

1. APARATOS E INSTRUMENTOS

A continuación se detallan cada uno de los aparatos e instrumentos que se utilizaron en el desarrollo de esta investigación.

1.1. Cromatógrafo de gases con detector nitrógeno-fósforo (GC-NPD)

El equipo GC-NPD que se ha utilizado se muestra en la Figura III-1 y consta de los siguientes elementos:

a) Una línea de gas helio (pureza 99.999 %).
b) Una línea de gas hidrógeno (pureza 99.999 %)
c) Una línea de gas aire comprimido puro sintético (pureza 99.99 %).
d) Un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N* equipado con:
   - Una columna capilar cromatográfica *HP5MS* con fase estacionaria 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm d.i. con 0.25 µm de espesor).
   - Un inyector automático *Agilent 7683* con carro de muestras para 100 viales de 2 mL.
   - Un detector de nitrógeno-fósforo.
e) Un ordenador equipado con el software *HP GC Chemstation Rev. A.08.03* para el control de todos los parámetros del cromatógrafo de modo automático.
f) Impresora.

Figura III-1: *Equipo CG-NPD*

1.2. Cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas (CG-MS)

El equipo GC-MS que se ha utilizado se muestra en la Figura III-2 y consta de los siguientes elementos:

a) Una línea de gas helio (pureza 99.996 %) con filtro.
b) Un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890* con detector de espectrometría de masas MS por impacto eléctrónico EI equipado con:
   - Una columna capilar cromatográfica *HP5MS* con fase estacionaria 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm d.i. con 0.25 µm de espesor).
   - Un detector de espectrometría de masas por impacto electrónico en modo full scan y SIM.
c) Un ordenador equipado con el software *MSD Chemstation Rev. E.01.01.335* para el control de todos los parámetros del cromatógrafo de modo automático.
d) Impresora.

Figura III-2: *Equipo CG-MS*

1.3. Concentradores

Para concentrar los componentes de las muestras y extractos se ha utilizado un rotavapor *Buchï R-200* (Figura III-3) y un evaporador con corriente de

nitrógeno Zymark TurboVap® II para la evaporación de agua y disolventes orgánicos (Figura III-4).

Figura III-3: *Rotavapor*

Figura III-4: *Concentrador bajo corriente de N_2*

1.4. Agitadores

El tratamiento de extracción líquido-líquido con disolvente orgánico se llevó a cabo asistido por agitación orbital. Los embudos de decantación se colocan en agitadores *Heidolph RZR 1* con capacidad para 5 embudos.

Para facilitar la disolución de los analitos en la fortificación de uvas sin tratamiento se utilizaron un Vortex Maxi Mix II y un baño de ultrasonidos Branson 5510 (en Figura III-5).

1.5. Centrífugas

Para centrifugar las muestras sólidas de uvas se utilizó la centrífuga Rotina 38 Hettich Zentrifugen y para las muestras líquidas de fermentación se utilizó el modelo Sorvall RC6 Plus con capacidad de refrigeración.

1.6. Balanza analítica

Para pesar los patrones puros y otros reactivos se ha utilizado una balanza analítica digital *Sartorius BL 120S* con una precisión de décima de miligramo.

1.7. Estufas

Para realizar los ensayos de fermentación a temperatura controlada de 28 ºC se utilizó una incubadora con agitación y refrigeración, *Innova 4330 (Refrigerated Incubator Shaker)*. Para secar los filtros con los posos de levaduras a 28 ºC se ha empleado una estufa *P Selecta* con regulación digital.

1.8. Aparatos para extracción

La extracción de los analitos de diferentes partes de la uva se llevó a cabo mediante la aplicación de ultrasonidos en un baño termostatizado a 20 ºC Branson 5510 Ultrasonics (Barcelona, España). Para la trituración, homogeneización y extracción desde las muestras sólidas de uvas se utilizó un triturador Heidolph SilentCruher M (Scwachbach, Alemania) (Figura III-5).

Para llevar a cabo el proceso de extracción en fase sólida (SPE), se utilizó un dispositivo Visiprep SPE a vacío con manoreductor suministrado por Supelco (Bellefonte, PA, EEUU), con capacidad para procesar 12 tubos símultáneamente (Figura III-6).

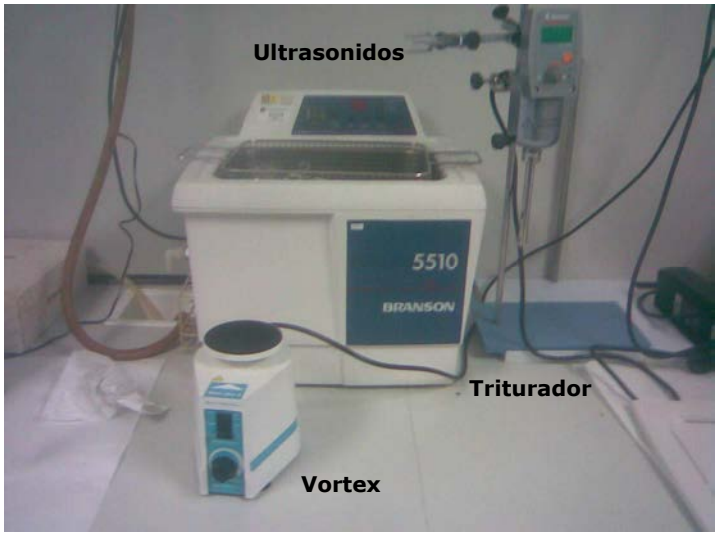


Figura III-5: *Baño de ultrasonidos, vortex y triturador*

Figura III-6: *Dispositivo de SPE*

2. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Los patrones de los plaguicidas y del patrón interno utilizados (diclofluanida, metalaxil, pirimetanil, penconazol y metribucina) son suministrados por la casa comercial Riedel-de-Haën (Seelze, Alemania), con certificación de pureza >99 % (grado Pestanal). Los reactivos utilizados, su grado de pureza y la firma comercial que los suministra se muestran en la Tabla III-1.

Tabla III-1: *Reactivos utilizados*

Compuesto	Grado de pureza	Casa comercial
Acetato de etilo	≥ 99.8 %	Carlo Erba
Acetona	≥ 99.8 %	Scharlau
Ácido tartárico	≥ 99.9 %	Panreac
Agua Milli Q	22 MΩ cm	Millipore
Ciclohexano	99.5 %	Lab Scan
Cloruro de sodio	99.5 %	Carlo Erba

Cloroformo	≥ 99.8 %	Merck
Dihidrógenofosfato de potasio	98-100 %	Panreac
Etanol	≥ 99.8 %	Scharlau
Hexano	≥ 99.5 %	Scharlau
Metanol	≥ 99.8 %	Merck
Metil-isobutilcetona	≥ 99.8 %	Merck
Sacarosa	≥ 99.0 %	Fluka
Sulfato de amonio	≥ 99.9 %	Panreac
Sulfato de magnesio	98-100 %	Panreac
Sulfato de sodio anhidro	≥ 99.0 %	Panreac

Se han preparado disoluciones patrón concentradas en metanol de 1000 mg L^{-1} a partir de los compuestos puros para la fortificación en mosto y vino sintéticos y reales, así como en extractos de uva, mosto y vino reales. Para el estudio del efecto matriz y calibrado de los métodos, se han utilizado disoluciones más diluidas de 5, 25 y 100 mg L^{-1} en metanol. Todas las disoluciones se mantuvieron a -20 ºC.

3. MUESTRAS SINTÉTICAS Y REALES

Las disoluciones de mosto y vino sintéticos se prepararon con la composición que se muestra en la Tabla III-2. El contenido de sacarosa en el mosto sintético está relacionado con el contenido de alcohol en el vino sintético obtenido como consecuencia de la fermentación alcohólica.

Tabla III-2: *Composición del mosto y vino sintéticos*

Mosto sintético	**Vino sintético**
Sacarosa 202 g L^{-1}	Ácido tartárico 5 g L^{-1}
Dihidrógenofosfato de potasio KH_2PO_4 5 g L^{-1}	Etanol 12 % (v/v)
Sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$ 2 g L^{-1}	pH = 3.6
Sulfato de magnesio $MgSO_4$ 2 g L^{-1}	
pH = 3.6	

Las disoluciones de mosto real se obtuvieron por estrujado y prensado de uvas vendimiadas en viñas de la DOCa Rioja que no han sido tratadas con producto fitosanitario alguno al menos en los diez últimos años. El mosto obtenido contiene 220 g L^{-1} de azúcares y un pH de 3.35. Las disoluciones de vino real se obtienen por fermentaciones en el laboratorio del mosto real tras la inoculación de levaduras seleccionadas comerciales (VRB Uvaferm, Lallemand, Australia) con una dosis de 0.3 g L^{-1}, controlando en todo momento la evolución del proceso fermentativo. El grado alcohólico alcanzado fue 12.8 % (v/v) y el pH fue 3.50.

CAPÍTULO IV:
ESTUDIOS PRELIMINARES

1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

La separación de los fungicidas objeto de estudio se realiza por cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo y una columna capilar HP-5MS (5 % de fenil metil siloxano entrecruzado) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de fase estacionaria. Se ha optimizado el proceso térmico en el horno cromatográfico obteniendo una programación con dos rampas de temperatura que se detallan a continuación: la temperatura inicial del horno es de 80 ºC que se mantiene durante 0.9 minutos (actúa como trampa fría para condensar la muestra); la primera rampa es de 70 ºC min^{-1} hasta alcanzar una temperatura de 225 ºC que se mantiene en isotermo durante 5 minutos; la segunda rampa, también de 70 ºC min^{-1}, alcanza una temperatura final de 275 ºC que se mantiene en isotermo durante 5 minutos.

El inyector se mantuvo a 200 ºC. El gas portador (helio) (99.996 % de pureza) a un caudal de 1.5 mL min^{-1}.

La temperatura del detector se fijó en 325 ºC. La relación de flujos para el detector ha sido 3 mL min^{-1} para H_2 y 70 mL min^{-1} para aire. Como gas de relleno o "make-up" se ha utilizado helio con un flujo de 3 mL min^{-1}.

La inyección ha sido realizada en modo "splitless" (sin división de flujo) con un tiempo de purga de 0.9 minutos.

La cuantificación se ha realizado por el método del patrón interno (P.I.) utilizando metribucina.

Los tiempos de retención obtenidos en estas condiciones para los diferentes compuestos estudiados se muestran en la Tabla IV-1.

Tabla IV-1: *Tiempos de retención de cada analito*

Compuesto	Tiempo (min)
Pirimetanil	4.19 ± 0.01
Metribucina (P.I.)	4.51 ± 0.01
Metalaxil	4.62 ± 0.02
Diclofluanida	4.89 ± 0.03
Penconazol	5.30 ± 0.02

La Figura IV-1 representa el cromatograma típico de separación de los fungicidas y el patrón interno metribucina en las condiciones mencionadas.

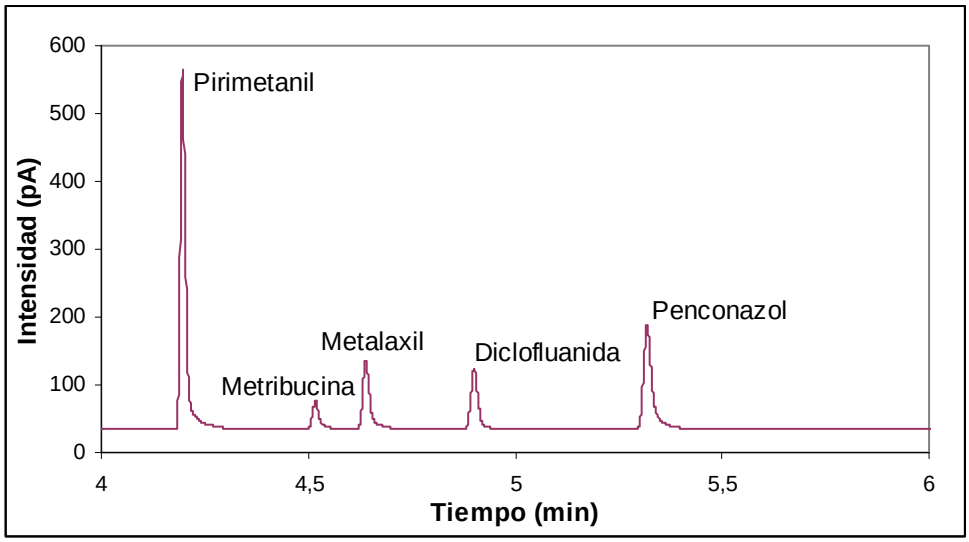


Figura IV-1: *Cromatograma de separación (GC-NPD) con la identificación de los compuestos*

2. SELECCIÓN DE PATRÓN INTERNO

Para la selección del patrón interno de cuantificación se realizaron estudios preliminares con dos compuestos, trifenilfosfato y metribucina. Se realizó un calibrado de los dos compuestos en la mezcla de disolventes hexano/ tolueno en relación 1:1 (donde mayor es su solubilidad según la bibliografía) y con el método cromatográfico descrito. Las características analíticas de cada uno de los productos se muestran en la Tabla IV-2.

El tiempo de retención para trifenilfosfato es 8.31 minutos y para metribucina es 4.51 minutos. Observando los datos de la tabla, se comprueba que metribucina presenta mejor ajuste lineal que trifenilfosfato, así como mayor sensibilidad y menor desviación estándar en las medidas.

Tabla IV-2: *Características analíticas de los patrones internos*

Compuesto	Intervalo lineal (µg L^{-1})	LD (µg L^{-1})	LC (µg L^{-1})	Ecuación [a]	R^2	DER[b] ,%
Trifenilfosfato	28.7 - 11480	12.2	20.6	A = 28.573 (± 4.576) C – 9.276 (±0.725)	0.9987	2.5 (114.8)
Metribucina	10.2 - 10200	3.8	5.8	A = 77.980 (± 0.336)C – 3.176(± 1.237)	0.9999	1.8 (102.0)

[a] A: Área relativa; C: Concentración

[b] Calculado a partir de cuatro medidas(n=4). Concentración (µg L^{-1}) entre paréntesis

Se realizó un estudio de repetibilidad de los dos compuestos objeto de estudio a tres niveles de concentración. En la Tabla IV-3 se observa que la repetibilidad de metribucina es mayor que la de trifenilfosfato en los tres niveles de concentración, por tener menores desviaciones en todos los casos. En función de todos estos resultados se escogió ***metribucina*** como patrón interno en una concentración de ***1 mg L^{-1}***, que proporciona una señal adecuada para hacer la relación de áreas para los analitos.

Tabla IV-3*. Estudio de repetibilidad, expresada como DER (%)*

Compuesto	DER, %		
	0.1 mg L^{-1}	0.5 mg L^{-1}	1.0 mg L^{-1}
Trifenilfosfato	8.63	3.80	2.48
Metribucina	3.65	0.43	1.19

3. MÉTODO DE CONFIRMACIÓN

Para la confirmación de los compuestos objeto de estudio se utilizó la técnica de cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas (GC-MS). El método utilizado presenta las condiciones que a continuación se describen. El flujo de gas portador He fue 1.5 mL min^{-1} y se utilizó una columna capilar HP5MS (5 % de fenil metil siloxano entrecruzado, de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de fase estacionaria). El programa de temperaturas del horno fue el siguiente: temperatura inicial del horno de 80 ºC

que se mantiene durante 0.9 minutos, rampa de 70 ºC min^{-1} hasta de 225 ºC que se mantiene durante 5 minutos; la segunda rampa, también de 70 ºC min^{-1}, alcanza una temperatura final de 275 ºC que se mantiene durante 5 minutos. El volumen de muestra inyectado es 1 µL en modo *splitless* con un tiempo de purga de de 1 minuto. El espectrómetro de masas opera en modo de impacto electrónico (con una energía de ionización de 70 eV), con 3.50 minutos de *solvent delay*, la temperatura de la interfase se mantiene a 285 ºC, y la temperatura de la fuente de iones se programa a 230 ºC, el tiempo de residencia (*dwell time*) es 100 milisegundos por ion. Se utiliza el modo SIM (Selected Ion Monitoring). Los iones seleccionados para cada compuesto son: 198, 199, y 200 *m/z* para pirimetanil; 103, 144, y 198 *m/z* para metribucina; 132, 160, y 206 *m/z* para metalaxil; 123, 167, y 224 *m/z* para diclofluanida; 159, y 248 *m/z* para penconazol. La confirmación se basó, además del criterio del tiempo de retención, en la presencia de los iones seleccionados con abundancias relativas de las respectivas abundancias en los patrones estándar (Document Nº SANCO/2007/3131). La Figura IV-2 representa el cromatograma típico de separación de los fungicidas y el patrón interno en las condiciones mencionadas.

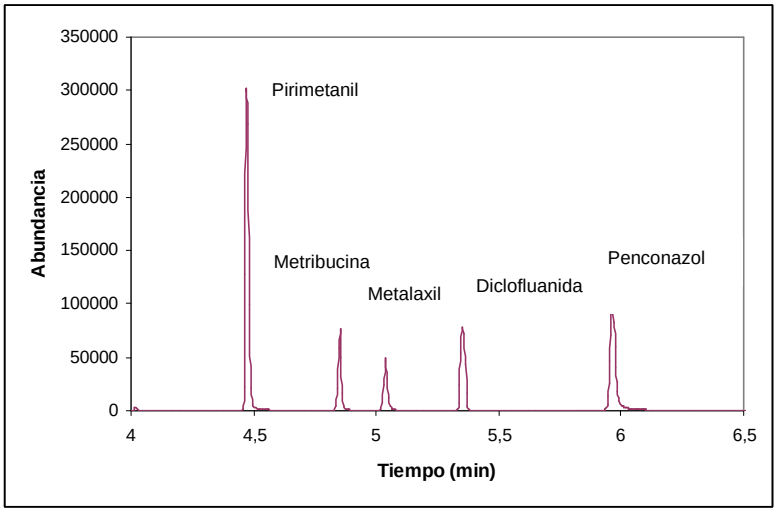


Figura IV-2: *Cromatograma con la identificación de los compuestos*

CAPÍTULO V:
DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS EN MUESTRAS ENOLÓGICAS

1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA MOSTOS Y VINOS

1.1. Selección de las variables de extracción

La cantidad extraída para cada compuesto depende de las variables utilizadas en la extracción líquido-líquido, tales como tipo y volumen de disolvente orgánico, volumen de muestra, tiempo de extracción por agitación orbital y cantidad de sal añadida para aumentar la fuerza iónica de la muestra. El volumen de muestra se considera fijo, 5 mL. El resto de variables se han estudiado y optimizado de manera univariante.

En base al método utilizado por Sala y col. (1997), se realiza el estudio sobre muestras de mosto sintético a las que se le han añadido los cuatro fungicidas objeto del trabajo, en concentraciones iguales o superiores a sus límites máximos de residuos en uva, tal como se indica a continuación:

- ✓ Para metalaxil y penconazol se consideran unas concentraciones de 20 mg L^{-1} y 2 mg L^{-1} respectivamente, diez veces superiores a sus LMR (2 mg L^{-1} y 0.2 mg L^{-1}, respectivamente)
- ✓ Para pirimetanil se considera una concentración de 5 mg L^{-1} similar a su LMR (5 mg L^{-1}).
- ✓ Para diclofluanida se considera una concentración de 20 mg L^{-1}, correspondiente al doble del LMR (10 mg L^{-1})

Sala y col. proponen unas concentraciones diez veces superiores a los LMR, pero para pirimetanil y diclofluanida este estudio no se pudo realizar debido a que estas concentraciones originan una excesiva señal y saturan el detector.

En la metodología del estudio se consideran las siguientes condiciones de partida: un volumen fijo de muestra de 5 mL, 1 g de sal NaCl, 10 mL como volumen de disolvente orgánico para cada uno de los ensayados y 15 minutos como tiempo de extracción por agitación orbital. Para conocer la recuperación de los compuestos o rendimiento de extracción se prepararon disoluciones patrón de los fungicidas en la misma concentración en disolvente orgánico.

1.1.1 Tipo de disolvente orgánico

Hexano, acetato de etilo (AcEt), acetona/diclorometano (1:1), ciclohexano acetato de etilo/ ciclohexano (1:1), se estudiaron como disolventes orgánicos de extracción basándose en su polaridad. La Tabla V-1 muestra los resultados de recuperación con la desviación estándar relativa (DER) obtenidos en el estudio realizado por triplicado.

Los rendimientos más bajos se obtienen con ciclohexano seguido de la mezcla acetona/diclorometano. Con acetato de etilo y la mezcla acetato de etilo/ciclohexano los rendimientos son menores que con hexano y con una mayor dispersión. Los rendimientos de extracción con acetato de etilo/ciclohexano fueron ligeramente mayores que los de acetato de etilo, pero tiene la característica común con acetona/diclorometano y ciclohexano de no extraer uno de los compuestos a estudiar, diclofluanida.

Tabla V-1: *Recuperaciones en la extracción con distintos disolventes*

Compuesto	% RECUPERACIÓN (DER)				
	Hexano	Acetato de Etilo	Acetona/ diclorometano	Ciclohexano	AcEt/ Ciclohexano
Pirimetanil	56.9 (1.2)	35.3 (9.2)	26.6 (5.6)	22.7 (9.4)	42.7 (9.1)
Metalaxil	54.7 (0.6)	35.7 (8.7)	28.5 (9.2)	18.7 (8.8)	45.8 (8.2)
Diclofluanida	68.0 (7.0)	20.9 (8.4)	N.D.	N.D.	N.D.
Penconazol	55.0 (2.8)	34.8 (8.9)	29.1 (9.3)	39.2 (9.2)	43.9 (9.7)

N.D.= No detectado. DER = Desviación Estándar Relativa (n = 3)

En las condiciones anteriormente descritas y en base a los resultados obtenidos de valores superiores en la recuperación junto con una buena repetibilidad en la extracción, el disolvente seleccionado es ***hexano***.

Dado que los bajos rendimientos observados con una única extracción, 54.7 y 68.0 %, se realizó una segunda extracción retirando el primer extracto orgánico. La recuperación de los compuestos con los dos extractos es mayor. En la Tabla V-2 se muestran las recuperaciones obtenidas con dos extracciones de 10 + 10 mL en mosto sintético. Dichas recuperaciones se aproximan al 100 %,

por lo que se decidió continuar el estudio de las siguientes variables realizando una doble extracción de 10 + 10 mL.

Tabla V-2: *% Recuperación con una extracción doble*

Compuesto	% Rec. (DER)
Pirimetanil	98.3 (3.3)
Metalaxil	94.4 (2.1)
Diclofluanida	115.7 (12.5)
Penconazol	91.0 (3.2)

DER = Desviación Estándar Relativa (n =3)

1.1.2 Volumen de disolvente

Una vez seleccionado el disolvente de extracción se realizaron extracciones con volúmenes diferentes de hexano manteniendo las demás variables en su valor inicial.

Los valores de recuperación obtenidos se muestran en la Tabla V-3.

Tabla V-3: *% Recuperación con diferentes volúmenes de disolvente*

Vol.disolvente (mL)	% RECUPERACIÓN (DER)			
	Pirimetanil	Metalaxil	Diclofluanida	Penconazol
2	98.4 (5.4)	84.6 (5.6)	26.8 (7.1)	86.2 (9.5)
5	98.1 (8.0)	91.5 (7.1)	114.5 (16)	91.3 (9.3)
10	98.9 (6.1)	94.8 (4.7)	117.7 (8.8)	93.1 (4.8)
20	98.1 (9.4)	83.9 (4.5)	83.2 (7.0)	87.8 (9.6)

DER = Desviación Estándar Relativa (n =3)

La observación de los datos refleja que para pirimetanil, el volumen de disolvente no parece afectar a la extracción, obteniendo rendimientos superiores al 98 %. Metalaxil y penconazol tienen un comportamiento similar, los valores mayores de recuperación corresponden a volúmenes de 5 y 10 mL, aunque para un volumen de 10 mL los rendimientos son ligeramente superiores, 94.8 % y 93.1 % para metalaxil y penconazol, respectivamente. Para diclofluanida los

valores mayores de recuperación también corresponden a volúmenes intermedios de 5 y 10 mL (114.5 y 117.7 %, respectivamente); mientras que para 2 mL y 20 mL los valores son menores (26.8 y 83 %, respectivamente).

En función de los resultados se selecciona un volumen de disolvente de *10 mL* para la extracción líquido-líquido.

1.1.3 Cantidad de sal (NaCl)

La adición de sal favorece la migración de los analitos a la fase orgánica al aumentar la fuerza iónica de la fase acuosa y disminuir la solubilidad de los compuestos orgánicos en la misma. Se adicionaron cantidades de NaCl de 0.5 g 1.0 y 1.5 g.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V-4. Se observa que la adición de sal proporciona valores similares de recuperación para todos los fungicidas pirimetanil, metalaxil y penconazol cuando se añaden 0.5 y 1.0 g (próximos al 100 %) y valores ligeramente inferiores con 1.5 g. Se seleccionó ***0.5 g de NaCl*** como cantidad adecuada.

Tabla V-4: *% Recuperación con diferentes cantidades de sal*

g NaCl	% RECUPERACIÓN (DER)			
	Pirimetanil	Metalaxil	Diclofluanida	Penconazol
0.5	98.3 (6.6)	99.9 (3.7)	115.8 (9.4)	89.3 (7.1)
1.0	100.5 (6.4)	100.8 (4.9)	119.9 (9.8)	92.8 (3.4)
1.5	93.6 (7.0)	95.9 (6.9)	119.1 (12.1)	82.4 (2.4)

DER = Desviación Estándar Relativa (n =3)

1.1.4 Tiempo de extracción

La extracción líquido-líquido es asistida con una agitación orbital, por lo tanto se estudió la influencia del tiempo de agitación orbital en la extracción de los compuestos. Los tiempos estudiados fueron 5, 10, 15, 20 y 30 minutos a una determinada velocidad de agitación, manteniendo los valores iniciales del resto de los parámetros, salvo los ya seleccionados (disolvente, cantidad de sal y doble extracción).

En la Tabla V-5 figuran los rendimientos obtenidos junto con las desviaciones entre paréntesis. Se observa que a partir de un tiempo de 10 minutos de agitación se alcanza el máximo rendimiento de extracción para pirimetanil, metalaxil y diclofluanida. La extracción de penconazol en estas condiciones es prácticamente independiente del tiempo de extracción. Se selecciona ***10 minutos*** como tiempo de agitación.

Tabla V-5: *% Recuperación en los diferentes tiempos de agitación*

Tiempo (min)	% RECUPERACIÓN (DER)			
	Pirimetanil	Metalaxil	Diclofluanida	Penconazol
5	96.6 (0.7)	99.1 (1.6)	118.0 (15.3)	89.6 (3.0)
10	102.0 (5.6)	103.1 (4.1)	118.6 (3.7)	91.9 (2.6)
15	105.0 (11.9)	104.0 (9.4)	100.8 (4.0)	89.9 (9.5)
20	99.8 (4.6)	101.9 (2.7)	103.9 (12.2)	85.3 (4.9)
30	98.9 (3.3)	100.6 (4.0)	88.1 (14.5)	87.1 (3.1)

DER = Desviación Estándar Relativa (n =3)

Los parámetros de extracción seleccionados como más idóneos para los compuestos estudiados se resumen en la Tabla V-6.

Tabla V-6: *Variables de extracción seleccionadas*

Volumen de muestra	5 mL
Disolvente	Hexano
Tiempo de agitación	10 min
Cantidad de NaCl	0.5 g
Volumen de disolvente	10 + 10 mL

1.2. Características analíticas del método

La Tabla V-7 muestra los intervalos lineales de concentración de los fungicidas estudiados tanto en mosto como en vino sintético, los límites de detección (LD), los límites de cuantificación (LC), las ecuaciones de las rectas, los coeficientes de correlación (R^2) y la desviación estándar relativa (DER) de las medidas. La calibración se realizó fortificando mosto y vino sintéticos con siete concentraciones diferentes, con 3 réplicas.

Tabla V-7: *Características analíticas del método LLE-GC-NPD en muestras sintéticas*

Compuesto	Matriz	Intervalo lineal ($\mu g\ L^{-1}$)	LD ($\mu g\ L^{-1}$)	LC ($\mu g\ L^{-1}$)	Ecuación [a]	R^2	DER[b] ,%
Pirimetanil	Mosto	1.04- 10240	0.54	1.04	AR = 4.117 (± 0.036)C-0.034 (± 0.042)	0.9998	3.1 (51.2)
	Vino	0.89 - 10240	0.46	0.89	AR = 4.130 (±0.028)C–0.0241 (±0.033)	0.9999	2.03 (51.2)
Metalaxil	Mosto	3.26 - 9920	1.49	3.26	AR = 1.022 (±0.004)C–0.008(±0.005)	0.9999	6.04 (49.6)
	Vino	2.79 - 9920	1.28	2.79	AR = 1.007(±0.011)C–0.0075 (±0.013)	0.9996	1.87 (49.6)
Diclofluanida	Mosto	11.9 - 9760	5.16	11.9	AR = 1.802 (±0.049)C+0.296(±0.073)	0.994	3.89 (976)
	Vino	4.13 - 9760	1.79	4.13	AR = 2.536(±0.042)C–0.002 (±0.062)	0.9992	5.18 (976)
Penconazol	Mosto	0.79- 10400	0.42	0.79	AR = 2.385 (±0.051)C–0.072 (±0.060)	0.998	7.04 (52.0)
	Vino	0.72 - 10400	0.38	0.72	AR = 2.226 (±0.061)C-0.077(±0.072)	0.997	6.29 (52.0)

[a] AR: Área relativa; C: Concentración
[b] Calculado a partir de cuatro medidas (n=4). Concentración ($\mu g\ L^{-1}$) entre paréntesis

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se determinaron inyectando extractos de vinos y mosto sintéticos sin fortificar (n=6) y midiendo la magnitud del ruido. LD y LC se estimaron como la concentración obtenida con el valor medio del ruido más tres o diez veces la desviación estándar, respectivamente (Miller y Miller, 2002). Se encontraron los menores límites para penconazol, mientras que los mayores límites fueron los correspondientes para diclofluanida.

1.3. Selectividad

La selectividad se determinó inyectando extracto de mosto y vino sintéticos no fortificados; se puede deducir de la Figura V-1 que no hay interferencias en los extractos de mosto y vino sintéticos. Las condiciones propuestas en el método de trabajo proporcionaron picos cromatógraficos definidos y reproducibles. El ruido fue similar independientemente de la matriz, mosto o vino.

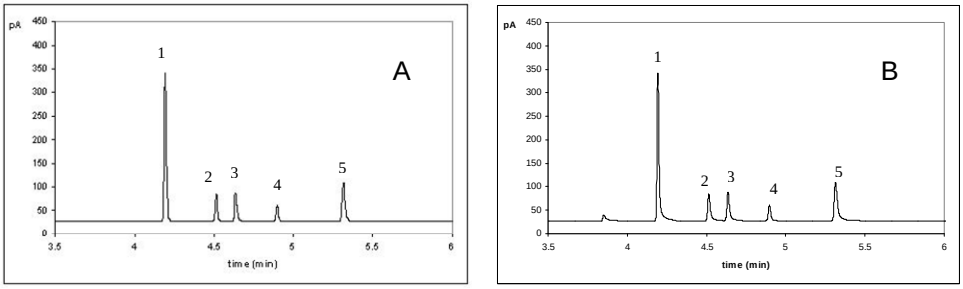


Figura V-1: *Cromatogramas GC-NPD obtenidos después de ELL: (A) Extracto de mosto sintético fortificado; (B) Extracto de vino sintético fortificado (1000 µg L^{-1}). Identificación de los picos: 1 Pirimetanil; 2 Metribucina (EI); 3 Metalaxil; 4 Diclofluanida; 5 Penconazol*

1.4. Recuperación, precisión y exactitud

Para la realización del estudio de recuperación de los compuestos una vez seleccionadas las variables de la extracción líquido-líquido, se prepararon disoluciones de mosto y vino sintéticos en presencia de los fungicidas objeto de estudio a dos niveles de concentración, 1 y 5 mg L^{-1}. Se realizaron tres réplicas para cada nivel de concentración.

La exactitud fue determinada como el porcentaje de recuperación a los dos niveles de fortificación mencionados y la precisión se evaluó en términos de repetibilidad en los dos niveles de concentración.

Las recuperaciones medias para pirimetanil, metalaxil y penconazol encontradas oscilaron desde 88.2 hasta 98.4 %. La Tabla V-8 muestra las medias de los resultados obtenidos para las dos matrices en los dos niveles de concentración. Los resultados muestran que los valores de desviación estándar relativa son menores del 10 %, entre 1.7 y 6.1 %. El ANOVA revela la ausencia de diferencias significativas (p>0.05) entre los dos tipos de muestra o matriz para pirimetanil, metalaxil y penconazol. Para diclofluanida los niveles de recuperación fueron muy superiores al 100 %, entre 115.5 y 174.9 %, fueron muy diferentes entre las dos matrices, y los valores de desviación estándar relativa fueron mayores del 10 %.

Tabla V-8: *Recuperaciones medias y precisión (ambas en porcentaje) a las concentraciones de 1 y 5 mg L^{-1} después de fortificar las muestras de mosto y vino sintéticos*

Compuesto	RECUPERACIÓN, (DER) (%)	
	Mosto	Vino
Pirimetanil	96.7 (1.7)	98.4 (2.5)
Metalaxil	92.8 (3.6)	93.9 (4.0)
Diclofluanida	119.1 (9.3)	168.3 (12.3)
Penconazol	88.2 (6.1)	89.8 (5.4)

DER = Desviación Estándar Relativa (n =3)

1.5. Evaluación del efecto matriz

En la bibliografía consultada se ha encontrado que algunos análisis de pesticidas en mostos y vinos mediante cromatografía gaseosa presentan notables errores por exceso, con recuperaciones muy superiores al 100% (Hajšlová y col. 1998; Erney y col. 1993). Este fenómeno es atribuido al posible efecto matriz cromatográfico; este efecto se explica por una mayor

transferencia de los analitos desde el inyector a la columna cromatográfica posiblemente como resultado de la presencia en el extracto de sustancias procedentes de la matriz estudiada (Bernal y col. 1997).

En este trabajo también se puede dar efecto matriz en la eficacia de extracción líquido-líquido debido a la diferente composición de las muestras objeto de estudio a lo largo del proceso fermentativo, con una disminución en la concentración de azúcar y un aumento en la de etanol obtenido en el proceso de fermentación alcohólica. El cambio en la composición de las muestras durante la fermentación alcohólica (transformación de mosto a vino) hace que sea necesario realizar el estudio del posible efecto matriz en el proceso de tratamiento de muestra. Para ello se prepararon disoluciones sintéticas con diferente composición en azúcar y etanol, simulando diferentes momentos de una fermentación. Se añadieron los fungicidas en dos niveles de concentración (1 y 5 mg L^{-1}) y se aplicó por triplicado la metodología desarrollada de extracción líquido-líquido. Las recuperaciones se muestran en la Tabla V-9.

Tabla V-9: *Recuperaciones de los fungicidas en distintas matrices sintéticas a dos niveles de concentración*

% Etanol (v/v)	Glucosa (g L^{-1})	% RECUPERACIÓN (DER)							
		Pirimetanil		Metalaxil		Diclofluanida		Penconazol	
		1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}
0.0	200.0	96.3 (1.6)	96.9 (1.1)	90.5 (0.8)	94.1 (2.9)	155.5 (3.8)	122.8 (4.7)	86.4 (4.1)	89.1 (6.0)
3.0	150.0	97.7 (1.5)	97.5 (1.5)	93.3 (0.9)	95.2 (1.7)	168.2 (1.8)	174.9 (4.5)	88.2 (4.6)	90.9 (1.7)
6.0	100.0	96.7 (0.9)	95.0 (0.6)	93.2 (0.5)	94.0 (0.8)	166.2 (8.9)	171.9 (6.5)	89.9 (2.1)	92.7 (2.7)
9.0	50.0	99.2 (0.5)	97.4 (1.0)	96.6 (1.9)	95.9 (0.4)	160.2 (2.7)	168.5 (7.3)	90.3 (1.9)	89.4 (0.7)
12.0	0.0	98.8 (2.7)	97.2 (1.3)	94.2 (4.5)	93.2 (1.3)	164.6 (7.8)	172.3 (9.1)	89.6 (1.0)	89.9 (5.9)

DER = Desviación Estándar Relativa (n =3)

El ANOVA realizado a los resultados obtenidos (Tabla V-9) muestra que no existen diferencias significativas (p>0.05) en la extracción por la diferente composición de las muestras en el caso de pirimetanil, metalaxil y penconazol. Para diclofluanida los rendimientos encontrados son superiores al 120% para todas las muestras sintéticas, y mayores cuanto mayor es el contenido en etanol. Por ello, no parece existir efecto matriz para pirimetanil, metalaxil y penconazol, y sí que se observa para diclofluanida.

Con el fin de corroborar la existencia o no del efecto matriz se realizó el estudio de la respuesta lineal del método en las dos matrices. Las rectas obtenidas se muestran en las Figura V-2. El efecto matriz se evaluó comparando estadísticamente sus pendientes. En primer lugar se estudió la homogeneidad de las varianzas de dichas curvas de calibración mediante un test de la F de Fisher a un nivel de significación del 95%. Para probar si es significativa la diferencia entre dos varianzas muestrales, $H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ se calculó el estadístico F:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

donde 1 y 2 se disponen en la ecuación de modo que F sea siempre ≥ 1. El número de grados de libertad para el numerador y denominador es n – 2.

Una vez calculados los estadísticos F para las desviaciones de las rectas obtenidas para las matrices estudiadas se comprobó que las varianzas de todas las rectas eran significativamente iguales. A continuación se realizó un test *t-Student* para cada compuesto y matriz (mosto y vino) aplicando las siguientes ecuaciones para el cálculo de la varianza y del estadístico, t_{cal}.

$$s_{y/x} = \frac{(n_1 - 2)s_{y/x_1}^2 + (n_2 - 2)s_{y/x_2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

El estadístico es: $$t_{cal} = \frac{b_1 - b_2}{s^2_{y/x}\left[\frac{1}{\sum\left(x_{i1} - \bar{x}_1\right)^2} + \frac{1}{\sum\left(x_{i2} - \bar{x}_2\right)^2}\right]^{1/2}}$$

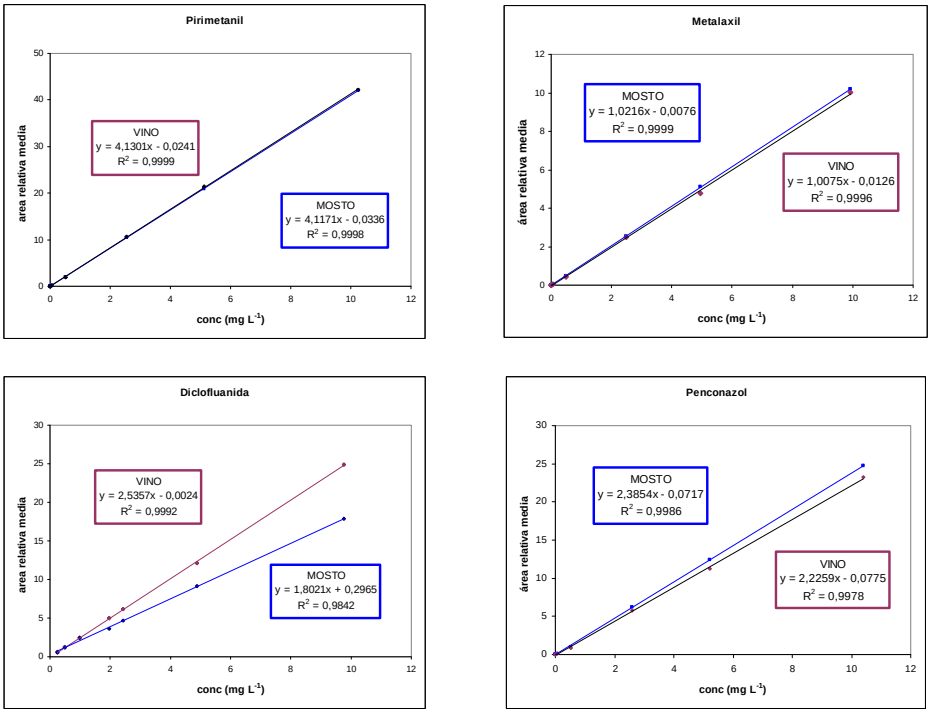


Figura V-2: *Rectas de calibrado en mosto y vino sintético para cada uno de los compuestos*

Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre las pendientes en mosto y vino sintético para pirimetanil, metalaxil y penconazol. Sin embargo, para diclofluanida las pendientes son estadísticamente diferentes. Por ello, se puede concluir que no existe efecto matriz para los fungicidas pirimetanil, metalaxil y penconazol, mientras que para diclofluanida además de observarse un efecto matriz cromatográfico por alcanzar recuperaciones del orden o superiores a 120 %, presenta diferencias en la recuperación en función del tipo de muestra (o matriz) en el que se realice el análisis; ello implica que

para realizar la determinación de diclofluanida en estas muestras, así como en el proceso de fermentación, es necesario realizar un calibrado por adición estándar para cada tipo de muestra o un calibrado en extracto de la matriz objeto de estudio.

El método desarrollado de tratamiento de muestra mediante una extracción líquido-líquido con disolvente orgánico resulta válido para la consecución de los objetivos planteados en este estudio. Hay que considerar que para aquellos compuestos que presentan efecto matriz el trabajo de determinación se hace tedioso, por lo cual se plantea para estudios posteriores desarrollar otros métodos de tratamiento de muestra aplicando la extracción en fase sólida y evaluar la posibilidad de eliminar o minimizar el efecto de la matriz.

1.6. Validación del método en muestras reales

1.6.1 Características analíticas del método

Una vez desarrollado y optimizado el método en las matrices de mosto y vino sintéticos, se procedió a la aplicación del mismo en las matrices reales. En primer lugar se realizó el estudio de las características analíticas del método en este tipo de muestras.

La Tabla V-10 muestra los intervalos lineales de concentración de los fungicidas estudiados tanto en mosto como en vino reales, los límites de detección (LD), los límites de cuantificación (LC), las ecuaciones de las rectas, los coeficientes de correlación (R^2) y la desviación estándar relativa (DER) de las medidas. Las curvas de calibrado se obtuvieron fortificando mosto y vino reales con siete diferentes concentraciones, realizando 3 réplicas de cada una.

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se determinaron inyectando extractos de vinos y mosto sintéticos sin fortificar (n=6) y midiendo la magnitud del ruido. LD y LC se estimaron como la concentración obtenida con el valor medio del ruido más tres o diez veces la desviación estándar, respectivamente (Miller y Miller, 2002).

Tabla V-10: *Características analíticas del método LLE-GC-NPD en muestras reales*

Compuesto	Matriz	Intervalo lineal ($\mu g\ L^{-1}$)	LD ($\mu g\ L^{-1}$)	LC ($\mu g\ L^{-1}$)	Ecuación [a]	R^2	DER[b] ,%
Pirimetanil	Mosto	0.93 - 10560	0.48	0.93	AR = 4.645(± 0.060) C-0.353(± 0.029)	0.9990	2.81 (52.8)
	Vino	0.83 – 10560	0.43	0.83	AR = 4.408 (±0.142)C–0.242 (±0.071)	0.994	9.77 (52.8)
Metalaxil	Mosto	3.12 - 10160	1.47	3.12	AR = 1.062 (±0.032)C–0.178(±0.015)	0.991	6.09 (50.8)
	Vino	2.80 - 10160	1.23	2.80	AR = 1.005(±0.026)C–0.110 (±0.012)	0.993	4.70 (50.8)
Diclofluanida	Mosto	4.13 - 11280	1.79	4.13	AR = 2.991 (±0.040)C+0.276(±0.070)	0.999	0.80 (56.4)
	Vino	3.85 - 11280	1.67	3.85	AR = 2.721(±0.079)C–0.518(±0.069)	0.995	3.20 (56.4)
Penconazol	Mosto	6.77 - 10400	3.63	6.77	AR = 2.755 (±0.099)C–0.630 (±0.093)	0.993	11.3 (52.0)
	Vino	6.04 - 10400	3.24	6.04	AR = 2.623 (±0.074)C-0.467(±0.075)	0.995	7.84 (52.0)

[a] AR: Área relativa; C: Concentración
[b] Calculado a partir de cuatro medidas (n=4). Concentración ($\mu g\ L^{-1}$) entre paréntesis

1.6.2 Selectividad

Se evaluó la selectividad del método propuesto en muestras de mosto y vinos reales exentos de fungidas. La Figura V-3 muestra lo cromatogramas obtenidos de los blancos de mosto y vino reales fortificados. Las condiciones propuestas en el método de trabajo proporcionaron picos cromatógraficos definidos y reproducibles. El ruido fue similar independientemente de la matriz, mosto o vino.

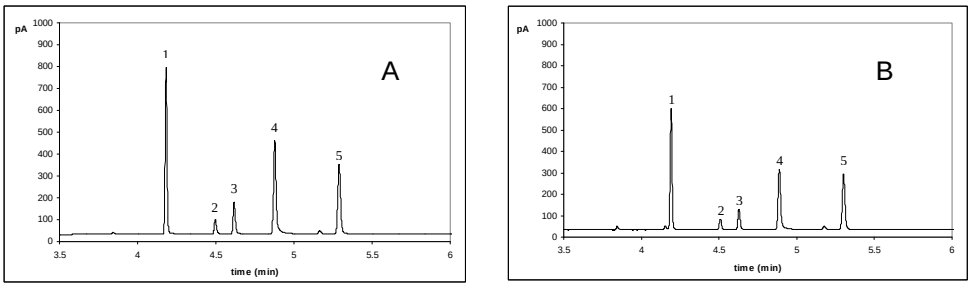


Figura V-3: *Cromatogramas GC-NPD obtenidos después de ELL: (A) Extracto de mosto real fortificado; (B) Extracto de vino real fortificado (2500 µg L^{-1}). Identificación de los picos: 1 Pirimetanil; 2 Metribucina (EI); 3 Metalaxil; 4 Diclofluanida; 5 Penconazol*

1.6.3 Recuperación, exactitud y precisión

Para la realización del estudio de recuperación de los compuestos se fortificaron muestras de mosto y vino reales exentos de fungicidas con los compuestos objeto de estudio a dos niveles de concentración, 1 y 5 mg L^{-1}. Se realizaron tres réplicas para cada nivel de concentración.

La exactitud fue determinada como el porcentaje de recuperación, a los dos niveles de fortificación mencionados. La precisión se evaluó en términos de repetibilidad en dos distintos niveles de concentración**.**

Las recuperaciones medias obtenidas para pirimetanil, metalaxil y penconazol fueron entre 86.2 y 100.6 %. La Tabla V-11 muestra las medias de los resultados obtenidos para las dos matrices en los dos niveles de concentración. Los resultados muestran que los valores de desviación estándar

relativa son inferiores del 10 %, entre 1.4 y 4.9 %. El ANOVA revela la ausencia de diferencias significativas (p>0.05) entre los dos tipos de muestra o matriz para pirimetanil, metalaxil y penconazol. Sin embargo, para diclofluanida los niveles de recuperación fueron muy superiores al 120 % (120.0 y 132.9 % para mosto y vino respectivamente) fueron muy diferentes entre las dos matrices y con valores de desviación estándar relativa de 7.0 y 7.5 % para mosto y vino, respectivamente.

Tabla V-11: *Recuperaciones medias y precisión (ambas en porcentaje) para las concentraciones de 1 y 5 mg L^{-1} después de fortificar las muestras de mosto y vino real*

Compuesto	RECUPERACIÓN, (DER) (%)	
	Mosto	Vino
Pirimetanil	86.2 (1.9)	88.0 (1.4)
Metalaxil	98.3 (3.7)	100.6 (3.7)
Diclofluanida	120.0 (7.0)	132.9 (7.5)
Penconazol	78.3 (4.3)	79.4 (4.9)

DER = Desviación Estándar Relativa (n =3)

1.6.4 Evaluación del efecto matriz en muestras reales

En primer lugar se realizó el estudio del posible efecto de la distinta composición de la matriz sobre la extracción de los compuestos. Para ello se fortificaron las muestras recogidas a distintos momentos durante la fermentación alcohólica de un mosto real ausentes de fungicidas, con el fin de tener distinta composición en azúcar y etanol de forma natural. Se añadieron los fungicidas a dos niveles de concentración (1 y 5 mg L^{-1}) y se realizaron extracciones por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla V-12.

El ANOVA realizado demuestra que no existen diferencias significativas (p>0.05) en las recuperaciones obtenidas por la diferente composición de las muestras estudiadas ni entre los niveles de concentración (1 y 5 mg L^{-1}) en el caso de los compuestos pirimetanil, metalaxil y penconazol. Diclofluanida

presenta recuperaciones superiores al 120%, y diferentes según la composició de las muestras y los niveles de concentración.

Tabla V-12: *Recuperaciones de los fungicidas en distintas matrices reales a dos niveles de concentración*

% Etanol (v/v)	Azúcares (g L^{-1})	% RECUPERACIÓN (DER,%)							
		Pirimetanil		Metalaxil		Diclofluanida		Penconazol	
		1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}
0.00	220	85.0 (1.3)	87.4 (3.9)	98.8 (1.3)	97.9 (0.6)	118.3 (1.2)	121.7 (3.5)	78.5 (3.0)	78.1 (2.3)
4.0	146	83.5 (2.2)	86.2 (3.8)	98.5 (0.8)	97.8 (1.4)	119.3 (3.4)	125.9 (4.9)	80.1 (4.0)	78.7 (2.7)
7.0	91	84.7 (1.6)	87.1 (1.2)	99.1 (1.5)	98.9 (1.9)	119.9 (2.5)	128.0 (2.1)	81.2 (2.4)	81.5 (1.9)
10.1	34	83.8 (3.0)	87.3 (2.8)	101.1 (2.2)	99.1 (1.3)	124.2 (6.5)	132.4 (6.4)	81.6 (2.8)	79.9 (3.3)
11.7	<5	88.9 (0.9)	87.1 (0.7)	101.1 (2.2)	100.1 (2.6)	144.3 (1.3)	131.4 (1.8)	78.4 (1.6)	80.5 (1.6)

DER = Desviación Estándar Relativa (n =3)

Con el fin de corroborar la existencia o no del efecto matriz se realizó el estudio de la respuesta lineal del método en las dos matrices reales. Las rectas obtenidas se muestran en las Figura V-4.

Se realizó un test *t-Student de* hipótesis para la comparación de las pendientes de dos líneas de regresión (mosto y vino) obtenidas para cada uno de los compuestos estudiados, con una significancia del 95 %. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre las pendientes en mosto y vino real para pirimetanil, metalaxil y penconazol. Para diclofluanida resulta que sí existen diferencias significativas entre ambas pendientes. Por ello, se puede concluir que no existe efecto matriz en el análisis de pirimetanil, metalaxil y penconazol. Diclofluanida en estas matrices presenta efecto matriz cromatográfico por alcanzar recuperaciones superiores al 120 % y además

presenta diferencias en la recuperación en función del tipo de muestra (o matriz) en el que se realice el análisis.

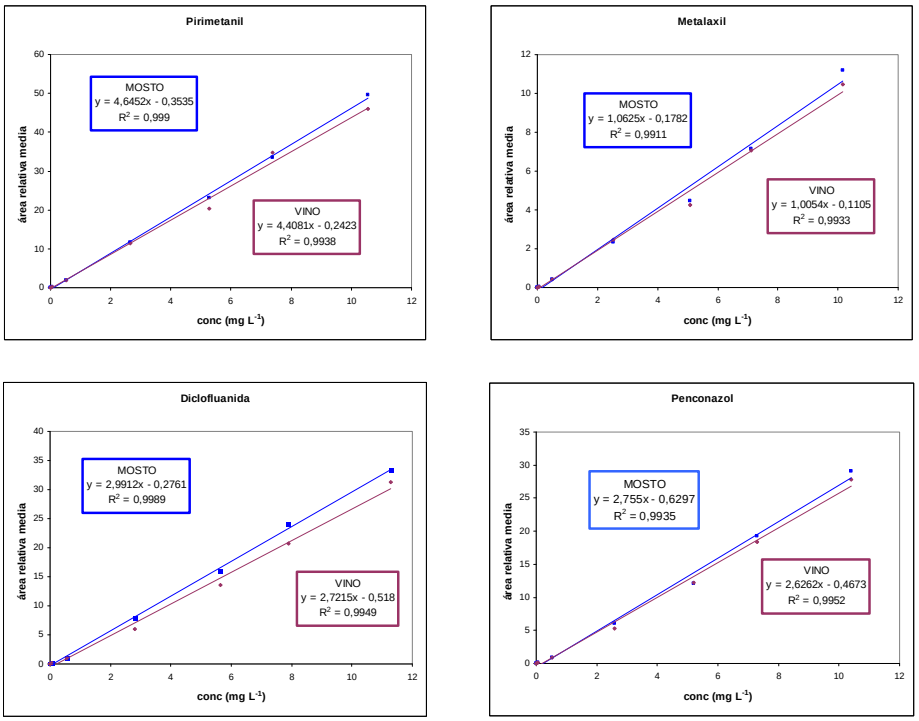


Figura V-4: *Rectas de calibrado en mosto y vino reales para cada uno de los compuestos*

2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA MOSTOS Y VINOS

2.1. Selección de las variables de extracción

Para el desarrollo del método basado en la extracción en fase sólida (solid phase extraction – SPE) se estudiaron dos tipos de sorbentes o fases, octadecilsilano 200 mg (LiChrolut RP-18) y poliestireno-divinilbenceno 200 mg (LiChrolut EN).

La puesta a punto de la metodología conlleva diferentes etapas: acondicionado de la fase, introducción de muestra, secado y limpieza de la fase, y elusión analitos. La primera de todas ellas es el acondicionado de la fase que se realiza eluyendo con 5 mL de metanol y seguidamente con 3 mL de agua ultrapura Milli Q.

El proceso de extracción se llevó a cabo en muestras de 5 mL de mosto y vino reales fortificadas a un nivel de concentración de 600 µg L^{-1} de cada fungicida objeto de estudio. Se evaluó la influencia de los siguientes aspectos: el volumen de muestra, la necesidad de una etapa de lavado, la composición de la disolución de lavado, el disolvente orgánico utilizado como eluyente y de volumen, el volumen de ruptura. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El rendimiento de extracción para cada compuesto se determina por comparación con los valores obtenidos con una disolución patrón de los fungicidas en metanol a la misma concentración. La cuantificación se realiza utilizando como estándar interno metribucina en concentración de 1 mg L^{-1}.

Con las mejores condiciones encontradas para cada tipo de fase sólida, volumen de muestra, volumen y composición en la etapa de lavado, eluyente y volumen de elución se propuso un método que ha sido validado y caracterizado para muestras reales de mosto y vino.

2.1.1 Eluyente y volumen de eluyente

El disolvente de elución junto con el tipo de fase sólida son esenciales para el método de extracción en fase sólida y dependen de la naturaleza química de los

analitos objeto de estudio. Seis disolventes orgánicos de diferente polaridad fueron evaluados para poder seleccionar el más adecuado para el método: hexano, cloroformo, acetato de etilo, metil-isobutilcetona (MIBK), acetona y metanol. Muestras de mosto (5 mL) fortificadas a un nivel de 600 µg L^{-1} de cada uno de los fungicidas fueron analizadas con cada disolvente. La elución se realizó con un volumen total de 5 mL estudiando la recuperación obtenida para cada fungicida por cada mL de eluyente que se añadía. Las Tablas V-13 y V-14 muestran las recuperaciones obtenidas para los dos tipos de fases estudiadas.

Tabla V-13: *Recuperaciones obtenidas con los diferentes disolventes en la fase RP-18 para cada mL de eluyente*

Fungicida		RECUPERACIÓN (%) RP-18					
		n-hexano	metanol	acetato de etilo	cloroformo	acetona	MIBK
Pirimetanil	R1	0.0	84.2	98.8	69.9	88.0	82.4
	R2	22.4	2.8	2.8	12.9	6.2	10.2
	R3	2.1	2.6	1.2	3.1	7.5	6.6
	R4	0.0	2.8	10.4	1.2	1.2	5.6
	R5	0.0	8.6	0.6	1.2	7.6	18.9
	total	**24.5**	**101.0**	**113.8**	**88.3**	**110.5**	**123.7**
Metalaxil	R1	0.0	99.3	102.5	80.4	82.6	97.2
	R2	19.2	2.0	5.3	11.6	7.8	21.9
	R3	4.4	4.3	0.0	0.0	22.0	15.9
	R4	0.0	3.9	15.4	0.0	1.7	17.0
	R5	0.0	11.4	0.0	0.0	5.8	26.9
	total	**23.6**	**120.9**	**123.2**	**92.0**	**119.9**	**178.9**
Diclofluanida	R1	5.3	125.5	137.4	97.2	132.4	181.9
	R2	70.1	3.3	2.7	8.3	6.9	22.5
	R3	35.4	2.6	1.5	24.0	3.1	17.2
	R4	16.7	9.4	10.1	0.9	0.6	17.1
	R5	0.0	8.0	0.9	1.5	2.8	14.9
	total	**127.5**	**148.8**	**152.6**	**131.9**	**145.8**	**253.6**
Penconazol	R1	0.0	128.2	111.4	84.6	74.3	107.2
	R2	11.1	3.2	3.7	75.9	10.9	11.8
	R3	0.0	2.7	1.1	0.0	43.8	4.2
	R4	0.0	2.6	21.4	0.0	1.8	2.8
	R5	0.0	16.2	0.0	0.0	6.3	4.2
	total	**11.1**	**152.9**	**137.6**	**160.5**	**137.1**	**130.2**

Tabla IV-14: *Recuperaciones obtenidas con los diferentes disolventes en la fase EN para cada mL de eluyente*

Fungicida		RECUPERACIÓN (%) EN					
		n-hexano	metanol	acetato de etilo	cloroformo	acetona	MIBK
Pirimetanil	R1	0.9	7.0	54.7	12.5	42.7	82.7
	R2	0.0	7.8	18.0	14.9	22.8	23.9
	R3	0.0	11.6	6.0	13.3	6.0	12.3
	R4	0.0	86.8	2.4	10.1	5.7	8.5
	R5	0.0	11.5	2.0	8.9	1.1	6.7
	total	**0.9**	**124.7**	**83.1**	**59.7**	**78.3**	**134.1**
Metalaxil	R1	5.7	33.3	68.7	44.4	85.5	99.3
	R2	0.0	22.7	16.9	20.6	16.8	21.9
	R3	0.0	19.7	8.2	12.7	2.9	18.1
	R4	0.0	107.3	4.1	5.5	4.8	16.7
	R5	0.0	7.4	2.5	8.1	0.0	10.4
	total	**5.7**	**190.4**	**100.4**	**91.3**	**110.0**	**166.4**
Diclofluanida	R1	1.4	89.9	99.3	40.5	89.3	179.3
	R2	0.9	20.0	18.5	29.9	23.6	74.4
	R3	1.7	20.2	4.6	18.8	1.4	37.0
	R4	2.1	135.0	1.7	11.3	3.3	28.4
	R5	28.8	13.4	0.9	10.7	2.1	27.4
	total	**34.9**	**278.5**	**125.0**	**111.2**	**119.7**	**346.5**
Penconazol	R1	0.0	28.2	72.3	29.8	75.0	91.9
	R2	12.5	18.6	14.8	20.8	22.2	19.8
	R3	0.0	15.5	4.4	13.4	6.4	8.4
	R4	0.0	133.8	1.9	5.1	3.7	3.2
	R5	0.0	8.7	0.0	4.0	2.1	0.0
	total	**12.5**	**204.8**	**93.4**	**73.1**	**109.4**	**123.3**

Con n-hexano se obtienen las recuperaciones más bajas en ambas fases, inferiores al 12.5 % en la fase EN y al 23.7 % en la fase RP-18, excepto para diclofluanida. En el resto de disolventes las recuperaciones oscilan entre 59.7 %, utilizando cloroformo y cartuchos Lichrolut-EN, y 346.4 % utilizando MIBK también en cartucho Lichrolut-EN. Se observa que con MIBK las recuperaciones obtenidas son muy superiores al 120 % en todos los casos. Con metanol como disolvente se obtienen valores elevados comprendidos entre 101.0 y 152.8 % para la fase RP-18 con la mayor recuperación en el primer mililitro de eluyente.

Para la fase EN los valores oscilan entre 124.7 y 278.5 % con la mayor recuperación en el cuarto mililitro de extracción.

Para acetato de etilo y acetona con la fase RP-18 ya en el primer mililitro de elución se obtienen recuperaciones comprendidas entre un 74.3 % y un 137.4 % respecto al total de los 5 mL que varía entre un 110.5 % y un 152.6 %. Respecto a la fase EN, con estos mismos disolventes, las recuperaciones oscilan entre 42.7 % y 99.3 % en el primer mililitro, y entre 78.3 y 125 % en el total de los 5 mL. Por estas razones se seleccionaron ambos disolventes para continuar el estudio de optimización del método. Dado que la mayor recuperación con estos eluyentes se obtiene ya en el primer mililitro y para el cuarto mililitro añadido la recuperación es superior al 97 %, se consideró un volumen total de 4 mL como volumen de elución. Con el fin de garantizar la completa elución se realizaron dos etapas de elución con 2 mL de disolvente orgánico (2 mL +2 mL).

