



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>Desarrollo de metodologías para el análisis de fungicidas en matrices enológicas. Estudios de procesos degradativos e identificación de sus metabolitos</b>
Autor/es
<b>Laura Lagunas Allué</b>
Director/es
María Teresa Martínez Soria y Jesús Sanz Asensio
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico



**Desarrollo de metodologías para el análisis de fungicidas en matrices enológicas. Estudios de procesos degradativos e identificación de sus metabolitos**, tesis doctoral

de Laura Lagunas Allué, dirigida por María Teresa Martínez Soria y Jesús Sanz Asensio (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.

# Desarrollo de metodologías para el análisis de fungicidas en matrices enológicas.

## Estudios de procesos degradativos e identificación de sus metabolitos

Tesis doctoral

LAURA LAGUNAS ALLUÉ



Universidad de la rioja  
Departamento de química  
Área de química analítica







DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD DE LA RIOJA  
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA

*Desarrollo de metodologías para el análisis de  
fungicidas en matrices enológicas. Estudios de  
procesos degradativos e identificación de sus  
metabolitos.*

LAURA LAGUNAS ALLUÉ

---







**D. Jesús Sanz Asensio y D<sup>a</sup>. María Teresa Martínez Soria**, Profesores Titulares de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja.

Hacen constar:

Que la memoria “Desarrollo de metodologías para el análisis de fungicidas en matrices enológicas. Estudios de procesos degradativos e identificación de sus metabolitos.” ha sido realizada por la licenciada LAURA LAGUNAS ALLUÉ 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, 2013.

Fdo: J. Sanz Asensio

M<sup>a</sup> T. Martínez Soria

---



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, Asociación de Enólogos de La Rioja y BASF Española, S.A. (Luis Carlos Mateo García), al instituto de investigación sobre catálisis y el medioambiente de Lyon, IRCELYON, Jean Marc Chovelon, Corinne Ferronato y Arnaud Salvador por su apoyo y colaboración en este trabajo.

---





## Agradecimientos

---

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a Jesús y Mayte, directores de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda incondicional y por enseñarme tantas y tantas cosas. Por compartir conmigo su tiempo y su amistad y por brindarme momentos inolvidables: David, Txino, Álvaro, M<sup>a</sup> Pilar S.; Ana, Vanesa, Cascante, M<sup>a</sup> Pilar M, Crespo y Cristina.

A Elisa y Tao, que a pesar de estar poco tiempo, fueron unos compañeros inolvidables.

A las personas que me han ayudado y han contribuido a la consecución de este trabajo: Alex, Puri, Rubén, Crespo y Elena.

A Judith y a Rodri por su apoyo constante y su buen humor.

Al personal docente e investigador del Departamento de Química y a los miembros del PAS (Servicio de Laboratorios, Auxiliares de Servicios Generales, Administrativos...) del Edificio CCT.

---

*Agradecimientos*

---

A mi madre y mi hermana cuyo afecto y comprensión ha sido fundamental en estos años.

A mis amigos, que me acompañaron en esta aventura y que de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo de Jorge, que me ha apoyado en todo momento a lo largo de todos estos difíciles años.

A todos ellos, muchas gracias

---

## ÍNDICES Y ACRÓNIMOS

---



---

	Pág
<b>Capítulo I. Introducción</b>	<b>1</b>
I.1. Plaguicidas: generalidades	3
I.1.1. Conceptos generales	3
I.1.2. Aspectos toxicológicos	5
I.1.3. Utilización de plaguicidas	8
I.2. Medidas legislativas sobre el uso sostenible de productos fitosanitarios	10
I.3. Principales enfermedades fúngicas de la vid	13
I.3.1. Podredumbre gris o Botritis ( <i>Botrytis cinerea</i> )	13
I.3.2. Mildiu ( <i>plasmopara vitícola</i> )	16
I.3.3. Oidio ( <i>Uncinula necator</i> )	18
I.4. Fungicidas empleados en el viñedo	20
I.5. Residuos de plaguicidas en uvas. Límites máximos de residuos	22
I.6. Presencia de fungicidas en la vinificación. Influencia y desaparición	27
I.6.1. Proceso de vinificación de vinos tintos jóvenes	27
I.6.2. Eliminación de residuos de fungicidas durante la vinificación	33
I.6.3. Efectos de los residuos de fungicidas sobre la actividad de levaduras y bacterias lácticas	36
I.6.4. Influencia de los residuos de fungicidas en la composición fenólica de los vinos	40
I.7. Análisis de productos fitosanitarios en muestras enológicas	51
I.7.1. Extracción en fase líquida	52
I.7.2. Extracción en fase sólida	58
I.7.3. Determinación	66
I.7.4. Efecto matriz	68
I.8. Compuestos estudiados	70
I.9. Degradación de pesticidas	75
I.9.1. Procesos de degradación	75
I.9.2. Fotocatálisis	79
I.9.3. Cinética de degradación. Ecuación de velocidad	81
I.9.4. Identificación de metabolitos. Técnicas analíticas	82

---

<b>Capítulo II. Justificación y Objetivos</b>	<b>85</b>
<b>Capítulo III. Resultados y discusión</b>	<b>89</b>
<i>Capítulo III.1. Desarrollo de protocolos analíticos para la determinación de fungicidas en uvas, vino y otras muestras del proceso de vinificación</i>	<b>91</b>
III.1.1. Separación cromatográfica	93
III.1.2. Análisis de fungicidas en mosto y vino	94
III.1.2.1 Tipo de fase sólida	95
III.1.2.2. Elución. Tipo y volumen de disolvente	97
III.1.2.3. Etapa de lavado	99
III.1.2.4. Condiciones finales de SPE	101
III.1.3. Análisis de fungicidas en uvas	101
III.1.3.1. Extracción sólido-líquido (SLE)	102
III.1.3.2. Extracción asistida por microondas (MAE)	104
III.1.3.3. Extracción por dispersión de matriz (MSPD)	106
III.1.3.4. Extracción QuEChERS	110
III.1.4. Calibrado en extracto de matriz	110
III.1.5. Parámetros de calidad de los métodos de análisis	111
<i>Capítulo III.2. Distribución de los residuos de fungicidas en las partes de la uva. Aplicación y evolución de los residuos de piraclostrobin y boscalid en campo</i>	<b>113</b>
III.2.1. Estudio “in Vitro” de distribución de residuos en uva	115
III.2.2. Estudio en campo de distribución y evolución de residuos en uva	122
<i>Capítulo III.3. Evolución de los niveles de residuos de fungicidas durante el proceso de vinificación</i>	<b>129</b>
III.3.1. Aplicación en campo	131
III.3.2. Evolución de residuos de piraclostrobin y boscalid durante el	133



---

proceso de vinificación de uva tinta tempranillo	
<b>Capítulo III.4. Influencia de la presencia de boscalid y piraclostrobin en la calidad del vino final</b>	<b>147</b>
III.4.1. Determinaciones analíticas en vino	149
III.4.2. Fraccionamiento de compuestos polifenólicos	154
III.4.3. Determinación de compuestos polifenólicos mediante UPLC-MS/MS (ESI ±)	156
III.4.4. Análisis sensorial	159
III.4.5. Influencia de la presencia de residuos de piraclostrobin y boscalid	162
III.4.6. Influencia en la composición química de los vinos	182
<b>Capítulo III.5. Degradación de piraclostrobin y boscalid: hidrólisis, fotólisis y fotocátalisis</b>	<b>185</b>
III.5.1. Hidrólisis y fotólisis: estudios	188
III.5.2. Hidrólisis y fotólisis: resultados	190
III.5.2.1. Piraclostrobin	190
III.5.2.2. Boscalid	196
III.5.3. Fotocátalisis: estudio y resultados	200
III.5.3.1. Piraclostrobin	201
III.5.3.2. Boscalid	205
<b>Capítulo IV. Conclusiones</b>	<b>209</b>
<b>Capítulo V. Bibliografía</b>	<b>215</b>
<b>Capítulo VI. Anexos</b>	<b>247</b>
VI.1. Optimization and validation of a simple and fast method for the determination of fungicides in must and wine samples by SPE and GC/MS	249
VI.2. Validation of a microwave-assisted extraction gas chromatography detection method for the determination of fungicides in grapes	261
VI.3. Response surface optimization for determination of pesticide residues in grapes using MSPD and GC/MS: assessment of global uncertainty	275
VI.4. Comparison of four extraction methods	293
VI.5. Mobility and distribution of eight fungicides in surface, skin and pulp in grapes. An application to pyraclostrobin and boscalid	305

<i>VI.6. Evolution of pyraclostrobin and boscalid residues during elaboration of red wine. Effect of wine-making procedures in their disappearance</i>	321
<i>VI.7. Hydrolysis and photolysis of pyraclostrobin in water</i>	337
<i>VI.8. Photodegradation of boscalid in water</i>	347
<i>VI.9. Degradation intermediates and reaction pathway of pyraclostrobin with TiO<sub>2</sub> photocatalysis</i>	357
<i>VI.10. Photocatalytic degradation of boscalid in aqueous titanium dioxide suspension: identification of intermediates and degradation pathways</i>	369

---

**ÍNDICE DE TABLAS**


---

<b>Tabla I.1.</b>	Clasificación toxicológica de los plaguicidas según la USEPA	7
<b>Tabla I.2.</b>	Clasificación de los compuestos fenólicos	41
<b>Tabla I.3.</b>	Distribución en racimo y propiedades organolépticas más importantes de los principales compuestos fenólicos	42
<b>Tabla I.4</b>	Propiedades físico-químicas, comportamiento de la planta, y modo de acción de los fungicidas objeto de estudio	71
<b>Tabla III.1.</b>	Adsorbentes SPE empleados en la extracción de fungicidas	96
<b>Tabla III.2.</b>	Relación de pendientes entre extracto de matriz y disolvente para los diferentes métodos de extracción de plaguicidas en mosto/vino (SPE) y uvas	111
<b>Tabla III.3.</b>	Concentración de residuos de fungicida y porcentajes totales de sorción (respecto a la concentración inicial) en uva a tres niveles de concentración	117
<b>Tabla III.4.</b>	Variación de los porcentajes de distribución en las diferentes partes de la uva durante los 35 días	120
<b>Tabla III.5.</b>	Concentraciones residuales de los fungicidas determinadas en muestras de uva y de vino embotellado durante las campañas de 2008, 2009 y 2010.	135
<b>Tabla III.6.</b>	Condiciones en modalidad MS/MS auto	157
<b>Tabla III.7.</b>	Parámetros analíticos obtenidos para los patrones de cuantificación	158
<b>Tabla III.8.</b>	Parámetros de masas para los compuestos polifenólicos identificados	159

<b>Tabla III.9.</b>	Número mínimo de repuestas necesarias para considerar significativo el resultado del test dúo-trío según los diferentes niveles significativos	161
<b>Tabla III.10.</b>	Concentración obtenida por UPLC/MS-MS para los compuestos fenólicos en 2008	167
<b>Tabla III.11.</b>	Coordenadas CIElab de los vinos estudiados en 2008	168
<b>Tabla III.12.</b>	Concentración obtenida por UPLC/MS-MS para los compuestos fenólicos en 2009	174
<b>Tabla III.13.</b>	Coordenadas CIElab de los vinos estudiados en 2009	175
<b>Tabla III.14.</b>	Concentración obtenida por UPLC/MS-MS para los compuestos fenólicos en 2010	180
<b>Tabla III.15.</b>	Coordenadas CIElab de los vinos estudiados en 2010	181
<b>Tabla III.16</b>	Hidrólisis de piraclostrobin a $4 \pm 2$ °C, $25 \pm 2$ °C y $50 \pm 2$ °C en disolución acuosa a distintos pHs	191
<b>Tabla III.17</b>	Hidrólisis de boscalid a $4 \pm 2$ °C, $25 \pm 2$ °C y $50 \pm 2$ °C en disolución acuosa a distintos pHs	196

**ÍNDICE DE FIGURAS**

---

<b>Figura I.1.</b>	Síntoma de botritis en hoja (A) y ataque en brote joven (B)	14
<b>Figura I.2.</b>	Ataque de botritis en racimo	15
<b>Figura I.3.</b>	Síntomas de mildiu. A) Manchas en hoja. B) Pelusilla blanquecina en grano	17
<b>Figura I.4.</b>	Síntomas de oídio. A) Manchas iniciales en el brote. B) Ataque en racimo.	20
<b>Figura I.5.</b>	Evolución de los residuos de plaguicidas en función del tiempo	26
<b>Figura I.6.</b>	Diagrama de vinificación en vinos tintos jóvenes	28
<b>Figura I.7.</b>	Estructura química de los ácidos fenólicos	43
<b>Figura I.8.</b>	Estructura básica de flavonoides	44
<b>Figura I.9.</b>	Estructura de diferentes flavonoles	45
<b>Figura I.10.</b>	Esqueleto básico de los flavanoles	45
<b>Figura I.11.</b>	Esqueleto de las antocianidinas encontradas en la uva	46
<b>Figura I.12.</b>	Esquema de la técnica de microextracción en gota.	54
<b>Figura I.13.</b>	A) Representación del sistema de sujeción de la fibra mediante dos jeringas convencionales. B) Representación esquemática en la que la aguja de la jeringa sostiene la fibra y uno de los extremos está sumergido en la solución dadora.	55
<b>Figura I.14.</b>	Cartuchos y discos usados en SPE	59
<b>Figura I.15.</b>	Etapas principales de la extracción en fase sólida.	61

---

<b>Figura I.16.</b>	Esquema del proceso de MSPD.	63
<b>Figura I.17.</b>	Procesos de absorción y desorción en HS-SPME	65
<b>Figura I.18.</b>	Esquema del efecto matriz cromatográfico. Moléculas de analito. Molécula de un componente de la matriz .	69
<b>Figura III.1.</b>	Cromatograma obtenido por (a) GC-MS y (b) GC-EDC en acetato de etilo. Identificación de los picos: 1 Vinclozolin; 2 Diclofluanida; 3 Penconazol; 4 Captan; 5 Quinoxifen; 6 Tetradifon (IS); 7 Fluquinconazol; 8 Boscalid; 9 Piraclostrobin	95
<b>Figura III.2.</b>	Recuperaciones totales ( $R_1+R_2+R_3...+R_n$ ) con diferentes disolventes (n=3)	98
<b>Figura III.3.</b>	Recuperaciones totales con diferentes mezclas de lavado (n=3)	97
<b>Figura III.4.</b>	Superficies de deseo: a) Concentración de sal vs. cantidad de muestra (b) Volumen de acetato de etilo vs. cantidad de muestra	103
<b>Figura III.5.</b>	Recuperaciones para diferentes disolventes de extracción con MAE	104
<b>Figura III.6.</b>	Superficies de respuesta para captan y boscalid	105
<b>Figura III.7.</b>	Recuperaciones para diferentes fases sólidas con MSPD	107
<b>Figura III.8.</b>	Superficies de respuesta: (a) % acetato de etilo vs. volumen de disolvente para vinclozolin; (b) cantidad de fase sólida vs. volumen de disolvente (vinclozolin); (c) cantidad de fase sólida vs. volumen de disolvente (penconazol); (d) % acetato de etilo vs. volumen de disolvente (penconazol).	109
<b>Figura III.9.</b>	Valores de Q (relación pulpa/piel) medios entre las tres concentraciones estudiadas durante 35 días.	121
<b>Figura III.10.</b>	Distribución de los residuos de piraclostrobin en las diferentes partes de la uva (superficie, piel y pulpa) para el tratamiento individual (Cabrio Top®) y la mezcla (Bellis®).	124

---

<b>Figura III.11.</b>	Distribución de los residuos de boscalid en las diferentes partes de la uva (superficie, piel y pulpa) para el tratamiento individual (Cantus®) y mezcla (Bellis®)	126
<b>Figura III.12.</b>	Distribución de las aplicaciones en la parcela experimental según las buenas prácticas agrícolas (BPA) y las críticas prácticas agrícolas (PAC). Productos fitosanitarios aplicados.	132
<b>Figura III.13.</b>	Porcentaje de residuos de piraclostrobin que permanecen después de las diferentes etapas de vinificación para los tratamientos de Cabrio Top y Bellis bajo PAC: 1) uva; 2) mosto prensado; 3) final fermentación alcohólica; 4) final fermentación maloláctica; 5) clarificación; 6) filtración	137
<b>Figura III.14.</b>	Ajustes lineales entre el logaritmo neperiano de la concentración residual de piraclostrobin para la fermentación alcohólica (triángulos naranjas) y la fermentación maloláctica (cuadrados granates) para ambos tratamientos, Cabrio Top y Bellis, bajo PAC.	139
<b>Figura III.15.</b>	Porcentaje de residuos de boscalid que permanecen después de las diferentes etapas de vinificación para los tratamientos de Cantus y Bellis (mezcla) bajo BPA y PAC: 1) uva; 2) mosto prensado; 3) final fermentación alcohólica; 4) final fermentación maloláctica; 5) clarificación; 6) filtración.	141
<b>Figura III.16.</b>	Ajustes lineales entre el logaritmo neperiano de la concentración residual de boscalid para la fermentación alcohólica (triángulos naranjas) y la fermentación maloláctica (cuadrados granates) para ambos tratamientos, Cantus y Bellis, bajo BPA y PAC	143
<b>Figura III.17.</b>	Ajustes lineales entre el logaritmo neperiano de la concentración residual de boscalid para la fermentación alcohólica (triángulos naranjas) y la fermentación maloláctica (cuadrados granates) para ambos tratamientos, Cantus y Bellis, bajo PAC.	144
<b>Figura III.18.</b>	L* = luminosidad del color. a* = valores (-) indican verde y (+) rojo. b* = valores (-) indican azul y (+) amarillo.	153
<b>Figura III.19.</b>	Carta de color y coordenadas típicas para vinos tintos	153
<b>Figura III.20.</b>	Ficha de cata para el test duo-trío	160



<b>Figura III.21.</b>	Evolución de la fermentación alcohólica en 2008	164
<b>Figura III.22.</b>	Parámetros enológicos obtenidos para los distintos tratamientos en la vinificación de 2008	165
<b>Figura III.23.</b>	Evolución de la fermentación alcohólica en 2009	171
<b>Figura III.24.</b>	Parámetros enológicos obtenidos para los distintos tratamientos en la vinificación de 2009	172
<b>Figura III.25.</b>	Evolución de la fermentación alcohólica 2010	177
<b>Figura III.26.</b>	Parámetros enológicos obtenidos para los distintos tratamientos en la vinificación de 2010	179
<b>Figura III.27.</b>	Análisis de componentes principales	183
<b>Figura III. 28.</b>	Ruta hidrolítica de piraclostrobin	192
<b>Figura III. 29.</b>	(A) Ruta degradativa de piraclostrobin. (B) Evolución de los fotoproductos durante la fotólisis.	195
<b>Figura III. 30.</b>	Mecanismo de degradación fotolítica para boscalid	198
<b>Figura III. 31</b>	Evolución de boscalid y sus productos de degradación (A) Productos monohidroxilados (B) Productos con m/z 357 (pérdida de cloro) (C) Evolución de los dos subproductos obtenidos de la ruptura del enlace amida-benceno.	199
<b>Figura III. 32</b>	Mecanismo de degradación fotocatalítica para piraclostrobin	203
<b>Figura III. 33</b>	Evolución, distribuida en grupos por su semejanza en estructura, de los subproductos obtenidos de la degradación fotocatalítica de piraclostrobin	204
<b>Figura III. 34</b>	Mecanismo de degradación fotocatalítica para boscalid	207
<b>Figura III. 35</b>	Evolución de los subproductos, agrupados por semejanza en estructura o por vía de degradación, durante la degradación fotocatalítica de boscalid.	208

---

**ACRÓNIMOS**


---

<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i>	Análisis de componentes principales
<b>ASE</b>	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>	Extracción con disolventes presurizados
<b>BPA</b>		Buenas prácticas agrícolas
<b>CARB</b>		Carbón grafitizado no poroso
<b>CAS</b>	<i>Chemical abstracts service</i>	
<b>CCD</b>	<i>Central Composite Design</i>	Diseño central compuesto
<b>CEE</b>		Comunidad Económica Europea
<b>CL<sub>50</sub></b>		Concentración letal media
<b>D.O.</b>		Denominación de origen
<b>DAD</b>	Diode-Array Detector	Detector de diodos
<b>DIF</b>	<i>Département Fédéral de l'Intérieur</i>	Departamento federal del interior
<b>DI-SDME</b>		Inmersión directa
<b>DL<sub>50</sub></b>		Dosis letal media
<b>DLLME</b>		microextracción líquido-líquido dispersiva
<b>DRTA</b>		Dosis de referencia de toxicidad aguda
<b>DVB</b>		Divinibenceno
<b>ECD</b>	Electron Capture Detector	Detector de captura de electrones
<b>ESI</b>	Electrospray ionization	Ionización por electrospray
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i>	Organización para la Agricultura y la Alimentación

---

<b>FRAC</b>	<i>Fungicide Resistance Action Committee</i>		
<b>FTIR</b>	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>		Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography Chromatograph</i>	(or	Cromatografía de gases o cromatógrafo de gases
<b>HF-LPME</b>			microextracción en fibra hueca
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Chromatography</i>	<i>Liquid</i>	Cromatografía de líquidos de alta presión
<b>HS-SPME</b>			espacio de cabeza
<b>IDA</b>			Ingesta diaria admisible
<b>IMP</b>	<i>Integrated Pest Management</i>		Manejo integrado de plagas
<b>IS</b>	<i>Internal Standard</i>		Patrón interno
<b>Kow</b>	Octanol-Water Coefficient	Partition	Coeficiente de partición octanol-agua
<b>LC</b>			Límite de cuantificación
<b>LD</b>			Límite de detección
<b>LLE</b>	<i>Liquid-liquid Extraction</i>		Extracción líquido-líquido
<b>LMR</b>			Límite máximo de residuos
<b>LPME</b>			microextracción líquido-líquido
<i>m/z</i>	<i>Mass/charge ratio</i>		Relación masa/carga
<b>MAE</b>	<i>Microwave Assisted Extraction</i>		Extracción asistida por microondas
<b>MeOH</b>			Metanol
<b>MIPs</b>			Polímeros de impresión molecular

---

<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>	espectrometría de masas
<b>MS/MS</b>	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>	Espectrometría de masas en tándem
<b>MSPD</b>	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i>	dispersión de matriz en fase sólida
<b>-NH<sub>2</sub></b>		Aminopropil
<b>NPD</b>	<i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i>	Detector de nitrógeno y fósforo
<b>OIV</b>		Organización Internacional de la Viña y el Vino
<b>PA</b>		Poliacrilato
<b>PAC</b>		Prácticas agrícolas críticas
<b>PAL</b>		Enzima fenilalanina-amonioliasa
<b>PDMS</b>	<i>Polydimethylsiloxane</i>	Polidimetilsiloxano
<b>PS</b>		Poliestireno
<b>PSA</b>	<i>Primary-Secondary Amine</i>	Amina primaria y secundaria
<b>PVPP</b>		polivinilpirrolidona
<b>QuEChERS</b>	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>	
<b>RD</b>		Real decreto
<b>RMN</b>		Resonancia Magnética Nuclear
<b>S.A.</b>		Sociedad anónima
<b>SAX</b>	<i>Strong Anion Exchange</i>	Fuerte intercambio aniónico
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i>	Desviación estándar
<b>SDME</b>	<i>Single Drop Microextraction</i>	Microextracción en gota

<b>SIM</b>	<i>Single Ion Monitorization</i>	Monitorización de un solo ión
<b>SLE</b>	<i>Solid-Liquid Extraction</i>	Extracción sólido-líquido
<b>SPE</b>	<i>Solid-Phase Extraction</i>	Extracción en fase sólida
<b>SPME</b>	<i>Solid-Phase Microextraction</i>	microextracción en fase sólida
<b>UE</b>		Unión Europea
<b>UHPLC</b>	Ultra High Performance Liquid Chromatography	Cromatografía líquida de ultra alta presión
<b>USEPA</b>	<i>United States Environmental Protection Agency</i>	Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos
<b>UV</b>		Ultravioleta

## **INTRODUCCIÓN**

---



## I.1. PLAGUICIDAS: GENERALIDADES

### I.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”.



De acuerdo con la Directiva de la Unión Europea 91/414/CEE se considera producto fitosanitario o plaguicida a toda sustancia activa o preparado comercial que contenga una o más sustancias activas destinadas a:

- Proteger los vegetales o productos vegetales contra todos los agentes nocivos.
- Influir en el proceso vital de los vegetales de forma distinta a como lo hacen las sustancias nutritivas (ej.: fitorreguladores).
- Mejorar la conservación de los productos vegetales.
- Destruir los vegetales inconvenientes (malas hierbas).

Los plaguicidas se emplean formulados, es decir, debidamente acondicionados para obtener la máxima efectividad en su uso. En toda formulación se distingue:

1. Materia activa o ingrediente activo: es la parte del producto que actúa realmente contra la plaga o enfermedad, pudiéndose dar el caso de que en un mismo producto comercial entren dos o más materias activas, con lo que se refuerza su acción contra una misma plaga o se amplía a varias plagas diferentes.
2. Materias o ingredientes inertes: no aportan en general ninguna cualidad específica, siendo su misión básica la de dar cuerpo al producto, facilitando su formulación comercial.
3. Coadyuvantes: son sustancias útiles en la elaboración de plaguicidas por su capacidad para modificar las características físicas y químicas de los ingredientes activos. Estas sustancias pueden ser mojantes (aumentan la viscosidad e incrementan la adherencia del producto a la hoja), dispersantes

(aumentan la homogeneidad) o estabilizadores (protegen a la materia activa de una degradación rápida).

4. Aditivos: sustancias tales como colorantes y repulsivos que, sin tener efecto sobre la eficacia de los plaguicidas, son utilizados en la elaboración de los mismos para cumplir prescripciones reglamentarias y/o reforzar las medidas de seguridad en el empleo de los productos fitosanitarios.

Según el agente perjudicial que se quiera combatir, los plaguicidas o productos fitosanitarios se dividen en: insecticidas (insectos), fungicidas (hongos), herbicidas (malas hierbas), acaricidas (ácaros), nematocidas (nematodos), molusquicidas o helicidas (caracoles y babosas), avicidas (aves y pájaros perjudiciales), rodenticidas (roedores) y bactericidas (bacterias).

### **I.1.2. Aspectos toxicológicos**

El uso de plaguicidas puede provocar contaminación en el aire, agua, suelo y en los propios cultivos, así como afectar a la salud de la población [Cormis, 1991]. Una vez que ha llegado un plaguicida al ambiente, bien por utilización o bien por accidente, su distribución y persistencia en el medio es una compleja función que depende de numerosos factores físicos, químicos y biológicos. Entre los principales riesgos de los plaguicidas se encuentran [López *et al.*; 2000]:

- *Riesgos para la agricultura.* La aplicación de plaguicidas sobre un cultivo puede entrañar un peligro potencial para la planta sobre la que se aplica y otras próximas. Entre los daños que los plaguicidas originan en la agricultura destacan: la eliminación de predadores naturales de las plagas; la aparición de resistencias en los organismos que son objeto de la lucha química, y la alteración del equilibrio ecológico al eliminar uno o varios

eslabones en la cadena trófica, que puede provocar la aparición de nuevas plagas por ausencia de predadores o competidores.

- *Riesgos para el medio ambiente.* El efecto de los plaguicidas en el ambiente depende de la vulnerabilidad del ecosistema. Los más susceptibles son aquellos que se regeneran fácilmente y que reciben de manera regular grandes cantidades de plaguicidas, como son los campos de monocultivo. Muchos de los plaguicidas (sobre todo los persistentes) permanecen en las plantas, son absorbidos por el suelo y sus bacterias (que los metabolizan) y los más solubles son arrastrados por las aguas de escorrentía superficial, pudiendo llegar posteriormente a ser absorbidos por animales, tanto domésticos como salvajes, lo cual puede plantear graves problemas.
- *Riesgos para la salud humana.* Los plaguicidas plantean problemas para el hombre a corto y largo plazo, debido a la capacidad que tienen muchos de estos productos de provocar daños en el organismo (carcinogenicidad, teratogenicidad, mutagenicidad, efectos en el hígado, alteraciones hormonales,...). La exposición de las personas a los plaguicidas es distinta según el grupo de población, siendo más elevada en personas directamente expuestas (trabajadores que intervienen en la fabricación, formulación, transporte, almacenamiento, venta y aplicación de los plaguicidas) que en la población en general (expuestos a residuos de plaguicidas que quedan en los alimentos, agua, aire,...).

La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha recomendado una clasificación de plaguicidas según su toxicidad (ver tabla I.1.).

Tabla I.1. Clasificación toxicológica de los plaguicidas según la USEPA [Tomlin, 2003].

CLASE	DL <sub>50</sub> en ratas			Efectos oculares	Efectos dérmicos
	Oral (mg kg <sup>-1</sup> )	Dérmica (mg kg <sup>-1</sup> )	Inhalatoria (mg L <sup>-1</sup> )		
I	<50	<200	<0,2	Opacidad corneal irreversible y corrosivo	Corrosivo
II	50-500	200-2000	0,2-2	Opacidad corneal reversible en 7 días e irritación persistente	Irritación severa a las 72 h
III	500-5.000	2000-20.000	2-20	Irritación reversible en 7 días	Irritación moderada a las 72 h
IV	>5.000	>20.000	>20	Sin irritación	Irritación leve a las 72 h

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<sub>50</sub>), 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<sub>50</sub> dérmica aguda, cantidad de plaguicida, expresada en mg kg<sup>-1</sup>, 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<sub>50</sub>), y se define como la cantidad de tóxico en mg L<sup>-1</sup> 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.

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<sub>50</sub> o CL<sub>50</sub> 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.

### **I.1.3. Utilización de plaguicidas**

A pesar de los efectos secundarios indeseables que comporta el uso de productos fitosanitarios, el empleo de los mismos resulta imprescindible en la actualidad para garantizar unas producciones agrícolas regulares y de calidad. Según estimaciones de la FAO las pérdidas de cosecha debidas a plagas y enfermedades a nivel mundial son del orden del 25-35%, pero en ausencia de protección fitosanitaria podrían elevarse al 70%. Es necesario encontrar el equilibrio entre la necesidad de producir alimentos y la obligación de proteger el medio ambiente dado que el sector fitosanitario invierte enormes cantidades en la

investigación y el desarrollo de nuevas materias activas que sean específicas, de corta vida y que no se acumulen en la cadena alimentaria.

En la actualidad La Unión Europea representa, con una venta anual de aproximadamente 280.000 toneladas de sustancias activas, una cuarta parte del mercado mundial. Los principales tipos de productos son los fungicidas (un 38% del mercado), seguidos por los herbicidas (36%), los insecticidas (13%) y otros plaguicidas (13%). La industria fitosanitaria europea da empleo en Europa a unas 26.000 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 aportar ventajas económicas y sociales también plantea efectos adversos, en algunos casos irreversibles, derivados de la exposición directa o indirecta del hombre y del medio ambiente a esas sustancias.

Los plaguicidas tienen un sinnúmero de aplicaciones prácticas, pero es en el ámbito agrícola donde se realiza un gasto superior. 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.

## **I.2. MEDIDAS LEGISLATIVAS 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 reducir al mínimo los posibles daños que produzcan en el medio ambiente y en la salud de personas y animales. En consecuencia, la UE aplica los mecanismos necesarios para que sólo puedan comercializarse aquellos productos fitosanitarios que sean útiles y eficaces para combatir las plagas mediante un sistema comunitario armonizado para comercializar y utilizar productos fitosanitarios. La Directiva 91/414/CEE establece normas uniformes en materia de evaluación, autorización, comercialización y control dentro de la Unión Europea (UE) de

productos fitosanitarios y de las sustancias activas que contienen. Únicamente están autorizados los productos fitosanitarios cuyas sustancias activas figuren en la lista del anexo I de esta Directiva y que si se utilizan en condiciones normales, no presentan riesgos para la salud humana o animal ni para el medio ambiente. La transposición de esta Directiva al ordenamiento jurídico español se realizó a través del Real Decreto 2163/1994, y posteriores modificaciones. Del mismo modo, la UE enumera las sustancias activas que no pueden salir al mercado ni ser utilizadas [Directiva 79/117/CEE] debido a sus efectos nocivos para la salud humana o animal, o bien por efectos negativos inadmisibles en el medio ambiente. No obstante, a escala nacional se autoriza la concesión de excepciones temporales para ciertos usos.

Si bien la UE autoriza aquellas sustancias activas que pueden utilizarse en la formulación de productos fitosanitarios, es responsabilidad de cada Estado Miembro el autorizar individualmente los productos fitosanitarios que deseen comercializar en su territorio. En España, y de acuerdo con el Real Decreto 3349/1983, se requiere una autorización e inscripción en el Registro Oficial de Productos y Material Fitosanitario, previa a su fabricación y comercialización.

Para garantizar la libre circulación de productos fitosanitarios, la Directiva 91/414/CEE prevé el reconocimiento mutuo de las autorizaciones concedidas por los Estados miembros, siempre y cuando sean comparables las condiciones agrícolas, ambientales y fitosanitarias de las regiones correspondientes.

A pesar del marco normativo vigente, se siguen encontrando cantidades indeseables de ciertos plaguicidas en los distintos medios (sobre todo suelo, aire y agua) y detectando en productos agrícolas residuos por encima de los límites reglamentarios. Por dicho motivo, el Programa Comunitario de Acción en Materia



de Medio Ambiente para 2001-2010, el Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea reconocieron la necesidad de seguir reduciendo los efectos de los plaguicidas sobre la salud humana y el medio ambiente, especialmente los relativos a los productos fitosanitarios.

En julio de 2006, la Comisión Europea aprobó “La estrategia temática sobre el uso sostenible de los plaguicidas” [COM/2006/0372 final]. Esta estrategia pretende reducir o eliminar la aplicación de plaguicidas, especialmente a través de la sensibilización de los usuarios, la promoción del uso de los códigos de buenas prácticas y la disponibilidad de los medios financieros necesarios para la investigación aplicada y la formación. Para ello, el Consejo de la Unión Europea y el Parlamento Europeo han aprobado un nuevo marco legislativo en materia de plaguicidas basado en dicha estrategia:

- (1) El Reglamento 1107/2009 regula la comercialización de productos fitosanitarios y deroga las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE. La finalidad de dicho Reglamento es garantizar un nivel elevado de protección de la salud humana y animal, así como del medio ambiente y mejorar el funcionamiento del mercado interior europeo mediante la armonización de las normas sobre la comercialización de productos fitosanitarios.
- (2) La Directiva 2009/128/CE establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir el uso sostenible de los plaguicidas en la UE que garantice la salud de los consumidores y de los operadores que los utilizan así como el respeto al medio ambiente.

### I.3.- PRINCIPALES ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA VID

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

#### I.3.1. Podredumbre gris o Botritis (*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 °C, aunque puede realizarse con temperaturas comprendidas entre 0 y 40 °C. 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 [Pérez Marín, 2004].

La podredumbre gris puede afectar a todos los órganos verdes de la cepa, pero principalmente a los racimos.

- En hojas. Los síntomas se manifiestan en el borde del limbo en forma de amplias necrosis que tienen el aspecto de quemaduras (ver figura I.1); si el tiempo es húmedo aparece sobre el borde de las manchas un polvillo gris.
- En brotes jóvenes y sarmientos. Los primeros síntomas se manifiestan por la presencia de manchas alargadas de color achocolatado, que se recubren de una pelusilla gris si el tiempo es húmedo. Al final de la vegetación aparecen unas manchas negruzcas y alargadas sobre un fondo blanquecino a lo largo del sarmiento y principalmente en su extremo (ver figura I.1.). Los ataques fuertes pueden ocasionar la pérdida de algunos brotes jóvenes, con la consiguiente disminución de la cosecha, y posteriormente la de algunas yemas de la base de los sarmientos, que no brotan al año siguiente.



Figura I.1. Síntoma de botritis en hoja (A) y ataque en brote joven (B).

- En racimos. Los síntomas durante el período de floración-cuajado se manifiestan sobre las inflorescencias y en el raspón del racimo en forma de manchas de color marrón oscuro. Durante el período envero-recolección, los granos (e incluso el raspón y las inflorescencias) presentan un aspecto

podrido y sobre su superficie se desarrolla un moho grisáceo característico, tal y como se muestra en la figura I.2.

La botritis es una enfermedad temida por los agricultores porque produce daños importantes en la cosecha. En el caso particular de la uva de mesa, la pérdida cuantitativa puede ser importante, ya que obliga a la eliminación manual de los granos atacados para dejar el racimo presentable para su comercialización, e incluso si el ataque es importante, impide su comercialización.