2.1.2 Etapa de lavado

Los cartuchos se lavaron con una disolución mezcla de agua/metanol y para comprobar la influencia de esta etapa se estudiaron diferentes relaciones de agua/metanol en la disolución. 5 mL de muestra fortificada con los fungicidas en una concentración de 600 µg L^{-1} se hacen pasar a través de los cartuchos. Para este estudio se trabaja con dos muestras de diferente matriz: matriz acuosa de mosto y matriz hidroalcohólica de vino. De esta forma se puede observar la existencia o no del efecto que la presencia de alcohol en la matriz y en la mezcla de lavado tendría en la eficacia de extracción.

La disolución de lavado está formada por diferentes relaciones agua/metanol desde sólo agua a sólo metanol (10/0; 9/1; 7/3; 5/5; 3/7; 0/10). En las Tablas V-15 y V-16 se muestran las recuperaciones obtenidas para los fungicidas utilizando 4 mL (2+2 mL) de los eluyentes, acetato de etilo y acetona, y 2 mL como volumen de lavado de la mezcla seleccionada para cada una de las fases sólidas estudiadas en matrices mosto y vino.

En la fase RP-18 y en ambos disolventes de elución se observa que para relaciones en las cuales la proporción de metanol es mayor a la del agua el

rendimiento disminuye fuertemente. Al aumentar la proporción de metanol, se pierde cantidad de los fungicidas objeto de estudio en el lavado al ser éstos más solubles en este disolvente (The Pesticide Manual, 1997). En el resto de relaciones (10/0, 9/1, 7/3) los rendimientos de extracción son superiores al 85.0 % para los cuatro fungicidas y en ambas matrices.

En la fase EN el efecto de la presencia del metanol en la mezcla de lavado es menos acusado y solo cuando la relación es elevada (3/7 y 0/10) disminuye la recuperación. En el resto de relaciones los rendimientos de extracción son superiores al 60.0 % para los cuatro fungicidas y en ambas matrices.

Se observa un efecto más acusado entre mosto y vino cuando el eluyente es acetona, y en especial cuando la fase es LiChrolut EN. Se selecciona a partir de esta etapa acetato de etilo como eluyente.

Tabla V–15: *Recuperaciones con distintos lavados para RP-18*

LAVADO		% RECUPERACIÓN RP-18			
Relación agua / metanol	Matriz	Pirimetanil		Metalaxil	
		Acetato de etilo	Acetona	Acetato de etilo	Acetona
Sin lavado	Mosto	97.2	94.4	100.5	107.4
	Vino	101.6	88.8	102.1	95.1
10/0	Mosto	86.2	92.6	120.9	117.8
	Vino	86.3	114.4	97.6	106.5
9/1	Mosto	86.3	87.6	104.0	116.9
	Vino	88.3	83.8	103.9	91.7
7/3	Mosto	89.7	86.5	112.2	110.9
	Vino	86.6	86.6	101.3	93.6
5/5	Mosto	72.9	81.9	99.8	107.5
	Vino	79.7	80.6	117.0	97.8
3/7	Mosto	57.1	47.3	11.9	4.6
	Vino	57.5	43.5	17.6	4.8
0/10	Mosto	16.8	12.5	8.9	29.9
	Vino	14.3	4.5	6.1	1.5

LAVADO		% RECUPERACIÓN RP-18			
Relación agua / metanol	Matriz	Diclofluanida		Penconazol	
		Acetato de etilo	Acetona	Acetato de etilo	Acetona
Sin lavado	Mosto	109.0	112.3	115.5	128.6
	Vino	94.1	94.5	105.0	106.8
10/0	Mosto	113.6	93.0	101.4	115.2
	Vino	103.0	102.4	93.8	114.0
9/1	Mosto	100.3	89.9	98.4	114.4
	Vino	104.0	91.0	97.0	89.1
7/3	Mosto	106.4	92.2	111.5	114.5
	Vino	104.9	97.5	96.7	93.0
5/5	Mosto	96.2	90.7	92.9	109.2
	Vino	120.8	110.5	113.9	107.4
3/7	Mosto	42.7	25.0	79.3	75.2
	Vino	40.5	20.1	74.9	59.2
0/10	Mosto	24.9	6.7	31.5	55.7
	Vino	10.4	4.3	15.5	6.2

Tabla IV–16: *Recuperaciones con distintos lavados para la fase EN*

LAVADO		% RECUPERACIÓN EN			
Relación agua / metanol	Matriz	Pirimetanil		Metalaxil	
		Acetato de etilo	Acetona	Acetato de etilo	Acetona
Sin lavado	Mosto	81.5	80.1	99.1	105.6
	Vino	79.3	82.8	102.1	95.1
10/0	Mosto	69.3	83.1	75.7	117.8
	Vino	76.9	81.3	96.1	81.8
9/1	Mosto	65.8	85.1	78.0	121.2
	Vino	83.5	79.7	102.2	79.2
7/3	Mosto	91.7	94.1	97.3	125.9
	Vino	81.3	89.1	96.2	94.7
5/5	Mosto	58.4	74.9	107.3	127.7
	Vino	61.6	74.1	96.7	106.4
3/7	Mosto	77.2	88.0	106.7	120.0
	Vino	75.1	83.5	86.0	66.8
0/10	Mosto	50.5	61.5	30.8	43.9
	Vino	50.4	56.6	27.1	28.2

LAVADO		% RECUPERACIÓN EN			
Relación agua / metanol		Diclofluanida		Penconazol	
		Acetato de etilo	Acetona	Acetato de etilo	Acetona
Sin lavado	Mosto	114.9	118.7	117.0	113.3
	Vino	120.1	112.2	110.0	117.8
10/0	Mosto	91.7	93.5	72.4	96.7
	Vino	108.8	104.3	90.6	85.9
9/1	Mosto	91.3	94.6	72.4	99.2
	Vino	111.3	99.9	98.7	77.3
7/3	Mosto	102.0	102.1	92.8	102.2
	Vino	107.8	110.4	89.1	95.4
5/5	Mosto	83.6	95.0	90.5	92.7
	Vino	104.9	109.7	84.6	97.8
3/7	Mosto	98.7	95.6	107.5	95.3
	Vino	98.5	92.6	83.2	65.9
0/10	Mosto	46.8	49.8	54.9	66.7
	Vino	43.5	47.0	36.2	38.4

A continuación se llevó a cabo un estudio con diferentes volúmenes de lavado utilizando las mejores relaciones agua/metanol en cada fase, 9/1 para RP-18 y 7/3 para EN. La Tabla V-17 recoge las recuperaciones obtenidas al realizar lavados con 1, 2 y 5 mL.

Tabla V-17: *Recuperaciones con distintos volúmenes del lavado seleccionado para cada fase*

Compuesto	Matriz	**RP-18**	Agua / metanol (9/1)		**EN**	Agua / metanol (7/3)	
		1 mL	2 mL	5 mL	1 mL	2 mL	5 mL
Pirimetanil	Mosto	91.5	97.7	90.9	66.8	68.1	70.5
	Vino	89.4	96.2	90.7	71.0	72.4	73.2
Metalaxil	Mosto	105.4	106.5	108.7	94.3	97.7	100.2
	Vino	98.5	104.8	104.3	82.5	81.4	86.0
Diclofluanida	Mosto	92.7	94.7	93.0	69.3	68.3	75.9
	Vino	93.8	96.2	89.0	72.4	74.3	75.1
Penconazol	Mosto	96.4	98.3	94.5	89.9	88.9	88.5
	Vino	103.0	95.8	98.0	77.8	77.1	77.0

En la fase RP-18, las recuperaciones fueron mayores al 94.7 % y similares en las dos matrices para todos los compuestos.

La fase de ODS proporciona mejores resultados de extracción y con menores diferencias entre las dos matrices que la fase EN. Se escogió la fase RP-18 como la mejor opción para desarrollar el método de extracción en fase sólida. La etapa de lavado consistió en pasar a continuación de la muestra 2 mL de una mezcla de agua/metanol (9/1).

2.1.3 Volumen de ruptura

Un ensayo para la determinación del volumen de ruptura se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Hennio (2000). Consiste en ir incrementando el volumen de muestra que se pasa a través del cartucho, de tal manera que las concentraciones de las disoluciones deben ser tales que la cantidad a retener en el cartucho sea siempre la misma.

Mientras no se produzca la ruptura la cantidad retenida con el paso de la muestra permanece constante hasta que se produce la ruptura, momento en que la cantidad extraída se reduce por ser eluida parte de ella con la muestra.

El ensayo se llevó a cabo con muestras fortificadas con 1 µg de cada fungicida. Debido a la diferente composición de las muestras, disolución acuosa (mosto) y disolución hidroalcohólica (vino) el estudio se realiza con ambas matrices. El volumen de muestra se modificó para determinar el volumen de ruptura de cada compuesto desde 1 hasta 150 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V-18 tanto para matriz mosto como para vino. Las recuperaciones obtenidas para los volúmenes de 1 a 10 mL están entre 93.4 % y 107.5 % y se pueden considerar constantes para todos los fungicidas. Para pirimetanil, el rendimiento es constante hasta 50 mL. En 150 mL se produce la ruptura. Para el resto de compuestos, a partir de 10 mL, las recuperaciones comienzan a disminuir. En ninguno de los plaguicidas estudiados aparecen diferencias significativas en el comportamiento entre la matriz mosto y vino en el margen de volúmenes estudiados. De acuerdo con este hecho, ***5 mL*** se fijó

como un volumen de muestra apropiado para la SPE con fase RP-18 para todos los fungicidas considerados, porque la ruptura no se produce a este valor.

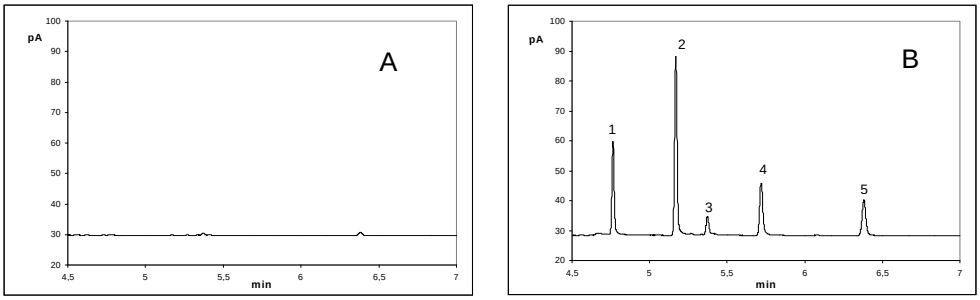
Tabla V-18: *Recuperaciones (DER, %) en el ensayo de volumen de ruptura*

Volumen (mL)	Pirimetanil		Metalaxil		Diclofluanida		Penconazol	
	Mosto	Vino	Mosto	Vino	Mosto	Vino	Mosto	Vino
1	104.5 (0.5)	103.4 (1.2)	104.2 (3.0)	96.7 (8.5)	105.8 (3.2)	99.9 (1.2)	106.0 (6.1)	101.7 (10.9)
2	99.1 (3.0)	102.2 (2.3)	97.7 (1.55)	94.3 (4.8)	97.7 (2.3)	95.0 (3.1)	95.7 (3.6)	98.0 (8.8)
5	98.4 (2.2)	96.7 (3.5)	105.8 (1.9)	105.2 (2.2)	93.4 (0.9)	95.2 (3.1)	96.9 (1.8)	99.3 (7.8)
10	107.5 (0.8)	105.9 (1.6)	105.8 (2.3)	102.3 (4.7)	103.3 (1.5)	100.2 (1.3)	103.6 (5.7)	101.3 (6.7)
25	94.3 (0.8)	93.0 (1.1)	95.6 (6.6)	98.5 (9.2)	87.9 (2.5)	88.3 (1.4)	95.4 (7.0)	90.1 (7.1)
50	98.2 (0.2)	99.0 (3.2)	88.5 (1.6)	65.3 (2.3)	78.3 (2.5)	88.7 (1.2)	83.5 (9.2)	86.2 (1.9)
150	86.2 (1.4)	80.4 (1.7)	84.1 (0.6)	58.7 (3.9)	77.1 (4.2)	77.3 (0.8)	67.1 (5.3)	73.6 (3.5)

2.2. Validación del método

2.2.1 Selectividad

La selectividad fue comprobada inyectando extractos de muestras de mosto y vino reales sin fortificar. Se puede deducir de las Figuras V-5 que no existen interferencias en los extractos de un mosto real y un vino real obtenidos de uvas tintas. Las condiciones propuestas generan picos cromatográficos estrechos y reproducibles.



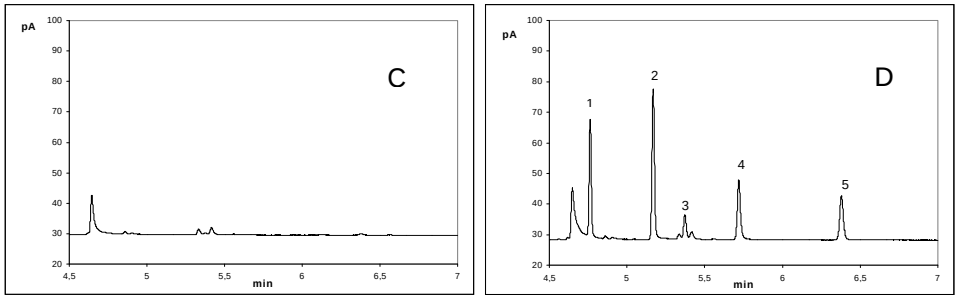


Figura V-5: *Cromatogramas GC-NPD de extractos obtenidos después de SPE-C18 de (A) mosto no fortificado; (B) mosto fortificado (600 µg L^{-1}). (C) vino no fortificado; (D) vino fortificado (600 µg L^{-1}). Identificación de picos: 1 Pirimetanil; 2 Metribucina (SI); 3 Metalaxil; 4 Diclofluanida; 5 Penconazol*

En la Figura V-6, se muestran los cromatogramas para el método GC-MS, que permite la confirmación de los fungicidas con buena resolución y no muestra picos interferentes.

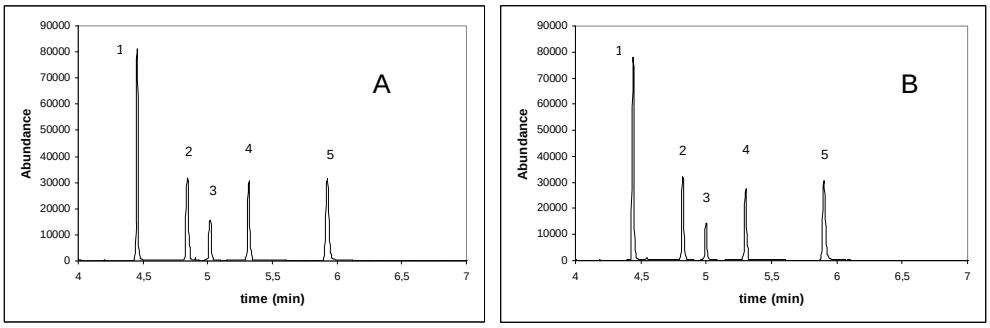


Figura V-6: *Cromatogramas GC-MS obtenidos después de SPE-C18 de (A) mosto fortificado (600 µg L^{-1}); (B) vino fortificado (600 µg L^{-1}). Identificación de picos: 1 Pirimetanil; 2 Metribucina (SI); 3 Metalaxil; 4 Diclofluanida; 5 Penconazol*

2.2.2 Calibración, linealidad, límites de detección y cuantificación

Con el objetivo de estimar la linealidad de las rectas de calibrado y reducir los errores cuantitativos procedentes del efecto matriz se pueden utilizar diferentes métodos, como adición estándar o calibrado externo con los patrones disueltos en un extracto de una muestra no fortificada. Sin embargo, en este estudió se utilizó una calibración en extracto de matriz ("*matrix matched calibration*") con patrón interno (Sanz-Asensio y col. 1999; Bernal y col. 1997).

Una calibración en matriz consiste en obtener extractos de muestras de mosto y vino reales procedentes de uvas sin tratar, que son fortificados con cantidades variables de los fungicidas (0.01 a 10.0 mg L^{-1}). Las rectas de calibrado para los fungicidas fueron realizadas representando el área relativa con respecto al patrón interno metribucina frente a la concentración de analito usando un total de siete extractos de mosto y vino exentos de fungicidas. Los parámetros de regresión lineal, coeficientes de correlación (r) de las rectas y repetibilidad de las áreas relativas de los picos para la determinación de los fungicidas en las muestras de mosto y vino real se presentan en la Tabla V-19.

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se determinaron inyectando un número de extractos de muestras reales de mosto y vino no fortificadas (n=6) y midiendo la magnitud del ruido de fondo de las respuesta analítica. LD y LC se estimaron como las concentraciones obtenidas con el valor medio del ruido más tres veces o diez veces su desviación estándar, respectivamente (Miller y Miller 2002; Nozal y col. 2005). Los límites de detección y cuantificación más bajos corresponden a pirimetanil, 0.08 y 0.09 µg L^{-1}, mientras que los límites superiores se encuentran para metalaxil, 7.66 y 9.34 µg L^{-1}.

Se realizó un calibrado en extracto ("matrix matched") para el método de confirmación GC-MS. En el rango de 0.01 a 10.00 mg L^{-1} en extractos de mosto y vino, se obtuvo también una excelente linealidad (coeficientes de correlación > 0.9995). El método de GC-MS mostró límites de detección entre 0.02 y 1.07 µg L^{-1}, y de cuantificación entre 0.05 y 3.58 µg L^{-1} en mosto y vino, para todos los compuestos.

Tabla V-19: *Características analíticas del método SPE-GC-NPD en muestras reales*

Compuesto	Matriz	Intervalo lineal (µg L^{-1})	LD (µg L^{-1})	LC (µg L^{-1})	Ecuación [a]	R^2	DER[b] ,%
Pirimetanil	Mosto	1.07- 10000	0.08	1.07	AR = 1.566 (±0.008)C-0.046 (± 0.037)	0.9999	2.34 (100.0)
	Vino	1.15 – 10560	0.09	1.15	AR = 1.542 (±0.013)C–0.006 (±0.060)	0.9997	1.84 (100.0)
Metalaxil	Mosto	9.02 - 10160	7.70	9.02	AR = 0.417 (±0.001)C–0.011 (±0.006)	0.9999	4.48 (99.8)
	Vino	9.34 - 10160	7.66	9.34	AR = 0.429 (±0.008)C–0.003 (±0.035)	0.9999	3.38 (99.8)
Diclofluanida	Mosto	3.85 - 11280	2.65	3.85	AR = 1.180 (±0.002)C+0.013 (±0.007)	0.9999	2.29 (100.0)
	Vino	3.99 - 11280	2.74	3.99	AR = 1.165 (±0.016)C–0.002 (±0.074)	0.9992	2.04 (100.0)
Penconazol	Mosto	0.28 - 10400	0.11	0.28	AR = 1.125 (±0.006)C–0.040 (±0.034)	0.9999	2.76 (114.4)
	Vino	0.27 - 10400	0.11	0.27	AR = 1.118 (±0.012)C-0.013 (±0.065)	0.9995	5.63 (114.4)

[a] AR: Área relativa; C: Concentración
[b] Calculado a partir de cuatro medidas (n=4). Concentración (µg L^{-1}) entre paréntesis

2.2.3 Recuperación, exactitud y precisión

Considerando el criterio de aceptabilidad de obtener recuperaciones entre 70 y 120 % con precisiones (expresadas como desviación estándar relativa) del 20 % (Documento Nº SANCO/2007/3131), el método analítico desarrollado presenta recuperaciones y precisiones (repetibilidad) dentro del rango de aceptabilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de trabajo en un corto intervalo de tiempo. La repetibilidad se expresa como una estimación de la desviación estándar relativa (DER) de un número de muestras estadísticamente significante.

Se prepararon por triplicado muestras de mosto y vino fortificadas con tres niveles de concentración para cada pesticida: 0.1, 1.0 y 5.0 mg L^{-1}. Se realizaron tres determinaciones para una misma muestra real de mosto y vino fortificada. Los resultados muestran que la desviación estándar relativa fue menor de 10 %, entre 0.5 y 9.2 % (Tabla V-20).

Tabla IV-20: *Recuperaciones (DER, %) obtenidas en los tres niveles de fortificación*

Fungicida	0.1 mg L^{-1}		1.0 mg L^{-1}		5.0 mg L^{-1}	
	Mosto	Vino	Mosto	Vino	Mosto	Vino
Pirimetanil	100.0 (2.3)	99.9 (2.5)	96.6 (1.3)	94.6 (1.9)	98.7 (0.5)	95.5 (2.1)
Metalaxil	106.6 (4.5)	105. 9 (4.3)	105.7 (2.2)	105.9 (3.1)	105.0 (5.4)	103.8 (3.6)
Diclofluanida	93.4 (2.4)	95.2 (2.6)	90.1 (1.3)	92.2 (1.6)	91.4 (2.2)	91.3 (1.8)
Penconazol	98.3 (9.2)	98.6 (8.4)	94.2 (7.4)	98.4 (2.2)	98.2 (7.4)	101.0 (5.3)

La recuperación y exactitud se determinaron en muestras reales fortificadas de mosto y vino a los tres niveles de concentración mencionados anteriormente. Las recuperaciones medias están en un rango entre 90,1 y 106.6 %. La Tabla V-21 muestra las medias de los resultados obtenidos en los dos tipos de matriz y niveles. El análisis de la varianza realizado con los datos reveló la ausencia de diferencias significativas (p>0.05) entre los niveles ensayados de fortificación y entre los dos tipos de muestra o matriz.

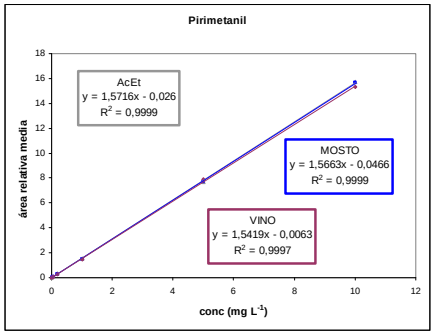
Tabla IV-21: *Recuperación media en las dos matrices. Recuperación media total (DER, %)*

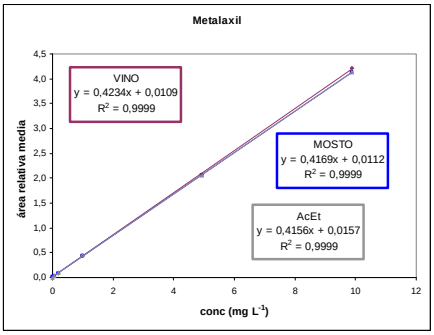
Fungicida	Mosto	Vino	Todos
Pirimetanil	98.4 (1.7)	96.7 (2.9)	97.6 (2.4)
Metalaxil	105.8 (0.8)	105.2 (1.1)	105.5 (1.0)
Diclofluanida	93.4 (2.4)	95.2 (2.6)	92.3 (2.0)
Penconazol	96.9 (2.4)	99.3 (1.4)	98.1 (2.2)

2.3. Evaluación del efecto matriz

El cambio en la composición de las muestras durante la fermentación alcohólica hace necesario realizar un estudio del posible efecto matriz en el proceso de tratamiento de las muestras. Se ha estudiado el posible efecto de este cambio en el proceso de extracción en fase sólida. Para ello, se estudió la respuesta lineal del método en las matrices: extractos de mosto y vino, y disolvente acetato de etilo. La similitud en las rectas de calibrado en las matrices indicaría que no existe efecto matriz en la extracción de los compuestos ni en la respuesta del detector. Las rectas obtenidas se muestran en las Figura V-7.

Se realizó un test *t-Student* de hipótesis para la comparación dos a dos de las pendientes de las líneas de regresión obtenidas para cada uno de los fungicidas estudiados, con un nivel de significación del 95 %. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre las rectas de calibrado en mosto y vino para pirimetanil, metalaxil, diclofluanida y penconazol. Se puede concluir que no hay efecto matriz en el análisis de estos compuestos en mosto y vino.





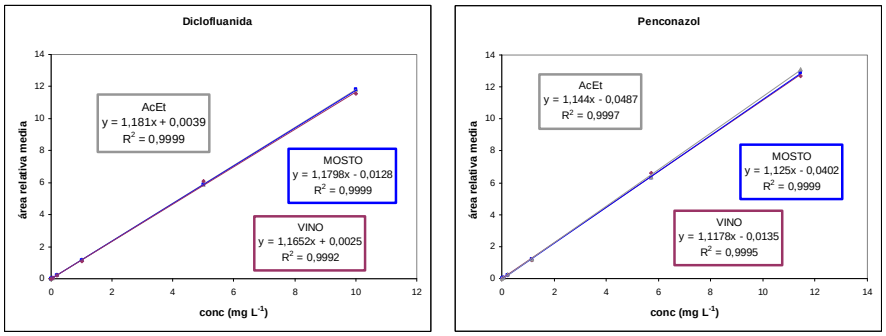


Figura IV-7: *Rectas de calibrado en acetato de etilo, y en extractos de mosto y vino reales para cada uno de los compuestos*

3. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EN MATRICES REALES

Una vez validados los métodos de extracción para muestras reales, a continuación se comparan los dos métodos, extracción líquido-líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE). En las siguientes Figuras V-8 y V-9 se representan las recuperaciones medias obtenidas con los dos métodos de extracción, para todos los niveles de concentración, y para cada uno de los compuestos fitosanitarios estudiados en matriz mosto y matriz vino.

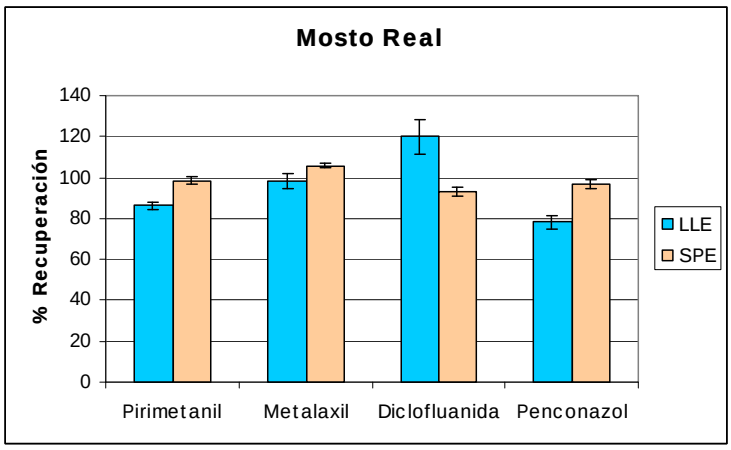


Figura IV-8: *Recuperaciones medias obtenidas para cada compuesto en mosto real con los dos métodos de extracción*

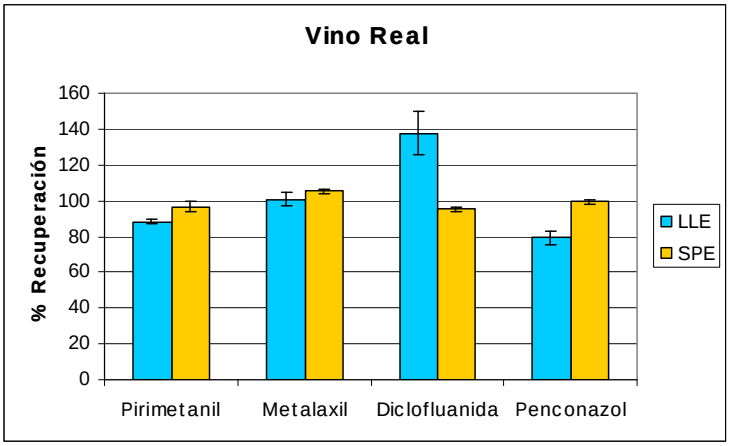


Figura IV-9: *Recuperaciones medias obtenidas para cada compuesto en mosto real con los dos métodos de extracción*

Para pirimetanil se aprecian desviaciones similares entre los dos métodos, pero en el caso de la SPE se obtienen mayores rendimientos de extracción.

Se obtuvieron recuperaciones ligeramente superiores y desviaciones ligeramente inferiores para metalaxil en el caso de SPE.

Para diclofluanida, los porcentajes de recuperación obtenidos con LLE son muy superiores al 100 %. Estos errores por exceso se deben al efecto de la matriz cromatográfico. Además, las recuperaciones son muy diferentes en las dos matrices objeto de estudio, lo que indica que la extracción depende de la composición de la matriz. Este efecto no se observa con SPE, siendo un método más preciso y con rendimientos superiores al 90 %.

En el caso de penconazol, con SPE se obtienen recuperaciones mayores y mayores reproducibilidad.

No se observa efecto matriz para los fungicidas pirimetanil, metalaxil, diclofluanida y penconazol con SPE. Diclofluanida presenta un marcado efecto matriz con LLE.

Los valores de recuperación se muestran en la Tabla V-22.

Tabla V-22: *Recuperación media (DER, %) en las dos matrices*

Fungicida	LLE		SPE	
	Mosto	Vino	Mosto	Vino
Pirimetanil	86.2 (1.9)	88.0 (1.4)	98.4 (1.7)	96.7 (2.9)
Metalaxil	98.3 (3.7)	100.6 (3.7)	105.8 (0.8)	105.2 (1.1)
Diclofluanida	120.0 (7.0)	137.8 (8.6)	93.4 (2.4)	95.2 (2.6)
Penconazol	78.3 (4.3)	79.4 (4.9)	96.9 (2.4)	99.3 (1.4)

La extracción en fase sólida asegura la extracción prácticamente cuantitativa de los compuestos con recuperaciones mayores a 93.4%), habiendo evitado el efecto matriz para diclofluanida.

En cuanto a límites de cuantificación y sensibilidad, los dos métodos presentan características similares.

También se puede realizar una comparación en función de ventajas e inconvenientes operacionales, que en muchos casos son cuestiones muy influyentes y decisivas. El método de extracción líquido-líquido presenta ventajas como la utilización de material convencional, pero tiene como inconvenientes el consumo elevado de disolventes orgánicos y que el proceso resulta largo y tedioso. El método de extracción en fase sólida presenta ventajas como ahorro de tiempo, reducción en el uso de disolventes, eliminación de emulsiones y un alto potencial para la automatización. Como inconveniente se encuentra la necesidad de un material específico.

Con todo ello, se puede concluir que el método de extracción en fase sólida con cartuchos de octadecilsilano es el más adecuado para el análisis de los fungicidas estudiados en muestras reales de vinificación.

Los límites de detección y cuantificación para cada matriz analizada se comparan con los LMRs establecidos por la Unión Europea, US Environmental Protection Agency (EPA) y Codex Alimentarius (España), en la Tabla V-23. Cabe destacar que estos valores están referidos al fruto de la vid y no a los productos mosto o vino. Considerando estos valores los límites de cuantificación obtenidos

están muy por debajo de los Lars, siendo el método es adecuado para determinar estos fungicidas en mosto y en vino.

Tabla IV-23: *Valores de los Límites Máximos de Residuos (LMRs) en uvas (µg g^{-1}) de varias agencias*

Compuesto	LMR Legislación Española	LMR Unión Europea	LMR EPA
Pirimetanil	5	5	5
Metalaxil	1	1	2
Diclofluanida	10	10	n.d.
Penconazol	0.2	0.2	n.d.

n.d. = no definido

4. EXTRACCIÓN SÓLIDO - LÍQUIDO PARA UVAS

Con el fin de determinar y cuantificar los residuos de los fungicidas objeto de estudio en uvas de vinificación, a continuación se procede a desarrollar una metodología analítica para la extracción de los compuestos en diferentes partes o fracciones de la uva, superficie exterior, piel (u hollejo) y pulpa. Esta metodología servirá para el análisis de muestras de uvas tratadas en campo (Capítulo VI de esta memoria) así como para la realización de un estudio en el laboratorio sobre la distribución y la retención de los compuestos objeto de estudio en las uvas.

4.1. Procedimiento de extracción

Se han propuesto tres procedimientos de extracción considerando concentraciones residuales de fungicidas en tres partes del fruto:

a) Superficie o parte exterior del fruto. Se pueden encontrar los residuos de plaguicidas retenidos por adsorción sobre la piel.

b) Hollejo. Se encuentran aquellos residuos de plaguicidas retenidos por absorción sobre la piel de la uva.

c) Pulpa, donde pueden aparecer residuos por penetración al interior del fruto.

Durante los años 2005 y 2006 se vendimiaron racimos de uvas de la variedad Tempranillo en la zona vitícola de Rioja Baja, sobre los cuales no se había realizado aplicación de producto fitosanitario alguno y que se consideran uvas testigo o control para poder realizar los estudios analíticos de los compuestos. Los granos de uvas seleccionados en cada racimo (parte superior, media e inferior) fueron congelados a –20 ºC en botes de 150 mL con 75 granos en cada bote.

Antes de la utilización de las uvas, los botes fueron mantenidos en frigorífico a 4 ºC durante 24 horas para la descongelación de las uvas. Para su manipulación se mantienen durante una hora a temperatura ambiente. Las uvas se pesaron y se procesaron según los métodos que se explican a continuación.

4.1.1 Lavado de la superficie (método 1)

La recuperación de los residuos en la parte exterior o superficie de la baya se lleva a cabo por una simple disolución de los mismos en agua mediante lavado con agua corriente. 50 mL de agua corriente se añadieron a 25 g de uvas en un vaso de precipitados de 250 mL de volumen, cubriéndolos completamente para disolver el posible residuo de fungicida que queda en la superficie o parte exterior de la baya. El vaso se mantuvo en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos de agitación a temperatura ambiente. Para asegurar la completa disolución de los fungicidas de la parte exterior se realizaron cuatro lavados sucesivos de uvas tratadas. El análisis cromatográfico posterior no mostró señal alguna a partir del segundo lavado. El método propuesto supone un lavado con 50 mL de agua del grifo. El agua se concentró hasta 5 mL en rotavapor para un posterior análisis por extracción en fase sólida (SPE), método desarrollado en el Apartado 2 de este Capítulo.

4.1.2 Extracción de fungicidas retenidos en el hollejo (método 2)

Los residuos que han sido retenidos por el hollejo se recuperan mediante una extracción con disolvente orgánico. Una vez lavadas las bayas y retirada el agua de lavado, se dejan secar sobre papel de filtro a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las uvas lavadas y secas se introducen con 50 mL de acetato de etilo en un vaso de precipitados de 250 mL. El vaso se introduce en el baño de ultrasonidos durante un tiempo de 30 minutos. Para asegurar la completa extracción en la piel, se realizaron cuatro extracciones consecutivas de uvas tratadas, con 50 mL de disolvente y 30 minutos en baño de ultrasonidos. Los extractos fueron inyectados en el cromatógrafo de gases. No se observó ninguna señal a partir de la tercera extracción. El método propuesto para los hollejos supone dos extracciones con 50 mL de acetato de etilo durante 30 minutos en ultrasonidos para cada extracción. Los dos extractos se combinan, se secan con Na_2SO_4 anhidro y se filtran a través de lana de vidrio para ser concentrados bajo corriente de nitrógeno en Turbo Vap® hasta 5 mL, y posteriormente ser analizados por cromatografía de gases.

4.1.3 Extracción de fungicidas en la baya

Después de haber eliminado los residuos presentes en la piel, tanto por disolución como por extracción, se recuperan aquellos que han sido retenidos en el interior de la baya, en la pulpa, mediante una extracción con disolventes orgánicos. 25 mL de acetato de etilo se añadieron a los 25 g de uvas secadas en papel de filtro durante 10 minutos a temperatura ambiente, después de retirar el acetato de etilo para la extracción sobre los hollejos. Las uvas se estrujaron durante 2 minutos con un homogeneizador Heidolph® Silent Crusher y después se centrífugó a 6000 rpm durante 15 minutos. Para asegurar la completa extracción, se realizaron tres extracciones consecutivas de uvas tratadas, con 25 mL de disolvente de 2 minutos con homogeneizador. Los extractos fueron inyectados en el cromatógrafo de gases. No se observó ninguna señal a partir de la segunda extracción. El método propuesto para los hollejos supone una extracción con 25 mL de acetato de etilo durante 2 minutos con homogeneizador. La fase líquida fue secada con sulfato de sodio anhidro y filtrada por lana de vidrio. El extracto se concentró hasta 5 mL bajo corriente de nitrógeno en Turbo Vap® y posteriormente se analizaron por cromatografía de gases.

4.2. Validación de los métodos

4.2.1 Selectividad

La selectividad del método se determinó inyectando extractos de uvas (no tratadas) fortificados con los fungicidas objeto de estudio. La Figura V-10 muestra que no hay interferencias en los extractos obtenidos de uvas tintas en un cromatograma GC-NPD. Las condiciones propuestas proporcionan picos cromatográficos estrechos y reproducibles. En la Figura V-11 se muestra un cromatograma GC-MS, que permite la confirmación de los fungicidas con buena resolución y sin la presencia de picos interferentes también en extractos de uva tinta.

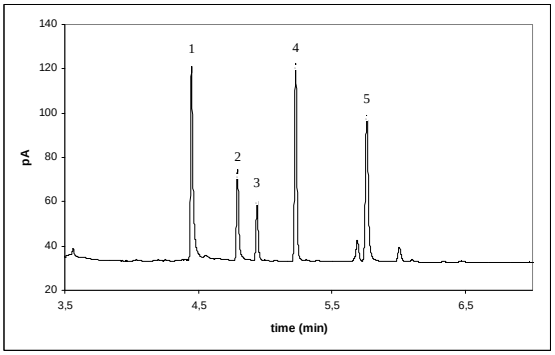


Figura V-10: *Cromatograma GC-NPD de un extracto fortificado de uvas tintas (0.25 mg kg^{-1}). Identificación de los picos: 1 Pirimetanil; 2 Metribucina (SI); 3 Metalaxil; 4 Diclofluanida; 5 Penconazol*

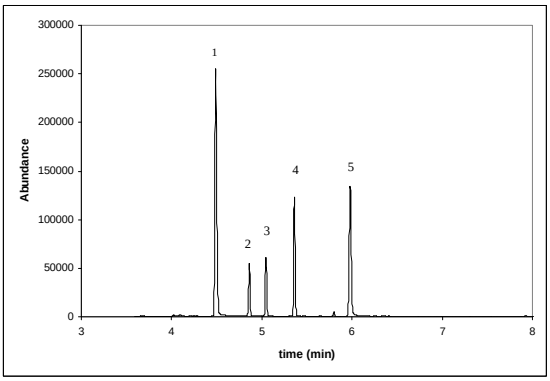


Figura V-11: *Cromatograma GC-MS de de un extracto fortificado de uvas tintas (0.25 mg kg^{-1}). Identificación de los picos: 1 Pirimetanil; 2 Metribucina (SI); 3 Metalaxil; 4 Diclofluanida; 5 Penconazol*

4.2.2 Calibración, linealidad, límites de detección y cuantificación

Diferentes métodos se pueden utilizar para estimar la linealidad de las rectas de calibrado y reducir los errores cuantitativos causados por el efecto matriz (Documento Nº SANCO/2007/3131). Las disoluciones estándar de calibrado se prepararon en tres matrices diferentes: en los extractos obtenidos por SPE del agua de lavado de uvas sin tratar; en los extractos de disolvente acetato de etilo de uvas sin tratar; y los estándares para la pulpa se obtuvieron adicionando

disoluciones patrón de fungicida a extractos de uvas trituradas sin tratar. Esto es lo que se llama una *matrix-matched calibration*.

Las rectas de calibrado se realizaron utilizando siete diferentes concentraciones de cada analito, con tres replicas para cada punto y se analizaron por GC-NPD. La linealidad se estimó por un análisis de regresión lineal y el método de mínimos cuadrados. Las rectas de calibrado para los fungicidas se realizaron representando el área relativa respecto al estándar interno metribucina frente a la concentración de analito. Se obtuvo una buena linealidad para todos los compuestos en todo el rango de concentraciones estudiadas con coeficientes de correlación superiores a 0.997. El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se determinaron inyectando un número de extractos de uvas no tratadas (n=6) y midiendo la magnitud del ruido de fondo de la respuesta analítica. LD y LC se estimaron como las concentraciones obtenidas con el valor medio del ruido más tres veces o diez veces su desviación estándar, respectivamente. La Tabla V-24 resume los parámetros estadísticos obtenidos con la regresión lineal y las repetibilidades de las áreas de pico para cada uno de los compuestos en cada uno de los métodos de calibrado. El extremo inferior del intervalo lineal corresponde al límite de cuantificación.

Para el método de confirmación CG-MS se realizaron los mismos calibrados en las tres matrices. Se obtuvo también una excelente linealidad con coeficientes de correlación superiores a 0.9997. El método de confirmación GC-MS mostró unos LD y LC en uvas por debajo de 0.41 y 1.36 µg kg^{-1}, respectivamente para todos los fungicidas, valores considerablemente por debajo de los LMRs legislados.

Tabla V-24: *Características analíticas de la metodología desarrollada en uva tinta por GC-NPD*

Compuesto	Matriz	Intervalo lineal (µg kg^{-1})	LD (µg kg^{-1})	LC (µg kg^{-1})	Ecuación [a]	R^2	DER[b] ,%
Pirimetanil	Agua lavado	0.25 - 2000	0.04	0.25	AR = 1.599 (± 0.016) C-0.017(± 0.066)	0.9997	9.37 (20.0)
	AcEt	0.17- 2000	0.01	0.17	AR = 1.787 (±0.015)C–0.077 (±0.063)	0.9997	4.69 (20.0)
	Uva	4.94 - 1400	2.46	4.94	AR = 3.229 (±0.125)C–0.046 (±0.037	0.997	4.36 (20.0)
Metalaxil	Agua lavado	1.82 - 1976	1.66	1.82	AR = 0.429 (±0.002)C+0.436(±0.393)	0.9995	7.30 (19.9)
	AcEt	1.48 - 1976	1.05	1.48	AR = 0.469 (±0.003)C+0.013 (±0.028)	0.9998	2.52 (19.9)
	Uva	7.70 - 1383	5.64	7.70	AR = 0.906 (±0.024)C+0.004 (±0,014)	0.998	6.75 (19.9)
Diclofluanida	Agua lavado	0.88 - 2000	0.67	0.88	AR = 0.870(±0.009)C + 0.131(±0.075)	0.9996	7.67 (20.0)
	AcEt	0.53 - 2000	0.42	0.53	AR = 1.090(±0.022)C–0.084 (±0.038)	0.9995	2.30 (20.0)
	Uva	5.96 - 1400	3.48	5.96	AR = 2.506(±0.091)C–0.014(±0.089)	0.997	2.55 (22.9)
Penconazol	Agua lavado	0.15 - 2288	0.05	0.15	AR = 1.014 (±0.006)C-0.062 (±0.029)	0.9998	11.4 (22.9)
	AcEt	0.05 - 2288	0.02	0.05	AR = 1.205 (±0.011)C–0.040 (±0.053)	0.9997	3.48 (22.9)
	Uva	5.38 - 1601	2.92	5.38	AR = 2.047 (±0.079)C-0.348(±0.283)	0.997	8.71 (22.9)

[a] AR: Área relativa; C: Concentración
[b] Calculado a partir de cuatro medidas (n=4). Concentración (µg kg^{-1}) entre paréntesis

4.2.3 Recuperación, precisión y exactitud

Como se ha comentado en el Apartado 2.2.3 del Capítulo V, se consideran los criterios establecidos por el Documento SANCO para el análisis de pesticidas. (Menkinssoglu-Spiroudi y Fotopoulou 2004; Documento Nº SANCO/2007/3131). Los métodos analíticos desarrollados en este estudio presentan recuperaciones y precisiones (repetibilidad) dentro del rango de aceptabilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de trabajo dentro de un corto intervalo de tiempo.

La utilización de SPE en el método 1, disolución de fungicidas presentes en la parte exterior de la baya tras el lavado en agua corriente, presentó recuperaciones mayores del 90.1% en los tres niveles de fortificación (0.1, 1.0 y 5.0 mg L^{-1}) con repetibilidades menores del 7.0 % (expresadas como Desviación Estándar Relativa). El análisis de la varianza (ANOVA) realizado con los datos mostró la ausencia de diferencias significativas entre los tres niveles de concentración. En la Tabla V-25 se muestran las recuperaciones encontradas para tres niveles de fortificación de los fungicidas en el agua de lavado.

Tabla V-25: *Recuperaciones medias y precisión (repetibilidad expresada como DER, % entre paréntesis) en el agua de lavado en tres niveles de (n=3)*

Compuesto	Nivel de fortificación en agua corriente		
	0.1 mg L^{-1}	1.0 mg L^{-1}	5.0 mg L^{-1}
Pirimetanil	93.2 (7.0)	91.2 (1.8)	95.3 (2.3)
Metalaxil	94.3 (4.9)	90.1 (3.7)	93.7 (1.5)
Diclofluanida	93.9 (5.5)	92.4 (2.4)	91.8 (3.6)
Penconazol	91.8 (4.3)	93.5 (5.9)	94.6 (2.7)

En el método 3, extracción de los fungicidas en la pulpa, las muestras de uvas tintas Tempranillo no tratadas (25 g) fueron fortificadas con tres concentraciones diferentes de los pesticidas (20, 200 y 1000 μg kg^{-1}) y

analizadas por triplicado. Las muestras fortificadas se dejaron durante una hora antes de la extracción para permitir que la disolución de fortificación penetrara en dichas muestras. La recuperación y la exactitud del método se determinaron en uvas no tratadas fortificadas con los tres niveles de concentración mencionados anteriormente. La Tabla V-26 muestra las recuperaciones medias obtenidas en el método 3. Los valores de recuperación para todos los fungicidas fueron superiores a 70%, entre 70.9 y 108.4 %, y las Desviaciones Estándar Relativas estaban por debajo de 10%, entre 2.1 y 9.5%. El análisis de la varianza (ANOVA) realizado con los datos muestra que no existen diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tres niveles de concentración estudiados.

***Tabla V-26**: Recuperaciones medias y precisión (repetibilidad expresada como DER, % entre paréntesis) en uvas en tres niveles de (n=3)*

Compuesto	Nivel de fortificación en uvas		
	20 µg kg^{-1}	200 µg kg^{-1}	1000 µg kg^{-1}
Pirimetanil	91.9 (9.1)	87.8 (4.5)	90.9 (6.9)
Metalaxil	105.0 (4.3)	108.4 (4.7)	104.4 (6.9)
Diclofluanida	74.3 (2.1)	72.7 (4.2)	70.9 (9.5)
Penconazol	84.3 (4.5)	83.6 (2.3)	84.0 (6.3)

4.2.4 Evaluación del efecto matriz

Para determinar si existe una respuesta diferente entre los estándares en los diferentes extractos (*matrix-matched*) se realizó un test *t* de Student para comparar las pendientes de las líneas de regresión obtenidas para cada compuesto y para cada matriz. Los resultados de este test confirmaron que todas las pendientes fueron significativamente diferentes (con un nivel de confianza del 95%).

La Tabla V-24 también muestra la importancia del efecto de la matriz de la pulpa en la respuesta cromatográfica de los fungicidas. Además, la determinación de residuos por el uso de una calibración en matriz (*matrix-*

matched calibration) está recomendada por *Quality control procedures of pesticide residues analysis* de la Unión Europea (Document Nº SANCO/2007/3131). En la Figura V-12 se muestran las rectas obtenidas para los cuatro compuestos por los tres métodos y para cada una de las matrices.

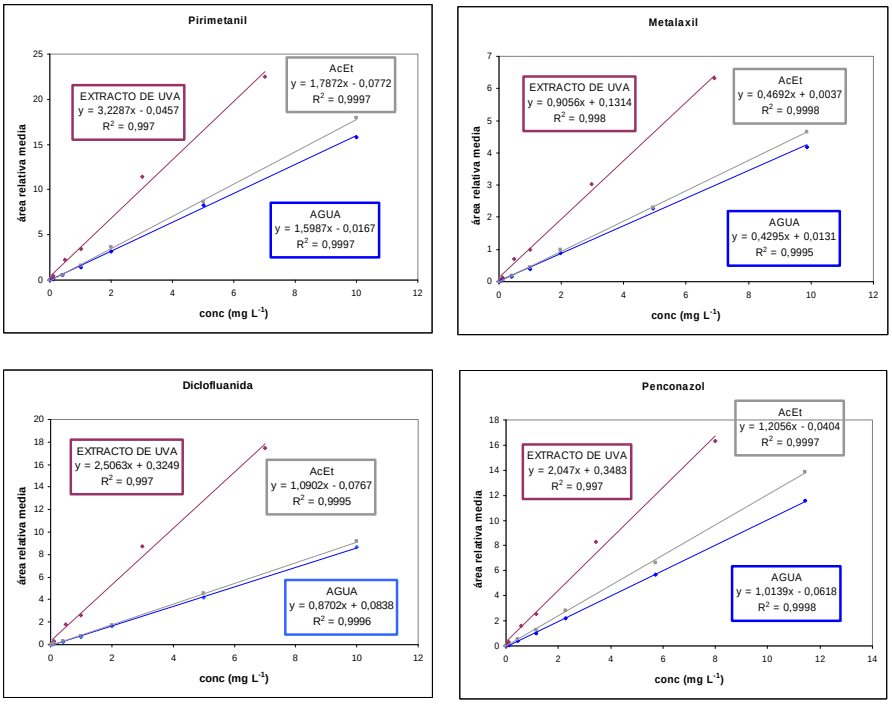


Figura V-12: *Rectas de calibrado en acetato de etilo, y en extractos de mosto y vino reales para cada uno de los compuestos*

4.3 Estudio de retención de los fungicidas en uvas tintas

La retención de los fungicidas se estudió sumergiendo 25 g de uvas enteras en 50 mL de disoluciones acuosas fortificadas con tres concentraciones diferentes de los compuestos a estudiar (1.0, 5.0 y 10.0 mg L^{-1}, que corresponden a 2.0, 10.0 y 20.0 µg g^{-1}, respectivamente). Estas concentraciones son similares o superiores a los LMRs fijados por la Unión Europea. Los diferentes ensayos se mantuvieron en la oscuridad a 4 ºC durante 1, 3, 7, 13 y 21 días (el plazo de seguridad más largo para todos los compuestos). Se

realizaron tres réplicas de cada ensayo. La cantidad de residuos presentes en las uvas enteras fue determinada por la metodología desarrollada (métodos 1, 2, y 3) en el Apartado 4.1 de este Capítulo. La cantidad total retenida se calculó como la suma de los resultados de la aplicación de los tres métodos. Por último, se calculó el porcentaje de retención de cada compuesto en relación a su concentración en la disolución acuosa. La Tabla V-27 muestra los resultados de cada compuesto para cada una de las concentraciones y cada uno de los períodos de tiempo en que han estado en contacto las uvas.

Tabla V-27: *Residuos (µg g^{-1}) y porcentaje de retención en uvas que han estado en contacto 1, 3, 7, 13 y 21 días con disoluciones de fungicidas de tres concentraciones (2, 10 y 20 µg g^{-1})*

PIRIMETANIL

Días	2 µg g^{-1}		10 µg g^{-1}		20 µg g^{-1}	
	µg g^{-1} (DER,%)	%	µg g^{-1} (DER,%)	%	µg g^{-1} (DER,%)	%
1	0.43 (6.2)	21.6	1.82 (2.2)	18.2	3.36 (2.8)	15.8
3	0.56 (5.3)	28.1	2.46 (7.6)	24.6	4.47 (6.4)	22.9
7	0.96 (2.5)	48.1	4.49 (7.0)	44.9	8.48 (2.6)	42.4
13	1.14 (4.9)	57.1	5.47 (3.8)	54.8	10.7 (5.2)	53.6
21	1.44 (6.2)	72.3	7.14 (7.7)	71.4	14.7 (2.8)	73.5

METALAXIL

Días	2 µg g^{-1}		10 µg g^{-1}		20 µg g^{-1}	
	µg g^{-1} (DER,%)	%	µg g^{-1} (DER,%)	%	µg g^{-1} (DER,%)	%
1	0.23 (9.9)	11.4	0.92 (2.4)	9.2	1.44 (1.8)	7.2
3	0.34 (8.2)	16.8	1.57 (4.6)	15.7	3.10 (3.4)	15.5
7	0.55 (10)	27.8	2.89 (4.6)	28.9	6.43 (1.8)	32.2
13	1.08 (5.2)	53.8	5.29 (9.3)	52.9	11.3 (1.7)	56.7
21	1.78 (3.9)	89.0	8.50 (5.8)	85.0	17.9 (5.8)	89.5

DICLOFLUANIDA

Días	2 µg g^{-1}		10 µg g^{-1}		20 µg g^{-1}	
	µg g^{-1} (DER,%)	%	µg g^{-1} (DER,%)	%	µg g^{-1} (DER,%)	%
1	0.18 (1.9)	9.2	1.55 (1.1)	15.5	2.96 (2.1)	14.8
3	0.22 (8.4)	11.2	1.72 (3.9)	17.2	3.14 (6.0)	15.7
7	0.31 (2.3)	15.5	2.07 (5.0)	20.7	3.50 (3.6)	17.5
13	0.41 (7.5)	20.4	2.33 (5.4)	23.3	4.17 (4.5)	20.8
21	0.54 (10)	27.1	2.69 (9.6)	26.9	5.07 (4.1)	25.3

PENCONAZOL

Días	2 µg g^{-1}		10 µg g^{-1}		20 µg g^{-1}	
	µg g^{-1} (DER,%)	%	µg g^{-1} (DER,%)	%	µg g^{-1} (DER,%)	%
1	0.54 (5.0)	27.1	2.00 (3.8)	20.0	3.32 (4.3)	17.5
3	0.73 (4.8)	36.7	2.97 (6.6)	29.7	6.21 (4.8)	31.1
7	1.12 (5.1)	56.5	4.91 (6.9)	49.1	12.0 (6.2)	60.1
13	1.16 (3.3)	58.1	5.66 (8.3)	56.5	12.7 (7.3)	63.4
21	1.22 (3.0)	61.0	6.65 (8.8)	66.5	13.6 (3.0)	68.1

La cantidad retenida de los fungicidas en las uvas aumentó con el incremento de la concentración inicial de las disoluciones para cada uno de los tiempos estudiados. La cantidad retenida es mayor cuanto mayor es el tiempo de contacto. Sin embargo, el porcentaje de retención encontrado no dependió de la concentración inicial de fungicida en contacto con las uvas para un mismo tiempo. Metalaxil fue el compuesto que presentó un mayor porcentaje de retención, seguido de pirimetanil, penconzol y diclofluanida, en este orden.

Para averiguar la cinética de retención de los fungicidas en cada concentración estudiada, los datos experimentales se han ajustado al siguiente modelo matemático (Fernández et al. 2005):

$$C_t = C_0 \, e^{-kt} \quad (1)$$

$$\mathrm{Ln}\, C_t = \mathrm{Ln} C_0 - kt \quad (2)$$

En la ecuación (1) C_t ($\mu g\ g^{-1}$) es la concentración de residuos a un tiempo t (días), C_0 ($\mu g\ g^{-1}$) es la concentración teórica inicial de residuos a tiempo t = 0, k es la constante de retención de los fungicidas, y t es el tiempo que las uvas han estado en contacto con las disoluciones. En este tipo de análisis, una cinética de primer orden, permite conocer el comportamiento de los residuos de fungicidas durante el tiempo, al mostrar la correlación entre los residuos retenidos y el tiempo. Es también posible estudiar si la correlación existente entre las variables es más o menos significante desde el punto de vista estadístico. La siguiente ecuación se usa para este fin (Miller y Miller 2002):

$$t = |r| \sqrt{(n - 2)} / \sqrt{(1 - r^2)} \quad (3)$$

En la ecuación (3), r representa el coeficiente de correlación y (n - 2) los grados de libertad. Esta ecuación permite obtener un valor de distribución *t* de Student que se puede comparar con los valores de *t* tabulados. Los resultados del ajuste se presentan en la Tabla V-28.

Tabla IV-28: *Parámetros estadísticos derivados del ajuste lineal de los datos para la retención de los fungicidas en uvas durante el tiempo*

Concentración ($\mu g\ g^{-1}$)	Pirimetanil			Metalaxil		
	r	k	*t*	r	k	*t*
2	0.906	0.058	3.696*	0.988	0.101	11.31*
10	0.908	0.065	3.747*	0.966	0.108	6.526*
20	0.923	0.070	4.158*	0.938	0.121	4.685*

Concentración ($\mu g\ g^{-1}$)	Diclofluanida			Penconazol		
	r	k	*t*	r	k	*t*
2	0.969	0.033	6.807*	0.757	0.046	2.009
10	0.962	0.027	6.105*	0.852	0.054	2.827
20	0.999	0.027	39.69*	0.731	0.060	1.854

[a] r = coeficiente de correlación ; k = constante de velocidad de retención ($días^{-1}$); *t* = valor calculado de *t* de distribución Student para $p < 0.05$; significación de la correlación entre variables * $p < 0.05$

Como se puede observar en estos datos, existe correlación lineal entre Ln C_t y el tiempo para pirimetanil, metalaxil y diclofluanida con coeficientes de correlación r > 0.906 considerando todos los tiempos del ensayo. Penconazol

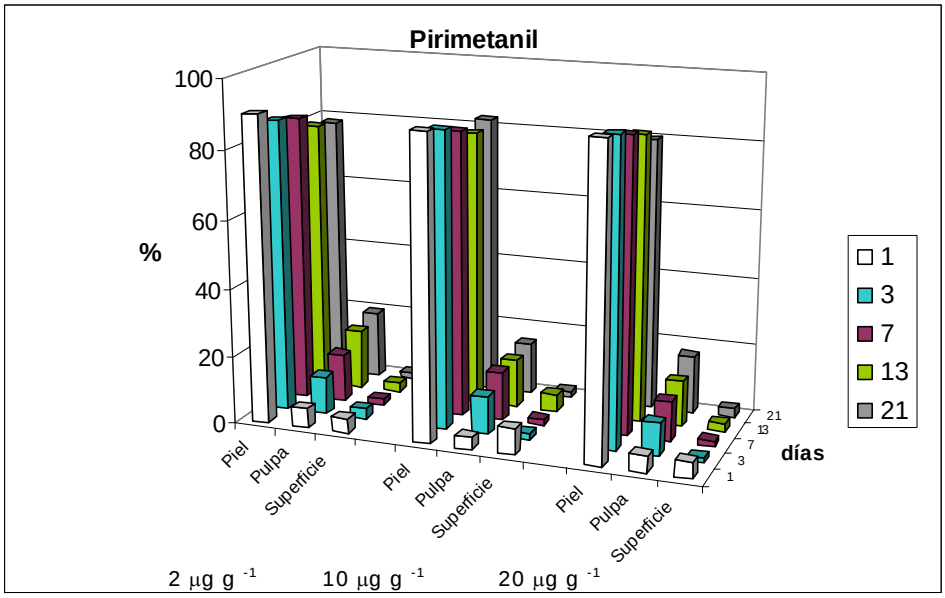
mostró coeficientes de correlación r < 0.852, sin embargo, este compuesto presentó un comportamiento lineal desde el día 1 al 7.

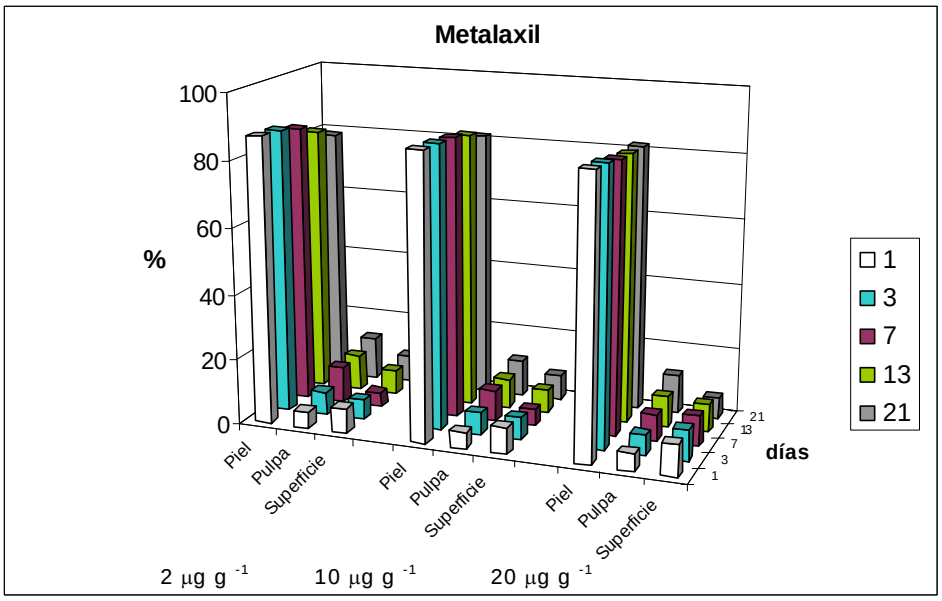
El test de *t* de Student realizado para comparar las pendientes obtenidas en la aplicación de la ecuación (2) (valores de k) reveló que no existen diferencias a un nivel de confianza del 95 % para los tres niveles de concentración estudiados.

En relación con los valores de las constantes, podemos establecer una velocidad de retención para los fungicidas en uvas, que sería la siguiente: metalaxil > pirimetanil > diclofluanida.

4.4. Estudio de distribución de los fungicidas en uvas tintas

La cantidad de residuos en las tres partes de la uva (superficie, piel y pulpa) fue determinada usando los métodos propuestos y se calculó el porcentaje de distribución en relación con el total de residuos absorbidos. La Figura V-13 muestra la distribución de los residuos en las diferentes partes de la uva durante el tiempo de contacto con las tres concentraciones estudiadas. El mayor contenido se encontró en piel para todos los compuestos, independientemente de la concentración de fungicida en contacto con las uvas, con > 66.3 % de los residuos para todos los fungicidas. En la pulpa, la cantidad de residuos encontrada varió entre 3.5 y 31.0 %. En la Figura V-13 se puede observar que el porcentaje de residuos en superficie y hollejo disminuye cone l tiempo, mientras que aumenta el porcentaje en pulpa para todos los compuestos estudiados.


Pirimetanil
100
80
60
40
20
0
%
Piel
Pulpa
Superficie
días
1
3
7
13
21
2 µg g -1
10 µg g -1
20 µg g -1


Metalaxil
100
80
60
40
20
0
%
Piel
Pulpa
Superficie
días
1
3
7
13
21
2 µg g -1
10 µg g -1
20 µg g -1

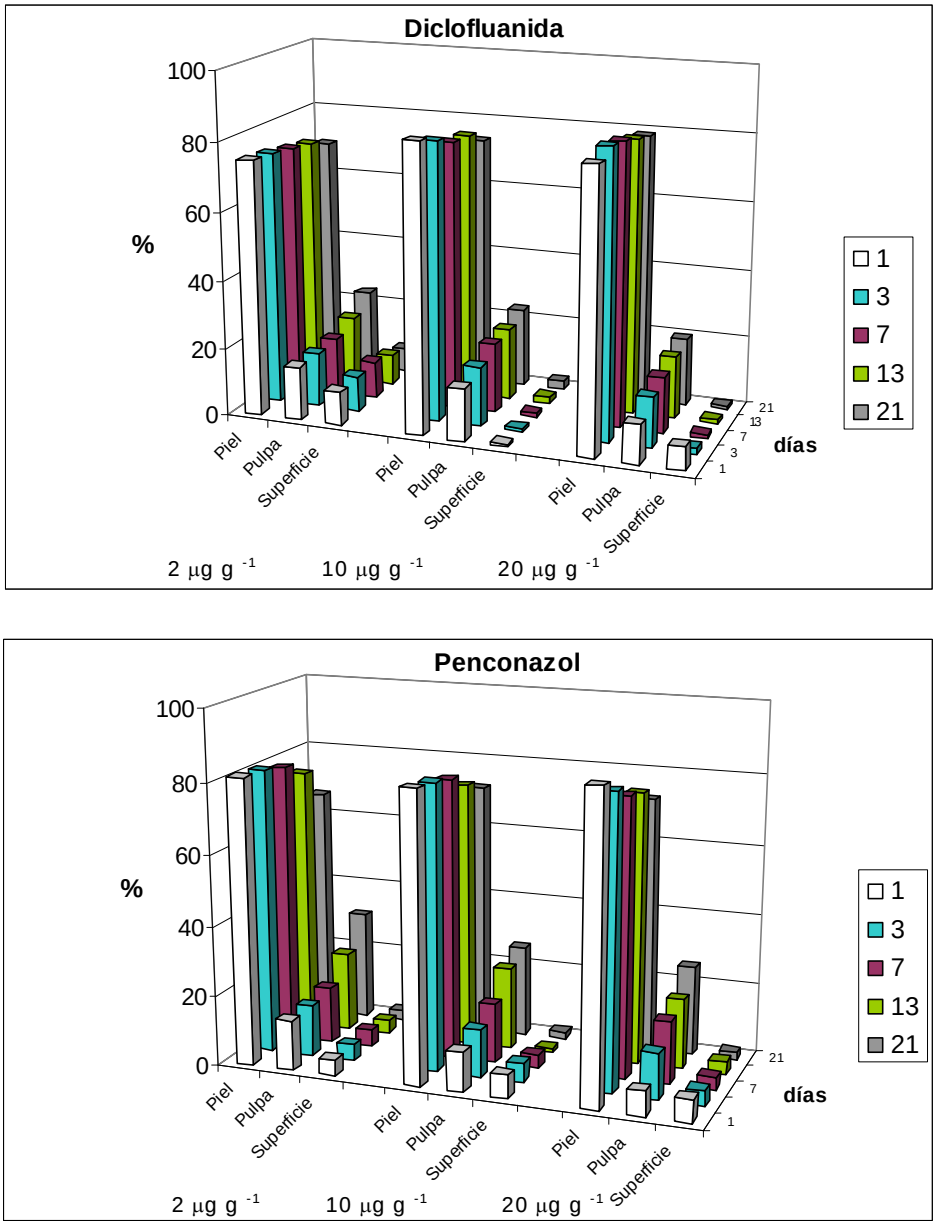


Figura V-13: *Distribución de los fungicidas en la superficie, piel y pulpa en uvas en contacto con disoluciones (2 µg g^{-1}, 10 µg g^{-1}, 20 µg g^{-1}) durante 1, 3, 7, 13 y 21 días*

Se realizó un estudio de penetración en pulpa calculando la relación entre las concentraciones en piel y pulpa (Q) para todos los ensayos. No se encontraron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95 % entre las concentraciones a un mismo tiempo de contacto. La penetración no dependió de la concentración inicial de la disolución. Los valores medios para las tres concentraciones se muestran en la Tabla V-29. Penconazol y diclofluanida presentaron los mayores valores de Q. Metalaxil y pirimethanil presentaron un comportamiento similar pero diferente al de los anteriores compuestos. El análisis estadístico realizado para todos los tiempos reveló que los valores Q para pirimetanil y metalaxil no difieren (al 95 % de nivel de confianza) de 7 a 21 días. Diclofluanida no presentó diferencias significativas en los valores de Q desde 1 a 7 días. Para penconazol se encontraron los mayores valores de Q para el mayor tiempo de contacto.

Tabla V-29: *Valores medios (Q± DE*) de la relación de concentraciones entre pulpa y piel durante el tiempo*

Días	Pirimetanil	Metalaxil	Diclofluanida	Penconazol
1	0.056 ± 0.006^{a}	0.057 ± 0.002^{a}	0.175 ± 0.025^{a}	0.157 ± 0.015^{a}
3	0.123 ± 0.011^{b}	0.078 ± 0.003^{b}	0.202 ± 0.021^{a}	0.169 ± 0.010^{b}
7	0.162 ± 0.006^{c}	0.117 ± 0.010^{c}	0.226 ± 0.012^{ab}	0.215 ± 0.011^{b}
13	0.184 ± 0.031^{c}	0.119 ± 0.014^{c}	0.254 ± 0.021^{b}	0.273 ± 0.022^{c}
21	0.220 ± 0.028^{c}	0.142 ± 0.006^{c}	0.312 ± 0.023^{c}	0.410 ± 0.045^{d}

* n = 9

$^{a\,b\,c\,d}$ Letras diferentes en la misma columna significan diferencias significativas (p <0.05)

CAPÍTULO VI:
ESTUDIOS DE FERMENTACIONES

1. FERMENTACIONES EN LABORATORIO DE MOSTO SINTÉTICO EN PRESENCIA DE PIRIMETANIL

1.1. Introducción

En este apartado se expone la cuantificación de pirimetanil en muestras sintéticas de fermentación. Los ensayos se realizaron con diferentes dosis de fungicida (2.5 y 5.0 mg L^{-1}) y con dos cepas de levaduras. La levadura L1 es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* sensible al producto y la levadura L2, desarrollada por el centro de Investigación y Desarrollo Agrario - CIDA, es una cepa resistente (Gracia y col. 2002).

Con el fin de controlar el estudio se prepararon muestras testigo tanto para el control de pirimetanil como para el control de los azúcares. Para ello se prepararon muestras de mosto sintético con presencia de pirimetanil y en ausencia de levaduras, obteniendo el testigo para el control del fungicida. Por otro lado se prepararon muestras de mosto testigo en presencia de levaduras y en ausencia de pirimetanil, obteniendo el control de los azúcares en el proceso fermentativo. La determinación de los residuos de pirimetanil se realizó por el método de extracción líquido-líquido desarrollado en el Capítulo V de esta memoria.

1.2. Preparación y toma de muestras

Los ensayos de fermentación se han realizado sobre mosto sintético estéril al que se le adicionan diferentes dosis de fungicida y se le hace fermentar con dos cepas de levaduras. Un esquema de este ensayo así como de las muestras obtenidas, se refleja en la Figura VI-1. A diferentes alícuotas de 2000 mL de mosto sintético esterilizado en autoclave se les adicionó la dosis del fungicida pirimetanil correspondiente al límite máximo de residuos (LMR = 5.0 mg L^{-1}) (muestras 3, 4 y 5) y a la mitad de éste, 2.5 mg L^{-1} (muestras 6, 7 y 8). Se inoculó la levadura L1 a los matraces de fermentación 1, 4 y 7, y la levadura L2 a los otros matraces 2, 5 y 8. Se inoculó una población de levaduras de 10^4 para cada matraz y levadura. Se realizaron dos repeticiones para cada ensayo, A y B.

Las muestras testigo o control para la evolución en el contenido de pirimetanil y en el contenido de azúcar corresponden a:

- Muestras del fungicida en mosto sintético que no se sometieron a fermentación y mantenidas a 28 ºC (muestras 3A y 3B para la concentración de 5.0 mg L^{-1}; muestras 6A y 6B para la concentración de 2.5 mg L^{-1}).
- Muestras de mosto sintético sin fungicida que se fermentaron con ambas levaduras y permitieron el control del grado de fermentación (muestras 1A y 1B para levadura L1; muestras 2A y 2B para la L2).

La fermentación alcohólica se llevó a cabo a una temperatura controlada de 28 ºC durante 7 días. El muestreo se realizó regularmente tomando un volumen de 30 mL en los dieciséis matraces del ensayo a las 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 168 h una vez iniciada la fermentación. Estas muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. a 3 ºC durante 10 minutos para eliminar las levaduras. El control de la fermentación alcohólica se realizó midiendo tanto el contenido en azúcar como el ºBrix.

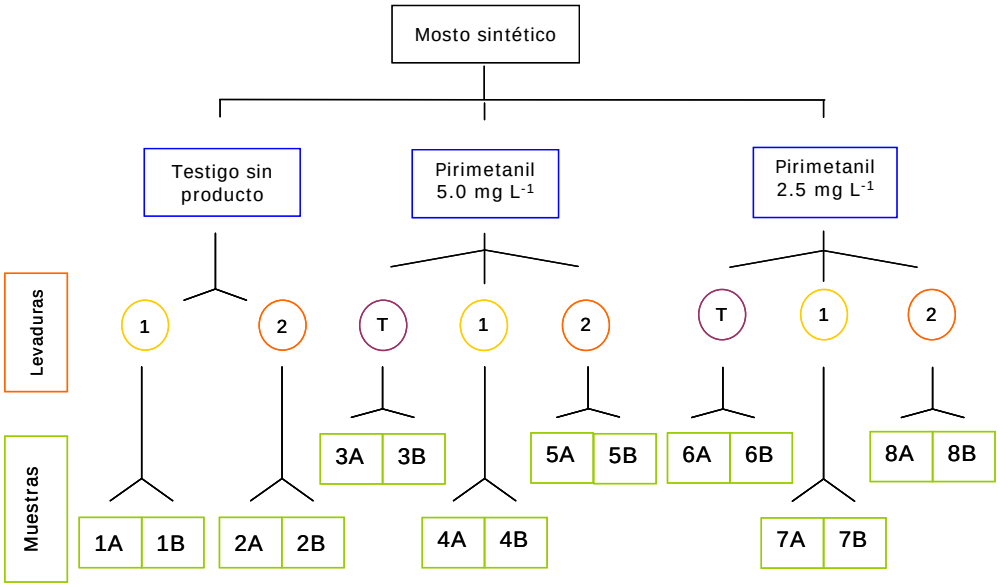


Figura VI -1: *Esquema del ensayo de fermentación*

1.3. Efecto de la fermentación alcohólica sobre el contenido de pirimetanil

1.3.1 Contenido de 5 mg L^{-1} en pirimetanil (LMR)

En la Tabla VI-1 se recoge el contenido de pirimetanil encontrado en el mosto testigo y en los mostos sintéticos fermentados con levaduras L1 y L2 a los que se adicionó una concentración de 5.0 mg L^{-1} correspondiente al límite máximo de residuos para dicho fungicida.

Tabla VI-1: *Contenido en pirimetanil en las muestras testigo y fermentadas (FOH) con su desviación (n = 4)*

Tiempo (h)	Testigo (mg L^{-1})	FOH L1 (mg L^{-1})	FOH L2 (mg L^{-1})
0	5.86 ± 0.14	5.86 ± 0.14	5.86 ± 0.14
12	5.78 ± 0.24	5.53 ± 0.49	4.78 ± 0.07
24	5.73 ± 0.40	5.17 ± 0.12	4.40 ± 0.31
48	5.30 ± 0.11	4.37 ± 0.37	3.67 ± 0.19
72	5.45 ± 0.64	5.08 ± 0.27	3.41 ± 0.09
96	5.20 ± 0.92	4.60 ± 0.29	3.26 ± 0.22
168	5.09 ± 0.51	4.52 ± 0.15	3.30 ± 0.31

La Figura VI-2 muestra la evolución de la concentración de pirimetanil en las muestras sometidas a fermentación, observando una evolución similar entre ambas levaduras y obteniendo una mayor disminución en la concentración con la levadura L2. A partir de un determinado tiempo de fermentación, aproximadamente 96 horas, prácticamente no hay variación en la concentración y permanece constante en valor de 4.60 mg L^{-1} y 3.26 mg L^{-1} para las levaduras L1 y L2, respectivamente. La diferente evolución de las muestras inoculadas frente a la testigo induce a pensar que el pirimetanil está afectado por otro/ s proceso/s distinto/s a la posible degradación producida por el medio y la temperatura. Es el efecto de la presencia de levaduras que podrían adsorber y metabolizar el compuesto; es decir, el proceso fermentativo afecta al contenido de pirimetanil para esta concentración determinada y de forma diferente según el tipo de levadura utilizada para la fermentación.

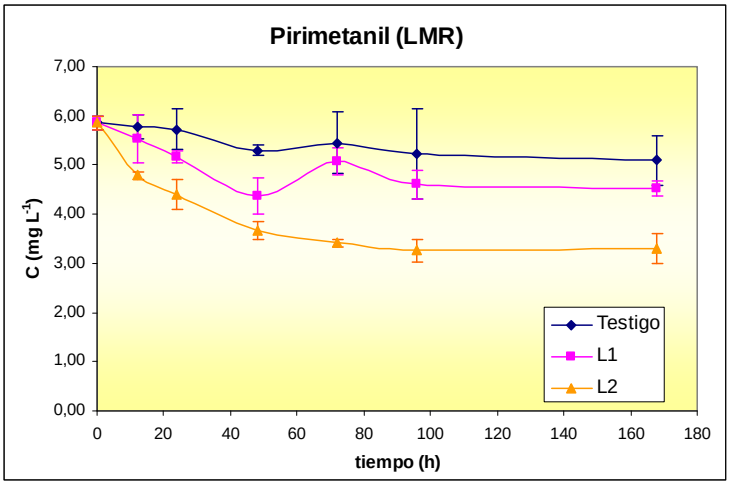


Figura VI–2: *Evolución de pirimetanil en muestras testigo y fermentadas*

El porcentaje de disminución de pirimetanil en el testigo al final del proceso es 13.1 %. Esto puede ser debido a una degradación en el medio (pH=3.5) hacia otros compuestos, no encontrados en este estudio, unido al efecto de la temperatura de fermentación. (Cabras y col. 1999; The Pesticide Manual).

Para el mismo proceso, en las muestras fermentadas con la levadura L1, la concentración disminuye un 21.4 %, mientras que con la levadura L2 se produce un descenso de 43.6 %. Globalmente, en las muestras inoculadas con la levadura L2 el descenso es más pronunciado desde el inicio de la fermentación que en el mosto inoculado con levadura L1. Por otra parte, el compuesto pirimetanil presente en el mosto puede ser eliminado por una fijación del mismo en las paredes de las levaduras (Cabras y col. 1999). Este hecho hace necesario un posterior análisis de los posos (pellets) obtenidos en la centrifugación de las muestras que contienen los restos de levaduras.

1.3.2 Contenido de 2.5 mg L^{-1} en pirimetanil (LMR / 2)

En la Tabla VI-2 se muestran los resultados del contenido de pirimetanil encontrado en los mostos sintéticos fermentados con levaduras L1 y L2 así como en el testigo cuando se ha adicionado una de fungicida de 2.5 mg L^{-1}

concentración correspondiente a la mitad del límite máximo de residuos para pirimetanil en uvas de vinificación.

Tabla VI-2: *Contenido en pirimetanil en las muestras testigo y fermentadas (FOH) con su desviación (n = 4)*

Tiempo (h)	Testigo (mg L^{-1})	FOH L1 (mg L^{-1})	FOH L2 (mg L^{-1})
0	2.65 ± 0.30	2.65 ± 0.30	2.65 ± 0.30
12	2.31 ± 0.41	2.18 ± 0.06	2.46 ± 0.52
24	2.57 ± 0.03	2.42 ± 0.07	1.87 ± 0.14
48	2.44 ± 0.01	2.26 ± 0.11	1.97 ± 0.03
72	2.38 ± 0.25	2.13 ± 0.06	1.87 ± 0.04
96	2.39 ± 0.01	2.15 ± 0.05	1.89 ± 0.14
168	2.31 ± 0.12	1.99 ± 0.07	1.69 ± 0.12

La Figura VI-3 muestra la evolución de la concentración de pirimetanil en las muestras estudiadas en el proceso. Se observa una evolución similar entre ambas levaduras obteniendo una mayor disminución en la concentración para la levadura L2. La diferente evolución de las muestras inoculadas frente a la testigo induce pensar que el pirimetanil, de forma similar al caso anterior, está afectado por otro proceso además de la posible degradación producida por el medio y la temperatura. La presencia de levaduras pueden producir la absorción y la metabolización del compuesto también a esta concentración; es decir, el proceso fermentativo afecta al contenido de pirimetanil para esta concentración y de forma diferente según el tipo de levadura utilizada para la fermentación.

El porcentaje de disminución de la concentración de pirimetanil al final del proceso es 12.8 % en las muestras testigo lo cual puede ser debido a una degradación en la matriz mosto.

Para el mismo proceso, el porcentaje de disminución en las muestras sometidas a fermentación con la levadura L1 es del 24.9 % y con la levadura L2 es de 36.2 %.

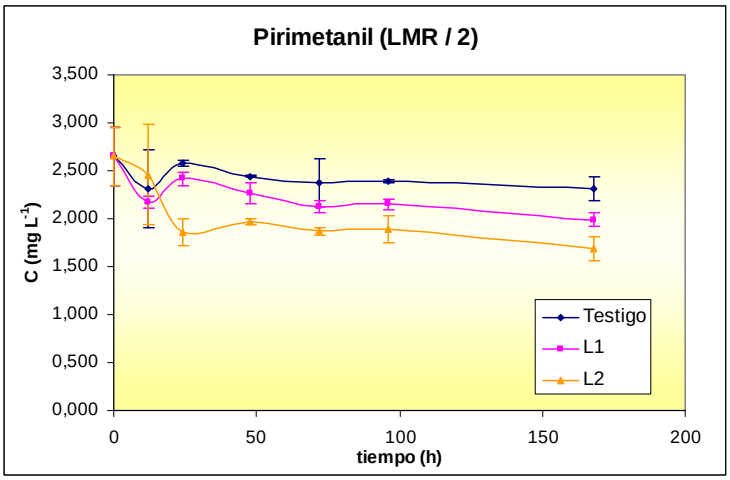


Figura VI-3: *Evolución de pirimetanil en muestras testigo y fermentadas*

1.3.3 Estudio cinético de la disipación de los residuos

La fermentación alcohólica afecta al contenido de pirimetanil en ambas concentraciones estudiadas.

La velocidad con la que se produce la disipación de estos residuos se puede calcular ajustando los datos al siguiente modelo matemático (Fernández y col. 2005; Gupta y col. 2008):

$$C_t = C_0\, e^{-kt} \quad (1)$$

$$\mathrm{Ln}\, C_t = \mathrm{Ln}C_0 - kt \quad (2)$$

En las ecuaciones (1) y (2), C_t es la concentración de residuos en cada momento del experimento, C_o es la concentración inicial, t es el tiempo y k es la constante de decaimiento del fungicida estudiado que corresponde a la pendiente de la recta. El valor de esta constante representa la tendencia de los residuos del fungicida a ser reducidos en mayor o menor grado durante el proceso de vinificación dependiendo de factores como degradación o adsorción en levaduras.

Con los datos obtenidos de la concentración de pirimetanil se realizó un estudio de la cinética de las fermentaciones para evaluar la velocidad de disipación de dichos residuos mediante la determinación de *k*. Para ello se

representó el Ln[Pirimetanil] frente al tiempo para cada uno de los ensayos. Este tipo de ajuste permite conocer el comportamiento de los residuos de fungicidas durante el tiempo, al mostrar la correlación que existe entre la concentración de pirimetanil y el tiempo. No obstante, es necesario estudiar si dichos coeficientes de correlación son realmente significativos. Para ello, se emplea un contraste estadístico adecuado teniendo en cuenta el número de puntos usados para su cálculo. El método más simple es calcular un valor de *t* según la siguiente ecuación:

$$t = |r| \sqrt{(n - 2)} / \sqrt{(1 - r^2)} \quad (3)$$

En la ecuación (3), r representa el coeficiente de correlación y (n - 2) los grados de libertad. El valor de *t* calculado se compara con el valor tabulado al nivel de significación deseado, utilizando un contraste *t* de dos colas y (n-2) grados de libertad. Si el valor de *t* calculado es mayor que el valor tabulado existe una correlación significativa entre las variables (Miller y Miller 2002). Los resultados del ajuste se muestran en la Tabla VI-3.

Tabla VI-3: *Parámetros estadísticos derivados del ajuste lineal de los datos para la disipación de pirimetanil durante el tiempo de fermentación en cada ensayo*

Muestra	5.0 mg L^{-1}			2.5 mg L^{-1}		
	r	k	*t*	r	k	*t*
Testigo	0.9065	0.0009	4.801*	0.9122	0.0008	4.452*
L1	0.9122	0.0014	4.977*	0.9529	0.0016	6.282*
L2	0.8760	0.0035	4.062*	0.9062	0.0026	4.286*

[a] r = coeficiente de correlación ; k = constante de velocidad de dispación (horas^{-1}); *t* = valor calculado de *t* de distribución Student para $p < 0.05$; significación de la correlación entre variables * $p < 0.05$

Los valores calculados para el parámetro *t* son mayores que el valor *t* tabulado (*t* = 2.571) lo que indica que existe una correlación significativa entre la concentración de pirimetanil y el tiempo.

Se compararon los valores de k (pendientes de las rectas) de todas las muestras mediante un contraste *t* de Student. Se observa que en las muestras correspondientes a 5.0 mg L^{-1} de pirimetanil, k es significativamente mayor (mayor velocidad de disipación) para la fermentación con la levadura L2, mientras que no existen diferencias entre las muestras testigo y las muestras fermentadas con la levadura L1. Con respecto a las muestras de 2.5 mg L^{-1}, se comprueba que las constantes k son significativamente diferentes para todas las muestras, mostrando también una mayor velocidad de disipación en las muestras fermentadas con la levadura L2.

1.3.4 Análisis de residuos en levaduras

Para comprobar si existe retención de pirimetanil por parte de las levaduras se analizaron los pellets (posos) obtenidos de la centrifugación de las muestras sometidas a fermentación. Se realizó un ensayo de fermentación con una concentración de 5 mg L^{-1} (LMR) en pirimetanil, para poder apreciar de un modo más claro la existencia o no de residuos en los posos, dado que la disminución de pirimetanil es mayor cuanto mayor es la concentración. Los restos sólidos de la fermentación se filtraron a vacío con filtros de nylon de 0.45 µm. Los filtros se secan durante 12 horas a 28 ºC en estufa. El método aplicado es una extracción con hexano, similar a la desarrollada en el Capítulo V de esta memoria. El ensayo se realizó por duplicado y los resultados se muestran en la Tabla VI-4.

Tabla VI-4: *Contenido de pirimetanil (% m/m) en los restos de levaduras*

	réplica	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**168 h**
L1	A	np	np	0.89	0.70	0.94	0.95
	B	np	0.70	0.61	0.60	0.97	np
L2	A	1.01	0.72	0.91	0.99	1.16	0.51
	B	np	1.09	0.94	0.79	0.82	0.88

np = no se han encontrado posos

Con los resultados expuestos en la tabla se puede indicar que se encuentra pirimetanil en los posos a partir de las 24 horas en la fermentación con levadura L1 y a partir de las 12 horas de fermentación con levadura L2. No se observan diferencias en el contenido de pirimetanil retenido en los posos durante los días de fermentación, ni entre levaduras. Este contenido es cercano al 1 % del encontrado en las muestras.

1.4. Efecto del contenido de pirimetanil sobre la fermentación alcohólica

La influencia del fungicida pirimetanil sobre la fermentación alcohólica a dos diferentes concentraciones iniciales se estudia determinando la cantidad de azúcares (ºBrix) a lo largo del proceso. En este estudio, las muestras testigo corresponden a la fermentación de mosto sintético con levadura L1 y levadura L2 sin adición de pirimetanil. Los ensayos se realizan por duplicado.

La Figura VI-4 representa los resultados del contenido en azúcar (expresados en porcentaje respecto al contenido inicial) obtenidos para cada muestra del proceso de fermentación con la levadura L1, mosto sintético (testigo) y mosto sintético con la adición de pirimetanil en dos concentraciones, 2.5 y 5.0 mg L^{-1}.

La disminución en el testigo es de un 99.7 % respecto al contenido inicial; mientras que para las muestras de 2.5 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1} en pirimetanil disminuyen en un 97.9 % y en un 95.7 %, respectivamente. La ausencia de diferencias indica que pirimetanil no afecta al consumo del azúcar por parte de las levaduras.

Para las muestras testigo y para aquellas que tienen presencia de plaguicida se observa una evolución similar hasta las 72 horas de fermentación. A partir de este tiempo las fermentaciones en aquellas muestras con el fungicida presentan un desarrollo más lento, tanto más cuanto mayor es la concentración de pirimetanil.

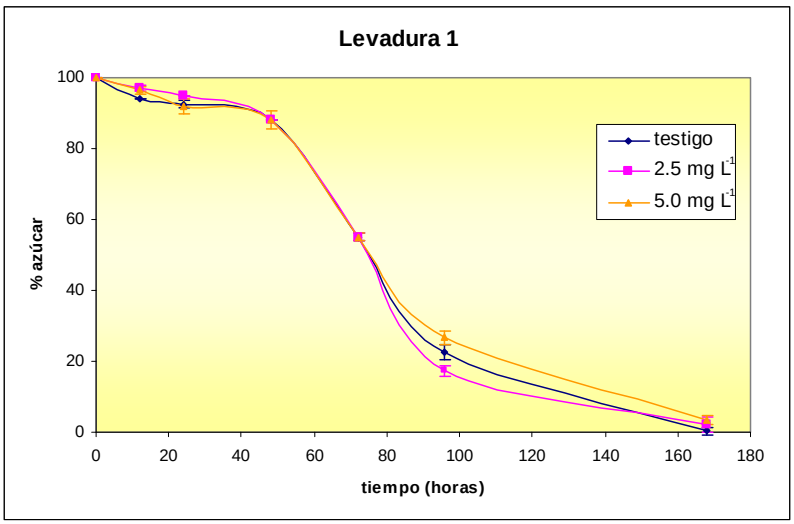


Figura VI-4: *Evolución de la fermentación para las distintas muestras*

La Figura VI-5 representa los resultados del contenido de azúcar obtenidos para cada muestra del proceso de fermentación con la levadura L2, mosto sintético (testigo) y mosto sintético al que se adiciona pirimetanil en dos concentraciones (2.5 y 5.0 mg L^{-1}). Se expresan en porcentaje respecto al contenido inicial.

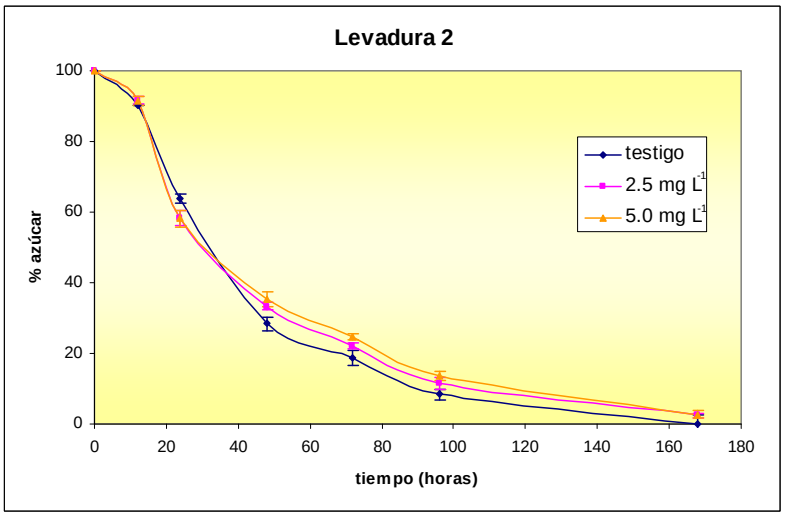


Figura VI-5: *Evolución de la fermentación de las diferentes muestras*

La disminución en el testigo de la levadura L2 es de 99.8 % respecto al contenido inicial; para las muestras que contienen pirimetanil esta disminución es de 97.6 % para 2.5 mg L^{-1} y de 97.3 % para 5.0 mg L^{-1}. No existen diferencias en el consumo de azúcares por la adición de pirimetanil.

La evolución con la levadura L2 es más rápida en las muestras con pirimetanil que en la testigo en el primer tramo entre 0 y 24/48 horas, etapa que marca la evolución posterior. A partir de este momento, el proceso fermentativo para las muestras testigo se lleva a cabo de un modo más rápido.

Comparando las fermentaciones realizadas por las dos levaduras se observa una disminución más acusada en el caso de la levadura L2 con respecto a la levadura L1, tanto en las muestras testigo como en las muestras con pirimetanil, aunque el final del proceso se alcanza en el mismo período de tiempo (168 horas).

2. FERMENTACIONES EN LABORATORIO DE MOSTO REAL EN PRESENCIA DE PIRIMETANIL

2.1. Introducción

En este apartado se expone la cuantificación de pirimetanil en muestras reales de fermentación. Los ensayos se realizaron con la dosis de compuesto correspondiente al LMR (5.0 mg L^{-1}), debido a que en el ensayo previo sobre mostos sintéticos se comprobó el efecto negativo de esta concentración. El proceso de fermentación se llevó a cabo con las dos levaduras estudiadas en el apartado anterior.

El ensayo realizado fue similar al llevado a cabo para mosto sintético, con muestras testigo para el control de pirimetanil y de los azúcares.

La cuantificación de pirimetanil en el ensayo de fermentación que se expone, se realizó empleando el método de extracción líquido-líquido validado para muestras reales de vinificación en el Capítulo V, apartado 1.6 de esta memoria.

2.2. Preparación y toma de muestras

Los ensayos de fermentación se han realizado sobre mosto real estéril procedente de cepas que no han sido tratadas con pesticidas. A éste mosto se le adicionó una dosis de pirimetanil correspondiente al límite máximo de residuos, 5 mg L^{-1} y se le hace fermentar con dos cepas de levaduras. Un esquema de este ensayo se refleja en la Figura VI-6.

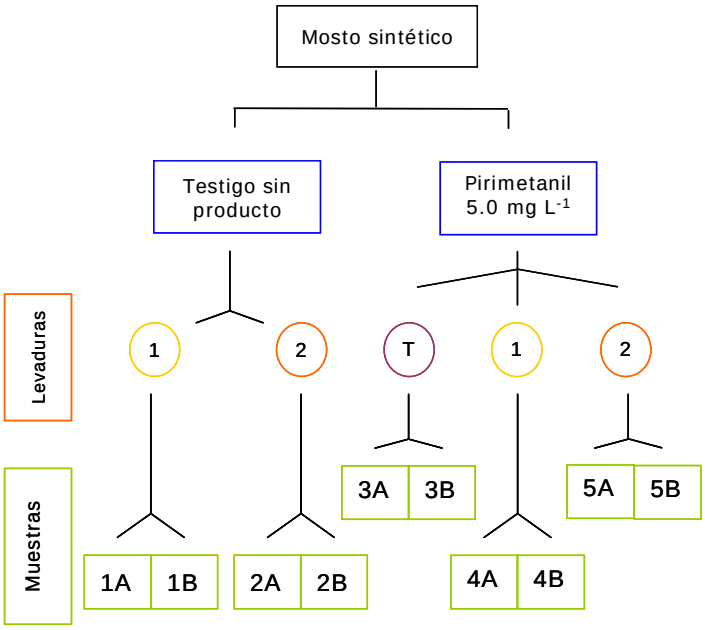


Figura VI-6: *Esquema del ensayo de fermentación*

A diferentes alícuotas de 2000 mL de mosto real esterilizado en autoclave se les adicionó las dosis del fungicida pirimetanil de 5 mg L^{-1} (muestras 3, 4 y 5). Se inoculó la levadura L1 a dos matraces de fermentación 1 y 4 y la levadura L2 a los otros dos 2 y 5. Se inoculó una población de levaduras de 10^4 para cada matraz y levadura. Se hicieron dos repeticiones para cada ensayo, A y B. Las muestras testigo o control para la evolución del contenido de pirimetanil y en el contenido de azúcar corresponden a:

- Muestras del fungicida en mostos reales no sometidos a fermentación y mantenidas a 28 ºC (muestras 3A y 3B).
- Muestras de mosto real en ausencia del fungicida y sometidas a fermentación con ambas levaduras (muestras 1A y 1B para levadura L1; muestras 2A y 2B para la L2).

La fermentación alcohólica se llevó a cabo a una temperatura controlada de 28 ºC durante 7 días. El muestreo se realizó regularmente tomando un volumen de 30 mL en los diez matraces del ensayo a las 0 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 168 h una vez iniciada la fermentación. Estas muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. a 3 ºC para eliminar las levaduras presentes. El control de la fermentación alcohólica se realizó midiendo el contenido en azúcar como grado Brix.

2.3. Efecto de la fermentación alcohólica sobre el contenido de pirimetanil

2.3.1 Contenido de 5.0 mg L^{-1} en pirimetanil

En la Tabla VI-5 se recoge el contenido de pirimetanil encontrado en el testigo y en los mostos fermentados con levaduras L1 y L2, a los que se adicionó una concentración correspondiente al límite máximo de residuos (5.0 mg L^{-1}).

Tabla VI-5: *Contenido en pirimetanil en las muestras testigo y fermentadas (FOH) con su desviación (n = 4)*

Tiempo (h)	Testigo (mg L^{-1})	FOH L1 (mg L^{-1})	FOH L2 (mg L^{-1})
0	4.74 ± 0.02	4.74 ± 0.02	4.74 ± 0.02
12	4.35 ± 0,26	4.29 ± 0.17	4.18 ± 0.06
24	4.50 ± 0.60	4.01 ± 0.37	4.23 ± 0.37
48	3.79 ± 0.37	3.56 ± 0.95	3.55 ± 0.28
72	3.65 ± 0.15	3.07 ± 0.51	3.12 ± 0.55
96	3.11 ± 0.46	3.07 ± 0.28	2.79 ± 0.30
168	3.37 ± 0.15	3.01 ± 0.21	2.67 ± 0.05

La Figura VI-7 muestra la evolución de la concentración de pirimetanil en las muestras sometidas a fermentación. La fermentación alcohólica afecta al contenido de pirimetanil en ambas levaduras estudiadas. Al final del proceso fermentativo, el porcentaje de disminución de pirimetanil en el testigo es de un 28.9 %. La reducción en la concentración inicial de 36.5 % y 43.7 % respectivamente con las levaduras L1 y L2, que respecto al testigo corresponde a un descenso de 7.6 % y 14.8 % respectivamente.

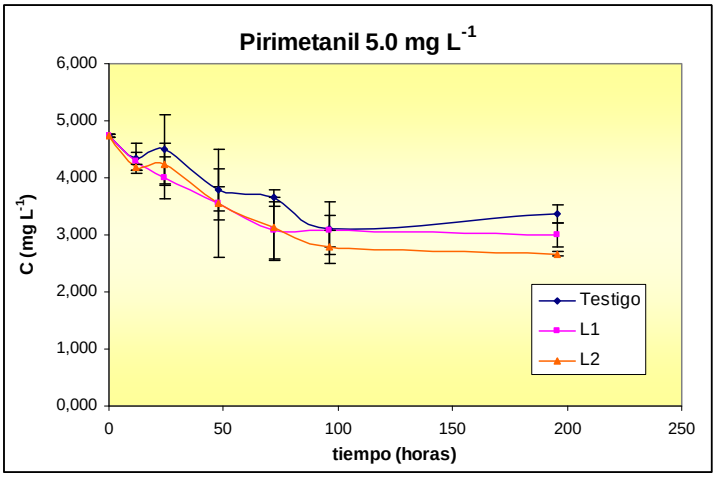


Figura VI-7: *Evolución de pirimetanil en muestras testigo y fermentadas*

2.3.2 Estudio cinético de la disipación de los residuos

La velocidad con la que se produce la disipación de estos residuos se puede calcular ajustando los datos al modelo matemático de cinética de primer orden explicado en el apartado 1.3.3 de este Capítulo.

Con los datos obtenidos de la concentración de pirimetanil se realizó un estudio de la cinética de las fermentaciones para evaluar la velocidad de disipación de dichos residuos mediante la determinación de *k*. Para ello se representó el Ln[Pirimetanil] frente al tiempo para cada uno de los ensayos. Se realizó el contrate estadístico *t* para comprobar la significación de los

coeficientes de correlación *r*. Los resultados del ajuste se muestran en la Tabla VI-6.

Tabla VI-6: *Parámetros estadísticos derivados del ajuste lineal de los datos para la disipación de pirimetanil durante el tiempo de fermentación en cada ensayo*

Muestra	5 mg L^{-1}		
	r	k	*t*
Testigo	0.8128	0.0023	3.120*
L1	0.8549	0.0027	3.684*
L2	0.8659	0.0035	3.871*

[a] r = coeficiente de correlación ; k = constante de velocidad de disipación (horas^{-1}); *t* = valor calculado de *t* de distribución Student para $p < 0.05$; significación de la correlación entre variables * $p < 0.05$

Los valores calculados para el parámetro *t* son mayores que el valor *t* tabulado (*t* = 2.571) lo que indica que existe una correlación significativa entre la concentración de pirimetanil y el tiempo.

Se compararon los valores de k (pendientes de las rectas) de todas las muestras mediante un contraste *t* de Student. Se observa que k es significativamente mayor (mayor velocidad de disipación) para el ensayo con la levadura L2, mientras que no existen diferencias entre las muestras testigo y las muestras fermentadas con la levadura L1.

2.3.3 Análisis de residuos en levaduras

Para comprobar si existe retención de pirimetanil por parte de las levaduras se analizaron los posos obtenidos en la centrifugación de las muestras sometidas a fermentación para estudiar los posibles residuos de fungicida. Los restos sólidos de la fermentación se filtraron a vacío con filtros de nylon de 0.45 μm. Los filtros se secan durante 12 horas a 28 ºC en estufa. El método de extracción aplicado es una extracción con hexano al igual que en el apartado 1.3.4. El ensayo se realizó por duplicado y los resultados se muestran en la Tabla VI-7.

Tabla VI-7: *Contenido de pirimetanil (% m/m) en los restos de levaduras*

	réplica	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**168 h**
L1	A	1.02	0.98	0.76	1.60	1.31	0.82
	B	1.10	1.27	0.94	0.34	2.21	2.20
L2	A	1.25	1.34	1.44	1.43	1.46	1.20
	B	0.99	1.02	1.81	1.30	2.16	1.72

Con los resultados expuestos en la tabla se puede indicar que se encuentra pirimetanil en los restos a partir de las 12 horas en las fermentaciones con las dos levaduras estudiadas. El contenido de pirimetanil retenido en los posos es similar y parece aumentar ligeramente a lo largo del proceso fermentativo con ambas levaduras, alcanzando el máximo a las 96 horas. Este contenido está por debajo del 2.5 % del encontrado en las muestras.

2.4. Efecto del contenido de pirimetanil sobre la fermentación alcohólica.

La influencia del fungicida pirimetanil sobre la fermentación alcohólica se estudia determinando la cantidad de azúcares (ºBrix) a lo largo del proceso. En este estudio, las muestras testigo corresponden a la fermentación de mosto real sin adición de pirimetanil. Los ensayos se realizan por duplicado.

La Figura VI-8 representa los resultados del contenido en azúcar (expresados en porcentaje respecto al contenido inicial) obtenidos para cada muestra del proceso de fermentación con L1, mosto real (muestra testigo) y mosto real en presencia de pirimetanil (5.0 mg L^{-1}).

Para las muestras testigo y para aquellas que tienen presencia de plaguicida se alcanza la estabilización a un tiempo de 168 horas del comienzo de la fermentación. La evolución del proceso es similar para el testigo y la muestra

con pirimetanil, reduciéndose la cantidad de azúcar al mismo valor de porcentaje.

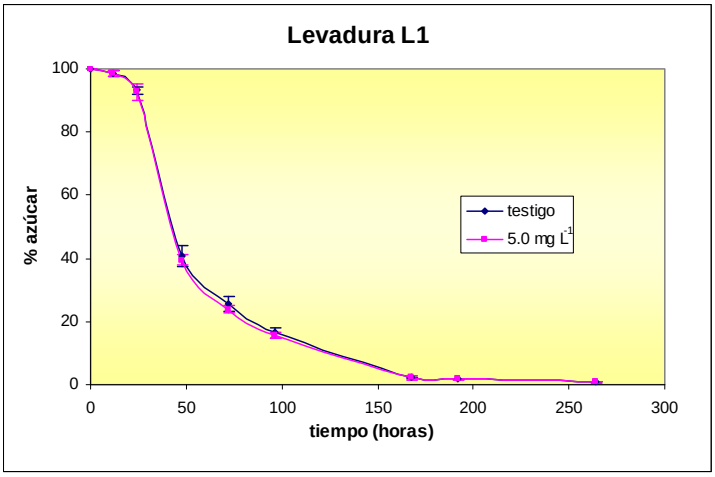


Figura VI-8: *Evolución de la fermentación para las distintas muestras*

La Figura VI-9 representa los resultados del contenido de azúcar (expresados en porcentaje respecto al contenido inicial) obtenidos para cada muestra del proceso de fermentación con L2.

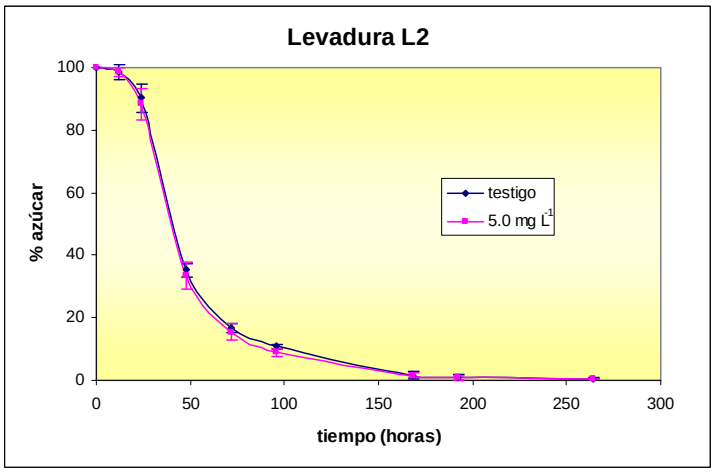


Figura VI-9: *Evolución de la fermentación para las diferentes muestras*

La disminución en el contenido de azúcar de las muestras testigo y de las muestras con pirimetanil es la misma al final del proceso, siendo la evolución de ambas similar.Tanto para las muestras testigo como para aquellas con presencia de pirimetanil la estabilización en la disminución de azúcar se alcanza a las 192 horas.

A la vista de estos resultados se puede concluir que el pirimetanil con el nivel del LMR (5.0 mg L^{-1}) no tiene un efecto significativo sobre el proceso de fermentación realizado por las dos cepas de levadura estudiadas.

3. FERMENTACIONES EN BODEGA

3.1. Introducción

En este apartado se aborda el estudio del tratamiento en campo y la influencia sobre la fermentación del compuesto fitosanitario: pirimetanil, fungicida bien conocido por los buenos resultados obtenidos en el control de Botrytis en la vid y estudiado en el laboratorio en los apartados anteriores de este Capítulo. Asimismo, se estudió la evolución de la cantidad de fungicida a lo largo de todo el proceso de elaboración, desde la uva hasta el vino embotellado.

La investigación se desarrolló durante los años 2004, 2005 y 2006. En el año 2004 se aplicó pirimetanil en uvas de la variedad Tempranillo, en la dosis y épocas recomendadas (Buenas Prácticas Agrícolas, BPAs) sobre parcelas de Rioja Alta (Briones) y se determinó su influencia sobre la fermentación con dos tipos de levaduras comerciales y sobre las propiedades organolépticas del vino elaborado en la bodega experimental de la Universidad de La Rioja.

En los años 2005 y 2006 se llevaron a cabo los ensayos en uvas variedad Tempranillo en Briones (Rioja Alta) con pirimetanil en la época y dosis recomendadas. Con el fin de observar el efecto de una aplicación indiscriminada sobre el proceso fermentativo, se aplicó pirimetanil a una parcela de Tempranillo en Aldeanueva de Ebro (Rioja Baja) en la dosis recomendada, pero fuera del

plazo de seguridad (siete días antes de la vendimia). Es lo que se denomina como Críticas Prácticas Agrícolas (CPAs).

Para tener información sobre el efecto que las distintas prácticas enológicas en bodega pudieran tener sobre el contenido del fungicida pirimetanil en las matrices, la cantidad de pirimetanil a lo largo de las etapas del proceso de elaboración, desde las uvas hasta el vino final, se ha determinado mediante los métodos analíticos desarrollados en el Capítulo V para cada uno de los años de estudio.

3.2. Proceso de vinificación y toma de muestras. Determinación de parámetros enológicos convencionales

Las uvas procedentes de cepas tratadas se vinificaron en la bodega experimental de la Universidad de La Rioja. El esquema del proceso de elaboración de vino tinto se muestra en la Figura VI-10. El proceso de vinificación fue el tradicional o clásico en Denominación de Origen Calificada Rioja.

Para la elaboración de vino tinto, la uva tinta se vendimió en cajas (Foto 1). A través de una cinta transportadora (Foto 2), la uva se pasó a la despalilladora-estrujadora (Foto 3) y la pasta fue conducida mediante bomba peristáltica a los depósitos de fermentación de acero inoxidable (Foto 4). Se añadió anhídrido sulfuroso en una cantidad de 5 g hL^{-1}.

Se inocularon los depósitos con las levaduras seleccionadas para el estudio (30 g hL^{-1}). Una vez acabada la fermentación alcohólica, comprobando que los azúcares residuales eran inferiores a 5 g L^{-1} en todos los depósitos, se procedió al descube y el vino yema obtenido se llevó a otros depósitos o lecheras para llevar a cabo la fermentación maloláctica sembrando las bacterias lácticas (1 g hL^{-1}). Una vez finalizadas las fermentaciones se tomaron muestras para realizar los correspondientes análisis y los vinos obtenidos se conservaron en cámara de frío (4ºC) para una ligera clarificación y preservación frente a posibles

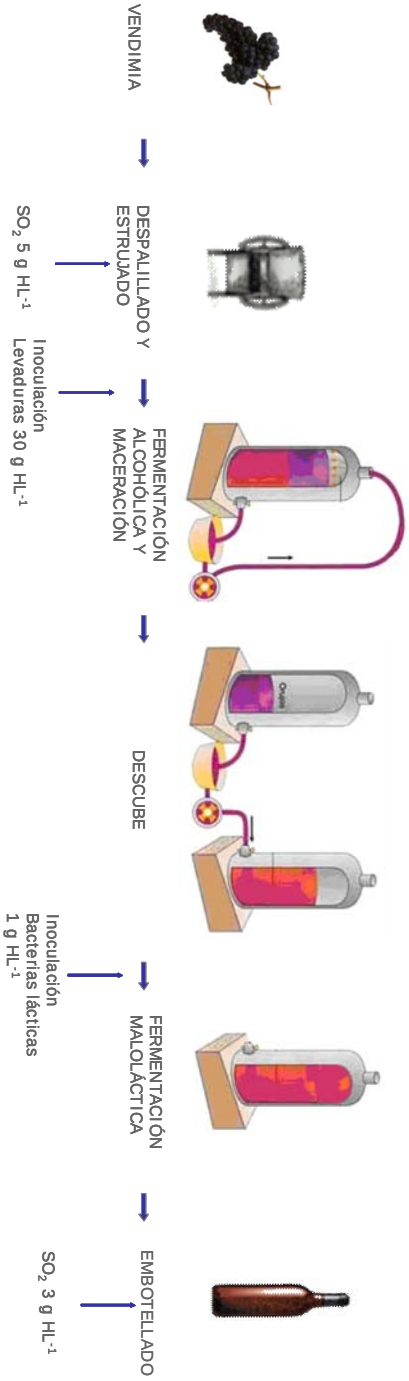


Figura VI-10: *Esquema de elaboración de vino tinto*

alteraciones hasta el momento del embotellado en que se corrigió el anhídrido sulfuroso libre a 30 mg L^{-1}.

Durante todo el proceso desde la vendimia hasta el vino final se determinaron los parámetros enológicos convencionales (densidad, temperatura, grado alcohólico, pH, azúcares reductores, acidez total, acidez volátil, anhídrido sulfuroso libre y total) de acuerdo con las prácticas oficiales de la OIV. El ácido L - málico se determinó por el método enzimático propuesto en los métodos oficiales de análisis de la AOAC.

La enzima *lacassa* se analizó por el método descrito por Dubordieu y col. (1984). Riberéau-Gayon y col. (2002a) establecen una relación entre la tasa de putrefacción determinada por apreciación visual y la actividad de la *lacassa* de las uvas, medida por la oxidación de la siringaldazina por el método de Dubourdieu. La Intensidad de Color o Índice de Color (IC) se estimó como la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm, mientras que la Tonalidad se calculó como la relación entre las absorbancias a 420 y 520 nm. El Índice de Polifenoles Totales (IPT) se estimó como la absorbancia a 280 nm.

Foto 1: *Vendimia en cajas*

Foto 2: *Cinta transportadora*

Foto 3: *Despalilladora-estrujadora*

Foto 4: *Depósitos de fermentación*

3.3. Análisis sensorial

Aproximadamente tres meses después de acabado el proceso de elaboración, se realizaron los análisis sensoriales en la sala de análisis sensorial de la Universidad de La Rioja (Foto 5). Los análisis organolépticos fueron realizados por un panel de expertos pertenecientes a la Asociación de Enólogos de La Rioja junto con egresados de la Licenciatura de Enología en la Universidad de La Rioja.

Los vinos elaborados con uvas tratadas proceden del ensayo que cumple la normativa de seguridad, es decir, el fungicida ha sido aplicado a la dosis y épocas recomendadas (BPAs).

En la primera sesión el objetivo de la evaluación sensorial consistió en averiguar si el vino elaborado con uvas procedentes de cepas tratadas era diferente de manera significativa con respecto al control. Debido a que esto se corresponde con una aplicación clásica de un test de discriminación, se escogió un test Duo-Trio (Meilgard y col. 2007). A los expertos se les presentaron tres muestras, una de ellas identificada como control o referencia. De las otras dos, una era idéntica al control. A los panelistas se les pidió que escribieran cuál de las dos muestras consideran similar al control. La pregunta planteada fue “¿Qué muestra es la misma que el control (o referencia)?”, se utilizó un test binomial

de una cola. Para la discriminación, los panelistas consideraron las percepciones visuales (apariencia), olfativas (aromas y retronasal) y gustativas (sabores, tacto y postgusto).

En la segunda sesión, se realizó un análisis descriptivo sobre los mismos vinos. A los catadores se les proporcionó una ficha de cata con una lista de términos y atributos para apariencia, aroma, sabor, tacto (o textura) y postgusto (Figura VI-11). Los panelistas eligieron los términos que para ellos caracterizaban los distintos vinos. Se trata de un test descriptivo simple conocido como frecuencia de citación (McCloskey y col 1996). Con el fin de identificar diferencias estadísticas, se llevó a cabo un análisis chi-cuadrado (χ^2) con la media de las frecuencias de citación para cada término o atributo en las dos muestras. Recientemente, se ha comprobado que el método de frecuencia de citación es una herramienta satisfactoria alternativa al análisis descriptivo convencional (Campo y col. 2008).

VINO TINTO	nº de catador:	nº de test:	fecha:			
1. FASE VISUAL						
1.1. Capa	Baja	Media	Alta			
1.2. Color	Violaceo	Púrpura	Cereza	Picota	Granate	Rubí
	Teja	Negruzco	Observaciones:			
2. FASE OLFATIVA						
2.1.Intensidad	Baja	Media	Alta			
2.2. Aromas	Frutal	Floral	Vegetal	Especiado	Animal	Balsámico
	De madera	Químico	Observaciones:			
2.3. Calidad	Franco	Sucio	Complejo	Simple		
3. FASE GUSTATIVA						
3.1. Sabores	Equilibrados	No equilibrados	Observaciones:			
3.2. Tacto	Suave	Astringente	Ligero	Untuoso		
3.3. Postgusto	Frutal	Floral	Vegetal	Especiado	Animal	Balsámico
	De madera	Químico	Observaciones:			
3.4. Persistencia	Persistente	No persistente				

Figura VI-11: *Ficha de cata para vino tinto*

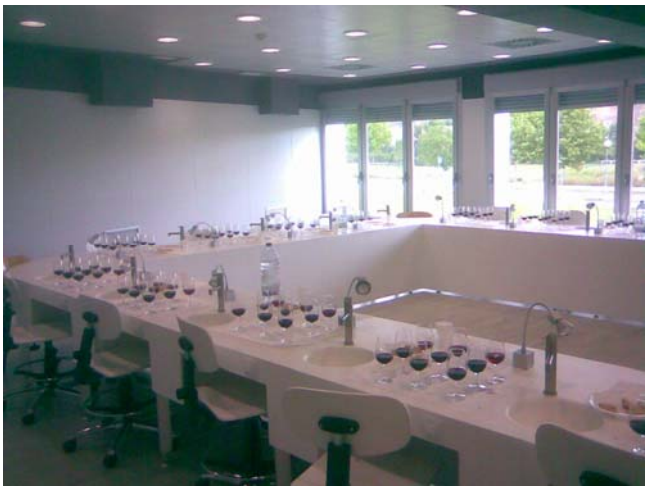


Foto 5: *Disposición de la sala de análisis sensorial*

3.4. Vinificación de uvas variedad Tempranillo año 2004

3.4.1 Tratamiento y elaboración

Las cepas variedad Tempranillo procedentes de la misma parcela en la zona de La Rioja Alta fueron tratadas con Scala® (37.4% Pirimetanil) en las épocas correspondientes a final de floración y envero (7/07/04 y 1/09/04), a una dosis recomendada por el fabricante de 2 L ha^{-1}. Se dejaron un número de filas sin tratar con el fin de tener un testigo de la parcela. El tratamiento se realizó mediante un atomizador HARDI (Dinamarca) con capacidad de 2000 L. Durante el tiempo que duró el experimento las condiciones metereológicas fueron registradas en la estación agroclimática San Vicente de la Sonsierra (La Rioja). Las lluvias totales fueron 112 mm en 35 días de lluvia, y las temperatura medias máxima y mínima fueron 26.3 y 12.7 ºC respectivamente.

La uva tinta variedad Tempranillo se vendimió en cajas el día 11/10/04, recogiéndose aproximadamente 200 kg de uva para el tratamiento y otros 200 kg sin tratamiento alguno. La pasta procedente de la despalilladora-estrujadora se encubó en depósitos de fermentación de acero inoxidable de 50 L. Se añadió

anhídrido sulfuroso en una cantidad de 50 mg L^{-1}. La elaboración se realizó por triplicado tanto para el testigo-control como para cada uno de los tratamientos.

El día 12/10/04 se inoculó con la levadura D254 y con la cepa estudiada anteriormente VRB y denominada L2 en las anteriores estudios (Lalvin Selection ICV, Lallemand) de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*. Los depósitos fueron bazuqueados dos veces por día hasta la finalización de la fermentación alcohólica al cabo de 10 días. Al día siguiente se procedió al descube y el vino yema obtenido se llevó a depósitos de acero inoxidable de 15 L de capacidad. Posteriormente se llevó a cabo la fermentación maloláctica sembrando las bacterias lácticas MBR Alpha O*enococcus oeni* (Lallemand). A los 23 días se dio por finalizada la fermentación maloláctica en todos los depósitos.

3.4.2 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación

La Figura VI-12 muestra la evolución en el contenido de azúcar durante la fermentación alcohólica con la cepa de levaduras D254, se observa una mayor disminución de azúcar en las fermentaciones de los mostos de uvas tratadas con respecto al control.

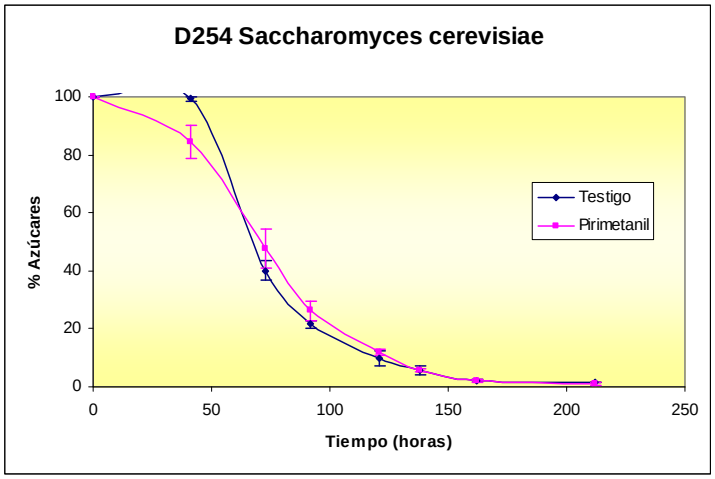


Figura VI-12: *Evolución de la fermentación con la cepa D254*

A partir de las 92 horas siguen una misma tendencia con valores similares en el % azúcar que queda en el mosto. La fermentación duró 10 días tanto para el testigo como para las uvas procedentes de cepas tratadas con pirimetanil. La fermentación maloláctica tuvo una duración de 23 días para ambos tratamientos, alcanzándose una cantidad de ácido málico inferior a 0.35 g L^{-1} en todos los depósitos.

En la fermentación alcohólica con la levadura VRB (Figura VI-13), la disminución en el contenido de azúcar es superior para las uvas procedentes de cepas tratadas que en las uvas testigo. Después de 165 horas y hasta el final del proceso, la fermentación presentó una evolución similar en ambos casos, testigo y pirimetanil. El proceso de fermentación alcohólica tuvo una duración de 10 días, tanto para el vino testigo como para el vino procedente con uvas tratadas con pirimetanil. La fermentación maloláctica se dio por finalizada en 23 días, observándose una cantidad de ácido málico inferior a 0.35 g L^{-1} en todos los vinos.

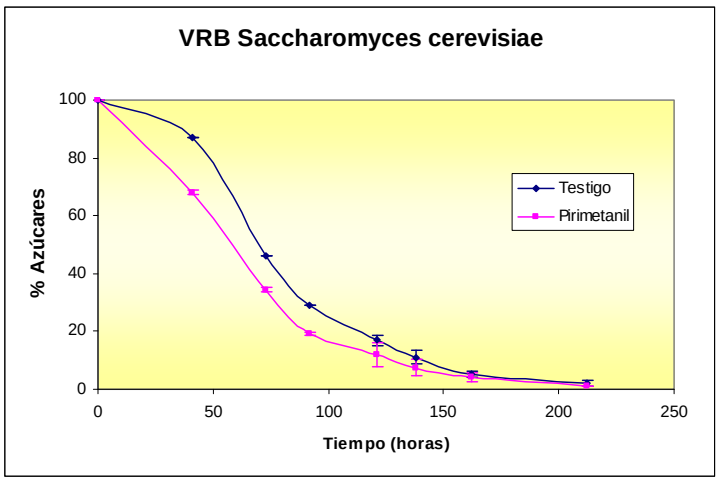


Figura VI-13: *Evolución de la fermentación con la cepa VRB*

En las Tablas VI-8 y VI-9 se resumen los valores encontrados para los diferentes parámetros estudiados en las muestras tomadas tanto en las uvas como en el vino elaborado para cada uno de los tratamientos.