Figura I.2. Ataque de botritis en racimo

En cuanto a aspectos cualitativos, la botritis es capaz de provocar importantes modificaciones en la composición de la uva, mosto y del vino. En la uva, la enfermedad altera las características organolépticas que afectan gravemente a la posterior fermentación del mosto. El hongo actúa sobre la superficie de la baya u hollejo destruyendo la materia colorante y los compuestos odorantes. En el mosto provoca degradación de azúcares y compuestos nitrogenados, alteración de los equilibrios ácidos, reducción del contenido de vitaminas y desarrollo de una actividad enzimática típica (la lacasa) que afecta a la calidad del vino por sus efectos oxidativos. La enzima lacasa, segregada por el hongo *Botrytis cinerea*, es

resistente a los procesos de vinificación, afecta negativamente a la calidad de los vinos produciendo una oxidación del color al degradar los polifenoles (antocianos y taninos), generando olores desagradables al transformar la composición fenólica y provocando una pérdida de aroma al combinarse con los precursores aromáticos.

### **I.3.2. Mildiu (*Plasmopara viticola*)**

Esta enfermedad es una de la más 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 y T<sup>a</sup> superior a 12 °C. Las condiciones necesarias para que se produzca una contaminación secundaria son: presencia de conidias o agua líquida (lluvia o humectación de las hojas superior a las 2 horas). Los ataques más graves de mildiu se producen cuando a un invierno húmedo le sigue una primavera y verano lluviosos, siendo 25 °C la temperatura óptima para su desarrollo. 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. Estos síntomas pueden observarse en la figura I.3.

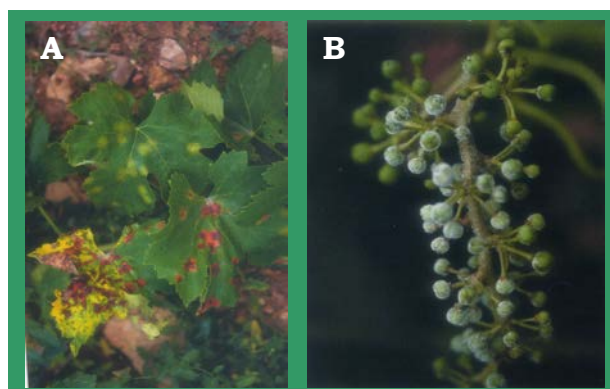


Figura I.3. Síntomas de mildiu. A) Manchas en hoja. B) Pelusilla blanquecina en grano

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 botritis 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.

### **I.3.3. 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", conociéndose 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. Para una T<sup>a</sup> de 15 °C comienza a ser favorable su progreso vegetativo y su propagación, alcanzando el óptimo entre los 25 °C y 28 °C, deteniendo su desarrollo a 35 °C y siendo letales las temperaturas superiores a 40 °C. 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 de 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 negrozco 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.4. se observan los ataques en brotes y racimos.



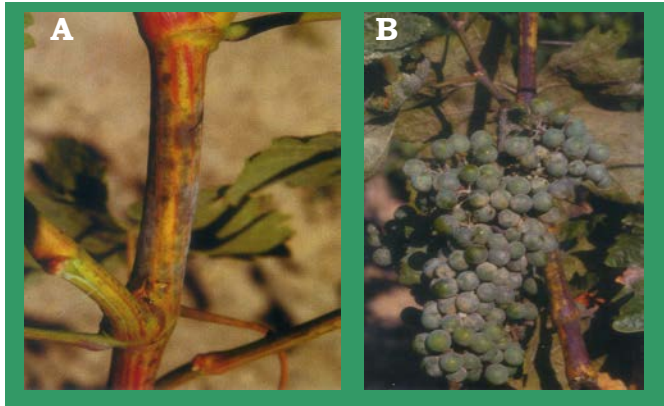


Figura I.4. Síntomas de oídio. A) Manchas iniciales en el brote. B) Ataque en racimo.

#### I.4. FUNGICIDAS EMPLEADOS EN EL VIÑEDO

Los fungicidas son aquellos plaguicidas destinados a controlar hongos patógenos causantes de enfermedades como mildiu, oídio y botritis en viñedo, tal y como se ha comentado en apartados anteriores.

Atendiendo a su comportamiento en la planta una vez aplicados, los fungicidas pueden agruparse en los siguientes grupos:

- *Superficiales o de contacto.* Son los productos que una vez aplicados en la planta no penetran en los tejidos vegetales por lo que únicamente ejercen su acción sobre la superficie cubierta por el producto (acción local), no protegiendo los órganos formados después del tratamiento. Es decir, se consideran preventivos o protectores ya que previenen la infección inhibiendo al patógeno antes de que éste haya penetrado en la planta y se haya establecido en sus tejidos. Al no penetrar en los tejidos son lavados por lluvias superiores a 10 mm, con lo que su persistencia no es larga (inferior a 7 días) por lo que hasta el presente no han mostrado riesgos de resistencias.

- *Penetrantes o sistémicos translaminares.* Penetran en los tejidos de la planta, pero no se trasladan interiormente por ellos, ejerciendo únicamente su acción en el sitio donde fueron aplicados. Por lo tanto, al igual que los fungicidas de contacto, no protegen los órganos formados después del tratamiento.
- *Sistémicos.* Son aquellos productos que penetran en los tejidos de las plantas y se desplazan por ellos a través de la savia, ejerciendo su actividad en sitios lejanos a donde fueron aplicados y en los órganos que, por el crecimiento, aparecen después de la aplicación (hasta 10-12 días después de la aplicación).

Tanto los fungicidas penetrantes como sistémicos se consideran curativos ya que, por penetrar en los tejidos, detienen o impiden el desarrollo del micelio después de que el hongo haya penetrado en la planta. No son lavados por la lluvia si transcurren 1-2 horas tras el tratamiento, su persistencia es más larga (10 días para los penetrantes y 12 días para los sistémicos), pero presentan el riesgo de aparición de resistencias. Además, ambos también tienen un carácter preventivo, inhiben al hongo para que no penetre en los tejidos. Otro punto importante es que la acción curativa sólo es eficaz si los tratamientos se realizan dentro de un determinado plazo de tiempo contado a partir del momento en que se produjo la infección. En el caso de los fungicidas antibotróficos este intervalo de tiempo queda reducido a unas pocas horas por lo que esos fungicidas tienen una acción más bien preventiva. Por el contrario, los fungicidas antimildiu pueden impedir el desarrollo del hongo si se aplican varios días (2-6 días) después de haberse producido la infección.

A su vez, según la forma de actuar los fungicidas podrían clasificarse en dos grandes grupos: (i) los fungicidas “multi-diana” (de contacto, generalmente) que actúan interfiriendo simultáneamente varios procesos vitales del hongo, y (ii) los fungicidas “mono-diana”, que suelen ser penetrantes o sistémicos, que afectan a un sólo proceso vital (inhibidores de la respiración, inhibidores de la división celular, etc.).

## **I.5. RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN UVAS. LÍMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS.**

En el cultivo de la vid pueden aparecer residuos de plaguicidas en la uva vendimiada como consecuencia de la aplicación de los tratamientos fitosanitarios. En este caso, los tratamientos que influyen decisivamente en el contenido final en residuos son los que se realizan más próximos a la vendimia, destacando los tratamientos fungicidas contra botritis. El contenido de estos residuos en el momento de la recolección depende tanto del depósito que queda inmediatamente tras la aplicación, como de lo que sucede entre ésta y la recolección. Entre los factores que afectan a la cantidad de plaguicida que queda en el racimo al acabar la aplicación se encuentran: la dosis aplicada, la naturaleza química del plaguicida y de su formulación (que determinan una mayor o menor adherencia), el tipo de aplicación, las condiciones climáticas y las características del sustrato vegetal (tamaño de las bayas y compacidad del racimo).

Una vez realizada la aplicación del plaguicida, el depósito inicial va disminuyendo con el tiempo según:

- El crecimiento del racimo (al aumentar el peso, la proporción de residuo en peso es menor)

- El tipo de formulación aplicada. Los depósitos procedentes de espolvoreo suelen ser menos persistentes que los procedentes de pulverizaciones.
- La lluvia y viento, que actúan mecánicamente arrastrando el plaguicida. Su acción depende de su intensidad, duración, tipo y formulación de plaguicida y momento en que tiene lugar tras la aplicación.
- La volatilización del plaguicida, es decir, su paso al estado de vapor y eliminación en la atmósfera.
- La degradación química que depende de la estabilidad de la molécula del plaguicida, de la temperatura y de la radiación solar.

El *Codex Alimentarius* entiende por residuo de plaguicida “toda sustancia presente en un producto alimenticio destinado al hombre o a los animales como consecuencia de la utilización de un plaguicida”. Este concepto de residuo engloba no sólo los restos de la molécula del plaguicida en su forma original, si no también todos los productos de degradación o metabolitos con significación toxicológica. Por lo tanto, además de los mecanismos de regulación de productos fitosanitarios y de las materias activas que los componen, es necesario garantizar que los residuos de los mismos en alimentos no se encuentren en niveles que supongan un riesgo inaceptable para los seres humanos. Para ello, las diferentes Administraciones Públicas de los diferentes países han fijado en los últimos años, límites máximos de residuos (LMR) para cada uno de los plaguicidas en diferentes productos de origen vegetal y animal. Un LMR se define como “la concentración máxima de residuos de un plaguicida permitida legalmente en la superficie o parte interna de los productos vegetales destinados a la alimentación humana o animal”. Debe quedar claro que un LMR es un concepto o valor legal, no necesariamente toxicológico. Ello es debido a que en su estimación se tienen en cuenta tanto criterios agronómicos como criterios toxicológicos. Según los primeros, quienes soliciten la

aprobación de un plaguicida deben presentar información científica sobre las cantidades mínimas de plaguicidas necesarias para proteger una cosecha y el nivel de residuos que queda en la cosecha después de dicho tratamiento. Siguiendo un criterio toxicológico, se calcula la máxima ingesta de residuos de plaguicidas a través de todos los alimentos, para el consumo a corto y largo plazo y para las diversas dietas de consumidores europeos. Esta ingesta se compara con un parámetro que refleja la toxicidad crónica (Ingesta Diaria Admisible-IDA) y con un parámetro que refleja la toxicidad aguda (Dosis de Referencia de Toxicidad Aguda-DRTA).

Durante muchos años la UE ha tratado de armonizar los LMR en los países que la integran con la promulgación de diversas directivas que establecían algunos LMR en determinados productos alimenticios. Sin embargo, para los productos y plaguicidas que no existían LMR europeos, los Estados Miembros podían fijar un LMR a nivel nacional para facilitar el comercio y proteger la salud de los consumidores. La verdadera armonización relativa a LMR no se consiguió hasta 2005, gracias al 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 178/2006, 149/2008, 260/2008, 299/2008, 839/2008 y 256/2009). Es de especial interés el anexo I del Reglamento 178/2006, en el que se incluye la lista de alimentos y piensos a los que se aplican contenidos máximos de residuos de plaguicidas; así como los diferentes anexos del Reglamento 149/2008, en donde se establecen los LMRs (anexos II y III) para los productos que figuran en el anexo I antes citado y la lista de sustancias activas que, por sus características o por su forma de aplicación, se encuentran exentas de la fijación de LMR (anexo IV). Para aquellas situaciones en las que un

plaguicida no se menciona específicamente en ningún anexo, se aplicará un LMR general de 0,01 mg kg<sup>-1</sup>, por defecto.

Por otra parte, la presencia de residuos de fungicidas en productos transformados como el vino, no está regulado a nivel comunitario. El artículo 20 del Reglamento 396/2005 dispone que, cuando no se hayan establecido LMRs para alimentos transformados, se aplicarán los LMRs correspondientes a la materia prima o producto fresco teniendo en cuenta los cambios en los niveles de residuos de plaguicidas debidos a la transformación o mezcla. El mismo Reglamento prevé la inclusión de esos factores específicos de concentración o dilución para determinadas operaciones de transformación o mezcla, o para determinados productos transformados o compuestos, en un anexo de la misma (Anexo VI). Actualmente, estos factores de transformación no han sido todavía publicados. Algunos países como Suiza [OSEC, 2010] o Italia [Decreto Ministeriali, 2004] han mostrado su iniciativa legislativa al fijar sus propios LMRs en vinos para algunos plaguicidas, aunque no para todos.

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 (diferentes climas, 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, 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 (ver figura I.5.) a lo largo del tiempo, específicas para cada vegetal y plaguicida, hasta que la cuantía de sus residuos sea similar o 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 disipación.

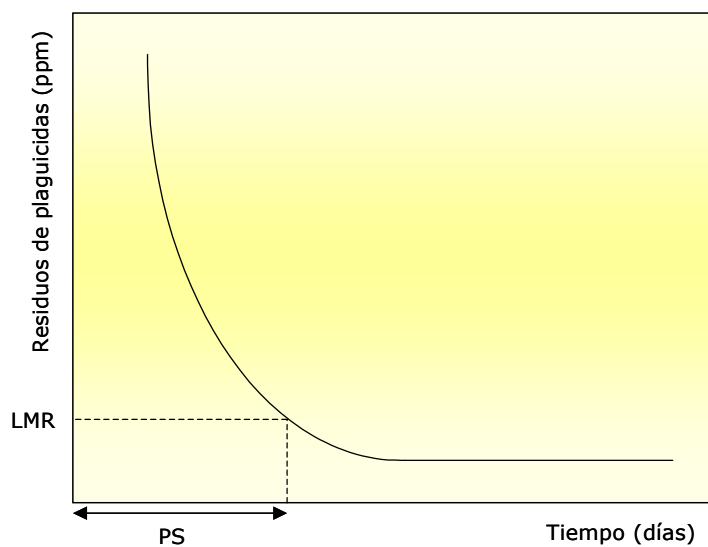


Figura I.5. Evolución de los residuos de plaguicidas en función del tiempo

## I.6. PRESENCIA DE FUNGICIDAS EN EL PROCESO DE VINIFICACIÓN. INFLUENCIA Y DISIPACIÓN.

### I.6.1. Proceso de vinificación de vinos tintos jóvenes.

Existen diversas formas de definir el vino pero quizás la definición más completa sea la que establece la Ley de la Viña y el Vino [Ley 24/2003]: “el vino es el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva”. El proceso de vinificación consta de múltiples etapas en función de la variedad de la uva y de las técnicas enológicas consideradas. A continuación se describen las principales etapas del proceso de elaboración de vinos tintos jóvenes llevados a cabo en la Denominación de Origen Calificada Rioja [Ruiz, 2004]. En la figura I.6 se muestra el esquema general de vinificación en tinto por el método tradicional.

Inicialmente la uva, una vez alcanzado el índice de madurez apropiado, se vendimia y se transporta a la bodega. A su llegada, el raspón puede ser retirado mediante el *despalillado* para evitar un aporte excesivo de amargor al mosto y, a continuación, se realiza un suave *estrujado*; ambas operaciones pueden llevarse a cabo con la misma máquina (despalilladora-estrujadora). La presencia de raspones durante la fermentación aumenta el contenido en polifenoles, pero a su vez se extraen los taninos astringentes, rebajándose así la calidad del vino obtenido. Además, la retirada del raspón supone una economía del espacio ocupado (supone un 30% de la vendimia en volumen y un 3-7% en peso), facilita el control de la temperatura de fermentación y se evita la fijación de etanol y materia colorante en el mismo. Por otro lado, el estrujado facilita la salida del mosto, la maceración y provoca una aireación que propicia el arranque de la fermentación.



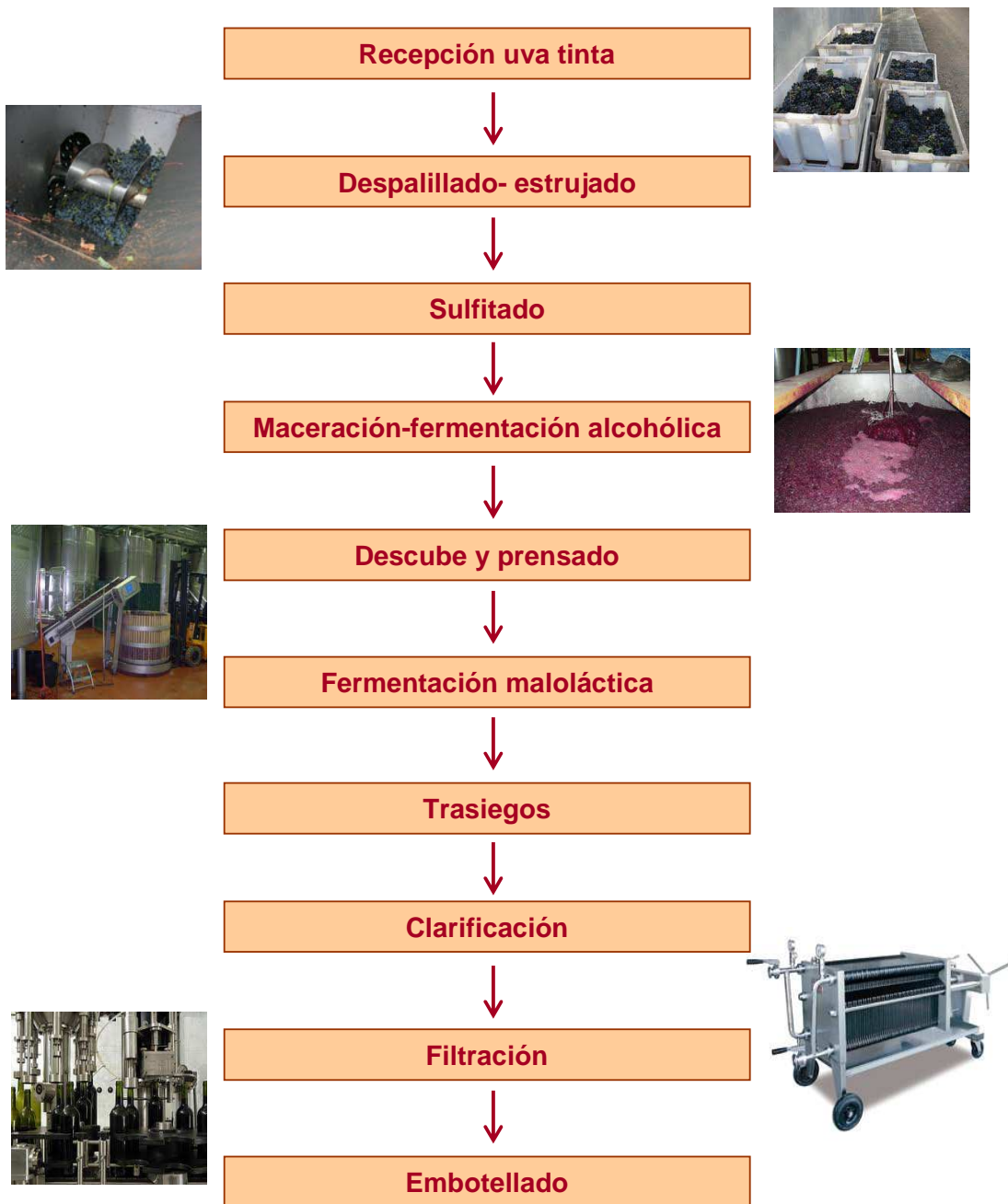


Figura I.6. Diagrama de vinificación en vinos tintos jóvenes

La vendimia estrujada se manda a los depósitos de fermentación por medio de una bomba y se procede al *sulfitado* (adición de anhídrido sulfuroso, SO<sub>2</sub>). El SO<sub>2</sub> se utiliza por sus propiedades antioxidantes y antisépticas, pero se debe usar con precaución para evitar olores o sabores desagradables. Las formas de empleo y aplicación de SO<sub>2</sub> son muy diversas. Debe saberse que una vez aplicado este compuesto, una parte se combina con los azúcares y otros compuestos (aproximadamente 1/3) y el resto que permanece libre es el SO<sub>2</sub> activo. La adición de SO<sub>2</sub> en esta etapa del proceso de vinificación, en dosis de 3-8 g hL<sup>-1</sup> para uvas sanas persigue diferentes finalidades:

- Evitar la oxidación de materias colorantes y aromas, reaccionando con el oxígeno y destruyendo las oxidasas (tirosinasa, lacasa).
- Seleccionar los microorganismos más idóneos y eficaces para una correcta fermentación, inhibiendo la acción de bacterias y levaduras.
- Favorecer la disolución de materia colorante y taninos durante la maceración.

Tras el encubado y la adición de sulfuroso, se puede añadir el denominado pie de cuba, que consiste en incorporar preparados de levaduras comerciales seleccionadas que dominan rápidamente el medio con el único objetivo de comenzar la *fermentación alcohólica*. En esta etapa se producen dos fenómenos simultáneos: por una parte la conversión de los azúcares de la uva en etanol por acción de las levaduras seleccionadas y por otra la maceración, en la cual el mosto entra en contacto con las partes sólidas del racimo (hollejos, pepitas...) que le ceden color, aromas y taninos. La fermentación suele comenzar a 20 °C, pero debido a una generación de calor durante la misma puede aumentar hasta unos 30-32 °C; temperaturas superiores a 35 °C podrían inactivar las levaduras. Por ello,

actualmente los depósitos de acero inoxidable disponen de mecanismos de control de temperatura. Durante esta etapa, los hollejos y las pepitas ascienden a la parte superior del depósito con el CO<sub>2</sub> formado y crean un sombrero flotante. Esto es un inconveniente ya que los hollejos deben estar en contacto con el mosto para facilitar la extracción de color y taninos.

Para aumentar la extracción, evitar el desarrollo de bacterias acéticas en el sombrero y oxigenar las levaduras, se realizan los denominados remontados y/o bazuqueos sumergiendo el sombrero con palos de madera o bazuqueadores. El tiempo de maceración dependerá del tipo de vino que se vaya a elaborar.

El *descube* o *trasiego* constituye el final de la maceración, separando el vino de los orujos. Se saca el líquido del depósito por la parte inferior (vino “yema”) para llevarlo a otro depósito donde concluirá la fermentación, si aún no lo ha hecho. Los orujos se prensan posteriormente para poder extraer el resto del vino que contengan. El vino “yema” o vino “flor”, que representa aproximadamente el 85% del total del vino, posee un menor contenido en taninos y es de calidad superior al que procede de la prensa.

Una vez terminada esta fermentación, el vino puede ser sometido a la *fermentación maloláctica*. Ésta tiene lugar de forma espontánea, si las condiciones son las adecuadas, por acción de bacterias lácticas (del género *Lactobacillus*, *Leuconosto* y *Pediococcus*) presentes en la uva o en el material de la bodega. Aún así, para asegurar el arranque de dicha fermentación, se suele inocular bacterias seleccionadas (normalmente *Oenococcus oeni*). Estas bacterias transforman el ácido málico (diácido) en ácido láctico (monoácido). Se produce por tanto una disminución de la acidez fija del vino ya que el ácido málico, de sabor acerbo y duro, es sustituido por ácido láctico, más suave en boca. Al disminuir la acidez se

da también una disminución del color. Incluso se modifica el aroma, atenuándose el aroma primario que recuerda a manzana verde y aportando un ligero aroma a mantequilla y tostado. Gustativamente, los vinos se vuelven más carnosos y pastosos. Además esta fermentación favorece la estabilidad microbiológica del producto final, evitando que se produzca la fermentación durante el embotellado. La duración de la misma suele ser entre 4-5 semanas y se lleva a cabo a temperaturas bajas, 20 °C, para evitar la degradación de ácido cítrico en ácido acético. Una vez ha finalizado, la concentración de SO<sub>2</sub> suele corregirse hasta valores de 30 mg L<sup>-1</sup> para destruir las bacterias residuales.

Tras la fermentación maloláctica, el vino se somete a un *trasiago* para eliminar todas las precipitaciones producidas. El vino comienza a limpiarse por efecto de la gravedad, depositándose las lías en el fondo. En éstas se encuentran levaduras y bacterias muertas, pepitas, hollejos, tierra, sales de ácidos orgánicos, etc. Para eliminarlas, el vino se somete a diversos trasiegos mientras permanezca en bodega manteniendo a su vez la concentración adecuada de sulfuroso para evitar oxidaciones y crecimientos microbianos indeseados.

Sin embargo, debido a la lentitud de estas clarificaciones espontáneas, se suele recurrir al uso de clarificantes. Estas sustancias se añaden al vino y producen la *floculación* de las impurezas en suspensión y, debido a la naturaleza eléctrica de sus iones, neutralizan partículas coloidales (proteínas, polisacáridos, polifenoles, agregados cristalinos, etc.) de signo contrario, responsables del enturbiamiento del vino final. Las cantidades a adicionar deben ser controladas cuidadosamente para evitar que el agente clarificante se deposite por sí mismo. Además, hay que tener en cuenta que en presencia de sustancias mucilaginosas como pectinas o glucanos, los clarificantes no resultan efectivos. Por eso, se añade gel de sílice facilitando la

desnaturalización de estas sustancias y permitiendo la clarificación. Por su origen, los clarificantes se clasifican en dos grupos:

- i) Orgánicos. Tienen la propiedad, al tener carga positiva, de reaccionar con los coloides de carga negativa (polifenoles y taninos, levaduras, bacterias, etc.). Pueden ser de naturaleza proteica (gelatina, albúmina de huevo, cola de pescado, caseína...), de naturaleza vegetal (alginatos) o de síntesis industrial (la polivinilpirrolidona –PVPP-).
- ii) Inorgánicos. Son compuestos arcillosos derivados de los silicatos primarios. Destacan la bentonita, el carbón o el gel de sílice. Son coloides electronegativos y por lo tanto, eliminan coloides positivos presentes en el vino (proteínas, materia colorante y metales responsables de las quiebras).

Los productos empleados habitualmente en la clarificación de vinos tintos son gelatina (5-20 g hL<sup>-1</sup>) y albúmina de huevo (5-10 g hL<sup>-1</sup>) que eliminan la materia colorante inestable y los taninos.

Aún después de la clarificación, los vinos jóvenes siguen conteniendo sustancias inestables, susceptibles de insolubilizarse si se producen cambios físico-químicos en el medio. Se pueden realizar una serie de tratamientos estabilizantes de naturaleza física, química o biológica. La estabilización física consiste en someter a los vinos a tratamientos térmicos para provocar la insolubilización de las sustancias indeseables y así poder eliminarlas. El tratamiento por frío o de estabilización tartárica es el más aceptado, enfriando el vino hasta temperaturas de – 5 °C para favorecer la precipitación de cristales de tartrato (sales de potasio o de calcio del ácido tartárico) que se eliminarán por filtración. Otro método de estabilización física es la utilización de altas temperaturas, con las consiguientes modificaciones organolépticas que ocasiona el calor, persiguiendo la estabilización

microbiológica y enzimática y la disolución de sales tartáricas. También es posible la estabilización química mediante el uso de compuestos como la goma arábiga (bloquea la coagulación de coloides), el ácido metatartárico (inhibe la cristalización de tartratos), el ácido ascórbico o vitamina C (antioxidante), etc. La estabilización microbiológica se obtiene principalmente ajustando la dosis de SO<sub>2</sub> libre (20-25 mg L<sup>-1</sup>).

Finalmente, el vino se somete a *filtración* como paso previo al embotellado para conseguir su limpidez y asegurar su estabilidad microbiológica y físico-química. Los filtros más utilizados son los filtros de placas cuya naturaleza depende del grado de limpidez que se desee conseguir y las tierras diatomeas.

### **I.6.2. Eliminación de residuos de fungicidas durante la vinificación.**

Durante el proceso de elaboración de un vino, los niveles residuales de fungicidas disminuyen, unos de forma brusca y otros ligeramente. Dicha disminución depende de la naturaleza química del fungicida (sobre todo de su solubilidad en agua), de la concentración inicial en las uvas vendimiadas y de las diferentes etapas que se lleven a cabo en el proceso de vinificación. Aunque el porcentaje de reducción es muy variable, es muy improbable que los vinos presenten niveles residuales de fungicidas que supongan un riesgo para la salud de los consumidores. Ello se debe principalmente a los procesos de retención de los fungicidas a orujos y lías, a las reacciones de hidrólisis ácida de estos compuestos, pudiendo originar metabolitos de degradación como sucede para folpet [Cabras *et al.*; 1997a] y/o a la acción de microorganismos (levaduras y bacterias) y enzimas que intervienen durante la vinificación. Todo ello se describe a continuación.

En la primera etapa de vinificación, estrujado y despalillado, los residuos de fungicidas se reparten entre la fase sólida de la uva y la fase líquida o mosto en

proporciones variables dependiendo de la afinidad del fungicida por cada una de las fases y según su solubilidad en agua. Los resultados publicados por diferentes autores, muestran que los porcentajes de reducción de las concentraciones residuales en mosto prensado con respecto a las concentraciones en uva inicial pueden oscilar entre: 0-5% (fenamidona, fludioxonil, mepanipirim, piraclostrobin, kresoxim-metil y trifloxistrobin); 15-30% (azoxistrobin, ciprodinil y tebuconazol); 50% (pirimetanil, boscalid, ciazofamida, mandipropamida y valifenalate), 60% (quinoxifen) y >75% (fluazinam, tetraconazol, famoxadona, metrafenona y proquinazida) [Cabras *et al.*; 1997b, 1998, 2000a, Garau *et al.*; 2009; González-Rodríguez *et al.*; 2011a].

Posteriormente la uva prensada y despalillada se somete a maceración-fermentación alcohólica. Los porcentajes de reducción determinados por Navarro *et al.* [1999] para diferentes fungicidas (fenamirol, mancozeb, penconazol y vinclozolin) entre la pasta inicial (mosto con piel y pepitas) y el vino tinto prensado, oscilaron entre 45% y 65%, a excepción del metalaxil (sólo un 9%). Resultados similares obtuvieron Vaquero-Fernández *et al.* [2012] para la disipación de pirimetanil, que tras la fermentación alcohólica mostró una reducción del 52,6%. Sala *et al.* [1996] obtuvieron reducciones superiores para vinclozolin (80%) y procimidona (60%). Porcentajes de reducción de este orden (70-85%) fueron obtenidos por Fernández *et al.* [2005a] para ciprodinil, fludioxonil, pirimetanil y quinoxifen.

Además, De Melo-Abreu *et al.* [2006a] observaron que famoxadona se eliminaba en el vino tinto prensado en porcentajes cercanos a 90% con respecto a la pasta inicial. No se detectaron residuos después de esta etapa de vinificación para piraclostrobin, famoxadona y folpet [González-Rodríguez *et al.*; 2009].

Los trasiegos posteriores una vez terminada la fermentación maloláctica también tienen una gran repercusión en la desaparición de algunos fungicidas, ya que pueden ser de nuevo adsorbidos en las lías [Sala *et al.*; 1996; Navarro *et al.*; 1999; Fernández *et al.*; 2005a; Edder *et al.*; 2009]. Ruediger *et al.* [2005] estudiaron la influencia de esta etapa en la reducción de varios fungicidas; clorotalonil mostró una reducción del 30%, procimidona del 25% y el resto de materias estudiadas (fenarimol, metalaxil, oxadixil, triadimenol y carbendazima) no varió su concentración significativamente después de esta etapa. La reducción obtenida en la fermentación maloláctica podría deberse más a la adsorción en las paredes celulares de las bacterias que a degradaciones químicas o físicas, como demostraron Cabras *et al.* [1994; 2000b], quienes determinaron las concentraciones que permanecían en las bacterias tras dicha etapa de vinificación.

La clarificación y filtración de los vinos pueden dar lugar a la desaparición de residuos de fungicidas presentes en los vinos. Con respecto a la clarificación, su eficacia depende de nuevo de factores como la solubilidad del fungicida en la mezcla hidroalcohólica del vino y el tipo de agente clarificante empleado (albúmina de huevo, bentonita, PVPP, etc.). Oliva *et al.* [2007a] evaluaron el efecto de cuatro agentes clarificantes (bentonita, carbón activo, PVPP, y caseinato potásico) en la eliminación de famoxadona, fluquinconazol y trifloxistrobin, aplicados directamente en vinos trasegados elaborados a partir de la uva blanca variedad Airén de la D.O. Jumilla (Murcia, España). La adición de carbón activo originó porcentajes de eliminación cercanos al 100% para los tres fungicidas. Resultados similares fueron obtenidos para ciprodinil, fludioxonil, pirimetanil y tebuconazol [Cabras *et al.*; 1997b]. En otro estudio, los autores anteriores evaluaron nuevamente el efecto de seis agentes clarificantes (albúmina de huevo, albúmina de sangre, bentonita+gelatina, carbón activo, PVPP y sílica gel) sobre famoxadona,



fluquinconazol y trifloxistrobin, pero esta vez añadiendo directamente a un vino tinto trasegado de la misma región de la variedad Monastrel [Oliva *et al.*; 2007b]. Cada uno de los clarificantes afectó en mayor o menor grado a la eliminación de los fungicidas, siendo carbón activo y PVPP los más efectivos, con porcentajes de reducción comprendidos entre 50-100%. Las albúminas de huevo y sangre mostraron porcentajes de eliminación intermedio (25-50%), aunque su empleo se desaconseja debido a que pueden aportar aromas desagradables al vino. Finalmente sílica gel y bentonita no fueron tan efectivas en la eliminación de estos residuos.

Por último, el tipo de filtrado antes del embotellado también puede tener algún efecto en la reducción de los residuos. Oliva *et al.* [2007b, 2007c] observaron que el empleo de filtros de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  influía mínimamente (<10%) en el descenso de los residuos de famoxadona, fluquinconazol y trifloxistrobin, tanto en vinos tintos como en blancos previamente clarificados. Resultados similares fueron mostrados por Fernández *et al.* [2005b] para ciprodinil, fludioxonil, pirimetanil y quinoxifen en vinos tintos. Ruediger *et al.* [2004] investigaron el efecto de agentes filtrantes como la tierra de diatomeas en la eliminación de siete fungicidas (carbendazima, clorotalonil, fenarimol, metalaxil, oxadixil, procimidona y triadimenol) no produciendo una eliminación significativa en ningún caso.

### **I.6.3. Efectos de los residuos de fungicidas sobre la actividad de levaduras y bacterias lácticas.**

La presencia de levaduras y su evolución durante la fermentación del vino puede verse influenciada por diversos factores entre los que se encuentra la presencia de residuos de fungicidas [Cabras *et al.*; 1999]. Los niveles residuales de estos compuestos pueden variar en el momento de la vendimia así como el efecto

de los mismos en las rutas metabólicas de la fermentación, en concreto el efecto que pueden ejercer sobre la síntesis de esteroides [Doignon *et al.*; 1992] o la inhibición de la respiración celular [Ubeda *et al.*; 1996]. Estos efectos pueden modificar la estructura de las membranas celulares de las levaduras y afectar su función específica. Como resultado se puede producir una caída progresiva en la viabilidad de la población de levaduras y como consecuencia, la ralentización de la fermentación que, en casos extremos, podría llevar a una paralización total del proceso, afectando a las características organolépticas del vino, disminuyendo su calidad final [Cabanis y Cooper, 1991; Larue, 1991; García-Romeo, 1996; Reulet *et al.*; 1996; Sala *et al.*; 1996; Cugier y Reulet, 1997].

Entre los primeros estudios realizados sobre la influencia de fungicidas en el proceso de elaboración del vino se puede citar a Dvorack y Schopfer [1970], los cuales señalan que la fermentación alcohólica fue interrumpida en presencia de 0,3 mg L<sup>-1</sup> de diclofluanida.

Fue a partir de la década de los 90 cuando progresaron las investigaciones centradas en evaluar la influencia de las sustancias activas fúngicas sobre los procesos fermentativos alcohólicos implicados en la elaboración del vino. El crecimiento de determinadas cepas de levaduras se vio negativamente afectado por sustancias fúngicas como folpet, captan y captafol [Cabras *et al.*; 1987; Domínguez *et al.*; 1995; Hatzidimitriou *et al.*; 1997], mancozeb [Ubeda *et al.*; 1996] o fenarimol [Zironi *et al.*; 1991].

Por el contrario, otras sustancias fúngicas tales como azoxistrobin, ciprodinil, fludioxonil, mepanipirim, pirimetanil y tetraconazol [Cabras *et al.*; 1999]; quinoxifen [Cabras *et al.*; 2000b]; fenhexamida [Cabras *et al.*; 2001], quinoxifen [Sarris *et al.*; 2009], iprodiona y fludioxonil [Ochiai *et al.*; 2002] o

zoxamida [Angioni *et al.*; 2005] no afectaron de forma significativa a los procesos fermentativos.