En los parámetros referentes a la uva o mosto estrujado (Tabla VI-8), se observaron unos valores ligeramente superiores para grado Brix en el mosto procedente de cepas tratadas con pirimetanil respecto al control o testigo. Para el pH no se encontraron diferencias en los valores entre las uvas tratadas y sin tratar. La acidez total fue inferior en el caso de los mostos tratados. Cabe destacar los bajos valores encontrados en la determinación de la *lacassa*, debido al buen estado sanitario de la uva, encontrándose valores inferiores en el caso de las uvas tratadas con antibotrítico. La tasa de incidencia de podredumbre correspondería a menos de 1 % para ambos tipos de uvas.

Tabla VI-8: *Parámetros enológicos de las uvas vendimiadas*

Muestras	ºBrix	pH	Acidez Total [a]	*Lacassa* (nmol mL^{-1})
Testigo	20.6 ± 0.1	3.49 ± 0.04	6.67 ± 0.12	0.231 ± 0.025
Pirimetanil	21.2 ± 0.1	3.44 ± 0.05	5.97 ± 0.09	0.037 ± 0.010

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico

En el caso de la fermentación con la levadura D254 (Tabla VI-9), se alcanzó una mayor graduación alcohólica y acidez total en los vinos testigo que en los vinos precedentes de cepas tratadas con pirimetanil. No se encontraron diferencias en los valores de pH y los valores alcanzados de acidez volátil son los normales para vinos sin alteraciones microbianas. Los valores de IPT e IC son ligeramente inferiores para los vinos de pirimetanil, no encontrándose diferencias en la tonalidad o matiz. Respecto a la fermentación con la levadura VRB, los valores de grado alcohólico y acidez total encontrados en los vinos procedentes de uvas tratadas fueron inferiores que los correspondientes a los vinos sin tratamiento. Para los valores de pH no se encontraron diferencias en ambos tipos de vinos. El Índice de Polifenoles Totales (IPT) y el Índice de Color (IC) presentaron valores ligeramente inferiores en los vinos de pirimetanil respecto a vinos testigos. La tonalidad fue mayor en los vinos tratados.

Las fermentaciones se vieron afectadas por la aplicación del producto, alcanzando un grado alcohólico menor que el testigo en la misma proporción y de forma independiente a la levadura inoculada. Ambas levaduras mostraron similar poder fermentativo. La diferencias entre vinos testigo y pirimetanil para

acidez total, IPT, IC y tonalidad fueron mayores en los vinos de fermentación con la cepa VRB, mientras que el valor de pH no se vio afectado en ningún caso.

Tabla VI-9: *Parámetros enológicos de los vinos elaborados*

CEPA D254

Muestras	Etanol (v/v)	pH	Acidez Total [a]	*Acidez Volátil* [b]
Testigo	12.8 ± 0.4	3.65 ± 0.04	5.92 ± 0.21	0.30 ± 0.03
Pirimetanil	10.5 ± 0.3	3.63 ± 0.04	5.25 ± 0.15	0.37 ± 0.08

Muestras	IPT	IC	Tonalidad
Testigo	42.6 ± 2.9	12.8 ± 0.4	0.42 ± 0.01
Pirimetanil	37.1 ± 1.7	10.4 ± 0.4	0.41 ± 0.01

CEPA VRB

Muestras	Etanol (v/v)	pH	Acidez Total [a]	*Acidez Volátil* [b]
Testigo	12.7 ± 0.1	3.58 ± 0.05	5.85 ± 0.18	0.25 ± 0.02
Pirimetanil	10.3 ± 0.4	3.60 ± 0.08	5.08 ± 0.07	0.26 ± 0.01

Muestras	IPT	IC	Tonalidad
Testigo	38.1 ± 1.0	14.5 ± 2.5	0.43 ± 0.01
Pirimetanil	27.1 ± 0.8	9.5 ± 1.1	0.51 ± 0.01

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
[b] Acidez Volátil expresada como g L^{-1} de ácido acético

3.4.3 Análisis de residuos de pirimetanil

Durante el proceso de elaboración se tomaron sucesivas muestras en diferentes etapas en las que se realizó una determinación del producto por el método de extracción líquido-líquido desarrollado en el Capítulo V (Apartado 1).

La Tabla VI-10 muestra las concentraciones determinadas de pirimetanil durante las distintas etapas del proceso de vinificación con la levadura D254. En el estrujado, la concentración fue analizada en el líquido sobrenadante (mosto).

Durante la fermentación alcohólica, la concentración residual de pirimetanil al final del proceso descendió un 69.2 % de la concentración inicial en el mosto. En el descube, la concentración aumentó en el vino debido a un proceso de

extracción de residuos de pirimetanil desde las lías producidas durante la fermentación. En el vino embotellado, la presencia de pirimetanil disminuyó desde la fermentación maloláctica.

Tabla VI-10: *Concentración de residuos de pirimetanil durante el proceso de vinificación con la levadura D254 con su desviación (n=9)*

Tiempo	Muestra	Concentración (µg L^{-1})
0 horas	Estrujado	54.3 ± 3.36
92 horas	Fermentación alcohólica	11.6 ± 0.09
121 horas	Fermentación alcohólica	9.65 ± 0.52
144 horas	Fermentación alcohólica	21.4 ± 0.94
187 horas	Fermentación alcohólica	5.02 ± 0.43
235 horas	Descube	16.7 ± 0.18
30 días	Fermentación maloláctica	19.5 ± 0.47
45 días	Botella	3.95 ± 0.08

En la Tabla VI-11 se muestran los valores de concentración de pirimetanil determinados en el proceso de vinificación con la levadura VRB. En la primera toma de muestra se produjo un descenso mayor comparada con el proceso de la levadura D254. Al final de al fermentación alcohólica, la concentración de los residuos de pirimetanil descendió un 72.8 %. En el vino embotellado los residuos de pirimetanil se encontraron por debajo del LC (1.04 µg L^{-1}). El comportamiento de los residuos fue similar en ambas levaduras.

Tabla VI-11: *Concentración de residuos de pirimetanil durante el proceso de vinificación con la levadura VRB con su desviación (n=9)*

Tiempo	Muestra	Concentración (µg L^{-1})
0 horas	Estrujado	52.9 ± 0.84
92 horas	Fermentación alcohólica	3.53 ± 0.15
121 horas	Fermentación alcohólica	6.79 ± 0.41
144 horas	Fermentación alcohólica	15.4 ± 0.49
187 horas	Fermentación alcohólica	4.49 ± 0.21
235 horas	Descube	14.4 ± 0.28
30 días	Fermentación maloláctica	16.5 ± 0.37
45 días	Botella	<LC

LC = 1.04 µg L^{-1}

3.4.4 Análisis sensorial

El test Duo-Trio realizado para comprobar si los vinos procedentes de distintas uvas pueden diferenciarse, demostró que los vinos elaborados no difieren entre sí a un nivel de significación del 5%. El número de respuestas correctas y totales fueron 10/25 en el caso de los vinos elaborados con la cepa D254 y 12/25 para los correspondientes a la cepa VRB. El número de respuestas correctas que debían darse para que las muestras difieran en un nivel de significación superior al 5% es 18. No se estimó conveniente realizar un análisis descriptivo debido a al poca diferenciación encontrada en el test.

3.5. Vinificación de uvas variedad Tempranillo año 2005

3.5.1 Tratamiento y elaboración

Las cepas variedad Tempranillo procedentes de la misma parcela en la zona de La Rioja Alta fueron tratadas con Scala® (37.4% Pirimetanil) en las épocas correspondientes a final de floración y envero, a la dosis recomendada por los fabricantes de 2 L ha^{-1} (ensayo de Buenas Práctica Agrícolas o BPAs). Durante el tiempo que duró el experimento las condiciones metereológicas fueron registradas en la estación agroclimática de San Vicente de la Sonsierra (La Rioja). Las lluvias totales fueron 32.0 mm en 15 días de lluvia, y las temperatura medias máxima y mínima fueron 27.7 y 10.1 ºC respectivamente.

En otra parcela, situada en la zona de Aldeanueva de Ebro en Rioja Baja, cepas de la variedad Tempranillo, fueron tratadas con el producto Scala® (37.4 % pirimetanil) siete días antes de la fecha programada de vendimia en la dosis de aplicación recomendada por el fabricante de 2 L ha^{-1} (ensayo de Críticas Prácticas Agrícolas o CPAs). Durante el tiempo que duró el experimento las condiciones metereológicas fueron registradas en la estación agroclimática de Aldeanueva de Ebro (La Rioja). No se registraron lluvias y las temperatura medias máxima y mínima fueron 20.3 y 13.4 ºC respectivamente.

Los tratamientos se realizaron mediante un atomizador HARDI (Dinamarca) con capacidad de 2000 L. Se dejaron un número de filas sin tratar con el fin de tener un control o testigo de la parcela.

La uva se vendimió en cajas el día 7/10/05, recogiéndose aproximadamente 200 kg de uva para el tratamiento y otros 200 kg sin tratamiento alguno. La pasta procedente de la despalilladora-estrujadora fue conducida mediante bomba peristáltica a los depósitos de fermentación de 50 L. La elaboración se realizó por triplicado tanto para el testigo-control como para cada uno de los tratamientos.

Los depósitos fueron inoculados con la levadura VRB Uvaferm (Lallemand) de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* neutra, autóctona de La Rioja. Se seleccionó esta levadura debido a los buenos resultados de fermentación y a la mayor disipación de residuos observada en laboratorio y en bodega el año anterior. Los depósitos fueron bazuqueados dos veces por día. Las fermentaciones finalizaron a los 11 días en el ensayo de BPAs y al cabo de 13 días para el ensayo de CPAs. Al día siguiente se procedió al descube y el vino yema obtenido se llevó a depósitos de 15 L. Posteriormente se llevó a cabo la fermentación maloláctica sembrando bacterias lácticas MBR Alpha O*enococcus oeni*. Al cabo de 52 días y 46 días respectivamente para los ensayos de BPAs y CPAs se dio por finalizada la fermentación maloláctica. Una vez finalizadas las fermentaciones se tomaron muestras para realizar los correspondientes análisis y acondicionar el vino obtenido para resguardarlo de futuras alteraciones hasta ser embotellado.

3.5.2 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación

I) BPA

En las Tablas VI-12 y VI-13 se resumen los valores encontrados para los diferentes parámetros estudiados en las muestras tomadas tanto al inicio como al final de la fermentación para cada uno de los tratamientos realizados en el ensayo de BPA.

Tabla VI-12: *Parámetros enológicos de las uvas vendimiadas (BPA)*

Muestras	ºBrix	pH	Acidez Total [a]	*Lacassa* (nmol mL^{-1})
Testigo	22.2 ± 0.1	3.55 ± 0.02	4.65 ± 0.08	0.046 ± 0.014
Pirimetanil	21.0 ± 0.1	3.46 ± 0.02	4.39 ± 0.05	nd

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
nd = no detectado

Tabla VI-13: *Parámetros enológicos de los vinos elaborados (BPA)*

Muestras	Etanol (v/v)	pH	Acidez Total [a]	*Acidez Volátil* [b]
Testigo	13.4 ± 0.1	3.72 ± 0.02	4.74 ± 0.18	0.37 ± 0.01
Pirimetanil	12.7 ± 0.1	3.61 ± 0.02	4.72 ± 0.15	0.40 ± 0.05

Muestras	IPT	IC	Tonalidad
Testigo	39.5 ± 1.3	12.6 ± 0.4	0.59 ± 0.03
Pirimetanil	45.7 ± 2.9	14.6 ± 1.1	0.58 ± 0.03

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
[b] Acidez Volátil expresada como g L^{-1} de ácido acético

En la elaboración de las uvas tratadas con pirimetanil se observaron unos valores ligeramente inferiores para ºBrix, pH y acidez total respecto al control. No se encontraron diferencias en la acidez total de los vinos, mientras que el pH fue inferior en los vinos procedentes de uvas tratadas. Cabe destacar los bajos valores encontrados en la determinación de la lacassa, debido al buen estado sanitario de la uva.

El grado alcohólico alcanzado fue inferior que al de los vinos sin tratamiento. El Índice de Polifenoles Totales (IPT) y el Índice de Color (IC) presentaron valores superiores a los del testigo. Para la tonalidad no se encontraron diferencias en los valores entre las uvas tratadas y sin tratar.

La Figura VI-14 muestra la evolución en el contenido de azúcar durante la fermentación alcohólica. Se observa una disminución similar entre los mostos de uvas tratadas y el control, llevándose a cabo en el mismo período de tiempo (10 días). La fermentación maloláctica tuvo una duración de 22 días en todos los depósitos, alcanzándose una cantidad de ácido málico inferior a 0.04 g L^{-1}.

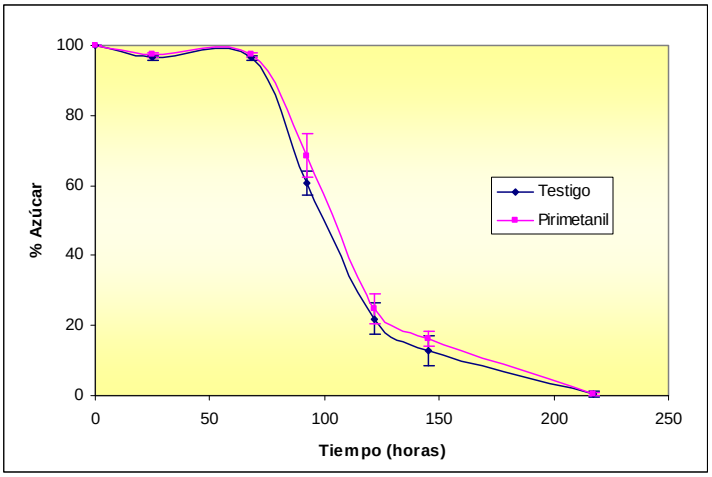


Figura VI-14: *Evolución de la fermentación de las diferentes muestras (BPA)*

II) CPA

En las Tablas VI-14 y VI-15 se recogen los parámetros de vinificación más importantes para cada una de las muestras en el ensayo de CPA. En la elaboración de las uvas tratadas con pirimetanil se observaron unos valores superiores para º Brix, y acidez total en mosto respecto al control, mientras que el pH encontrado en las uvas tratadas con pirimetanil fue inferior respecto al control. En la determinación de laccasa, no se encontró cantidad alguna debido al buen estado sanitario de la uva.

El grado alcohólico y la acidez total fueron superiores en vinos procedentes de uvas tratadas con pirimetanil, mientras que le pH encontrado fue inferior en estos vinos. El Índice de Polifenoles Totales (IPT) y el Índice de Color (IC) no presentaron valores diferentes para ambos vinos. La tonalidad fue inferior en el caso de la elaboración con pirimetanil.

Tabla VI-14: *Parámetros enológicos de las uvas vendimiadas(CPA)*

Muestras	ºBrix	pH	Acidez Total [a]	*Lacassa* (nmol mL^{-1})
Testigo	25.6 ± 0.2	3.69 ± 0.01	3.82 ± 0.10	nd
Pirimetanil	26.8 ± 0.2	3.52 ± 0.01	4.08 ± 0.05	nd

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
nd = no detectado

Tabla VI-15: *Parámetros enológicos de los vinos elaborados(CPA)*

Muestras	Etanol (v/v)	pH	Acidez Total [a]	*Acidez Volátil* [b]
Testigo	14.3 ± 0.2	3.92 ± 0.01	4.89 ± 0.03	0.24 ± 0.02
Pirimetanil	14.8 ± 0.1	3.74 ± 0.03	5.28 ± 0.22	0.14 ± 0.02

Muestras	IPT	IC	Tonalidad
Testigo	64.5 ± 3.0	19.9 ± 0.7	0.62 ± 0.01
Pirimetanil	68.0 ± 4.6	19.0 ± 0.7	0.55 ± 0.02

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
[b] Acidez Volátil expresada como g L^{-1} de ácido acético

En la Figura VI-15 se muestra la evolución de la fermentación según el contenido de azúcar en los diferentes tratamientos del ensayo de CPA. Se observa una disminución similar en las fermentaciones de mosto de uvas tratadas siete días antes de la vendimia con respecto a las uvas control. El final de la fermentación se produce en el mismo tiempo, 13 días. La fermentación maloláctica se dio por concluida en 43 días para todos los vinos, alcanzándose una cantidad de ácido málico inferior a 0.1 g L^{-1} en los depósitos control, mientras que en los vinos de uvas tratadas el contenido en ácido málico fue superior a 0.2 g L^{-1}.

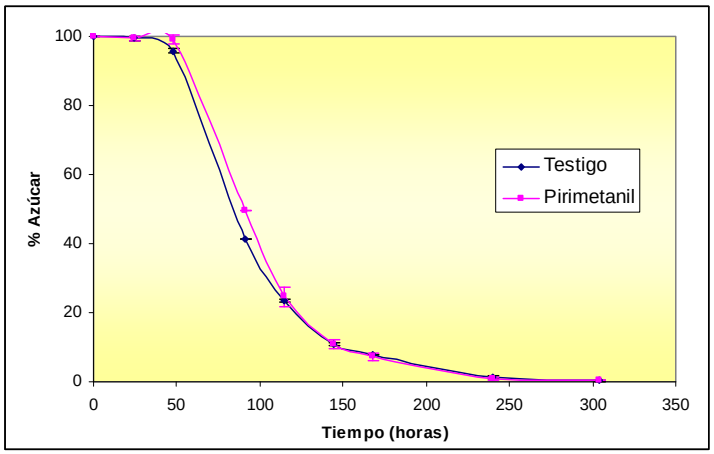


Figura VI-15: *Evolución de la fermentación de las diferentes muestras (CPA)*

3.5.3 Análisis de residuos de pirimetanil

El análisis de residuos conlleva la determinación de pirimetanil en diferentes muestras, comenzando con el grano de uva y finalizando en el vino embotellado. En el momento de vendimia se muestrearon racimos de uvas de las cuales se seleccionan 75 granos de partes diferentes de los racimos (parte superior, media e inferior) Las uvas se mantienen a –20 ºC hasta ser analizadas. Las uvas se analizaron según el método analítico desarrollado en el Capítulo V (Apartado 4), considerando concentraciones residuales en la superficie exterior del grano, en el hollejo y en la pulpa.

Durante la vinificación se tomaron muestras en diferentes etapas en las que se realizó una determinación del producto mediante extracción en fase sólida, método desarrollado en el Capítulo V (Apartado 2).

La Tabla VI-16 muestra las concentraciones determinadas de pirimetanil en las tres partes del grano de uva para los dos ensayos. En el ensayo de BPA, la cantidad total de residuos en uva fue 0.123 mg kg^{-1}, inferior al límite máximo de residuos (LMR = 5 mg kg^{-1}). Los residuos se encontraron principalmente en el hollejo, con un 68.3 % frente a un 13.8 % en la pulpa y 17.9 % en la superficie externa de la piel. En el ensayo de CPAs, la cantidad total en la uva fue 1.315 mg kg^{-1}. Los residuos se encontraron principalmente en el hollejo, con un 73.5 % frente a un 16.3 % en la pulpa y un 10.2 % en la superficie. Esta distribución concuerda con los estudios de movilidad y penetración realizados en laboratorio expuestos en el Capítulo V (Apartado 4).

Tabla VI-16: *Concentración de residuos de pirimetanil en las uvas con su desviación estándar (n=3)*

Uva	Concentración BPA (mg kg^{-1})	Concentración CPA (mg kg^{-1})
Superficie	0.022 ± 0.003	0.134 ± 0.011
Hollejo	0.084 ± 0.002	0.968 ± 0.058
Pulpa	0.017 ± 0.002	0.213 ± 0.009

En la Tabla VI-17 se presentan las concentraciones de pirimetanil durante las distintas etapas del proceso de vinificación en el ensayo de BPA. En el estrujado, la concentración fue analizada en el líquido sobrenadante (mosto). La concentración residual de pirimetanil permanece constante durante todo el

proceso de fermentación alcohólica y fermentación maloláctica hasta el embotellado. La cantidad de fungicida desciende un 41.9 % desde el descube hasta el final de la fermentación maloláctica. En el vino embotellado los residuos estaban por debajo del límite de detección.

Tabla VI-17: *Concentración de residuos de pirimetanil durante el proceso de fermentación alcohólica (BPA) con su desviación estándar (n=9)*

Tiempo	Muestra	Concentración (µg L^{-1})
0 horas	Estrujado	88.7 ± 1.3
24 horas	Fermentación alcohólica	89.2 ± 0.4
66 horas	Fermentación alcohólica	88.1 ± 1.2
90 horas	Fermentación alcohólica	89.2 ± 0.3
120 horas	Fermentación alcohólica	89.5 ± 0.7
142 horas	Fermentación alcohólica	93.9 ± 2.7
238 horas	Descube	91.2 ± 3.7
35 días	Fermentación maloláctica	53.2 ± 1.8
62 días	Fermentación maloláctica (fin)	52.4 ± 3.4
67 días	Botella	<LD

LD = 0.54 µg L^{-1}

La Tabla VI-18 muestra las concentraciones obtanidas de pirimetanil durante las distintas etapas del proceso de vinificación en el ensayo de CPA. En el estrujado, la concentración fue analizada en el líquido sobrenadante (mosto).

Tabla VI-18: *Concentración de residuos de pirimetanil durante el proceso de fermentación alcohólica (CPA) con su desviación estándar (n=9)*

Tiempo	Muestra	Concentración (mg L^{-1})
0 horas	Estrujado	1.04 ± 0.07
24 horas	Fermentación alcohólica	0.49 ± 0.03
48 horas	Fermentación alcohólica	0.43 ± 0.04
90 horas	Fermentación alcohólica	0.49 ± 0.03
114 horas	Fermentación alcohólica	0.67 ± 0.04
144 horas	Fermentación alcohólica	0.66 ± 0.01
166 horas	Fermentación alcohólica	0.69 ± 0.03
336 horas	Descube	0.49 ± 0.03
36 días	Fermentación maloláctica	0.56 ± 0.03
57 días	Fermentación maloláctica	0.52 ± 0.05
67 días	Botella 67 días	0.51 ± 0.03

A las 24 horas del inicio del proceso fermentativo, la concentración disminuye un 52.3 %. Un aumento en la cantidad de pirimetanil se observó a las 114

horas. Este hecho fue debido a una solubilización del compuesto producido por los procesos de maceración en medio hidroalcohólico y prácticas enológicas como el bazuqueo. Al finalizar la fermentación alcohólica la concentración disminuye un 47.1 % respecto al contenido inicial. Durante la fermentación maloláctica la concentración permanece constante e inferior a la encontrada en la etapa anterior. La cantidad de fungicida disminuyó en el vino final embotellado un 50.1 % respecto de la concentración inicial en el mosto.

3.5.4 Análisis sensorial

El test Duo-Trio realizado para determinar si los vinos procedentes de uvas de distintos tratamientos pueden diferenciarse, demostró que los vinos elaborados con uvas tratadas con pirimetanil y sin tratamiento no difieren entre sí a un nivel de significación del 5%. El número de respuestas correctas fue 32, entre un total de 55 respuestas, frente a 33 respuestas correctas para un nivel de significación del 5 %.

A continuación se realizó un análisis descriptivo de los tres tipos de vino. Se comentaron las características de la fase visual, fase olfativa y fase gustativa. En las Figuras VI-16, VI-17 y VI-18 se observan los diagramas de este análisis sensorial mostrando la frecuencia de citación dentro de un máximo de 55.

Fase visual: se observó que los vinos de uvas tratadas con pirimetanil presentaron mayor capa ($p<0.05$) y mayor componente violáceo ($p<0.05$) en el color que el vino control.

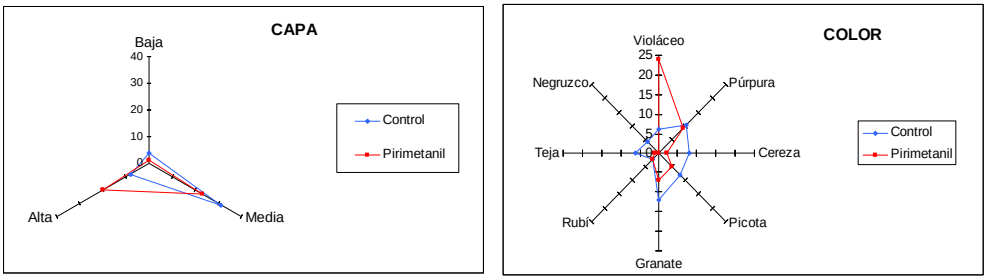


Figura VI-16: *Fase visual*

Fase olfativa: los vinos elaborados con uvas tratadas obtuvieron una intensidad aromática más baja ($p<0.05$) que el control, observándose una calidad aromática más limpia y franca en el caso del pirimetanil ($p<0.05$). Los dos vinos presentaron un carácter frutal y vegetal similar ($p>0.05$), con cierto matiz químico.

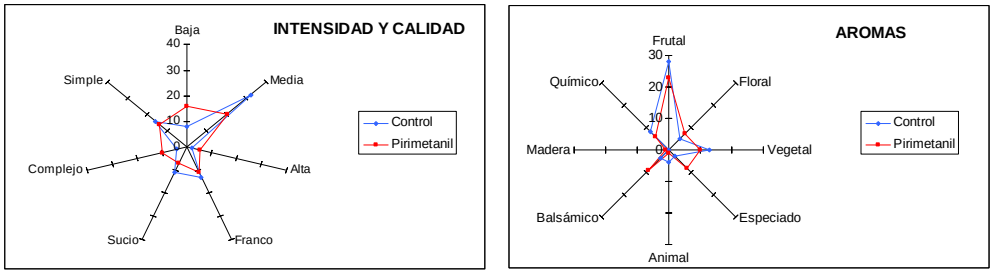


Figura VI-17: *Fase olfativa*

Fase gustativa: los sabores se encontraron más equilibrados en los vinos que proceden de uvas tratadas ($p<0.05$). Todos poseen un tacto suave y ligero, son similares en cuanto a persistencia en boca y el postgusto en ambos es marcadamente frutal y algo vegetal ($p>0.05$).

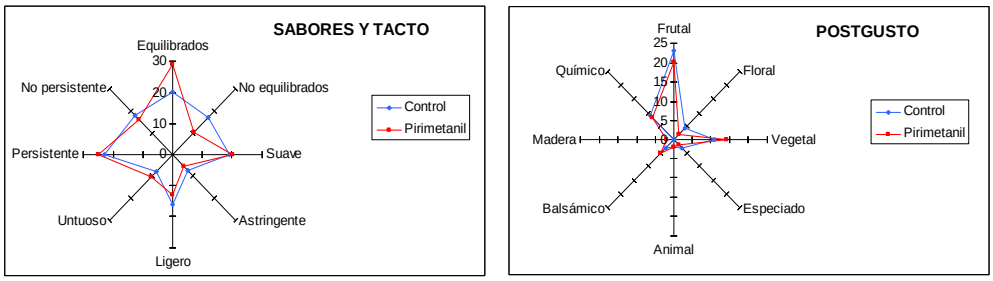


Figura VI-18: *Fase gustativa*

3.6. Vinificación de uvas variedad Tempranillo año 2006

3.6.1 Tratamiento y elaboración

Las cepas variedad Tempranillo procedentes de la misma parcela en la zona de La Rioja Alta fueron tratadas con Scala® (37.4% Pirimetanil) en las épocas

correspondientes a final de floración y envero, a la dosis recomendada por el fabricante de 2 L ha^{-1}. Durante el tiempo que duró el experimento las condiciones metereológicas fueron registradas en la estación agroclimática de San Vicente de la Sonsierra (La Rioja). Las lluvias totales fueron 67.2 mm en 19 días de lluvia, y las temperatura medias máxima y mínima fueron 26.6 y 12.8 ºC respectivamente.

Cepas de la variedad Tempranillo de la misma parcela situadas en la zona de Aldeanueva de Ebro en La Rioja Baja fueron tratadas con el producto Scala® (37.4 % pirimetanil) siete días antes de la fecha programada de vendimia en la dosis de aplicación recomendada por los fabricantes (2 L ha^{-1}). Durante el experimento las condiciones metereológicas fueron registradas en la estación agroclimática de Aldeanueva de Ebro (La Rioja). Las lluvias totales fueron 2.4 mm en 2 días de lluvia, y las temperatura medias máxima y mínima fueron 20.4 y 14.8 ºC respectivamente.

El tratamiento se realizó mediante un atomizador HARDI (Dinamarca) con capacidad de 2000 L. Se dejaron un número de filas sin tratar con el fin de tener un control o testigo de la parcela.

La uva se vendimió en cajas el día 10/10/06, recogiéndose aproximadamente 200 kg de uva para el tratamiento y otros 200 kg sin tratamiento alguno. La pasta procedente de la despalilladora-estrujadora fue conducida mediante bomba peristáltica a los depósitos de fermentación de acero inoxidable de 50 L. La elaboración se realizó por triplicado tanto para el testigo-control como para el tratamiento.

Los depósitos fueron inoculados con la levadura VRB Uvaferm (Lallemand) de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* neutra, autóctona de La Rioja. Se seleccionó esta levadura debido a los buenos resultados de fermentación y a la mayor disipación de residuos observada en laboratorio y en bodega años anteriores. Los depósitos fueron bazuqueados dos veces por día. Las fermentaciones finalizaron a los 12 días para los dos ensayos, BPA y CPA. Al día siguiente se procedió al descube y el vino yema obtenido se llevó a depósitos de 15 L. Posteriormente se llevó a cabo la fermentación maloláctica sembrando bacterias

lácticas MBR Alpha O*enococcus oeni*. Al cabo de 34 días y 32 días respectivamente para los ensayos de BPA y CPA se dio por finalizada la fermentación maloláctica. Una vez finalizadas las fermentaciones se tomaron muestras para realizar los correspondientes análisis y acondicionar el vino obtenido para resguardarlo de futuras alteraciones hasta ser embotellado.

3.6.2 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación

I) BPA

En las Tablas VI-19 y VI-20 se resumen los valores encontrados para los diferentes parámetros estudiados en las muestras tomadas tanto al inicio como al final de la fermentación para el control y el tratamiento con pirimetanil en el ensayo de BPA.

Tabla VI-19: *Parámetros enológicos de las uvas vendimiadas (BPA)*

Muestras	º Brix	pH	Acidez Total [a]	*Lacassa* (nmol mL^{-1})
Testigo	25.0 ± 0.2	3.68 ± 0.02	4.28 ± 0.02	0.507 ± 0.009
Pirimetanil	22.8 ± 0.1	3.55 ± 0.01	4.35 ± 0.03	0.048 ± 0.006

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico

Tabla VI-20: *Parámetros enológicos de los vinos elaborados (BPA)*

Muestras	Etanol (v/v)	pH	Acidez Total [a]	*Acidez Volátil* [b]
Testigo	13.4 ± 0.8	3.89 ± 0.03	4.06 ± 0.03	0.21 ± 0.03
Pirimetanil	13.6 ± 1.4	3.69 ± 0.01	5.07 ± 0.13	0.19 ± 0.06

Muestras	IPT	IC	Tonalidad
Testigo	47.6 ± 3.2	15.7 ± 1.1	0.73 ± 0.01
Pirimetanil	37.9 ± 2.2	12.6 ± 1.8	0.72 ± 0.01

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
[b] Acidez Volátil expresada como g L^{-1} de ácido acético

En la elaboración de las uvas tratadas con Pirimetanil se observaron unos valores inferiores para º Brix y pH. La acidez total fue superior en los mostos procedentes de uvas tratadas. Los bajos valores encontrados en la determinación de la *lacassa* se debieron al buen estado sanitario de la uva,

aunque se detectaron valores más bajos en las uvas tratadas con pirimetanil (ver Tabla VI-20).

En los vinos elaborados con la aplicación de pirimetanil, el pH fue inferior y la acidez total fue superior a los vinos testigo, mientras que no se encontraron diferencias en la graduación alcohólica alcanzada. La acidez total revela la ausencia de alteraciones o picados. El Índice de Polifenoles Totales (IPT) observado en los vinos procedentes de uvas tratadas con pirimetanil fue muy inferior al correspondiente a los vinos control o testigo. Para la tonalidad y el Índice de Color (IC) no se encontraron diferencias en los valores entre los distintos vinos.

La Figura VI-19 muestra la evolución en el contenido de azúcar durante la fermentación alcohólica para el ensayo de BPA. Se observó una gran variabilidad entre las réplicas. Se aprecian diferencias en la evolución del contenido de azúcar, siendo superiores los valores correspondientes a las uvas tratadas con pirimetanil respecto a las del testigo; al final del proceso ambas fermentaciones se igualaron, llevándose a cabo en el mismo período de tiempo (12 días). La fermentación maloláctica tuvo una duración de 34 días en todos los depósitos, alcanzándose una cantidad de ácido málico inferior a 0.30 g L^{-1}.

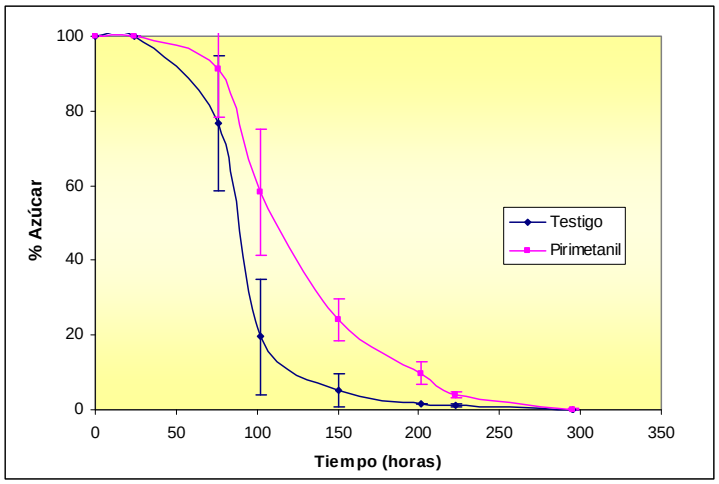


Figura VI-19: *Evolución de la fermentación de las diferentes muestras (BPA)*

II) CPA

En las Tablas VI-21 y VI-22 se recogen los parámetros de vinificación convencionales para cada una de las muestras para el ensato de CPA.

Tabla VI-21: *Parámetros enológicos de las uvas vendimiadas (CPA)*

Muestras	º Brix	pH	Acidez Total [a]	*Lacassa* (nmol mL^{-1})
Testigo	20.2 ± 0.2	3.58 ± 0.01	4.42 ± 0.01	0.092 ± 0.014
Pirimetanil	19.2 ± 0.1	3.32 ± 0.01	5.36 ± 0.02	0.046 ± 0.010

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico

Tabla VI-22: *Parámetros enológicos de los vinos elaborados (CPA)*

Muestras	Etanol (v/v)	pH	Acidez Total [a]	*Acidez Volátil* [b]
Testigo	12.2 ± 0.4	3.89 ± 0.01	5.51 ± 0.30	0.34 ± 0.06
Pirimetanil	12.0 ± 0.2	3.61 ± 0.01	5.77 ± 0.42	0.38 ± 0.05

Muestras	IPT	IC	Tonalidad
Testigo	43.5 ± 3.3	14.4 ± 2.1	0.64 ± 0.01
Pirimetanil	39.5 ± 4.7	11.8 ± 1.6	0.57 ± 0.01

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
[b] Acidez Volátil expresada como g L^{-1} de ácido acético

En la elaboración de las uvas tratadas con pirimetanil se observaron unos valores inferiores para grado Brix y pH respecto al control, mientras que la acidez total encontrado en las uvas tratadas con pirimetanil es superior respecto al control.

El grado alcohólico fue similar para el control y pirimetanil. La acidez total no presentó diferencias en ambos vinos, mientras que el pH fue inferior para los vinos de uvas tratadas. El IPT y el IC fueron similares para ambos vinos, y la tonalidad para la elaboración de uvas tratadas con pirimetanil presentaron valores inferiores a los del control. Los valores de acidez volátil no revelan la presencia de alteraciones. En la determinación de *lacassa*, los valores encontrados fueron muy bajos debido al buen estado sanitario de la uva, siendo inferiores los correspondientes a las uvas tratadas con pirimetanil.

En la Figura VI-20 se muestra la evolución de la fermentación de las diferentes muestras, según el contenido de azúcar para el ensayo de CPA.

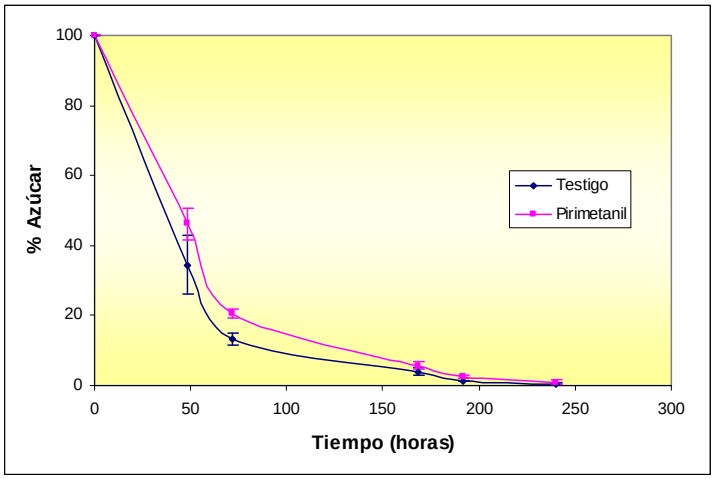


Figura VI-20: *Evolución de la fermentación de las diferentes muestras (CPA)*

Se observó una mayor disminución en el caso de las uvas testigo con respecto a las uvas tratadas con pirimetanil hasta las 168 horas, momento en el que las dos fermentaciones siguieron la misma evolución con similares valores de % azúcar. El final de la fermentación se produce en el mismo período de tiempo para ambas, 12 días. La fermentación maloláctica se dio por concluida en 32 días para todos los vinos, alcanzándose una cantidad de ácido málico menor de 0.05 g L^{-1} en todos los depósitos.

3.6.3 Análisis de residuos de pirimetanil

En el momento de vendimia se muestrearon distintos racimos. Se escogieron 75 granos de partes diferentes de los racimos (parte superior, media e inferior), guardándose a –20 ºC para su posterior análisis. Las uvas se analizaron según el método descrito en el Capítulo V (Apartado 4), considerando concentraciones residuales en la superficie exterior del grano, en el hollejo y en la pulpa.

Durante el proceso de elaboración se tomaron sucesivas muestras en diferentes etapas en las que se realizó la determinación del producto por el método de extracción en fase sólida desarrollado en el Capítulo V.

La Tabla VI-23 muestra las concentraciones determinadas de pirimetanil en las tres partes del grano de uva. En el ensayo de BPA, los residuos totales encontrados en el momento de la vendimia fueron 0.022 mg kg^{-1}. Esta cantidad está muy por debajo del Límite Máximo de Residuos (5 mg kg^{-1}). La mayor proporción de estos residuos se encontró en la piel u hollejo (68.2 %), mientras que en la superficie externa se encontraron el 18. 2 %. Se observó una penetración en la pulpa de un 13.6% de los residuos. En el ensayo de CPA, la cantidad total de residuos en el momento de la vendimia fueron 3.78 mg kg^{-1}. Un 78.2 % se estos residuos se encontraron en la piel. La distribución concuerda con los estudios de movilidad expuestos en el Capítulo IV.

Tabla VI-23: *Concentración de residuos de pirimetanil en uvas con su desviación estándar (n=3)*

Uva	Concentración BPA (mg kg^{-1})	Concentración CPA (mg kg^{-1})
Superficie	0.004 ± 0.001	0.443 ± 0.030
Hollejo	0.015 ± 0.001	2.955 ± 0.333
Pulpa	0.003 ± 0.001	0.382 ± 0.032

La Tabla VI-24 muestra las concentraciones determinadas de pirimetanil durante las distintas etapas del proceso de vinificación en el ensayo de BPA.

Tabla VI-24: *Concentración de residuos de pirimetanil durante el proceso de fermentación alcohólica (BPA) con su desviación estándar (n=9)*

Tiempo	Muestra	Concentración (µg L^{-1})
0 horas	Estrujado	22.0 ± 1
72 horas	Fermentación alcohólica	<LD
96 horas	Fermentación alcohólica	<LD
114 horas	Fermentación alcohólica	<LD
192 horas	Fermentación alcohólica	<LD
312 horas	Descube	<LD
48 días	Fermentación maloláctica	<LD
60 días	Botella	<LD

LD = 0.54 µg L^{-1}

En el estrujado, la concentración fue analizada en el líquido sobrenadante (mosto). La cantidad de pirimetanil encontrada en este mosto fue 22.0 µg L^{-1} y disminuyó en las siguientes 72 horas de fermentación hasta niveles por debajo del límite de detección (0.54 µg L^{-1}).

En la Tabla VI-25 se muestran las concentraciones de pirimetanil determinadas durante el proceso de vinificación en el ensayo de CPA.

Tabla VI-25: *Concentración de residuos de pirimetanil durante el proceso de fermentación alcohólica (CPA) con su desviación estándar (n=9)*

Tiempo	Muestra	Concentración (mg L^{-1})
0 horas	Estrujado	10.69 ± 0.77
72 horas	Fermentación alcohólica	2.69 ± 0.06
120 horas	Fermentación alcohólica	3.72 ± 0.14
196 horas	Fermentación alcohólica	4.05 ± 0.08
288 horas	Descube	4.19 ± 0.24
36 días	Fermentación maloláctica	2.66 ± 0.12
44 días	Fermentación maloláctica	3.03 ± 0.06
58 días	Botella	2.36 ± 0.11

La concentración de pirimetanil en el estrujado es de 10.69 mg L^{-1} y este nivel disminuyó aproximadamente 75 % en la siguiente toma de muestra (72 horas). Se observó un aumento en la concentración a las 120 horas. Este hecho fue debido a una solubilización del compuesto producido por los procesos de maceración en medio hidroalcohólico y prácticas enológicas como el bazuqueo. Después de 120 horas, la concentración permaneció constante hasta el final de la fermentación, disminuyendo un 60.8 % de la concentración inicial en mosto. La cantidad de fungicida disminuyó un 71.6 % al final de la fermentación maloláctica y en el vino final embotellado el descenso fue de un 78 % respecto de la concentración inicial en el mosto.

3.6.4 Análisis sensorial

El test Duo-Trio realizado para comprobar si los vinos procedentes de distintas uvas pueden diferenciarse, demostró que los vinos elaborados no difieren entre sí a un nivel de significación del 5%. El número de respuestas correctas y totales fueron 12/30. El número de respuestas correctas que debían

darse para que las muestras difieran en un nivel de significación superior al 5% es 20. Dada la ausencia de significación no se consideró oportuno realizar un análisis descriptivo.

4. FERMENTACIONES DE UVAS PROCEDENTES DE CEPAS TRATADAS CON PROHEXADIONA DE CALCIO

4.1. Introducción

El objetivo de este trabajo consiste en el estudio de los efectos del regulador de crecimiento Prohexadiona de Calcio en la producción de cepas variedad Tempranillo, así como su influencia en la vinificación de las uvas procedentes de las cepas tratadas y en las propiedades organolépticas de los vinos elaborados.

El estudio se realizó durante dos años consecutivos en la misma parcela de La Rioja Alta (Briones). La Prohexadiona de Calcio (ProCa) es un regulador de crecimiento que puede ser una opción en la vitivinicultura de calidad. No existen trabajos previos acerca de la aplicación de este producto en viñas de Europa ni en variedad Tempranillo. Los estudios realizados sobre otras variedades en Estados Unidos (Cabernet Sauvignon, Syrah) no han demostrado mejoras organolépticas en los vinos elaborados con uvas procedentes de cepas tratadas con ProCa.

El método de elaboración fue el tradicional descrito en el apartado 3.2 de este Capítulo así como la determinación de los parámetros enológicos convencionales. El análisis sensorial también se realizó del mismo modo que en las anteriores vinificaciones de este Capítulo (Apartado 3.3). En este apartado también se incluyó la determinación de las coordenadas de color, debido a la posible influencia de la aplicación de Prohexadiona de calcio. Para la determinación de las coordenadas de color se ha tenido la inestimable colaboración del grupo de color de la Universidad de La Rioja que tiene desarrollado un software propio que calcula las coordenadas de color de los vinos en el espacio CIELab utilizando el iluminante D65 y el observador CIE 1964, siguiendo para ello el método recomendado por la OIV. A partir del

espectro de transmitancia entre 320-720 nm se calcularon las coordenadas CIELab: a* (tonalidad que va de verde al rojo), b* (tonalidad que va del amarillo al azul) y L* (expresa la claridad y tiene una graduación entre el blanco y el negro) a partir de los valores triestímulo X, Y y Z.

4.2. Vinificación de uvas variedad Tempranillo (año 2004)

4.2.1 Tratamiento y Elaboración

La aplicación de Prohexadiona de Calcio sobre una parcela de viñedo de variedad Tempranillo en Briones (Rioja Alta), de 13 años de edad que presentaba unas condiciones de cultivo uniformes en lo que refiere a plantas, crecimiento y desarrollo vegetativo, marco y distancia entre cepas, método de cultivo, abonados, riegos, etc. El sistema de conducción fue espaldera con posicionamiento vertical de los brotes. Las cepas fueron podadas a 12 yemas.

ProCa se aplicó como Regalis® (BASF, Alemania) en una sola dosis 3 kg ha^{-1} en el período vegetativo de prefloración (BBCH 57) en la fecha 12/06/04. El tratamiento se llevó a cabo mediante pulverización con un atomizador HARDÍ (Dinamarca), sobre las dos caras de la cubierta vegetal, empapando completamente todos los brotes. La aplicación se realizó en el momento en que no había predicción de lluvia en un mínimo de 24 horas. Se dejaron un número de filas sin tratar con el fin de tener un control o testigo de la parcela. Durante el experimento las condiciones metereológicas fueron registradas en la estación agroclimática de San Vicente de la Sonsierra (La Rioja). Las lluvias totales fueron 112 mm en 35 días de lluvia, y las temperatura medias máxima y mínima fueron 26.3 y 12.7 ºC respectivamente.

La uva se vendimió en cajas el 11/10/04 cosechando aproximadamente 300 kg de uva con tratamiento y otros 300 kg sin tratamiento. La pasta fue conducida mediante bomba peristáltica a los depósitos de fermentación de acero inoxidable de 100 L.

El 12/10/04 se inocularon los depósitos con la cepa neutra de *Saccharomyces cerevisiae* VRB Uvaferm (Lallemand), autóctona de La Rioja. Los depósitos fueron remontados dos veces por día. Una vez finalizada la fermentación alcohólica (22/10/04) se procedió al descube y el vino yema obtenido se llevó a depósitos de 50 L. Posteriormente se llevó a cabo la fermentación maloláctica sembrando las bacterias lácticas MBR Alpha O*enococcus oeni* el 26/10/04. La fermentación maloláctica se dio por finalizada el 18/11/04.

Con el fin de evaluar el tamaño de la baya, se colocaron 100 granos en bandejas perforadas con agujeros de distinto diámetro (18, 16, 14, 12 y 10 mm). De este modo, las bayas fueron atravesando las distintas bandejas desde la de mayor diámetro hasta la de menor, contabilizando la proporción de uvas retenidas en cada bandeja. A continuación, las bayas fueron estrujadas y se separó el sólido del líquido. Se midió la relación peso del sólido/volumen de mosto.

4.2.2 Efectos en campo

Se observó un efecto positivo en el estado sanitario de las uvas vendimiadas tratadas con el regulador de crecimiento Prohexadiona de calcio. En la Tabla VI-26 se muestran algunos parámetros relacionados con el rendimiento de producción.

***Tabla VI-26**: Valores de distintos parámetros de rendimiento de producción*

Muestras	**Tamaño de baya[a]**			
	10-12 mm	12-14mm	14-16mm	16-18 mm
Testigo	8.1 ± 0.3	54.3 ± 7.2	31.8 ± 7.5	5.7 ± 1.1
ProCa	24.2 ± 2.3	57.5 ± 4.6	15.1 ± 2.7	3.2 ± 1.5

[a] % de bayas para cada diámetro

Muestras	**Peso medio de baya (g)**	**% Sólido/líquido**
Testigo	2.38 ± 0.06	42.3 ± 2.4
ProCa	1.78 ± 0.03	57.1 ± 4.3

La reducción media que se observa en el peso medio de baya procedente de cepas tratadas con ProCa indica una reducción en el rendimiento de cosecha del 25 %. La presencia de hombros en los racimos se redujo un 90 %, es decir, en 10 racimos observados, pasaron de 10 a 1. El tamaño de las bayas procedentes

de las cepas tratadas fue significativamente diferente al tamaño de baya de las cepas control. Los racimos de viñas tratadas presentan un mayor número de bayas de menor tamaño (10-12 mm de diámetro) y un menor número de bayas con diámetro 14-18 mm. La relación sólido/líquido fue significativamente mayor en las uvas tratadas. El peso medio de baya fue significativamente menor en las uvas tratadas.

En la Figura VI-21 se observan las diferencias entre los racimos de las cepas control y los procedentes de cepas tratadas con ProCa.

A) B)

Figura V-21: *Racimos procedentes de A) cepas sin tratar; y B) cepas tratadas con ProCa*

4.2.3 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación

En las Tabla VI-27 y VI-28 se muestran los valores encontrados para diferentes parámetros tanto al inicio como al final de la fermentación para cada uno de los depósitos. El mosto procedente de uvas tratadas presentó valores superiores para grado Brix, pH y acidez total.

Tabla VI-27: *Parámetros enológicos de las uvas vendimiadas*

Muestras	º Brix	pH	Acidez Total [a]	*Lacassa* (nmol mL^{-1})
Testigo	20.6 ± 0.2	3.49 ± 0.01	4.35 ± 0.02	0.231 ± 0.014
ProCa	24.4 ± 0.1	3.78 ± 0.01	5.34 ± 0.01	0.046 ± 0.010

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico

Tabla VI-28: *Parámetros enológicos de las vinos elaborados*

Muestras	Etanol (v/v)	pH	Acidez Total [a]	*Acidez Volátil* [b]
Testigo	13.0 ± 0.4	3.68 ± 0.01	4.12 ± 0.11	0.21 ± 0.01
ProCa	13.8 ± 0.3	4.04 ± 0.04	4.72 ± 0.09	0.21 ± 0.01

Muestras	IPT	IC	Tonalidad
Testigo	44.3 ± 3.3	12.7 ± 0.9	0.42 ± 0.01
ProCa	61.6 ± 0.6	14.6 ± 0.4	0.54 ± 0.02

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
[b] Acidez Volátil expresada como g L^{-1} de ácido acético

El vino producido con uvas tratadas proporcionó un mayor grado alcohólico. Los valores de acidez volátil del vino fueron normales para vinos sin alteraciones. El Índice de Color (IC), el Índice de Polifenoles Totales (IPT), pH y la acidez total fueron superiores para los vinos obtenidos con uvas tratadas. La tonalidad presentó un valor inferior en los vinos "ProCa". Cabe destacar los bajos valores encontrados en la determinación de la lacassa, debido al buen estado sanitario de la uva. La tasa de incidencia de podredumbre correspondería a menos de 1 % para ambos tipos de uvas.

Respecto al proceso fermentativo de las uvas tratadas, existen diferencias respecto al control sin tratar al producirse de un modo más rápido y alcanzando en menor tiempo el final de la fermentación. La Figura VI-22 muestra la evolución según el tanto por ciento de azúcares. La fermentación maloláctica tuvo una duración de 23 días, no encontrándose málico con el método utilizado.

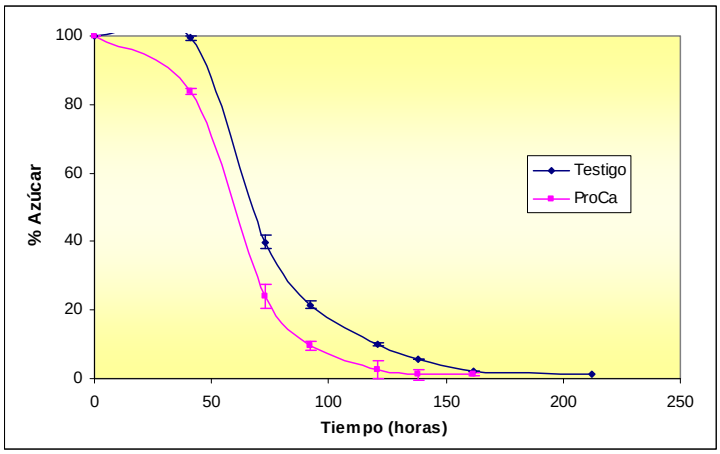


Figura VI-22: *Evolución de la fermentación de las diferentes muestras*

4.2.4 Coordenadas de color

En la Tabla VI-29 se muestran las coordenadas CIELab para los distintos vinos. La coordenada L* o claridad presenta diferencias significativas entre el testigo y los vinos procedentes de uvas tratadas con Prohexadiona de calcio. Estos últimos vinos son más oscuros o tienen más capa que el testigo. Respecto a la coordenada a*, que es la componente roja, se puede afirmar que los vinos de ProCa tienen valores superiores al testigo. Para la coordenada b*, que va desde el amarillo (valores positivos) al azul (valores negativos), los vinos procedentes de uvas tratadas presentan tonalidades más azules, presentándose más violáceos.

Tabla VI-29*: Coordenadas CIELab para las distintas muestras*

Muestras	L*	a*	b*
Testigo	85.0 ± 1.8	25.40 ± 1.47	- 0.44 ± 1.72
ProCa	77.4 ± 0.7	32.74 ± 1.51	- 4.72 ± 0.29

4.2.5 Análisis sensorial

El test Duo-Trio realizado para comprobar si los vinos procedentes de distintas uvas pueden diferenciarse, demostró que los vinos elaborados no difieren entre sí a un nivel de significación del 5%. El número de respuestas correctas y totales fueron 17 y 25 y el número crítico de respuestas para

significación es 18. Se realizó un análisis descriptivo de los dos tipos de vino y se matizaron las características de la fase visual, olfativa y gustativa. En las Figuras VI-23, VI-24 y VI-25 se muestran los diagramas radiales del análisis descriptivo.

Fase visual: la capa fue muy superior en el vino de Pro-Ca ($p<0.05$). El vino control presentó un color más cereza y granate, y en el vino de Pro-Ca se observaron tonos picota y negruzcos ($p<0.05$).

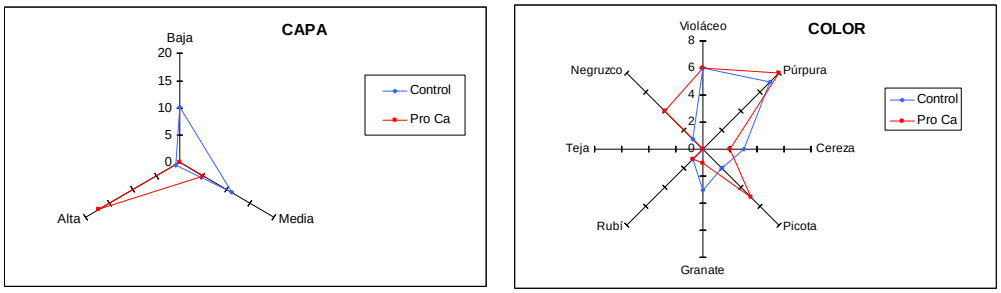


Figura VI-23: *Fase visual*

Fase olfativa: Los vinos no presentaron diferencias en la intensidad ni en los tipos de aroma; se observaron aromas frutales en ambos vinos y aromas especiados ($p<0.05$) en el vino de Prohexadiona-Ca. El test olfativo consideró más complejo ($p<0.05$) aromáticamente al vino de Prohexadiona-Ca.

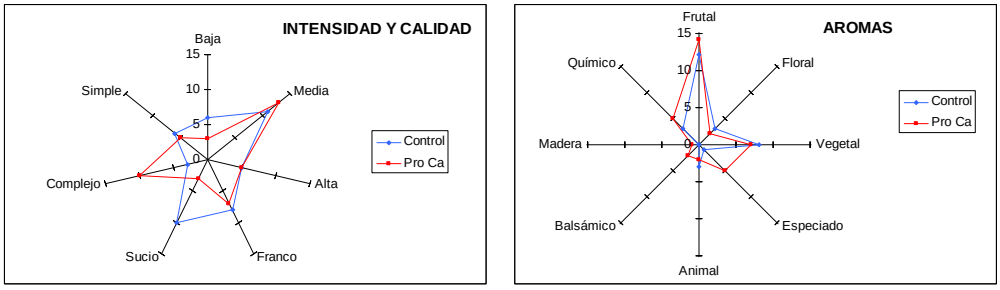


Figura VI-24: *Fase olfativa*

Fase gustativa: los sabores se encontraron más equilibrados ($p<0.05$) en el vino tratado con Prohexadiona-Ca respecto al control; el tacto fue considerado suave y ligero ($p<0.05$) en el vino control frente a una gran astringencia y untuosidad en el vino tratado. El postgusto fue muy frutal en ambos, con toques

especiados y balsámicos en el vino tratado. El vino tratado con Prohexadiona-Ca fue más persistente ($p<0.05$) que el vino control.

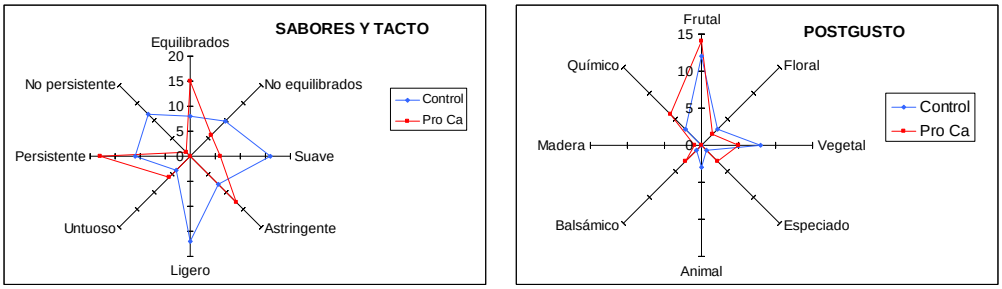


Figura VI-25: *Fase gustativa*

4.3. Vinificación de uvas variedad Tempranillo (año 2005)

4.3.1 Tratamiento y Elaboración

ProCa se aplicó como Regalis® (BASF, Alemania) en una sola dosis 3 kg ha^{-1} en el período vegetativo de prefloración (BBCH 57) en la fecha 11/06/05 sobre la misma parcela que el año anterior y con las mismas consideraciones. Durante el experimento las condiciones metereológicas fueron registradas en la estación agroclimática de San Vicente de la Sonsierra (La Rioja). Las lluvias totales fueron 52 mm en 23 días de lluvia, y las temperatura medias máxima y mínima fueron 27.7 y 10.1 ºC respectivamente.

La uva se vendimió en cajas el 7/10/05 cosechando aproximadamente 300 kg de uva con tratamiento y otros 300 kg sin tratamiento. La pasta fue conducida a los depósitos de fermentación de acero inoxidable de 100 L.

El mismo día se inocularon los depósitos con la cepa neutra de *Saccharomyces cerevisiae* VRB Uvaferm (Lallemand). Los depósitos fueron remontados dos veces por día. Una vez finalizada la fermentación alcohólica (18/10/04) se procedió al descube y el vino yema obtenido se llevó a depósitos de 50 L. Posteriormente se llevó a cabo la fermentación maloláctica sembrando

las bacterias lácticas MBR Alpha O*enococcus oeni* el 21/10/04. La fermentación maloláctica se dio por finalizada el 11/11/05.

4.3.2 Efectos en campo

La aplicación de Pro-Ca tuvo un efecto menos acusado que en el año anterior. La maduración y el crecimiento vegetativo de las cepas tratadas con ProCa fue similar a las de cepas control sin tratar, obteniéndose racimos de similar forma y número de bayas. Para las viñas tratadas, la producción disminuyó un 10%, y el número de hombros descendió en un 30%, es decir, en 10 racimos pasan de 10 a 7. En la Figura VI-26 se aprecian las pequeñas diferencias entre dos racimos.

A) B)

Figura VI-26: *Racimos procedentes de A) cepas sin tratar; y B) cepas tratadas con ProCa*

En la Tabla VI-30 se muestran los parámetros correspondientes al rendimiento. Se encontraron un mayor número de bayas pequeñas en las cepas tratadas, con diámetros 10-12 mm y 12-14 mm. El peso medio de baya significativamente menor en las uvas tratadas.

***Tabla VI-30**: Valores de distintos parámetros de rendimiento de producción*

Muestras	Tamaño de baya[a]			
	10-12 mm	12-14mm	14-16mm	16-18 mm
Testigo	0.3 ± 0.6	14.7 ± 1.5	75.4 ± 1.1	9.6 ± 1.1
ProCa	5.7 ± 1.5	17.7 ± 0.6	68.0 ± 1.7	8.5 ± 0.6

[a] % de bayas para cada diámetro

Muestras	Peso medio de baya (g)	% Sólido/líquido
Testigo	1.57 ± 0.02	50.4 ± 3.7
ProCa	1.41 ± 0.02	55.6 ± 2.5

4.3.3 Evolución de la fermentación y parámetros de vinificación

En las Tablas VI-31 y VI-32 se muestran los valores encontrados para diferentes parámetros al inicio y al final de la fermentación para cada uno de los depósitos. En las uvas procedentes de cepas tratadas se observan unos valores ligeramente inferiores para ºBrix y pH, mientras que la acidez total fue superior con respecto al control. Se observó un buen estado sanitario como muestra la ausencia de *lacassa*.

No se observaron diferencias significativas en el contenido de alcohol, pH y acidez total entre los vinos control y de "ProCa". La acidez volátil indicó la ausencia de alteraciones. El IPT y el IC fueron mayores para los vinos obtenidos de uvas tratadas. La tonalidad fue similar para ambos vinos.

***Tabla VI-31:** Parámetros enológicos de las uvas vendimiadas*

Muestras	º Brix	pH	Acidez Total [a]	*Lacassa* (nmol mL^{-1})
Testigo	22.2 ± 0.1	3.55 ± 0.02	4.65 ± 0.01	nd
ProCa	20.2 ± 0.1	3.49 ± 0.01	4.70 ± 0.02	nd

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
nd = no detectado

***Tabla VI-32:** Parámetros enológicos de las uvas vendimiadas*

Muestras	Etanol (v/v)	pH	Acidez Total [a]	*Acidez Volátil* [b]
Testigo	13.4 ± 0.1	3.72 ± 0.01	4.78 ± 0.18	0.37 ± 0.01
ProCa	13.6 ± 0.1	3.68 ± 0.04	4.42 ± 0.47	0.27 ± 0.07

Muestras	IPT	IC	Tonalidad
Testigo	39.5 ± 1.3	12.7 ± 0.2	0.59 ± 0.03
ProCa	44.5 ± 2.0	13.2 ± 0.2	0.55 ± 0.04

[a] Acidez Total expresada como g L^{-1} de ácido tartárico
[b] Acidez Volátil expresada como g L^{-1} de ácido acético

Respecto al proceso fermentativo de las uvas tratadas, se observa en la Figura VI-27 que no existieron diferencias con el control sin tratar, realizándose de un modo similar y finalizando la fermentación en el mismo período de tiempo (10 días). La fermentación maloláctica tuvo una duración de 20 días, no detectándose el ácido málico.

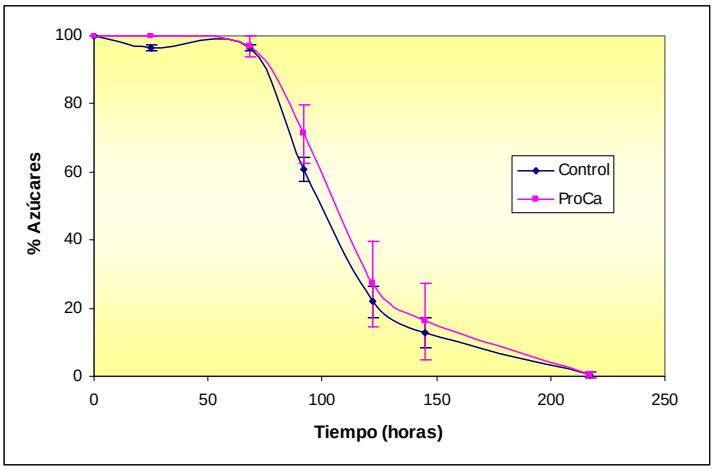


Figura VI-27: *Evolución de la fermentación de las diferentes muestras*

4.3.4 Coordenadas de color

La Tabla VI-33 muestra las coordenadas CIELab para los distintos vinos.

Tabla VI-33*: Coordenadas CIELab para las distintas muestras*

Muestras	L*	a*	b*
Testigo	79.0 ± 0.4	24.54 ± 1.88	-1.37 ± 0.76
ProCa	71.0 ± 0.6	32.74 ± 1.35	-2.93 ± 0.55

Respecto a la claridad, los vinos de prohexadiona presentan más capa (L inferior) que los vinos control. Los vinos procedentes de uvas tratadas también presentan más componente roja y azul (a* y b* en negativo).

4.3.5 Análisis sensorial

El test Duo-Trio realizado en el análisis sensorial para comprobar si los vinos procedentes de distintas uvas pueden diferenciarse, demostró que los vinos elaborados no difieren entre sí a un nivel de significación del 5%. El número de respuestas correctas fue 31 frente a un total de 55 respuestas, mientras que el número crítico de respuestas es 34. Se realizó un análisis descriptivo de los dos tipos de vino y se matizaron las características de la fase visual, olfativa y gustativa. Se muestran los diagramas en las Figuras VI-28, VI-29 y VI-30.

Fase visual: Se encontraron diferencias significativas en la capa (muy superior en el vino de Prohexadiona-Ca) y en el color: el vino control presentó un color más granate y en el vino de Prohexadiona-Ca se observaron tonos más violáceos y púrpuras.

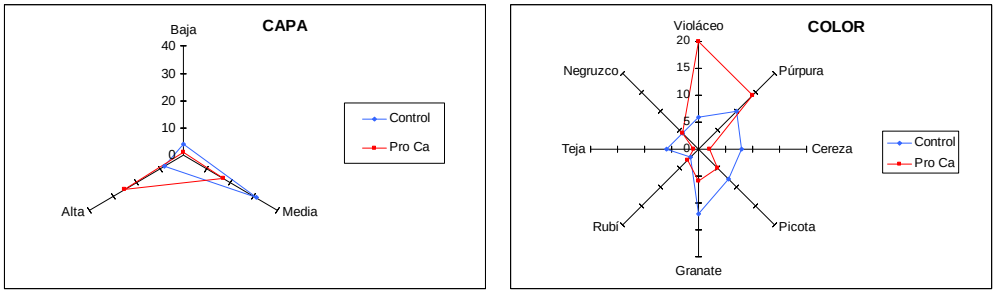


Figura VI-28: *Fase visual*

Fase olfativa: el vino de Prohexadiona-Ca presentó una intensidad aromática superior ($p<0.05$) y una calidad más franca, limpia y compleja ($p<0.05$); se observaron aromas muy frutales en ambos vinos.

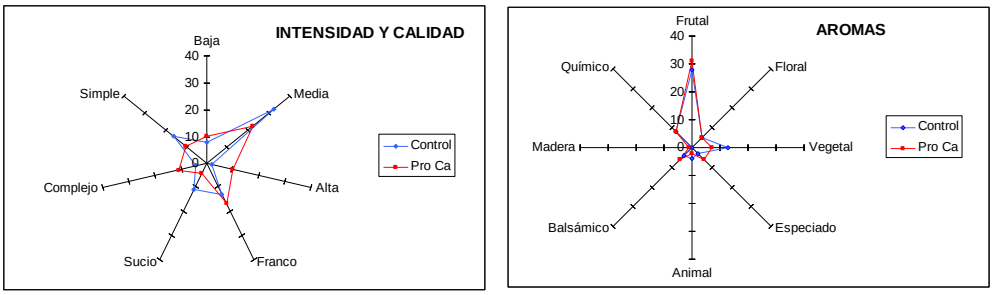


Figura VI-29: *Fase olfativa*

Fase gustativa: los sabores se encontraron más equilibrados ($p<0.05$) en el vino tratado con Prohexadiona-Ca respecto al control; el tacto fue considerado suave y ligero en el vino control frente a una gran untuosidad en el vino tratado. El postgusto fue muy frutal en ambos, con toques especiados y balsámicos en el vino tratado. El vino tratado con Prohexadiona-Ca fue más persistente que el vino control.

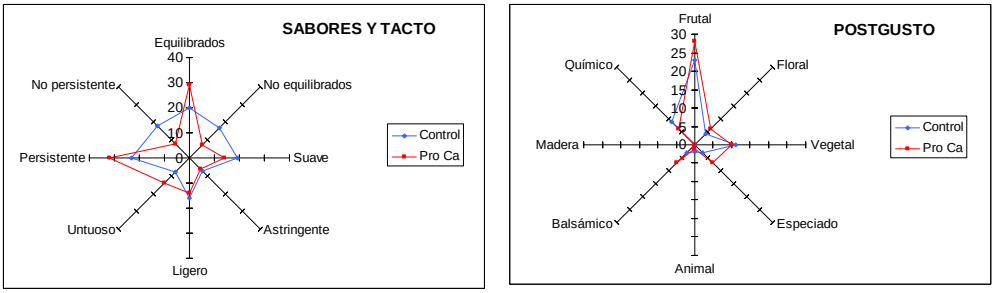


Figura VI-30: *Fase gustativa*

4.4. Discusión

En el año 2004 se observó una mejora en el estado sanitario de las uvas procedentes de cepas tratadas con prohexadiona de calcio como muestran los valores inferiores de *lacassa*. Este resultado confirma la teoría de Vail y Marois. El menor tamaño de grano y la menor compacidad de los racimos reducen la incidencia de *Botrytis cinerea*. Prohexadiona de calcio produjo una reducción en el rendimiento de producción y en la presencia y número de hombros. Este

efecto fue producido como consecuencia de una reducción en el cuajado del fruto. Como describió Lo Giudice (2004), Prohexadiona cálcica tiene el potencial de reducir el cuajado del fruto, especialmente cuando es aplicado en la época de prefloración. La aplicación en prefloración de ProCa causa pardeamiento y abscisión de las inflorescencias. ProCa inhibe la conversión del ácido aminociclopropanocarboxílico a etileno, y su aplicación reduce la senescencia inducida por etileno en varios sistemas de las plantas (Rademacher y col. 1992). Las diferencias entre las uvas control y las procedentes de cepas con tratamiento fueron más marcadas en el año 2004, pero en el año 2005 la maduración fue similar tanto para las uvas de las cepas control como para las de las tratadas, con excelente estado sanitario. El porqué de que este tratamiento tuvo un efecto menos acusado es incierto. Las cepas no fueron posiblemente sensibles al producto debido a las condiciones climatológicas y mediambientales.

Los valores de los parámetros enológicos convencionales en la fecha de vendimia revelaron una completa y más rápida maduración de las uvas procedentes de las cepas tratadas con Proca en el año 2004. Estas uvas fueron significativamente diferentes a las de las cepas control. Sin embargo, la aplicación de ProCa en el año 2005 no causó diferencias significativas en la maduración de las distintas uvas. La aplicación de Prohexadiona-Ca no produjo una alteración en la evolución de los procesos de fermentación alcohólica y maloláctica.

Se produjo un gran incremento en el Índice de Color y el Índice de Polifenoles Totales para los vinos obtenidos de uvas tratadas respecto a aquellos obtenidos de uvas no tratadas. Este efectó se observó en los dos años de estudio. La reducción en la producción y tamaño de grano, y el incremento en la relación sólido/líquido llevó a una mayor concentración de compuestos fenólicos tal y como describía Lo Giudice. Las coordenadas de color CIELab corroboran este hecho, ya que los vinos de Prohexadiona de calcio presentan mayor oscuridad y tonos rojos. La aplicación de ProCa produjo una mejor maduración fenólica en los dos años de estudio.

Los tests Duo-Trio mostraron que no aparecieron diferencias significativas (a un nivel de 0.05) entre los vinos control y los procedentes de uvas tratadas con ProCa en ninguno de los dos años en que se realizó el estudio. Sin embargo, el análisis descriptivo reveló diferencias en el color, los aromas y sensación en boca o tacto. Debido a la reducción del rendimiento de cosecha y tamaños de baya en las cepas tratadas, los compuestos polifenólicos relacionados con el color del vino se concentraron, mostrando los vinos procedentes de dichas uvas una mayor intensidad de color con respecto a los vinos control. Además, la aplicación de Prohexadiona de calcio causó un aumento en la absorbancia a 420, 520 y 620 nm (implica un mayor IC) y proporcionó un color violáceo-púrpura en los vinos procedentes de las uvas tratadas. Este hecho puede explicarse por una mayor concentración en antocianos o por un aumento en la copigmentación. (Gutiérrez y col. 2005). Aparte del hecho evidente de que un aumento en la relación superficie volumen (debido al menor tamaño de baya) proporciona un aumento en antocianos y otros compuestos flavonoideos (Pérez-Magariño y col. 2004) existe una segunda hipótesis; se ha comprobado que prohexadiona de calcio afecta directamente a la ruta biosintética de antocianos y otros flavonoides. Este efecto se debe posiblemente al rol que juegan las dioxigenasas dependientes del 2-oxoglutarato (Heller y Forkmann 1994; Rademacher y col. 2003).

La mayor capa asignada en el análisis sensorial para los vinos procedentes de uvas tratadas concuerda con los valores de la coordenada L* encontrados para dichos vinos, que son inferiores (vinos más oscuros) a los valores correspondientes al control. La mayor intensidad de tonos violáceos y púrpuras observados en los vinos ProCa confirma los mayores valores de la coordenada b* determinados para dichos vinos.

Los precursores de aroma y flavor también se incrementaron como resultado del menor tamaño de baya. El análisis sensorial mostró una alta intensidad aromática para los vinos procedentes de uvas tratadas. Además, el aroma de estos vinos fue clasificado como más complejo y limpio que el del control. Se percibieron también más aromas especiados en los vinos procedentes de uvas

tratadas. El flavor y aroma típicos de la variedad Tempranillo presentan matices a regaliz y trufa (Jackson 2002), que pertenecen a la familia de aromas especiados, y se percibieron más claramente en los vinos procedentes de uvas tratadas.

La astringencia, el cuerpo y la untuosidad obtenidos en los vinos "ProCa" se debieron a un mayor contenido de ácidos orgánicos y flavonoides, como flavonoles, flavan-3-oles y sus polímeros (procianidinas y taninos condensados), que se extrajeron de las pepitas y los hollejos de las uvas. Este hecho se correlaciona con el alto valor de IPT determinado en los vinos procedentes de uvas tratadas. Se encontró una alta persistencia en los vinos "ProCa" como consecuencia de la concentración de compuestos responsables del flavor y del sabor producida por una reducción del tamaño de baya.

El postgusto también se apreció como especiado en los vinos procedentes de uvas tratadas, lo que corrobora también el perfil aromático obtenido para dichos vinos.

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas tras la realización de este trabajo son las siguientes:

DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS

- Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación de los fungicidas pirimetanil, metalaxil y penconazol en las muestras del proceso fermentativo de mostos (mosto, mosto en fermentación y vino) basado en la extracción líquido-líquido con determinación por cromatografía de gases y detector de nitrógeno-fósforo. El método propuesto obtiene altos rendimientos de extracción. La presencia de azúcar y etanol en las muestras de fermentación no afectó a al determinación de pirimetanil, metalaxil y penconazol. No se observó efecto matriz en el análisis de dichos fungicidas. Sin embargo, diclofuanida presentó efecto matriz y no puede ser analizado por este método.

- Se ha desarrollado y validado un método de extracción en fase sólida con determinación por cromatografía de gases y detector de nitrógeno fósforo que permite la rápida determinación de los fungicidas pirimetanil, metalaxil, diclofluanida y penconazol en mosto, mosto en fermentación y vino. El método ofrece buenas recuperaciones y excelentes linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. La fase de octadecilsilano fue la más adecuada para la extracción cuantitativa de los analitos objeto de estudio. No fue necesaria una etapa de purificación de los extractos puesto que los cromatogramas de los extractos de mosto y vino procedentes de uvas sin tratar no muestran interferencias. No existe efecto matriz en la cuantificación de los cuatro compuestos por la diferente composición de la matriz. También se ha propuesto un método de confirmación de la presencia de los analitos en los extractos por cromatografía de gases y detección con espectrómetro de masas.

- Se ha desarrollado y validado un método rápido y simple de extracción con disolvente orgánico para la determinación de residuos de pirimetanil,

metalaxil, diclofluanida y penconazol en uvas tintas. La metodología incluye tres métodos para la extracción de residuos en tres partes de la uva: superficie exterior, hollejo o piel, y pulpa. Los métodos ofrecen buenas recuperaciones, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. El efecto matriz se evita con un calibrado en extracto (*matrix matched calibration*) para la cuantificación de los compuestos en pulpa y en la baya entera.

- El estudio de la movilidad de los cuatro fungicidas en las diferentes partes de la baya realizado en laboratorio mostró que el porcentaje de retención no dependió de la concentración inicial de fortificación, y que dicho porcentaje aumentó cuanto mayor es el tiempo de contacto con las uvas. Pirimetanil, metalaxil y diclofluanida mostraron una cinética de primer orden en la retenciión con respecto al tiempo. La cantidad de residuos fue mayor en la piel. Se observó penetración de los todos los fungicidas a la pulpa. La relación entre las concentraciones de piel y pulpa no dependió de la concentración inicial. Penconazol presentó una mayor penetración que el resto de los compuestos. Los ensayos realizados en laboratorio son adecuados para la simulación de la retención y distribución de los fungicidas objeto de estudio en uvas de vinificación.

ESTUDIO DE PIRIMETANIL EN LA FERMENTACIÓN EN LABORATORIO

- El proceso de fermentación alcohólica de mostos sintéticos y reales provocó un gran descenso en la cantidad añadida de pirimetanil comparado con las muestras testigo, y sin que se observe la aparición de ningún producto de degradación alguno.

- La disminución del contenido en pirimetanil durante el proceso de fermentación depende de la cepa de levadura y de la concentración inicial adicionada de pirimetanil. La disminución es mayor en muestras reales que en sintéticas. Se observan restos de pirimetanil en los posos de levaduras de forma independiente a la levadura inoculada y al tiempo de fermentación.

- La presencia de pirimetanil no afecta negativamente al proceso de fermentación alcohólica.

ESTUDIO DE PIRIMETANIL APLICADO EN CAMPO EN FERMENTACIÓN

- En las fermentaciones realizadas en bodega de uvas tratadas con pirimetanil, las diferencias obtenidas en los distintos parámetros enológicos en mostos y vinos testigo y con presencia de pirimetanil mostraron que pirimetanil no afectó de manera sistemática a ninguno de ellos.

- Los valores de lacassa encontrados fueron inferiores en el caso de los mostos procedentes de uvas tratadas con respecto al testigo.

- El análisis sensorial realizado con los vino elaborados los diferentes años no reveló diferencias significativas. La presencia de piriemetanil no modificó la evolución de los procesos fermentativos (fermentación alcohólica y maloláctica) ni las características organolépticas de los vinos elaborados.

- En las uvas tratadas de acuerdo con las BPA, los residuos de pirimetanil se encontraron principalmente en el hollejo. La cantidad total en la baya siendo esta cantidad inferior al LMR. La eliminación de pirimetanil desde el mosto inicial hasta el vino final durante el proceso de vinificación se debió a las distintas prácticas enológicas como trasiegos y clarificación en frío, por una retención de residuos en las sustancias coloidales o sólidas del mosto/vino.

ESTUDIO DEL EFECTO DE PROHEXADIONA DE CALCIO EN UVA Y VINO

- La aplicación de Prohexadiona cálcica en postfloración produjo un efecto más acusado en la maduración de la uva en el año 2004, apareciendo diferencias respecto al control en parámetros como º Brix (superior en las uvas tratadas) y en forma y tamaño de los racimos. En el año 2005. la evolución en campo ha sido muy similar al control.

- Durante el proceso fermentativo existe una mayor extracción de polifenoles en el caso de las uvas tratadas al producirse un aumento en los valores de IPT, taninos e IC en cada uno de los años estudiados.

- Los valores de lacassa encontrados son significativamente más bajos para las uvas tratadas con Prohexadiona-Ca.

- La presencia de Prohexadiona-Ca no alteró la evolución del proceso de fermentación alcohólica.

- El análisis sensorial muestra que no se aprecian diferencias significativas entre los diferentes vinos elaborados.

- La aplicación de Prohexadiona-Ca hace modificar las características organolépticas de los vinos elaborados con las uvas procedentes de las cepas tratadas.

BIBLIOGRAFÍA

Adou, K.; Bontoya, W.R.; Sweeney, P.J. (2001). Multiresidue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (9), 4153-4160.

AEPLA. (2008). Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas. Memoria del ejercicio 2007. http://www.aepla.es/contenidos

Amvrazi E.G. y Albanis, T.A. (2006). Multiresidue Method for Determination of 35 Pesticides in Virgin Olive Oil by Using Liquid-Liquid Extraction Techniques Coupled with Solid-Phase Extraction Clean Up and Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection and Electron Capture Detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 9642-9651.

Amvrazi, E.G.; Tsiropoulos, N.G. (2008). Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection. Journal of Chromatography A, in press, doi: 10.1016/j.chroma.2008.07.070

Anastassiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC International 86 (2), 412-431.

Angioni, A.; Garau, A.; Caboni, P.; Russo, M.T.; Farris, G.A.; Zara, S. Cabras, P. (2005). Gas chromatographic ion trap mass spectrometry determination of zoxamide residues in grape, grape processing, and in the fermentation process. Journal of Chromatography A 1097, 165-170.

Angioni, A.; Sarais, G.; Dedola, F.; Caboni, P. (2006). Pyrimethanil Residues on Table Grapes Italia after Field Treatment. Journal of Environmental Science and Health part B 41 (6), 833–841.

Araoud, M.; Douki, W.; Rhim, A.; Najjar, M.F.; Nazzah, N. (2007). Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Environmental Science and Health part B 42 (2), 179–187.

Balinova, A.; Mladenova, R.; Shtereva, D. (2007). Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography–mass spectrometric and gas chromatography–electron capture detection of pesticide residues in crops. Journal of Chromatography A 1150, 136–144.

Baltussen, E.; Sandra P.; David, F.; Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. Journal of Microcolumn Separations 11 (10), 737-747.

Barberá, C. Toxicidad de Pesticidas. En: Pesticidas Agricolas. Ed. Omega. Barcelona. 2004.

Barra, C.A.; Di Corcia, A.; Giuliano, G. (2000). Proceses and factors controlling the degradation of herbicides in subsoil: experimental study of terbuthylazine. Quaderni dell'Istituto di Ricerca Sulle Acque 112, 69-87.

Barriada-Pereira, M.; González-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D.; Fernández-Fernández, E. (2007). Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. Talanta 71, 1345–1351.

Basak A.; Rademacher W. (2000) .Growth regulation of pome and stone fruit trees by use of prohexadione-Ca. Acta Hortoculturae 514, 41-50.

Bazzi C.; Messina, Ch.; Tortoreto L.; Stefani E.; Bini F.; Sabatini E.; Spinelli F.; Costa, G.; Aupmann S.; Stamler G. (2003). Control of pathogen incidence in

pome fruits and other horticultural crop plants with Prohexadione-Ca. European Journal of Horticultural Science 68, 108-114.

Berglof, T.; Koskinen, W.C.; Kylin, H.; Moorman, T.B. (2000). Characterization of triadimefon sorption in soils using supercritical (SFE) and accelerated solvent (ASE) extraction techniques. Pest Management Science 56 (10), 927-931.

Bernal, J.L.; Del Nozal, M.J.; Jiménez, J.J. (1997). Matrix Effects in the Determination of Acaricides and Fungicides in Must by Gas Chromatography with Electron Capture and Nitrogen-Phosphorus Detection. Journal of Chromatography A 778, 111-117.

BOE. (1983), Real Decreto 3349/83, de 30 de noviembre, sobre la Reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas, Boletín Oficial del Estado, España.

BOE. (1994). Real Decreto 280/1994 de 18 de Febrero, del Ministerio de Presidencia, por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal.

BOR. (2001). Decreto 53/2001, por el que se regula la producción integrada en productos agrarios en la Comunidad Autónoma de La Rioja.

Bouaid, A.; Martín-Esteban, A.; Fernández, P.; Cámara, C. (2000). Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC). Fressenius Journal of Analytical Chemistry 367, 291-294.

Cabanis, J.C.; Cooper, J.F. (1991). Résidus de produits phytosanitaires dans les vins. Revue Française d'Oenologie 130, 43-50.

Caboni, P.; Sarais, G.; Angioni, A.; Garau, V.L.; Cabras, P. (2005). Fast and Versatile Multiresidue Method for the Analysis of Botanical Insecticides on Fruits

and Vegetables by HPLC/DAD/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 8644-8649.

Cabras, P.; Angioni, A. (2000a). Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (4), 967-972.

Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L. (1997). Fate of Some New Fungicides (Cyprodinil, Fludioxonil, Pyrimethanil and Tebuconazole) from Vine to Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45, 2708-2710.

Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L. (1998). Fate of Azoxystrobin, Fluazinam, Kresoxim-methyl, Mepanipyrim and Tetraconazole) in Grapes, Must and Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 3249-3251.

Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L. (2000b). Fate of Quinoxyfen Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 6128-6131.

Cabras, P.; Garau, V.L.; Angioni, A. (1999). Pesticides in Fermentative Processes of Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 3854-3857.

Cabras, P.; Garau, V.L.; Pirisi, F.M. (1995). Fate of Some Insecticides from Vine to Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43, 2613-2615.

Cabras, P.; Meloní, M.; Piri, F.M.; Pirisi, R. (2006). Degradation of dicarboximidic fungicides in wine. Pesticide Science 15 (3), 247-252.

Calhelha, R.C.; Andrade, J.V.; Ferreira, I.C.; Estevinho, L.M. (2006). Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. Food Microbiology 23 (4), 393-398.

Campo E.; Langlois J.; Ballester C.; Dacremont C.; Valentin D. (2008). Comparison of conventional descriptive analysis and the frequency of citation

method for odor profiling: case of 12 Burgundy Pinot Noir wines. Enoforum 2008. Montpellier. France.

Cela, R.; Lorenzo, R.A.; Casais, M.C. (2002). Técnicas de extracción en Química Analítica. Ed. Síntesis, Madrid.

Chen T.; Chen, G. (2007). Identification and quantitation of pyrethroid pesticide residues in vegetables by solid-phase extraction and liquid chromatography / electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 21:, 1848–1854.

Cho, S.; El-Aty, A.M.A.; Jeon, H.; Choi, J.; Shin, H.; Shim, J. (2008). Comparison of different extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues in kiwi fruit using gas chromatography–mass spectrometry. Biomedical Chromatography 22,: 727–735.

Cho,S.; Abd El-Aty A.; Jeon, H.; Choi, J.; Shin, H.; Shim J. (2008). Comparison of different extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues in kiwi fruit using gas chromatography–mass spectrometry. Biomedical Chromatography 22, 727-735.

Cormis de, L. (1991). Produits homologués: quelles garanties pour l'elaborateur de vins et les consommateurs? Revue Française d'Oenologie 129, 19-23.

Correia, M .;Delerue-Matos, C.; Alves, A. (2001). Development of a SPME-GC-ECD methodology for selected pesticides in must and wine samples. Fresenius Journal of Analytical Chemistry 369, 647–651.

Correia, M.; Derelue-Matos, C.; Alaves, A. (2000). Multiresidue Methodology for Pesticide Screening in Wines. Journal of Chromatography A 889, 59-67.

Coscollá, R. (2004). Plaguicidas. En: Los Parásitos de la vid (5ª Edición). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Ediciones Mundiprensa, Madrid, p. 329-344.

Cugier, J.P.; Reulet, P. (1997). Enquête sur les résudus de produits phytosanitaires: Congormité aux LMR dans les raisins, résidus dans les vins. Phytoma, la défense des végétaux, 492, 31-36.

Cuinier, C. (1996). Influence éventuelle des Produit Phytopharmaceutiques sur les Fermentations et la Qualité des Vins. Revue Française d'Oenologie 159, 41-43

De Melo Abreu, S.; Caboni, P.; Cabras. P.; Garau, V.L.; Alvés, A. (2006). Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine. Analytica Chimica Acta 573-574, 291-297.

De Melo Abreu, S.; Correia, M.; Herbert, P.; Santos, L.; Alves, A. (2005). Screening of grapes and wine for azoxystrobin, kresoxim-methyl and trifloxystrobin fungicides by HPLC with diode array detection. Food Additives and Contaminants part A 22 (6), 549-556.

Díez, C.; Traag, W.A.; Zommer, P.; Marinero, P.; Atienza, J. (2006). Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. Journal of Chromatography A 1131, 11–23.

DOCE (1991). Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.

DOCE. (1990). Directiva 90/642/ECC de la Comisión de las Comunidades Europeas de 27 de Noviembre de 1990 relativa a la fijación de los niveles máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidos fruta y vegetales.

Document Nº SANCO/2007/3131. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. 31/October/2007

DOUE. (2004). Reglamento (CE) Nº 850/2004 del Parlamento Europeo y de Consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CEE, Diario Oficial de la Unión Europea.

Dubourdieu D.; Grassi, C.; Deruche C.; Riberau-Gayon, P. (1984). Mise au point d'une mesure rapide de l'activite laccase, dans les mouts et dans les vins par methode a la syringaldazine. Application a l'appreciation de l'estat sanitaire es vendages. Connaisance Vigne Vin 18(4), 237-252.

EPA (1999a). J. Reigal, Recognition and Management of Pesticide Poisonings, Environmental protection agency, Washington DC (EEUU).

EPA (1999b). Office of pesticide programs list of chemicals evaluated for carcinogenic potential, Environmental protection agency, Washington DC, (EEUU).

Erney, D.R.; Gillespie, A.M.; Gilvydis, D.M. (1993). Explanation of the Matrix-Induced Chromatographic Response Enhancement of Organophosphorus Pesticides during Open Tubular Column Gas Chromatography with Splitless or Hot On-Column Inyection and Flame Photometric Detection. Journal of Chromatography A 638, 57-63.

Esteban, D. (2003). Técnicas de absorción de compuestos orgánicos volátiles. Cromatografía y Técnicas Afines 24 (1), 3-12.

Esteve, F.A. (2007). Preparación de muestras para el análisis de plaguicidas mediante microondas y fluidos presurizados. Tesis doctoral. Universitat de Valencia.

Evans J.R.; Evans R.R.; Regusci C.L.; Rademacher W. (1999). Mode of action, metabolism, and uptake of BASF 125 W prohexadione calcium**.** Hortscience 34, 1200-121.

FAO. (1967). Raport first session FAO Panel experts integrated pest control. Roma.

FAO. (2002), Food and ture Organization, International code of conduct on the distribution and use of pesticides, Organización de Naciones Unidas, Roma, Italia

FAO. (2003), Food and Agriculture Organization,Global Food security and the role of sustainable fertilization, Organización de Naciones Unidas (2003) Roma, Italia.

Fernández Gonzalez, J.; Rial Otero, R.; Cancho Grande, B.; Simal Gándara J. (2003). Determination of fungicide residues in white grapes for winemaking by gas chromatography with mass spectrometric detection and assessment of matrix effects. Journal of AOAC International 86(5), 1008-1014.

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

Fernández Moreno, J.L.; Arrebola Liébanas, F.J.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L. (2006). Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1111, 97–105.

Fernando W.G.D.; Jones A.L. (1999). Prohexadione calcium - A tool for reducing secondary fire blight infection. Acta Horticulturae 489: 597-600.

Ferreira, V. (1997). Cromatografía: fundamentos y práctica. Universidad de Zaragoza. 1997.

Ferrer, C.; Gómez, M.J.; García-Reyes, J.F.; Ferrer, I.; Thurman, E.M.; Fernández-Alba, A.R. (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass

spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1069, 183–194.

Fiilion, J.; Sauve, F.; Selwyn, J. (2000). Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of AOAC International 83(3), 698-713.

Forcada, M.; Beltrán, J.; López, F.J.; Hernández, F. (2000). Multiresidue procedures for determination of triazine and organophosphorus pesticides in water by use of large-volume PTV injection in gas chromatography. Chromatographia 51, 362-368.

Fregoni, M.; Corazzina, E. (1984). Osservazioni triennali sul diradamento dei grappoli di Garganega nel Soave. *Vignevini,* ,7-8,11-14.

Fritz S. J. (1999). Analytical Solid-Phase Extraction. Wiley-Vch, Unites States.

Fuentes, E.; Báez., M.E.; Labra, R. (2007). Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. Journal of Chromatography A 1169, 40-46.

García De Luján, A. (1992). Ensayo de aclareo de racimos en la zona de Jerez. Vitivinicultura 6, 44-46.

García Romeo, J.P. (1996). Acidez Volátil y paradas de fermentación. Estudio de factores que las originan y de sus posibles soluciones. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

García-Escudero E.; Villar M.; García-Oliveras, C.; Ibáñez S.; Romero L. (2004). Influencia del aclareo de racimos en el rendimiento y calidad del vino en las variedades tintas de la D.O.Ca.Rioja. IV World Wine Forum. Logroño. España.

Garcia-Escudero, E.; Lopez, R.; Santamaría, P.; Zaballa, O. (2000). Control de rendimiento en viñedos conducidos en régimen de riego localizado. Viticultura y Enología Profesional 69, 12-23.

García-Escudero, E.; López, R.; Santamaría, P.; Zaballa, O.; Arbizu, J. (1995). El control del rendimiento por aclareo de racimos. Experiencias sobre cv. Mazuelo. Zubia 7, 53-64.

García-López, M; Canosa, P.; Rodríguez, I. (2008). Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391 (3), 963-974.

García-Reyes, J. F.; Ferrer, C.; Gómez-Ramos, M.J.; Molina-Díaz, A.; Fernández-Alba, A.R. (2007). Determination of pesticide residues in olive oil and olives. Trends in Analytical Chemistry 26 (3), 239-251.

Gnaegi, F.; Aerny, J.; Bolay, A.; Crettenard, J. (1983). Influence des traitments viticoles antifongiques sur le vinification et la qualité du vin. R Revue suisse de viticulture, d'arboriculture et d'horticulture 15 (4), 243-250.

Gosch, C.; Puhl I.,Halbwirth H.; Schlangen K.; Roemmelt S.; Andreotti C.; Costa G.; Fischer T.C.; Treutter D.; Stich K.; Forkmann G. (2003). Effect of prohexadione-Ca on various fruit crops: Flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. European Journal of Horticultural Science 68, 144-151.

Gracia, A.; Dizy, M.; Gutiérrez, A.R.; Santamaría, P. (2002). Sensibilidad de Distintos Clones de Saccharomyces cerevisiae a Diferentes Pesticidas Antibotríticos Utilizados en Viña. Comunicación presentada en el III Foro Mundial de Vino (2002).

Granby, K.; Andersen, J.H.; Christensen, H.B. (2004). Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid

chromatography–tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 520, 165–176.

Gray, A.J.; Soderlund, D.M. (1985). Mammalian toxicology of pyrethroids insecticides, Vol.5, Academic Press.

Greenberg, R. (1981). Determination of Fenvalerate, a Synthetic Pyrethroid, in Grapes, Peppers, Apples, and Cottonseeds by Gas-Liquid Chromatography. Journal of Agrucultural and Food Chemistry 29 (4), 856-860.

Guan, W.; Wang, Y.; Xu, F.; Guan, Y. (2008). Poly(phthalazine ether sulfone ketone) as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction of organochlorine compounds and organophosphorus pesticides. Journal of Chromatography A 1177 , 28–35.

Guardia-Rubio, M.; Marchal-López, R.M.; Ayora-Cañada, M.J.; Ruiz-Medina, A. (2007). Determination of pesticides in olives by gas chromatography using different detection systems. Journal of Chromatography A 1145, 195–203.

Gupta, M.; Sharma, A.; Shanker, A. (2008). Dissipation of imidacloprid in Orthodox tea and its transfer from made tea to infusion. Food Chemistry 106, 158-164.

Gutiérrez I.H.; Lorenzo E.S.P.; Espinosa, A.V. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. Food Chemistry 92 (2), 269-283.

Hajšlová, J.; Holadová, K.; Kocourek, V. (1998). Matrix-Induced Effects: A Critical Point in the Gas Chromatographic analysis of Pesticide Residues. Journal of Chromatography A 800, 283-295.

Hayasaka, Y.; MacNamara, K.; Baldock, G.A.; Taylor, R.L.; Pollnitz, A.P. (2003). Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry 375, 948–955.

Heller W.; Forkmann G. (1994). Biosynthesis of flavonoids. Flavonoids: Advances in Research since 1986. Harborne J.B. (ed) Chapman and Hall, London, p 499-535.

Hennio, M.C. (2000). Sample handling and trace pollutans techniques, applications and quality assurance, 1nd edition, Barceló Eds. Elservier, Amsterdam, p 3-71.

Hernández Borges, J.; Rodríguez Delgado,M.A.; García Montelongo, F.J. (2005). Microextracción en fase sólida: Aplicación al análisis de pesticidas. Cromatografía y Técnicas afines 26 (1), 12-25.

Hernández, F.; Pitarch, E.; Serrano, R.; Guerrero, C. (2002). Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatography – tandem mass spectrometry. Chromatographia 55 (11/12), 715-722.

Hidalgo Togores, J. (2002). Tratado de Enología. Ed. Mundiprensa. Madrid.

Hillman, R.; Bachmann, K. (1995). Extraction of pesticides using supercritical trifluoromethane and carbon dioxide. Journal of Chromatography A 695, 149-154.

Horwitz W.H.; Latimer G.W. (eds). (2005). Fruits and fruits products. Official methods of analysis of AOAC International 18th ed., p 15.

Hsu, J.P.; Schattenberg, H.J.; Garza, M.M. (1991). Fast turnaround multiresidue screen for pesticides in produce. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 75 (5), 886-892.

Ilias I.F.; Rajapakse N. (2005). Prohexadione-calcium affects growth and flowering of petunia and impatiens grown under photoselective films. Scientia Horticulturae 106, 190-202.

Jackson R.S. (2002). Types of wine. In: Wine tasting: A Professional Handbook. San Diego: Elsevier Academic Press p. 211-225.

Jackson, D.I.; Lombard, P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - a review. American Journal of Enology and Viticulture 44, 409-430.

Jiménez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Toribio, L., Bernal, J. (2007). Use of SPE-GC/EIMS for residue analysis in wine elaborated from musts spiked with formulations of chlorpyriphos-methyl, methiocarb, dicofol, and cyproconazol. Journal of Separation Science 30 (4), 547-556.

Jiménez, J.J.; Bernal, J.L.; Del Nozal, M.J. (2001). Analysis of Pesticide Residues in Wine by Solid Phase extraction and Gas Chromatography with Electron Capture and Nitrogen-Phosphorus Detection. Journal of Chromatography A 919, 147-156.

Jiménez, J.J.; Bernal, J.L.; del Nozal, M.J.; Bernal, J.; Toribio, L. (2006). Persistence and degradation of metalaxyl, lindane, fenvalerate and deltamethrin during the wine making process. Food Chemistry 104, 216-223.

Jiménez, J.J.; Bernal, J.L.; del Nozal, M.J.; Toribio, L.; Bernal, J. (2007). Use of SPE-GC/EIMS for residue analysis in wine elaborated from musts spiked with formulations of chlorpyriphos-methyl, methiocarb, dicofol, and cyproconazol. Journal of Separation Science 30, 547-556.

Juan-García, A.; Mañes, J.; Font, G.; Picó, Y. (2004). Evaluation of solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction for the determination of fungicide residues at low-g kg^{-1} levels in grapes by liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1050, 119–127.

Kaihara, A.; Yoshii, K.; Tsumura, Y.; nakamura, Y.; Ishimitsu, S.; Tonogai, Y. (2000). Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and HPLC. Journal of Health Science 46 (5), 336-342.

Kristenson, E.M.; Ramos, L.; Brinkman, U. A.Th. (2006). Recent advances in matrix solid-phase dispersion. Trends in Analytical Chemistry 25 (2), 96-111.

Kruve, A.; Künnapas, A., Herodes, K.; Leito, I. (2008). Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1187, 58–66.

Lagana, A.; D'Ascenzo, G.; Fago, G.; Marino, A. (1997). Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in crops by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/diode array detection. Chromatographia 46 (5-6), 256-264.

Lal, A.; Tan, G.; Chai, M. (2008). Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables Using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatographic Methods. Analytical Sciences 24, 231-236.

Larue, F. (1991). IBS: des fongicides qui perturben les fermentationes. Vitis 139, 106-108.

Leandro, C.C.; Hancock, P., Fussell, R.J.; Keely, B.J.; Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching. Journal of Chromatography A 1144, 161-169.

Leary, J.B. Gas chromatographic determination of monitor (O,S-dimethyl phosphoramidothiate) residues in crops. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 54 (6), 1396-1398.

Lee, Y.; Kwon, C. (1999). Multiresidue análisis of eight acaricides in fruits. Agricultural Chemistry and Biotechnology 42 (4), 191-196.

Lesueur,C.;, Knittl, P.; Gartner, M.; Mentler, A.; Fuerhacker, M. (2008). Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuECheRS method. Food Control 19, 906–914.

Letohay, S.; Eller, K. (1995). Development of a method of analysis for 46 pesticides in fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and gas chromatography / ion tarp mass spectrometry. Journal of AOAC International 78 (3), 821-830.

Likas, D.T.; Tsiropulos, N.G.; Miliadis, G.E. (2007). Rapid gas chromatographic method for the determination of famoxadone, trifloxystrobin and fenhexamid residues in tomato, grape and wine samples. Journal of Chromatogry A 1150, 208-214.

Liu, L; Hashi, Y.; Qin, Y.; Zhou, H.; Lin, J. (2007). Development of automated online gel permeation chromatography–gas chromatograph mass spectrometry for measuring multiresidual pesticides in agricultural product. Journal of Chromatography B 845, 61-68.

Liu, Y.; Zhao, E.; Zhou, Z. (2006). Single-Drop Microextraction and Gas Chromatographic Determination of Fungicide in Water and Wine Samples. Analytical Letters 39 (11), 2333 – 2344.

Lo Giudice D., Wolf T.K.; Marini R.P. (2003). Vegetative response of Vitis vinifera to prohexadione-calcium**.** Hortscience 38, 1435-1438.

Lo Giudice D., Wolf T.K.; Zoecklein B.W. (2004). Effects of prohexadione-calcium on grape yield components and fruit and wine composition**.** American Journal of Enology and Viticulture 55, 73-83.

López-Ávila, V.; Charan, C.; Vanemm, J. (1996). Supercritical fluid extraction enzyme-linked inmuno sorbent assay applications for determinations of pesticides in soil and foods. ACS Symposium Series 621, 439-449.

Louter, A.J.H.; Brinkman, U.A.T.; Ghijsen, R.T.; Fully automated water analyser based on online solid-phase extraction gas chromatography. Journal of Microcolumn separations 5 (4), 317-324.

Luke, M.A.; Froberg, J.E.; Doose, G.M.; Masumoto, H.T. (1981). Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 64, 1187-1195.

Martínez Galera, M.; Gil García, M.D.; Santiago Valverde, R. (2008). Determination of photoirradiated high polar benzoylureas in tomato by HPLC with luminol chemiluminescence detection. Talanta 76, 815–823.

McCloskey, L.P.; Sylvan, M.;Arrhenius, S.P. (1996) Descriptive analysis for wine quality experts determining appellations by Chardonnay wine aroma. Journal of Sensory Studies 11, 49–67.

Meilgard C.E.; Civille G.V.; Carr B.T. (2007). Overall difference tests: does a sensory difference exists between sample. Sensory Evaluation Techniques. 4th edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. USA p 72-80.

Melo, L.F.C.; Collins C.H.; Jardim, I.C.S.F. (2004). New materials for solid-phase extraction and multiclass high-performance liquid chromatographic analysis of pesticides in grapes**.** Journal of Chromatography A 1032 (1-2), 51-58.

Mendiola, J.A.; Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. (2007). Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. Journal of Chromatography A 1152, 234–246.

Menkissoglu-Spiroudi, U. ; Fotopoulou, A. (2004). Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables**.** International Journal of Environmental Analytical Chemistry 84(1-3), 17-25.

Millán, S.; Sampedro, M.C.; Unceta, N.; Goicolea, M.A.; Rodríguez, E.; Barrio, R.J. (2003). Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. Journal of Chromatography A 995, 135–142

Miller S.S.; Tworkoski T. (2003). Regulating vegetative growth in deciduous fruit trees. PGRSA Q. 31, 8-46.

Miller, J.N.; Miller, J.C. (2002). Estadísitica y quimiometría para Química Analítica, 4ª edición, Prentice Hall Eds., Madrid, p 125-127.

Mills, P.A.; Onley, J.H.; Gaither, R.A. (1963). Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 46, 186-191.

Molina-Mayo, C., Hernández-Borges, J., Borges-Miquel, T.M., Rodríguez-Delgado, M.A. (2007). Determination of pesticides in wine using micellar electrokinetic chromatography with UV detection and sample stacking". Journal of Chromatography A 1150, 348-355.

Moore, M.T.; Hugget, D.B.; Gillespie, W.B.; Rodgers, J.H.; Cooper, C.M. (1998). Comparative toxicity of chlordane, chlorpyrifos and aldicarb in four aquatic testing organism. Archives of environmental contamination and toxicology 34, 152-157.

Navarro, M.; Pico, Y.; Marín, R.; Mañes, J. (2002). Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. Journal of Chromatography A 968, 201–209.

Navarro, S. ; Barba, A.; Navarro, N. (2000). Multiresidue Method for the Rapid Determination in Grape, Must and Wine of Fungicides Frequently Used on Vineyards". Journal of Chromatography A 882, 221-229.

Navarro, S.; Barba, J.; Oliva, J.; Navarro, G.; Pardo, F. (1999). Evolution of Residual Levels of Six Pesticides During Elaboration of Red Wines. Effect of Wine Making Procedures in Their Dissapearence. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 264-270.

Nozal, Mª.J., Bernal J.L., Jiménez, J.J., Martín, Mª.T., and Bernal, J. (2005). Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1076, 90-96.

Nunes, G.S.; Ribeiro M.L.; Polese, L.; Barceló, D. (1998). Comparison of different clean-up procedures for the determination of N-methylcarbamate insecticides in vegetable matrices by highperformance liquid chromatography with UV detection. Journal of Chromatography A 795, 43–51.

Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Kanda, H.; Yamagami, T.; David, F.; Tienpont, B.; Sandra, P. (2005). Optimization of a multi-residue screening method for the determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. Journal of Separation Science 28, 1083–1092.

Office International de la Vigne et du Vin. (1990). International Analysis Methods of Wines and Must. Paris. France.

OILB/SROP. (1977). Integrated Plant Protection – a road to an ecosystem – oriented Plant Production. Statement on Plant Protection and Protection and Production on the Future.

Oliva, J.; Barba, A.; Vela, N.; Melendreras, F.; Navarro, S. (2000). Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must, and wine. Journal of Chromatography A 882 (1/2), 213-220.

Oliva, J.; Navarro, S.; Barba, A.; (1999). Determination of Chlorpyrifos, Penconazole, Fenarimol, Vinclozolin and Metalaxyl in Grapes, Must and Wine by On-line Microextraction and Gas Chromatography. Journal of Chromatography A 833, 43-51.

Oliva, J.; Payá, P.; Anastassiades, M.; MacK, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; 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 and Bioanalytical Chemistry 389, 1697-1714.

Oliva, J.; Payá, P.; Cámara, M.A.; Barba, A. (2007). Removal of famoxadone, fluquinconazole and trifloxystrobin residues in red wines: Effects of clarification and filtration processes. Journal of Environmental Science and Health part B 42 (7), 775–781.

Oliva, J.; Zalacaín, A.; Payá, P.; Salinas, M.R.; Barba, A. (2008). Effect of the use of recent commercial fungicides [under good and critical agricultural practices] on the aroma composition of Monastrell red wines. Analytica Chimica Acta 617 (1-2), 107-118.

Owens C.L.; Stover E. (1999). Vegetative growth and flowering of young apple trees in response to prohexadione calcium. Hortscience 34, 1194-1196.

Pang, G., Fan,C.; Liu, Y.; Cao, Y.; Zhang, J.; Fu, B.; Li, X.; Wu, Y. (2006). Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/ gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Additives and Contaminants 23, 777-810.

Papadapoulou-Mourkidou, E., Patsias, J.; Kotopoulou, A. (1997). Determination of pesticides in solis by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. Journal of AOAC International 80 (2), 447-454.

Parrilla-Vázquez, P.; Mughari, A.R.; Martínez-Galera, M. (2008)**.** Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection. Analytica Chimica Acta 607, 74–82.

Pawliszyn, J.; Arthur, A. (1990)."Solid phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibres". Analytical Chemistry 62, 2145-2148.

Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; 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 and Bioanalytical Chemistry 389, 1697–1714.

Pérez Clavijo, M.; Plaza Medina, M.; Sanz Asensio, J.; Galbán Bernal, J. (1996). Decay study of pesticide residues in apple samples. Journal of Chromatography A 740, 146-150.

Pérez de Obanos, J.J. (2004). Podredumbre Gris. En: Los Parásitos de la vid (5ª Edición). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Ediciones Mundiprensa, Madrid, p 195-201.

Pérez-Magariño S.; González-San José M.L. (2004). Evolution of Flavanols, Anthocyanins, and Their Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes Harvested at Different Stages of Ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (5), 1181-1189.

Pérez Marín, J.L. (2004). Mildiu. En: Los Parásitos de la vid (5ª Edición). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Ediciones Mundiprensa, Madrid, p 187-195.

Pérez Marín, J.L. (2004). Podredumbre Gris. En: Los Parásitos de la vid (5ª Edición). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Ediciones Mundiprensa, Madrid, p 202-206.

Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B. (2007). Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables with ethyl acetate

extraction using gas and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry,389, 1773–1789.

Plaza, M. (2003). Aislamiento y caracterización de residuos y metabolitos de pesticidas. Estudios degradativos en muestras agroalimentarias. Tesis Doctoral. Universidad de la Rioja.

Puertas, B., Serrano, M.J., Valcárcel, M.C., Pérez-Magariño, S., Jiménez, M.J., García de Luján, A. (2003). Incidencia del aclareo de racimos en la composición de la uva durante la maduración de las variedades Cabernet sauvignon y Tempranillo. XXV Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (España).

Rademacher W.; Temple-Smith K.E.; Griggs D.L.; Hedden P. (1992). The mode of action of acyllcyclohexanediones: a new type of plant retardant. In: Progress in Plant Growth Regulation Karssen C.M. et al. (Eds). Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, p 571-577.

Rademacher, W.; Kober R. (2003). Efficient use of prohexadione-Ca in pome fruits. European Journal of Horticultural Science 68, 101-107.

Ravelo-Pérez, L.M.; Hernández-Borges, J.; Borges-Miguel, T.M.; Rodríguez-Delgado, M.Á. (2007). Multiple pesticide analysis in wine by MEKC combined with solid-phase microextraction and sample stacking. Electrophoresis 28, 4072-4081.

Ray, D.E. (1997). Handbook of Pesticide Toxicology Vol.2, Academic Press.

Removal of pesticides from red and white wine by the use of fining and filter agents. Australian Journal of Grape and Wine Research 10, 8–16.

Reulet, P.; De la Rocque, B; Cugier, J.P. (1996). Enquête 1995 sur les résudus dans le raisin et le vin. Phytoma, la defense des végétaux 488, 9-14.

Rial Otero, R.; Cancho Grande, B.; Simal Gandara, J. (2003). Multiresidue Method for Fourteen in White Grapes by Liquid-Liquid and Solid Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography – Diode Array Detection. Journal of Chromatography A 992, 121-131.

Ribéreau-Gayon P.; Glories Y.; Maujean A.; Dubourdieu D. (2002a). La uva y su maduración. Tratado de Enología. Tomo I: Microbiología del vino. Vinificaciones. Ed. Hemisferio Sur, p 376-377.

Ribéreau-Gayon P.; Glories Y.; Maujean A.; Dubourdieu D. (2002b). Compuestos fenólicos. Tratado de Enología. Tomo II: Química del vino. Estabilización y tratamientos. Ed. Hemisferio Sur p 177-257.

Ribéreau-Gayon, P. (1998). Traité d'Oenologie. Ed. Dunod. Paris.

Romero, J.; López, P.; Rubio, C.; Batlle, R.; Nerín, C. (2007). Strategies for single-drop microextraction 0ptimisation and validation. Application to the detection of potential antimicrobial agents. Journal of Chromatography A 1166, 24-29.

Romero-González, R.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L. (2008). Multiresidue method for the fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Talanta 76 (1), 211-225.

Ruediger, G.A.; Pardon, K.H.; Sas, A.N.; Godden, P.W.; Pollnitz, A.P. (2004). Removal of pesticides from red and white wine by the use of fining and filter agents. Australian Journal of Grape and Wine Research 10, 8-16.

Sagratini, G.; Mañes, J.; Giardiná, D.; Damiani, P.; Picó, Y. (2007). Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1147, 135–143.

Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J. (1997). Quick Gas Chromatographic Method for Determining Common Pesticides in Musts and Wine. Chromatographia 44 (5/6), 320-324.

Sala, C.; Fort, F.; Busto, O.; Zamora, F.; Arola, L.; Guasch, J. (1996). Fate of some common pesticides during vinification process. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44 (11), 3668-3671.

Sandra, P.; Tienpont , B.; Vercammen, J.; Tredoux, A.; Sandra, T.; David, F. (2001). Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine. Journal of Chromatography A 928, 117–126.

Sannino, A.; Bandini, M.; Bolzoni, L. (1999). Multiresidue determination of 19 fungicides in processed fruits and vegatables by capillary gas chromatography after gel permeation chromatography. Journal of AOAC International 82 (5), 1229-1238.

Santos, M.C. (1997). Aplicación de fungicidas antibotríticos en vid: eficacia, residuos y consecuencias enológicas. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.

Sanz-Asensio, J.; Martínez-Prado, A.P.; Plaza-Medina, M.; Martínez-Soria, M.T.; Pérez-Clavijo, M. (1999). Behaviour of acephate and its metabolite methamidofhos in apple samples. Chromatographia 49 (3/4), 155-160.

Sanz-Asensio, J.; Sáenz-Barrio, C.; Galarreta-Juez, M.T.; Galbán-Bernal, J. (1995). Study of the decay of diazinon and chlorpirifos in apple samples, using gas chromatography. Food Chemistry 42, 213-224.

Schenck, F.J.; Lehotay, S.J.; Vega, V. (2002). Comparison of solid-phase extraction sorbents for cleanup in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables. Journal of Separation Science 25, 883–890.

Sharif, Z., Man, Y.B.C.; Hamid, N.S.A.; Keat, C.C. (2006). Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges. Journal of Chromatography A 1127, 254–261.

Smit M.; Meintjes J.J.; Jacobs G.; Stassen P.J.C.; Theron K.I. (2005). Shoot growth control of pear trees (Pyrus communis L.) with prohexadione-calcium. Scientia Horticulturae 106, 515-529.

Sotés, V. (2004). Fitoreguladores. En: Los Parásitos de la vid (5ª Edición). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Ediciones Mundiprensa, Madrid, p 352-355.

Tardáguila, J.; Bertamini, M. (1993). Canopy management o gestión del follaje: una potente técnica para mejorar la producción y la calidad de la uva. Viticultura y Enología Profesional 28, 31-46.

Teixeira, M.J; Aguiar. A.; Afonso, C.M.M.; Alves, A.; Bastos, M.M.S.M. 2004. Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology. Analytica Chimica Acta 513(1), 333-340.

The Pesticide Manual. 11th Edition. Editor: C.D.S. Tomlin. British Crop Protection Council (1997).

Torres, C.M.; Pico, Y.; Mañes, J. (1995). Analysis of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables by Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) and Different Gas Chromatography Element Selective Detectors. Chromatographia 41 (11/12), 685-692.

Torres, C.M.; Pico, Y.; Redondo, M.J.; Manes, J.; (1996). Matriz soli-phase dispersión extraction procedure for multiresidue pesticide analysis inoranges. Journal of Chromatography A 719 (1), 95-103.

Tousseau, D. (1991). Les points faibles de l'ensemble des procédures et reglamentations visant les produits phytosanitaires. Revue Française d'Oenologie 129, 31-34.

Tseng, S.; Lin, Y.; Lee, H.; Su, S.; Chou, S.; Hwang, D. (2007). A Multiresidue Method for Determining 136 Pesticides and Metabolites in Fruits and Vegetables: Application of Macroporous Diatomaceous Earth Column. Journal of Food and Drug Analysis 15, (3), 316-324.

Vail M.E.; Marois J.J. (1991). Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. Phytopathology 81, 188-191.

Vaquero-Fernández L, Sáenz-Hernáez A, Sanz-Asensio J, Fernández-Zurbano P, Sainz-Ramírez M, Pons-Jubera B, López-Alonso M, Epifanio-Fernández SI, Martínez-Soria MT. (2008). Determination of cyprodinil and fludioxonil in the fermentative process of must by high-performance liquid chromatography-diode array detection . Journal of the Science of Food and Agriculture, 88, 1943-1948.

Vigna, C.R.M.; Morais, L.S.R.; Collins, C.H; Jardim, I.C.S.F. (2006). Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. Journal of Chromatography A 1114 (2), 211-215.

Wang, W.; Meng, B.; Lu, X.; Liu, Y.; Tao, S. (2007). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. Analytica Chimica Acta 602, 211-222.

Ware, G.W. (1994).The pesticide Book, W.H. Freeman, Fresno, EEUU.

Weichbrodt, M.; Vetter, W.; Luckas, B. (2000). Microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction with ethyl acetate-cyclohexane before determination of organochlorines in fish tissue by gas chromatography with electron-capture detection. Journal of AOAC International 83 (6), 1334-1343.

Wennrich, L.; Popp, P.; Breuste, J. (2001). Determination of Organochlorine Pesticides and Chlorobenzenes in Fruit and Vegetables Using Subcritical Water Extraction Combined with Sorptive Enrichment and CGC-MS. Chromatographia Supplement 53, 380-386.

Wong, J.W.; Webster, M.G.; Malverson, C.A. (2003). Multiresidue Pesticide Analysis in Wines by Solid Phase Extraction and Capillary Gas Chromatography – Mass Spectrometric Detection with Selective Ion Monitoring". Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 1148-1161 (2003).

Xiao, Q.; Hu, B.; Yu, C.; Xia, L.; Jiang, Z. (2006). Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection. Talanta 69, 848-865.

Yagüe, C.; Bayarri, S.; Conchello, P.; Lázaro, R.; Pérez-Arquillué, C.; Herrera, A.; Arín A. (2005). Determination of Pesticides and PCBs in Virgin Olive Oil by Multicolumn Solid-Phase Extraction Cleanup Followed by GC-NPD/ECD and Confirmation by Ion-Trap GC-MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 5105-5109.

Zambonin, C.G.; Quinto, M.; De Vietro, N.; Palmisano, F. (2004). Solid-phase microextraction - Gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. Food Chemistry 86, 269-274.

Zhang, M.; Huang, J.; Wei, C.; Yu, B.; Yang, X.; Chen, X. (2008). Mixed liquids for single-drop microextraction of organochlorine pesticides in vegetables. Talanta 74, 599-604.

Zheng, X. (2004). Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable and fruit by microwave-assisted liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Fenxi Huaxue 32 (2), 225-228.

Zironi, R.; Farris, G.A.; Fatichenti, F. (1991). Pesticide residues from vine to wine. Accademia Italiana Della Vite e del Vino 43, 351-369.

ANEXOS

Journal of the Science of Food and Agriculture *J Sci Food Agric* **88**:1943–1948 (2008)

Determination of cyprodinil and fludioxonil in the fermentative process of must by high-performance liquid chromatography–diode array detection

Luis Vaquero-Fernández,[1] Ana Sáenz-Hernáez,[1] Jesús Sanz-Asensio,[1] Purificación Fernández-Zurbano,[1] Miguel Sainz-Ramírez,[1] Begoña Pons-Jubera,[1] Miguel López-Alonso,[2] Sara-Isabel Epifanio-Fernández[2] and María-Teresa Martínez-Soria[1]*

[1]*Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain*
[2]*Department of Agriculture and Food, University of La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain*

Abstract

BACKGROUND: A quantitative, selective and sensitive high-performance liquid chromatographic method is described for the analysis of new fungicides cyprodinil, fludioxonil and their commercial formulation *Switch* in model solutions of must and wine, as well as samples during alcoholic fermentation. A study of the dissipation of residues was carried out.

RESULTS: The proposed method is based on liquid–liquid extraction (LLE) followed by high-performance liquid chromatography and diode array detection. Dichloromethane was the most appropriate solvent for extracting cyprodinil and fludioxonil in samples. Quality parameters of the proposed method presented good recovery (ca. 97% for almost all compounds) and precision (between 4.8% and 5.4%), and limits of quantification were lower than maximum residue limits (MRLs) in grapes.