En la actualidad existen menos estudios centrados en evaluar la influencia de nuevas sustancias activas sobre fermentaciones alcohólicas. Oliva *et al.* [2007a] evaluaron la influencia de seis nuevos fungicidas (famoxadona, fenhexamida, fluquinconazol, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin) en el contenido de levaduras presentes en uvas y el efecto que ejercían sobre las mismas durante dicho proceso enológico. Aunque estas materias activas no produjeron efectos negativos sobre las levaduras iniciales ni sobre el proceso fermentativo sí que podrían afectar a la calidad organoléptica de los vinos. Estos efectos también han sido estudiados y demostrados por otros autores como González-Rodríguez *et al.* [2011b] y Noguero-Pato *et al.* [2011].

Sin embargo, Comitini y Ciani [2008] pusieron de manifiesto durante tres campañas como la aplicación de nuevos fungicidas orgánicos aplicados en viñedo originaban una reducción drástica de las levaduras autóctonas presentes en la piel de las uvas así como un cambio en la población de levaduras hacia *A.pullulans*.

Calhelha *et al.* [2006] evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de cinco fungicidas (diclofluanida, benomilo, iprodiona, procimidona y vinclozolin) sobre la actividad fermentativa de diferentes levaduras. Clasificaron estos fungicidas de mayor a menor toxicidad en función de la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de cada levadura en un 90%: diclofluanida ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) > benomilo ( $250\text{-}750 \text{ mg L}^{-1}$ ) > iprodiona ( $1000\text{-}1600 \text{ mg L}^{-1}$ ) > promicidona ( $800\text{-}2500 \text{ mg L}^{-1}$ ).

El efecto inhibitorio que producen los pesticidas sobre la actividad de bacterias lácticas (fermentación maloláctica) durante la elaboración del vino es un

efecto que se ha estudiado en menor medida. Vidal *et al.* [2001] y Carreté *et al.* [2002] pusieron de manifiesto dicho efecto cuando las bacterias *Oenococcus Oeni* responsables de la fermentación maloláctica de un vino sintético se encontraban en presencia de diclofluanida, cobre o incluso ácidos grasos. Estas sustancias parecen tener un efecto sobre el crecimiento celular inhibiendo la actividad de la ATPasa. Ruediger *et al.* [2005] demostraron que el pesticida dicofol presenta un efecto inhibitorio importante sobre el catabolismo del ácido málico. Clorotalonil, cloropirifos y fenamirol también presentaron dicho efecto pero en menor medida. Sin embargo, los siete fungicidas estudiados (carbendazima, clorotalonil, fenarimol, metalaxil, oxadixil, procimidona y triadimenol) no mostraron efecto negativo alguno sobre la bacteria láctica *Oenococcus oeni*.

Por otro lado, Cabras *et al.* realizaron a lo largo del tiempo varios estudios sobre el efecto de distintos fungicidas: benalaxil, carbenzamida, diclofluanida, folpet, triadimefón y vinclozolin [Cabras *et al.*; 1994]; azoxistrobin, ciprodinil, fludioxonil, mepanipirim, pirimetanil y tetraconazol [Cabras *et al.*; 1999]; quinoxifen [Cabras *et al.*; 2000a] y fenhexamida [Cabras *et al.*; 2001] sobre la actividad fermentativa de dos bacterias lácticas, *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni*. Ninguno de ellos presentó efectos negativos en el desarrollo de la fermentación maloláctica, a excepción de diclofluanida (redujo la actividad de *Oenococcus oeni*) y de azoxistrobin, ciprodinil, fludioxonil, pirimetanil y tetraconazol que mostraron un 15% menos de bioconversión del ácido málico con *Oenococcus oeni*.

Otros autores estudiaron los efectos inhibitorios de fungicidas como zoxamida [Angioni *et al.*; 2005] no interfiriendo en la actividad de las bacterias lácticas o diclofluanida, iprodiona, vinclozolin y promicidona sobre la fermentación maloláctica de *Oenococcus oeni* [Sapis-Domercq, 1980; Vidal *et al.*;

2001; Carreté *et al.*; 2006]. Los tres últimos fungicidas pertenecientes a la familia de las dicarboximidias no mostraron apenas efectos inhibitorios. La diclofluanida mostró efectos moderados, siendo la concentración mínima inhibitoria de 5 mg L<sup>-1</sup>.

#### **I.6.4. INFLUENCIA DE LOS RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS VINOS**

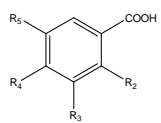
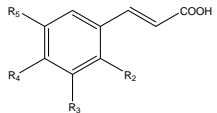
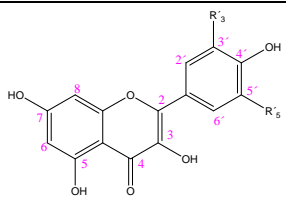
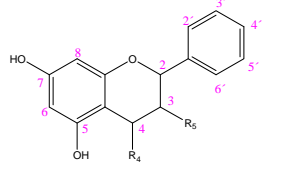
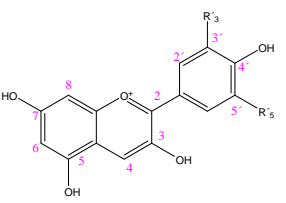
##### ***Principales compuestos fenólicos***

Los compuestos fenólicos de las uvas y el vino, presentan una amplia diversidad de estructuras químicas. Simplificando su clasificación, es posible señalar que existen dos grupos generales de compuestos: los no flavonoides y los flavonoides (tabla I.2.). Dentro de los primeros, caracterizados por presentar solo un anillo de 6 carbonos (C6), los más importantes corresponden a los ácidos benzoicos (C6-C1) y a los ácidos cinámicos (C6-C3). La importancia de los primeros desde un punto de vista enológico, radica en su relación con el gusto amargo de los vinos. En el caso de los segundos, resultan importantes por su relación con el pardeamiento, en especial de los vinos blancos y en menor medida por su participación en el gusto amargo [Zamora F.; 2003].

El grupo más importante de compuestos fenólicos presentes en el vino corresponde a los compuestos flavonoides, caracterizados por presentar dos anillos de 6 carbonos unidos por un heterociclo central de 3 carbonos (C6-C3-C6).

En este grupo se distinguen los flavonoles (como quercetina, miricetina y kaemferol y sus glicósidos) presentes en los hollejos, siendo importantes por participar en el color amarillo de los vinos blancos y por sus efectos antioxidantes benéficos para la salud.

Tabla I.2. Clasificación de los compuestos fenólicos

COMPUESTOS NO FLAVONOIDES	
ÁCIDOS FENÓLICOS	Ácidos benzoicos 
	Ácidos cinámicos 
COMPUESTOS FLAVONOIDES	
FLAVONOLES	
FLAVANOLES . Taninos condensados . Catequinas	
ANTOCIANIDINAS Y ANTOCIANOS	

Los flavanoles presentan como base a la (+)-catequina y la (-)-epicatequina. La unión de estos compuestos da origen a los taninos de la uva (taninos condensados) ubicados en semillas y hollejos, que presentan una relación inversa en cuanto a amargor y astringencia a medida que aumentan de tamaño (es decir,

aumenta el número de unidades de (+)-catequina o (-)-epicatequina en su estructura), disminuyendo el amargor en los taninos de mayor tamaño, pero aumentando su astringencia, hasta alcanzar un tamaño en que no son solubles, no pueden reaccionar con las proteínas de la saliva precipitándolas y por tanto dejan de producir la sensación de astringencia.

Finalmente, están los antocianos que dan el color rojo a las uvas tintas, presentes en los hollejos, destacando cinco antocianinas en la especie *Vitis vinífera*. De todos ellos, antocianos y flavanoles son los que más influencia tendrán sobre el color, su evolución y otras características organolépticas definitorias de la calidad del vino final.

En la tabla I.3. se muestra la distribución de los principales compuestos fenólicos dentro del racimo de uva así como las propiedades organolépticas más importantes en las que participan.

Tabla I.3. Distribución en racimo y propiedades organolépticas más importantes de los principales compuestos fenólicos

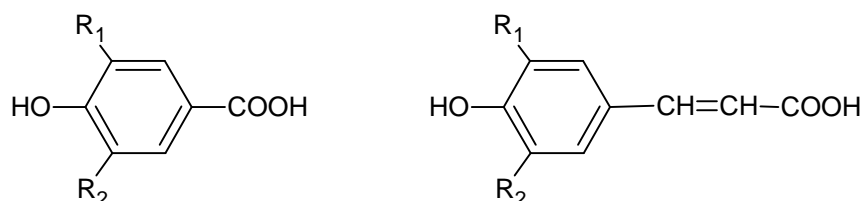
Compuesto	Localización en la baya				Principales propiedades
	Piel	Pulpa	Semillas	Raspón	
Ácidos fenólicos	Sí	Sí	Sí	Sí	Poca influencia directa
Flavonoles	Sí	No	No	No	Color amarillo
Antocianos	Sí	No*	No	No	Color rojo
Flavanoles	Sí	No	Sí	Sí	Sabor amargo, astringencia, cuerpo, estructura

\* Excepto en las variedades tintas que sí contienen en la pulpa

A continuación se explican los compuestos fenólicos más importantes encontrados en la uva y el vino, analizando su estructura y propiedades químicas relacionándolas en todo momento con las características organolépticas que proporcionan al vino.

**COMPUESTOS NO FLAVONOIDES*****Ácidos fenólicos***

Los ácidos fenólicos se subdividen en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos. Su estructura química se presenta en la figura I.7.



Principales ácidos benzoicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Principales ácidos cinámicos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ác. Gálico	OH	OH	Ác. Cafeíco	OH	H
Ác. p-hidroxibenzoico	H	H	Ác. p-cumárico	H	H
Ác. siríngico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Ác. ferúlico	OCH <sub>3</sub>	H

Figura I.7. Estructura química de los ácidos fenólicos

Tanto los ácidos benzoicos como los cinámicos pueden estar en forma libre o esterificados con el ácido tartárico u otros componentes del vino. Los ácidos fenólicos se encuentran en el hollejo, en la pulpa, en las semillas y en el raspón.

Estos compuestos carecen de color cuando se encuentran en solución en una mezcla hidroalcohólica, pero pueden tomar un color amarillo después de la oxidación y dar lugar al pardeamiento del mosto y el vino. En el plano organoléptico esos constituyentes no presentan sabor y olor particulares pero son precursores de los fenoles volátiles después de la acción de ciertos microorganismos [Edlin *et al.*; 1995].



## COMPUESTOS FLAVONOIDES

Se trata de pigmentos de color amarillo más o menos intenso. Se pueden clasificar en varias familias, según cambios en su estructura básica dependiendo del grado de saturación y de la sustitución de grupos funcionales. Los más importantes son flavonoles, antocianos y flavanoles. Esta última familia incluye a los taninos condensados o procianidinas. La estructura básica de estos compuestos se muestra en la figura I.8.

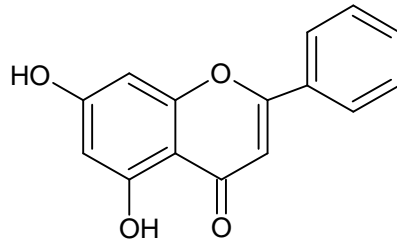


Figura I.8. Estructura básica de flavonoides

### *Flavonoles*

Se trata de los pigmentos de color amarillo más o menos intenso. Son responsables del color amarillo de la uva blanca. Los más importantes son tres: quercetina, miricetina y kaempferol. Se diferencian por la sustitución del anillo bencénico situado a la derecha de la molécula (figura I.9). De esta manera kaempferol posee un grupo OH en dicho anillo bencénico, quercetina dos grupos OH y miricetina 3 OH.

Su localización en la uva se limita a los hollejos. Los flavonoles pueden encontrarse así (en forma de aglicona) o en forma de heterósido, unidas a un glúcido. Su participación en el color del vino tinto es de poca importancia, limitándose a contribuir en pequeña parte en la componente amarilla.

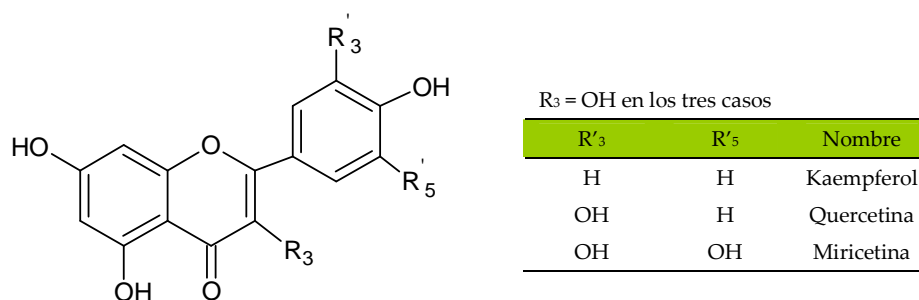


Figura I.9. Estructura de diferentes flavonoles

### Flavanoles o flavan-3-oles

Es el grupo de flavanoides que más ampliamente está distribuido en la naturaleza. Los flavanoles presentan estructuras derivadas de tres esqueletos básicos: flavan-3-ol, flavan-4-ol y flavan-3,4-diol (figura I.10.).

Al contrario de lo que ocurre con otros flavonoides, las combinaciones de tipo heterosídico son poco habituales.

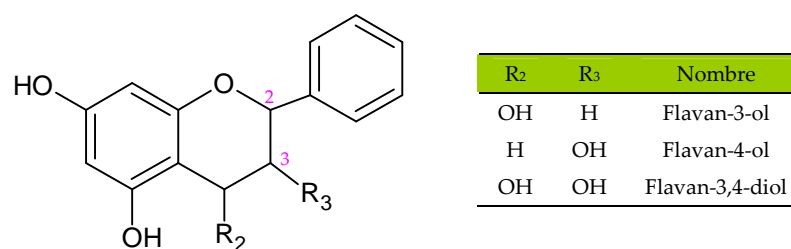


Figura I.10. Esqueleto básico de los flavanoles

Los flavan-3-ol monómeros se les suele designar genéricamente como "catequinas". En su estructura poseen dos carbonos asimétricos (C2 y C3) lo que hace posible la existencia de cuatro isómeros ópticos: (+)/(-) catequina y

epicatequina, mayoritarios en la uva. No obstante, en la naturaleza la mayor parte de los flavanoles están en forma de polímeros.

### ***Antocianidinas y antocianos***

Los antocianos son los responsables del color rojo azulado de la piel de las uvas tintas y naturalmente del color del vino tinto. Su estructura deriva de las antocianidinas basándose en la estructura del ión flavilio, también llamado 2-fenilbenzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico; el flavilio normalmente funciona como un catión. La estructura química de las cinco antocianidinas más importantes se muestra en la figura I.11.

Los antocianos son glucósidos de las antocianidinas es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico siempre en la posición 3.

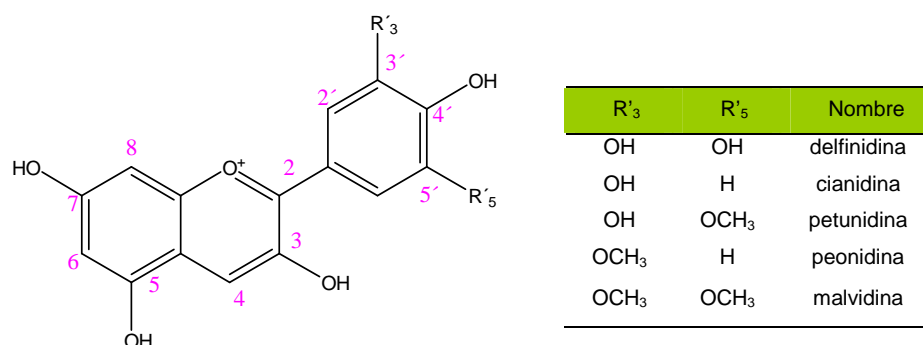


Figura I.11. Esqueleto de las antocianidinas encontradas en la uva.

Se diferencian entre sí por el número de grupos hidroxilo presentes en la molécula, por el grado de metilación de éstos, por la naturaleza y el número de azúcares enlazados a la molécula, por la posición de enlace y por el tipo y número de ácidos alifáticos o aromáticos enlazados al azúcar presente en la molécula.

Existen pequeñas variaciones de la tonalidad roja dependiendo del antociano del que se trate, pero teniendo en cuenta el predominio tan alto de los derivados de malvidina en la mayoría de los vinos, es esta antocianina la que más va a contribuir al color.

Cada antocinánidina puede ser acetilada o glicosilada por ácidos y azúcares en diferentes posiciones. Debido a esto, el número de antocianos es entre 15 y 20 veces mayor que el número de antocianidinas [Mazza *et al.*; 1990]. Por tanto, las antocianidinas sólo aparecen cuando se produce la hidrólisis de los antocianos.

### *Composición fenólica de uvas y vinos*

Los constituyentes fenólicos revisten una gran importancia en enología debido al papel que juegan directa o indirectamente sobre la calidad de los vinos. Estos compuestos participan en una serie de reacciones en las que en ocasiones se transforman y evolucionan provocando mejoras importantes en la calidad del vino, mientras que otras veces sufren alteraciones perjudiciales.

Así, los compuestos polifenólicos de los vinos están relacionados con cualidades gustativas como astringencia y amargor, pero también con cualidades visuales como color y limpidez de los vinos. Además estos compuestos presentan propiedades bactericidas, antioxidantes, vitamínicas y protegen al consumidor frente a enfermedades cardio-vasculares.

Los polifenoles presentes en el vino varían desde compuestos relativamente sencillos producidos durante la maduración de las uvas en la vid hasta sustancias sumamente complejas formadas durante el proceso de elaboración, así como otras extraídas de la madera de las barricas en el caso de vinos envejecidos.

Los compuestos fenólicos aparecen bruscamente en la fase del envero, sustituyendo a la clorofila que hasta entonces hacía que el grano de uva se comportase como un órgano verde más de la vid. Proviene básicamente de las partes sólidas de la uva, y en menor medida de la pulpa, siendo su aportación diferente según procedan de hollejos, pepitas o raspones. Las pepitas contienen el 65% de los polifenoles del racimo, mientras que el raspón tiene un 22%, el hollejo otro 12% y la pulpa tan solo el 1% restante. La composición polifenólica final del vino varía según el tiempo de contacto de cada una de estas partes con el mosto y por ello dicha composición no es únicamente un reflejo de los polifenoles encontrados en la variedad de uva de la cual proceda el vino, ya que es en último término la técnica de elaboración (tratamiento mecánico aplicado para obtener el mosto, tipo de vinificación y envejecimiento) lo que condiciona la amplia variación en el contenido de polifenoles de un vino.

El color del vino tinto se debe a la presencia de antocianinas, en forma libre o combinadas a procianidinas, que contribuyen a los componentes rojo, amarillo y azul del color del vino en función del pH del medio. Durante el almacenamiento y envejecimiento de los vinos tintos tienen lugar cambios progresivos de los compuestos polifenólicos extraídos inicialmente de las uvas. Los cambios producidos en el color de los vinos tintos en estas etapas se atribuyen a la formación progresiva de pigmentos condensados resultantes de la interacción entre antocianinas y otros compuestos fenólicos, especialmente flavanoles tales como catequinas y procianidinas (taninos condensados). En la formación de esos nuevos pigmentos se ha sugerido que intervienen diferentes mecanismos: fenómenos de copigmentación, condensación directa entre antocianinas y flavonoles y reacciones entre ellos mediadas por acetaldehído.

### **Efecto de residuos de fungicidas en la composición fenólica de un vino**

Los compuestos fenólicos revisten una gran importancia en enología debido al papel que juegan directa o indirectamente sobre la calidad de los vinos. Son el origen del color y de la astringencia, siendo ésta última atribuida especialmente a los taninos. La presencia de residuos de fungicida en uva puede provocar modificaciones en la composición polifenólica de los vinos, al alterar no sólo la extracción de estos compuestos durante el proceso de vinificación, sino también su evolución durante el envejecimiento.

En la actualidad, hay muy pocos estudios publicados que evalúen la posible influencia de los productos fitosanitarios sobre la composición fenólica en vinos u otros alimentos debido a la complejidad del tema.

Los primeros estudios realizados sobre este tema fueron los de Hajšlová *et al.* [1984] que estudiaron la influencia de dos pesticidas, Melprex 65 W y Anthio 25, en la composición fenólica de manzana. Diferencias en “o-dihidroxifenoles” y en ácidos fenólicos fueron encontradas, siendo el pesticida Melprex 65 W el que mostró valores más bajos de estos compuestos. La actividad de la enzima polifenol oxidasa fue similar en las muestras tratadas comparadas con el control, sin embargo se probó que la dodina (materia activa de Melprex 65 W) participa en la formación de productos coloreados en las reacciones de oxidación de la enzima polifenol oxidasa.

Posteriormente, se realizaron otros estudios en diferentes frutas. Saad *et al.* [1993] verificaron que los restos de plaguicidas en zumos de tomate afectan a la actividad de diferentes enzimas entre los que se encuentran algunos de los que participan en el metabolismo de los polifenoles, como son peroxidases y polifenol oxidases. Rung, B. y Schwack, W. [2005], descubrieron que aminoparatión, un

metabolito de degradación del pesticida paratión, puede servir como sustrato de la enzima polifenol oxidasa en frutas, y dar lugar a reacciones de oxidación, formando compuestos coloreados.

Recientemente, Fattouch *et al.* [2010] han estudiado la interacción que producen algunos pesticidas en la enzima polifenol oxidasa en muestras de membrillo. Esta enzima es la encargada de catalizar la oxidación de los o-difenoles a sus respectivas quinonas, dando lugar a pigmentos coloreados. Benomil, carbaril, deltametrina y metil paratión (a altas concentraciones) fueron los que más afectaron a la polifenol oxidasa, exhibiendo un 44%, 51%, 33% y 58%, respectivamente, de inhibición de la actividad. Para el resto de pesticidas, el efecto inhibitorio decreció en el siguiente orden: paraoxon > diuron > triazofos > atrazina > clorfenvinfos > clorpirifos  $\approx$  fenclorphos  $\approx$  fosmet > fenitrotión > endosulfan > fenamifos > captan mientras que amitraz y malatión no afectaron a la enzima. En contraste, concentraciones bajas de estos pesticidas aumentaban la actividad de la polifenol oxidasa.

En 2007, Navarro *et al.* realizaron un estudio sobre la influencia de cinco insecticidas y herbicidas, pendimetalin, trifluralin, fenitrotión, malatión y metidation, en la velocidad de fermentación y color durante el proceso de elaboración de cerveza. Todos los pesticidas mostraron diferencias significativas con respecto al control en el valor de pH y en el color final de la cerveza elaborada, encontrando los valores más bajos de polifenoles totales en las cervezas elaboradas en presencia de fenitrotión y trifluralin.

Los estudios realizados sobre este tema en vino también son muy escasos. Los primeros resultados fueron mostrados por Santos, C. [1997], quién estudio el efecto de cinco fungicidas aplicados en dos dosis diferentes, carbendazim,

diclofluanida, iprodiona, procimidona y vinclozolin, sobre los parámetros físico-químicos y organolépticos del vino. Los valores de pH, densidad y acidez total no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, en presencia de procimidona y vinclozolin se obtuvo menor concentración de ácido málico, mayor concentración de polifenoles totales y color rojo (a dosis alta de ambos pesticidas), con la misma tonalidad en todos los vinos elaborados.

Varios años más tarde, Oliva *et al.* [2005; 2009] evaluaron la influencia de los residuos de seis fungicidas (azoxistrobin, ciprodinil+fludioxonil, kresoxim-metil, pirimetanil y quinoxifen), de reciente utilización en la D.O. Jumilla, sobre el color final de vinos tintos obtenidos por maceración prefermentativa a baja temperatura. El estudio se llevó a cabo en uva tinta (variedad Monastrell) a la que, un día antes de la vendimia, se trató con las diversas formulaciones utilizadas en el estudio a la dosis recomendada por la casa comercial. Una vez terminada la fermentación de los vinos, se determinaron diferentes parámetros indicativos de la composición fenólica de los vinos obtenidos. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las vinificaciones tratadas con fungicidas y la testigo, sobre todo en el caso de pirimetanil.

## **I.7. ANÁLISIS DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS EN MUESTRAS ENOLÓGICAS**

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



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.

### **I.7.1. 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.

El método de tratamiento más comúnmente utilizado para muestras líquidas es la *extracción líquido-líquido (LLE)* con disolventes orgánicos. Acetonitrilo, hexano, diclorometano o acetato de etilo son los más utilizados [Rial Otero *et al.*; 2003; Angioni *et al.*; 2005; De Melo Abreu *et al.*; 2005; Vaquero-Fernández *et al.*; 2008; González-Rodríguez *et al.*; 2009]. Para realizar la extracción en discontinuo se utiliza un embudo de decantación en el que se añaden la muestra y el disolvente de extracción. Se mezcla agitándose vigorosamente y se deja decantar, procediendo

posteriormente a la separación de las fases. Esta operación puede realizarse de manera simple (una sola vez), o 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. Posteriormente, el extracto o extractos obtenidos se secan con sulfato sódico anhidro para eliminar los restos de agua. Esta metodología presenta las desventajas de emplear elevadas cantidades de disolvente, además de ser difícilmente automatizable.

Durante los últimos años se han desarrollado metodologías alternativas que permiten alcanzar una reducción en el costo de disolventes orgánicos y un menor tiempo de trabajo. Así, esta tendencia condujo al desarrollo de nuevos procedimientos de preparación de muestras basados en el principio de la extracción líquido-líquido, como es la microextracción en fase líquida (LPME) en sus dos versiones (microextracción en gota y microextracción en fibra hueca) y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME).

En la técnica de 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  $\mu\text{L}$ ) (fase extractante) 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 (figura I.12).

La SDME es un procedimiento rápido (no necesita preparación de muestra), económico, disponibilidad de alta variedad de disolventes utilizando muy poco volumen, no requiere un equipamiento sofisticado y elimina la posibilidad de

contaminación entre muestras puesto que se utiliza una gota nueva para cada extracción.

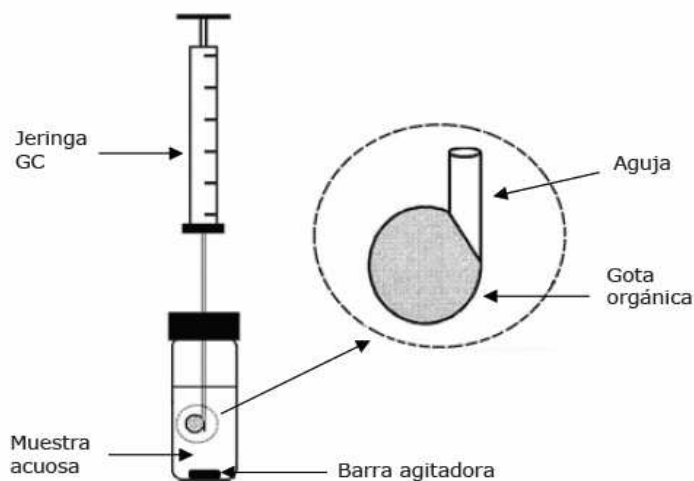


Figura I.12. Esquema de la técnica de microextracción en gota.

Además, se consigue una alta concentración de los analitos al utilizar pequeñas cantidades de disolvente de extracción. Esta técnica se ha utilizado para el análisis de pesticidas organofosforados en agua y frutas (previa trituración y filtración y suspendiendo la gota en el jugo obtenido) [Xiao *et al.*; 2006]. También se ha utilizado la SDME para el análisis de diferentes clases de pesticidas en vegetales [Amvrazi y Tsiropoulos, 2008; Zhang *et al.*; 2008], zumos y frutas [Viñas *et al.*; 2010] y vino [Liu *et al.*; 2006].

La *microextracción en fibra hueca (HF-LPME)* se puede llevar a cabo en dos modalidades: En la primera de ellas se usan dos agujas de jeringa convencionales insertadas a través de un septum y que son conectadas mediante una fibra hueca en forma de U (figura I.13.A). La fibra se sumerge inicialmente en un disolvente orgánico para que éste se inmovilice en los poros de la fibra. Después, la fibra se

sumerge en la fase acuosa con los analitos. La fase aceptora es inyectada en el interior de la fibra con ayuda de una jeringa. Una vez completada la extracción, se recoge la fase aceptora y se lleva al instrumento de análisis.

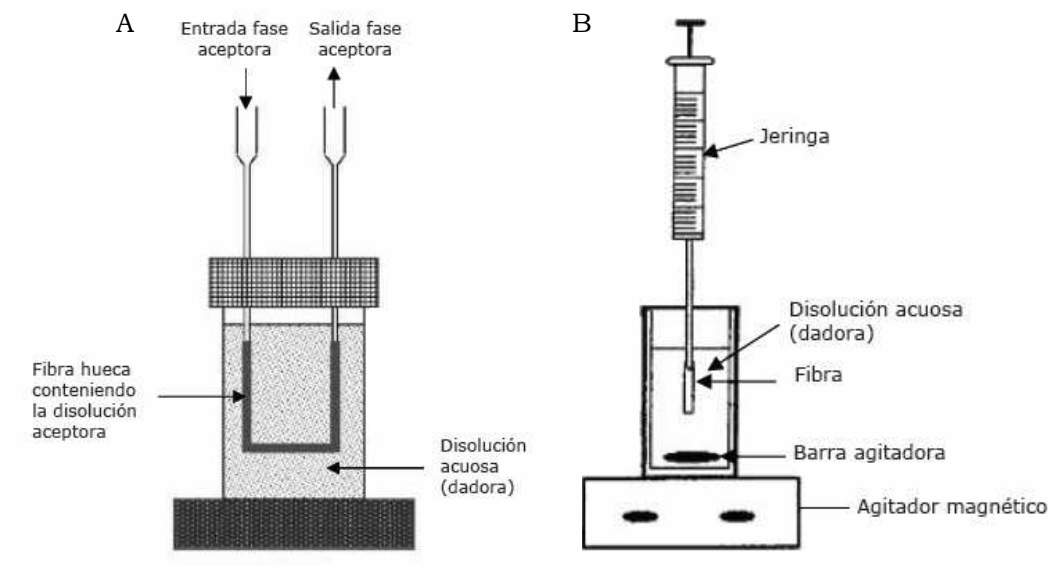


Figura I.13. A) Representación del sistema de sujeción de la fibra mediante dos jeringas convencionales. B) Representación esquemática en la que la aguja de la jeringa sostiene la fibra y uno de los extremos está sumergido en la solución dadora.

En la segunda configuración únicamente un extremo de la fibra se usa para la inyección y recolección de la fase aceptora mientras que el otro extremo queda expuesto a la disolución dadora (figura I.13.B). La jeringa soporta la fibra, introduce y recoge la fase aceptora y, además, introduce ésta última en el instrumento en el que se llevará a cabo el análisis.

Esta técnica se ha utilizado estos últimos años con éxito para el análisis de pesticidas en frutas y vegetales [Barahona *et al.*; 2010; Sanagi *et al.*; 2010], en bebidas alcohólicas [Bolaños *et al.*; 2008], y en muestras de agua [Berhanu *et al.*;

2008; Sarafraz-Yazdi *et al.*; 2012] sin necesidad de llevar a cabo un pretratamiento previo de la muestra.

La introducción de la *microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)*, tuvo lugar en 2006 por Assadi [Assadi *et al.*; 2006]. Es una técnica simple, rápida y con bajo consumo de disolventes. Además permite elevados valores de recuperación y un alto factor de concentración. El principio de la DLLME está basado en dos pasos: (1) Inyección de una mezcla adecuada de los disolventes extractantes y dispersivos en el interior de la muestra acuosa que contiene los analitos. (2) Centrifugación de la disolución: Después de la centrifugación, los analitos estarán en la fase más densa, que habrá sedimentado, pudiendo ser extraídos fácilmente del resto de la muestra acuosa. Los hidrocarburos halogenados como clorobenceno, cloroformo, tetracloruro de carbono y tetracloroetileno, son normalmente seleccionados como disolventes extractantes debido a su alta densidad. El disolvente dispersivo debe ser miscible con el agua (disolvente polar) a la vez que debe ser parcialmente miscible con el disolvente extractante. Como disolventes dispersivos pueden usarse acetona, acetonitrilo, metanol, etanol e isopropanol, entre otros [Cunha *et al.*; 2009; Zang *et al.*; 2009; Zhou *et al.*; 2009; Caldas *et al.*; 2010; Rodríguez-Cabo *et al.*; 2011].

Otra técnica de extracción introducida en los últimos años es la denominada *Accelerated Solvent 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 °C, respectivamente, facilitando la desorción del analito desde la matriz sólida al líquido de extracción y empleando menos cantidad de disolvente que en los métodos convencionales. Aunque la principal aplicación del sistema ASE fue en el análisis de plaguicidas en suelos y sedimentos [Ferrer *et al.*; 2002], en los últimos

años se están ampliando estas aplicaciones a otro tipo de muestras como frutas vegetales y cereales [Cho *et al.*; 2008; Cervera *et al.*; 2010, Zhang *et al.*; 2011].

La *Extracción Asistida por Microondas (MAE)* se basa en el uso de energía de microondas para conseguir que los compuestos de interés pasen de la muestra a un disolvente adecuado. El campo electromagnético induce una rotación de las moléculas que poseen momento dipolar sin afectar por ello a su estructura molecular. Las ventajas que presenta esta técnica son:

- Es una técnica rápida (las extracciones duran aproximadamente 10 min, y pueden llevarse a cabo 12 extracciones en paralelo),
- Utiliza volúmenes pequeños de disolventes y reduce el uso de disolventes orgánicos clorados.
- Permite el control de los parámetros de extracción: tiempo, potencia y temperatura.

El calentamiento por acción de la radiación de microondas puede ocurrir por varios mecanismos:

1. Extracción en presencia de algún disolvente o mezclas de disolventes polares (coeficiente de pérdida dieléctrica alto). En disolventes polares, el calentamiento ocurre por rotación de dipolos. Estos disolventes se caracterizan por tener altos coeficientes de pérdida dieléctrica, lo que origina una temperatura elevada. Cuando la extracción se lleva a cabo en sistemas cerrados, la temperatura que se alcanza es mayor que los puntos de ebullición de los disolventes a presión atmosférica, lo que origina elevadas presiones. Estos dos factores aumentan la solubilidad del analito

en el disolvente utilizado y aceleran la cinética de desorción desde la matriz [Cela *et al.*; 2002].

2. Extracción con disolventes transparentes a la energía de microondas (coeficiente de pérdida dieléctrica bajo). En este caso el disolvente sólo actúa como medio solubilizador de los analitos. Las muestras suelen ser materiales biológicos o ambientales (tejidos vegetales o animales, alimentos, suelos, etc.), caracterizados por un elevado contenido en agua libre dispersada en su estructura. Este agua presente en los tejidos provoca un sobrecalentamiento en determinados puntos de la matriz, originando la ruptura de las membranas celulares, El disolvente se difunde en la matriz y extrae los analitos solubilizándolos [Cela *et al.*; 2002].

Los principales factores que afectan a la extracción son temperatura, tiempo de extracción, cantidad de muestra y naturaleza y volumen del disolvente de extracción. Al igual que la técnica ASE, ha sido aplicada principalmente a suelos y sedimentos [Fuentes *et al.*; 2007; Hernández-Soriano *et al.*; 2007], pero también se ha utilizado en frutas, vegetales y pescado [Hernández-Borges *et al.*; 2008; Paíga *et al.*; 2009; Wilkowska *et al.*; 2010].

### **I.7.2. Extracción en fase sólida**

El interés de las técnicas de extracción basadas en un material sorbente reside en la disponibilidad de una amplia gama de fases lo que le confiere una gran selectividad. La idea de emplear un material sorbente para extraer compuestos de una muestra acuosa se desarrolló en los años 70 y sus aplicaciones han sido numerosas) [Jiménez *et al.*; 2007; Yang *et al.* 2011]. Los sorbentes se emplean en la actualidad para extraer compuestos orgánicos de varias matrices, incluyendo agua, aire y suelo.

Muchos sorbentes son modificados específicamente para la extracción de distintos grupos de compuestos orgánicos con varios grados de selectividad. Los sorbentes empleados con mayor frecuencia contienen sílices enlazadas (octil (C8) y octadecil (C18)), polímeros hidrofóbicos de PDMS, carbón activo usado para una retención selectiva de compuestos, cambiadores iónicos, etc. En los últimos años, se han desarrollado nuevas fases sorbentes mucho más selectivas como son los polímeros de impresión molecular (MIPs), los inmunosorbentes y los nanotubos y fullerenos de carbón.

Dependiendo de las características del sorbente, la retención del analito se produce: (i) por adsorción; (ii) mediante absorción (o reparto de los analitos entre el absorbente y la muestra); (iii) por una interacción antígeno-anticuerpo y (iv) por un mecanismo de retención mixto. La desorción posterior puede tener lugar mediante la elución con un pequeño volumen de un disolvente apropiado o mediante desorción térmica, normalmente en el inyector del instrumento analítico.