CONCLUSIONS: There is no matrix effect in the analysis of cyprodinil and fludioxonil. The application of the fermentative process on cyprodinil and fludioxonil fungicides causes a decrease in the concentrations of these compounds. This decrease is slightly higher, the higher the initial concentration, without observing the appearance of any product in degradation. Fludioxonil shows a higher reduction when the compounds are presented together in *Switch*.
© 2008 Society of Chemical Industry

Keywords: fungicides; must; wine; liquid–liquid extraction; HPLC-DAD; matrix effect

INTRODUCTION

The principal parasites of the grapevine are gray mold (*Botrytis cinerea*), downy mildew (*Plasmopara viticola*) and powdery mildew (*Uncinula necator*). These pests can reduce berry quality.[1] In order to achieve an effective control of this fungus it is necessary to use fungicides at the right stage of growing.[2] The use of these products, particularly when the grape harvest is near, can lead to hazardous residues above the maximum permitted levels in the must obtained. In addition, the presence of pesticides could affect the activity of the yeasts, resulting in a stopped or sluggish fermentation, which is detrimental to the final quality of the product.[3,4] Other studies have dealt with the transformation of pesticides and their dissipation during fermentation.[2,5,6]

Generally, pesticide analyses are carried out by gas chromatography (GC)[7–9] or high-performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector (DAD); fluorescence detection[10–12] is also used. Routine methods used in pesticide residue analysis in complex matrices are based on extraction and concentration of pesticides prior to chromatographic analysis[13]. Major extraction techniques involve solid-phase extraction[8,14,15] or solid-phase micro-extraction.[10,16] The most commonly used treatment method for liquid samples is liquid–liquid extraction (LLE) with organic solvents. Acetonitrile, hexane, dichloromethane and ethyl acetate are the most commonly used.[6,17–20]

In the analysis of pesticides in enological samples, an essential question is the choice of a methodology for the determination of these compounds both in

* Correspondence to: Maria-Teresa Martinez-Soria, Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios 51, 26006 Logroño, Spain
E-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es
(*Received 21 December 2007; revised version received 16 April 2008; accepted 24 April 2008*)
Published online 9 July 2008; DOI: 10.1002/jsfa.3301

© 2008 Society of Chemical Industry. *J Sci Food Agric* 0022–5142/2008/$30.00

must and wine, no matter their matrix. Since alcoholic fermentation causes changes in the composition of the must, with a reduction of the sugar content and an increase in ethanol, it is important to study the matrix effect which can occur in the fungicide extraction process – an effect which has already been detected by other writers.[21–23] Some researchers[14] have looked at the matrix effect in the determination of fungicides in different types of grapes, while others have worked on the composition of the must itself[21] or of the wine.[17,24]

Recently, some new fungicides were introduced on the market. Cyprodinil (anilinopyrimidine) and fludioxonil (phenylphyrrole) are available together in a commercial formulation called Switch (37.5% and 25%, respectively). The first inhibits the biological synthesis of methionine, one of the principal components of fungal protein synthesis, while fludioxonil stimulates the synthesis of glycerol, which blocks cell growth in the fungus.[25–27] The main aim of this work was to develop a sensitive, selective, precise and simple method for the determination of cyprodinil and fludioxonil residues in the fermentation process of musts by LLE with subsequent HPLC-DAD. Furthermore, a study of the matrix effect on sample treatment and on quantification of the compounds was made. The method was applied in order to evaluate the effect of alcoholic fermentation on the concentration of the target fungicides, which have been applied individually and mixed in the commercial product.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Analytical standard pesticides of cyprodinil (4-cyclopropyl-6-methyl-*N*-phenylpyrimidine), fludioxonil [4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-yl)-1*H*-pyrrole-3-carbonitrile] and Switch were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Table 1 shows the chemical characteristics of the compounds studied. Standards were certified at a minimum of >99% pure (Pestanal grade). HPLC-grade methanol, ethanol, acetonitrile and dichloromethane were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Other reagents used were D(+)-glucose, potassium dihydrogen phosphate, magnesium sulfate, ammonium sulfate and sodium sulfate anhydrous ACS-ISO for analysis from Panreac (Spain). L(+)-Tartaric acid ACS was provided by Sigma Aldrich. Sodium chloride for analysis was purchased from Carlo Erba.

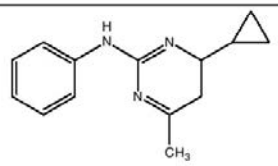
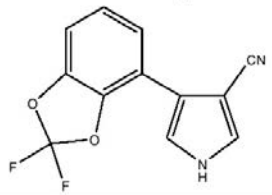
Ultrapure water was obtained in a Milli-Ro plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Inoculated yeast VRB *Saccharomyces cerevisiae* was purchased from Lallemand (Australia). Inocula were prepared in 7 g L^{-1} of Difco™ yeast nitrogen base (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) in Milli-Q water.

Stock standard solutions

A stock standard solution (*ca* 1000 mg L^{-1}) of each fungicide was prepared in methanol by weighing approximately 0.0250 g of the analyte into a 25 mL volumetric flask and diluting to volume. An intermediary mixed standard solution was prepared by dilution in methanol of the stock standard solution to give a concentration of *ca* 100 mg L^{-1} for each compound. All standard solutions were stored at −20 °C. Working standard solutions for further studies were prepared by spiking different volumes of the intermediary standard solution in synthetic must and wine (model solutions) in order to obtain a matrix as similar as possible to real wine samples. All working standard solutions were stored in the dark at 4 °C.

Table 1. Chemical characteristics of the compounds studied

Name	Chemical structure	Molecular weight	Molecular formula	K_{ow}[a]	ADI[a] (mg kg^{-1} b.w. daily)	Oral LD[a] (rats; mg kg^{-1})
Cyprodinil		225.3	$C_{14}H_{15}N_3$	4.0	0.04	2800
Fludioxonil		248.2	$C_{12}H_6F_2N_3O_2$	4.1	0.05	>2800

[a] From *The Pesticide Manual* (2000 version, by the British Crop Protection Council, Surrey, UK).

J Sci Food Agric **88**:1943–1948 (2008)
DOI: 10.1002/jsfa

Synthetic must and wine preparation

The synthetic must solution was prepared in ultrapure water as follows: 202 g L^{-1} D(+)-Glucose, 5 g L^{-1} L(+)-tartaric acid, 5 g L^{-1} potassium dihydrogen phosphate, 2 g L^{-1} magnesium sulfate and 2 g L^{-1} ammonium sulfate. The synthetic wine solution was prepared as follows: ethanol 12% (v/v) and 5 g L^{-1} of L(+)-tartaric acid. The must and wine samples were adjusted to pH = 3.6 with NaOH.

HPLC-DAD system and operating conditions

The separation, identification and quantification of the cyprodinil, fludioxonil and Switch compounds were performed using a Waters HPLC-DAD with two model 515 pumps, an autosampler model 717 plus and a diode-array detector model 996. The reversed-phase column used was a Kromasil C-18 (15 × 0.46 cm) column. The chromatographic conditions used were as follows: eluent A, water; eluent B, acetonitrile; flow rate, 1 mL min^{-1}; gradient, 35–60% B over the first 3.5 min and then was stable for 20 min. Injection volume was 50 µL. The chromatograms were performed at 280 nm and the spectra were recorded from 200 to 350 nm.

Extraction procedure

Extraction of the chosen fungicides from the different matrices which form the basis of this study was performed using the LLE method.

With the best conditions found for fungicide extraction a method was proposed, which has been validated and characterized for model must, must in fermentation and wine samples. The method used for the extraction of the two compounds, cyprodinil and fludioxonil, was as follows: 20 mL of sample (must, must/wine, wine) was placed in a 100 mL extraction funnel, 25 mL of dichloromethane was added and it was shaken for 15 min in orbital agitation. Once the extract was separated out, anhydrous sodium sulfate was added to dry possible remains from the aqueous phase and it was concentrated to dryness in a rotary evaporator. The dry extract was made up to 5 mL with methanol. Two injections were performed for each extract.

RESULTS AND DISCUSSION

Selectivity, precision, recovery and accuracy

Selectivity was checked by injecting extracts of spiked synthetic must and wine samples; it can be deduced from .Figures 1 and 2 that there are no interferences in the extracts of a synthetic must and wine. The proposed conditions generated narrow and reproducible chromatographic peaks. Noise was similar regardless of the matrix: must or wine.

Accuracy was determined as percent recovery. Recovery assays were performed with synthetic must and wine spiked with fungicides at two concentration levels, 1 and 5 mg L^{-1}, for cyprodinil and fludioxonil.

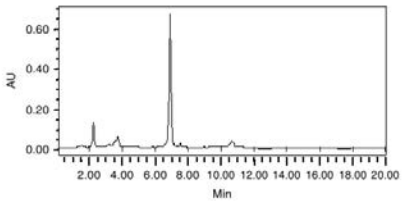


Figure 1. HPLC-DAD chromatogram obtained from non-spiked fermentation sample after LLE.

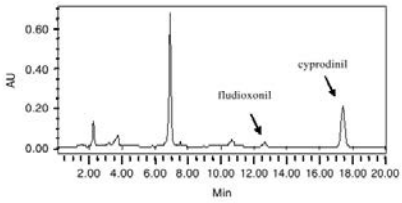


Figure 2. HPLC-DAD chromatogram obtained from fermentation sample spiked with cyprodinil (2 mg L^{-1}) and fludioxonil (1 mg L^{-1}) after LLE.

Table 2. Mean recoveries and precision (both as percentages) for concentrations of 1 and 5 mg L^{-1} after spiking synthetic must and wine samples

	Recovery (RSD, %)	
Pesticide	Must	Wine
Cyprodinil	97.0 (5.3)	99.5 (5.4)
Fludioxonil	97.7 (4.8)	98.8 (5.0)

RSD, relative standard deviation ($n = 6$).

Precision was evaluated in terms of repeatability using two different fortification levels. Repeatability expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time. Repeatability is expressed as an estimate of the relative standard deviation (RSD) of a statistically significant number of samples. Three replica tests were carried out at each concentration level, in accordance with the sample treatment previously developed for each compound. Results showed that the RSD values were lower than 10%, and between 4.8% and 5.4%. The average recoveries ranged from 97.0% to 99.5%. Table 2 shows the mean results obtained for the two types of matrix at the two concentration levels. Analysis of variance (ANOVA) revealed the absence of significant difference ($P < 0.05$) between the two types of sample or matrix for cyprodinil and fludioxonil, and between different concentrations.

Assessment of the matrix effect

The change in composition of the samples during alcoholic fermentation (in the transformation of the grape must into wine) makes it necessary to carry out a study of the possible matrix effect in the process of treating the sample. The possible effect of this change on LLE has been studied. The linear response of the method was studied in the two matrices. The similarity in the calibration curves in both matrices would indicate that there was no matrix effect in the extraction of the compounds. A Student's *t*-test was made to compare the slopes of the lines of regression (synthetic must and wine) obtained for each of the compounds studied, with a significance of 95%. The results showed that there were no significant differences between the slopes in synthetic must and wine for cyprodinil and fludioxonil. Thus it can be concluded that there is no matrix effect in the analysis of cyprodinil and fludioxonil in these matrices.

Calibration curves, limits of detection and limits of quantification

The analytical curves were obtained by spiking synthetic must and wine with seven different concentrations for each analyte, with three replicates. These samples were analyzed by the developed method. Linearity was estimated via linear regression analysis by the least-squares regression method.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) parameters were determined by injecting a number of extracts of non-spiked must and wine samples ($n = 6$) and measuring the magnitude of the background analytical response. LOD and LOQ were estimated as the concentration obtained with the average value of noise plus three or ten times the standard deviation, respectively.[28]

Table 3 shows the analytical features of the method for the determination of the fungicides studied in synthetic must and wine. The limits of quantification were always below the maximum residue limits (MRLs).

Analysis of synthetic samples spiked with fungicides during fermentation

Fermentation tests were performed on sterile synthetic must to which different doses of fungicide (doses equal to or above MRLs, which are 2 and 1 mg L^{-1}, respectively, for cyprodinil and fludioxonil in grapes) were added and these were then fermented with the selected strain of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, a strain resistant to the products studied. The musts were spiked with cyprodinil and fludioxonil individually (2 and 4 mg L^{-1} for cyprodinil; 1 and 2 mg L^{-1} for fludioxonil) and Switch (10 mg L^{-1}). The target fungicides were added to different aliquots of 500 mL of synthetic must, sterilized in an autoclave. These must aliquots were inoculated with a yeast population of 10^4 in each flask, with two repetitions for each test.

In order to check the possible degradation of the fungicides in the synthetic must matrix itself, (an aqueous medium at pH 3.6) control samples were prepared in synthetic must which were not subjected to the fermentation process but did maintain the same conditions of pH and temperature: pH 3.6 and a controlled temperature of 28 °C. These control samples were spiked with the same concentration of the compounds as the fermentation samples.

Fermentation proceeded for 7 days. Each test flask was sampled regularly by taking two samples of 25 mL during the entire fermentation process (at 0 and then after 12, 24, 48, 72, 96 and 168 h from the start of fermentation). These samples were centrifuged at 3000 rpm at 3 °C so as to eliminate the remains of fermented yeast. All the tests were duplicated. The samples taken were analyzed according to the described method and optimized in this study. Alcoholic fermentation was controlled by measuring the sugar content.

Wines obtained from fermentations showed these main enological parameters: pH = 3.6, 11% alcohol (v/v), reducing sugars <2 g L^{-1} and tartaric acid 4.6 g L^{-1}. There was no significant difference in the fermentative processes of musts with fungicides compared with the controls.

Tables 4 and 5 reflect the amounts of each compound found both in the control must and in the musts fermented in the different concentrations studied.

The results obtained showed that the matrix must without fermentation (control solutions) caused a slight elimination of the compounds with a decrease in the concentration irrespective of the initial spiked concentration: 5–6% for cyprodinil whether individual or in the product, and 1–4% for fludioxonil in the individual fermentation and 34.7% in the Switch product. In Table 6 the synergic effect is shown for fludioxonil when together with cyprodinil in

Table 3. Analytical features of the method designed for analysis of fludioxonil and cyprodinil in synthetic must and wine

Compound	Matrix	Linear range (μg L^{-1})	LOD (μg L^{-1})	LOQ (μg L^{-1})	Equation[a]	R^2
Cyprodinil	Must	53.6–20 000	42.9	53.6	$A = (256757.8 \pm 7493.9)C + (-8789.6 \pm 76435.3)$	0.996
	Wine	45.9–20 000	34.8	45.9	$A = (251561.2 \pm 10954.0)C + (6539.2 \pm 11727.0)$	0.990
Fludioxonil	Must	35.0–20 000	30.9	35.0	$A = (83978.3 \pm 2445.2)C + (2113.5 \pm 24940.0)$	0.996
	Wine	177.7–20 000	173.4	177.7	$A = (81817.5 \pm 4175.9)C + (-13705.3 \pm 42599.4)$	0.990

[a] *A*, area; *C*, concentration.

J Sci Food Agric **88**:1943–1948 (2008)
DOI: 10.1002/jsfa

Table 4. Evolution of cyprodinil and fludioxonil content in control and fermented (F) samples with their standard deviation ($n = 4$) for an initial concentration corresponding to the MRL of each compound of 2 mg L^{-1} and 1 mg L^{-1}, respectively: cyprodinil and fludioxonil individually

Time	Cyprodinil (mg L^{-1})		Fludioxonil (mg L^{-1})	
(h)	Control	F	Control	F
0	2.05 ± 0.02	2.05 ± 0.02	1.11 ± 0.05	1.11 ± 0.01
12	2.04 ± 0.03	1.99 ± 0.05	1.13 ± 0.04	1.11 ± 0.02
24	2.03 ± 0.03	2.01 ± 0.03	1.13 ± 0.03	1.06 ± 0.02
48	1.84 ± 0.01	1.92 ± 0.01	1.08 ± 0.06	0.64 ± 0.05
72	1.90 ± 0.07	1.87 ± 0.01	1.07 ± 0.06	0.68 ± 0.07
96	1.84 ± 0.05	1.94 ± 0.03	1.12 ± 0.02	0.56 ± 0.00
168	1.93 ± 0.07	1.69 ± 0.02	1.10 ± 0.01	0.30 ± 0.01

Table 5. Evolution of the cyprodinil and fludioxonil content in control and fermented (F) samples with their standard deviation ($n = 4$) for an initial concentration corresponding to 2 × MRL (4 mg L^{-1} and 2 mg L^{-1}, respectively): cyprodinil and fludioxonil individually

Time	Cyprodinil (mg L^{-1})		Fludioxonil (mg L^{-1})	
(h)	Control	F	Control	F
0	3.88 ± 0.17	3.88 ± 0.17	2.51 ± 0.06	2.51 ± 0.06
12	3.79 ± 0.09	3.79 ± 0.09	2.54 ± 0.04	2.79 ± 0.03
24	3.86 ± 0.01	3.93 ± 0.06	2.67 ± 0.01	2.18 ± 0.09
48	3.83 ± 0.04	3.74 ± 0.06	2.56 ± 0.04	1.40 ± 0.06
72	3.58 ± 0.04	3.21 ± 0.22	2.12 ± 0.17	0.44 ± 0.02
96	3.77 ± 0.13	3.43 ± 0.05	2.38 ± 0.09	0.21 ± 0.11
168	3.68 ± 0.06	3.14 ± 0.12	2.42 ± 0.07	0.19 ± 0.25

Table 6. Synergic effect on fludioxonil in the commercial Switch product in control and fermented (F) samples with their standard deviation ($n = 4$)

Time	Cyprodinil (mg L^{-1})		Fludioxonil (mg L^{-1})	
(h)	Control	F	Control	F
0	3.88 ± 0.02	3.88 ± 0.02	2.59 ± 0.10	2.59 ± 0.10
12	3.84 ± 0.01	3.96 ± 0.02	2.49 ± 0.08	2.27 ± 0.01
24	3.70 ± 0.02	3.57 ± 0.01	2.00 ± 0.07	1.35 ± 0.01
48	3.70 ± 0.01	3.50 ± 0.05	1.96 ± 0.06	1.00 ± 0.01
72	3.78 ± 0.05	3.39 ± 0.01	1.95 ± 0.06	0.67 ± 0.00
96	3.73 ± 0.01	3.22 ± 0.18	1.68 ± 0.17	0.60 ± 0.05
168	3.70 ± 0.02	2.83 ± 0.04	1.69 ± 0.17	0.38 ± 0.01

the commercially available Switch product, as the fludioxonil concentration presents a higher reduction.

For the individual compounds, the fermentative process causes a decrease in the concentrations, depending on the initial concentration. This decrease is slightly higher, the higher the initial concentrations: for cyprodinil between 17% and 19%, respectively, for concentrations of 2.0 and 4.0 mg L^{-1}; for fludioxonil between 73% and 92%, respectively, for concentrations of 1.0 and 2.0 mg L^{-1}. In fermentation with Switch, cyprodinil and fludioxonil decreased by 27% and 85%, respectively.

CONCLUSIONS

LLE is a suitable extraction method for the determination of new phytosanitary products which continue to appear on the market, with high extraction recoveries and values for the limits of detection and quantification which are well below the MRLs imposed by Spanish and European legislation.

Cyprodinil and fludioxonil fungicides do not reveal a matrix effect when the method designed for its determination in must and wine is applied.

The application of the fermentative process on cyprodinil and fludioxonil fungicides causes a greater decrease in the content of these compounds compared to those of the control samples without the appearance of any product in degradation and shows a greater decrease the higher the initial concentration.

In the study of the commercial Switch product a greater decrease can be seen in the concentration for fludioxonil, which shows a synergic effect.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Government of La Rioja for the FPI scholarship granted to Luis Vaquero-Fernández and the project ANGI 2004/18, the INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), and the University of La Rioja.

REFERENCES

1 Ribéreau-Gayon P, Dubordieu D, Donéche B and Lonvaud A, La uva y su maduración, in *Tratado de Enología. Vol. 1 Microbiología del vino. Vinificaciones*. Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp. 307–381 (2002).

2 Angioni A, Garau A, Caboni P, Russo MT, Farris GA, Zara S, *et al*, Gas chromatographic ion trap mass spectrometry determination of zoxamide residues in grape, grape processing, and in the fermentation process. *J Chromatogr A* **1097**:165–170 (2005).

3 Cuinier C, Influence éventuelle des produits phytopharmaceutiques sur les fermentations et la qualité des vins. *Rev Française Oenol* **159**:41–43 (1996).

4 González CF, Otero RR, Grande BC and Gándara JS, Determination of fungicide residues in white grapes for winemaking by gas chromatography with mass spectrometric detection and assessment of matrix effects. *J AOAC Int* **86**:1008–1014 (2003).

5 Fernandez MJ, Oliva J, Barba A and Cámara MA, Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. *J Agric Food Chem* **53**:804–811 (2005).

6 Cabras P, Angioni A, Garau VL, Melis M, Pirisi FM, Menelli EV, *et al* Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *J Agric Food Chem* **45**:2708–2710 (1997).

7 Navarro S, Barba J, Oliva J, Navarro G and Pardo F, Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines: effect of wine-making procedures in their disappearance. *J Agric Food Chem* **47**:264–270 (1999).

8 Jiménez JJ, Bernal JL and Del Nozal MJ, Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen–phosphorus detection. *J Chromatogr A* **919**:147–156 (2001).

9 Soleas GJ, Yan J, Hom K and Goldberg DM, Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection. *J Chromatogr A* **882**:205–212 (2000).

10 Millán S, Sanpedro MC and Unceta N, Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. *J Chromatogr A* **995**:135–142 (2003).
11 Scarponi L and Martinetti L, Treatments and residues in wine: studies of the presence of cyprodinil and fludioxonil residues in some Italian wines. *Vignevini* **26**:27–29 (1999).
12 Yamazaki Y and Ninomiya T, Determination of benomyl, diphenyl, *o*-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion, and methyl parathion in oranges by solid-phase extraction, liquid chromatography, and gas chromatography. *J AOAC Int* **82**:1474–1478 (1999).
13 Zhu X, Qi X, Wang J, Yue J, Sun Z and Lei W, Determination of procimidone, pentachloroaniline and methyl-pentachlorophenylsulfide residues in wine by MSPD-GC-ECD. *Chromatographia* **65**:625–628 (2007).
14 Rial Otero R, Cancho Grande B and Simal Gandara J, Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography–diode array detection, *J Chromatogr A* **992**:121–131 (2003).
15 Wong JW, Webster MG and Malverson CA, Multiresidue pesticide analysis in wines by solid-phase extraction and capillary gas chromatography–mass spectrometric detection with selective ion monitoring. *J Agric Food Chem* **51**:1148–1161 (2003).
16 Correia M, Derelue-Matos C and Alves A, Multi-residue methodology for pesticide screening in wines. *J Chromatogr A* **889**:59–67 (2000).
17 Sala C, Busto O and Guasch J, Quick gas chromatographic method for determining common pesticides in musts and wines. *Chromatographia* **44**:320–324 (1997).
18 Likas DT, Tsiropoulos NG and Miliadis GE, Rapid gas chromatographic method for the determination of famoxadone, trifloxystrobin and henhexamid residues in tomato, grape and wine samples. *J Chromatogr A* **1150**:208–214 (2007).
19 Melo Abreu S, Caboni P, Cabras P, Alves A and Garau VL, A comparison of a gas chromatographic with mass spectrometric detection screening methods for the analysis of famoxadone in grapes and wines. *J Chromatogr A* **1103**:362–367 (2006).
20 Navarro S, Oliva J and Barba A, Evolution of chlorpyrifos, fenarimol, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in red wines elaborated by carbonic maceration of monastrell grapes. *J Agric Food Chem* **48**:3537–3541 (2000).
21 Bernal JL, Del Nozal MJ and Jiménez JJ, Matrix effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas chromatography with electron-capture and nitrogen–phosphorus detection. *J Chromatogr A* **778**:111–117 (1997).
22 Navarro S, Barba A, Navarro G, Vela N and Oliva J, Multiresidue method for the rapid determination – in grape, must and wine – of fungicides frequently used on vineyards. *J Chromatogr A* **882**:221–229 (2000).
23 Columé A, Cárdenas S, Gallego M and Valcarcel M, Simplified method for the determination of chlorinated fungicides and insecticides in fruits by gas chromatography. *J Chromatogr A* **882**:193–203 (2000).
24 Wong JW and Halverson CA, Multiresidue analysis of pesticides in wines using C-18 solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Am J Enol Vitic* **50**:435–442 (1999).
25 Masner P, Muster P and Schmid J, Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine fungicides. *Pestic Sci* **42**:163–166 (1994).
26 Leroux P, Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pestic Sci* **47**:191–197 (1996).
27 Pillonel C and Meyer T, Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity on *Neurospora cras*. *Pestic Sci* **49**:229–236 (1997).
28 Miller JN and Miller JC, Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación, in *Estadisitica y quimiometria para Química Analitica* (4th edn). Pearson Educación S.A., Prentice-Hall, Madrid, pp. 125–127 (2002).

J Sci Food Agric **88**:1943–1948 (2008)
DOI: 10.1002/jsfa

Research Article

Received: 21 March 2008 Revised: 19 November 2008 Accepted: 4 December 2008 Published online in Wiley Interscience: 23 February 2009

(www.interscience.wiley.com) DOI 10.1002/jsfa.3508

Development of a liquid–liquid extraction method for the determination of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol during the fermentative process of must by GC-NPD

Luis Vaquero-Fernández,[a] Jesús Sanz-Asensio,[a] Purificación Fernández-Zurbano,[a,c] Miguel Sainz-Ramírez,[a] Miguel López-Alonso,[b] Sara-Isabel Epifanio-Fernández[b] and Mará-Teresa Martínez-Soria[a]*

Abstract

BACKGROUND: A rapid, selective and sensitive gas chromatographic method is described for the analysis of four fungicides – pyrimethanil, metalaxyl, penconazol and dichlofluanid, widely used in vineyards – in must and wine, as well as samples during alcoholic fermentation. The effect of alcoholic fermentation on pyrimethanil concentration in synthetic and real musts was studied.

RESULTS: The proposed method was based on liquid–liquid extraction followed by gas chromatography with nitrogen–phosphorus detector. n-Hexane was the most appropriate solvent for extracting the target fungicides in synthetic and real samples. Quality parameters of the proposed method presented good recovery (*ca* 78.3% for almost all compounds) and precision (between 1.4% and 6.1%), and quantification limits lower than maximum residue limits. However, for dichlofluanid recovery levels of well over 100% were found.

CONCLUSIONS: There was no matrix effect in the analysis of pyrimethanil, metalaxyl or penconazol, but this effect was observed for dichlofluanid in synthetic and real matrices. The application of the fermentative process on pyrimethanil fungicide caused a high decrease in the concentration of this compound, and no product appeared in degradation. The decrease of pyrimethanil in fermented samples was similar in both synthetic and real samples.
© 2009 Society of Chemical Industry

Keywords: fermentative process; fungicides; GC-NPD; liquid–liquid extraction; matrix effect; must

INTRODUCTION

Fungicides are frequently used to protect vines from diseases. The indiscriminate application of pesticides without respecting the established safety periods (particularly on dates close to the harvest) may produce fungicide levels above the maximum residue limits (MRLs) in the must obtained.[1] Moreover, the presence of pesticides has also been associated with negative effects on yeast metabolism, such as stopped or sluggish fermentations, and on the organoleptic features of wine, which are detrimental to the final quality of the product.[2,3]

The analytical methods used for analysing phytosanitary products are based on initial extraction of fungicides and their subsequent determination using chromatographic techniques.[4] The most commonly used chromatographic technique for identifying and quantifying fungicide residues in musts and wines is gas chromatography (GC). Capillary columns and appropriate detectors such as nitrogen-phosphorus detector (NPD),[5] electron capture detector (ECD)[6] or mass spectrometry (MS)[7] are often used. High-performance liquid chromatography (HPLC) with a diode array detector (DAD) and fluorescence detector is also used.[8–10]

* *Correspondence to: Mará-Teresa Martínez-Soria, Departamento de Química, Universidad de La Rioja. Madre de Dios, 51. 26006 Logroño, Spain. E-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es*

a *Departamento de Química, Universidad de La Rioja. Madre de Dios, 51. 26006 Logroño, Spain*

b *Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja. Madre de Dios, 51. 26006 Logroño, Spain*

c *Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino (Universidad de la Rioja, CSIC, Gobierno de La Rioja). Madre de Dios, 53. 26006 Logroño, Spain*

 © 2009 Society of Chemical Industry

Currently used extraction methods are solid phase extraction (SPE)[6,11,12] and solid phase microextraction (SPME).[8,12–14] However, the most commonly used treatment method for liquid samples is liquid–liquid extraction (LLE) with organic solvents. Acetonitrile, hexane, dichloromethane or ethyl acetate are the most used.[15–20]

When analysing these types of compounds in oenological samples, it is essential to choose an analytical methodology that allows determination of fungicides in both must and wine samples, regardless of the matrix. Since alcoholic fermentation causes changes in must composition, reducing sugar content and increasing ethanol, it is important to study the matrix effect that may occur in the fungicide extraction process – an effect which has already been reported by other writers.[21–23] Some researchers have studied the matrix effect in fungicide determination in different types of grapes,[11] while others have studied this effect due to the composition of must[21] or wine.[24] Some studies[25–27] have described a matrix influence known as 'matrix-induced chromatographic response enhancement effect'.

The main aim of this study was to develop a sensitive, selective and precise method for determining fungicide residues in the fermentation of must by LLE with subsequent GC-NPD. The selected fungicides are commonly used in vineyards: dichlofluanid, metalaxyl, penconazol and pyrimethanil. The matrix influence on the extraction and the quantification of the compounds was also studied. The method was applied in order to evaluate the effect of alcoholic fermentation on pyrimethanil concentration.

EXPERIMENTAL

Chemicals

The analytical standard pesticides pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid, penconazol and metribuzin were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Table 1 shows the chemical characteristics of the compounds studied. Standards were certified at a minimum of >99% pure (Pestanal grade). HPLC-grade methanol, ethanol, ethyl acetate, acetone, dichloromethane, cyclohexane and n-hexane were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Other reagents used were D(+)-glucose, potassium dihydrogen phosphate, magnesium sulfate, ammonium sulfate and sodium sulfate anhydrous ACS-ISO for analysis from Panreac (Barcelona, Spain). L(+)-Tartaric acid ACS was provided by Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Sodium chloride for analysis was purchased from Carlo Erba (Milan, Italy).

Ultrapure water was obtained in a Milli-Ro plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Inoculated yeast VRB *Saccharomyces cerevisiae* was purchased from Lallemand (Adelaide, Australia).

Standard solutions preparation

A stock standard solution (*ca* 1000 mg L^{-1}) of each fungicide was prepared in methanol by weighing approximately 0.0250 g of the analyte into a 25 mL volumetric flask and diluting to volume. An intermediary mixed standard solution was prepared by dilution in methanol of the stock standard solution to give a concentration of *ca* 100 mg L^{-1} for each compound. Stock and intermediary standard solutions of the internal standard (metribuzin) were prepared in the same way. All standard solutions were stored at −20 °C. Working standard solutions for further studies were prepared by spiking different volumes of the intermediary standard solution in synthetic and real must and wine. All standard solutions were stored in the dark at 4 °C.

Synthetic must and wine preparation

The synthetic must solution was prepared in ultrapure water as follows: 202 g L^{-1} D(+)-glucose, 5 g L^{-1} L(+)-tartaric acid, 5 g L^{-1} potassium dihydrogen phosphate, 2 g L^{-1} magnesium sulfate and 2 g L^{-1} ammonium sulfate. The synthetic wine solution was prepared as follows: ethanol 12% (v/v) and 5 g L^{-1} L(+)-tartaric acid. The must and wine samples were adjusted to pH 3.6 with NaOH.

Real must and wine preparation

Real must solutions were obtained by pressing the cv. Tempranillo grapes harvested in vineyards in the Qualified Designation of Origin (DOCa) Rioja wine-producing region in 2006, and which had not been treated with any phytosanitary product for at least 10 years. The analysed must had a sugar content of 220 g L^{-1} and a pH of 3.35. The real wine solutions were obtained by laboratory fermentation of 5 L of the real must after inoculation with selected yeasts. The evolution of the fermentative process was controlled at all times by measuring the sugar content. Wine obtained from fermentation showed the following main oenological parameters: alcohol content 12.8 ± 0.1% (v/v), pH 3.50 ± 0.02, reducing sugars <2 g L^{-1} and titratable acidity 5.15 ± 0.05 g L^{-1} tartaric acid. Real must and wine samples obtained were used to carry out the method validation.

GC-NPD system and operating conditions

An Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) 6890 N gas chromatograph equipped with an NPD, an autosampler 7683 (Agilent) and a split–splitless injector, connected to an HP ChemStation (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA), was used for determining dichlofluanid, metalaxyl, penconazol and pyrimethanil fungicides. The capillary column was an HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d. with 0.25 µm crosslinked 5% phenylmethyl siloxane). Injector and detector temperatures were 200 °C and 325 °C, respectively. Oven temperature was programmed as follows: 80 °C for 0.9 min, raised to 225 °C (70 °C min^{-1}) for 5 min, to 275 °C (70 °C min^{-1}) for 3 min. Helium was the carrier and make-up gas at 1.5 mL min^{-1} and 3 mL min^{-1}, respectively. Flow relation for the NPD detector was 3 mL min^{-1} for hydrogen and 70 mL min^{-1} for air. Injection was performed in splitless mode with a purge time of 0.9 min.

Extraction procedure

The target fungicides (dichlofluanid, metalaxyl, penconazol and pyrimethanil) from the different matrices were extracted by a liquid–liquid extraction method.

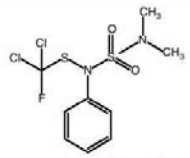
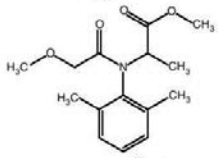
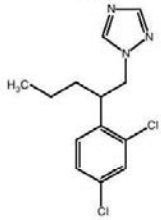
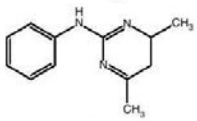
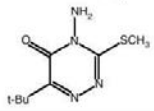
The development of the method involved the study of variables which affect liquid–liquid extraction with organic solvents, as well as a study of recovery and of the matrix influence which may be caused by the fermentative samples in the method.

The study was performed on samples of synthetic must spiked with the target fungicides, in concentrations equal to or above their MRLs established by European Union legislation on grapes.[28] Samples were respectively spiked at 20.0, 2.0, 5.0 and 20.0 mg L^{-1} with metalaxyl, penconazol, pyrimethanil and dichlofluanid. Sala *et al.* proposed the use of concentrations ten times greater than the MRLs,[15] but this study could not be performed in the case of pyrimethanil and dichlofluanid because these compounds caused saturation in the detector at the suggested concentrations.

The amount of compounds extracted depended on the variables used in LLE, such as organic solvent type, sample volume, orbital agitation time and the amount of salt added to

 © 2009 Society of Chemical Industry

Table 1. Chemical characteristics of the studied compounds

Family name	Common name	Chemical structure	K_{ow}[a]	ADI[a] (mg kg^{-1} b.w. daily)	Oral LD[a] (rats; mg kg^{-1})	MRL European Union (µg kg^{-1})	MRL EPA (µg kg^{-1})
Phenylsulfamide fungicides	Dichlofluanid		3.7	0.0125	>5000	10 000	n.d.[b]
Acylamino acid and anilide fungicides	Metalaxyl		1.75	0.03	633	1 000	2000
Triazoles fungicides	Penconazol		3.72	0.03	2125	200	n.d.[b]
Pyrimidin fungicides	Pyrimethanil		2.84	0.17–0.20	>5000	5 000	5000
Triazine herbicide	Metribuzin		1.6	0.013	2000	n.d.[b]	n.d.[b]

[a] From *The Pesticide Manual* (2000 version, by the British Crop Protection Council, Surrey, UK).
[b] n.d., non-defined MRL in grapes.

saturate the sample. These variables were analysed and optimized in a univariant way. The initial working conditions considered a fixed sample volume of 5 mL of synthetic must, with 1 g NaCl, a solvent volume of 10 mL and an orbital agitation time of 15 min. A method is proposed with the best conditions found, and characterized for synthetic and real must and wine.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the extraction procedure

Metribuzyn was chosen as an internal standard because this herbicide is not normally used in vineyard treatments in the Qualified Designation of Origin Rioja. Metribuzyn shows good linearity (R^2 = 0.9999), great sensitivity and a good standard deviation in the measures. Reproducibility at a concentration of 1.0 mg L^{-1} showed a standard deviation of 0.8% (n = 4).

n-Hexane, ethyl acetate, cyclohexane, ethyl acetate– cyclohexane (1 : 1) and acetone–dichloromethane (1 : 1) were studied as extraction solvents. The recoveries with the different solvents are shown in Table 2. The recovery results and relative standard deviation (RSD, n = 3) showed the lowest recoveries with cyclohexane (18.7–39.2%), followed by those with acetone–dichloromethane (26.6–29.1%). With ethyl acetate (20.9–35.7%) the extractions were lower than with n-hexane (54.7–68.0%) and had greater

 © 2009 Society of Chemical Industry

Table 2. Recoveries (RSD, %) with different solvents

	% Recovery (RSD)				
Compound	n-Hexane	Ethyl acetate	Acetone/dichloromethane	Cyclohexane	Ethyl acetate/cyclohexane
Pyrimethanil	56.9 (1.2)	35.3 (9.2)	26.6 (5.6)	22.7 (9.4)	42.7 (9.1)
Metalaxyl	54.7 (0.6)	35.7 (8.7)	28.5 (9.2)	18.7 (8.8)	45.8 (8.2)
Dichlofluanid	68.0 (7.0)	20.9 (8.4)	ND	ND	ND
Penconazol	55.0 (2.8)	34.8 (8.9)	29.1 (9.3)	39.2 (9.2)	43.9 (9.7)

ND, non-detected; RSD, relative standard deviation.

Table 3. Recoveries (RSD, %) with two extractions of n-hexane

Compound	% Recovery (RSD)
Pyrimethanil	98.3 (3.3)
Metalaxyl	94.4 (2.1)
Dichlofluanid	115.7 (12.5)
Penconazol	91.0 (3.2)

RSD, relative standard devitation ($n = 3$).

deviations: 8.4–9.2% in ethyl acetate *versus* 0.6–7.0% in n-hexane. The extraction recoveries with ethyl acetate–cyclohexane (42.7–45.8%) were a little higher than ethyl acetate recoveries, but had the characteristic, as in the case of acetone–dichloromethane and cyclohexane, of not extracting one of the studied compounds: dichlofluanid. As these results show, the selected solvent was n-hexane. In order to increase the recoveries obtained with a single extraction, a second extraction was performed with another 10 mL of n-hexane, after removing the first extract. The recovery results with two extractions (10 + 10 mL) of n-hexane are shown in Table 3.

Once the extraction solvent had been selected, extractions were performed (v + v mL) using different volumes of n-hexane: 2, 5, 10 and 20 mL. Analysis of data shows that pyrimethanil and penconazol presented high and similar recoveries (*ca* 98.4% and *ca* 89.6%, respectively) for volumes of 2, 5, 10 and 20 mL, although slightly higher than those for a volume of 10 mL. For metalaxyl, the highest recovery values were obtained for volumes of 5 and 10 mL (91.5% and 94.8%, respectively). Dichlofluanid displayed the same behaviour as metalaxyl since high recovery values were obtained for volumes of 5 and 10 mL (114.5% and 117.7%, respectively). Therefore, the solvent volume of 10 + 10 mL was chosen for LLE.

Amounts between 0.5 g and 1.5 g NaCl were added. In the results obtained it was observed that the addition of salt provided similar recovery values for pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol when 0.5 and 1.0 g were added and slightly lower values with 1.5 g. 0.5 g NaCl was chosen as the appropriate amount because it was easily dissolved in samples.

LLE was performed by orbital agitation. The studied times were 5, 10, 15, 20 and 30 min. An agitation time of 10 min yielded recoveries of 102.0% for pyrimethanil, 103.1% for metalaxyl, 91.9% for penconazol and 118.6% for dichlofluanid.

The method applied for the extraction of dichlofluanid, metalaxyl, penconazol and pyrimethanil in synthetic and real samples involved the following steps. 0.5 g NaCl was added to 5 mL of sample (must; must–wine; wine) in a 50 mL extraction funnel. 10 mL n-hexane was added and agitated for 10 min. Once the extract was removed, 10 mL n-hexane was added for another 10 min of agitation. After combining the extracts, anhydrous sodium sulfate was added for drying. The extract was then evaporated to *ca* 1 mL in a rotary evaporator (R-200, Büchi, Essen, Germany) at 35 °C. The extract was adjusted to a final volume of 2 mL with n-hexane. Metribuzyn was added in a concentration of 1 mg L^{-1} as internal standard.

Matrix influence on fermentative process

The change in sample composition during alcoholic fermentation (in the transformation of sugar must into ethanol) required that the matrix influence in the extraction process had to be studied.

Several synthetic solutions were prepared with different sugar and ethanol composition in order to obtain samples from different moments in a hypothetic fermentation. The fungicides were added at two concentration levels (1.0 and 5.0 mg L^{-1}) and extractions were performed in triplicate. In the study of real samples, the must obtained from untreated red grapes was inoculated with selected yeasts. Alcoholic fermentation was carried out in the laboratory and samples with different ethanol and sugar composition were taken during the process. These samples were spiked with the target fungicides at the same concentration (1.0 and 5.0 mg L^{-1}). The results are shown in Table 4. Analysis of variance (ANOVA) showed that the extraction of pyrimethanil, metalaxyl and penconazol did not present significant differences ($P < 0.05$) due to the different sample composition, or two different spiked levels, in either synthetic or real samples. Dichlofluanid recoveries were higher than 100% in all synthetic and real samples (see Table 4). Consequently, pyrimethanil, metalaxyl and penconazol did not show a matrix effect. However, this effect was observed for dichlofluanid.

Calibration curves, limits of detection and limits of quantification

Analytical curves were obtained spiking must and wine samples with seven concentrations for each analyte, with three replicates. These samples were analyzed using the method previously described. The linearity of the method was estimated by the least square method.

Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were determined by injecting several extracts of non-spiked must and wine samples ($n = 6$) and measuring background analytical response (noise). LODs and LOQs were estimated as the concentration obtained with the average value of noise plus three and ten times the standard deviation, respectively.[29]

Table 5 shows the analytical features of the method for the fungicides in both synthetic and real must and wine. The LOQs were always below the MRLs.

 © 2009 Society of Chemical Industry

Table 4. Recoveries (RSD, %) of the fungicides in different synthetic and real matrices at two concentration levels

Synthetic Samples		Pyrimethanil		Metalaxyl		Dichlofluanid		Penconazol	
% Ethanol (v/v)	Sucrose (g L^{-1})	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}
0.0	200.0	96.3 (1.6)	96.9 (1.1)	90.5 (0.8)	94.1 (2.9)	115.5 (3.8)	122.8 (4.7)	86.4 (4.1)	89.1 (6.0)
3.0	150.0	97.7 (1.5)	97.5 (1.5)	93.3 (0.9)	95.2 (1.7)	168.2 (1.8)	174.9 (4.5)	88.2 (4.6)	90.9 (1.7)
6.0	100.0	96.7 (0.9)	95.0 (0.6)	93.2 (0.5)	94.0 (0.8)	166.2 (8.9)	171.9 (6.5)	89.9 (2.1)	92.7 (2.7)
9.0	50.0	99.2 (0.5)	97.4 (1.0)	96.6 (1.9)	95.9 (0.4)	160.2 (2.7)	168.5 (8.2)	90.3 (1.9)	89.4 (0.7)
12.0	0.0	98.8 (2.7)	97.2 (1.3)	94.2 (4.5)	93.2 (1.3)	164.4 (7.8)	172.3 (9.1)	89.6 (1.0)	89.9 (5.9)
Real Samples		**Pyrimethanil**		**Metalaxyl**		**Dichlofluanid**		**Penconazol**	
% Ethanol (v/v)	Sugars (g L^{-1})	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}	1 mg L^{-1}	5 mg L^{-1}
0.0	220.0	85.0 (1.3)	87.4 (3.9)	98.8 (1.3)	97.9 (0.6)	118.3 (1.2)	121.7 (3.5)	78.5 (1.1)	78.1 (1.1)
4.0	146.0	83.5 (2.2)	86.2 (3.8)	98.5 (0.8)	97.8 (1.4)	119.3 (3.4)	125.9 (4.9)	80.1 (4.0)	78.7 (2.7)
7.0	91.0	84.7 (1.6)	87.1 (1.2)	99.1 (1.5)	98.9 (1.9)	119.9 (5.5)	128.0 (2.1)	81.2 (2.4)	81.5 (1.9)
10.1	34.0	83.8 (3.0)	87.3 (2.8)	101.0 (2.9)	99.1 (1.3)	124.2 (6.5)	132.4 (6.4)	81.6 (2.8)	79.9 (3.3)
11.7	<5.0	88.9 (0.9)	87.1 (0.7)	101.1 (2.2)	100.1 (2.6)	144.3 (1.3)	131.4 (1.8)	78.4 (1.6)	80.5 (1.6)

RSD = Relative Standard Deviation (n = 3).

Table 5. Analytical characteristics of the method for analysing pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol in synthetic and real samples

Compound	Matrix		LOD (µg L^{-1})	LOQ (µg L^{-1})	Linear range (µg L^{-1})	Equation[a]	R^2
Pyrimethanil	Must	Synthetic	0.54	1.04	1.04–10 240	RA = 4.117 (±0.036) C − 0.034 (±0.042)	0.9998
		Real	0.48	0.93	0.93–10 240	RA = 4.645 (±0.060) C − 0.353 (±0.029)	0.999
	Wine	Synthetic	0.46	0.89	0.89–10 240	RA = 4.130 (±0.028) C − 0.0241 (±0.033)	0.9999
		Real	0.43	0.83	0.83–10 240	RA = 4.408 (±0.142) C − 0.242 (±0.071)	0.994
Metalaxyl	Must	Synthetic	1.49	3.26	3.26–9 920	RA = 1.022 (±0.004) C − 0.008 (±0.005)	0.9999
		Real	1.47	3.12	3.12–9 920	RA = 1.062 (±0.032) C − 0.178 (±0.015)	0.991
	Wine	Synthetic	1.28	2.79	2.79–9 920	RA = 1.007 (±0.011) C − 0.0075 (±0.013)	0.9996
		Real	1.23	2.8	2.80–9 920	RA = 1.005 (±0.026) C − 0.110 (±0.012)	0.993
Dichlofluanid	Must	Synthetic	5.16	11.9	11.9–9 760	RA = 1.802 (±0.049) C + 0.296 (±0.073)	0.994
		Real	1.79	4.13	4.13–9 760	RA = 2.991 (±0.040) C + 0.276 (±0.070)	0.999
	Wine	Synthetic	1.79	4.13	4.13–9 760	RA = 2.536 (±0.042) C − 0.002 (±0.062)	0.9992
		Real	1.67	3.85	3.85–9 760	RA = 2.721 (±0.079) C − 0.518 (±0.069)	0.995
Penconazol	Must	Synthetic	0.42	0.79	0.79–10 400	RA = 2.385 (±0.051) C − 0.072 (±0.060)	0.998
		Real	3.63	6.77	6.77–10 400	RA = 2.755 (±0.099) C − 0.630 (±0.093)	0.993
	Wine	Synthetic	0.38	0.72	0.72–10 400	RA = 2.226 (±0.061) C − 0.077 (±0.072)	0.997
		Real	3.24	6.04	6.04–10 400	RA = 2.623 (±0.074) C − 0.467 (±0.075)	0.995

[a] RA, relative area; C, concentration.

Selectivity, precision, recovery and accuracy

Selectivity was checked by injecting extracts of non-spiked synthetic and real must and wine samples. It can be deduced from Fig. 1 (synthetic) and Fig. 2 (real) that there was no interference in synthetic or real must and wine extracts. The proposed conditions generated narrow and reproducible chromatographic peaks. Noise was similar regardless of the matrix.

Accuracy was determined as percentage recovery. Recovery assays were performed with must and wine (synthetic and real samples) spiked with fungicides at two concentration levels: 1.0 and 5.0 mg L^{-1} for pyrimethanil, metalaxyl, penconazol and dichlofluanid.

Precision was evaluated in terms of repeatability using two different spiked levels. Analyses were carried out in triplicate. The average recoveries for pyrimethanil, metalaxyl and penconazol were from 78.3% to 100.6%. Table 6 shows the results obtained for both matrices (synthetic and real) and concentration levels. Results showed that relative standard deviation values were lower than 10%: between 1.4% and 6.1%. The ANOVA showed that there were no significant differences ($P < 0.05$) between matrices for pyrimethanil, metalaxyl and penconazol.

However, dichlofluanid recovery levels were higher than 100%: between 119.1% and 168.3% in synthetic samples and between 120.0% and 132.9% in real samples. They were different for both matrices. Relative standard deviation values were higher: between 7.0% and 11.6%.

Assessment of the matrix effect

The linear response of the method was studied for both matrices (synthetic and real). The similarity in the calibration curves would

 © 2009 Society of Chemical Industry

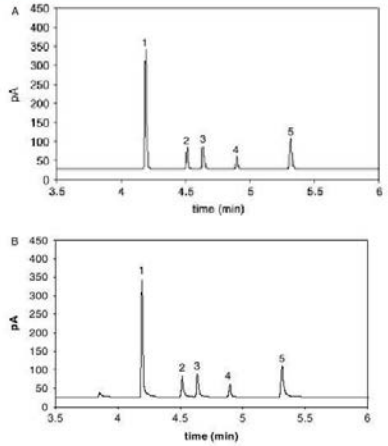


Figure 1. GC-NPD chromatograms obtained after LLE. (A) Extract from spiked synthetic must. (B) Extract from spiked synthetic wine (1 mg L^{-1}). Peak identification: 1, pyrimethanil; 2, metribuzin (IS); 3, metalaxyl; 4, dichlofluanide; 5, penconazole.

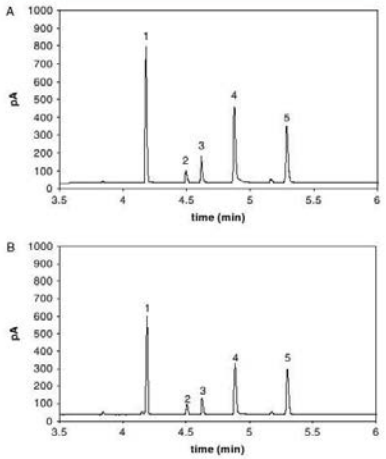


Figure 2. GC-NPD chromatograms obtained after LLE. (A) Extract from spiked real must. (B) Extract from spiked real wine (2.5 mg L^{-1}). Peak identification: 1, pyrimethanil; 2, metribuzin (IS); 3, metalaxyl; 4, dichlofluanid; 5, penconazol.

Table 6. Average recoveries and precision (both as percentage) for concentrations of 1 and 5 mg L^{-1} after spiking synthetic and real must and wine samples

	Recovery (RSD, %)			
	Must		Wine	
Compound	Synthetic	Real	Synthetic	Real
Pyrimethanil	96.7 (1.7)	86.2 (1.9)	98.4 (2.5)	88.0 (1.4)
Metalaxyl	92.8 (3.6)	98.3 (3.7)	93.9 (4.0)	100.6 (3.7)
Dichlofluanid	119.1 (9.3)	120.0 (7.0)	168.3 (12.3)	132.9 (7.5)
Penconazol	88.2 (6.1)	78.3 (4.3)	89.8 (5.4)	79.4 (4.9)

RSD, relative standard deviation ($n = 6$).

indicate that there was no matrix effect in the extraction. A Student's *t*-test was made to compare the slopes of regression lines (synthetic must and wine, and real must and wine) obtained for each studied compound with a significance of 95%. The results showed that there were no significant differences between the slopes in must and wine for pyrimethanil, metalaxyl or penconazol in either synthetic or real samples. However, significant differences were observed between the slopes for dichlofluanid. Thus it can be concluded that there was no matrix effect in the analysis of pyrimethanil, metalaxyl, penconazol. However, this effect was observed for dichlofluanid.

Analysis of synthetic and real samples spiked with pyrimethanil during fermentation

The fermentation assays were performed on sterile synthetic and real must, where a dose of pyrimethanil was added. Pyrimethanil is a widely used product for controlling the fungus *Botrytis cinerea* in DOCa Rioja. The musts were then fermented with the selected strain of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). This yeast strain was resistant to the studied product.[30] The fungicide was added to different 500 mL aliquots of must (sterilized in an autoclave), in a concentration similar to the MRL. These must aliquots were inoculated with a yeast population of 10^4 in each flask. Assays were performed in duplicate.

In order to check the fungicide degradation in synthetic and real must matrices, control solutions with the same amount of pyrimethanil were prepared. They were not subjected to the fermentation process but they had the same pH and temperature conditions as the samples inoculated with yeasts.

The fermentation process lasted for 7 days. Two 25 mL samples were regularly collected from each flask during the fermentation process (at 0, 12, 24, 48, 72, 96 and 168 h from the beginning of fermentation). These samples were centrifuged at 3000 rpm at 3 °C in order to eliminate yeast sediments. The developed method was applied to analysing pyrimethanil residues in fermentation and control synthetic and real must samples. Alcoholic fermentation was controlled by measuring sugar content. In order to check pyrimethanil effect on fermentative process, non-spiked musts were fermented under the same conditions. No significant differences were observed in fermentative processes of musts spiked with pyrimethanil compared with non-spiked musts.

Tables 7 and 8 show pyrimethanil content found in both control and fermented samples. In synthetic must pyrimethanil showed a decrease of 13.1% in control must at the end of the process. This effect could be explained by the compound degradation produced because of the matrix or the temperature.[16] In samples analysed during fermentation, pyrimethanil concentration decreased 43.6%. In the real must assay, a decrease of 28.9% in

 © 2009 Society of Chemical Industry

Table 7. Evolution of pyrimethanil content in the control and fermented (F) synthetic samples, with their standard deviation ($n = 4$)

	Pyrimethanil (mg L^{-1})	
Time (h)	Control	F
0	5.86 ± 0.14	5.86 ± 0.14
12	5.78 ± 0.24	4.78 ± 0.07
24	5.73 ± 0.40	4.40 ± 0.31
48	5.30 ± 0.11	3.67 ± 0.19
72	5.45 ± 0.64	3.41 ± 0.09
96	5.20 ± 0.92	3.26 ± 0.22
168	5.09 ± 0.51	3.30 ± 0.31

Table 8. Evolution of pyrimethanil content in control and fermented (F) real samples, with their standard deviation ($n = 4$)

	Pyrimethanil (mg L^{-1})	
Time (h)	Control	F
0	4.74 ± 0.02	4.74 ± 0.02
12	4.35 ± 0.26	4.18 ± 0.06
24	4.50 ± 0.60	4.23 ± 0.37
48	3.79 ± 0.37	3.55 ± 0.28
72	3.65 ± 0.15	3.12 ± 0.55
96	3.11 ± 0.46	2.79 ± 0.30
168	3.37 ± 0.15	2.67 ± 0.05

pyrimethanil amount was observed in control must At the end of alcoholic fermentation, the reduction percentage of pyrimethanil was 43.7%. The decrease of pyrimethanil in fermented samples was similar in both synthetic and real samples.

CONCLUSIONS

LLE is a suitable extraction method for the determination of widely used phytosanitary products, with high extraction yields and values for the LOQs below the MRLs established by European legislation.

The presence of ethanol and sugar in fermentative samples did not show any influence on the determination of pyrimethanil, metalaxyl and penconazol fungicides. These fungicides did not display a matrix effect when the proposed method was applied. In contrast, dichlofluanid did have a matrix effect. This result means that the determination of dichlofluanid in fermentative samples requires a standard addition calibration[11] for each sample or a matrix-matched calibration.[6,20]

A greater decrease in pyrimethanil content was observed in fermentation samples than in control ones. It was not observed any degradation product.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Comunidad Autónoma de La Rioja for the FPI fellowship granted to Luis Vaquero-Fernández and the project ANGI 2004/18, the INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), FEDER-MEC for the project AGL2005-02313/ALI, and the Universidad de La Rioja.

REFERENCES

1 Ribéreau-Gayon P, Dubordieu D, Donéche B and Lonvaud A, La uva y su maduración, in *Tratado de Enología*. Vol. 1. *Microbiología del Vino: Vinificaciones*. Hemisferio Sur, Buenos Aires, pp. 307–381 (2002).
2 Cuinier C, Influence éventuelle des produits phytopharmaceutiques sur les fermentations et la qualité des vins. *Rev Fr Oenol* **159**:41–43 (1996).
3 Fernández González C, Rial Otero R, Cancho Grande B and Simal Gándara J, Determination of fungicide residues in white grapes for winemaking by gas chromatography with mass spectrometric detection and assessment of matrix effects. *J AOAC Int* **86**:1008–1014 (2003).
4 Sherma J, Pesticide residue analysis: 1997–1998. *J AOAC Int* **82**:561–574 (1999).
5 Navarro S, Barba J, Oliva J, Navarro G and Pardo F, Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines: effect of wine-making procedures in their disappearance. *J Agric Food Chem* **47**:264–270 (1999).
6 Jiménez JJ, Bernal JL and Del Nozal MJ, Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen–phosphorus detection. *J Chromatogr A* **919**:147–156 (2001).
7 Soleas GJ, Yan J, Hom K and Goldberg DM, Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass-selective detection. *J Chromatogr A* **882**:205–212 (2000).
8 Millán S, Sanpedro MC and Unceta N, Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. *J Chromatogr A* **995**:135–142 (2003).
9 Scarponi L and Martinetti L, Treatments and residues in wine: studies of the presence of cyprodinil and fludioxonil residues in some Italian wines. *Vignevini* **26**:27–29 (1999).
10 Yamazaki Y and Ninomiya T, Determination of benomyl, diphenyl, o-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion, and methyl parathion in oranges by solid-phase extraction, liquid chromatography, and gas chromatography *J AOAC Int* **82**:1474–1478 (1999).
11 Rial Otero R, Cancho Grande B and Simal Gandara J, Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid–liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography–diode array detection. *J Chromatogr A* **992**:121–131 (2003).
12 Melo LFC, Collins CH and Jardim ICSF, New materials for solid-phase extraction and multiclass high-performance liquid chromatographic analysis of pesticides in grapes. *J Chromatogr A* **1032**:51–58 (2004).
13 Correia M, Derelue-Matos C and Alves A, Multi-residue methodology for pesticide screening in wines. *J Chromatogr A* **889**:59–67 (2000).
14 Vitali M, Guidotti M and Giovinazzo R, Determination of pesticide residues in wine by SPME and GC/MS for consumer risk assessment. *Food Addit Contam* **15**:280–287 (1998).
15 Sala C, Busto O and Guasch J, Quick gas chromatographic method for determining common pesticides in musts and wines. *Chromatographia* **44**:320–324 (1997).
16 Cabras P, Angioni A, Garau VL, Melis M, Pirisi FM, Menelli EV *et al*, Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *J Agric Food Chem* **45**:2708–2710 (1997).
17 Oliva J, Navarro S and Barba A, Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography. *J Chromatogr A* **833**:43–51 (1999).
18 Navarro S, Barba J, Oliva J, Navarro G and Pardo F, Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines: effect of wine-making procedures in their disappearance. *J Agric Food Chem* **47**:264–270 (1999).
19 Navarro S, Oliva J and Barba A, Evolution of chlorpyrifos, fenarimol, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in red wines elaborated by carbonic maceration of monastrell grapes. *J Agric Food Chem* **48**:3537–3541 (2000).
20 Vaquero-Fernández L, Sáenz-Hernáez A, Sanz-Asensio J, Fernández-Zurbano P, Sainz-Ramírez M, Martínez-Soria MT *et al*, Determination of cyprodinil and fludioxonil in the fermentative process of must by high-performance liquid chromatography–diode array detection. *J Sci Food Agric* **88**:1943–1948 (2008).
21 Bernal JL, Del Nozal MJ and Jiménez JJ, Matrix effects in the determination of acaricides and fungicides in must by gas

 © 2009 Society of Chemical Industry

chromatography with electron-capture and nitrogen–phosphorus detection. *J Chromatogr A* **778**:111–117 (1997).
22 Navarro S, Barba A, Navarro G, Vela N and Oliva J, Multiresidue method for the rapid determination – in grape, must and wine – of fungicides frequently used on vineyards. *J Chromatogr A* **882**:221–229 (2000).
23 Columé A, Cárdenas S, Gallego M and Valcarcel M, Simplified method for the determination of chlorinated fungicides and insecticides in fruits by gas chromatography *J Chromatogr A* **882**:193–203 (2000).
24 Wong JW and Halverson CA, Multiresidue analysis of pesticides in wines using C-18 solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Am J Enol Vitic* **50**:435–442 (1999).
25 Hajšlová J, Holadová K and Kocourek V, Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *J Chromatogr A* **800**:283–295 (1998).
26 Erney DR, Gillespie AM, Gilvydis DM and Poole CF, Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with spitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J Chromatogr A* **638**:57–63 (1993).
27 Erney DR, Pawlowki TM and Poole CF, Matrix-induced peak enhancement of pesticides in gas chromatography: is there a solution? *HRC J High Res Chromatogr* **20**:375–378 (1997).
28 Council Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in products of plant and animal origin. Official Journal OJ L70 of 16/03/2005 (2005).
29 Miller JN and Miller JC, Editorial, in *Estadísitica y Quimiometría para Química Analítica* (4th edn). Prentice-Hall, Madrid (2002).
30 Gracia A, Dizy M, Gutiérrez AR and Santamaría P, Sensibilidad de Distintos, Clones de *Saccharomyces cerevisiae* a Diferentes Pesticidas Antibotríticos Utilizados en Viña, poster presentation in *III World Wine Forum*, Logroño. Spain (2002).

 © 2009 Society of Chemical Industry

Food Additives and Contaminants
Vol. 26, No. 2, February 2009, 164–171

Fate and distribution of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol fungicides from treated grapes intended for winemaking

L. Vaquero-Fernández[a], J. Sanz-Asensio[a], M. López-Alonso[b] and M.T. Martínez-Soria[a]*

[a]*Department of Chemistry and* [b]*Department of Agriculture and Food, University of La Rioja, Madre de Dios, Logroño, Spain*

(*Received 25 March 2008; final version received 10 August 2008*)

Tempranillo grapes were immersed in solutions of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol fungicides at different concentrations for several different times. Determinations of the fungicide residues was carried out by GC-NPD, with an additional confirmation by GC-MS. The percentage absorption was determined as well as the distribution between surface, skin and pulp of the grapes. The percentage absorption ranged from 7.2 to 85.5%. These values depended on the time the grapes were in contact with the fungicide solutions. Residues were mainly found in skins, with percentages in skins ranging from 66.3 to 90.3% of total residues. In pulp, these values ranged from 3.5 to 31.0%. The overall methodology was applied to the determination of pyrimethanil in Tempranillo grapes treated with the recommended doses, respecting the safety period. Pyrimethanil residues found in treated grapes were higher in the skin. In grapes collected within the safety period (21 days), the levels found for fungicide residues were below maximum residues levels.