La *extracción en fase sólida (SPE)* es la más utilizada en esta última década para la preparación de muestras. Esta técnica se basa en el empleo de sorbentes en cartuchos o discos (ver figura I.14.).



Figura I.14. Cartuchos y discos usados en SPE (fuente: [www.genopore.com](http://www.genopore.com))



Esta técnica de extracción consiste en cuatro etapas principales (ver figura I.15.):

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  $5 \text{ mL min}^{-1}$ .
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).

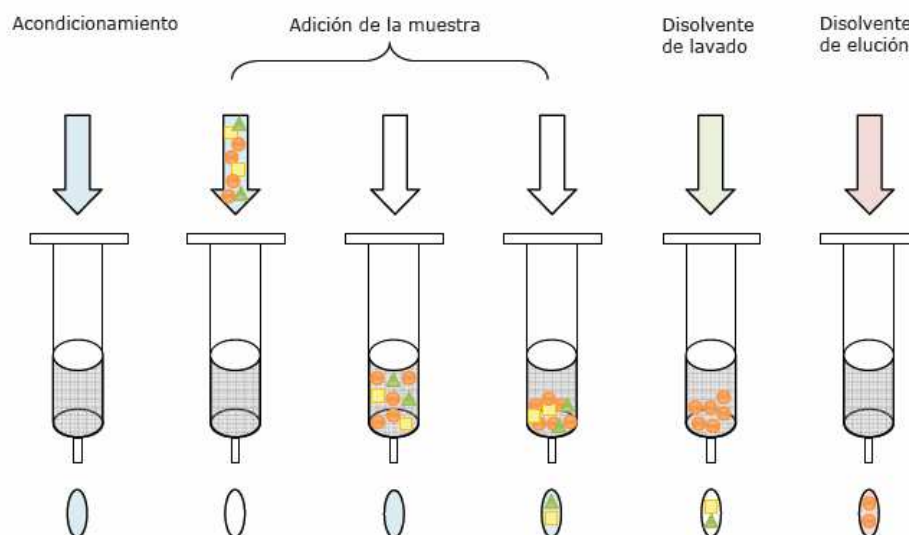


Figura I.15. Etapas principales de la extracción en fase sólida.

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.

La fase sólida más universal es octadecil o C18. Otras fases utilizadas con buenos resultados para el análisis de plaguicidas son carbón poroso (CARB GR), poliestireno-divinilbenceno (LiChrolut® EN) y polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona (Oasis®) [Jiménez *et al.*; 2006; Molina Mayo *et al.*; 2007]. 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 mosto y vino son acetato de etilo, hexano, acetonitrilo, diclorometano y acetona [Jiménez *et al.*; 2001; Melo *et al.*; 2004; Vigna *et al.*; 2006; Jiménez *et al.*; 2007; Vaquero-Fernández *et al.*; 2009; Carpinteiro *et al.*; 2010; Fontana *et al.*; 2011]. 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 LLE que está siendo desplazada, en la mayoría de los casos, por nuevas técnicas.

La extracción en fase sólida de matrices sólidas con un contenido en agua medio-alto se lleva a cabo mediante la técnica conocida como *dispersión de matriz en fase sólida (Matrix Solid Phase Dispersion – MSPD)*. Desarrollada en 1989 por Barker [Barker S.A, 1989], esta técnica que permite el fraccionamiento completo de los componentes de la muestra así como elución selectiva de un único analito o varios tipos de compuestos de la misma familia. Se basa en la disrupción de la estructura de la matriz con ayuda de un mortero y la homogeneización de la misma sobre un soporte sólido. Esta mezcla es transferida a un cartucho, normalmente de polipropileno, y los analitos son eluidos con un disolvente apropiado (figura I.16.).

La eficacia y selectividad en MSPD depende de varios factores entre los cuales destacan la selección del material dispersante, uso de co-adsorbentes, tipo de disolvente y secuencia de elución.

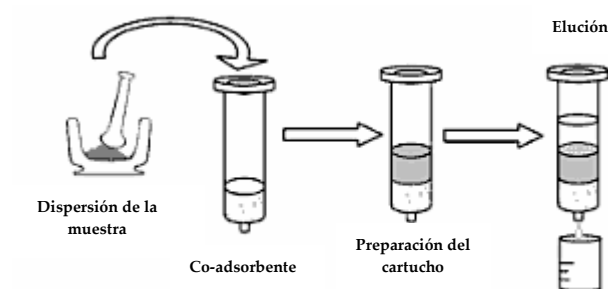


Figura I.16. Esquema del proceso de MSPD. (tomada Canosa Rodríguez, M.P.)

Las fases sólidas dispersantes más empleadas son octadecilsilano. Florisil ( $\text{MgSiO}_3$ ), alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) y sílica ( $\text{SiO}_2$ ) son adsorbentes denominados de fase normal utilizados para la extracción de pesticidas, herbicidas y contaminantes prioritarios en matrices biológicas [Gutiérrez *et al.*; 2011], vegetales y frutas [Navarro *et al.*; 2002; Chu *et al.*; 2005; Lian *et al.*; 2010] mediante MSPD. Además también se han usado como dispersantes de muestras medioambientales (lodos de depuradora, sedimentos, etc.) para la extracción de contaminantes [Sánchez-Brunete *et al.*; 2008]. Es posible obtener extractos libres de impurezas mediante la purificación on-line del extracto primario obtenido en MSPD. Esto se consigue colocando una capa de co-adsorbente, generalmente de distinta naturaleza que el sólido utilizado para dispersar la muestra, en el fondo del cartucho. En muchos casos este co-adsorbente actúa reteniendo las interferencias [Pensado *et al.*; 2005]. El disolvente de elución, al igual que en SPE, es de gran importancia a la hora de determinar que analitos eluyen del cartucho y en que orden lo hacen. La correcta elección del disolvente/s y de su secuencia permite obtener extractos libres de impurezas en base a la retención de las mismas en la fase estacionaria [Pensado *et*

*al.*; 2005] o mediante una primera elución para eliminarlas del cartucho de MSPD [Canosa *et al.*; 2007].

En los últimos años, el método QuEChERS está siendo cada vez más utilizado en el análisis de residuos de pesticidas en frutas y verduras hasta llegar a convertirse en un método de referencia. Como su propio nombre indica, presenta las siguientes ventajas: **Quick** (rápido), **Easy** (fácil), **Cheap** (barato), **Effective** (efectivo), **Rugged** (robusto) y **Safe** (seguro). Anastassiades *et al.* [2003] desarrollaron esta nueva técnica rápida y sensible para el análisis multiresiduo de plaguicidas en dichas matrices. QuEChERS tiene dos etapas principales: (i) etapa de extracción y (ii) una etapa de SPE dispersiva. En la primera etapa, se lleva a cabo la adición de un disolvente miscible con agua como acetonitrilo o acetona a una porción homogeneizada de muestra, permitiéndose así la extracción de los analitos en el disolvente orgánico. Además, la adición de una sal (ej:  $\text{MgSO}_4 + \text{NaCl}$ ) conduce a una mejor separación posterior de ambos disolventes y a mayor extracción de pesticidas debido a la fuerza iónica de la fase acuosa. La mezcla se somete a agitación y centrifugación y posteriormente se toma una alícuota de la fase orgánica, que será sometida a una etapa de limpieza mediante una SPE dispersiva. Esta etapa incluye la adición de fases sólidas como C18, y GCB (carbón grafitizado) o PSA (amina primaria secundaria) a la alícuota con el fin de eliminar interferencias de dicha fase orgánica. Una vez agitado y centrifugado, el sobrenadante será analizado con la instrumentación correspondiente.

Las cantidades de muestra y de disolvente se reducen hasta < 5 g y 10 mL, respectivamente. Se han publicado muchos métodos modificados basados en QuEChERS para el análisis de pesticidas en vegetales, aceitunas, aceite y productos alimenticios agrícolas [García-Reyes *et al.*; 2007; Lesueur *et al.*; 2008; Camino-Sánchez *et al.*; 2011].

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. Las principales ventajas de esta técnica son su simplicidad, la eliminación y/o minimización del consumo de disolventes orgánicos con un menor impacto ambiental y menor riesgo para el analista, un mayor poder de automatización y rapidez en la extracción comparada con las técnicas anteriores.

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 (ver figura I.17) es cuando se establece el equilibrio entre las distintas fases (matriz, fase gaseosa y fibra).

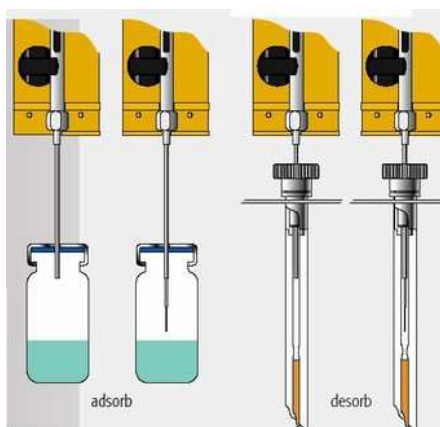


Figura I.17. Procesos de absorción y desorción en HS-SPME (tomada de [www.brechbuehler.com](http://www.brechbuehler.com))

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. La desorción de los compuestos puede llevarse a cabo por efecto de la temperatura (desorción térmica) o por elución con disolventes.

Es una técnica que ha dado buenos resultados en el análisis de plaguicidas en matriz acuosa. 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 *et al.*; 2001; Martins *et al.*; 2011], polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) [Millán *et al.*; 2003] y poliacrilato (PA) [Zambonin *et al.*; 2004].

### **I.7.3. Determinación**

Las características físico-químicas de los diversos productos fitosanitarios determinan la técnica que puede ser utilizada para el análisis de los mismos. La técnicas más empleadas para identificar y cuantificar los residuos de fungicidas en mosto y vino son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (HPLC).

En cromatografía gaseosa, la muestra se inyecta y se volatiliza pasando posteriormente a través de una columna cromatográfica (columnas capilares). La elución por dicha columna se produce por el flujo de una fase móvil, en este caso un gas inerte (N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, He, Ar/CH<sub>4</sub>) cuya única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Esta técnica de separación se acopla a detectores selectivos según el compuesto a determinar, como el detector de nitrógeno-fósforo (NPD) para la detección de compuestos orgánicos que contienen fósforo y/o nitrógeno [Jiménez *et al.*; 2001; Amvrazi *et al.*; 2008; Vaquero *et al.*; 2009], el detector de captura de electrones (ECD) para compuestos halogenados (como son los

pesticidas organoclorados) [Jiménez *et al.*; 2001; Amvrazi *et al.*; 2008; Sanagi *et al.*; 2010] y el detector de espectrometría de masas (MS) [Angioni *et al.* 2005; Cho *et al.* 2008; Cunha *et al.*; 2009; Camino-Sánchez *et al.*; 2011] y/o de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) el cual está teniendo numerosas aplicaciones en los últimos años para el análisis multiresiduos debido a su elevada sensibilidad [Cervera *et al.*; 2010].

Algunos plaguicidas no pueden ser determinados directamente por GC por no tener suficiente volatilidad o ser compuestos termolábiles. Para este tipo de compuestos el uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es particularmente útil. Los componentes más importantes en HPLC son la fase móvil que circula, la columna, y el detector. La fase móvil consta de uno o varios disolventes que eluyen los analitos de forma isocrática (la composición de dicha fase es constante durante el análisis) o en gradiente (la proporción de los disolventes varía a lo largo del análisis). Las columnas más utilizadas para la separación de plaguicidas son de fase reversa (C<sub>18</sub>) y los sistemas de detección más usados para analizar estos compuestos son detector con red de diodos (DAD) [De Melo-Abreu *et al.*; 2006b; Vaquero-Fernández *et al.*; 2008; Wilkowska *et al.*; 2010] y el detector de fluorescencia [Hernández-Borges *et al.*; 2008]; para casos en los que exista gran cantidad de interferencias o se necesite una elevada sensibilidad se utiliza la espectrometría de masas (LC-MS) [Lesueur *et al.*; 2008] y/o la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [Bolaños *et al.*; 2008; Caldas *et al.* 2010; Carpinteiro *et al.* 2010; Fontana *et al.* 2011].

Recientemente se ha desarrollado la técnica UHPLC “Ultra High Performance Liquid Chromatography” en tándem con espectrometría de masas para la determinación de pesticidas en diversas matrices. Con esta técnica se obtiene una mayor eficiencia junto con menores tiempos de análisis gracias al uso



de fases estacionarias de pequeño tamaño de poro (1,7  $\mu\text{m}$ ), y fases móviles a velocidades mayores debido a una instrumentación que puede operar a grandes presiones (15000 psi aprox). Se consigue una mayor resolución y un aumento en la respuesta, junto con menor ensanchamiento de picos [Bonnechère *et al.*; 2011; Romero-González *et al.*; 2011].

#### **I.7.4. Efecto matriz**

Uno de los mayores inconvenientes en la determinación por cromatografía de gases es el denominado “efecto matriz” el cual consiste en el aumento de la respuesta del analito cuando se encuentra en presencia de la matriz. Este efecto fue descrito inicialmente por Erney *et al.* [1993]. El incremento de señal tiene lugar cuando los componentes de la matriz compiten por los analitos por los sitios activos en el inyector, principalmente en el liner, protegiéndolos de la adsorción o degradación térmica, permitiendo que más muestra sea transferida a la columna (figura I.18.). Si se consideran dos muestras que contienen concentraciones idénticas de plaguicidas, una de las cuales está preparada en solvente puro y la otra en extracto de matriz y son analizados por cromatografía de gases, esta última puede presentar picos cromatográficamente mayores.

Este fenómeno no se da por igual en todos los analitos ni en todas las matrices. El aumento de la señal está determinado por parámetros tales como el carácter más o menos polar del plaguicida, el tipo de matriz, la relación concentración analito/matriz y el sistema cromatográfico.

Para compensar este efecto existen diversas estrategias: (i) el uso del método de adición estándar; (ii) el uso de extractos procedentes de matrices sin plaguicidas, enriquecidos posteriormente como patrones (matrix-matched standards); (iii) el uso de patrones deuterados; (iv) el uso de agentes protectores.

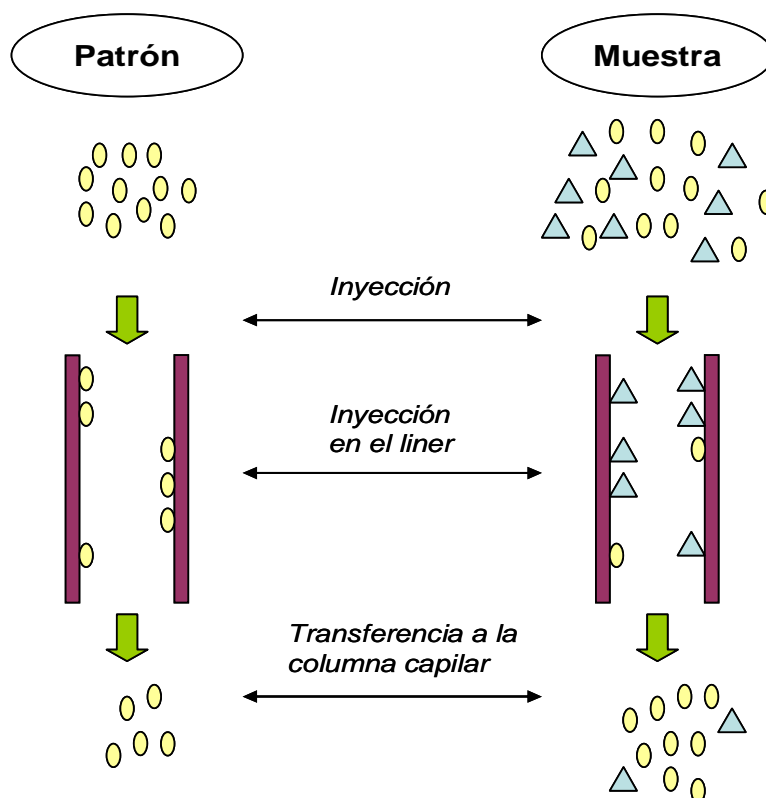


Figura I.18. Esquema del efecto matriz cromatográfico. Moléculas de analito . Molécula de un componente de la matriz .

El método de adición estándar permite mejorar el proceso de cuantificación para estos analitos pero requiere mucho trabajo experimental adicional y además es dependiente de la concentración de las sustancias coextraídas.

El uso de patrones deuterados no siempre es posible desde un punto de vista comercial y presenta grandes desventajas económicas.

El uso de agentes protectores implica la elección de los agentes adecuados para nuestro análisis debido a la gran variedad que existe. Además deben

disolverse en disolventes polares como acetonitrilo o la mezcla acetonitrilo:agua, siendo ambos no recomendables para GC.

## I.8. COMPUESTOS ESTUDIADOS

En la siguiente tabla (tabla I.4.) se recogen las principales propiedades físico-químicas esenciales para conocer su comportamiento en el medio ambiente, comportamiento en la planta, modo de acción y toxicidad de los fungicidas estudiados en este trabajo. Dichos fungicidas presentan, en general:

- Baja solubilidad en agua
- Altos coeficientes de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ). Este coeficiente es una medida de cómo una sustancia química puede distribuirse entre dos solventes inmiscibles, agua (polar) y octanol (apolar). Cuanto mayor es el valor de  $K_{ow}$ , más apolar es la sustancia. Los plaguicidas con una vida media y un  $K_{ow}$  alto pueden acumularse en tejidos grasos de animales y humanos.
- Presiones de vapor bajas. Es una medida de la volatilidad de una sustancia química (plaguicida). Los plaguicidas con una presión de vapor menor de  $1,0 \times 10^{-7}$  mm Hg tienen bajo poder para volatilizarse mientras que con presiones de vapor superiores a  $1,0 \times 10^{-3}$  mm Hg tienen alto potencial para volatilizarse.

Tabla I.4. Propiedades físico-químicas, comportamiento de la planta y modo de acción de los fungicidas objeto de estudio [Tomlin, 2003].

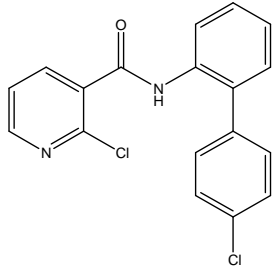
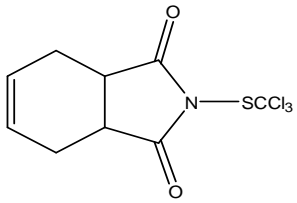
BOSCALID	
Identificación y propiedades físico-químicas:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nº CAS: 188425-85-6</li> <li>Grupo químico: carboxamida</li> <li>Fórmula molecular: C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O</li> <li>Peso molecular: 343,2 g mol<sup>-1</sup></li> <li>Solubilidad en agua (a 20 °C): 4,6 mg L<sup>-1</sup></li> <li>Log Kow (a pH 7 y 20 °C): 2,96</li> <li>Presión de vapor (a 20 °C): 5,4 x 10<sup>-9</sup> mm Hg</li> </ul>	
Comportamiento en la planta:	Fungicida penetrante o sistémico translaminar
Empleo en el viñedo	Acción preventiva y curativa en el control del oídio y botritis Plazo de seguridad: 28 días
Modo de acción (FRAC)	Inhibidor de la respiración a nivel de la succinato-deshidrogenasa (grupo C2)
CAPTAN	
Identificación y propiedades físico-químicas:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nº CAS: 133-06-2</li> <li>Grupo químico: ftalimida</li> <li>Fórmula molecular: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S</li> <li>Peso molecular: 300,6 g mol<sup>-1</sup></li> <li>Solubilidad en agua (a 20 °C): 5,2 mg L<sup>-1</sup></li> <li>Log Kow (a pH 7 y 20 °C): 2,5</li> <li>Presión de vapor (a 20 °C): 9x10<sup>-8</sup> mmHg</li> </ul>	
Comportamiento en la planta:	Fungicida de contacto
Empleo en el viñedo	Acción preventiva y curativa en el control de botritis Plazo de seguridad: 14 días
Modo de acción (FRAC)	Interfiere el mecanismo de respiración de los hongos inhibiendo la germinación de esporas y dificultando el crecimiento y desarrollo micelar

Tabla I. 4. Propiedades físico-químicas, comportamiento de la planta, y modo de acción de los fungicidas objeto de estudio [Tomlin, 2003].

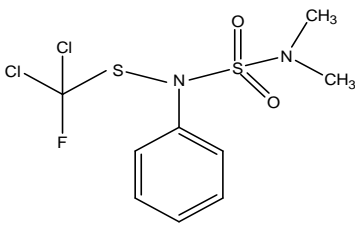
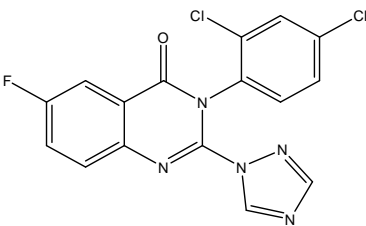
<b>DICLOFLUANIDA</b>	
Identificación y propiedades físico-químicas:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nº CAS: 1085-98-9</li> <li>Grupo químico: sulfamida</li> <li>Fórmula molecular: C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub></li> <li>Peso molecular: 333,2 g mol<sup>-1</sup></li> <li>Solubilidad en agua (a 20 °C): 1,3 mg L<sup>-1</sup></li> <li>Log Kow (a pH 7 y 20 °C): 3,70</li> <li>Presión de vapor (a 25 °C): 2,8x 10<sup>-7</sup> mmHg</li> </ul>	
Comportamiento en la planta:	Foliar, de contacto y protector
Empleo en el viñedo	Acción preventiva y curativa en el control del oídio y botritis Plazo de seguridad: -- días
Modo de acción (FRAC)	Modo de acción multi-localizado. Inhibidor de la respiración
<b>FLUQUINCONAZOL</b>	
Identificación y propiedades físico-químicas:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nº CAS: 136426-54-5</li> <li>Grupo químico: triazol</li> <li>Fórmula molecular: C<sub>16</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>FN<sub>5</sub>O</li> <li>Peso molecular: 376,2 g mol<sup>-1</sup></li> <li>Solubilidad en agua (a 20 °C): 1,15 mg L<sup>-1</sup></li> <li>Log Kow (a pH 7 y 20 °C): 3,24</li> <li>Presión de vapor (a 25 °C): 4,8 x 10<sup>-11</sup> mmHg</li> </ul>	
Comportamiento en la planta:	Fungicida sistémico
Empleo en el viñedo	Acción preventiva y erradicante en el control de oídio Plazo de seguridad: no tiene
Modo de acción (FRAC)	Inhibidor de la biosíntesis de ergosterol (componente de las paredes celulares de los hongos superiores) a nivel de la C <sub>14</sub> -demetilasa (grupo G1)

Tabla I.4. Propiedades físico-químicas, comportamiento de la planta, y modo de acción de los fungicidas objeto de estudio [Tomlin, 2003].

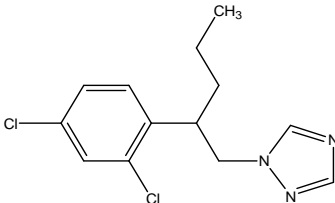
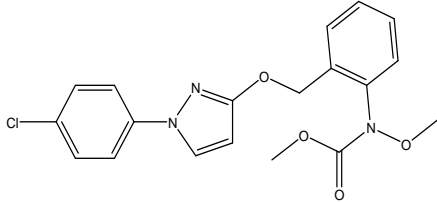
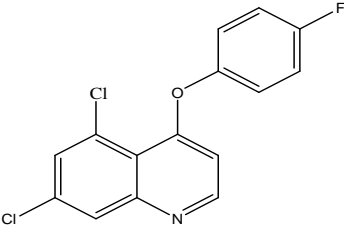
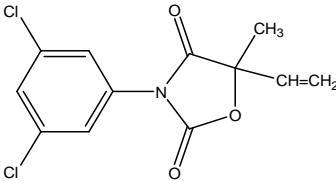
<b>PENCONAZOL</b>	
Identificación y propiedades físico-químicas:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• N° CAS: 66246-88-6</li> <li>• Grupo químico: triazol</li> <li>• Fórmula molecular: C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub></li> <li>• Peso molecular: 284,2 g mol<sup>-1</sup></li> <li>• Solubilidad en agua (a 20 °C): 73 mg L<sup>-1</sup></li> <li>• Log Kow (a pH 7 y 20 °C): 3,72</li> <li>• Presión de vapor (a 25 °C): 2,7x 10<sup>-6</sup> mmHg</li> </ul>	
Comportamiento en la planta:	Fungicida sistémico
Empleo en el viñedo	Acción preventiva y curativa en el control del oídio Plazo de seguridad: 35 días
Modo de acción (FRAC)	Inhibidor de la biosíntesis de ergosterol (componente de las paredes celulares de los hongos superiores) a nivel de la C <sub>14</sub> -demetilasa (grupo G1)
<b>PIRACLOSTROBIN</b>	
Identificación y propiedades físico-químicas:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• N° CAS: 175013-18-0</li> <li>• Grupo químico: estrobilurina</li> <li>• Fórmula molecular: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClO<sub>4</sub></li> <li>• Peso molecular: 387,8 g mol<sup>-1</sup></li> <li>• Solubilidad en agua (a 20 °C): 1,9 mg L<sup>-1</sup></li> <li>• Log Kow (a pH 7 y 20 °C): 3,99</li> <li>• Presión de vapor (a 20 °C): 1,9 x 10<sup>-10</sup> mmHg</li> </ul>	
Comportamiento en la planta:	Fungicida penetrante o sistémico translaminar
Empleo en el viñedo	Acción preventiva y curativa en el control de mildiu y oídio Plazo de seguridad: 35 días
Modo de acción (FRAC)	Inhibidor de la respiración celular bloqueando el transporte de electrones entre el citocromo b y el citocromo c1 en el sitio Qo (grupo C3)

Tabla I.4. Propiedades físico-químicas, comportamiento de la planta, y modo de acción de los fungicidas objeto de estudio [Tomlin, 2003].

QUINOXIFEN	
Identificación y propiedades físico-químicas:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nº CAS: 124495-18-7</li> <li>Grupo químico: quinolina</li> <li>Fórmula molecular: C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>FNO</li> <li>Peso molecular: 308,1 g mol<sup>-1</sup></li> <li>Solubilidad en agua (a 20 °C): 0,047 mg L<sup>-1</sup></li> <li>Log Kow (a pH 7 y 20 °C): 4,66</li> <li>Presión de vapor (a 25 °C): 9,4 x 10<sup>-8</sup> mm Hg</li> </ul>	
Comportamiento en la planta:	Fungicida sistémico
Empleo en el viñedo	Plazo de seguridad: 30 días
Modo de acción (FRAC)	Inhibe el desarrollo de los apresorios deteniendo las infecciones
VINCLOZOLIN	
Identificación y propiedades físico-químicas:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nº CAS: 50471-44-8</li> <li>Grupo químico: dicarboximida</li> <li>Fórmula molecular: C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub></li> <li>Peso molecular: 286,1 g mol<sup>-1</sup></li> <li>Solubilidad en agua (a 20 °C): 3,4 mg L<sup>-1</sup></li> <li>Log Kow (a pH 7 y 20 °C): 3,02</li> <li>Presión de vapor (a 20 °C): 1,2 x 10<sup>-7</sup> mm Hg</li> </ul>	
Comportamiento en la planta:	Fungicida de contacto
Empleo en el viñedo	Acción preventiva y curativa en el control de botritis Plazo de seguridad: 21 días
Modo de acción (FRAC)	Inhibidor de la transducción de la señal osmótica (grupo E3)

## I.9. DEGRADACIÓN DE PESTICIDAS

### I.9.1. Procesos de degradación

Cuando un plaguicida es liberado en el medio ambiente interacciona con los componentes bióticos y abióticos de éste, sufriendo alteraciones en su estructura que pueden modificar sus características físico-químicas y su acción biológica. La degradación del plaguicida dará lugar a nuevos compuestos que no necesariamente han de ser menos tóxicos que la sustancia original.

La degradación puede ser parcial o total, llegando en casos extremos a la obtención de compuestos inorgánicos como H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, amonio, fosfatos, etc. Las reacciones de degradación son muy variadas (oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución, etc.) pudiendo estar mediadas por agentes tanto orgánicos (bacterias del suelo principalmente) como inorgánicos. También son significativos los procesos fotolíticos. Las cinéticas de degradación de un plaguicida en campo son complejas debido a que pueden tener lugar simultáneamente varios procesos.

La facilidad de degradación de un plaguicida depende de su estructura molecular. En general los más resistentes son los organoclorados. Entre los menos resistentes están los organofosforados.

Los tratamientos más habituales para la eliminación de pesticidas en aguas y suelos se pueden dividir en tres grandes grupos: oxidación, tratamientos físicos y tratamientos biológicos.

#### *OXIDACIÓN*

Las tecnologías de oxidación forman parte de un grupo de procesos que tiene la capacidad de reducir o eliminar tanto la toxicidad como el volumen de contaminantes peligrosos. Los oxidantes más utilizados son dióxido de cloro,



peróxido de hidrógeno, ozono, fotólisis y ozono con radiación ultravioleta. Pueden oxidar materiales peligrosos hasta su eliminación total en forma de moléculas inorgánicas o lo que es más habitual, transformar a los contaminantes en sustancias menos tóxicas o que son más fáciles de degradar por otros métodos.

#### *TRATAMIENTOS FÍSICOS*

Las características fundamentales de estos tratamientos son su selectividad y la posibilidad de concentrar los contaminantes en una fase que se añade al medio, habitualmente suelos. Entre los tratamientos con uso potencial para la eliminación de pesticidas se encuentran:

- Extracción con disolventes: con esta técnica el contaminante puede aislarse y concentrarse pero no destruirse.
- Lavado con surfactantes: existen tecnologías de lavado de suelos utilizando glicol o polietilenglicol.
- Extracción con fluidos supercríticos: suele realizarse con metanol y se alcanzan rendimientos entre el 50 y el 90%.
- Retención sobre carbón activo
- Nanofiltración
- Ósmosis inversa

#### *TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS*

Con microorganismos naturales o cultivados especialmente para convertir los contaminantes en compuestos simples bajo condiciones medio ambientales especiales. Los tratamientos biológicos tienen varias ventajas, por ejemplo, puede

llegarse a la mineralización completa de los contaminantes, siendo muy escasa la contaminación que se transfiere a otros medios.

La biodegradación de un contaminante en el medio ambiente depende de los microorganismos presentes, pudiendo pertenecer al medio o crecer en condiciones controladas y ser añadidos posteriormente al sistema para producir la degradación. La velocidad del proceso de degradación está influenciada por pH, temperatura, y humedad. Los valores óptimos para una mayor degradación dependerán del tipo de microorganismo aunque generalmente unos valores entre 6-9 para pH, 20-45 °C para temperatura y 25-85% de humedad son adecuados en cualquier caso.

#### *HIDRÓLISIS*

La hidrólisis es la reacción de las moléculas de plaguicida con el agua del medio. Esta reacción puede tener lugar tanto en condiciones ácidas como básicas. Dado que el pH en aguas naturales está entre 5 y 9, los procesos bióticos o fotolíticos están favorecidos respecto a este tipo de degradación por lo que es un proceso de menor importancia en aguas superficiales, aunque puede ser una importante vía de degradación de pesticidas en aguas subterráneas, donde la fotólisis prácticamente no tiene lugar.

#### *FOTÓLISIS*

La fotólisis es la ruptura de un enlace químico en presencia de radiación, generalmente radiación ultravioleta. Muchos compuestos orgánicos que pueden considerarse residuos tóxicos absorben energía en el espectro ultravioleta y pueden ser susceptibles de tratamiento fotolítico. La radiación UV es suficiente para romper muchos tipos de enlaces covalentes.

Los factores más importantes que influyen sobre la fotorreactividad de los compuestos son:

- Estado físico del sistema a tratar (sólido, líquido o gas)
- Influencias ambientales (disolvente, soluto, temperatura, etc.)
- Grado de sustitución del grupo funcional.

Con respecto a la fotólisis se consideran dos efectos diferentes: fotólisis directa y fotólisis indirecta.

La fotólisis directa comprende la absorción directa de la luz por el plaguicida seguido de la reacción química correspondiente, sin ninguna colaboración de otras sustancias químicas. Este proceso viene condicionado por factores medio ambientales como la transmisión de luz a través del agua, y por factores intrínsecos de la sustancia como son la velocidad de absorción de luz y el rendimiento cuántico de la reacción fotoquímica.

En los procesos de fotólisis indirecta, la energía de la luz es absorbida por otros constituyentes del medio y es o bien transmitida a un plaguicida cercano o forma especies reactivas como radicales hidroxilo, que reaccionan con el plaguicida y lo transforman. Especies orgánicas como los ácidos húmicos y fúlvicos e inorgánicas como nitratos y nitritos pueden acelerar la fotodegradación del pesticida [Manzanilla-Cano *et al.*; 2010; Xie *et al.*; 2011; Ukpebor *et al.*; 2012] aunque también se ha observado el efecto contrario utilizando agua de mar o determinados compuestos orgánicos [Dimou *et al.*; 2005].

Existen numerosos estudios de fotodegradación realizados en condiciones de laboratorio y utilizando diferentes tipos de plaguicidas: carbamatos [Iesce *et al.*; 2006; Mazellier *et al.*; 2010], triazinas [Jain *et al.*; 2009], organofosforados [Weber *et*

*al.*; 2009a; Gatidou *et al.*; 2011], etc. La diversidad de resultados sobre fotólisis de pesticidas (tiempo de vida media, constante de velocidad, etc.) provienen de la diversidad en los sistemas acuosos y de las fuentes de irradiación utilizadas (luz solar, lámpara de arco de xenón o lámpara de mercurio). La velocidad de fotólisis y la distribución de los fotoproductos son dependientes de la intensidad y distribución de la longitud de onda de la luz usada. En este estudio, se utilizó una lámpara de arco de xenón (Xe) ya que proporciona longitudes de onda cercanas a las del espectro de la luz solar, y teóricamente los productos de degradación son similares a los obtenidos mediante irradiación solar [Weber *et al.*; 2009b]. Las velocidades de fotólisis con lámparas artificiales siempre son mayores que las obtenidas utilizando luz solar, tal y como se ha demostrado en trabajos anteriores [Hu *et al.*; 2009; Gao *et al.*; 2011].

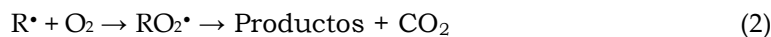
Generalmente, los estudios de fotodegradación se realizan con altas concentraciones de pesticidas (entre 0,2 y 1 ppm) con el fin de identificar la mayor cantidad posible de productos de degradación. Además, el utilizar altas concentraciones conlleva el uso de disolventes orgánicos como acetonitrilo y metanol para incrementar la solubilidad del pesticida en agua (normalmente muy baja), lo cual puede variar el comportamiento del pesticida con respecto a un medio acuoso natural [Sanz-Asensio *et al.*; 1999a].

### **I.9.2. Fotocatálisis**

Debido a las características químicas que poseen los plaguicidas, son contaminantes persistentes que resisten en grado variable la degradación fotoquímica, química y bioquímica, por lo que su vida media en el medio ambiente puede ser elevada.

Actualmente, existen diversas tecnologías para la destrucción de plaguicidas en agua, que van desde tratamientos físicos como la adsorción, filtros percoladores y degradación térmica, hasta tratamientos biológicos y procesos avanzados de oxidación [Giroud *et al.*; 2010; Coppola *et al.*; 2011]. Los últimos avances en la depuración de aguas, principalmente en la oxidación de compuestos orgánicos tóxicos, persistentes y acumulables, utilizan tecnologías o procesos avanzados de oxidación, catalíticos químicos o fotoquímicos, que involucran la generación y uso de especies, como el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el cual posee alta efectividad para la oxidación de la materia orgánica [Marín *et al.*; 2011; Plantard *et al.*; 2012].

Los radicales se generan en disolución y, debido a que son agentes fuertemente oxidantes, reaccionan frente a la mayoría de las moléculas orgánicas y muchas especies inorgánicas, principalmente mediante reacciones de abstracción de hidrógeno, generando radicales orgánicos libres (ecuación 1), los cuales pueden reaccionar con oxígeno molecular formando peroxirradicales (ecuación 2). Además, pueden iniciarse reacciones de oxidación en serie que pueden conducir a la mineralización completa de los compuestos orgánicos [Ismail *et al.*; 2011]:



La fotocatalisis heterogénea, una tecnología de oxidación avanzada, es un proceso que se basa en la absorción directa o indirecta por un sólido, que normalmente es un semiconductor, de fotones de luz, visible o UV, con energía suficiente, igual o superior a la energía del gap del semiconductor,  $E_{\text{gap}}$ . Las reacciones de oxidación o reducción se presentan en la superficie del sólido excitado o en la región interfacial entre el sólido excitado y la disolución, sin que el catalizador (el sólido) sufra cambios químicos. En esta interfase hay una densidad

local de carga diferente a la del seno de ambas fases, produciéndose un campo eléctrico que actúa como fuerza impulsora en el proceso de transferencia de carga. La interfase semiconductor/ disolución acuosa tiene como rasgo distintivo que la redistribución de carga se extiende significativamente, tanto del lado de la disolución, como del lado del semiconductor.