Keywords: pesticides; grapes; absorption; distribution; penetration

Introduction

Fungicides are widely used in the treatment of grape diseases for winemaking such us grey mold (*Botrytis cinerea*), powdery mildew (*Uncinula necator*) and downy mildew (*Plasmopara vitícola*). Although the correct use of these phytosanitary products does not have adverse effects for public or environmental health, indiscriminate treatment applied without respect for safety periods or recommended doses can entail a risk of the residues remaining in grapes used for winemaking. These fungicides can be transmitted to the must and then to the wine during fermentation (Cabras et al. 2000a; Fernández González et al. 2003; Nozal et al. 2005) and affect not only the fermentation process, but also the final quality of the product, giving rise to off-flavours (Cuinier 1996). Moreover, there might also be a risk for consumer health (Stavropoulos et al. 2001; Navarro et al. 2005). Therefore, rapid and reliable analytical techniques must be developed to control residue levels in grapes in order to verify their compliance with the maximum residue levels (MRLs) (Teixeira et al. 2004).

Numerous analytical methods have been described for determining the presence of fungicides in wine-making grapes. Determinations are generally carried out by GC with different detectors (NPD, ECD, and MS) (Sherma 1999; Fernández et al. 2002; Tadeo et al. 2004; Angioni et al. 2005) or HPLC with UV–VIS or MS detection (Melo et al. 2004; Nozal et al. 2005; De Melo Abreu et al. 2006; Vaquero-Fernández et al. 2008). The MS detector is commonly used as a confirmatory method (De Melo Abreu et al. 2006; Likas et al. 2007).

In GC analysis, the response of the system to certain pesticides may be affected by the presence of co-extractives from the matrix. Recent related papers in different fields of pesticide analyses report the matrix effect in calibration, and therefore carry out preparation of the calibration solution using extracts from blank samples (matrix-matched calibration) (Likas et al. 2007; Zhu et al. 2007).

Numerous studies on the determination of certain pesticides in grapes at residual levels have been published (Navarro et al. 2000; Rial Otero et al. 2003). The method commonly used is solid–liquid extraction as a prior isolation step, with solvents such as acetonitrile, hexane, acetone, dichloromethane, ethyl acetate or solvent mixtures as dichloromethane/acetone (Sala et al. 1997; Cabras et al. 2000b; Angioni et al. 2005; De Melo Abreu et al. 2006; Likas et al. 2007). Some studies also consider the use of solid-phase extraction (SPE) as a further purification process (Fernández González et al. 2003; Rial Otero et al. 2003; Teixeira et al. 2004).

*Corresponding author. Email: maria-teresa.martinez@unirioja.es

ISSN 0265–203X print/ISSN 1464–5122 online
© 2009 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/02652030802399026
http://www.informaworld.com

The different effects of the application of fungicides to vines may explain the different locations and concentrations of fungicide residues in grapes. While systemic products penetrate the pulp, those in contact may be found in the skin. The adjuvants used in commercial formulations are important in the penetration of fungicides in tissues (Cabras et al. 2000a; Teixeira et al. 2004). In previous studies, different penetration of pesticides into the pulp has been observed in fruits like apples (Pérez-Clavijo et al. 1996; Sanz-Asensio et al. 1999).

The present study was designed to determine the residue levels of four fungicides widely used in grapevines of DOCa Rioja (pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol) in different fractions of grape. This paper reports results of a study of the distribution of the target fungicides with simulated uptake from solution and in field studies. Different concentrations were tested to be equal or higher than the MRLs fixed by European Union.

Materials and methods

Materials and chemicals

Pesticide analytical standards of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Standards were certified and at least at >99% pure (Pestanal grade). Metribuzin (a herbicide not used for vineyards) from Riedel-de-Haën with a purity of 99.8% was used as internal standard (IS). Scala® (37.4% pyrimethanil formulated as suspension concentrate) was supplied by BASF Española S.A. (Barcelona, Spain) for vines treatment. The standards were stored at −20°C. HPLC-grade ethyl acetate, sodium sulfate anhydrous for GC residue analysis and washed glass wool were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain), Ultrapure water was obtained in a Milli-Ro plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

A Heidolph SilentCruher M (Scwachbach, Germany) and a Centrifuge Eppendorf 5804 (Hamburg, Germany) were used to process samples in the developed method. A Zymark TurboVap® II (Hopkinton, MA, USA) was used to evaporate extracts of ethyl acetate under a nitrogen stream and a Büchi rotavapor R-200 to evaporate washing extracts.

The extraction of the skin with water and ethyl acetate was carried out with a Branson 5510 Ultrasonics (Barcelona, Spain).

For solid-phase extraction, octadecylsilane 200 mg (LiChrolut RP-18) cartridges were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). A Visiprep SPE vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used to process twelve tubes simultaneously. The system was equipped with a pressure controller (20 mmHg) to force the sample through the cartridges.

Standard solutions

Stock standards solution (approximately 1000 mg l^{-1}) of each fungicide was prepared in methanol by weighing approximately 0.0250 g of the analyte into a 25 ml volumetric flask and diluting to volume. An intermediary mixed-standard solution was prepared by dilution in methanol of the stock standard solution to give a concentration of approximately 100 mg l^{-1} for each compound. Stock and intermediary standard solutions of IS, metribuzin, were prepared in the same way. All standard solutions were stored at −20°C.

Sampling and processing

In 2005 and 2006, grapes of Tempranillo variety were harvested in the winemaking area of La Rioja (Spain). These vines had not been treated with phytosanitary products and collected grapes were considered as control grapes in order to carry out the study of the compounds. The selected treated and control grapes from each bunch (top, middle and bottom) were frozen at −20°C in 150 ml flasks containing 75 grapes each.

Before using the grapes, they were defrosted in a refrigerator at 4°C for 24 h. They were kept at room temperature for 1 h before handling. The grapes were weighed, spiked and processed as follows:

- Washing procedure: tap water (50 ml) was added to 25 g of grapes in a 250 ml glass until they were completely covered to dissolve the pesticide residue remaining on the exterior of the fruit. The glass was placed in an ultrasound bath and shaken for 30 min to dissolve the residues located on the surface of the grapes. The removed water was concentrated in rotavapor to 5 ml for subsequent SPE analysis. SPE cartridges containing 200 mg of C18 sorbent were used. The C18 cartridge was activated with 5 ml methanol and then 3 ml ultrapure water. The volume of the sample was 5 ml. A washing step with 2 ml of water/methanol (9/1) was carried out. The extract retained in the solid phase was eluted with 2 + 2 ml of ethyl acetate (Method 1).
- Solvent extraction of fungicides in grape skin: once the grapes had been washed with water and the washing water had been removed, they were left to dry on filter paper at room temperature for 10 min. The washed and dried grapes were placed in 50 ml of ethyl acetate in a 250 ml glass in order to extract the

fungicide residues absorbed on the grape skins. The glass was placed in the ultrasonic bath for 30 min. To ensure full extraction of the skin, four consecutive extractions of 30 min were carried out in the ultrasonic bath for spiked grapes. No signal of fungicides was observed in the third and fourth extracts. The method proposed for grape skin includes two extractions with 50 ml ethyl acetate for 30 min in the ultrasonic bath. The two extracts were combined, dried with sodium sulfate anhydrous and filtered through glass wool and concentrated in Turbo Vap® to 5 ml (Method 2).

- Solvent extraction of fungicides in the whole grape: grapes were crushed after removal of ethyl acetate for skin extraction. Ethyl acetate (25 ml) was added. The grapes were homogenised with the crusher for 2 min and then centrifuged at 6000 rpm for 15 min. The liquid phase was dried with sodium sulfate anhydrous and filtered through glass wool. The extract was concentrated at 5 ml in the Turbo Vap® (Method 3).

The quantification for GC analysis was performed using metribuzin as internal standard at a concentration of $1\,mg\,l^{-1}$. Confirmation was performed by GC-MS.

Instrumentation and chromatographic conditions

An Agilent Technologies GC 6890 N equipped with an NPD Nitrogen–Phosphorus Detector system, an autosampler 7683 (Agilent) and a split–splitless injector connected to a HP ChemStation (Hewlett-Packard) were used to determine the fungicides dichlofluanid, metalaxyl, penconazole and pyrimethanil. The capillary column was a HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d. with 0.25 µm of cross-linked 5% phenylmethyl siloxane). Injector and detector temperatures were 200°C and 325°C, respectively. The oven temperature was programmed as follows: 80°C for 0.9 min, increased to 225°C ($70^{\circ}C\,min^{-1}$) for 5 min, to 275°C ($70^{\circ}C\,min^{-1}$) for 3 min. Helium was the carrier and make-up gas at 1.5 and $3\,ml\,min^{-1}$, respectively. Flow ratios for the NPD detector were $3\,ml\,min^{-1}$ for hydrogen and $70\,ml\,min^{-1}$ for air. Injection was performed in splitless mode with a purge time of 0.9 min and the injection volume was 2 µl.

The confirmation of the studied compounds was carried out on an Agilent 7890A GC with MS 5975C detector system. Column, carrier flow and oven temperature programme were the conditions abovementioned for GC-NPD system. The volume of sample was 1 µl, injected in splitless mode with splitless time of 1 min. The mass spectrometer was operated in electron impact (70 eV of ion energy), with 3.50 min solvent delay, the interface temperature was kept at 285°C, the ion source temperature was kept at 230°C and the dwell time was 100 ms per ion. Selected monitoring ion (SIM) mode was used (198, 199, and 200 m/z for pyrimethanil; 103, 144, and 198 m/z for metribuzin; 132, 160, and 206 m/z for metalaxyl; 123, 167, and 224 m/z for dichlofluanid; 159, and 248 m/z for penconazol).

Study of absorption and distribution in grapes

The absorption of the fungicides was studied by soaking 25 g of untreated grapes in 50 ml of aqueous solution spiked with three fungicide concentration levels (1.00, 5.00 and $10.00\,mg\,l^{-1}$, corresponding to 2, 10 and $20\,\mu g\,g^{-1}$, respectively), in a 250 ml beaker. The samples were kept in the dark at 4°C for 1, 3, 7, 13 and 21 days (the longest safety period for all compounds). The spiking concentrations were similar or higher than MRLs fixed by the European Union ($10\,\mu g\,g^{-1}$ for dichlofluanid, $1\,\mu g\,g^{-1}$ for metalaxyl, $0.2\,\mu g\,g^{-1}$ for penconazol and $5\,\mu g\,g^{-1}$ for pyrimethanil). Three replicates were carried out. The fungicide absorption in the whole grape was calculated as the sum of the three parts: surface, skin and pulp.

Study in field

Tempranillo grapevines in Rioja Baja were treated with Scala® (37.4% pyrimethanil) at the recommended doses (21 per hectare). Scala is a very widely used product against *Botrytis cinerea*. Samples were collected 7 and 21 days after treatment.

Results and discussion

Analytical method efficiency

There were no interferences in the extracts obtained from red grapes in the GC-NPD chromatogram. The proposed conditions generated narrow and reproducible chromatographic peaks. Clean chromatograms were obtained with only peaks of interest in fortified blank matrix. The GC-MS method allowed confirmation of the fungicides with good resolution and did not show interfering peaks.

Matrix standard calibrations were performed for washing water and ethyl acetate from skins, and a matrix-matched calibration were carried out for pulp. Linear range, limits of detection (LODs), limits of quantification, and repeatability were determined for the three methods and four fungicides. The linear range was from 10 to $1400\,\mu g\,kg^{-1}$. Good linearity was obtained for all fungicides and for the entire range of studied concentrations with correlation coefficients better than 0.997. LODs ranged from 0.04 to $1.67\,\mu g\,kg^{-1}$ in surface (washing water); from 0.01

Table 1. Fungicide residues and absorption percentage in grapes samples that have been in contact with three different solutions during different times.

	Solution concentration					
	2 μg g^{-1}		10 μg g^{-1}		20 μg g^{-1}	
Days	μg g^{-1} (RSD,%)	%	μg g^{-1} (RSD,%)	%	μg g^{-1} (RSD,%)	%
Pyrimethanil						
1	0.43 (6.2)	21.6	1.82 (2.2)	18.2	3.36 (2.8)	15.8
3	0.56 (5.3)	28.1	2.46 (7.6)	24.6	4.47 (6.4)	22.9
7	0.96 (2.5)	48.1	4.49 (7.0)	44.9	8.48 (2.6)	42.4
13	1.14 (4.9)	57.1	5.47 (3.8)	54.8	10.7 (5.2)	53.6
21	1.44 (6.2)	72.3	7.14 (7.7)	71.4	14.7 (2.8)	73.5
Metalaxyl						
1	0.23 (9.9)	11.4	0.92 (2.4)	9.2	1.44 (1.8)	7.2
3	0.34 (8.2)	16.8	1.57 (4.6)	15.7	3.10 (3.4)	15.5
7	0.55 (10.0)	27.8	2.89 (4.6)	28.9	6.43 (1.8)	32.2
13	1.08 (5.2)	53.8	5.29 (9.3)	52.9	11.3 (1.7)	56.7
21	1.78 (3.9)	89.0	8.50 (5.8)	85.0	17.9 (5.8)	89.5
Dichlofluanid						
1	0.18 (1.9)	9.2	1.55 (1.1)	15.5	2.96 (2.1)	14.8
3	0.22 (8.4)	11.2	1.72 (3.9)	28.9	3.14 (6.0)	15.7
7	0.31 (2.3)	15.5	2.07 (5.0)	20.7	3.50 (3.6)	17.5
13	0.41 (7.5)	20.4	2.33 (5.4)	23.3	4.17 (4.5)	20.8
21	0.54 (10.3)	27.1	2.69 (9.6)	26.9	5.07 (4.1)	25.3
Penconazol						
1	0.54 (5.0)	27.1	2.00 (3.8)	20.0	3.32 (4.3)	17.5
3	0.73 (4.8)	36.7	2.97 (6.6)	29.7	6.21 (4.8)	31.1
7	1.12 (5.1)	56.5	4.91 (6.9)	23.3	12.0 (6.2)	60.1
13	1.16 (3.3)	58.1	5.66 (8.3)	56.5	12.7 (7.3)	63.4
21	1.22 (3.0)	61.0	6.65 (8.8)	66.5	13.6 (3.0)	68.1

to 1.05 μg kg^{-1} in skin (ethyl acetate); and from 2.46 to 5.64 μg kg^{-1} in pulp. Repeatabilities expressed as RSD were below 11.4%. The methods were adequate for determining these fungicides.

A matrix-matched calibration and solvent calibration were also carried out for the GC-MS method in the range from 2.0 to 2000 μg kg^{-1} in grape and water extracts, and in ethyl acetate, excellent linearity was also obtained (correlation coefficients >0.9995). The GC-MS confirmation method showed LODs and LOQs in grapes below 0.41 and 1.36 μg kg^{-1} for all compounds, values considerably below the fixed MRLs.

Recovery and accuracy were determined with spiked grapes at the three concentration levels and analysed in triplicate. The analytical methods presented had recoveries >90.1% and precisions (repeatability) <7.6% and they were within the acceptable range: 70–110% with relative standard deviation (RSD) <20% ($n = 3$) (SANCO/3131/2007).

An analysis of variance performed with the data revealed the absence of significant differences ($p < 0.05$) between the assayed levels of spiking.

Study of fungicides absorption

Grapes in contact with solutions containing the fungicides at three concentration levels were analysed. The amounts of residues present in whole grapes were determined by the proposed methods and the percentage absorption of fungicide relative to its concentration in the solution was calculated. Table 1 shows the results for each compound in all the concentration and time situations.

The amount of absorbed fungicide increased with increasing initial concentration of solutions for any time period. This increase was higher, the higher the contact time.

However, the found absorption percentage did not depend on the initial fungicide concentration in contact with grapes for the same contact time. Metalaxyl was the most absorbed fungicide, followed by pyrimethanil, penconazol and dichlofluanid.x

To ascertain the fungicide absorption rate at each studied concentration, the experimental data have been fitted to the following mathematical model (Fernández et al. 2005):

$$C_t = C_0 e^{-K_t} \quad (1)$$

$$\ln C_t = \ln C_t - K_t \quad (2)$$

where C_t is the residue concentration at time t (μg g^{-1}); C_0 is the theoretical initial residue concentration at $t = 0$ (μg g^{-1}); K is the fungicide absorption constant; and t is the time that grapes have been in contact

Table 2. Statistical parameters derived from the linear fit of the data for the fungicides absorption during time.

	Pyrimethanil			Metalaxyl			Dichlofluanid			Penconazol		
Concentration ($\mu g\,g^{-1}$)	r	k	t	r	k	t	r	k	t	r	k	t
2	0.906	0.058	3.696*	0.988	0.101	11.31*	0.969	0.033	6.807*	0.757	0.046	2.009
10	0.908	0.065	3.747*	0.966	0.108	6.526*	0.962	0.027	6.105*	0.852	0.054	2.827
20	0.923	0.070	4.158*	0.938	0.121	4.685*	0.999	0.027	39.69*	0.731	0.060	1.854

Notes: r = correlation coefficient; k = constant rate; t = calculated value of a Student's t-test distribution for $p < 0.05$; significance of the correlation between variables $^*p < 0.05$.

with solutions. This type of analysis, a first-order kinetic, allows the behaviour of fungicide residues during the time to be known by showing the correlation that exists between the absorbed residues and the time. It is also possible to study if the correlation existing between variables is more or less significant from the statistical point of view, through a statistical demonstration with the number of pairs of values used in the coefficient calculus. The following equation is then used (Miller and Miller 2002):

$$t = |r|\sqrt{(n-2)}/\sqrt{(1-r^2)} \quad (3)$$

where r is the correlation coefficient; and $(n-2)$ is degrees of freedom. From this equation, one obtains a value of distribution of the Student's t-test that can be compared with t-tabulated values. The fitting results are presented in Table 2.

As can be seen from these data, the linear correlation between ln C_t and time was good for pyrimethanil, metalaxyl and dichlofluanid for all assays, with correlation coefficients $r > 0.906$. Penconazol did not show a linear correlation, with low correlation coefficients $r < 0.853$. However, this compound presented a linear fit from 1 to 7 days. The Student's t-test performed to compare the slopes (K values) revealed that there were no significant differences at the 95% confidence level for the three studied concentrations. For the constant values, one can establish an absorption rate for the fungicides as follows: metalaxyl > pyrimethanil > dichlofluanid.

Study of fungicides distribution

The amounts of residues in the three parts of the grapes (surface, skin and pulp) were determined using the proposed methods and the percentage distribution relative to the total absorbed residues was calculated. Figure 1 shows this distribution of the fungicide residues in the different parts of the grape as a function of time for the three studied concentrations. The highest content was found in the skin for all compounds, regardless of the fungicide concentration in contact with grapes, with >66.3% of the residues for all the fungicides. In pulp, the residue amounts ranged from 3.5 to 31.0%.

A study of fungicide penetration in pulp was performed by calculating the ratio between pulp and skin concentrations (Q) for all the assays. There was no significant difference at the 95% confidence level between concentrations at the same time. The penetration did not depend on the initial solution concentration. The average values for all concentrations are shown in Table 3. Penconazol and dichlofluanid had the highest Q-values. Metalaxyl and pyrimethanil had a similar behaviour, but different from the other compounds. The statistical analysis performed for all times showed that metalaxyl and pyrimethanil Q-values did not differ at the 95% confidence level from 7 to 21 days. Dichlofluanid presented no significant differences in Q-values for 1 to 7 days. Penconazol had higher Q-values for the highest contact time.

Analysis of red grapes from La Rioja (Spain)

The overall methodology was applied to determine pyrimethanil in Tempranillo grapevines. The selected treated grapes from different clusters from the vineyard (top, middle and bottom of the cluster) were frozen at −20°C in 150-ml flasks containing 75 grapes each during 1 week for further analysis. The results are shown in Table 4.

The amount of pyrimethanil determined in the three parts of the fruit was higher in the grapes collected after 7 days of treatment. A high reduction in pyrimethanil residues were observed over time. This decrease was approximately 99% from 7 to 21 days. The reduction was due to dissipation and/or a degradation by environmental conditions. Pyrimethanil residues were mainly found in the skin (78.2% and 64.5% in grapes collected after 7 and 21 days, respectively). Penetration in pulp was higher for grapes collected after 21 days, and 15.5% of the residues versus 10.1% in grapes collected after 7 days. Pyrimethanil penetration observed in field studies was comparable with that observed in laboratory studies.

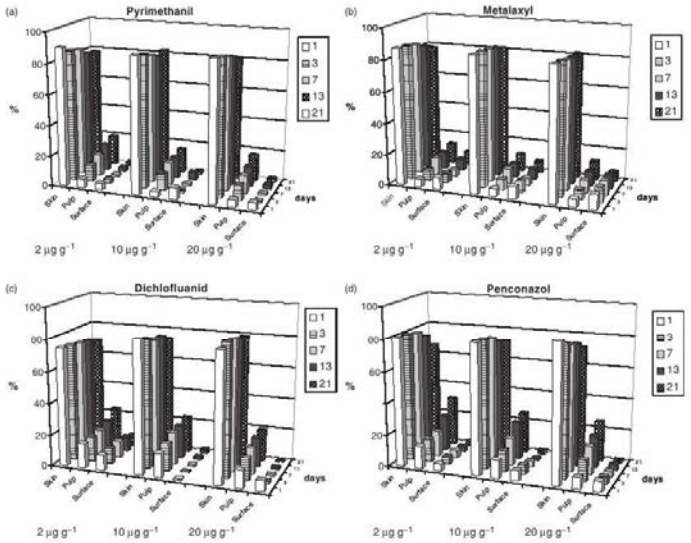


Figure 1. Distribution of fungicides in surface, skin and pulp in grapes that have been in contact with three spiked solutions (2, 10 and 20 μg g^{-1}) during 1, 3, 7, 13 and 21 days: (a) pyrimethanil, (b) metalaxyl, (c) dichlofluanid and (d) penconazol.

Table 3. Average ratios ($Q \pm$ standard deviation*) between pulp and skin concentrations for fungicides during time.

Days	Pyrimethanil	Metalaxyl	Dichlofluanid	Penconazol
1	0.056 ± 0.006^{a}	0.057 ± 0.002^{a}	0.175 ± 0.025^{a}	0.157 ± 0.015^{a}
3	0.123 ± 0.011^{b}	0.078 ± 0.003^{b}	0.202 ± 0.021^{a}	0.169 ± 0.010^{b}
7	0.162 ± 0.006^{c}	0.117 ± 0.010^{c}	0.226 ± 0.012^{ab}	0.215 ± 0.011^{b}
13	0.184 ± 0.031^{c}	0.119 ± 0.014^{c}	0.254 ± 0.021^{b}	0.273 ± 0.022^{c}
21	0.220 ± 0.028^{c}	0.142 ± 0.006^{c}	0.312 ± 0.023^{c}	0.410 ± 0.045^{d}

Notes: *$n = 9$.
[a,b,c,d]Different letters in the same column mean significant differences ($p < 0.05$).

Table 4. Pyrimethanil residues in grapes from La Rioja (Spain).

	Pyrimethanil (μg kg^{-1}), RSD (%[a])		
Sample	Surface	Skin	Pulp
2006 (7 days)	443 (6.9)	2955 (11.3)	382 (8.6)
2006 (21 days)	4.55 (6.3)	14.7 (13.0)	3.54 (6.5)

Note: [a]RSD, relative standard deviation; $n = 3$.

Conclusions

A simple, rapid, liquid extraction method was developed for the determination of pyrimethanil, dichlofluanid, metalaxyl and penconazol in red grapes. Overall, the methodology involved three procedures for each different part of the berry: surface, skin and pulp. The method gave good recoveries, linearity, precision and accuracy, and was highly sensitive. An additional GC-MS confirmatory method was proposed for treated grapes samples.

The study of fungicides mobility in the laboratory showed that percentage absorption did not depend on the initial spiked concentration and the percentage increased with increasing contact time. Pyrimethanil, metalaxyl and dichlofluanid showed a first-order kinetics for the absorption during time.

The highest concentrations of residues were found in the skin. Penetration into the pulp was

observed for all fungicides. The ratios between pulp and skin residues (Q) did not depend on the initial spiked concentration. Penconazol had a higher penetration than the other compounds.

Grapes treated with pyrimethanil and collected after 7 days had higher amounts of residues than those harvested when respecting the safety period. Pyrimethanil residues in field samples was affected by chemical characteristics of the product as well as by other factors, such as environmental factors.

Residues were found mainly in the skin. Samples treated in the field had a similar penetration of pyrimethanil in the pulp compared with samples spiked in the laboratory. Assays performed in the laboratory with grapes are suitable for the simulation of fungicide absorption and distribution. For grapes collected in the safety period, the levels found for fungicide residues were below maximum residues levels.

Acknowledgements

The authors thank the Government of La Rioja (Spain) for the FPI scholarship granted to Luis Vaquero-Fernández and the Project No. ANGI 2004/18; the INIA for the infrastructure provided (Project No. VIN00-054-C2-01); the MEC/FEDER for the AGL2005-02313/ALI project; the University of La Rioja for its support; and Bodegas D. Mateos S.L. and Luis Carlos Mateo (Market Developer of BASF Española, S.A.).

References

Angioni A, Garau A, Caboni P, Russo MT, Farris GA, Zara S, Cabras P. 2005. Gas chromatographic ion trap mass spectrometry determination of zoxamide residues in grape, grape processing, and in the fermentation process. J Chromatogr A. 1097:165–170.

Cabras P, Angioni A, Caboni P, Garau VL, Melis M, Pirisi FM, Cavitas F. 2000a. Distribution of folpet on the grape surface after treatment. J Agr Food Chem. 48: 915–916.

Cabras P, Angioni A, Garau VL. 2000b. Fate of quinoxyfen residues in grapes, wine, and their processing products. J Agr Food Chem. 48:6128–6131.

Cuinier C. 1996. Influence eventuelle des produits phytopharmaceutiques sur les fermentations et la qualite des vins. Revue Francaise d'œnologie. 159:41–43.

De Melo Abreu S, Caboni P, Cabras P, Garau VL, Alvés A. 2006. Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine. Anal Chim Acta. 573–574:291–297.

Fernández M, Picó Y, Mañes J. 2002. Analytical methods for pesticide residue determination in bee products. J Food Protect. 65:1502–1511.

Fernández MJ, Oliva J, Barba A, Cámara MA. 2005. Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration sep. J Agric Food Chem. 53:804–811.

Fernández Gonzalez J, Rial Otero R, Cancho Grande B, Simal Gándara J. 2003. Determination of fungicide residues in white grapes for winemaking by gas chromatography with mass spectrometric detection and assessment of matrix effects. J AOAC Int. 86: 1008–1014.

Likas DT, Tsiropulos NG, Miliadis GE. 2007. Rapid gas chromatographic method for the determination of famoxadone, trifloxystrobin and fenhexamid residues in tomato, grape and wine samples. J Chromatogr A. 1150: 208–214.

Melo LFC, Collins CH, Jardim ICSF. 2004. New materials for solid-phase extraction and multiclass high-performance liquid chromatographic analysis of pesticides in grapes. J Chromatogr A. 1032:51–58.

Miller JN, Millar JC. (2002). Estadisitica y quimiometría para Química Analítica, 4th Ed. Madrid (Spain): Prentice-Hall. Chapter 5, Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación; p. 115–118.

Navarro S, Barba A, Navarro G, Vela N, Oliva J. 2000. Multiresidue method for the rapid determination – in grape, must and wine – of fungicides frequently used on vineyards. J Chromatogr A. 882:221–229.

Navarro S, Barba A, Oliva J, Pardo F. 2005. Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. J Agric Food Chem. 53: 804–811.

Nozal M[a]J, Bernal JL, Jiménez JJ, Martín M[a]T, Bernal J. 2005. Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. J Chromatogr A. 1076:90–96.

Pérez-Clavijo M, Plaza Medina M, Sanz Asensio J, Galbán Bernal J. 1996. Decay study of pesticide residues in apple samples. J Chromatogr A. 740:146–150.

Rial Otero R, Cancho Grande B, Simal Gándara J. 2003. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid–liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. J Chromatogr A. 992:122–131.

Sala C, Busto O, Guash J. 1997. Quick gas chromatographic method for determining common pesticides in musts and wines. Chromatographia. 44:320–324.

SANCO. 2007. Document No. SANCO/3131/2007, 31 October 2007. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. National Food Administration, Uppsala, Sweden.

Sanz-Asensio J, Martínez-Prado AP, Plaza-Medina M, Martínez-Soria MT, Pérez-Clavijo M. 1999. Behaviour of acephate and its metabolite methamidophos in apple samples. Chromatographia. 49:155–160.

Sherma J. 1999. Pesticide residue analysis: 1997–1998. J AOAC Int. 82:561–574.

Stavropoulos P, Athanasopoulos PE, Kyriakidis NB. 2001. Degradation of pyrazophos and methidathion in fortified red and white wine under conditions of light and darkness. Food Chem. 72:473–477.

Tadeo JL, Sánchez-Brunete C, Albero B, González BL. 2004. Analysis of pesticide residues in juice and beverages. Crit Rev Anal Chem. 3:165–175.

Teixeira MJ, Aguiar A, Afonso CMM, Alves A, Bastos MMSM. 2004. Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology. Anal Chim Acta. 513:333–340.

Vaquero-Fernández L, Sáenz-Hernáez A, Sanz-Asensio J, Fernández-Zurbano P, Sainz-Ramírez M, Pons-Jubera B, López-Alonso M, Epifanio-Fernández SI, Martínez-Soria MT. 2008. Determination of cyprodinil and fludioxonil in the fermentative process of must by high-performance liquid chromatography-diode array detection. J Sci Food Agric. 88: 1943–1948.

Zhu X, Qi X, Wang J, Yue J, Sun Z, Lei W. 2007. Determination of procymidone, pentachloroaniline and methil-pentachloro-phenylsulfide residues in wine by MSPD-GC-ECD. Chromatographia. 65:625–628.

Analytical Letters, 42: 1761–1783, 2009
Copyright © Taylor & Francis Group, LLC
ISSN: 0003-2719 print/1532-236X online
DOI: 10.1080/00032710903060644

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

CHROMATOGRAPHY

Analysis of Pyrimethanil, Metalaxyl, Dichlofluanid, and Penconazol in Must and Wine from Red Grapes by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography

Luis Vaquero-Fernández,[1] Jesús Sanz-Asensio,[1] Miguel López-Alonso,[2] and María-Teresa Martínez-Soria[1]
[1]Department of Chemistry, University of La Rioja, Logroño, Spain
[2]Department of Agriculture and Food, University of La Rioja, Logroño, Spain

Abstract: This article describes a method for the simultaneous analysis of four fungicides—pyrimethanil, penconazol, metalaxyl, and dichlofluanid—in must and wine by solid-phase extraction. Two cartridges (octadecylsilane and polystyrene-divinylbenzene) were evaluated with different elution solvents. The most efficient solid phase was octadecylsilane together with ethyl acetate as elution solvent. Determination was performed by gas chromatography with a nitrogen–phosphorus detector, using metribuzin as internal quantification standard. To reduce quantitative errors from matrix effects, matrix-matched calibration was used. The linear

Received 22 October 2008; accepted 30 April 2009.
The authors thank the government of La Rioja for the FPI grant given to Luis-Vaquero-Fernández and the project ANGI 2004/18, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), Ministerio de Educación y Ciencia/Fondo Europeo de Desarrollo Regional (MEC/FEDER) for the project AGL2005-02313/ALI, Agencia de Desarrollo Economico de La Rioja (ADER) for the project 2006-I-ID-00159, and the University of La Rioja.
Address correspondence to María-Teresa Martínez-Soria, Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios 51, 26006, Logroño, Spain. E-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es

regression coefficients were at least 0.9990. The quality parameters of the proposed method presented good recoveries from spiked must and wine, ranging from 92.3 to 105.5%, and good precision, indicated by relative standard deviations (RSDs) of less than 10%. The limits of quantification varied from 0.27 μg L^{-1} for penconazol in wine to 9.34 μg L^{-1} for metalaxyl in wine. An additional confirmation method, gas chromatography with mass spectrometry detection, was used.

Keywords: Fungicides, GC, must, SPE, wine

INTRODUCTION

The most important fungi targeted by vineyard protection measures are grey mold (*Botrytis cinerea*), powdery mildew (*Uncinula necator*), and downy mildew (*Plasmopara viticola*). Chemical control for the prevention of diseases caused by these fungi is based on the use of different fungicides. The use of these fungicidal treatments may entail the risk of the appearance of residues in viniferous grapes that may pass to the must and eventually to the wine during fermentation (Cabras et al. 1997; Fernández González et al. 2003; Nozal et al. 2005), affecting not just the fermentative process but also the final quality of the product (Cuinier 1996; Oliva et al. 1999) and thus enter the food chain (Oliva et al. 1999; Stavropoulos, Athanasopoulos, and Kyriakidis 2001).

The analytical methods applied to the determinations of fungicides in oenological samples (grapes, musts, and wines) involved an initial sample treatment process with an extraction of the target compounds from the matrix. Subsequently, a purification of the extracts was usually performed. For the determination, different techniques are normally used, preferably chromatographic techniques (Sherma 1999). Gas chromatography (GC) with different selective detectors such as nitrogen–phosphorous (NPD), electron capture (ECD), or mass spectrometric (MS) detection have been widely used (Fernández González et al. 2003; Tadeo et al. 2004; Jiménez et al. 2001). High-performance liquid chromatography (HPLC) is the best choice when the compounds are not volatile or thermally unstable. Ultraviolet (UV), diode array, and mass spectrometric (MS) detectors are the most used and show good results (Fernández González et al. 2003; Nozal et al. 2005; Melo, Collins, and Jardim 2004).

In GC analysis, some analytes can give peaks showing a poor response or poor peak shapes that are difficult to integrate. These problems may stem from partial degradation of the analyte at the high temperature of the injection port or by a low transference to the chromatographic column due to its retention in the active sites of the injector. Nevertheless, the sample components may compete for the active sites in the glass liner, decreasing the

interaction between the active sites and the analyte and thus allowing a larger amount of analyte to be transferred to the chromatographic column. This fact, known as the "matrix-induced chromatographic response enhancement effect," was described by Erney et al. in 1993. Matrix-induced effects have often been reported in pesticide residue analysis and depend on the chromatographic system, the type and chemical structure of the substrate, and the physicochemical properties of each chemical compound and may be difficult or impossible to eliminate (Schenck and Lehotay 2000). This phenomenon is observed during the analysis of real samples containing certain matrix components and has been reported in various residue studies for different matrices (Jiménez et al. 2001; Erney, Pawlowski, and Poole 1997; Hajslova Kholadová et al. 1998; Jiménez et al. 1998).

In 1994, Hollan, McNaughton, and Malcolm found recoveries ranging from 120 to 300% for several pesticides in white wine. They resolved this problem by using standards in control extract and obtained a majority of recoveries in the 70–110% range. Many related studies in different fields of pesticide analyses avoid the matrix effects in the calibration step and instead prepare the calibration solutions in extracts from blank samples (matrix-matched calibration) (Jiménez et al. 2001; Erney et al. 1993; Erney, Pawlowski, and Poole 1997; Hajslova Kholadová et al. 1998).

A number of studies on the determination of certain pesticides in grapes, must, and wine at residual levels have been published (Rial Otero et al. 2002; Rial Otero, Cancho Grande, and Simal Gándara 2003). The method commonly used is liquid–liquid extraction (LLE), as a prior isolation step, with solvents such as acetonitrile, hexane, dichloromethane, and ethyl acetate or solvent mixtures such as dichloromethane/acetone (Cabras et al. 1997; Rial Otero et al. 2002; Rial Otero, Cancho Grande, and Simal Gándara 2003; Cabras et al. 2001). At present, solid-phase extraction (SPE) (Oliva et al. 1999; Vigna et al. 2006) and solid-phase microextraction (SPME) (Rial Otero et al. 2002; Arthur and Pawliszyn 1990) are becoming increasingly important in the analysis of fungicides.

Solid-phase extraction is a simple sample-preparation technique that can be used to clean up extracts, as well as for extracting/concentrating. The choice of the solid-phase method depends on the polarity of the pesticides and the type of matrix to be analyzed. As a result, it has recently gained acceptance in the analysis of residues in wines, mainly with octadecylsilane as a stationary phase (Melo, Collins, and Jardim 2004; Wong and Halverson 1999; Young et al. 2001).

Other phases used with good results for analyzing pesticides are polymeric resins such as polystyrene-divinylbenzene, polydivylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone, poly(methyloctadecylsiloxane), and aminopropyl-terminated poly(dimethylsiloxane) (Nozal et al. 2005; Jiménez et al. 2001; Melo, Collins, and Jardim 2004; Wong et al. 2003; Vigna et al. 2006). The

SPE procedures have also been coupled with GC for the analysis of pesticide residues in wine.

In the mentioned literature, analytical methods were developed for the determination of residues in wine, and maximum residue limits (MRLs) were set for wine-making grapes. Currently, there is no regulation in the European Union (EU) or in Spain about MRLs for fungicides in wine.

Pesticide residues initially appear in must obtained from harvested grapes, and its matrix composition is similar to the grapes. In wine, which is fermented must, some chemical changes occur and lead to a production of ethanol and other by-products, with an extraction of many compounds from red grape skin. Thus, matrix is drastically altered. In this study, a SPE-GC-NPD method was developed for determining residues of four commonly used fungicides in the wine-producing region of La Rioja: dichlofluanid, metalaxyl, penconazol, and pyrimethanil. Residues were determined both in must and wine, and the influence of changes in sample matrix was studied. The work proved that recoveries did not depend significantly on the matrix. Therefore, the method can be used at any moment of the vinification process.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

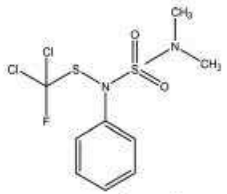
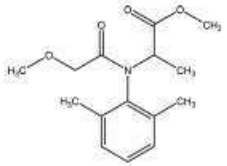
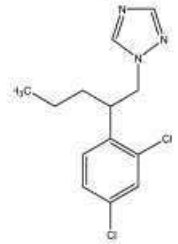
Pesticide analytical standards of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid, and penconazol were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Standards were certified and as least at >99% pure (pestanal grade). Table 1 shows the chemical characteristics of the studied compounds. Metribuzin (a herbicide not used for vineyards) from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) with a purity of 99.8% was used as internal standard (IS). All were stored at −20°C. The HPLC-grade methanol, ethanol, ethyl acetate, acetone, methyl isobutyl ketone, chloroform, and n-hexane were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain).

Ultrapure water was obtained in a Milli-RO plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

For solid-phase extraction, octadecylsilane (200 mg; LiChrolut RP-18) and polystyrene-divinylbenzene (200 mg; LiChrolut EN) cartridges were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). A Visiprep SPE vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA) was used to simultaneously process 12 tubes. The system was equipped with a pressure controller (20 mm Hg) to force the sample through the cartridges.

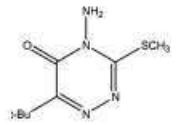
Inoculated yeast VRB *Saccharomyces cerevisiae* was purchased from Lallemand (Australia). The yeast was select for Qualified Designation of

Table 1. Chemical characteristics of the compounds studied

Family name	Common name	Chemical structure	K_{ow}^{a}	ADI[a] (mg kg^{-1} b.w. daily)	Oral LD[a] (rats; mg kg^{-1})
Phenylsulfamide fungicides	Dichlofluanid		3.7	0.0125	>5000
Acylamino acid and anilide fungicides	Metalaxyl		1.75	0.03	633
Triazoles fungicides	Penconazol		3.72	0.03	2125

(*Continued*)

Table 1. Continued

Family name	Common name	Chemical structure	K_{ow}^{a}	ADI[a] (mg kg^{-1} b.w. daily)	Oral LD[a] (rats; mg kg^{-1})
Pyrimidin fungicides	Pyrimethanil		2.84	0.17–0.20	>5000
Triazine herbicide	Metribuzin		1.6	0.013	2000

[a]From British Crop Protection Council 2000.

Origin Rioja in the "Centro de Investigación y Desarrollo Agrario" (CIDA) in Logroño (Spain) with the acronym VRB "Vino Rioja Blanco" (Wine Rioja White).

Standard Solutions

A stock standard solution (ca. 1000 mg L^{-1}) of each fungicide was prepared in methanol by weighing approximately 0.025 g of the analyte into a 25-ml volumetric flask and diluting to volume. An intermediary mixed standard solution was prepared by dilution in methanol of the stock standard solution to give a concentration of 100 mg L^{-1} for each compound. Stock and intermediary standard solutions of the IS, metribuzin, were prepared in the same way. All standard solutions were stored at −20°C. Working standard solutions for further studies were prepared by spiking different volumes of the intermediary standard solution in must and wine.

Must and Wine Preparation

The must solutions were obtained by pressing the grapes harvested in vineyards in the "Qualified Designation of Origin Rioja" wine-producing region, which had not been treated with any fungicide for at least 10 years. The analysis of the must obtained had a sugar content of 220 g L^{-1} and a pH of 3.35. The wine solutions were obtained by laboratory fermentation of the must after inoculation of cultured yeasts (0.3 g L^{-1}). The evolution of the fermentative process was controlled at all times. The alcohol grade obtained was 12.8% (v/v), together with a pH of 3.50.

Solid-Phase Extraction Procedure

The method was developed in three steps. The first step consisted of conditioning the phase by eluting first with 5 mL methanol and then 3 mL ultrapure water. The extraction procedure, the second step, was studied on 5-mL samples of must and wine spiked with 600 µg L^{-1} of each fungicide. The third step is the elution. The extract retained in the solid phase was eluted by 1 ml to 5 mL of organic solvent. All the assays were performed in duplicate. Quantification was performed using metribuzin as internal standard at a concentration of 1 mg L^{-1}.

With the best conditions found for each type of solid phase, a method was proposed that was validated and characterized for must and wine samples.

Instrumentation and Chromatographic Conditions

An Agilent Technologies (Santa Clara, USA) GC 6890 N equipped with an NPD system, an autosampler 7683, and a split-splitless injector connected to a HP ChemStation (Hewlett-Packard) was used to determine the fungicides dichlofluanid, metalaxyl, penconazol, and pyrimethanil. The capillary column was a HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d. with 0.25 µm of crosslinked 5% phenylmethyl siloxane). Separation conditions were previously optimized (Vaquero-Fernández et al. 2009). Injector and detector temperatures were 200°C and 325°C, respectively. Oven temperature was programmed as follows: 80°C for 0.9 min, raised to 225°C (70°C min^{-1}) for 5 min, to 275°C (70°C min^{-1}) for 3 min. Helium was the carrier and make-up gas at 1.5 mL min^{-1} and 3 mL min^{-1}, respectively. Flow ratios for the NPD detector were 3 mL min^{-1} for hydrogen and 70 mL min^{-1} for air. Injection was performed in splitless mode with a purge time of 0.9 min. Injection volume was 2 µL.

The confirmation of the studied compounds was carried out on an Agilent 7890A GC with MS 5975C detector system. Column, carrier flow, and oven temperature program were the conditions mentioned previously for the GC-NPD system. The volume of sample was 1 µL, injected in splitless mode with splitless time of 1 min. The mass spectrometer was operated in electron impact (70 eV of ion energy) with 3.50 min solvent delay, the interface temperature was kept at 285°C, the ion source temperature was kept at 230°C, and the dwell time was 100 ms per ion. Selected monitoring ion (SIM) mode was used (198, 199, and 200 m/z for pyrimethanil; 103, 144, and 198 m/z for metribuzin; 132, 160, and 206 m/z for metalaxyl; 123, 167, and 224 m/z for dichlofluanid; and 159 and 248 m/z for penconazol).

Chromatograms from extracts of unspiked and spiked must and wine samples are shown in Figs. 1 and 2; as can be seen, there was no interference in the extracts of must and wine obtained from red grapes. The proposed conditions generated narrow and reproducible chromatographic peaks. In Fig. 3, the GC-MS chromatogram is reported, which allows the confirmation of the fungicides with good resolution and did not show interfering peaks.

Method Validation

Method validation was carried out to determine detection and quantification limits, linearity, precision, and accuracy.

The analytical curves were obtained using seven different concentrations (0.01 to 10.00 mg L^{-1}) for each analyte, with three replicates each.

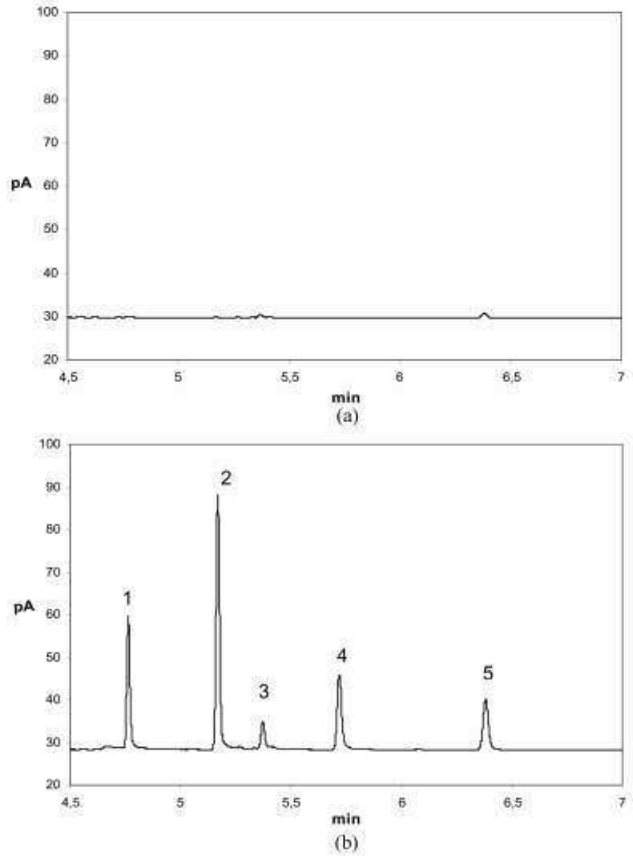


Figure 1. GC-NPD chromatograms obtained after SPE-RP18 of (a) extract from unspiked must; (b) extract from spiked must (600 μg mL^{-1}). Peak identification: 1, pyrimethanil; 2, metribuzin (IS); 3, metalaxyl; 4, dichlofluanid; and 5, penconazol.

Linearity was estimated by linear regression analysis using the least square regression method.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) parameters were determined by injecting a number of extracts of unspiked must and wine samples (n = 6) and measuring the magnitude

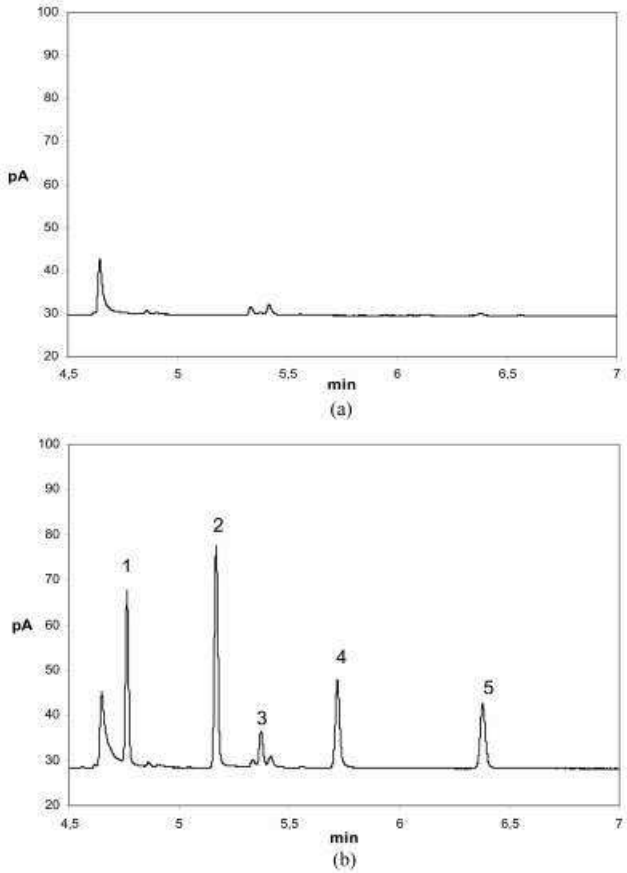


Figure 2. GC-NPD chromatograms obtained after SPE-RP18 of (a) extract from unspiked wine; (b) extract from spiked wine (600 μg mL^{-1}). Peak identification: 1, pyrimethanil; 2, metribuzin (IS); 3, metalaxyl; 4, dichlofluanid; and 5, penconazol.

of the background analytical response. The LOD and LOQ were estimated as the concentrations obtained with the average noise value and were 3 or 10 times the standard deviation, respectively (Nozal et al. 2005; Miller and Miller 2002). For GC-MS, the limits of detection and quantification were determined as the analyte concentration that gave

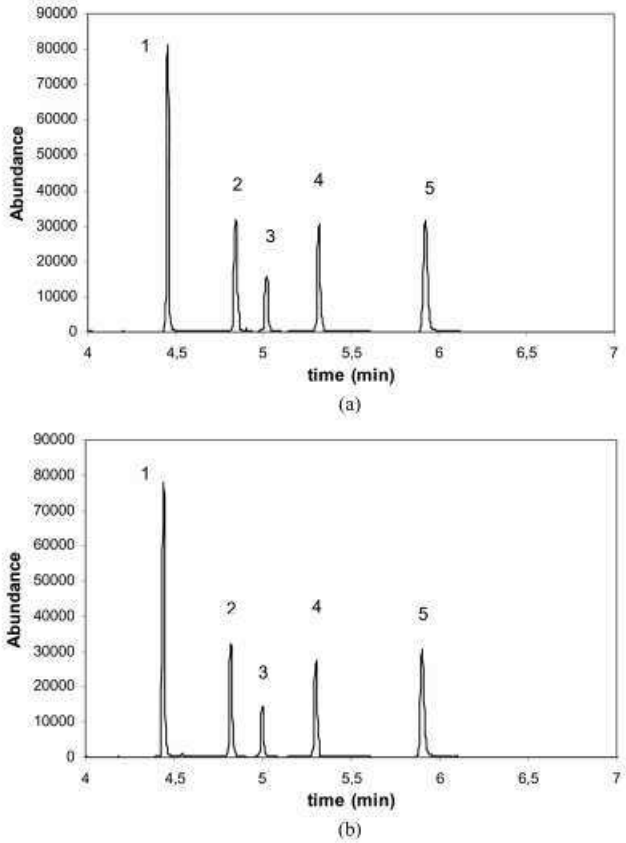


Figure 3. GC-MS chromatograms obtained after SPE-RP18 of (a) extract from spiked must (600 μg mL^{-1}); (b) extract from spiked wine (600 μg mL^{-1}). Peak identification: 1, pyrimethanil; 2, metribuzin (IS); 3, metalaxyl; 4, dichlofluanid; and 5, penconazol.

an S/N value of 3 or 10, respectively. Confirmation was based on the presence of the selected ions with relative abundances of the respective abundances in the standard (European Commission 2007; Dass 2007).

Accuracy was determined as the percentage recovery at three different fortification levels. Precision was evaluated in terms of repeatability using three different fortification levels.

RESULTS AND DISCUSSION

Method Optimization

Different parameters were studied to develop the SPE method to determine pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid, and penconazol in must and wine samples. These included the following: eluent selection, elution volume, composition and volume of the solid-phase wash, and breakthrought volume. The study was performed in the same way for both the octadecylsilane phase (RP-18) and the polymeric polyestyrene-divinylbenzene phase (EN).

Eluent and Elution Volume

The elution solvent, as well as the type of solid phase, are essential in the SPE method and depend on the chemical nature of the analytes studied. Six organic solvents with different polarities were evaluated to select the most appropriate solvent for the method: n-hexane, chloroform, ethyl acetate, methyl isobutyl ketone (MIBK), acetone, and methanol. Samples of must (5 mL) fortified at a level of 600 μg L^{-1} for each fungicide were analyzed in duplicate with each solvent. Elution was performed with a total volume of 5 mL, and the recovery obtained for each fungicide for every 1 mL of eluent added was studied. Table 2 shows the recoveries obtained for both types of phases studied.

The lowest recoveries were obtained with n-hexane in both phases. For the other solvents, the recoveries ranged from 59.7% when using chloroform as solvent and EN cartridges to 346.4% with MIBK also in EN cartridges. With MIBK, the recoveries obtained were much greater than 100% in all cases. The same occurred with methanol using EN cartridges. Ethyl acetate and acetone were selected to continue the method optimization study. To guarantee complete elution, two elution steps with 2 mL of organic solvent were used. Therefore, the elution solvent volume selected was 4 mL (2 mL + 2 mL).

The matrix effect observed for dichlofluanid and penconazol may be eliminated considering a solid-phase wash step before the elution with the solvents. This effect will be evaluated in the following section.

Cartridge Washing after Sample Elution

The cartridges were washed with different relations of water/methanol to check the influences of this step. For this study, two different matrix samples were evaluated: must and wine. This allowed us to observe the influence of the presence of alcohol in the matrix and in the wash mixture

Table 2. Extraction efficiency percentages for fungicides in must with different solvents

		Solvent					
Fungicide	Recovery from 1 to 5 mL and total	n-Hexane	Methanol	Ethyl acetate	Chloroform	Acetone	M1BK
RP-18 cartridges							
Pyrimethanil	R1	0.0	84.2	98.8	69.9	88.0	82.4
	R2	22.4	2.8	2.8	12.9	6.2	10.2
	R3	2.1	2.6	1.23	3.1	7.5	6.6
	R4	0.0	2.8	10.4	1.2	1.2	5.6
	R5	0.0	8.6	0.6	1.2	7.6	18.9
	Total	24.5	101.0	113.8	88.2	110.5	123.7
Metalaxyl	R1	0.0	99.3	102.5	80.4	82.6	97.2
	R2	19.2	2.0	5.3	11.6	7.8	21.9
	R3	4.4	4.3	0.0	0.0	22.0	15.9
	R4	0.0	3.9	15.4	0.0	1.7	17.0
	R5	0.0	11.4	0.0	0.0	5.8	26.9
	Total	23.7	120.9	123.2	92.0	119.9	179.0
Dichlofluanid	R1	5.3	125.5	137.4	97.2	132.4	181.9
	R2	70.1	3.3	2.7	8.3	6.9	22.5
	R3	35.4	2.6	1.5	24.0	3.1	17.2
	R4	16.7	9.4	10.1	0.9	0.6	17.1
	R5	0.0	8.0	0.9	1.5	2.8	14.9
	Total	127.4	148.9	152.6	132.0	145.9	253.5
Penconazol	R1	0.0	128.2	111.4	84.6	74.3	107.2
	R2	11.1	3.2	3.7	75.9	10.9	11.8
	R3	0.0	2.7	1.1	0.0	43.8	4.2
	R4	0.0	2.6	21.4	0.0	1.8	2.8
	R5	0.0	16.2	0.0	0.0	6.3	4.2
	Total	11.1	152.8	137.6	160.5	137.1	130.2
EN cartridges							
Pyrimethanil	R1	0.9	7.0	62.9	12.5	50.4	82.7
	R2	0.0	7.8	20.7	14.9	26.9	23.9
	R3	0.0	11.6	6.9	13.3	7.1	12.3
	R4	0.0	86.8	2.8	10.1	6.7	8.5
	R5	0.0	11.5	2.3	8.9	1.3	6.7
	Total	0.9	124.7	95.6	59.7	92.4	134.2
Metalaxyl	R1	5.7	33.3	81.1	44.4	85.5	99.3
	R2	0.0	22.7	19.9	20.6	16.8	21.9
	R3	0.0	19.7	9.7	12.7	2.9	18.1

(*Continued*)

Table 2. Continued

Fungicide	Recovery from 1 to 5 mL and total	Solvent n-Hexane	Methanol	Ethyl acetate	Chloroform	Acetone	MIBK
	R4	0.0	107.3	4.8	5.5	4.8	16.7
	R5	0.0	7.4	3.0	8.1	0.0	10.4
	Total	5.7	190.4	118.5	91.3	110.0	166.4
Dichlofluanid	R1	1.4	89.9	99.3	40.5	89.3	179.3
	R2	0.9	20.0	18.5	29.9	23.6	74.4
	R3	1.7	20.2	4.6	18.8	1.4	37.0
	R4	2.1	135.0	1.7	11.3	3.3	28.4
	R5	28.8	13.4	0.9	10.7	2.1	27.4
	Total	6.1	278.5	125.0	111.3	119.7	346.4
Penconazol	R1	0.0	28.2	84.6	29.8	75.0	91.9
	R2	12.5	18.6	17.3	20.8	22.2	19.8
	R3	0.0	15.5	5.1	13.4	6.4	8.4
	R4	0.0	133.8	2.2	5.1	3.7	3.2
	R5	0.0	8.7	0.0	4.0	2.1	0.0
	Total	12.5	204.7	109.2	73.1	109.4	123.2

on extraction efficiency. The washing solvent was formed by different combinations of water/methanol (10/0, 9/1, 7/3, 5/5, 3/7, 0/10).

By increasing the proportion of methanol in the wash solvent, a reduction in the extraction recoveries of the fungicides for both eluents was observed—ethyl acetate and acetone—and using the RP-18 phase. When the EN stationary phase was used, the effect of the presence of methanol on the wash mixture was less marked, and only when the ratio had a greater methanol content (more than 3/7) did extraction recovery diminish. The loss of compounds was due to their greater solubility in methanol (Tomlin 1997). Water/methanol ratios of 9/1 and 7/3 were selected for stationary phases RP-18 and EN, respectively, because they displayed smaller differences in recoveries between the must and wine matrices.

This difference between must and wine was greater when the eluent was acetone, especially with the EN phase. Ethyl acetate was selected as eluent, and the study of different washing volumes with both sorbents was continued.

The water/methanol washing solvents studied were 1, 2, and 5 mL. In the RP-18 phase, recoveries were more than 95.8% and similar in must and wine matrices for all the compounds with 2 mL of water/methanol

(9/1). Greater differences were observed between the two matrices using 1 and 5 mL in metalaxyl, dichlofluanid, and penconazol. In the EN phase, the greatest recoveries were obtained with 5 mL of wash. However, the effects due to the matrix in methalaxyl and penconazol were very high. The RP-18 provided better extraction results and with smaller differences between the two matrices than the EN phase. The RP-18 phase was selected as the best option for the performance of the SPE method.

Breakthrough Volume

An assay to determine breakthrough volume was performed according to the procedure described by Hennio (2000) and Dopico-García, López-Vilariño, and González-Rodríguez (2005). This consisted in gradually increasing the volume of sample that passed through the cartridge so that the concentrations of solvents must be such that the amount to be retained in the stationary phase of the cartridge was always the same.

The assay was performed for samples spiked with 1 μg of each fungicide. Because of the different sample compositions, must and wine, the study was performed with both matrices. Sample volumes of spiked must and wine were modified to determine the breakthrough volume of each compound. The sample volume ranged from 1 to 50 mL. Table 3 shows the results obtained for RP-18 cartridges for both the must matrix and the wine matrix. The recoveries obtained for the assays between 1 and 10 mL can be considered constant for all fungicides except for pyrimethanil, whose recovery was constant until 50 mL in both must and wine. In the case of the other compounds, the recoveries started to diminish from this volume, sometimes very slowly. This occurred, for example, with penconazol and dichlofluanid in wine samples. According to this, 5 mL can be fixed as a suitable simple volume for SPE by RP-18 for all considered fungicides, because breakthrough does not occur at this value.

Calibration and Linearity

Different methods may be used to estimate the linearity of the calibration curve and reduce the quantitative errors from the matrix effects (Miller and Miller 2002; Sanz-Asensio et al. 1999). In this study, a matrix-matched calibration was used.

Must and wine samples obtained from untreated grapes were subjected to the same treatment as the samples. The blank extracts were spiked with variable amounts of fungicides. Calibration curves for the fungicides were prepared by plotting the area relative to that of the

Table 3. Assay for breakthrough volume

Sample volume (mL)	Pyrimethanil		Metalaxyl		Dichlofluanid		Penconazol	
	Must	Wine	Must	Wine	Must	Wine	Must	Wine
1	104.5 (0.5)	103.4 (1.2)	104.2 (3.0)	96.6 (8.5)	105.8 (3.2)	99.9 (1.3)	106.0 (6.1)	101.7 (11.0)
2	99.1 (2.9)	102.2 (2.3)	97.7 (1.6)	94.3 (4.8)	97.7 (2.3)	95.1 (3.1)	95.7 (3.6)	98.0 (8.8)
5	98.4 (2.2)	96.7 (3.5)	105.8 (1.9)	105.2 (2.2)	93.4 (0.9)	95.2 (3.1)	96.9 (1.8)	99.3 (7.8)
10	107.5 (0.8)	105.9 (1.6)	105.8 (2.3)	102.3 (4.7)	103.3 (1.6)	100.2 (1.3)	103.6 (5.7)	101.3 (6.9)
25	94.3 (0.8)	93.0 (1.2)	95.7 (6.6)	98.5 (9.2)	87.9 (2.5)	88.3 (1.4)	95.4 (7.0)	90.1 (7.1)
50	98.2 (0.2)	99.0 (3.2)	88.5 (1.7)	65.3 (2.3)	78.3 (2.5)	88.9 (1.2)	83.5 (9.2)	86.2 (1.9)

Notes. Recoveries obtained in SPE-RP18 by increasing sample volume of must and wine (spiked with 1 µg of each fungicide). RSD in brackets calculated from three measurements.

internal standard (metribuzin) vs. the analyte concentration using a total of seven spiked uncontaminated samples. Excellent linearity was obtained for all fungicides as ranged by seven-point calibration curves and for the entire studied range with correlation coefficients better than 0.9993. Table 4 summarizes the statistical parameters obtained with linear regression and repeatabilities of peak relative area for each pesticide in the must and real wine samples.