El  $\text{TiO}_2$  es el semiconductor más usado en fotocatalisis, debido a que es química y biológicamente inerte, no es tóxico, es estable a la corrosión fotoquímica y química, es abundante y barato, además posee un gap de energía de 3,2 eV que puede ser excitado con luz UV de  $\lambda < 387$  nm, la cual puede ser aportada por la luz solar. El dióxido de titanio Degusta P-25 es el material más usado en aplicaciones fotocatalíticas ambientales [Ahmed *et al.*; 2011; Lambropoulou *et al.*; 2011]. El producto es una mezcla de las fases cristalinas anatasa/ rutilo en proporción 80:20, con un 99,5% de pureza, posee un área superficial de  $50 \pm 15$  m<sup>2</sup> y un diámetro promedio de 21 nm.

### I.9.3. Cinética de degradación. Ecuación de velocidad

Las reacciones de degradación de los pesticidas en agua pueden seguir cinéticas de distintos órdenes, pero de forma general, se describen como reacciones de primer orden. En estos casos, la representación gráfica del logaritmo de las concentraciones en función del tiempo da una recta, cuya pendiente se puede relacionar con la constante de degradación ( $k$ ) y ésta, con el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) que indica la estabilidad del compuesto a través del tiempo, según las ecuaciones [Levine, 1978] :

$$\ln [C_0] - \ln [C] = kt \quad (3)$$

$$t_{1/2} = 0,693/k \quad (4)$$

Las reacciones que tienen interés en el medio ambiente son las producidas por la luz solar, y para ello es necesario que el compuesto absorba a la longitud de onda de la radiación solar, por encima de 290 nm.

En aguas naturales, además de la reacción de fotólisis, se llevan a cabo fotodegradaciones sensibilizadas debido a la presencia de compuesto o iones naturales, tales como nitratos, nitritos, ácidos húmicos, etc.; que aceleran la degradación del compuesto. Por esta razón, la determinación de la velocidad de fotólisis directa de un compuesto se suele realizar en agua desionizada, tal y como se ha hecho en este trabajo.

#### **I.9.4. Identificación de metabolitos. Técnicas analíticas**

Las técnicas analíticas más utilizadas en estudios de degradación son GC [Mukhopadhyay *et al.*; 2013; Peng *et al.*; 2013] y HPLC [Mazellier *et al.*; 2010; Gatidou *et al.*; 2011]. Ambas técnicas han sido usadas tanto para realizar estudios cinéticos de degradación como para identificar los productos de degradación obtenidos. En estudios de identificación, dichas técnicas se acoplan a un espectrómetro de masas el cual permite identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos y elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Dicho detector permite conocer la masa del compuesto a identificar y la presencia o ausencia de átomos distintos al H, O o C en la molécula pero no se puede conocer su estructura de forma exacta.

Por ello, hay estudios en los que la identificación de analitos es más exhaustiva, utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) [Liu *et al.*; 2012; Sandín-España *et al.*; 2013]. Esta técnica se fundamenta en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos, en base a la interacción del momento magnético nuclear con un campo magnético externo  $B_0$ , que conduce a la

generación de un diagrama formado por diferentes niveles energéticos. Proporciona así, suficiente información estructural para la confirmación de una determinada estructura así como para la identificación y determinación estructural de un determinado compuesto orgánico.





**JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



La aplicación de productos fitosanitarios sigue siendo en la actualidad el medio de lucha más eficaz para combatir la incidencia de las principales enfermedades fúngicas, responsables de las pérdidas económicas más importantes de este sector. Con el paso del tiempo, las sustancias activas fúngicas de estos productos fitosanitarios dejan de ser eficaces contra los hongos de las principales enfermedades (mildiu, oidio y botritis) debido a fenómenos de resistencia. Por dicho motivo, es necesaria la autorización de nuevas sustancias químicas fúngicas denominadas “sustancias de nueva generación” y la aprobación y registro de nuevos productos fitosanitarios que las contengan y que puedan aplicarse en este sector.

Atendiendo a este hecho y al nuevo marco directivo que va a regular la comercialización y el uso en la Unión Europea de plaguicidas en los próximos años, se establece la siguiente hipótesis de partida: *“siempre y cuando las concentraciones de los residuos de fungicidas de nueva generación en uvas destinadas a procesos de vinificación sean inferiores a los LMRs establecidos por la legislación, éstas podrán ser utilizadas en dicho proceso de elaboración garantizando la calidad sanitaria del producto final. Ahora bien, los residuos de estos plaguicidas podrían producir paradas fermentativas, originar metabolitos de degradación con una toxicidad superior a la de las sustancias activas de partida y alterar la calidad organoléptica de los vinos debido a la modificación de la composición polifenólica de éstos”*.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es conocer cómo evolucionan los niveles residuales de fungicidas de nueva generación a lo largo del proceso de vinificación y cómo dichos residuos pueden influir en la fermentación y calidad organoléptica de los vinos elaborados con uvas tintas variedad

Tempranillo, así como identificar los metabolitos obtenidos mediante la aplicación de diferentes vías de degradación.

En base a todo lo expuesto hasta ahora, se establecen los siguientes objetivos más concretos:

1. Desarrollar y validar nuevos protocolos analíticos para la determinación de niveles residuales de fungicidas en muestras enológicas.
2. Evaluar la evolución de niveles residuales de fungicidas de nueva generación a lo largo de las diferentes etapas implicadas en los procesos de vinificación de uva tinta Tempranillo, desde la aplicación en campo hasta el embotellado del vino final.
3. Evaluar el efecto de la presencia de residuos de fungicidas de nueva generación sobre el curso de las fermentaciones y sobre la composición fenólica de los vinos obtenidos.
4. Conocer los metabolitos de degradación generados mediante los procesos degradativos de hidrólisis, fotólisis y fotocátalisis y establecer las rutas degradativas de estos procesos.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



**DESARROLLO DE PROTOCOLOS ANALÍTICOS PARA  
LA DETERMINACIÓN DE FUNGICIDAS EN UVAS,  
VINO Y OTRAS MUESTRAS DEL PROCESO DE  
VINIFICACIÓN**

---





La metodología analítica más extendida para la determinación de fungicidas en muestras de uva, mosto y vino consta de diversas etapas: una extracción inicial sólido-líquido o líquido-líquido con un disolvente o mezcla de disolventes orgánicos; una separación de las fases acuosa y orgánica combinada con una etapa posterior de purificación-concentración; y finalmente, la determinación de los analitos de interés por diferentes técnicas cromatográficas.

### **III.1.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA**

Como se explicó en la introducción de este trabajo, una de las técnicas instrumentales más habituales para el análisis de fungicidas en muestras de uvas, mostos y vinos es cromatografía de gases (GC) acoplada a detectores selectivos como: detector de nitrógeno-fósforo (NPD), detector de captura de electrones (ECD) y/o detector de espectrometría de masas (MS). Igual de eficaz resulta la cromatografía de líquidos acoplada a un detector de fotodiodos (DAD), de MS y/o de espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

La separación e identificación de los ocho fungicidas objeto de estudio en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a un detector ECD y a un MS de simple cuadrupolo, tras la optimización previa de las condiciones instrumentales.

La cuantificación se realizó en todas las técnicas por el método del patrón o estándar interno (IS). Para poder aplicar este método correctamente es necesario que se cumplan los siguientes requisitos: la señal del patrón interno debe estar bien definida, no debe solapar con las señales de los analitos aunque su tiempo de retención debe ser similar y no debe estar presente en las muestras a analizar. Para

la selección del patrón interno de cuantificación se realizaron estudios preliminares con varios compuestos, siendo finalmente tetradifon la sustancia elegida para ello debido a que presentó una sensibilidad alta y un tiempo de retención similar a los analitos.

El cromatograma típico de separación de los fungicidas y el patrón interno, tetradifon, para GC-MS y GC-ECD en acetato de etilo se muestran en la figura III.1. En el caso de GC-MS, se trabajó en modo SIM (*single ion monitorization*) con uno o varios iones específicos ( $m/z$ ) para incrementar la sensibilidad y selectividad del análisis al eliminar posibles interferencias. En la selección de las relaciones  $m/z$  características para cada fungicida han primado diferentes factores como son la abundancia relativa, la relación  $m/z$  específica y la no coincidencia de dicha relación en el espectro de masas de sustancias coextraídas procedentes de las muestras que eluyen en el mismo tiempo de retención.

### **III.1.2. ANÁLISIS DE FUNGICIDAS EN MOSTO Y VINO**

La técnica elegida para la extracción de los fungicidas objeto de estudio en esta Tesis Doctoral ha sido la extracción en fase sólida. La cantidad extraída para cada compuesto depende de aquellos factores que afectan al rendimiento de la extracción. Factores tales como la fase sólida utilizada y su acondicionamiento, volumen de muestra, disolvente orgánico que se utiliza como eluyente y su volumen, así como la composición y volumen de la disolución de lavado se pueden considerar los más importantes. Se ha estudiado la implicación de estos factores en la extracción de manera univariante [ver *Anexo I*].

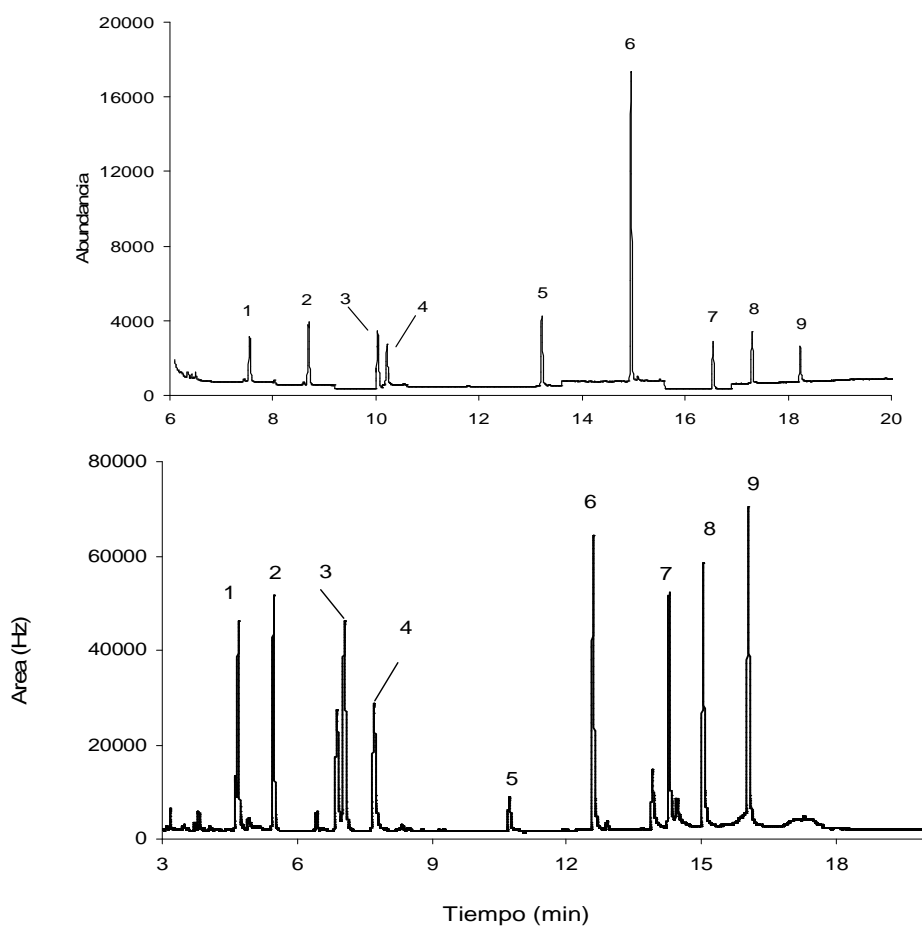


Figura III.1. Cromatograma obtenido por (a) GC-MS y (b) GC-EDC en acetato de etilo. Identificación de los picos: 1 Vinclozolin; 2 Diclofluanida; 3 Penconazol; 4 Captan; 5 Quinoxifen; 6 Tetradifon (IS); 7 Fluquinconazol; 8 Boscalid; 9 Piraclostrobin.

### III.1.2.1. Tipo de fase sólida

Los diferentes materiales adsorbentes usados en la extracción de muestras enológicas se resumen en la tabla III.1. con sus principales características.

Tabla III.1. Adsorbentes SPE empleados en la extracción de fungicidas

Fase reversa	
Características	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fase líquida polar y fase estacionaria apolar</li> <li>• La retención de los analitos orgánicos se debe a fuerzas atractivas entre los enlaces C-N del analito y de los grupos funcionales superficiales de la sílica. Para eluir el analito se necesita un disolvente apolar que rompa esas uniones hidrofóbicas.</li> </ul>
Tipos	Octadecil-carbono (C18) <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria es un polímero de sílica con una cadena hidrocarbonada de 18 C: Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>.</li> <li>➤ Aplicaciones: extracción o retención de compuestos como antibióticos, drogas, hidrocarburos, fenoles, esteroides, plaguicidas...</li> </ul>
	Poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria es una resina polimérica de estireno-divinilbenceno.</li> <li>➤ Aplicaciones: retienen un amplio rango de compuestos, tanto polares como no polares, mucho más fuertemente que los rellenos de fase reversa de base sílice.</li> </ul>
Fase normal	
Características	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fase líquida apolar y fase estacionaria polar</li> <li>• La retención de un analito a este tipo de fase se debe a interacciones hidrofílicas (puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, entre los grupos funcionales polares del analito con los grupos polares de la superficie del adsorbente. Para eluir un analito adsorbido a esta fase se debe emplear un disolvente que sea más polar que la matriz original de la muestra.</li> </ul>
Tipos	Alúmina <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria está compuesta por óxidos de aluminio que pueden presentar diferentes grados de actividad en función de su Ph (ácida, básica o neutra).</li> <li>➤ Aplicaciones: extracción por adsorción de compuestos polares, como vitaminas, enzimas, antibióticos...</li> </ul>
	Sílica <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria es una sílica no derivatizada, cuyos grupos hidroxilo libres presentes en la superficie son responsables de la adsorción de compuestos polares.</li> <li>➤ Aplicaciones: extracción de alcoholes, plaguicidas, cetonas, fenoles, esteroides...</li> </ul>
	Florisil <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria es un silicato de magnesio.</li> <li>➤ Aplicaciones: extracción por adsorción de alcoholes, aminos, plaguicidas, fenoles...</li> </ul>
Intercambio iónico	
Características	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los adsorbentes se suelen emplear con compuestos cargados que se encuentran en una solución generalmente acuosa.</li> <li>• El mecanismo principal de retención son atracciones electroestáticas entre los grupos cargados del analito y de la superficie del adsorbente.</li> </ul>
Tipos	Aminopropil (-NH <sub>2</sub> ) <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria es un polímero de sílica con un grupo aminopropil. Se considera un débil intercambiador aniónico cuando se usa con disoluciones acuosas, aunque también puede actuar en fase normal extrayendo componentes polares de matrices apolares.</li> <li>➤ Aplicaciones: ácidos orgánicos fuertes, ácidos grasos, pigmentos...</li> </ul>
	Amina primaria y secundaria (PSA) <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria es un polímero de sílica de intercambio aniónico constituido por unidades de N-propiletildiamina que contiene aminas primarias y secundarias.</li> <li>➤ Aplicaciones: ácidos orgánicos fuertes, ácidos grasos, carbohidratos, pigmentos...</li> </ul>
	Fuerte intercambio aniónico (SAX) <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria consiste en un grupo amino cuaternario unido a la superficie de la sílica, que actúa como fuerte intercambiador aniónico.</li> <li>➤ Aplicaciones: se emplea en la extracción de compuestos cargados negativamente desde soluciones acuosas y no acuosas, como ácidos carboxílicos, surfactantes...</li> </ul>
Adsorción	
Carbón negro grafitizado (GCB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ La fase estacionaria, no porosa, posee una estructura de anillo hexagonal que le confiere gran afinidad hacia compuestos orgánicos polares y no polares. La retención se basa en la estructura del analito y en la existencia de grupos funcionales en el mismo que interactúe con la superficie del adsorbente.</li> <li>➤ Aplicaciones: pigmentos, esteroides, componentes de frutas...</li> </ul>

La selección de la fase sólida se realizó según la experiencia del equipo investigador en estudios de compuestos similares, además de tener en cuenta la polaridad de las sustancias a extraer. Por ello las dos fases estudiadas fueron: octadecilsilano (C<sub>18</sub>) y poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB).

Tomando como condiciones de extracción las correspondientes a trabajos anteriores realizados para plaguicidas en mosto y vino en ambas fases sólidas, se comprueba que mientras que la fase C<sub>18</sub> retiene los analitos, la fase PS-DVB tiene unas recuperaciones muy bajas (< 50% para todos los fungicidas de este estudio) por lo que esta fase se descarta para posteriores estudios. La fase sólida C<sub>18</sub> se seleccionó para realizar la optimización de la metodología a seguir en SPE.

El acondicionamiento o activación de esta fase, C<sub>18</sub>, se realizó adicionando 5 mL de metanol y posteriormente 3 mL de agua grado Milli Q.

#### **III.1.2.2. Elución. Tipo y volumen de disolvente**

Tanto el eluyente como el tipo de fase sólida son esenciales en SPE y ambos dependen de la naturaleza química de los analitos. Cuatro disolventes orgánicos con diferentes polaridades fueron estudiados con el fin de seleccionar el mejor disolvente para la extracción: acetato de etilo, diclorometano, acetona y acetonitrilo (constantes dieléctricas: 6,0/9,1/21/37 respectivamente). Acetato de etilo y acetona son disolventes ampliamente usados como eluyentes en SPE debido a su capacidad de elución tanto de compuestos polares como apolares.

Tres muestras de vino tinto de 10 mL, cada una fortificada con 500 µg L<sup>-1</sup> de cada fungicida fueron extraídas con cada disolvente. La figura III.2. muestra las recuperaciones totales obtenidas con cada disolvente utilizado.

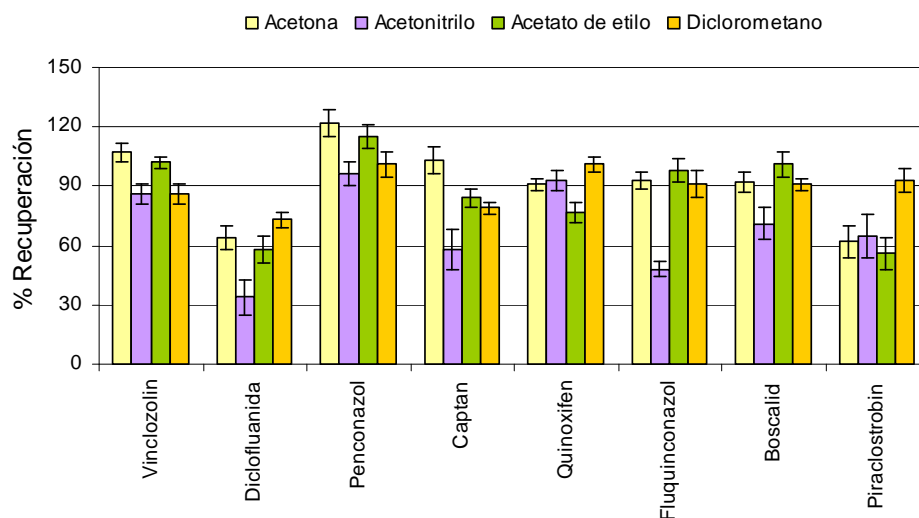


Figura III.2. Recuperaciones totales ( $R_1+R_2+R_3\dots+R_n$ ) con diferentes disolventes ( $n=3$ )

La elución se llevó a cabo añadiendo mililitro a mililitro de cada disolvente hasta que la extracción en el último mililitro fuese inferior al 1% para cada fungicida. Así, los volúmenes necesarios para una elución total fueron: 3 mL para acetona, 3 mL para acetato de etilo, 4 mL para acetonitrilo y 5 mL para diclorometano.

Acetonitrilo fue el disolvente con el que se obtuvieron las peores recuperaciones con valores inferiores al 70% para cuatro fungicidas (diclofluanida, captan, fluquinconazol y piraclostrobin). Los disolventes acetato de etilo y acetona presentaron valores de recuperación inferiores al 70% sólo para diclofluanida y piraclostrobin. Sin embargo, la elución del cartucho con diclorometano ofreció buenas recuperaciones para todos los fungicidas estudiados.

Los disolventes acetona, acetato de etilo y acetonitrilo son disolventes orgánicos que en general extraen un gran número de interferencias presentes en la

matriz de la muestra. Sin embargo, la elución con diclorometano presentó cromatogramas más limpios al extraer un menor número de interferencias.

Por ambas razones, el disolvente elegido para la extracción de los compuestos fue diclorometano dado que las recuperaciones obtenidas fueron superiores al 70% para todos los fungicidas y los cromatogramas presentan un menor número de señales correspondientes a compuestos presentes en la matriz. El volumen necesario para eluir completamente todos los compuestos de la fase sólida fueron 5 mL.

### **III.1.2.3. Etapa de lavado**

Para comprobar la influencia de esta etapa en el rendimiento de la extracción se procedió al lavado del cartucho una vez retenidos en él los analitos junto con otras sustancias procedentes de la matriz. Las disoluciones de lavado estudiadas se formaron con diferentes relaciones de agua y metanol, respectivamente: 10:0, 9:1, 7:3 y 5:5. La figura III.3. muestra las recuperaciones obtenidas en el extracto final utilizando las mezclas anteriores en la etapa de lavado.

Las recuperaciones obtenidas fueron similares para las mezclas 10:0 y 9:1, siendo ligeramente menores para la mezcla 7:3 y muy bajas para la mezcla 5:5, en las que la proporción de metanol es mayor. Conforme aumenta la proporción de metanol en la mezcla de lavado, tiene lugar una reducción en las recuperaciones de los fungicidas, posiblemente debido a una mayor solubilidad de los plaguicidas en disolventes orgánicos como es metanol.

Otro factor a tener en cuenta es la presencia de interferencias. La mezcla 10:0 no es capaz de eliminar gran parte de las interferencias presentes. Sin embargo, la



adición de una pequeña proporción de metanol al agua permite eliminar gran parte de los compuestos de la matriz obteniéndose así cromatogramas más limpios.

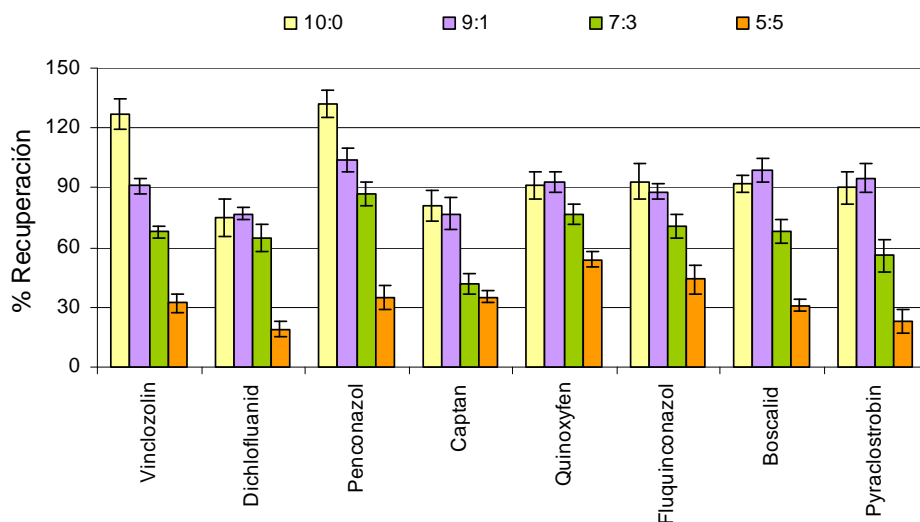


Figura III.3. Recuperaciones totales con diferentes mezclas de lavado (n=3)

Por ello, la relación agua/metanol 9:1 fue seleccionada para los cartuchos C<sub>18</sub> siendo la relación que permite tanto una extracción sin una pérdida significativa de analitos como la obtención de cromatogramas con un menor número de interferencias.

Posteriormente se realizó el estudio de diferentes volúmenes de lavado. Entre 2 y 10 mL fueron los volúmenes estudiados de la mezcla seleccionada. Las recuperaciones obtenidas fueron similares para todos los compuestos independientemente del volumen de lavado utilizado, sin embargo, a mayor volumen, las interferencias presentes en el cromatograma son menores. El volumen utilizado de la mezcla 9:1 en esta etapa es de 10 mL.

#### III.1.2.4. Condiciones finales de SPE

Las condiciones establecidas para llevar a cabo la extracción en fase sólida fueron las siguientes:

1. Activación de la fase sólida, C<sub>18</sub>, con 5 mL de metanol más 3 mL de agua grado Milli Q.
2. Una vez activada la fase, se pasan 10 mL de muestra (mosto/vino).
3. Se añaden 10 mL de disolución de lavado H<sub>2</sub>O/MeOH (9:1) para eliminar las posibles interferencias.
4. Se deja secar aproximadamente 20 minutos el cartucho mediante vacío con el fin de eliminar el agua que pueda quedar de las etapas anteriores.
5. Se eluyen los analitos con 5 mL de diclorometano.
6. Se evapora el diclorometano a sequedad bajo corriente de nitrógeno.
7. Por último se redisuelve la muestra en 10 mL de acetato de etilo, disolución a la que se le añade el patrón interno de cuantificación (tetradifon) para posteriormente analizarla mediante GC.

#### III.1.3. ANÁLISIS DE FUNGICIDAS EN UVAS

Tres técnicas analíticas de extracción fueron optimizadas, validadas y comparadas a su vez con QuEChERS para el análisis de los ocho fungicidas en uvas de vinificación: extracción asistida por microondas (MAE), extracción por dispersión de matriz (MSPD) y extracción sólido-líquido (SLE).

La determinación de las muestras extraídas por los diferentes métodos se llevó a cabo por GC-MS con las mismas condiciones indicadas en los *Anexos II, III y IV*.

### **III.1.3.1. Extracción sólido-líquido (SLE)**

Muchas variables afectan a la extracción sólido-líquido como la adición o no de sal, el tipo y volumen de disolvente, la homogeneización o mezclado de la muestra con el disolvente y la cantidad de muestra.

Inicialmente, se estableció como disolvente de extracción de esta técnica acetato de etilo [ver *Anexo IV*].

Para encontrar las mejores condiciones de extracción, la concentración de NaCl (0,0-0,125 M), cantidad de muestra (10-25 g) y volumen de disolvente (10-30 mL) fueron optimizados mediante un diseño central compuesto (CCD) para los ocho fungicidas. La cantidad de muestra resultó ser una variable significativa para casi todos los fungicidas, excepto diclofluanida y piraclostrobin, y condujo a recuperaciones mayores a niveles bajos. El volumen de disolvente mostró una influencia negativa para boscalid y fluquinconazol, es decir, a mayor volumen menor recuperación, y la extracción fue mejor a niveles de concentración de sal bajos. La optimización con la función de deseo (figura III.4.) mostró valores máximos de recuperación con 15 g, 12 mL y 0,01M para las variables cantidad de muestra, volumen de disolvente y concentración de NaCl, respectivamente.

Una vez estas variables fueron optimizadas, se procedió a estudiar la influencia de la homogeneización o mezclado entre muestra y disolvente de extracción. Diferentes técnicas y tiempos de homogeneización fueron ensayados. Se procedió a una agitación manual, orbital y con ultraturrax de las muestras fortificadas a diferentes tiempos (2, 5 y 10 minutos) para cada técnica. Los resultados mostraron que ultraturrando la muestra con acetato de etilo se

consegúan las mayores recuperaciones. El tiempo de homogeneización fue suficiente con 2 minutos. Un tiempo mayor, no condujo a mejores recuperaciones.

El método de extracción optimizado es el siguiente [ver *Anexo IV*]: 15 gramos de uvas, 12 mL de acetato de etilo y 0,015 g de NaCl (que equivalen a 0,01 M) se mezclaron en un tubo de centrifuga de 50 mL. La mezcla fue homogeneizada durante 2 minutos con ultraturrax y centrifugada a 6000 rpm durante 15 minutos. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró a través de lana de vidrio. El extracto fue concentrado bajo corriente de nitrógeno hasta 5 mL con TurboVap®. El patrón interno fue añadido a una concentración de 100 µg L<sup>-1</sup> antes de la determinación por GC-MS.

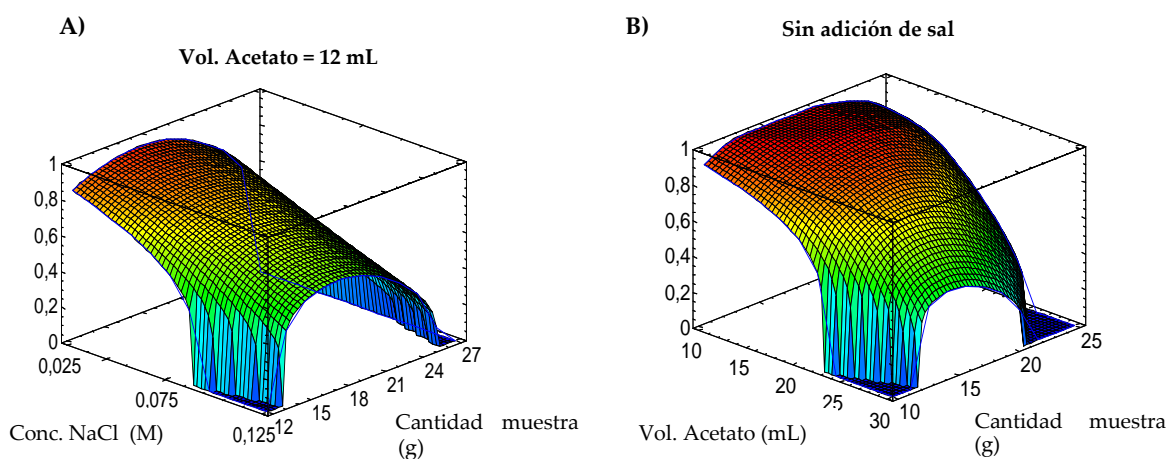


Figura III.4. Superficies de deseo: a) Concentración de sal vs. cantidad de muestra (b) Volumen de acetato de etilo vs. cantidad de muestra.

### III.1.3.2. Extracción asistida por microondas (MAE)

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio preliminar para elegir el disolvente más apropiado para la extracción [ver *Anexos II y IV*]. Para ello, se realizó un estudio de recuperaciones en muestras fortificadas con  $50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  con los siguientes disolventes: acetonitrilo, acetona, hexano/acetato de etilo (1:1), diclorometano/acetato de etilo (1:1) y hexano/acetona (1:1). Las recuperaciones obtenidas para cada fungicida y disolvente utilizado se muestran en la figura III.5.

Los resultados obtenidos mostraron que las recuperaciones fueron mejores para la mezcla hexano/acetona (1:1). Además, los cromatogramas obtenidos con esta mezcla presentaron una línea base limpia y con menos interferencias.

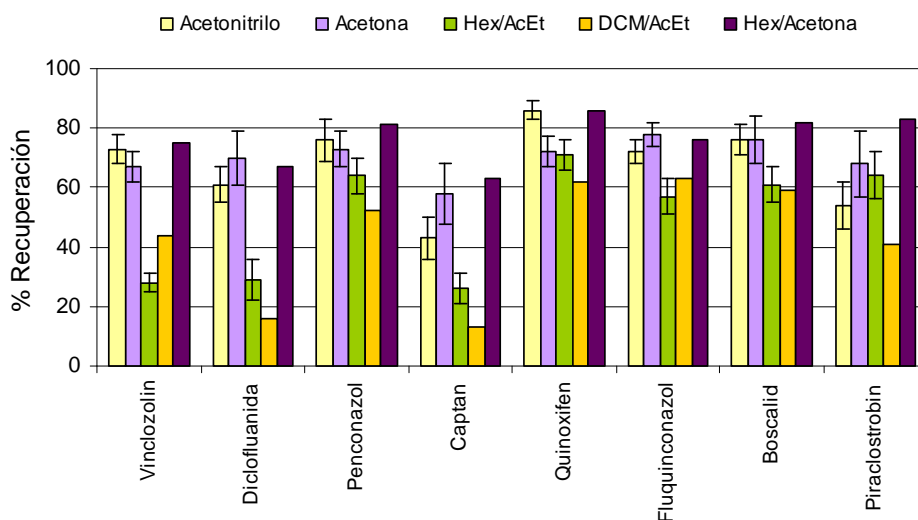


Figura III. 5. Recuperaciones para diferentes disolventes de extracción con MAE

Una vez elegido disolvente, se realizó una optimización de las variables más importantes mediante diseño de experimentos. Se realizó un diseño factorial

fraccional  $2^{4-1}$  para estudiar cuatro variables en los siguientes rangos: temperatura (70-120 °C), tiempo de extracción (2-10 min), % hexano (40-80% v/v en la mezcla extractante hexano/acetona) y volumen de disolvente (5-20 mL).

Los resultados de este diseño mostraron que las variables % hexano y volumen de disolvente no fueron significativas para ningún plaguicida por lo que se fijaron valores para cada una: 50% (v/v) hexano y 10 mL de la mezcla hexano/acetona como disolvente de extracción.

Las otras dos variables, temperatura y tiempo de extracción, fueron significativas para algunos fungicidas. Por lo tanto, para estudiarlas de una manera más completa se llevó a cabo un CCD con los intervalos de valores deducidos de los resultados del diseño anterior. Así la temperatura se estudió entre 80 °C y 120 °C y el tiempo de extracción entre 2 y 14 minutos. Las superficies de respuesta más representativas del comportamiento de los ocho fungicidas se muestran en la figura III.6. para los fungicidas captan y boscalid.

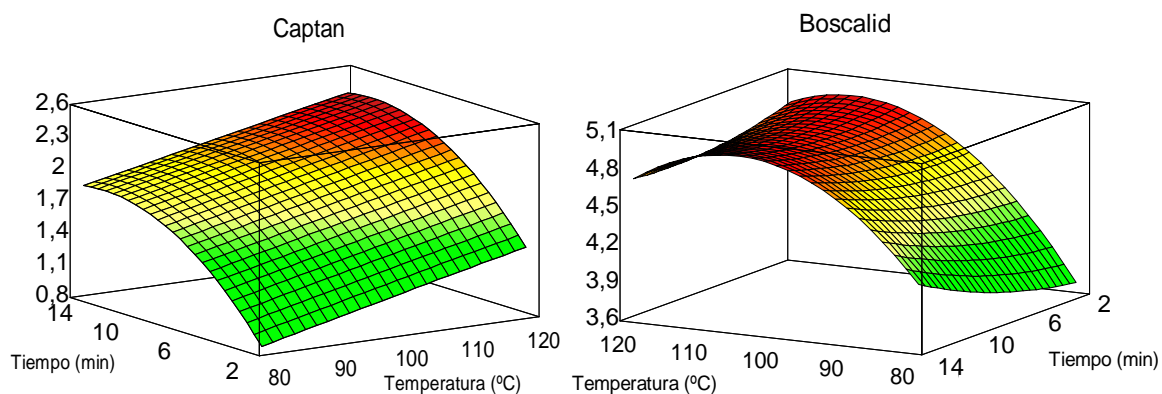


Figura III.6. Superficies de respuesta para captan y boscalid.

Todos los fungicidas presentaron un comportamiento y superficie muy similar a la representada para boscalid, excepto diclofluanida, cuyo comportamiento y resultado fue similar a captan. La superficie de deseo fue calculada, mostrando como valores óptimos 105 °C para temperatura y 10 minutos para tiempo de extracción [ver *Anexo II*], usando estos valores para los posteriores experimentos.

Así, el método de extracción asistido por microondas utilizado fue el siguiente [ver *Anexo II*]: 2,0 ± 0,1 g de uva fueron pesados en los tubos de teflón de microondas y se añadieron 10 mL de la mezcla hexano/acetona (1:1) a cada muestra. El horno fue colocado a una potencia de 600 W, subiendo la temperatura desde 0 °C hasta 105 °C en un tiempo de 5 minutos, manteniendo esta temperatura 10 minutos. Las muestras fueron agitadas mediante el uso de imanes durante todo el proceso. Después de la extracción, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de abrirlos. El agua del sobrenadante fue eliminada añadiendo sulfato de sodio anhidro y filtrando con lana de vidrio. El residuo se lavó 2 veces con 2 mL de hexano/acetona (1:1) y se incorporó al sobrenadante obtenido. Finalmente estos extractos se evaporaron bajo corriente de nitrógeno ajustando el volumen final a 5 mL. El patrón interno, tetradifon, se añadió al final a una concentración de 100 µg L<sup>-1</sup>.

### **III.1.3.3. Extracción por dispersión de matriz (MSPD)**

#### *Estudios preliminares*

Inicialmente, se estudió de manera univariante el tipo de fase sólida a utilizar. Para ello, se probaron tres fases muy utilizadas en la extracción de plaguicidas como son C<sub>18</sub>, florisil y alúmina, usando la misma cantidad de fase

sólida que de muestra (0,5 g de fase y 0,5 g de uva). Ésta se fortificó con los fungicidas objeto de estudio a un nivel de concentración de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cada uno de ellos. Las tres fases fueron eluidas con una secuencia de 10 mL de diclorometano seguidos de 10 mL de acetato de etilo, dos disolventes con los que se habían obtenido buenos resultados en trabajos anteriores [ver *Anexo I*]. Además, se añadió 1 g de sílica en la parte baja de la columna de extracción con el fin de limpiar el extracto, ya que se recomienda para extractos de frutas y verduras. En la figura III.7. se muestran las recuperaciones obtenidas en cada caso con las condiciones inicialmente propuestas para el estudio de las diferentes fases sólidas.

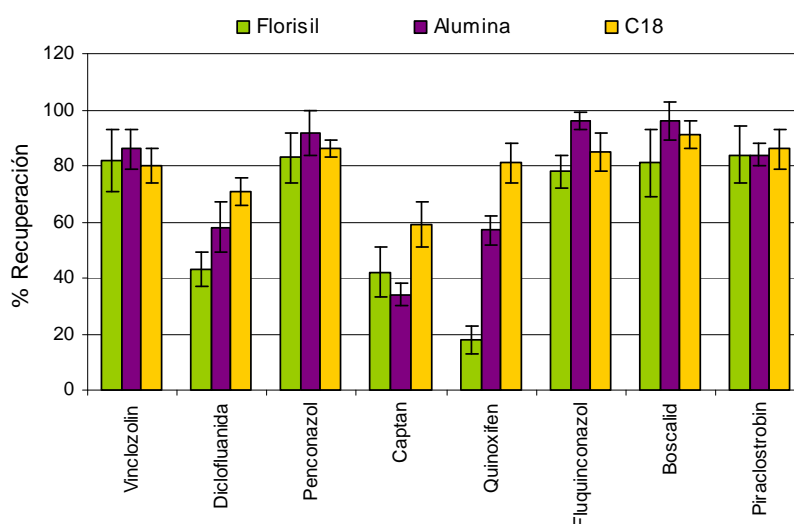


Figura III. 7. Recuperaciones para diferentes fases sólidas con MSPD

La fase sólida C<sub>18</sub> presentó los mejores valores de recuperación para todos los compuestos estudiados con valores comprendidos entre 59% y 91%, florisil los peores con recuperaciones entre 18% y 84% y, alúmina presentó valores intermedios en general, siendo la fase con la que peor se extrajo el fungicida captan en las condiciones inicialmente propuestas. Por ello, en vista de estos resultados se



descartaron las fases florisil y alúmina y se continuó la optimización del método de extracción por dispersión de matriz utilizando la fase C<sub>18</sub>.

#### *Optimización del método de extracción por dispersión de matriz (MSPD)*

Las variables a optimizar fueron: cantidad de fase sólida C<sub>18</sub>, % (v/v) acetato de etilo en una mezcla de extracción compuesta por acetato de etilo y diclorometano y volumen de elución [ver *Anexo III*].

Puesto que eran tres las variables a estudiar, se utilizó un diseño central compuesto. La influencia de la cantidad de fase sólida se estudió entre 0,5 g (nivel bajo) y 2,0 g (nivel alto) y el % (v/v) de acetato de etilo en la mezcla de elución entre 0% y 100%. El volumen de la mezcla acetato de etilo/diclorometano varió entre 5-20 mL. La cantidad de muestra en los experimentos se fijó en 0,5 g.

Las superficies de respuesta más características y representativas de los compuestos estudiados fueron las de vinclozolin y penconazol (figura III.8.). De manera general, las superficies de respuesta de quinoxifen, diclofluanida, captan, fluquinconazol, piraclostrobin y boscalid fueron muy similares a la de vinclozolin. La respuesta óptima para estos compuestos se observó para 1,35 g de fase C<sub>18</sub> y 12 mL de la mezcla de elución con 60% (v/v) de acetato de etilo. Sin embargo, para penconazol, los mejores resultados se obtuvieron con el mismo volumen de mezcla eluyente, 12 mL, pero una cantidad de 2,0 g para la fase C<sub>18</sub> y un 30% (v/v) de acetato de etilo en la mezcla extractante. Así, se procedió a calcular la función de deseo [ver *Anexo III*] con el fin de llegar a unas condiciones óptimas para todos los fungicidas. Esta función mostró como resultados finales: 1,5 g de la fase sólida C<sub>18</sub> (una relación 3/1 con respecto a la cantidad de muestra) y 10 mL de la mezcla diclorometano/acetato de etilo con un porcentaje del 50% (v/v) de acetato de etilo.

Una vez optimizadas todas las variables, el método final utilizado fue el siguiente: 0,5 g de muestra se mezclaron con 1,50 g de C<sub>18</sub> en un mortero de vidrio hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.

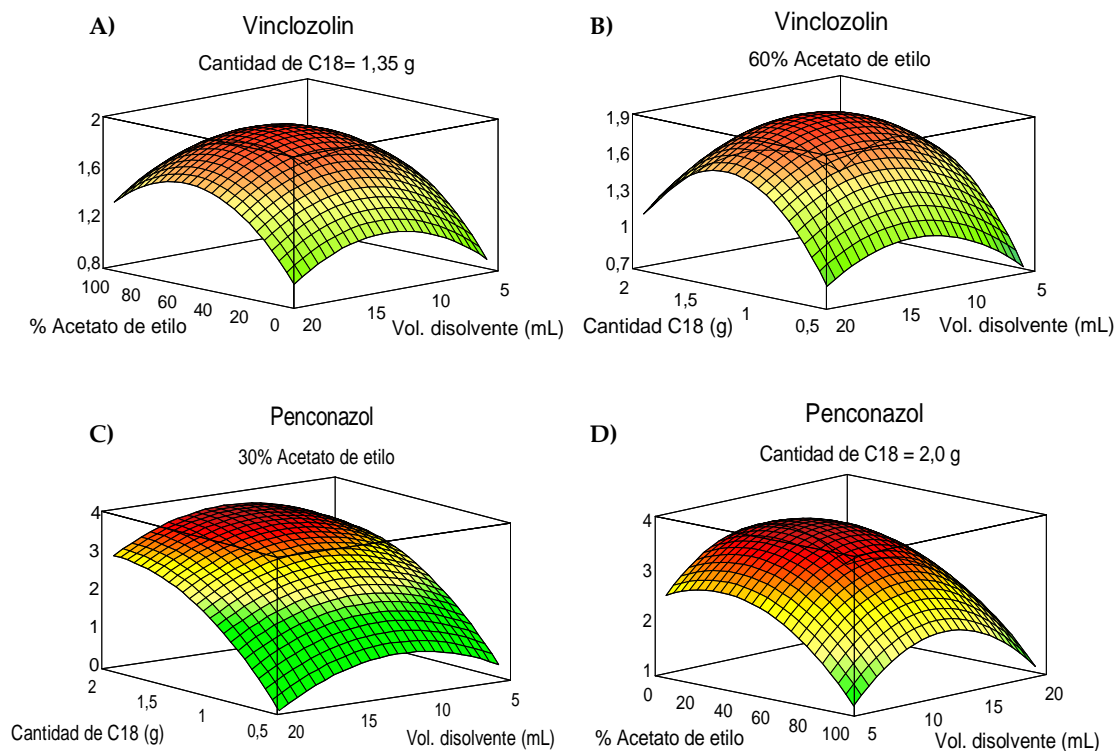


Figura III.8. Superficies de respuesta: (a) % acetato de etilo vs. volumen de disolvente para vinclozolin; (b) cantidad de fase sólida vs. volumen de disolvente (vinclozolin); (c) cantidad de fase sólida vs. volumen de disolvente (penconazol); (d) % acetato de etilo vs. volumen de disolvente (penconazol).

Esta mezcla fue transferida a una columna formada con una jeringa y un filtro de celulosa colocado en la parte inferior a la cual se la añadió 1 g de

adsorbente (sílica) para limpiar los extractos. Diez mililitros de la mezcla eluyente (diclorometano/acetato de etilo (1:1)) fueron añadidos a la columna y eluidos gota a gota aplicando un ligero vacío. La porción eluída fue recogida en un tubo y evaporada bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen de 5 mL. Antes de analizarlo por GC-MS, se añadieron 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de tetradifón para compensar la respuesta cromatográfica.

#### **III.1.3.4. Extracción QuEChERS**

El método QuEChERS usado está basado en el desarrollado por Anastassiades *et al.* [2003] y posteriores modificaciones. Se pesaron 10 g de uva en tubos de centrifuga de 50 mL [ver *Anexo IV*]. Las muestras fueron extraídas con 10 mL de acetonitrilo (1% (v/v) ácido acético) durante 1 minuto con vortex. Después, se añadieron 4 g de  $\text{MgSO}_4$  anhidro y 1 g de NaCl. La mezcla fue agitada durante otro minuto con vortex y centrifugada 6 minutos a 5000 rpm. Se tomó una alícuota de 5 mL del sobrenadante y se añadió a otro tubo limpio de centrifuga, añadiéndole posteriormente 250 mg de PSA como fase dispersiva y 750 mg de sulfato de magnesio. Se agitó la mezcla durante otro minuto y se centrifugó a 5000 rpm, 3 min. Se añadió el patrón interno, tetradifón y se colocó en un vial para su análisis por GC-MS.

#### **III.1.4. CALIBRADO EN EXTRACTO DE MATRIZ**

Debido al aumento de señal que presentaron algunos compuestos en las matrices estudiadas, el calibrado se realizó en extractos de matriz de mosto, vino y uva. En la Tabla III.2 se resumen las relaciones entre las pendientes medidas en disolvente orgánico y extracto de matriz según el método de extracción. Los disolventes orgánicos utilizados para realizar el calibrado fueron acetato de etilo

(para SPE y SLE), acetonitrilo para QuEChERS, hexano/acetona (1:1) para MAE y diclorometano/acetato de etilo (1:1) para MSPD. Para llevar a cabo el extracto en matriz, muestras de las matrices estudiadas sin fungicidas fueron sometidas a los procesos de extracción anteriormente explicados según la matriz analizada. Una vez se obtuvieron los extractos con los componentes de la matriz, éstos fueron fortificados con concentraciones crecientes de fungicidas.

En la mayoría de los plaguicidas se observaron pendientes mayores cuando se realiza calibrado en matriz, siendo en muchos casos la diferencia de pendientes significativa por lo que se usaron estos calibrados tanto para la validación de los métodos analíticos como para el análisis de muestras, evitando así recuperaciones mayores de 120%.

Tabla III.2. Relación de pendientes entre extracto de matriz y disolvente para los diferentes métodos de extracción de plaguicidas en mosto/vino (SPE) y uvas.

Fungicida	Relación de pendientes (extracto de matriz/disolvente orgánico)				
	SPE	SLE	MAE	MSPD	QuEChERS
Vinclozolin	1,4	1,4	2,0	1,8	1,5
Diclofluanida	1,4	1,6	1,5	2,1	1,3
Penconazol	1,3	1,4	1,3	1,6	1,4
Captan	1,4	1,4	1,2	1,2	1,3
Quinoxifen	1,2	1,1	1,4	0,9	1,5
Fluquinconazol	1,4	1,7	0,9	1,5	1,4
Boscalid	1,2	1,5	1,0	1,1	1,3
Piraclostrobin	0,9	1,2	1,4	1,3	1,4

### III.1.5. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

El protocolo analítico propuesto en esta Tesis para la determinación de fungicidas en muestras enológicas conlleva la evaluación distintos parámetros de

calidad tales como: selectividad, recuperación, precisión, linealidad y límites de detección (LDs) y cuantificación (LCs) [ver *Anexos II, III, IV*]. Se puede afirmar que todos los métodos optimizados en este capítulo son métodos cuantitativos, selectivos, precisos, con respuesta lineal y suficientemente sensibles como para determinar los residuos de los fungicidas en las muestras estudiadas a niveles inferiores a los LMRs establecidos por la legislación. En general, los porcentajes de recuperación de los fungicidas estudiados en las diferentes matrices evaluadas oscilaron entre 70 % y 120 %. Los valores de precisión de los métodos, expresada como desviación estándar relativa (DER, %) fueron inferiores a 15% en todos los casos.

En el estudio de la matriz uva, se compararon los cuatro métodos optimizados en términos de linealidad, recuperación, límites y precisión [*Anexo IV*] con el fin de determinar cuál ofrece mejores parámetros. Según los datos obtenidos, MAE resultó ser el método más preciso, con límites de cuantificación inferiores a los otros tres métodos y con mayores recuperaciones. Además, este método es más rápido ya que permite realizar mayor número de determinaciones al mismo tiempo y no necesita demasiada preparación de muestra ni adición de sales u otros reactivos sólidos, lo cual conlleva pérdida de tiempo en su pesada.

Así, el método de extracción asistida por microondas fue el método elegido para llevar a cabo las determinaciones de los residuos en uvas vendimiadas y en las lías obtenidas en las vinificaciones llevadas a cabo durante los tres años en los que se ha realizado este trabajo.

**DISTRIBUCIÓN DE LOS RESIDUOS DE FUNGICIDAS  
EN LAS PARTES DE LA UVA. APLICACIÓN Y  
EVOLUCIÓN DE LOS RESIDUOS DE  
PIRACLOSTROBIN Y BOSCALID EN CAMPO**

---

---



Los diferentes modos de acción de los productos fitosanitarios aplicados podrían explicar las diferentes localizaciones y concentraciones encontradas de sus residuos en frutas y vegetales [Pérez-Clavijo *et al.*; 1996; Sanz-Asensio *et al.*; 1999b; Teixeira *et al.*; 2004]. Mientras que a los pesticidas sistémicos y penetrantes (sistémicos locales) se espera encontrarlos en la pulpa, los pesticidas de contacto estarían preferiblemente localizados en la piel [Coscollá, 2004].

### **III.2.1. ESTUDIO “IN VITRO” DE DISTRIBUCIÓN DE RESIDUOS EN UVA.**

Se llevó a cabo un estudio “in Vitro” de la distribución de ocho fungicidas (vinclozolin, diclofluanida, captan, penconazol, quinoxifen, fluquinconazol, boscalid y piraclostrobin) en las diferentes partes de la uva (superficie, piel y pulpa) con objeto de comprobar si existe una correlación entre el modo de acción de cada fungicida y su localización en la fruta

Para ello, se sumergieron 25 gramos de muestra (granos enteros de uva) en disoluciones de cada fungicida a tres niveles de concentración diferentes (0,50 mg L<sup>-1</sup>, 2,00 mg L<sup>-1</sup> y 5,00 mg L<sup>-1</sup>, correspondientes a 1, 4 y 10 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente) en vasos de precipitados de 250 mL. Las muestras se mantuvieron tapadas y en oscuridad a 4 °C durante 1, 3, 7, 15, 25 y 35 días. Las concentraciones elegidas fueron similares o mayores a los LMR para poder observar la distribución en las diferentes partes de la uva. El estudio se realizó por triplicado. La presencia de fungicida en uva fue calculada como la suma de las cantidades encontradas en las tres partes estudiadas: superficie, piel y pulpa.



La extracción de los fungicidas de las diferentes partes de la uva se realizó con tres métodos distintos validados para determinar la concentración de los fungicidas en superficie, piel y pulpa de la uva. La extracción de residuos en superficie se llevó a cabo ultrasonizando las muestras con agua como disolvente de extracción. El análisis de residuos en piel se realizó de forma similar utilizando en este caso acetato de etilo y realizando dos veces el mismo proceso para conseguir una extracción completa. Por último, los residuos que penetraron al interior de la uva y que permanecen en pulpa se determinaron mediante MAE. Una explicación más detallada de cada método de extracción y de los parámetros de validación se puede observar en el *Anexo V*.

Las concentraciones de residuos encontradas y los porcentajes totales de retención en uva (calculados en función de la concentración inicial) se muestran en la tabla III.3. Según estos datos, la cantidad de fungicida total en uva aumentó acorde aumenta la concentración inicial, es decir, se encuentra mayor concentración de residuos en las uvas sumergidas en disoluciones de mayor concentración. Además, conforme más días están las uvas sumergidas en la disolución de fungicida, mayor cantidad total de residuo presenta el fruto y por lo tanto mayor es el porcentaje de retención. Sin embargo, se observa que el porcentaje total de residuo encontrado para un mismo período de tiempo es muy similar en los tres niveles de concentración estudiados y por tanto, se puede decir que no depende de la concentración inicial de la disolución en contacto con las uvas.

De los fungicidas estudiados, la mayor cantidad encontrada de residuo en uva fue para quinoxifen (entre un 107-116% de retención sobre la cantidad inicial), seguido por piraclostrobin (83-91%), fluquinconazol (73-77%)  $\approx$  boscalid (72-76%),

Tabla III.3. Concentración de residuos de fungicida y porcentajes totales de retención (respecto a la concentración inicial) en uva a tres niveles de concentración.

Días	Concentración de la disolución					
	1 $\mu\text{g g}^{-1}$		4 $\mu\text{g g}^{-1}$		10 $\mu\text{g g}^{-1}$	
	$\mu\text{g g}^{-1}$ (RSD, %)	%	$\mu\text{g g}^{-1}$ (RSD, %)	%	$\mu\text{g g}^{-1}$ (RSD, %)	%
<b>Vinclozolin</b>						
1	0,24 (4,2)	24,2	0,86 (10,1)	21,6	1,86 (6,4)	18,4
3	0,30 (1,8)	29,9	1,04 (4,4)	26,1	2,41 (1,4)	24,0
7	0,37 (1,3)	36,7	1,51 (2,0)	37,8	3,18 (3,0)	31,0
15	0,44 (9,6)	44,0	1,69 (4,7)	42,2	3,72 (3,1)	37,7
25	0,52 (8,4)	51,5	1,94 (5,1)	48,4	4,74 (7,5)	47,3
35	0,59 (2,2)	59,4	2,30 (5,1)	57,3	5,24 (8,4)	52,3
<b>Diclofluánida</b>						
1	0,15 (4,8)	14,6	0,57 (3,4)	14,3	1,38 (6,8)	13,8
3	0,12 (8,8)	12,4	0,67 (4,9)	16,8	1,17 (1,8)	11,7
7	0,17 (9,3)	17,2	0,83 (7,0)	20,7	1,58 (3,2)	15,8
15	0,18 (3,2)	18,4	0,96 (9,9)	24,0	2,10 (7,5)	21,0
25	0,25 (6,0)	24,8	1,05 (2,4)	26,3	2,68 (3,4)	26,8
35	0,34 (2,2)	34,3	1,51 (5,5)	37,9	3,19 (3,4)	31,9
<b>Penconazol</b>						
1	0,14 (1,8)	13,8	0,47 (0,9)	11,8	1,78 (3,2)	17,8
3	0,16 (2,6)	16,0	0,77 (2,8)	19,2	2,20 (6,4)	22,0
7	0,21 (8,9)	21,1	1,68 (8,6)	42,1	2,31 (6,6)	23,1
15	0,58 (6,0)	58,2	2,17 (8,1)	54,3	5,33 (11,2)	53,3
25	0,60 (7,0)	59,9	2,44 (1,6)	60,9	6,29 (8,9)	62,9
35	0,64 (3,1)	64,2	2,45 (3,7)	61,2	6,62 (1,1)	66,2
<b>Captan</b>						
1	0,06 (3,6)	6,4	0,37 (3,2)	9,2	0,89 (7,7)	8,9
3	0,10 (8,5)	10,2	0,51 (1,4)	12,7	1,02 (3,7)	10,2
7	0,13 (1,8)	13,0	0,61 (8,2)	15,3	1,74 (6,9)	17,4
15	0,18 (3,4)	17,9	0,83 (5,4)	20,7	2,15 (6,2)	21,5
25	0,22 (6,3)	22,1	1,02 (6,3)	25,6	2,75 (1,4)	27,5
35	0,27 (2,9)	26,6	1,27 (9,8)	31,7	3,08 (6,9)	30,8

Tabla III.3. Continuación

Días	Concentración de la disolución					
	1 µg g <sup>-1</sup>		4 µg g <sup>-1</sup>		10 µg g <sup>-1</sup>	
	µg g <sup>-1</sup> (RSD, %)	%	µg g <sup>-1</sup> (RSD, %)	%	µg g <sup>-1</sup> (RSD, %)	%
<b>Quinoxifen</b>						
1	0,86 (7,1)	85,7	3,71 (1,2)	92,7	8,84 (9,4)	88,4
3	0,89 (2,2)	89,2	3,78 (5,5)	94,5	8,68 (8,2)	86,4
7	0,94 (3,8)	93,5	3,87 (5,1)	96,8	9,03 (2,2)	90,3
15	0,99 (3,7)	98,8	4,14 (4,7)	103	9,28 (1,8)	92,8
25	1,01 (10,1)	101	4,36 (6,9)	109	10,6 (2,0)	106
35	1,11 (5,4)	111	4,67 (4,8)	116	10,7 (2,0)	107
<b>Fluquinconazol</b>						
1	0,37 (8,3)	36,8	1,33 (2,7)	33,3	3,31 (5,6)	33,1
3	0,39 (9,4)	39,0	1,74 (7,8)	43,5	3,97 (7,3)	39,7
7	0,49 (2,7)	48,7	2,08 (2,5)	52,1	4,69 (1,0)	46,9
15	0,58 (9,0)	58,2	2,49 (4,9)	62,2	6,14 (4,3)	61,4
25	0,68 (4,0)	68,4	2,66 (6,4)	66,4	6,88 (6,4)	68,8
35	0,74 (1,1)	74,1	2,91 (2,5)	72,8	7,68 (5,2)	76,8
<b>Boscalid</b>						
1	0,33 (4,8)	32,6	1,13 (7,8)	28,0	2,78 (3,4)	27,8
3	0,35 (5,3)	35,1	1,34 (2,6)	33,6	3,66 (4,1)	36,6
7	0,43 (5,2)	42,8	1,56 (9,1)	39,3	4,61 (5,5)	46,1
15	0,53 (2,6)	53,2	2,04 (6,0)	51,3	5,83 (8,7)	58,3
25	0,62 (8,2)	62,2	2,66 (6,2)	66,7	7,03 (8,3)	70,3
35	0,72 (3,7)	72,4	3,03 (1,9)	75,5	7,37 (7,4)	73,7
<b>Piraclostrobin</b>						
1	0,52 (6,6)	52,4	2,03 (4,1)	50,8	4,67 (9,0)	46,7
3	0,60 (5,3)	60,5	2,54 (8,1)	63,6	5,82 (7,2)	58,3
7	0,66 (7,2)	65,6	2,79 (5,2)	69,8	6,23 (1,8)	62,4
15	0,75 (6,9)	75,1	3,09 (3,2)	77,2	6,87 (2,6)	68,7
25	0,84 (9,5)	84,2	3,30 (6,5)	82,4	7,91 (2,3)	79,1
35	0,88 (2,4)	88,2	3,65 (5,9)	91,1	8,28 (6,3)	82,8

penconazol (61-66%), vinclozolin (52-59%), diclofluanida (32-38%) y captan (27-32%). En la tabla III.4.; se muestran los porcentajes de distribución en cada parte de la uva respecto a la cantidad total de residuo encontrada en función del tiempo. Para todos los fungicidas estudiados, el mayor contenido de residuo se encontró en piel, independientemente de la concentración inicial y del modo de acción de cada compuesto (contacto o sistémico), aunque el % que se encuentra en esta parte de la uva sí que se ve influenciado por éste último factor, siendo mayor para los fungicidas de contacto.

Los porcentajes obtenidos en piel fueron superiores a 53,0%. En general, fungicidas sistémicos como quinoxifen, fluquinconazol, boscalid y piraclostrobin mostraron valores entre 50-60% en esta parte de la uva, mientras que aquellos cuyo modo de acción es de contacto como vinclozolin, diclofluanida y captan presentaron porcentajes superiores, comprendidos entre 70-85%. En pulpa, la concentración de residuos varió entre 9,6% y 41,7%. Los fungicidas de contacto mostraron valores inferiores a 20%, mientras que para los fungicidas sistémicos la penetración en pulpa fue mayor y los porcentajes oscilaron entre 20% y 40%. La concentración encontrada en la superficie del fruto osciló entre 1,3% y 20,2%, siendo independiente del modo de acción que presente el fungicida.

De manera general, se observaron porcentajes muy similares entre el primer y último día de estudio en piel para todos los fungicidas. Sin embargo, en superficie principalmente disminuyen y en pulpa aumentan. Parece establecerse un equilibrio entre la disolución y la piel del fruto, comprendiendo una difusión de los residuos encontrados inicialmente en la superficie a través de la capa intermedia, piel, hasta la pulpa. Este hecho podría ser debido a la continua exposición de las uvas con la disolución inicial durante todo el estudio.

Tabla III. 4. Variación de porcentajes de distribución en las diferentes partes de la uva durante 35 días

Fungicida	Concentración		
	1 $\mu\text{g g}^{-1}$	4 $\mu\text{g g}^{-1}$	10 $\mu\text{g g}^{-1}$
Vinclozolin	Superficie: 2,3-1,3% Piel: 83,4-81,2% Pulpa: 14,3-17,5%	Superficie: 1,4-4,4% Piel: 88,4-79,0% Pulpa: 10,2-16,6%	Superficie: 4,3-2,6% Piel: 85,0-79,5% Pulpa: 10,7-17,9%
Diclofluanida	Superficie: 9,4-7,3% Piel: 79,5-73,0% Pulpa: 11,2-19,7%	Superficie: 7,2-16,3% Piel: 80,5-69,4% Pulpa: 12,3-17,7%	Superficie: 9,1-6,7% Piel: 81,3-72,8% Pulpa: 9,6-20,5%
Captan	Superficie: 12,6-6,4% Piel: 71,7-75,6% Pulpa: 15,7-18,0%	Superficie: 10,8-5,8% Piel: 73,6-72,0% Pulpa: 15,6-22,2%	Superficie: 11,8-4,4% Piel: 71,4-77,6% Pulpa: 16,8-18,0%
Penconazol	Superficie: 8,4-2,5% Piel: 74,6-72,1% Pulpa: 16,8-26,1%	Superficie: 7,2-5,2% Piel: 76,2-72,3% Pulpa: 17,6-24,0%	Superficie: 16,1-9,2% Piel: 66,9-72,9% Pulpa: 17,1-21,7%
Quinoxifen	Superficie: 20,2-9,4% Piel: 54,1-56,1% Pulpa: 25,7-34,5%	Superficie: 15,1-7,3% Piel: 55,4-58,0% Pulpa: 29,5-34,7%	Superficie: 14,8-9,8% Piel: 54,4-58,9% Pulpa: 30,8-31,3%
Fluquinconazol	Superficie: 17,3-3,5% Piel: 60,9-60,8% Pulpa: 21,8-35,7%	Superficie: 14,8-4,4% Piel: 62,0-57,4% Pulpa: 23,2-38,2%	Superficie: 11,4-4,1% Piel: 63,1-58,2% Pulpa: 25,5-37,7%
Boscalid	Superficie: 18,2-4,0% Piel: 53,1-56,4% Pulpa: 28,8-39,6%	Superficie: 8,1-3,8% Piel: 63,2-58,4% Pulpa: 28,7-37,8%	Superficie: 10,2-6,9% Piel: 60,2-55,2% Pulpa: 29,7-37,9%
Piraclostrobin	Superficie: 14,4-5,2% Piel: 55,1-53,0% Pulpa: 30,5-41,7%	Superficie: 12,2-7,9% Piel: 57,6-53,0% Pulpa: 30,2-39,2%	Superficie: 12,3-7,4% Piel: 57,5-56,3% Pulpa: 30,1-36,2%

Con estos datos, se evaluó la penetración en pulpa para cada compuesto a través de la relación  $Q$  que se define como: cantidad que penetra en pulpa por cantidad encontrada en piel. Se observó que a pesar de trabajar con tres

concentraciones iniciales diferentes de fungicida, la relación  $Q$  no presentaba diferencias significativas en un nivel de confianza de 95% entre concentraciones para un mismo período de tiempo, por lo que se puede decir que la relación entre la concentración que penetra en pulpa y la que permanece en piel no es dependiente de la concentración inicial. Los valores medios obtenidos de  $Q$  para las tres concentraciones iniciales estudiadas se muestran en la figura III.9.; ordenados de menor a mayor.

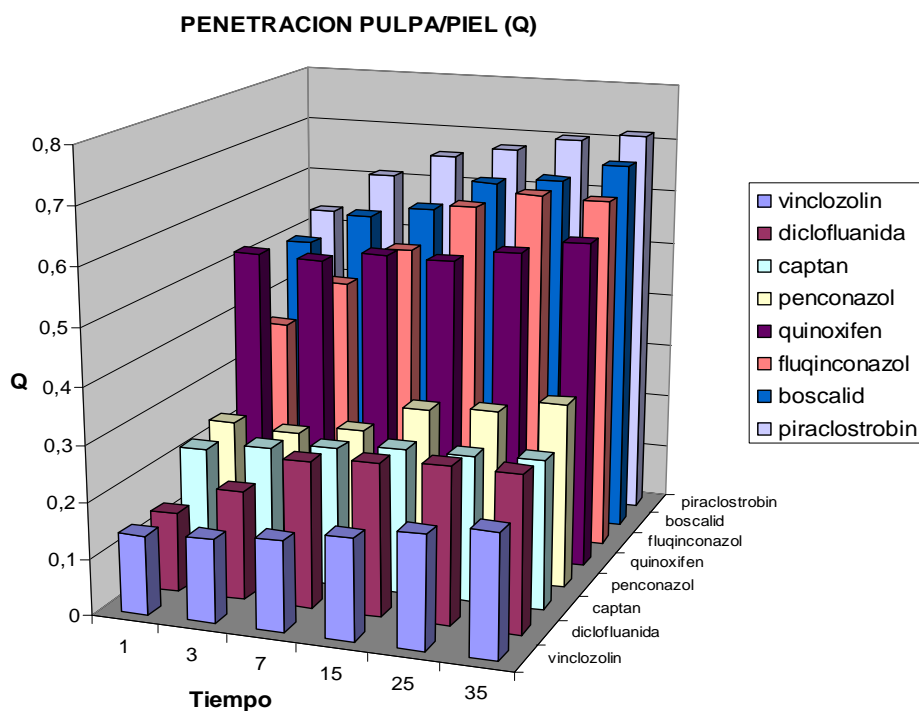


Figura III.9. Valores medios de  $Q$  (relación pulpa/piel) para las tres concentraciones estudiadas durante 35 días.

En dicha figura, se puede observar que los pesticidas estudiados se agrupan en función del valor de  $Q$ . Pesticidas no sistémicos (o de contacto) como vinclozolin, diclofluanida y captan mostraron valores inferiores a 0,40 mientras que los sistémicos o penetrantes como quinoxifen, fluquinconazol, boscalid y piraclostrobin, mostraron valores superiores a 0,40 excepto penconazol que aun siendo un pesticida sistémico, presenta valores más acordes con aquellos pesticidas de acción local.

Así, se puede concluir según estos datos que la penetración en pulpa fue mayor para fungicidas que presentan un modo de acción penetrante o sistémico. Por tanto, se encuentra una correlación en todos los casos excepto para penconazol, entre el modo de acción del pesticida y el grado de penetración al interior del fruto (pulpa).

### **III.2.2. ESTUDIO EN CAMPO DE DISTRIBUCIÓN Y EVOLUCIÓN DE RESIDUOS EN UVA.**

En la campaña de 2009, cien cepas de la variedad tempranillo y de la Denominación de Origen Calificada Rioja, fueron seleccionadas para llevar a cabo un estudio de la evolución y distribución de residuos de piraclostrobin y boscalid en las diferentes partes de la uva. Estas cepas fueron tratadas a finales de julio con las tres formulaciones objeto de estudio: Cantus® (50% p/p boscalid), Cabrio Top® (5% p/p piraclostrobin) y Bellis®, mezcla de ambos fungicidas (piraclostrobin 12,8% p/p; boscalid 25,2% p/p) a las dosis recomendadas por el fabricante (BASF, España), 1,0, 2,0 y 0,8 kg por hectárea, respectivamente. Las muestras de uva fueron recogidas a los días 1, 3, 7, 15, 25 y 35 después de realizar la aplicación. Se

eligió un plazo máximo de 35 días debido a que es el plazo de seguridad más alto que presentan las formulaciones utilizadas, en concreto, Cabrio Top®.

Los residuos en uva fueron analizados mediante los mismos métodos de utilizados para el estudio llevado a cabo en laboratorio [*Anexo V*]. La proporción encontrada en cada parte del fruto se muestra en la figura III.10. para piraclostrobin y en la figura III.11. para boscalid, tanto para los tratamientos individuales (Cabrio Top®, piraclostrobin y Cantus®, boscalid) como para la mezcla (Bellis®).

#### *Piraclostrobin*

Como ya se había observado en el laboratorio (tabla III.4), los valores de residuos encontrados para este fungicida en piel oscilaron entre 53% y 58%. Sin embargo en la aplicación individual en campo, figura III.10, la concentración en piel no llega a alcanzar el equilibrio observado en el estudio de laboratorio, disminuyendo de 76% hasta 58%. Los residuos encontrados en superficie y piel penetran en pulpa conforme pasan los días de experimento, aumentando así la concentración en esta última desde 10% a 39%.

En superficie se encontró la menor concentración de residuos, disminuyendo la proporción en los siguientes días a su aplicación. Factores climatológicos o el paso de estos residuos a partes internas de la uva (piel o pulpa) pueden dar lugar a esta disminución.

Si se comparan los porcentajes medios, considerando los diferentes niveles de concentración, obtenidos en laboratorio para cada parte de la uva después de 35 días de estudio (superficie 6,8%, piel 54,1% y pulpa 39,0%) con los valores obtenidos en campo para el tratamiento individual (superficie 3,3%, piel 58,0% y



pulpa 38,7%) se puede decir que no hay diferencias. El valor obtenido para la relación Q entre los residuos de pulpa y piel fue de  $0,668 \pm 0,017$  para el tratamiento individual mientras que en laboratorio los valores oscilaron entre  $0,534 \pm 0,019$  para el primer día después del tratamiento y  $0,714 \pm 0,063$  para el día 35. Estos datos demuestran que se pueden extrapolar las conclusiones obtenidas en el laboratorio a lo que suceda en campo.

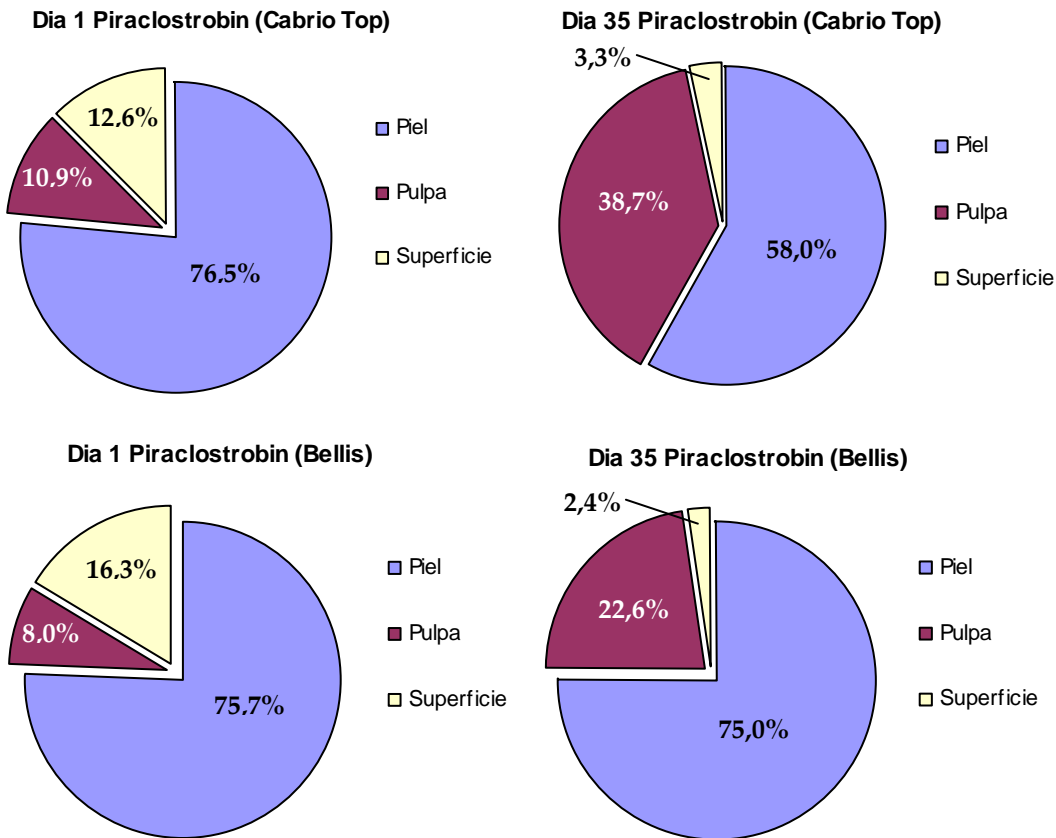


Figura III.10. Distribución de los residuos de piraclostrobin en las diferentes partes de la uva (superficie, piel y pulpa) para el tratamiento individual (Cabrio Top®) y mezcla (Bellis®).