Table 5 shows the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for each matrix analyzed and compared with the MRLs established by Spanish Legislation (Legislación Española 1994), the European Union (Council regulation 2005), and the U.S. Environmental Protection Agency (EPA 2007). Note that these MRL values refer to fruits and not to derivate products (wine or juice). The LODs and LOQs were comparable with those obtained using similar techniques (e.g., SPE-GC; see Jiménez et al. 2001; Wong and Halverson 1999; Wong et al. 2003). They were less than others obtained by methodologies such as LLE-GC (Oliva et al. 1999) or SPE-HPLC (Rial Otero, Cancho Grande, and Simal Gándara 2003). A matrix-matched calibration in solvent was also carried out for GC-MS method. In the range from 0.01 to 10.00 mg L^{-1} in must and wine extracts, and in ethyl acetate, an excellent linearity was obtained (correlation coefficients >0.9995). The GC-MS confirmation method showed LODs between 0.02 and 1.07 µg L^{-1} and LOQs between 0.05 and 3.58 µg L^{-1} in must and wine for all compounds.

Precision, Recovery, and Accuracy

To test the performance of an analytical method, several criteria have to be considered: the pesticide recoveries should be in the range 70–110% with RSD < 15% (Vaquero-Fernández et al. 2009; Menkissoglu-Spiroudi and Fotopoulou 2004); the developed analytical method presented recoveries and precisions (repeatability) within the acceptable range. Repeatability expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time.

Samples of must and wine fortified with three concentration levels for each pesticide (0.1, 1.0, and 5.0 mg L^{-1}) were performed. Three determinations were made on the same spiked must and wine sample. Table 6 shows the average recoveries achieved with the proposed method. The recovery obtained for all pesticides was >90%, and RSDs were less than 10% (between 0.5 and 9.2%).

Recovery and accuracy were determined on spiked must and wine samples at the three previously mentioned concentration levels. The mean recoveries ranged from 90.1% to 106.6%. An analysis of variance

Table 4. Statistical linearity parameters: linearity, correlation coefficient, and RSD obtained with the proposed method and calibration curves for samples (must and wine) and ethyl acetate

	Ethyl acetate				Must				Wine			
Compound	Slope	Intercept	Correlation coefficient r^2	RSD[a] (%)	Slope	Intercept	Correlation coefficient r^2	RSD[a] (%)	Slope	Intercept	Correlation coefficient r^2	RSD[a] (%)
Pyrimethanil	1.571 ± 0.009	−0.026 ± 0.040	0.9999	3.60 (100.0)	1.566 ± 0.008	−0.046 ± 0.037	0.9999	2.34 (100.0)	1.542 ± 0.013	−0.006 ± 0.060	0.9997	1.84 (100.0)
Metalaxyl	0.415 ± 0.001	0.016 ± 0.006	0.9999	8.06 (99.8)	0.417 ± 0.001	0.011 ± 0.006	0.9999	4.48 (99.8)	0.429 ± 0.008	0.028 ± 0.035	0.9999	3.88 (99.8)
Dichlofluanide	1.181 ± 0.001	0.004 ± 0.007	0.9999	3.30 (100.0)	1.180 ± 0.002	−0.013 ± 0.007	0.9999	2.29 (100.0)	1.165 ± 0.016	0.002 ± 0.074	0.9993	2.04 (100.0)
Penconazol	1.144 ± 0.009	−0.049 ± 0.047	0.9997	5.65 (114.4)	1.125 ± 0.006	−0.040 ± 0.034	0.9999	2.76 (114.4)	1.118 ± 0.012	−0.013 ± 0.065	0.9995	5.63 (114.4)

[a]Calculated from four measurements. Concentration ($\mu g\ L^{-1}$) in brackets.

Table 5. LOD and LOQ values (μg L^{-1}) and MRL values in grapes (μg g^{-1}) from several agencies

	Must		Wine		MRL (Spanish	MRL (European	MRL
Compound	LOD	LOQ	LOD	LOQ	legislation)	Union)	(U.S. EPA)
Pyrimethanil	0.08	1.07	0.09	1.15	5	5	5
Metalaxyl	7.40	9.02	7.66	9.34	1	1	2
Dichlofluanid	2.65	3.85	2.74	3.99	10	10	n.d.
Penconazol	0.11	0.28	0.11	0.27	0.2	0.2	n.d.

Note. n.d.: not defined.

performed with the raw data revealed the absence of significant differences ($P > 0.05$) between the assayed levels of spiking and between the two types of sample or matrix, must and wine.

Assessment of Matrix Effects

In view of the change in composition of the samples during alcoholic fermentation (in the transformation of grape must into wine), the possible matrix effect in the sample-treatment process must be studied. Therefore, the linear response of the method was studied with standard solutions prepared in pure solvent (ethyl acetate) and blank matrices (must and wine). Solutions were prepared with different concentrations of the fungicides, which were analyzed in accordance with the proposed method. The similarity in the calibration curves in all matrices would indicate that there was no matrix effect, either in the extraction of the compounds or in the detector response. A Student's *t*-test was made to compare the slopes of the lines of regression (in must, wine, and ethyl acetate) obtained for each compound studied. The results for this test show that there were no significant differences at the 95% confidence level between the slopes obtained in ethyl acetate, must, and wine for pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid, and penconazol.

CONCLUSIONS

The SPE-GC-NPD method developed here enables rapid determination of the fungicides pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid, and penconazol and is suitable for monitoring the four fungicides in must and wine from red grape samples after a simple extraction of the sample. The method offers good recoveries, linearity, precision, and accuracy and is highly sensitive.

Table 6. Recoveries (n = 9) and precision (repeatability, n = 9) for fungicides in must and wine to three fortification levels: 0.1, 1.0, and 5.0 mg L^{-1}

	Must						Wine					
	Recovery (%)			Repeatability RSD (%)			Recovery (%)			Repeatability RSD (%)		
Compound	0.1 mg L^{-1}	1.0 mg L^{-1}	5.0 mg L^{-1}	0.1 mg L^{-1}	1.0 mg L^{-1}	5.0 mg L^{-1}	0.1 mg L^{-1}	1.0 mg L^{-1}	5.0 mg L^{-1}	0.1 mg L^{-1}	1.0 mg L^{-1}	5.0 mg L^{-1}
Pyrimethanil	100.0	96.6	98.7	2.3	1.3	0.5	99.9	94.6	95.5	2.5	1.9	2.1
Metalaxyl	106.6	105.7	105.0	4.5	2.2	5.4	105. 9	105.9	103.8	4.3	3.1	3.6
Dichlofluanid	93.4	90.1	91.4	2.4	1.3	2.2	95.2	92.2	91.3	2.6	1.6	1.8
Penconazol	98.3	94.2	98.2	9.2	7.4	7.4	98.6	98.4	101.0	8.4	2.2	5.3

The recoveries achieved with RP-18 cartridges were better than those obtained with the polymeric EN phase. The octadecylsilane solid phase was the most appropriate for extracting all the analytes quantitatively.

No cleanup was necessary because chromatograms of must and wine samples from untreated grapes contained no interfering peaks.

There is no matrix effect in the quantification with the method. The different composition of the matrix—must and wine—does not affect the sensitivity of the method, giving similar LOD and LOQ values in both matrices.

The LOQs were much less than the MRLs established by legislation in the main wine-producing countries of the European Union for fungicide residues in viniferous grapes and recommended by other sources.

An additional GC-MS confirmatory method was proposed for must and wine samples.

REFERENCES

Arthur, C. L., and J. Pawliszyn. 1990. Solid phase icroextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62: 2145–2148.

British Crop Protection Council. 2000. *The Pesticide Manual*. Surrey, UK: British Crop Protection Council.

Cabras, P., A. Angioni, V. L. Garau, M. Mellis, F. M. Pirisi, G. A. Farris, E. V. Minelli, F. Cavitas, and M. Cubeddu. 1997. Fate of some new fungicides (Cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2708–2710.

Cabras, P., A. Angioni, V. L. Garau, F. M. Pirisi, F. Cabitza, M. Pala, and G. A. Farris. 2001. Fenhexamid residues in grapes and wine. *Food Addit. Contam.* 18(7): 625–629.

Council regulation (EC) no. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in products of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/ECC. Official Journal of European Union L70 of 16/03/2005, 1–16.

Cuinier, C. 1996. Influence éventuelle des produits phytopharmaceutiques sur les fermentations et la qualité des vins. *Revue Française d'Oenologie* 159: 41–43.

Dass, C. 2007. In *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

Dopico-García, M. S., J. M. López-Vilariño, and M. V. González-Rodríguez. 2005. Determination of antioxidants by solid-phase extraction method in aqueous food simulants. *Talanta* 66: 1103–1107.

Erney, D. R., A. M. Gillespie, D. M. Gilvydis, and C. F. Poole. 1993. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with spitless or hot on-column injection and flame photometric detection. *J. Chromatogr. A* 638(1): 57–63.

Erney, D. R., T. M. Pawlowski, and C. F. Poole. 1997. Matrix-induced peak enhancement of pesticides in gas chromatography: Is there a solution? *J. High Resolut. Chrom.* 20(7): 375–378.

European Comission, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed, Document no. SANCO/2007/3131, 31/October/2007.

Fernández González, J., R. Rial Otero, B. Cancho Grande, and J. Simal Gándara. 2003. Determination by GC-MSD of fungicide residues in white grapes for wine making. Matrix effect assessment. *J. AOAC Int.* 86(5): 1008–1014.

Hajslova Kholadová, J., V. Kocourek, J. Poustka, M. Godula, P. Cuhra, and M. Kempny. 1998. Matrix-induced effects: A critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *J. Chromatogr. A* 800(2): 283–295.

Hennio, M. C. 2000. In *Sample Handling and Trace Pollutant Techniques, Applications, and Quality Assurance*, ed. D. Barceló. Amsterdam: Elsevier.

Holland, P. T., D. E. McNaughton, and C. P. Malcolm. 1994. Multiresidue analysis of pesticides in wines by solid-phase extraction. *J. AOAC Int.* 77(1): 79–86.

Jiménez, J. J., J. L. Bernal, M. J. Del Nozal, L. Toribio, and M. Martín. 1998. Gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil column: Influence of the honey matrix on the quantitative results. *J. Chromatogr. A* 823(1–2): 381–387.

Jiménez, J. J., J. L. Bernal, M. J. Del Nozal, L. Toribio, and E. Arias. 2001. Analysis of pesticide residues in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection. *J. Chromatogr. A* 919(1): 147–156.

Legislación Española. 1994. Ministerio de la Presidencia, Real Decreto 280/1994 de 18 de Febrero y sucesivas modificaciones, del Ministerio de Presidencia, por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal. BOE no. 58, de 9/03/94.

Melo, L. F. C., C. H. Collins, and I. C. S. F. Jardim. 2004. New materials for solid-phase extraction and multiclass high-performance liquid chromatographic analysis of pesticides in grapes. *J. Chromatogr. A* 1032(1–2): 51–58.

Menkissoglu-Spiroudi, U., and A. Fotopoulou. 2004. Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetable. *Int. J. Environ. An. Ch.* 84(1–3): 15–27.

Miller, J. N., and J. C. Miller. 2002. In *Estadisitica y quimiometría para Química Analítica*, 4th ed. Madrid: Prentice Hall.

Nozal, M. J., J. L. Bernal, J. J. Jiménez, M. T. Martín, and J. Bernal. 2005. Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1076: 90–96.

Oliva, J., S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, and M. R. Salinas. 1999. Effect of pesticide residues on the aromatic composition of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2830–2836.

Rial, R., C. Yagüe, B. Cancho, and J. Simal. 2002. Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of the

fungicides cyprodinil and fludioxonil in white wine. *J. Chromatogr. A* 942 (1–2): 41–52.

Rial Otero, R., B. Cancho Grande, and J. Simal Gándara. 2003. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *J. Chromatogr. A* 992(1–2): 121–131.

Sanz-Asensio, J., M. Plaza-Medina, M. T. Martínez-Soria, and M. Pérez-Clavijo. 1999. Study of photodegradation of the pesticide ethiofencarb in aqueous and non-aqueous media, by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 840: 235–247.

Schenck, F. J., and S. J. Lehotay. 2000. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? *J. Chromatogr. A* 868(1): 51–61.

Sherma, J. 1999. Pesticide residue analysis: 1997–1998. *J. AOAC Int.* 82(3): 561–574.

Stavropoulos, P., P. E. Athanasopoulos, and N. B. Kyriakidis. 2001. Degradation of pyrazophos and methidathion in fortified red and white wine under conditions of light and darkness. *Food Chem.* 72: 473–477.

Tadeo, J. L., C. Sánchez-Brunete, B. Albero, and L. González. 2004. Analysis of pesticide residues in juice and beverages. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34: 165–175.

Tomlin, C. D. S. 1997. *The Pesticide Manual,* 11th ed. Suffolk, UK: British Crop Protection Council.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Available at http://www.epa.gov/pesticides/regulating/tolerances (accessed June 2007).

Vaquero-Fernández, L., J. Sanz-Asensio, M. López-Alonso, and M. T. Martínez-Soria. 2009. Fate and distribution of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol fungicides from treated grapes intended for winemaking. *Food Addit. Contam.* 26(2): 164–171.

Vigna, C. R. M., L. S. R. Morais, C. H. Collins, and I. C. S. F. Jardim. 2006. Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. *J. Chromatogr. A* 1114(2): 211–215.

Wong, J. W., and C. A. Halverson. 1999. Multiresidue analysis of pesticides in wines using C-18 solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Am. J. Enol. Viticult.* 50(4): 435–442.

Wong, J. W., M. G. Webster, C. A. Halverson, M. J. Hengel, K. K. Ngim, and S. E. Ebeler. 2003. Multiresidue pesticide analysis in wines by solid-phase extraction and capillary gas chromatography-mass spectrometric detection with selective ion monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1148–1161.

Young, M. S., M. F. Early, C. R. Mallet, and J. Krol. 2001. Application of a mixed-mode solid-phase extraction and cleanup procedure for LC/MS determination of thiabendazole and carbendazim in apple juice. *J. AOAC Int.* 84(5): 1060–3271.

TREATMENT OF GRAPEVINES WITH PROHEXADIONE CALCIUM AS A GROWTH REGULATOR. THE INFLUENCE ON PRODUCTION, WINEMAKING AND SENSORY CHARACTERISTICS OF WINES

L.VAQUERO-FERNANDEZ[1], P. FERNANDEZ-ZURBANO[1,3], J. SANZ-ASENSIO[1], M. LOPEZ-ALONSO[2] and M.T. MARTINEZ-SORIA[1]*

1: Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios, 53, 26006 Logroño, Spain
2: Department of Agriculture and Food, University of La Rioja, Madre de Dios, 53 26006 Logroño, Spain
3: Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino, University of La Rioja, CSIC, Government of La Rioja, Madre de Dios, 53, 26006 Logroño, Spain

Abstract

Aims: The overall objective of this study was to investigate the effect of the growth regulator Prohexadione Calcium (ProCa) on the production of Tempranillo vines in La Rioja, the vinification and the sensory profile of wines obtained from treated grapes.

Methods and results: Prohexadione calcium was applied to Tempranillo vines from Rioja Baja at preblooming in years 2004 and 2005. A number of rows were not treated and they were used as controls. Vinification was carried out at an experimental winery. Oenological parameters were determined. A sensory analysis was performed on the obtained wines. The results showed that crop yield was reduced in treated vines. As regards the fermentation process, slight differences were observed in the case of the treated Tempranillo grapes in comparison to the control. The sensory analysis revealed different organoleptic characteristics in the wines obtained from treated grapes in comparison to those produced from the untreated ones.

Conclusion: The growth regulator Prohexadione calcium can be used as an alternative to bunch thinning. Improved sanitary conditions of grapes are observed. The treatment at preblooming produces a reduction in berry size and weight. An improvement in sensory characteristics and wine quality is observed, as a consequence of reduced production.

Significance and impact of study: ProCa as a growth regulator may be an option for a quality vitiviniculture. No previous studies have been published on applications of ProCa in grapevines in either Europe or in cv. Tempranillo. Additionally, studies with other varieties have not demonstrated sensory improvements in wines obtained from treated vines.

Key words: prohexadione calcium, grapes, Tempranillo *cv*., winemaking, sensory analysis

Résumé

Objectifs : L'objectif de cette étude a été de rechercher les effets de la prohexadione-calcium en tant que régulateur de la croissance sur la production de vins Tempranillo de La Rioja et son influence sur la vinification et les caractéristiques sensorielles des vins obtenus.

Méthode et résultats : On a appliqué de la prohexadione-calcium sur des vignes de Tempranillo en Rioja Baja à la préfloraison pendant deux années consécutives, 2004 et 2005. Quelques rangs n'ont pas été traités en tant que témoins. La vinification a eu lieu dans une cave expérimentale. On a déterminé les paramètres œnologiques. On a fait une analyse sensorielle des vins obtenus. Les résultats ont montré que le rendement des vins traités était inférieur à celui des non traités. Pendant la fermentation, des légères différences ont été notées pour les raisins du cépage Tempranillo traités, par rapport aux raisins non traités. L'analyse sensorielle a montré des caractéristiques organoleptiques différentes entre les vins issus des raisins traités et ceux issus des non traités.

Conclusions : La prohexadione-calcium peut être utilisée comme régulateur de la croissance à la place de l'éclaircissage. On a observé une amélioration des conditions sanitaires des raisins. Le traitement à la préfloraison diminue la taille et la forme des grappes. Les caractéristiques sensorielles et la qualité des vins sont améliorées à la suite de la réduction de la production.

Importance et intérêt de l'étude : La prohexadione-calcium comme régulateur de la croissance peut être un choix pour une viticulture de qualité. Il n'existe pas de publications sur l'application de la prohexadione-calcium sur les vignes en Europe ou sur le cépage Tempranillo. De plus, les études sur d'autres cépages n'ont pas démontré une amélioration des caractéristiques sensorielles des vins issus des raisins traités.

Mots clés : prohexadione-calcium, grappes, Tempranillo, vinification, analyse sensorielle

manuscript received the 14th of April 2009 - revised manuscript received the13rd of June 2009

*Corresponding author: maria-teresa.martinez@unirioja.es

J. Int. Sci. Vigne Vin, 2009, **43**, n°3, 149-157
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

INTRODUCTION

The production of good quality grapes requires the control of several and multiple parameters in the vineyard. Therefore, control of production yield is becoming increasingly more important for a quality vitiviniculture. At present, it seems undeniable that high crop yields give lower quality grapes than those obtained from low crop yields. Nowadays, bunch thinning is a very widely-used technique to reduce production in vigorous vines or in vines that have been subject to favorable weather conditions. Bunch thinning produces an increase in Color Intensity (CI), Total Phenolic Index (TPI) and anthocyanins (García Escudero *et al.*, 2004).

An alternative method for controlling production is the use of plant growth regulators. Prohexadione calcium (Pro-Ca) (3-oxido-4-propionyl-5-oxo-3-cyclohexene-carboxylate) is a gibberelin biosynthesis inhibitor with limited persistence (Owens and Stover, 1999). ProCa operates by blocking two oxoglutarate-dependant dioxygenases, which catalyse the later steps in the biosynthetic sequence. The 3-hydroxylation of GA20 (inactive) into GA1 (biologically active) is especially inhibited, resulting in a reduction of longitudinal shoot growth in plants (Evans *et al.*, 1999; Graebe, 1987). ProCa is easily applied by spraying and constitutes no apparent risk for consumers or the environment (Rademacher and Kober, 2003). ProCa has been reported to be absorbed completely within eight hours and to degrade in plants with a half-life of a few weeks and in soil with a half-life of less than one week, without producing toxic metabolites (Ilias and Rajapakse, 2005). ProCa has been registered and used on apples as Apogee® (27.5 % ProCa) in North America and as Regalis® (10 % ProCa) in Europe (Miller and Tworkoski, 2003) by BASF. ProCa has been applied in fruit trees with satisfactory results (Basak and Rademacher, 2000; Bazzi *et al.*, 2003; Gosch *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2005).

Several studies have revealed that the application of Prohexadione calcium also reduces the incidence and severity of fire blight caused by the bacterium *Erwinia amylovora* (Fernando and Jones, 1999; Momol *et al.*, 1999), although the compound does not have bactericidal activity. The first studies of ProCa on grapevines were performed by the researchers Lo Giudice *et al.* (2003, 2004). These authors studied the impact of the application of ProCa in the vigorous *Vitis vinifera* grapevines, especially in *cv.* Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Chardonnay and Seyval.

Significant compounds for the quality of red wines such as phenols (anthocyanins, flavonols, etc) are found in grape skins. These compounds are responsible for color, astringency, bitterness and body of wines (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2002). Prohexadione calcium produces a decrease in berry size. This fact leads to an increase in surface-to-volume ratio, theoretically increasing the proportion of these flavor and aroma precursors in the must and wine and potentially increasing wine quality (Lo Giudice *et al.*, 2004). Moreover, a reduction in berry size and the production of less compact bunches may diminish the incidence and severity of *Botrytis cinerea* and other bunch rots, especially in humid environments (Vail and Marois, 1991).

In *cv.* Cabernet-Sauvignon, the reduction of berry weight is correlated with an increase in color intensity (absorbance at 420 and 520 nm), total anthocyanins and total phenols. The observed effects on grape composition were generally positive, but the effect on the quality and the organoleptic characteristics of the final wine are still unknown (Lo Giudice *et al.*, 2004).

The aim of this study is to examine the effect on the production, the fermentative process, the oenological parameters and the sensory characteristics of the wine obtained from Tempranillo grapevines (major variety in DOCa Rioja) treated with Prohexadione calcium.

MATERIALS AND METHODS

1. Field trials

Prohexadione calcium was applied during the years 2004 and 2005 in the same plot in Rioja Alta. Tempranillo vines were 13 years old and presented constant conditions of vegetative growth and development, under similar conditions of fertilization and irrigation. Vines were trained and spur-pruned on a wire trellis system for support and the canopy was vertically shoot-positioned. The row and vine spacing was of 2.5 and 1.2 m, respectively. Shoot density was adjusted to 12 shoots per vine.

ProCa was applied as Regalis®, 10% ProCa, (BASF, Germany) at a dose of 3 kg ha^{-1} at preblooming (BBCH 57) (12 June 2004 and 11 June 2005). Treatments were applied to both sides of the canopy, wetting the entire shoots. The product was sprayed with a HARDI® atomizator (Denmark). Applications were carried out when there was no rain predicted for at least 24 hours. A number of rows were not treated and were used as a control plot.

2. Vinification process

Mature grapes were harvested on 11 October 2004 and 7 October 2005. Four experimental vinifications for control and treated grapes were carried out in the experimental winery of the University of La Rioja, two for the control crop and two for treated grapes. All wines were obtained using the traditional winemaking method. Grapes were destemmed, crushed and fermented into

100 L stainless steel tanks; 100 mg kg^{-1} of potassium metabisulfite was added. Crushed grapes were inoculated with commercial yeast strain VRB *Sacharomyces cerevisiae* (30 g hL^{-1}) from Lallemand (Australia). The prefermentation process lasted 24 hours.

The cap was punched down during the maceration-fermentation process (pigeage) and pumping-over extractions were also performed during fermentation (remontage). The wines were drawn off and then inoculated with commercial lactic bacteria strain Alpha *Oenoccus oeni* (1 g hL^{-1}) from Lallemand (Australia) in 30 L stainless steel tanks. After malolactic fermentation, wines were racked and 90 mg L^{-1} of potassium metabilsulfite were added. Wines were clarified by settling at 4 ºC for a week and then bottled. The wines were stored at 4 ºC in order to prevent spoilage.

3. Determination of usual oenological parameters

In order to evaluate berry size, 100 berries were placed in trays with different diameter holes (18, 16, 14, 12 and 10 mm). Thus, berries passed through from higher diameter trays to lower ones. Berries were crushed. Then, solid was separated and weighed and the liquid volume was measured. Conventional oenological parameters (density, ethanol concentration, pH, reducing sugars, titratable and volatile acidities, total and free SO_2) were determined in accordance with official OIV practices. L-malic was determined by an enzymatic method in accordance with official AOAC analysis methods. Color Intensity (CI) was calculated as the sum of absorbances at 420, 520, and 620 nm, and the hue of the wine was calculated as the ratio of absorbance at 420 nm and 520 nm. Total Polyphenol Index (TPI) was estimated as absorbance at 280 nm. Tannins were determined using the method described by Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1996). Amount of laccase was determined using the method described by Dubourdieu *et al.* (1984). All determinations were carried out in triplicate.

4. Sensory analysis

In February 2005 and 2006, sensory analyses were performed by a panel formed by experts from the Asociación de Enólogos de La Rioja and Enology graduates from the University of La Rioja. The panel had 25 and 55 members in 2004 and 2005, respectively. Two sessions in different days were carried out. In the first session, the aim of the sensory evaluation was to determine whether the wine obtained from treated vines was significantly different from the control. Since this is a classical application of a discrimination test, a duo-trio test was chosen (Meilgard *et al.*, 2007). Three samples were presented to the experts, one of which was identified as the reference. One of the other two was identical to the reference. The panelists were asked to state which product most closely resembled the reference. Since the question was « Which sample matched the reference sample? » the one-tailed binomial test was used. Panelists considered visual, odor, taste and mouth-feel perceptions.

In the second session, a descriptive sensory analysis was carried out. Panelists were provided with evaluation sheets containing a list of different terms for appearance, aroma, attributes in mouth, and aftertaste. The panelists chose the terms characterizing the wines. A chi-square (χ^2) analysis performed on the average citation frequency of each term in the two samples was carried out in order to identify statistical differences. The citation frequency method was performed as a successful tool for conventional descriptive analysis (Campo *et al.*, 2008).

RESULTS

1. Assay in 2004

a. Grapes

Table 1 shows some yield parameters. The average reduction in the weight of berries from treated vines indicated a reduction in the crop yield of 25%. The

Table 1 - Several yield components

Samples	Average berry weight (g)	Berry size*				% Solid / liquid (m /v)
		10-12 mm	12-14 mm	14-16 mm	16-18 mm	
Control 2004	2.38 ± 0.06^a	8.1 ± 0.3^a	54.3 ± 7.2^a	31.8 ± 7.5^a	5.7 ± 1.1^a	42.3 ± 2.4^a
ProCa 2004	1.78 ± 0.03^b	24.2 ± 2.3^b	57.5 ± 4.6^a	15.1 ± 2.7^b	3.2 ± 1.5^b	57.1 ± 4.3^b
Control 2005	1.57 ± 0.02^a	0.3 ± 0.6^a	14.7 ± 1.5^a	75.4 ± 1.1^a	9.6 ± 1.1^a	50.4 ± 3.7^a
ProCa 2005	1.41 ± 0.02^b	5.7 ± 1.5^b	17.7 ± 0.6^b	68.0 ± 1.7^b	8.5 ± 0.6^a	55.6 ± 2.5^a

* % of berries for each diameter; a,b Different letters in same column and year means significant differences at 5 % level.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

presence of « shoulders » in bunches was reduced by 90%. The size of individual berries from treated vines were different from those of control vines. Clusters from treated vines had a higher number of small berries (10-14 mm diameter) and a lower number of berries with 14-18 mm than control grapes. Solid /liquid relation was higher in treated grapes.

b. Alcoholic and malolactic fermentations

Averages of oenological parameters for control and « ProCa » musts and wines are shown in table 2. Must from treated grapes gave higher values for Brix degree, pH and titratable acidity. Wine produced from these grapes had a higher alcoholic degree. CI, TPI, hue, titratable acidity, and tannins were higher in wines obtained from treated grapes. Laccase values were notably low due to good sanitary conditions.

With regard to the fermentative process, differences between control and « ProCa » were observed. The evolution of sugars (%) is shown in figure 1. The fermentation of treated grapes was quicker and « dryness » (reducing sugars < 2 g L^{-1}) was achieved earlier. Malolactic fermentation had a duration of 23 days for both control and « ProCa » wines.

c. Sensory analysis

The Duo-Trio test performed to check whether wines produced were different showed that wines did not differ at a significance level of 5% because number of correct responses was 17 and the critical number for significance is 18. These results suggested a certain differentiation that was not significant enough at this level. Actually, p was 0.10 .

The results for the descriptive analysis are shown in figure 2. The spider webs represent the citation frequency in a maximum of 25.

For appearance or visual perceptions, depth was different (p<0.05) for « ProCa » wine because it was considered higher than the control. Color was also different in « ProCa » wine. This wine was considered with more purple, biguerrau cherry and blackish colors (p<0.05) than the control one, while the shades found in the control wine were cherry red and deep red. Some differences were observed in terms of aroma and odor perceptions. Intensity and aromas were similar for both control and « ProCa » wines. Fruity aromas were present in both wines. ProCa wine also had spicy aromas and were globally considered more complex (p<0.05) than the control wine. Tastes were more balanced (p<0.05) in wine from treated grapes. Mouthfeel was mild and light (p<0.05) for the control wine. In contrast, « ProCa wine » presented higher astringency and stickiness. Aftertaste was very fruity for both control and « ProCa » wines; the latter also presented

Table 2 - Conventional oenological parameters at the beginning and end of fermentation in 2004 and 2005

Must

Samples	° Brix	pH	Titratable Acidity[c]	*Laccase* (nmol mL^{-1})
Control (2004)	20.6 ± 0.2^{a}	3.49 ± 0.01^{a}	4.35 ± 0.02^{a}	0.231 ± 0.014^{a}
ProCa (2004)	24.4 ± 0.1^{b}	3.78 ± 0.01^{b}	5.34 ± 0.01^{b}	0.046 ± 0.010^{b}
Control (2005)	22.2 ± 0.1^{a}	3.55 ± 0.02^{a}	4.65 ± 0.01^{a}	nd
ProCa (2005)	20.2 ± 0.1^{b}	3.49 ± 0.01^{b}	4.70 ± 0.02^{b}	nd

Wine

Samples	Ethanol (v/v)	pH	Titratable Acidity[c]	Volatile Acidity[d]
Control (2004)	13.0 ± 0.4^{a}	3.68 ± 0.01^{a}	4.12 ± 0.11^{a}	0.21 ± 0.01^{a}
ProCa (2004)	13.8 ± 0.3^{b}	4.04 ± 0.04^{b}	4.72 ± 0.09^{b}	0.21 ± 0.01^{a}
Control (2005)	13.4 ± 0.1^{a}	3.72 ± 0.01^{a}	4.78 ± 0.18^{a}	0.37 ± 0.01^{a}
ProCa (2005)	13.6 ± 0.1^{a}	3.68 ± 0.04^{a}	4.42 ± 0.47^{a}	0.27 ± 0.07^{b}

Wine

Samples	TPI[e]	CI[f]	Tannins	Hue
Control (2004)	44.3 ± 3.3^{a}	12.7 ± 0.9^{a}	3.10 ± 0.16^{a}	0.42 ± 0.01^{a}
ProCa (2004)	61.6 ± 0.6^{b}	14.6 ± 0.4^{b}	4.31 ± 0.24^{b}	0.54 ± 0.02^{b}
Control (2005)	39.5 ± 1.3^{a}	12.7 ± 0.2^{a}	2.76 ± 0.09^{a}	0.59 ± 0.03^{a}
ProCa (2005)	44.5 ± 2.0^{b}	13.2 ± 0.2^{b}	3.12 ± 0.11^{b}	0.55 ± 0.04^{a}

[a,b] Different letters in same column and year means significant differences at 5 % level.
[c] expressed as g tartaric acid per litre
[d] expressed as g acetic acid per litre
[e] Total Polyphenol Index (absorbance at 280 nm)
[f] Color Intensity (sum of aborbances at 420, 520 and 620 nm)
nd = non detected

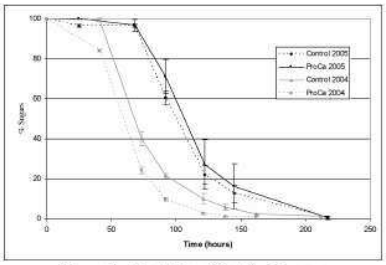


Figure 1 - Evolution of the % of sugar during fermentation in each sample

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

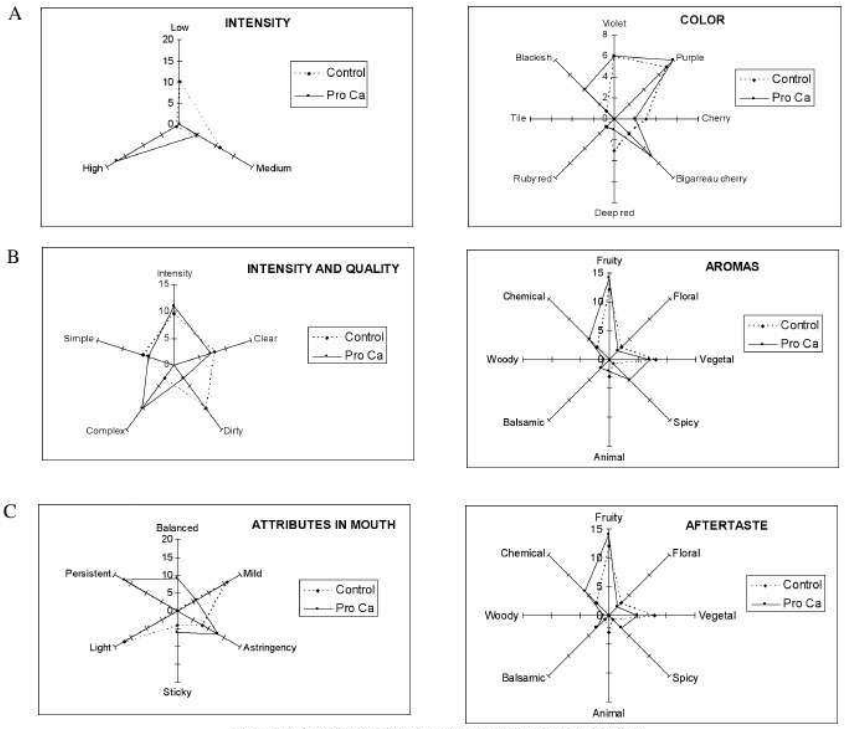


Figure 2 - Spiderweb diagrams for sensory analysis in 2004.
A) Appearance; B) Odor; C) Attributes in mouth and aftertaste

spicy and balsamic attributes. « ProCa » wine had more persistence than the control (p<0.05).

2. Assay in 2005

a. Grapes

In this year, the application of « ProCa » had a less marked effect than in 2004. The maturation and vegetative growth of treated vines were similar to the control vines. For treated vines, the presence of shoulders was reduced by 30%, and yield production decreased by 10%. There was a higher number of small berries in treated grapes, with 10-12 mm and 12-14 mm diameters (see table 1).

b. Alcoholic and malolactic fermentation

Usual oenological parameters for control and « ProCa » wines are shown in table 2. In the winemaking of treated grapes, Brix degree was slightly lower than in controls. There were no differences in pH and titratable acidity for both control and « ProCa » musts. Wine from treated grapes also gave lower values for titratable acidity and pH. Significant differences in ethanol were not observed in the control and « ProCa » wines. TPI, tannins, and CI were higher for wines obtained from treated grapes. Hue was similar in both control and « ProCa » wine. Good sanitary conditions were observed as shown by the absence of laccase.

Figure 1 shows the evolution of sugar content (%) in the fermentative process of control and « ProCa » grapes. The kinetics were similar for both samples. No significant differences in the evolution of fermentation were identified for both samples. Both fermentations had the same duration, with reducing sugars < 2 g L^{-1}. Malolactic

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

fermentation lasted 20 days for both wines. Malic acid was below 0.1 g L^{-1}.

c. Sensory analysis

The Duo-Trio test performed to check whether wines produced were different showed that wines did not differ at a significance level of 5%. Sensory panelist could not distinguish between the wines because correct responses were 31 and the critical number for significance is 34.

In the subsequent descriptive analysis, certain differences were observed. Spider webs represent the citation frequency in a maximum of 55 (Figure 3). As regards appearance, differences in depth or intensity and color were shown. « ProCa » wine presented a higher intensity than the control (p<0.05); control wine showed a higher deep red (p<0.05) and violet (p<0.05) colors and purple hues were also observed in « ProCa » wine. As regards odor perceptions, wine from treated grapes had a higher intensity (p<0.05) with a clear and complex quality (p<0.05). Fruity aromas were observed in both control and « ProCa » wines. Tastes were more balanced in wine obtained from treated grapes than wine obtained from untreated grapes (p<0.05). For control wine, mouthfeel was perceived as mild and light in contrast to the higher stickiness of « ProCa » wine. Aftertaste was very fruity for both control and « ProCa » wines. These wines also had spicy and balsamic attributes. Wine from grapes treated with ProCa was more persistent than the control wine.

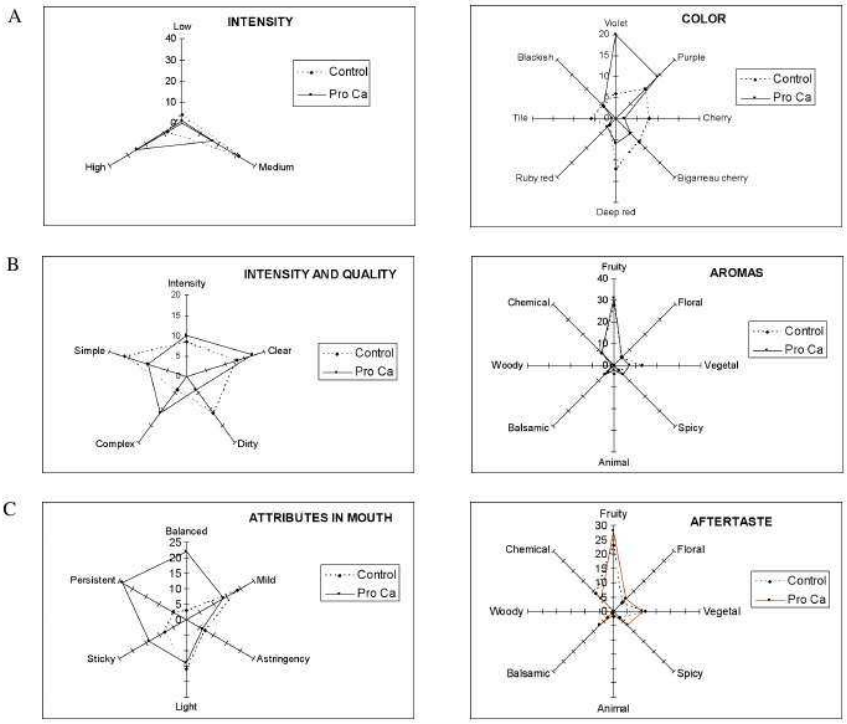


Figure 3 - Spiderweb diagrams for sensory analysis in 2005.
A) Appearance; B) Odor; C) Attributes in mouth and aftertaste

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

DISCUSSION

An improvement in the sanitary conditions of grapes from vines treated with ProCa was observed as revealed by the laccase values. This result confirmed the theory of Vail and Marois (1991). The smaller size of berries and less compact clusters with reduced shoulders number diminish the incidence of *Botrytis cinerea*. Prohexadione calcium produced a reduction in crop yield. This effect was the result of a reduction in fruit set. As Lo Giudice (2004) described, Prohexadione calcium has the potential to reduce fruit set, particularly at preblooming. The prebloom application of ProCa caused browning and abscission of flowers. ProCa inhibits the conversion of aminocyclopropanecarboxylic acid into ethylene, and its application reduces ethylene-induced senescence in several plant systems (Rademacher *et al.*, 1992).

Differences between treated and control grapes were marked in 2004, although in 2005, a reduction in yield and shoulders number was also observed, and excellent sanitary conditions were obtained. The reason why this treatment had a less marked effect is uncertain. Vines could not be sensitive to the product due to the climatological and environmental conditions.

Data at harvest for oenological parameters revealed complete and early ripening for grapes treated with ProCa in 2004. These grapes were significantly different from the controls. Fermentation was faster in treated grapes. However, the application of prohexadione calcium did not have a marked effect on grapes in 2005, with slight differences in maturation. Therefore, there was no difference in alcoholic fermentation of treated and control grapes. Malolactic fermentation was not affected in either years.

There was a important increase in CI, TPI, and tannins in wines obtained from treated grapes with respect to those obtained from control grapes. This effect was observed in both years. The reduction of yield and berry size, and the increase in solid/liquid relation led to a higher concentration of phenolic compounds in Tempranillo grapes, as described by LoGiudice (2004) in other varieties. The application of prohexadione calcium produced better phenolic ripening during the two years.

Duo-trio tests showed that there were no statistical differences between control and « ProCa » wines in either 2004 or 2005. However, descriptive analysis revealed differences in color, aromas and mouthfeel. Due to the reduction in yield and berry size in treated vines, color-related polyphenols were concentrated so intensity was classified higher than in the control wine. Moreover, the application of Prohexadione calcium caused a higher CI (with higher absorbance at 420, 520 and 620 nm), and provided violet and purple colors in « ProCa » wines. These facts could be explained by a higher anthocyanin concentration or an increase in copigmentation (Gutiérrez *et al.*, 2005). Apart from the obvious fact that an increase in surface-to-volume ratio results in an increase in anthocyanins and flavonoids (Pérez-Magariño *et al.*, 2004), there is a second hypothesis. It has been shown that ProCa directly affects the biosynthetic pathway of anthocyanins and other flavonoids. This fact is possibly due to the role of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases (Awad and de Jagger, 2002; Heller and Forkmann, 1994; Rademacher *et al.*, 2003; Roemmelt *et al.*, 2003).

Flavors and aroma precursors also increased as a result of smaller berry size. Sensory analysis showed a high aromatic intensity for « ProCa » wine in 2005. Moreover, the aroma of « ProCa » wine was globally classified as more complex and clearer. Spicy aromas (licorice, clave, black pepper) were also observed in wine from treated vines. Tempranillo grapes develop intense varietal aroma and flavor nuances reminiscent of licorice, truffle (Jackson, 2002) which were clearly apparent in wines obtained from treated vines.

The astringency, body and stickiness achieved in « ProCa » wines were due to a higher content of organic acids and flavonoids, such us flavonols, flavan-3-ols and their polymers (procyanidins and condensed tannins), which were extracted from the seeds and skins of grapes. This finding correlated with a high TPI and tannins values found in these wines. High persistence in wines from treated vines was also a consequence of the concentration of flavourants and tastants produced by a reduction in small berry size.

Spicy aftertaste was also reported in « ProCa » wines. This fact confirms the odor profile obtained for those wines.

CONCLUSIONS

The preblooming application of Prohexadione calcium produced a reduction in yield, clusters and berry size in *cv.* Tempranillo. Moreover, better and earlier grape ripening was achieved with a high Brix degree. This effect was less marked in 2005.

During fermentation, there was a higher extraction of phenolic compounds as a result of an increase in surface-to-volume ratio. An increase in TPI, tannins and CI was observed in both years. Fermentative processes (alcoholic and malolactic fermentations) were not affected. The amount of laccase determined in 2004 was significantly lower in grapes from vines treated with ProCa.

The Duo-trio tests showed that significant differences were not observed at a level of 5 %, but results suggested

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

a certain differentiation. The application of Prohexadione calcium modified the sensory characteristics of wines obtained from treated grapevines. Typical sensory attributes in Tempranillo wines were enhanced.

The treatment of grapevines with Prohexadione calcium can be used as a new tool for controlling production and therefore improving wine quality for *cv.* Tempranillo.

Acknowledgements : The authors want to thank the Government of La Rioja for the FPI grant given to Luis Vaquero-Fernández and the project ANGI 2004/18; INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01); and MEC/FEDER for the AGL2005-02313/ALI project. The authors would also want to thank the University of La Rioja, Bodegas Dinastía Vivanco S.A. and L.C. Mateo-García (Market Developer of BASF Española).

REFERENCES

AWAD M.A. and DE JAGGER A., 2002. Formation of flavonoids, especially anthocyanin and chlorogenic acid in « Jonagold » apple skin: influences of growth regulators and fruit maturity. *Scientia Horticulturae*, **93**, 257-266.

BASAK A. and RADEMACHER W., 2000. Growth regulation of pome and stone fruit trees by use of prohexadione-Ca. *Acta Horticulturae*, **514**, 41-50.

BAZZI C., MESSINA CH., TORTORETO L., STEFANI E., BINI F. SABATINI E., SPINELLI F., COSTA G., AUPMANN S. and STAMLER G. 2003. Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. *Europ. J. Hortic. Sci.*, **68**, 108-114.

CAMPO E., LANGLOIS J., BALLESTER C., DACREMONT C., and VALENTIN D., 2008. Comparison of conventional descriptive analysis and the frequency of citation method for odor profiling: case of 12 Burgundy Pinot noir wines. *Enoforum 2008*. Montpellier. France.

DEKERS T. and SCHOOFS H., 2002. Control strategies of bacterial diseases in European pear growing. *Acta Horticulturae*, **587**, 639-645.

DUBOURDIEU D., GRASSI C., DERUCHE C. and RIBÉREAU-GAYON P., 1984. Mise au point d'une mesure rapide de l'activité laccase, dans les moûts et dans les vins par méthode à la syringaldazine. Application à l'appréciation de l'état sanitaire des vendanges. *Connaissance Vigne Vin*, **18** (4), 237-252.

EVANS J.R., EVANS R.R., REGUSCI C.L. and RADEMACHER W., 1999. Mode of action, metabolism, and uptake of BASF 125 W prohexadione calcium. *Hortscience*, **34**, 1200-121.

FERNANDO W.G.D. and JONES A.L., 1999. Prohexadione calcium - A tool for reducing secondary fire blight infection. *Acta Horticulturae*, **489**, 597-600.

GARCÍA-ESCUDERO E., VILLAR M., GARCÍA-OLIVERAS C, IBÁÑEZ S. and ROMERO L., 2004. Influencia del aclareo de racimos en el rendimiento y calidad del vino en las variedades tintas de la D.O.Ca.Rioja. IV World Wine Forum, Logroño, Spain.

GOSCH C., PUHL I., HALBWIRTH H., SCHLANGEN K., ROEMMELT S., ANDREOTTI C., COSTA G., FISCHER T.C., TREUTTER D., STICH K. and FORKMANN G., 2003. Effect of prohexadione-Ca on various fruit crops: Flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *Europ. J. Hortic. Sci.*, **68**, 144-151.

GRAEBE J.E., 1987. Gibberellin biosynthesis and control. A review. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology*, **38**, 419-465.

GUAK S., NEILSEN D. and LOONEY N.E., 2001. Growth allocation of N and carbohydrates, and stomatal conductance of greenhouse grown apple treated with prohexadione-Ca and gibberellins. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, **76**, 746-752.

GUTIÉRREZ I.H., LORENZO E.S.P. and ESPINOSA A.V., 2005. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet-Sauvignon, Cencibel and Syrah. *Food Chemistry*, **92** (2), 269-283.

HELLER W. and FORKMANN G., 1994. Biosynthesis of flavonoids. *In: Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Harborne J.B. (ed) Chapman and Hall, London, pp 499-535.

HORWITZ W.H. and LATIMER G.W. (eds), 2005. Fruits and fruits products. *In: Official methods of analysis of AOAC International*, 18th ed., pp15.

ILIAS I.F. and RAJAPAKSE N., 2005. Prohexadione-calcium affects growth and flowering of petunia and impatiens grown under photoselective films. *Scientia Horticulturae*, **106**, 190-202.

JACKSON R.S., 2002. Types of wine. *In: Wine tasting: A Professional Handbook*. San Diego: Elsevier Academic Press pp. 211-225.

LO GIUDICE D., WOLF T.K. and MARINI R.P., 2003. Vegetative response of *Vitis vinifera* to prohexadione-calcium. *Hortscience*, **38**, 1435-1438.

LO GIUDICE D., WOLF T.K. and ZOECKLEIN B.W., 2004. Effects of prohexadione-calcium on grape yield components and fruit and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 73-83.

MEILGARD C.E., CIVILLE G.V. and CARR B.T., 2007. Overall difference tests: does a sensory difference exists between samples ? *In: Sensory Evaluation Techniques*. 4th edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton., USA, pp 72-80.

MILLER S.S. and TWORKOWSKI T., 2003. Regulating vegetative growth in deciduous fruit trees. *Quarterly Reports on Plant Growth Regulation Society of America*, **31**, 8-46.

MOMOL M.T., UGINE J.D., NORELLI J.L. and ALDWINKLE H.S., 1999. The effect of prohexadione calcium, SAR inducers and calcium on the control of shoot blight caused by *Erwinia amylovora* on apple. *Acta Horticulturae*, **489**, 601-605.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990. *International analysis methods of wines and must*. Paris. France

OWENS C.L. and STOVER E., 1999. Vegetative growth and flowering of young apple trees in response to prohexadione calcium. *Hortscience*, **34**, 1194-1196.

PÉREZ-MAGARIÑO S. and GONZÁLEZ-SAN JOSÉ M.L., 2004. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chemistry*, **52** (5),1181-1189.

RADEMACHER W., TEMPLE-SMITH K.E., GRIGGS D.L., and HEDDEN P., 1992. The mode of action of acyllcyclohexanediones: a new type of plant retardant. *In: Progress in Plant Growth Regulation. Karssen C.M. et al.* (Eds). Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands., pp 571-577.

RADEMACHER W., 2000. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**, 501-531.

RADEMACHER W. and KOBER R., 2003. Efficient use of prohexadione-Ca in pome fruits. *Europ. J. Hortic. Sci.*, **68**, 101-107.

RIBÉREAU-GAYON J. and STONESTREET E., 1966. Dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie analytique*, **48**, 188-196.

RIBÉREAU-GAYON P., GLORIES Y., MAUJEAN A. and DUBOURDIEU D., 2002. *Compuestos fenólicos. In: Tratado de Enología. Tomo II: Química del vino. Estabilización y tratamientos*. Ed. Hemisferio Sur, pp 177-257.

ROEMMELT S., ZIMMERMANN N., RADEMACHER W., and TREUTTER D., 2003. Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry*, **64**, 709-716.

SMIT M., MEINTJES J.J., JACOBS G., STASSEN P.J.C. and THERON K.I., 2005. Shoot growth control of pear trees (*Pyrus communis* L.) with prohexadione-calcium. *Scientia Horticulturae*, 106, 515-529.

VAIL M.E. and MAROIS J.J., 1991. Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, **81**, 188-191.

 ©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *"III Foro Mundial del Vino"* celebrado en Logroño (22-25 Mayo, 2002) con el título ***"Influencia de fungicidas y/o metabolitos en la fermentación del mosto. Aspectos analíticos".***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional *"VII Jornadas Científicas de los Grupos de Investigación Enológica"* celebrado en Logroño (21-23 Mayo, 2003) con el título ***"Influencia del contenido del fungicida Pirimetanil en la evolución de la fermentación alcohólica de un mosto sintético".***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional *"VII Jornadas Científicas de los Grupos de Investigación Enológica"* celebrado en Logroño (21-23 Mayo, 2003) con el título ***"Evolución del contenido de los fungicidas Cyprodinil y Fludioxonil durante la fermentación alcohólica de mostos sintéticos".***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *"3rd Symposium In Vino Analítica Scientia (Analytical Chemistry for wine, brandy and spirits)* celebrado en Aveiro (10-12 Julio, 2003) con el título ***"Evolution of the content of Pyrimethanil during the fermentation of synthetic must"***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *"XIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Química Analítica"* celebrado en La Coruña (21-23 Octubre, 2003) con el título ***"Impact of Pyrimethanil, Cyprodinil, Fludioxonil and Switch on the fermentation of synthetic must. Variations in alcoholic degree".***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *"IV Foro Mundial del Vino"* celebrado en Logroño (12-14 Mayo, 2004) con el título ***"Residuos de pesticidas: efecto matriz en el proceso fermentativo".***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *"IV Foro Mundial del Vino"* celebrado en Logroño (12-14 Mayo, 2004) con el título ***"Efecto matriz de las diferentes muestras enológicas en la determinación de Cyprodinil, Fludioxonil y Benomilo".***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *"5th European Pesticide Residue Workshop"* celebrado en Estocolmo (13-16

Junio, 2004) con el título **"Pesticide residues: matrix effect on fermentation*".***

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *"5th European Pesticide Residue Workshop"* celebrado en Estocolmo (13-16 Junio, 2004) con el título **"Determination of residues of Cyprodinil, Fludioxonil and Benomile. Matrix effect on fermentation*".***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional *"XXVIIIth World Congress of Vine and Wine. 2nd General Assembly of the OIV"* celebrado en Viena (4-9 Julio, 2004) con el título ***"Impact of Pyrimethanil, Cyprodinil, Fludioxonil and Switch on the fermentation of must. Variations in alcoholic degree".***
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "VIII Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Palencia (1-3 Junio, 2005) con el título **"Efectos de Prohexadiona cálcica en la fermentación alcohólica de uvas variedad Tempranillo".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "VIII Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Palencia (1-3 Junio, 2005) con el título **"Proceso fermentativo de uvas variedad Tempranillo en presencia de los fungicidas Pyraclostrobin y Pyrimethanil".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "11as Jornadas de Análisis Instrumental" celebrado en Barcelona (15-17 Noviembre, 2005) con el título **"Comparison of liquid-liquid and solid-phase extraction in fungicide analysis in must and wine followed by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "V Foro Mundial del Vino" celebrado en Logroño (28-30 Marzo, 2006) con el título **"Influencia de la presencia de Pyrimethanil y Pyraclostrobin en la fermentación alcohólica y maloláctica".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "V Foro Mundial del Vino" celebrado en Logroño (28-30 Marzo, 2006) con el título **"Proceso fermentativo de uvas variedad Viura en presencia del fungicida Pyrimethanil. Determinación de residuos durante la elaboración".**
- Presentación de la comunicación oral y tipo póster en el Congreso Internacional "V Foro Mundial del Vino" celebrado en Logroño (28-30 Marzo,

2006) con el título **"Aplicación de Prohexadiona cálcica como regulador del crecimiento en la vid. Efectos sobre la fermentación y las propiedades organolépticas en la variedad Tempranillo".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "6th European Pesticide Residue Workshop" celebrado en Corfu, Grecia (21-15 Mayo, 2006) con el título **"Control of phytosanitary products: the influence of the matriz (must and wine) on the elimination of the fungicide Pyrimethanil".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "6th European Pesticide Residue Workshop" celebrado en Corfu, Grecia (21-15 Mayo, 2006) con el título **"Treatment of grapes with growth regulators (Prohexadione Calcium). The influence on production, winemaking and organoleptic characteristics".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "6th European Pesticide Residue Workshop" celebrado en Corfu, Grecia (21-15 Mayo, 2006) con el título **"Influence of Pyrimethanil on alcoholic fermentation with two *Saccharomyces* yeast strains and residue analysis".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el XIII Congreso Nacional de Enólogos celebrado en Logroño, La Rioja (3-5 Mayo, 2007) con el título **"Aplicación en vid de Prohexadiona de calcio como regulador del crecimiento. Influencia en la calidad del vino".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el XIII Congreso Nacional de Enólogos celebrado en Logroño, La Rioja (3-5 Mayo, 2007) con el título **"Aplicación de productos fitosanitarios dentro del Sistema de Producción Integrada. Efecto en la elaboración y calidad del vino".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "IX Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Badajoz (29 Mayo - 1 Junio, 2007) con el título con el título **"Efectos de la utilización del fungicida Pirimetanil en la elaboración de vinos tintos".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "IX Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Badajoz (29 Mayo - 1 Junio, 2007) con el título con el título **"Efectos del Pyraclostrobin en el proceso fermentativo de uvas variedad Tempranillo y en las características organolépticas del vino elaborado".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "IX Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Badajoz (29 Mayo - 1 Junio, 2007) con el título con el título **"Utilización de reguladores de crecimiento: una opción en la vitivinicultura de calidad".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "IX Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Badajoz (29 Mayo - 1 Junio, 2007) con el título con el título **"Influencia del tratamiento con Prohexadiona de calcio en el color de las uvas".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "Euroanalysis XIV" celebrado en Amberes, Bélgica (9-14 Septiembre, 2007) con el título **"Determination of fungicide levels in grape skins and grapes".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "Euroanalysis XIV" celebrado en Amberes, Bélgica (9-14 Septiembre, 2007) con el título **"Solid-Phase Extraction – Gas Chromatography for the determination of fungicides in must and wine".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "5th Mediterranean Group of Pesticide Research (International Symposium on Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries)" celebrado en Agadir, Marruecos (20-24 Noviembre, 2007) con el título **"Determination of pyraclostrobin during the fermentation process of red grapes".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "5th Mediterranean Group of Pesticide Research (International Symposium on Pesticides in Food and the Environment in Mediterranean Countries)" celebrado en Agadir, Marruecos (20-24 Noviembre, 2007) con el título **"Mobility of fungicide residues in skin and pulp of red grapes".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "VI Foro Mundial del Vino" celebrado en Logroño (23-25 Abril, 2008) con el título **"Dissipation of fungicide pyrimethanil in grapes, must, fermenting must and wine".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "VI Foro Mundial del Vino" celebrado en Logroño (23-25 Abril, 2008) con el título **"Efectos de la aplicación de la prohexadiona de calcio (regulación de crecimiento) en la composición polifenólica de los vinos".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "VI Foro Mundial del Vino" celebrado en Logroño (23-25 Abril, 2008) con el título **"Proceso fermentativo de uvas variedad Tempranillo en la presencia del fungicida Boscalid. Determinación de residuos durante la elaboración."**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "VI Foro Mundial del Vino" celebrado en Logroño (23-25 Abril, 2008) con el título **"Aplicación de Prohexadiona de calcio en vid y su implicación directa en el color y calidad del fruto".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "7th European Pesticide Residue Workshop" celebrado en Berlín, Alemania (1-5 Junio, 2008) con el título **"Analysis of pyrimethanil residues from grapes to vine".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "7th European Pesticide Residue Workshop" celebrado en Berlín, Alemania (1-5 Junio, 2008) con el título **"Determination of fungicide residues in red grapes".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional "7th European Pesticide Residue Workshop" celebrado en Berlín, Alemania (1-5 Junio, 2008) con el título **"Dissipation of fungicide Boscalid during the vinification process from red grapes"**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional ""*31st World Congress of Vine and Wine. 6th General Assembly of the OIV"* celebrado en Verona (15-20 Junio, 2008) con el título **"Determination of fungicide Pyrimethanil in grapes, must, fermenting must and wine".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional ""*31st World Congress of Vine and Wine. 6th General Assembly of the OIV"* celebrado en Verona (15-20 Junio, 2008) con el título **"Análisis de residuos de Piraclostrobin y Boscalid en muestras enológicas y su influencia en la fermentación".**
- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional ""*31st World Congress of Vine and Wine. 6th General Assembly of the OIV"* celebrado en Verona (15-20 Junio, 2008) con el título **"A new tool to control production yield in vines and its influence on phenolic maturity".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Internacional ""*31st World Congress of Vine and Wine. 6th General Assembly of the OIV"* celebrado en Verona (15-20 Junio, 2008) con el título **"Tratamiento con Prohexadiona de calcio. Influencia en el color de las uvas".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "X Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Ourense (3-5 Junio, 2009) con el título con el título **"Efecto de la aplicación de Productos Fitosanitarios dentro del Sistema de Producción Integrada sobre la fermentación y calidad del vino tinto".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "X Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Ourense (3-5 Junio, 2009) con el título con el título **"Recuento e identificación de mohos en uvas de la variedad Garnacha tratadas con el regulador de crecimiento Prohexadiona de calcio".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "X Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Ourense (3-5 Junio, 2009) con el título con el título **"Sensibilidad de distintos cepas de *Saccharomyces* a diferentes pesticidas incluidos en el Sistema de Producción Integrada en viña".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "X Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Ourense (3-5 Junio, 2009) con el título con el título **"Prácticas vitícolas Ecológicas versus Prácticas vitícolas Convencionales. I/ Influencia en la composición polifenólica en uvas de la DOCa Rioja".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "X Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Ourense (3-5 Junio, 2009) con el título con el título **"Prácticas vitícolas Ecológicas versus Prácticas vitícolas Convencionales. II/ Influencia en la composición polifenólica en vinos de la DOCa Rioja".**

- Presentación de la comunicación tipo póster en el Congreso Nacional "X Jornadas Científicas-Grupos de Investigación Enológica" celebrado en Ourense (3-5 Junio, 2009) con el título con el título **"Influencia en la composición polifenólica en uvas y vinos tras la aplicación en vid de los fungicidas Boscalid y Piraclostrobin".**