Por el contrario, en el caso de la aplicación mezcla, la proporción en piel se mantiene constante a lo largo de los 35 días mostrando un equilibrio como el que se observaba en el estudio realizado en laboratorio. Así, los residuos que inicialmente se encuentran en superficie son los que van penetrando, a través de la piel, hasta la pulpa. La distribución final encontrada en uva (superficie 2,4%, piel 75,0% y pulpa 22,6%) no coincide con la distribución obtenida en el laboratorio. Como se puede observar, la penetración a pulpa fue menor, ofreciendo un valor de  $Q$  de  $0,301 \pm 0,020$ . Estos datos muestran la influencia que tiene la presencia de boscalid en la distribución de piraclostrobin en las diferentes partes de la uva.

El porcentaje de reducción de la cantidad total de fungicida encontrada inicialmente y la cantidad final obtenida después de 35 días fue del 90% aproximadamente para el tratamiento individual y de un 93% en el caso de la mezcla por lo que se puede suponer que la disipación total de los residuos de este fungicida para ambos tratamientos es muy similar, aunque difiera en su distribución en las partes de la uva.

#### *Boscalid*

Como ocurría para piraclostrobin y el resto de fungicidas estudiados, boscalid mostró un equilibrio en piel cuando el estudio se realizó en laboratorio. En dicho estudio, la concentración en esta parte de la uva osciló entre 53% y 63% entre las distintas concentraciones y a lo largo de los 35 días. El aumento en el contenido en pulpa parece estar relacionado con la disminución observada en superficie, residuos que pasan a piel y posteriormente a pulpa.

Sin embargo, la aplicación en campo no muestra ese equilibrio en piel (ver figura III.11). Gran parte de la cantidad de residuos inicial encontrada en piel se distribuye posteriormente entre la superficie y la pulpa en ambos tratamientos.

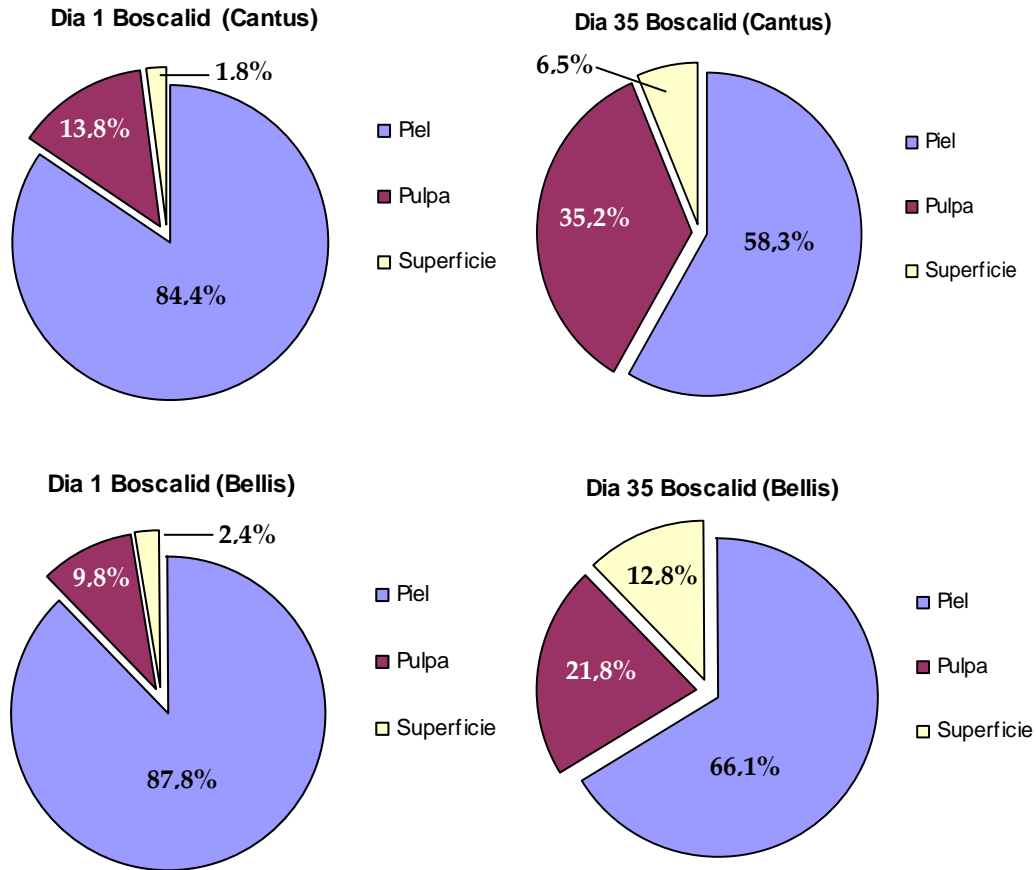


Figura III.11. Distribución de residuos de boscalid en las diferentes partes de la uva (superficie, piel y pulpa) para el tratamiento individual (Cantus®) y mezcla (Bellis®).

Igual que ocurría en el caso de piraclostrobin como tratamiento individual, los porcentajes medios obtenidos en laboratorio para cada parte de la uva después de 35 días de estudio (superficie 4,9%, piel 56,7% y pulpa 38,4%) y la distribución observada en campo para el tratamiento individual (superficie 6,5%, piel 58,3% y pulpa 35,2%) son muy similares. La relación  $Q$  entre residuos de pulpa y piel mostró un valor de  $0,602 \pm 0,035$  mientras que los valores obtenidos en laboratorio están comprendidos entre  $0,496 \pm 0,044$  y  $0,679 \pm 0,028$ . Se puede decir que la distribución ocurrida en campo se asemeja a la obtenida en laboratorio.

En el caso de la aplicación mezcla, Bellis, la distribución final obtenida en el fruto (superficie 12,8%, piel 66,1% y pulpa 21,8%) no coincide con la distribución obtenida en el laboratorio comentada anteriormente. Como se puede observar, la penetración en pulpa fue menor, ofreciendo un valor de  $Q$  de  $0,329 \pm 0,013$ . La distribución de boscalid entre superficie, piel y pulpa se ve influenciada por la presencia de piraclostrobin en la uva.

El porcentaje de reducción de la cantidad total de fungicida (independientemente de su localización) a lo largo de los días fue 65% en el caso del tratamiento individual y 64% en el caso de la mezcla, por lo que se puede indicar que la disipación total de los residuos de este fungicida para ambos tratamientos es muy similar independientemente de la presencia de otro fungicida en el fruto.



**EVOLUCIÓN DE LOS NIVELES DE RESIDUOS DE  
FUNGICIDAS DURANTE EL PROCESO DE  
VINIFICACIÓN**

---



Las uvas destinadas a vinificación pueden contener residuos de fungicidas en el momento de la vendimia a causa de los tratamientos fitosanitarios efectuados en el viñedo. Estos residuos de fungicidas en uvas deberían encontrarse por debajo de los valores correspondientes a los LMRs establecidos en las disposiciones legales comunitarias, siempre y cuando se lleven a cabo bajo buenas prácticas agrícolas. No obstante, aún estando por debajo de los LMRs, estos residuos podrían tener efectos negativos sobre aquellos microorganismos responsables de las fermentaciones alcohólica y/o maloláctica. Como consecuencia de ello, se podrían registrar retrasos en el inicio de las fermentaciones e incluso producirse paradas fermentativas. Al mismo tiempo, y de forma contraria, las distintas etapas del proceso de vinificación (prensado, desfangado, maceración, fermentación, clarificación y filtración) podrían contribuir a la disminución de la tasa inicial de contaminación por fungicidas.

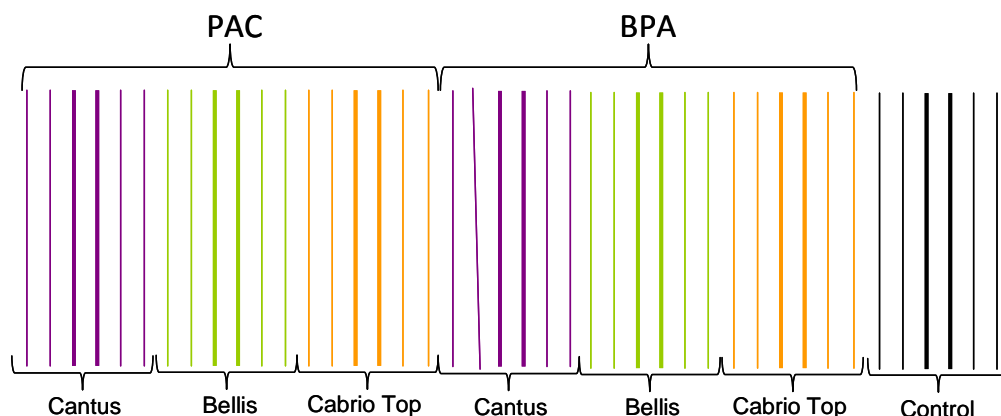
En el presente capítulo se desarrolla el estudio de la evolución de los niveles residuales de dos fungicidas de nueva generación, piraclostrobin y boscalid, a lo largo de las diferentes etapas del proceso de vinificación de uva tinta variedad Tempranillo durante tres campañas pertenecientes a los años 2008, 2009 y 2010. Los resultados obtenidos en estas campañas dieron lugar a la publicación del artículo recogido en el *Anexo VI*.

### **III.3.1. APLICACIÓN EN CAMPO**

Las aplicaciones de las distintas formulaciones fueron llevadas a cabo durante tres años, 2008, 2009 y 2010 en una parcela experimental situada en Aldeanueva de Ebro, La Rioja, adscrita a la D.O. Ca. Rioja. La parcela presenta una superficie aproximada de 3000 m<sup>2</sup> y fue dividida en grupos de 6 filas cada



uno, tal y como puede verse en la figura III.12, con 40-50 cepas por fila. La separación entre filas y cepas es de 2,6 y 1,2 m, respectivamente. En cada grupo de filas se realizó la aplicación del tratamiento correspondiente. Sólo se vendimiaron las filas centrales con el fin de evitar contaminación entre unos y otros tratamientos (en la figura se muestran con mayor grosor). Con el objetivo de tener uvas control de la parcela se dejaron un número de filas sin tratamiento alguno.



TRATAMIENTOS					
Nombre Comercial	Formulación	Fabricante	Dosis (kg ha <sup>-1</sup> )	Fechas aplicación	Plazo de seguridad (días)
<i>Cabrio Top</i>	metiram (55 %) piraclostrobin (5 %)	BASF Española S.A.	2	Mayo y/o Junio	35
<i>Cantus</i>	boscalid (50 %)	BASF Española S.A.	1	Julio (2008 y 2010) Agosto (2009)	28
<i>Bellis</i>	piraclostrobin (12,8 %) boscalid (25,2 %)	BASF Española S.A.	0,8	Entre mayo y agosto (máximo 2)	15

Figura III.12. Distribución de las aplicaciones en la parcela experimental según las buenas prácticas agrícolas (BPA) y las prácticas agrícolas críticas (PAC). Productos fitosanitarios aplicados

La viña utilizada para el estudio produce uva tinta *V. vinífera cv. Tempranillo*, una variedad común en esta zona, y procede de cepas con una antigüedad de 8 años. Tres nuevas formulaciones comerciales para el tratamiento contra mildiu, oidio y botritis se aplicaron sobre estas uvas: Cantus®, Cabrio Top® y Bellis®. Estos productos fitosanitarios fueron seleccionados por presentar en su formulación sustancias activas fúngicas de nueva generación: piraclostrobin, boscalid y la mezcla de ambos. La composición de estas formulaciones comerciales, así como las dosis y las fechas de aplicación de cada año y plazos de seguridad se presentan también en la figura III.12.

El número de aplicaciones realizadas para cada compuesto así como la dosis aplicada fueron las recomendadas por el fabricante, acorde con las buenas prácticas agrícolas (BPA). Sin embargo y con el fin de asegurar la presencia de los fungicidas en uva en el momento de la vendimia y con ello en el proceso de vinificación, se realizó una única aplicación a las mismas dosis para cada compuesto siete días antes de la vendimia en base a las prácticas agrícolas críticas (PAC). De este modo se asegura la presencia de residuos en la uva vendimiada pudiendo así estudiar la disipación de éstos en todas las etapas del proceso de elaboración.

### **III.3.2. EVOLUCIÓN DE RESIDUOS DE PIRACLOSTROBIN Y BOSCALID DURANTE EL PROCESO DE VINIFICACIÓN DE UVA TINTA TEMPRANILLO**

Para llevar a cabo este estudio se vendimió la uva tinta variedad Tempranillo en el mes de octubre de las diferentes campañas 2008, 2009 y 2010. Con las uvas vendimiadas se llevaron a cabo vinificaciones por duplicado en la

bodega experimental de la Universidad de La Rioja, siguiendo un proceso de vinificación clásico en vino tinto [ver esquema en *Anexo VI* y en el Capítulo I de esta memoria]. Además se llevó a cabo la vinificación de uvas control en ausencia de dichas materias activas. Para evaluar los niveles residuales de estos dos fungicidas se tomaron las siguientes muestras a lo largo del proceso de vinificación:

- Muestras de uva vendimiada.
- Muestras de mosto, obtenido tras el estrujado de la uva (día 1 de la fermentación alcohólica).
- Muestras en los días 3, 4, 6 y 8 de la fermentación alcohólica.
- Muestra de las lías tras el trasiego realizado al acabar la fermentación alcohólica.
- Muestras en los días 1, 10, 15, 20, 25 y 30 días de la fermentación maloláctica, además de una vez terminada ésta.
- Muestras de vino al finalizar la clarificación con bentonita más gelatina.
- Muestras de vino tras filtrarlo con filtros de nylon, 0,45 µm.

Las concentraciones residuales de los fungicidas detectados en uva vendimiada y en vino final obtenido se recogen en la tabla III.5.

Las concentraciones detectadas en uvas vendimiadas en las tres campañas estudiadas fueron inferiores a los LMRs establecidos por la UE para uvas de vinificación (piraclostrobin 2000 mg kg<sup>-1</sup> y boscalid 5000 mg kg<sup>-1</sup>), tanto para uvas tratadas bajo BPA como para las tratadas bajo PAC.

Tabla III.5. Concentraciones residuales de fungicidas en muestras de uva y vino embotellado durante las campañas 2008, 2009 y 2010.

Fungicida	Formulación comercial	Aplicación	Muestras <sup>a</sup>		
			Uva ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Vino ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Reducción de los residuos (%)
<b>2008</b>					
Piraclostrobin	Cabrio Top	BPA	<LD	<LD	---
		PAC	1358 $\pm$ 136	<LD	>99
Boscalid	Cantus	BPA	91,1 $\pm$ 1.8	9 $\pm$ 1	90
		PAC	3383 $\pm$ 225	839 $\pm$ 58	75
<b>2009</b>					
Piraclostrobin	Cabrio Top	BPA	58,3 $\pm$ 3,9	<LD	>99
		PAC	1567 $\pm$ 98	<LD	>99
	Bellis	BPA	<LD	<LD	---
		PAC	1044 $\pm$ 93	<LD	>99
Boscalid	Cantus	BPA	408 $\pm$ 26	37 $\pm$ 3	90
		BPA	266 $\pm$ 22	32 $\pm$ 3	88
	PAC	3201 $\pm$ 204	603 $\pm$ 57	81	
<b>2010</b>					
Piraclostrobin	Cabrio Top	BPA	<LD	<LD	---
		BPA	<LD	<LD	---
	PAC	1312 $\pm$ 108	<LD	>99	
Boscalid	Cantus	BPA	198 $\pm$ 14	18 $\pm$ 2	91
		BPA	113 $\pm$ 8	7 $\pm$ 1	94
	PAC	3527 $\pm$ 331	796 $\pm$ 86	78	

BPA: buenas prácticas agrícolas

PAC: prácticas agrícolas críticas

LD: límite de detección (LDpiraclostrobin-uva=1,7  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ; LDpiraclostrobin-vino=1,2  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )<sup>a</sup>: media  $\pm$  SD (n = 2).

El porcentaje de reducción de la tasa de contaminación global del proceso de vinificación en términos de concentración (ver tabla III.5.) fue superior al 75%

para boscalid en todos los casos y a 99% para piraclostrobin en las tres campañas. Estos porcentajes de reducción de los niveles residuales durante la vinificación coinciden con los obtenidos por otros autores para ambos fungicidas [Edder *et al.*; 2009; Garau *et al.*; 2009; González-Rodríguez *et al.*; 2011a], los cuales indican que la disminución de ambos fungicidas es debida principalmente a procesos de adsorción sobre orujos, fangos y lías

### *Piraclostrobin*

Los residuos encontrados en uva de este fungicida de manera general fueron inferiores al límite de detección durante las tres campañas tras la aplicación de los tratamientos de Cabrio Top y Bellis (mezcla) bajo BPA, excepto para el tratamiento con Cabrio Top en 2009, que presentó una concentración de 58  $\mu\text{g kg}^{-1}$  desapareciendo totalmente en la fase de estrujado de la uva. Por ello, el estudio de la disipación de los residuos de este fungicida se llevó a cabo gracias a la aplicación de estos tratamientos bajo PAC.

A partir de las concentraciones determinadas en todas las muestras del proceso de vinificación, se calcularon los porcentajes presentes de residuo en cada etapa. Los valores obtenidos para piraclostrobin según los diferentes tratamientos se esquematizan en la figura III.13. (datos numéricos ver *Anexo VI*) en la que claramente se aprecia que todas las etapas del proceso de vinificación contribuyeron en mayor o menor medida a la disipación de los residuos.

La etapa de estrujado ejerció un efecto considerable en la reducción de los residuos permaneciendo en el mosto la mitad de la concentración inicial de residuos, entre un 42%-53%.

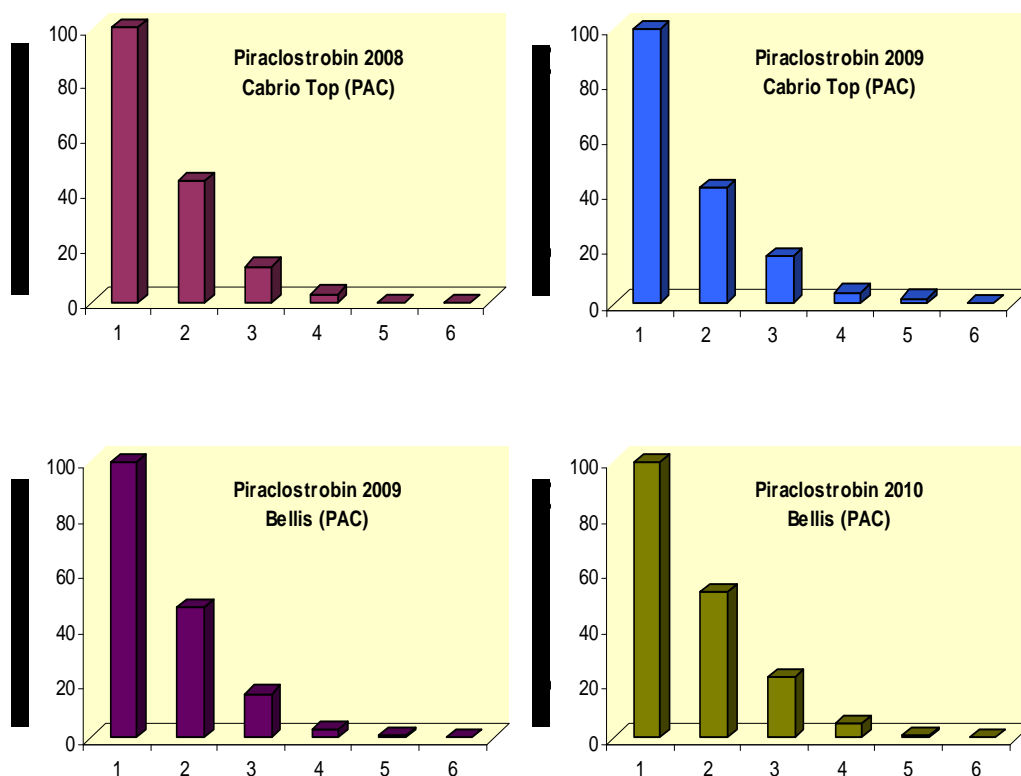


Figura III.13. Porcentaje de residuos de piraclostrobin que permanecen después de las diferentes etapas de vinificación para los tratamientos Cabrio Top y Bellis bajo PAC: 1) uva; 2) mosto; 3) final fermentación alcohólica; 4) final fermentación maloláctica; 5) clarificación; 6) filtración.

En las siguientes etapas, los residuos siguieron disminuyendo hasta quedar en vino después de la fermentación alcohólica entre 13% y 22% de este fungicida. Una vez que dicha etapa finalizó, tuvo lugar la fermentación maloláctica, produciendo una reducción de 10% a 17% en los residuos de piraclostrobin. Los residuos que permanecieron después de esta etapa (<5%) desaparecieron en todos los casos en las etapas de clarificación, utilizando bentonita más gelatina, y filtración. Las concentraciones obtenidas en los vinos

finales (ver tabla III.5.) no superaron el límite de detección para este fungicida en ningún caso, independientemente del tratamiento aplicado.

Tal y como se expuso en la introducción, no existen valores de LMRs de plaguicidas en vino en la UE. Únicamente países como Italia y Suiza han demostrado su iniciativa legislativa al establecer LMRs en vino para algunos de ellos. En el caso de piraclostrobin, se estableció un límite máximo de 0,05 mg Kg<sup>-1</sup> en Italia [Decreto del Ministero della Salute—19 aprile 2006; Decreto del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali—23 luglio 2008]. Las concentraciones finales obtenidas en este estudio y para este fungicida en base a los ensayos realizados son inferiores a estos LMRs y por ello cumplen con dicha legislación..

Una vez analizadas todas las muestras del proceso y obtenidos los valores de concentración, se realizó un estudio cinético para la disipación encontrada en ambas etapas fermentativas. Para ello, dichos valores se ajustaron al siguiente modelo matemático:

$$R_t = R_0 e^{-kt} \quad \longrightarrow \quad \ln R_t = \ln R_0 - Kt$$

donde  $R_t$  es la concentración del residuo al tiempo  $t$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $R_0$  es la concentración inicial al tiempo  $t = 0$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $K$  es la constante de decaimiento del fungicida (coincide con la pendiente), y  $t$  es el tiempo en días.

En la figura III.14. se representan gráficamente los ajustes lineales obtenidos entre el logaritmo neperiano de la concentración de los residuos y el tiempo. Los coeficientes de correlación lineal fueron superiores a 0,9823 en fermentación alcohólica y superiores a 0,9851 en fermentación maloláctica. Los valores para la constante de decaimiento  $K$  (pendientes de las rectas) fueron

superiores en fermentación alcohólica (aproximadamente el doble) que en fermentación maloláctica indicando que la primera de éstas contribuye a una mayor disipación de los residuos de piraclostrobin.

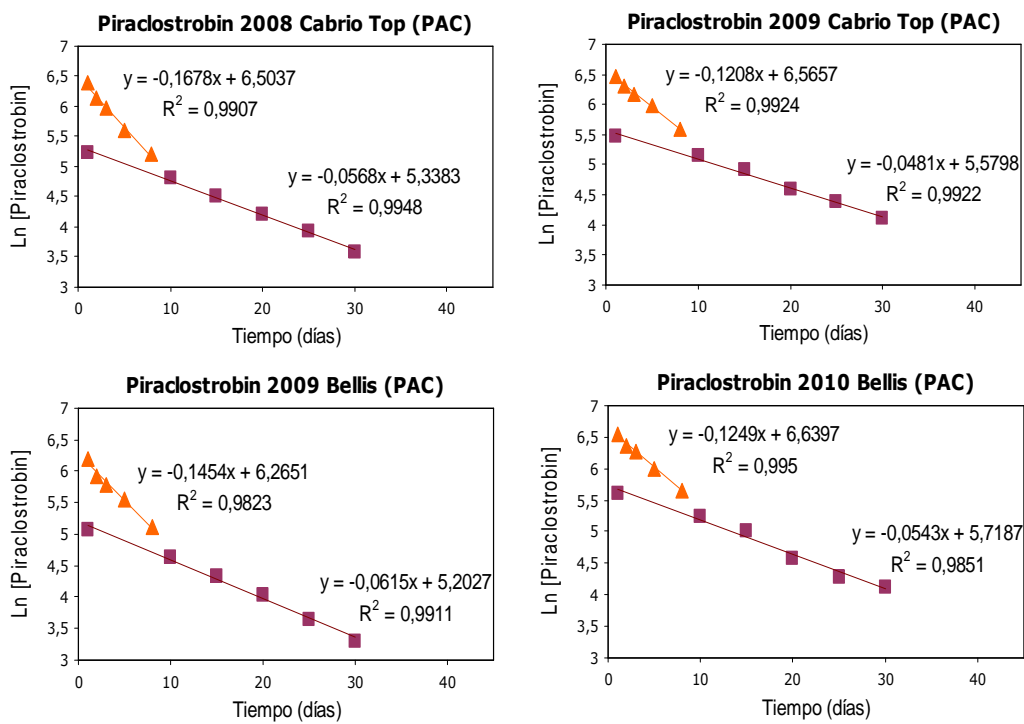


Figura III.14. Ajustes lineales entre el logaritmo neperiano de la concentración residual de piraclostrobin para la fermentación alcohólica (triángulos naranjas) y la fermentación maloláctica (cuadrados granates) para los tratamientos, Cabrio Top y Bellis, bajo PAC.

Los valores de  $K$  para fermentación alcohólica resultaron muy similares entre los años en que se aplicó cada tratamiento y entre tratamientos mostrando valores de 0,1208 a 0,1678. Lo mismo ocurrió para los valores de  $K$  en la fermentación maloláctica (valores comprendidos entre 0,0481 y 0,0615). Por tanto, se puede decir como conclusión que la disipación de los residuos de



piraclostrobin no se ve influenciada significativamente por la presencia de otras materias activas y la proporción en que este fungicida se encuentra en los productos comerciales utilizados en el tratamiento de las uvas vendimiadas.

### *Boscalid*

Los residuos encontrados de este fungicida durante las tres campañas tras la aplicación de los tratamientos de Cantus y Bellis (mezcla) bajo BPA y PAC fueron inferiores al límite máximo de residuos (5000 mg kg<sup>-1</sup>). Debido a la presencia de residuos de boscalid en las aplicaciones según las BPA y la posibilidad de estudiar así la disipación, la aplicación bajo PAC para Cantus sólo se realizó el primer año de estudio, que corresponde a la campaña 2008.

A partir de las concentraciones determinadas en todas las muestras del proceso de vinificación, se calcularon los porcentajes presentes de residuo en cada etapa. Los valores obtenidos para boscalid según los diferentes tratamientos se esquematizan en la figura III.15. (datos numéricos en *Anexo VI*) en la que se puede apreciar, igual que en el caso de piraclostrobin, que todas las etapas del proceso de vinificación contribuyeron a una reducción en la cantidad de residuos.

La etapa de estrujado ejerció un efecto considerable en la reducción de los residuos permaneciendo en el mosto entre 30% y 47% de la concentración inicial encontrada en uva. En las siguientes etapas, los residuos siguieron disminuyendo hasta quedar en el vino ya formado después de la fermentación alcohólica entre 20% y 40% aproximadamente de este fungicida.

Posteriormente la fermentación maloláctica contribuyó con una reducción de un 5% de media en todos los casos.

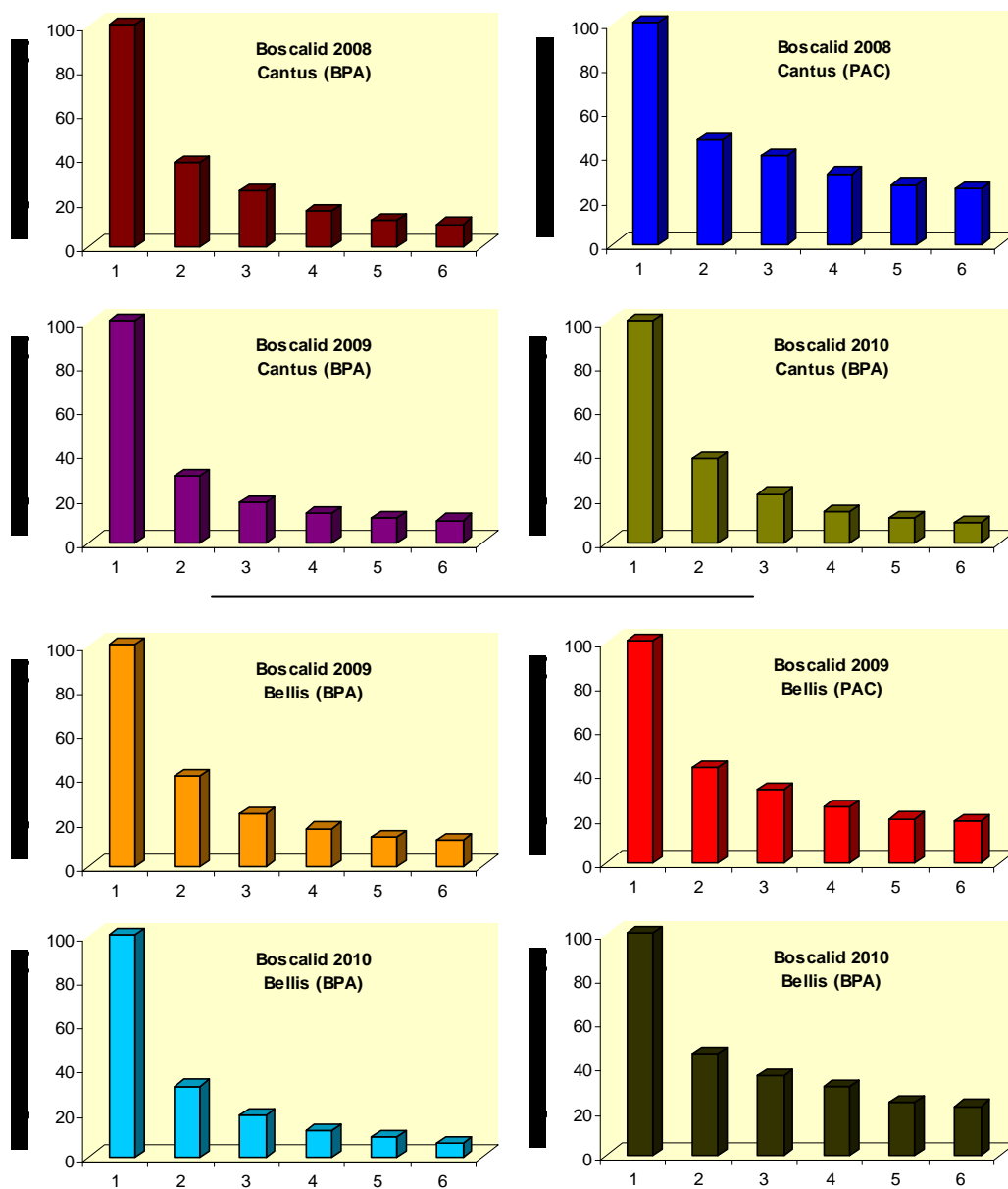


Figura III.15. Porcentaje de residuos de boscalid que permanecen después de las diferentes etapas de vinificación para los tratamientos de Cantus y Bellis (mezcla) bajo BPA y PAC: 1) uva; 2) mosto; 3) final fermentación alcohólica; 4) final fermentación maloláctica; 5) clarificación; 6) filtración.

La clarificación produjo una eliminación < 5%, muy similar a la obtenida mediante la etapa de filtración, contribuyendo ésta con una disminución de entre 1% y 3%. Las concentraciones encontradas en los vinos finales ya filtrados (ver Tabla III.5.) obtenidos bajo BPA estuvieron entre 7 y 37  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de boscalid siendo inferiores al LMR establecido para este fungicida en Italia o Suiza para la matriz vino (1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) [Decreto del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali – 23 luglio 2008; Ordonnance du DFI du 26 juin 1995].

Una vez analizadas todas las muestras del proceso y obtenidos los valores de concentración, se realizó un estudio cinético para la disipación que se produce en ambas etapas fermentativas. Para ello, dichos valores se ajustaron al siguiente modelo matemático:

$$R_t = R_0 e^{-kt} \quad \longrightarrow \quad \ln R_t = \ln R_0 - Kt$$

donde  $R_t$  es la concentración del residuo al tiempo  $t$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $R_0$  es la concentración inicial al tiempo  $t = 0$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $K$  es la constante de decaimiento del fungicida, y  $t$  es el tiempo en días.

En la figuras III.16. y III.17. se representan gráficamente los ajustes lineales obtenidos entre el logaritmo neperiano de la concentración residual y el tiempo según BPA y PCA, respectivamente. Los valores para los coeficientes de correlación lineal fueron superiores a 0,9122 en fermentación alcohólica y superiores a 0,9355 en fermentación maloláctica. Los valores obtenidos para la constante de decaimiento  $K$  fueron superiores en fermentación alcohólica en todos los casos, independientemente del tratamiento y de las prácticas agrícolas

aplicadas, indicando así que la primera etapa contribuye a una mayor disipación para los residuos de boscalid.

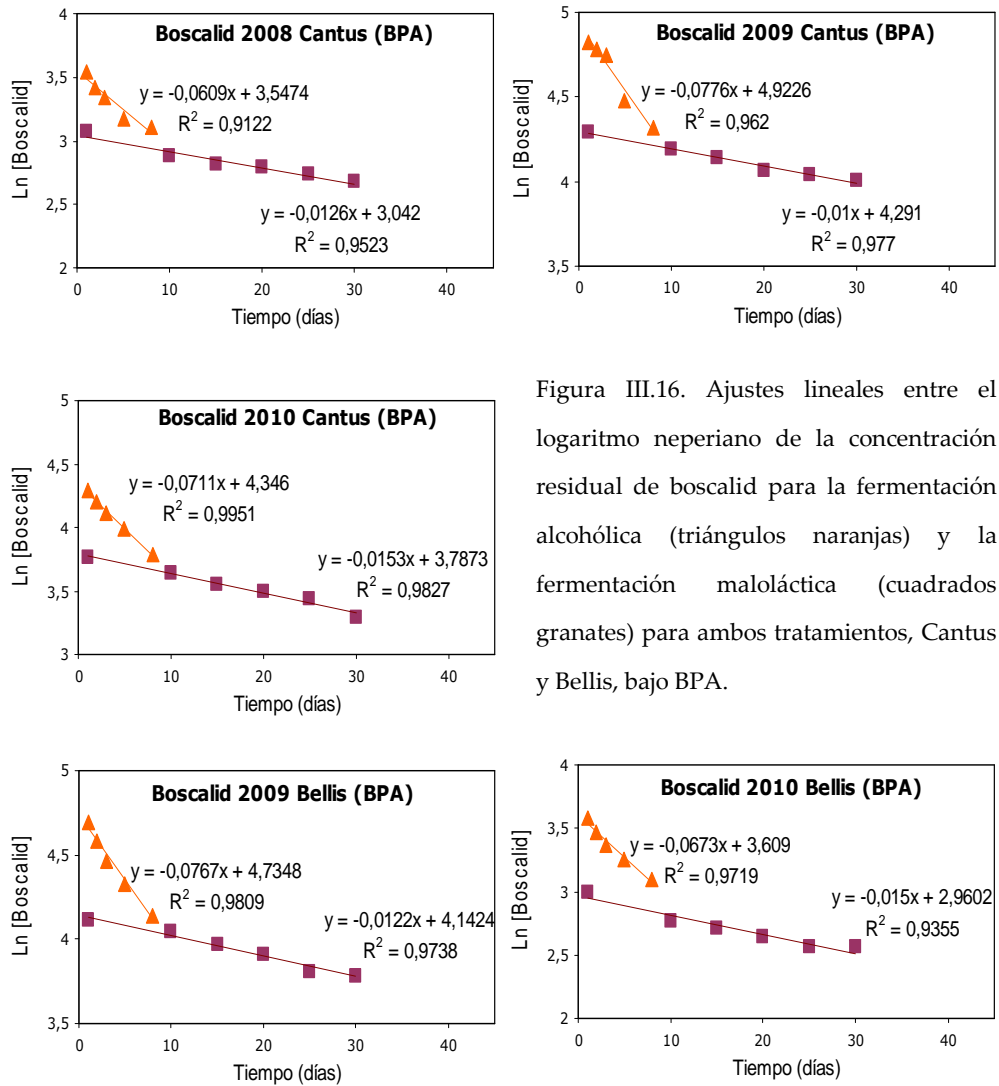


Figura III.16. Ajustes lineales entre el logaritmo neperiano de la concentración residual de boscalid para la fermentación alcohólica (triángulos naranjas) y la fermentación maloláctica (cuadrados granates) para ambos tratamientos, Cantus y Bellis, bajo BPA.

Los valores de K para fermentación alcohólica resultaron muy similares entre los tres años en que se aplicó cada tratamiento y entre ambos tratamientos, Cantus y Bellis, viéndose afectado su valor según las prácticas agrícolas realizadas. Lo mismo ocurrió para los valores de K en fermentación maloláctica.

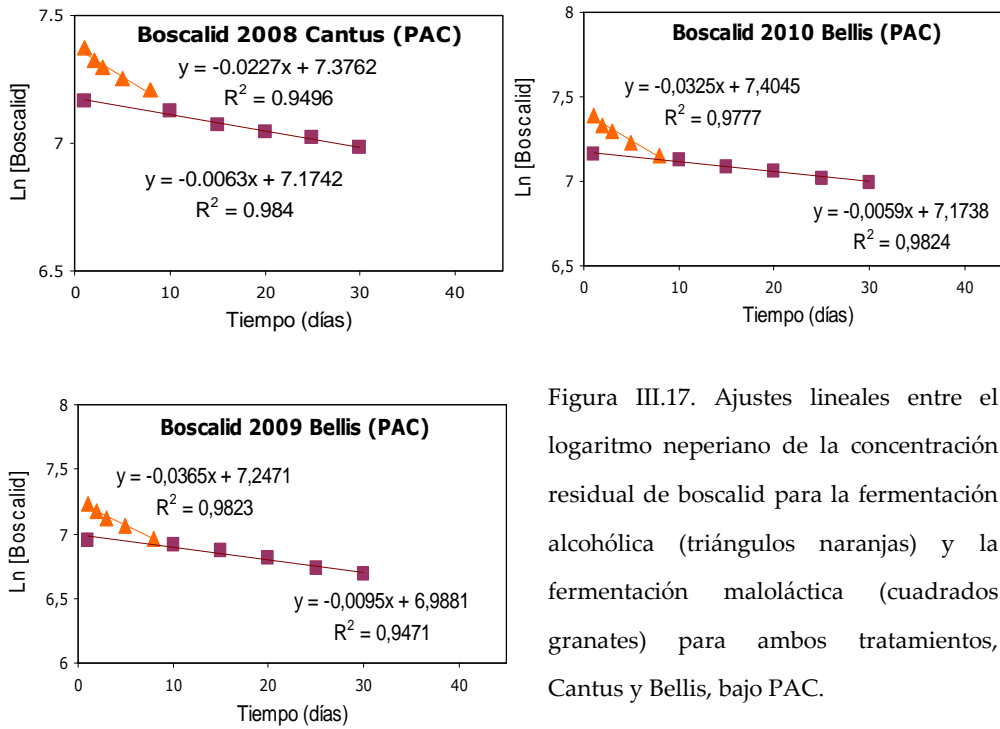


Figura III.17. Ajustes lineales entre el logaritmo neperiano de la concentración residual de boscalid para la fermentación alcohólica (triángulos naranjas) y la fermentación maloláctica (cuadrados granates) para ambos tratamientos, Cantus y Bellis, bajo PAC.

Por tanto, se puede decir como conclusión que la disipación de residuos de boscalid no se ve influenciada significativamente por la presencia de piraclostrobin en las uvas vendimiadas. Sin embargo, se puede distinguir una peculiaridad independientemente de si el tratamiento es individual o mezcla con piraclostrobin. En las tres vinificaciones realizadas bajo tratamiento de PAC (figura III.17), la concentración en uva y por tanto en mosto inicial, es mayor que

para las muestras realizadas bajo BPA y sin embargo las  $K$  de decaimiento son inversamente proporcionales a dicha concentración. En el caso de fermentación alcohólica los valores obtenidos se encuentran entre 0,02 y 0,04 días<sup>-1</sup> mientras que para vinificaciones con tratamientos bajo BPA mostraron valores entre 0,06 y 0,08 días<sup>-1</sup>. La misma situación se observa para los valores de  $K$  de fermentación maloláctica. Los vinos elaborados con uvas tratadas bajo BPA mostraron valores de 0,010-0,015 días<sup>-1</sup>, mientras que los vinos bajo PAC dieron valores inferiores a 0,01 días<sup>-1</sup>.





**INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE BOSCALID Y  
PIRACLOSTROBIN EN LA CALIDAD DEL VINO  
FINAL**

---





La calidad del vino final depende de la calidad de la uva vendimiada. Para obtener vinos de alta calidad es necesario vendimiar las uvas sanas y en su estado óptimo de maduración. Las enfermedades presentes en el viñedo como son botritis, oidio y mildiu obligan a los agricultores al uso de pesticidas con el fin de mantener la uva en perfecto estado. La presencia de residuos de estos plaguicidas puede modificar la estructura de las membranas celulares de levaduras y bacterias responsables del proceso de vinificación, afectando su función específica. Como resultado de ello se puede producir una variación en la población y en la especie de microorganismos encontrados en el mosto, pudiendo dar lugar a ralentizaciones en los procesos fermentativos (fermentación alcohólica y fermentación maloláctica) y variación de la actividad de enzimas que participan en el metabolismo de polifenoles, dando lugar a cambios en el color y/o la astringencia de los vinos finales. Todo ello se traduce en una pérdida de calidad en el vino final obtenido.

#### **III.4.1. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN VINO**

Durante todo el proceso desde la vendimia hasta el vino final se determinaron los parámetros enológicos convencionales. Para controlar la evolución de la fermentación alcohólica se midieron densidad y temperatura así como anhídrido sulfuroso libre y total de acuerdo con los métodos oficiales de la OIV. Grado alcohólico, pH, azúcares reductores, acidez total y acidez volátil fueron medidos mediante FTIR (Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier) con el equipo FOSS WineScan. El resto de parámetros se analizaron siguiendo la metodología explicada a continuación para cada uno de ellos:

### ***Índice de Polifenoles Totales (IPT)***

El índice de polifenoles totales se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 10 mm, previa dilución del vino 1:100 con agua destilada [Ribéreau-Gayon, 1999] y se calculó de la siguiente manera:  $IPT = A_{280} \times 100$ .

### ***Antocianos Totales***

La decoloración de los antocianos por adición de sulfuroso permite evaluar la cantidad de antocianos libres de una muestra de vino [Ribéreau-Gayon, 1965]. A 1 mL de vino, se añaden 1 mL de etanol y 20 mL de HCl al 0,7 % (m/v) en un vaso de precipitados. Se toman 5 mL de esta mezcla y se le añaden 2 mL de agua destilada (control). Por otro lado, se añaden 2 mL de NaHSO<sub>3</sub> al 7 % (m/v) a otros 5 mL de la mezcla inicial. Al cabo de 10 minutos se midieron las absorbancias a 520 nm en cubetas de 10 mm. El contenido del vino en antocianos totales responde a la siguiente fórmula:  $\text{Antocianos Totales} = (A_1 - A_2) \times 875 \text{ mg L}^{-1}$  donde  $A_1$  es la absorbancia del control (sin adicionar sulfuroso),  $A_2$  es la absorbancia de la muestra decolorada por adición de sulfuroso y 875 corresponde al coeficiente de extinción molar de malvidina (antociano patrón).

### ***Taninos Totales***

Este parámetro se determina por calentamiento en medio ácido produciéndose la formación de antocianidinas a partir de los taninos [Ribéreau-Gayon, 1965]. Se diluye el vino 1:50 en agua destilada. Se preparan dos tubos conteniendo 2 mL de la dilución, 1 mL de agua destilada y 6 mL de HCl 12 N. Uno de los tubos se tapó herméticamente, protegiéndolo de la luz y se mantuvo

al baño maría durante 30 min. El otro tubo se dejó a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo, el primer tubo se sacó y se enfrió de forma rápida sobre hielo. Seguidamente, a los dos tubos se les adicionó 1 mL de etanol y se midieron las absorbancias a 550 nm. Los taninos totales ( $\text{g L}^{-1}$ ) se calcularon según la fórmula  $\text{Taninos totales} = (A_1 - A_2) \times 19,33$  donde  $A_1$  es la absorbancia de la muestra procedente del tubo hervido,  $A_2$  es absorbancia de la muestra procedente del tubo a temperatura ambiente y 19,33 corresponde al coeficiente de extinción molar de cianidina.

### ***Índice de astrigencia***

En este trabajo se utilizó un método propuesto anteriormente por Zamora *et al*, 1994.

Se prepararon una serie de disoluciones, de distintas concentraciones de ácido tánico y de ovoalbúmina en vino sintético ( $4 \text{ g L}^{-1}$  de ácido tartárico y  $95 \text{ g L}^{-1}$  de etanol,  $\text{pH} = 3,5$ ). Las concentraciones de ovoalbúmina utilizadas para la recta de calibrado fueron: 0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 y  $4,0 \text{ g L}^{-1}$  mientras que para ácido tánico fueron 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 y  $10,0 \text{ g L}^{-1}$ .

La recta de calibrado se realizó a partir de la preparación de 42 tubos, conteniendo cada uno de ellos 1 mL de disolución de ácido tánico y 1 mL de disolución de ovoalbúmina, combinando cada concentración de ésta con las seis valores de concentración correspondientes al ácido tánico.

Los tubos se agitaron y al cabo de 10 minutos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. Seguidamente el sobrenadante se diluyó 1:50 con agua destilada y se midieron las absorbancias a 280 nm en cubeta de cuarzo de 10 mm.

El blanco se hizo con la disolución sintética de vino. Seguidamente, se procedió de la misma forma, pero empleando las muestras de vinos en lugar de los estándares de ácido tánico.

### ***Índice de etanol***

Este índice representa el porcentaje de taninos unidos a polisacáridos, es decir, taninos no astringentes.

Se diluye 1 mL de vino a 10 mL enrasando con alcohol etílico. Se homogeneizó y dejó reposar durante 24 horas. Pasado este tiempo, se centrifugó para eliminar el precipitado, determinando después la absorbancia a 280 nm del sobrenadante previa dilución 1:100 con agua destilada (A<sub>2</sub>).

Por otro lado, se determinó la A<sub>280</sub> del vino original, diluido 1:100 con agua destilada (A<sub>1</sub>).

El índice de etanol se calcula:

$$\text{Índice de etanol (\%)} = 100 \times (A_1 - A_2) / A_1$$

### ***Coordenadas de color CIELab***

Para la obtención de las coordenadas de color, se midió el espectro del vino en el rango visible, entre 380 y 780 nm, en una cubeta de cuarzo de 2 mm de camino óptico, para evitar la realización de diluciones. A partir de los resultados del espectro, se obtienen las coordenadas de color CIELab por medio de los valores triestímulo X, Y y Z utilizando el iluminante D65 y el observador CIE 1964, de acuerdo con el método propuesto por la OIV. La coordenada a\* corresponde a la tonalidad que va del verde (-a\*) al rojo (+a\*), la coordenada b\* corresponde a la tonalidad que va del amarillo (+b\*) al azul (-b\*) y la coordenada

$L^*$  que expresa la claridad o capa que tiene una graduación entre el blanco ( $+L^*$ ) y el negro ( $-L^*$ ).

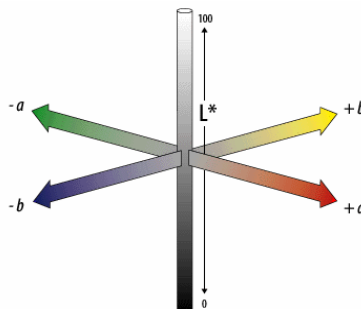


Figura III.18.  $L^*$  = luminosidad del color.  $a^*$  = valores (-) indican verde y (+) rojo.  $b^*$  = valores (-) indican azul y (+) amarillo.

Los valores típicos encontrados para estas tres coordenadas en vinos tintos y la carta de colores para los vinos correspondientes a la Denominación de Origen Calificada Rioja son mostrados en la siguiente figura (figura III.19).

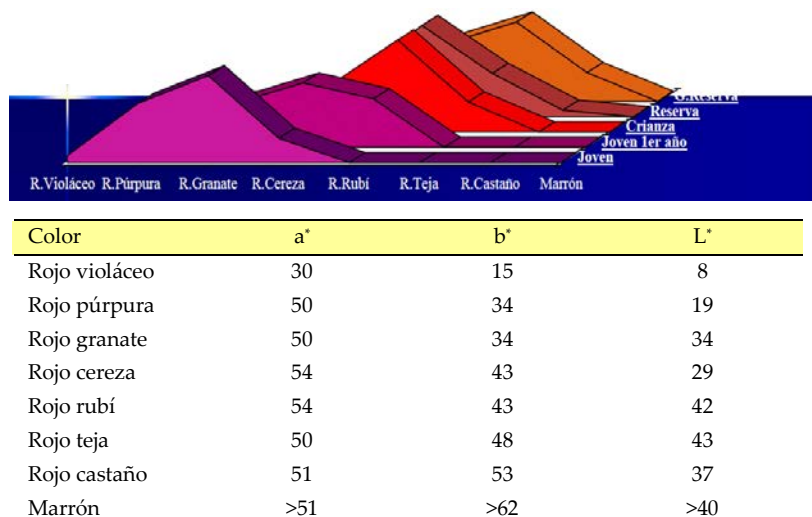


Figura III.19. Carta de colores y valores de las coordenadas CIElab para vinos tintos

Los valores mostrados en la figura anterior para las tres variables indican que conforme el vino es conservado durante más años, los valores de dichas variables aumentan.

### **III.4.2. FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

Las muestras de este trabajo fueron fraccionadas mediante una columna de GPC (Gel Permeation Chromatography), con el fin de separar los compuestos fenólicos poliméricos, de alto peso molecular que interfieren en la separación y resolución cromatográfica, de los monoméricos y oligoméricos los cuales si se pueden separar y cuantificar mediante técnicas cromatográficas [Guadalupe *et al.* 2006].

El primer paso en el estudio de fraccionamiento de los vinos consiste en la preparación de la columna de sílice. Para ello se llevó a cabo el empaquetamiento del gel GPC (Toyopearl HW-50F) en una columna Millipore (Bedford, MA, USA) con dimensiones de 120 mm x 12 mm.

Se introducen pequeñas cantidades de sílice disuelta en agua destilada en la columna para que se vaya compactando la sílice a lo largo de la misma hasta llegar a los 12 centímetros de longitud. El agua añadida en exceso se elimina por la parte inferior de la columna para favorecer la compactación de la columna de sílice. Además, el agua sobrante que queda por encima de la sílice en el extremo superior se elimina mediante una pipeta pasteur.

Una vez compactada se cierra con un tapón la parte inferior de la columna de fraccionamiento con el objetivo de que la columna no pierda más agua. La columna de sílice debe estar siempre húmeda para evitar la formación de burbujas y la ruptura de la columna (aparición de grietas). En caso de que la

columna tuviera burbujas o empezara a agrietarse se comenzaría de nuevo todo el proceso.

Previa a la inyección de los dos mililitros de vino, es necesario purgar todo el sistema con el eluyente a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  con el objetivo de eliminar todo el aire que pudiera haber en las conexiones. Una vez inyectado el vino se deja pasar el eluyente durante 60 minutos, con lo cual se obtienen 60 mL de una fracción que contiene los polifenoles de menor peso molecular. La fase de elución fue una disolución de etanol al 55% (v/v) en agua destilada con 1 mL de TFA (ácido trifluoroacético). El flujo de la fase de elución es de un  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Así se eluyen los siguientes grupos de polifenoles :

- Flavanoles (catequinas y epicatequinas)
- Flavonoles
- Ácidos hidroxinómicos
- Antocianos (mayoritariamente malvidina)

La columna de sílice se puede utilizar para fraccionar unos 12-15 vinos; y entre la elución de uno y otro vino no es necesario limpiar la columna. Entre la inyección de un vino y otro la columna de sílice debe acondicionarse de nuevo dejando pasar la fase de elución durante 5 minutos.

Eluidos los vinos, se colocan los 60 mL de eluyente en el rotavapor a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora con el objetivo de eliminar la mayor cantidad etanol que sea posible antes de pasarlas al liofilizador. A continuación, los matraces con las muestras a las cuales se les ha eliminado parcialmente el disolvente, son llevados a un congelador industrial para enfriarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$



durante un día para posteriormente someterlos a una liofilización. Esta técnica consiste en exponer la muestra congelada a elevadas presiones y bajas temperaturas con el objetivo de conseguir la total evaporación del disolvente. Transcurridas las 24 horas que deben permanecer las muestras en el liofilizador, se obtiene un sólido. Este sólido se redisolvió con una disolución agua-ácido fórmico en proporción 95:5 (v/v).

### **III.4.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS MEDIANTE UPLC-MS/MS (ESI ±).**

Los análisis fueron llevados a cabo usando el sistema cromatográfico Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA). La separación cromatográfica de 7,5 µL de muestra se realizó con la columna Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm) fijando el horno de la columna a 40 °C. Los eluyentes fueron (A) 5% (v/v) ácido fórmico en agua y (B) acetonitrilo más 0,1% (v/v) de ácido fórmico. El gradiente de elución fue el siguiente: isocrático 98% A durante 1 min, aumentando posteriormente de 2 a 40% B en 4 min, de 40 a 90% B en 3 min, de 90 a 100% B en 2 min y finalmente disminuyendo de 100 a 2% B en 2 min para acondicionar de nuevo la columna.

El analizador utilizado fue un Micro TOF-Q (Time Of Flight), de Bruker Daltonics equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Con el fin de confirmar la fragmentación de las moléculas, se analizaron las muestras por MS/MS utilizando como gas de fragmentación nitrógeno con las siguientes condiciones que se resumen en la tabla III.6.

Los parámetros para el análisis fueron establecidos en modo positivo y negativo adquiriendo en un rango de masas entre 50–1000 m/z.

Tabla III.6. Condiciones en modalidad MS/MS auto

ESI (+)	ESI (-)
Collision energy 8 eV	Collision energy 10 eV
Threshold absolute 800 cts	Threshold absolute 800 cts
Range 50-1000 m/z	Range 50-1000 m/z
Set capillary 4500 V	Set capillary 4000 V
Set End plate offset -500 V	Set End plate offset -500 V
Set Nebulizer 3,0 bar	Set Nebulizer 3,0 bar
Set Dry gas 9,0 l min <sup>-1</sup>	Set Dry gas 9,0 l min <sup>-1</sup>
Set Dry heater 200 °C	Set Dry heater 200 °C

---

La identificación de los compuestos polifenólicos se realizó mediante la utilización de patrones y el estudio de los espectros de masas en comparación con la información encontrada en la bibliografía.

A continuación se muestra la identificación de los polifenoles dividido por familias: antocianos, flavanoles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles.

La identificación de antocianos se realizó trabajando por UPLC-MS/MS ESI en modo positivo y flavonoles, flavanoles y ácidos hidroxicinámicos en ESI-. La tabla III.7. indica, para cada compuesto polifenólico, su nombre, la masa encontrada y el fragmento que identifica el equipo tras la fragmentación con nitrógeno.

La cuantificación de los compuestos polifenólicos se realizó mediante la utilización de cuatro patrones, correspondientes a cada uno de los grupos de.

Tabla III.7. Parámetros de masas para los compuestos polifenólicos identificados

Tiempo de retención(min)	Compuesto	[M-H] <sup>+</sup> o[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS/MS fragmento (m/z)
<b>Antocianos [M-H]<sup>+</sup></b>			
2,66	Delfinidina-3-O-glucosido	465	303
2,86	Cianidina-3-O-glucosido	449	287
2,95	Petunidina-3-O-glucosido	479	317
3,16	Peonidina-3-O-glucosido	463	301
3,22	Malvidina-3-O-glucosido	493	331
3,41	Delfinidina-3-O-(6-o-acetil)glucósido	507	317
3,68	Petunidina-3-O-6-acetilglucósido	521	331
3,73	Delfinidina-3-O- glucosido coumarato	611	303
3,77	Peonidina-3-O-6- acetilglucósido	505	301
3,81	Malvidina-3-O-6- acetilglucósido	535	331
3,92	Cianidina-3-O-6 glucosido coumarato	595	287
3,97	Petunidina-3-O-6 glucosido coumarato	625	317
4,18	Peonidina-3-O-6 glucosido coumarato	609	301
4,21	Malvidina-3-O-6 glucosido coumarato	639	331
<b>Flavanoles [M-H]<sup>-</sup></b>			
0,82	Ácido gálico	169	125
2,14	Catequina	289	203
<b>Ácidos hidroxicinámicos [M-H]<sup>-</sup></b>			
2,19	Ácido caftárico	311	179
2,20	Ácido cafeico	179	135
2,71	Ácido cutárico	295	149
2,71	Ácido cumárico	163	119
<b>Flavonoles [M-H]<sup>-</sup></b>			
2,65	Quercetina 3-O-galactosido	463	301
3,26	Miricetina 3-O-glucosido	479	316
3,57	Quercetina 3-O-glucuronido	477	301
3,60	Quercetina 3-O-glucosido	463	301
3,87	Kaempferol 3-O-glucosido	447	285
4,03	Miricetina	317	179
4,66	Quercetina	301	179
5,23	Kaempferol	285	269

compuestos polifenólicos estudiados: malvidina para antocianos; quercetina para flavonoles; ácido cafeico para ácidos hidroxicinámicos y catequina para flavanoles. Los cuatro patrones fueron proporcionados por Sigma Aldrich (Madrid).

Inicialmente, se inyectaron los cuatro patrones y se buscaron las masas establecidas en bibliografía. Una vez determinado el tiempo de retención de cada uno, se realizaron rectas de calibrado para cada patrón con el fin de cuantificar todos los compuestos polifenólicos en base al patrón correspondiente. El rango lineal estudiado, su coeficiente de correlación, el límite de cuantificación (LC) y el límite de detección (LD) se resumen en la tabla III.8.

Tabla III.8. Parámetros analíticos obtenidos para los patrones de cuantificación

Compuesto	Rango lineal (mg L <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LC (mg L <sup>-1</sup> )
Malvidina	0,5-75	0,9980	0,04	0,12
Quercetina	0,25- 7	0,9873	0,01	0,02
Ácido cafeico	1 - 100	0,9975	0,02	0,05
Catequina	0,5 - 100	0,9981	0,02	0,05

#### III.4.4. ANÁLISIS SENSORIAL

Aproximadamente tres meses después de finalizar el proceso de elaboración en las vendimias de 2008, 2009 y 2010, se realizaron los análisis sensoriales en la sala de análisis sensorial de la Universidad de La Rioja. Los análisis organolépticos fueron realizados por un panel de catadores compuesto por alumnos y egresados de la Licenciatura de Enología en la Universidad de La Rioja. El análisis sensorial se llevó a cabo para los vinos elaborados con uvas tratadas de acuerdo a los plazos de seguridad, es decir, el fungicida ha sido aplicado a la dosis y épocas recomendadas (BPAs).

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 *et al.* 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 consideraban similar al control A rellenando la ficha de cata mostrada en la figura III.20.

ANÁLISIS SENSORIAL		TEST DUO-TRIO	
Nº Catador:		Nº de Test:	
Nombre:		Mujer:.....	Hombre:.....
Tipo de muestra:		Fecha:	

Saborea las muestras de izquierda a derecha, la muestra de la derecha es la de referencia. Determina cual de las dos muestras desconocidas es **SIMILAR** a la muestra de referencia e indica con una X.

<b>Referencia</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>
<input type="text" value="Control"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Comentarios:

Figura III.20. Ficha de cata para el test duo-trío

Para el tratamiento de datos se utilizó un test binomial de una cola y para la expresión de los resultados se sumaron las repuestas correctas y se comparó con los datos correspondientes de la tabla III.9 para determinar si existen diferencias significativas entre las muestras. Para la discriminación, los panelistas consideraron las percepciones visuales (apariencia), olfativas (aromas y retronasal) y gustativas (sabores, tacto y postgusto).

Tabla III.9. Numero mínimo de repuestas necesarias para considerar significativo el resultado del test dúo-trío según los diferentes niveles significativos

Numero de respuestas	5 %	1%	0,1 %
7	7	7	-
8	7	8	-
9	8	9	-
10	9	10	10
11	9	10	11
12	10	11	12
13	10	12	13
14	11	12	13
15	12	13	14
16	12	14	15
17	13	14	16
18	13	15	16
19	14	15	17
20	15	16	18
21	15	17	18
22	16	17	19
23	16	18	20
24	17	19	20
25	18	19	21
30	20	22	24
35	23	25	27
40	26	28	31
45	29	31	34
50	32	34	37
60	37	40	43
70	43	46	49
80	48	51	55
90	54	57	61
100	59	63	66

---

### **III.4.5. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE PIRACLOSTROBIN Y BOSCALID**

#### **VINIFICACIÓN 2008**

#### ***Influencia sobre levaduras y bacterias. Evolución de la fermentación alcohólica y maloláctica.***

Las cepas variedad tempranillo procedentes de la parcela de Aldeanueva de Ebro fueron tratadas con Cabrio Top® (5% piraclostrobin) y con Cantus® (50% boscalid) en las épocas y dosis comentadas en el capítulo 3.3, ambos según las BPA y las PAC. Se dejaron un número de filas sin tratar con el fin de tener un testigo de la parcela. La uva tinta variedad Tempranillo se vendimió en cajas el día 09/10/08, recogiendo aproximadamente 200 kg de uva para el tratamiento y otros 200 kg sin tratamiento alguno.

La pasta procedente de la despalladora-estrujadora se encubó en depósitos de fermentación de acero inoxidable de 50 L. Se añadió anhídrido sulfuroso en una cantidad de 50 mg L<sup>-1</sup>. La elaboración se realizó por triplicado tanto para el testigo-control como para cada uno de los tratamientos. El día 10/10/2008 se inocularon levaduras de la cepa *Uvaferm*® VRB *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand). Los depósitos fueron bazuqueados dos veces por día. El control de la densidad permitió seguir la evolución de la fermentación alcohólica. La densidad disminuye a medida que avanza la fermentación siendo en el mosto entre 1070 y 1120 g L<sup>-1</sup> y en el vino entre los 990 y 998 g L<sup>-1</sup>.

Al día siguiente de finalizar la fermentación alcohólica, 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 *Oenococcus oeni*. La fermentación maloláctica se dio por finalizada una vez la concentración de ácido láctico y de ácido málico fue menor de  $2 \text{ g L}^{-1}$  y  $0,25 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, midiendo ambos ácidos por FTIR (Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier) con el equipo FOSS WineScan.

La figura III.21. representa el contenido en azúcar (expresado en porcentaje respecto al contenido inicial) del proceso de fermentación obtenido para el vino testigo y para los tratamientos con piraclostrobin y boscalid. Se observa en todos los casos una evolución similar de las fermentaciones entre mostos de uvas tratadas con respecto al control. La fermentación finalizó en aproximadamente 7 días para los tratamientos con piraclostrobin y boscalid según BPA y 8 días para los tratamientos bajo PAC y el vino testigo. La presencia de residuos de piraclostrobin y boscalid en mosto, incluso a altas concentraciones, no parece tener influencia en la actividad de las levaduras fermentativas ni por tanto en la evolución de la fermentación alcohólica. En el caso de la fermentación maloláctica, la duración fue similar para testigo y vinos procedentes de uvas tratadas siendo 32 y 33 días para el vino con boscalid y 28 y 31 días para las uvas tratadas con piraclostrobin, según BPA y PAC, respectivamente, mientras que para el vino elaborado como testigo finalizó en 29 días.

De forma similar a la fermentación alcohólica, ni el tratamiento en campo ni la presencia de residuos de ambos fungicidas en mosto parecen interactuar con las bacterias lácticas, responsables de llevar a cabo esta fermentación.



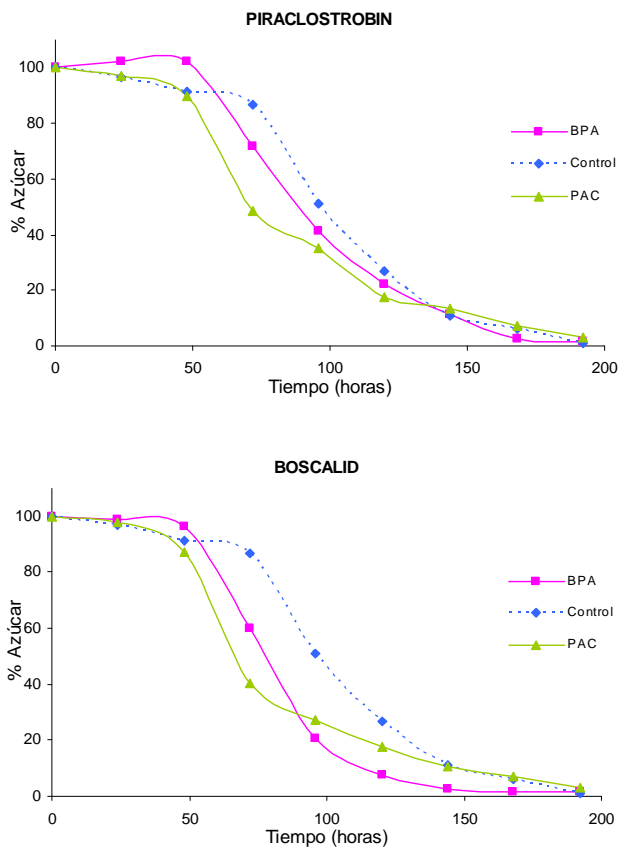


Figura III.21. Evolución de la fermentación alcohólica en 2008

### *Influencia sobre parámetros enológicos*

Los resultados obtenidos para los parámetros enológicos determinados como se explican en este capítulo para los diferentes tratamientos se muestran en la figura III.22. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

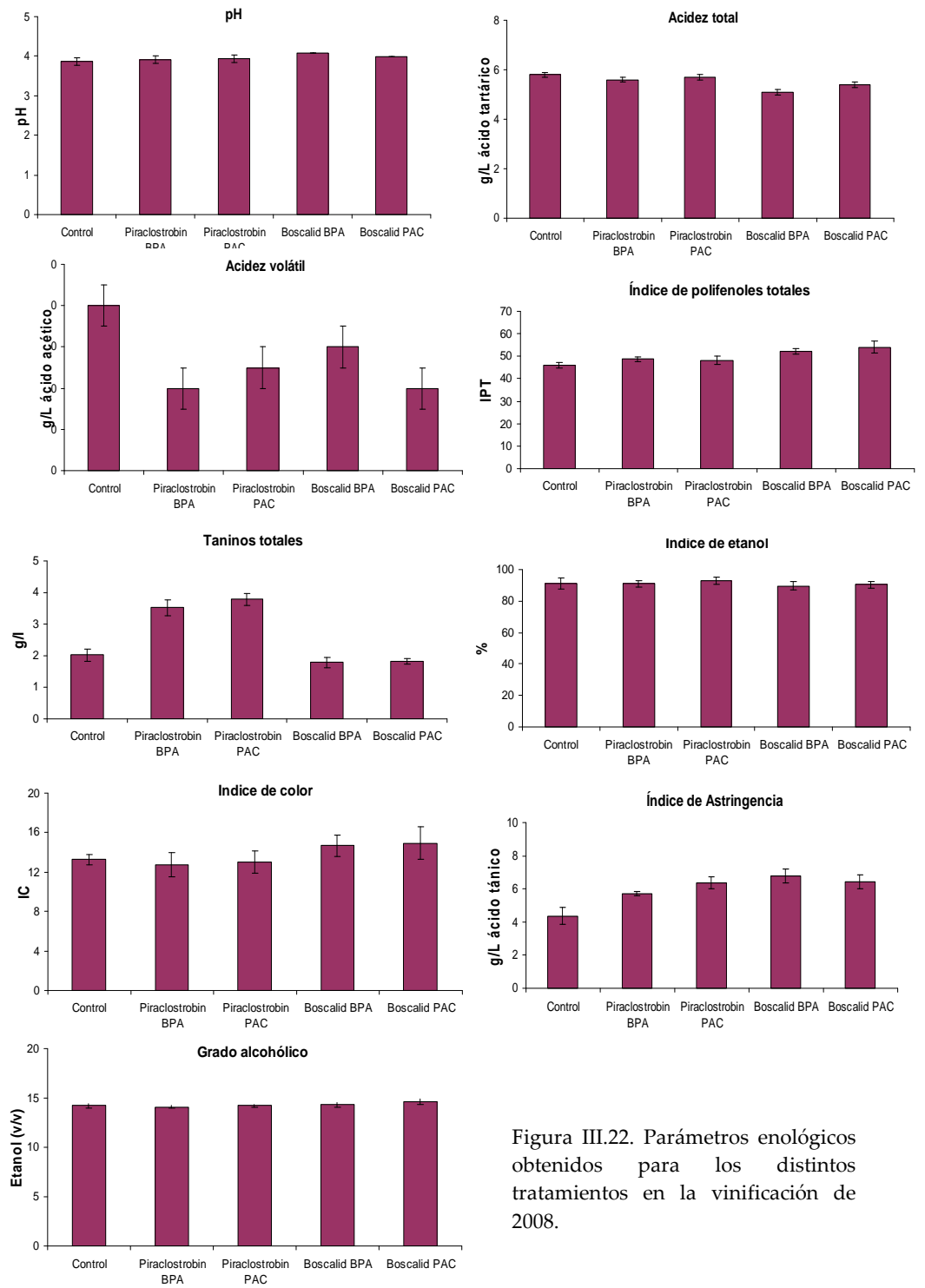


Figura III.22. Parámetros enológicos obtenidos para los distintos tratamientos en la vinificación de 2008.

Como se puede observar en la figura anterior, el tratamiento con ambos pesticidas, independientemente de cuando se produzca la aplicación, no produce diferencias significativas en cuanto al valor de pH o del índice de etanol.

En el caso de piraclostrobin, además de los dos parámetros enológicos comentados, acidez total, índice de color y grado alcohólico tampoco mostraron diferencias respecto al testigo. Sin embargo, se obtiene un aumento considerable en el contenido de taninos totales y del índice de astringencia. El parámetro que, aún siendo diferente significativamente varía ligeramente respecto al control, es IPT.

En el caso de vinos tratados con boscalid, índice de color, contenido en taninos y grado alcohólico no muestra diferencias significativas respecto al vino control. Los valores de acidez total y volátil, fueron inferiores al testigo. Lo contrario que sucede para IPT y astringencia, que son superiores.

Los compuestos polifenólicos individuales también fueron aislados y cuantificados (ver tabla III.10.). Se realizó la suma de cada grupo de compuestos para poder comparar entre los diferentes tratamientos.

Los grupos en los que se clasifican los compuestos polifenólicos estudiados son antocianos, flavanoles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles.

El vino testigo mostró valores superiores para ácidos hidroxicinámicos y flavonoles e inferiores para antocianos y flavanoles que los vinos tratados con piraclostrobin o boscalid, independientemente de las aplicaciones realizadas de Cabrio Top o Cantus, respectivamente.

Tabla III.10. Concentración obtenida por UPLC/MS-MS para los compuestos fenólicos en 2008

Compuesto	Concentración de compuestos polifenólicos (mg L <sup>-1</sup> )				
	Control	Cabrio Top (BPA)	Cabrio Top (PAC)	Cantus (BPA)	Cantus (PAC)
<b>Antocianos</b>					
Delfinidina-3-O-glucosido	28,5 ± 2,7	48,0 ± 0,5	40,0 ± 1,0	38,0 ± 0,6	26,4 ± 1,7
Cianidina-3-O-glucosido	2,4 ± 0,2	3,3 ± 0,1	4,8 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,2 ± 0,1
Petunidina-3-O-glucosido	37,8 ± 1,8	77,2 ± 2,1	57,7 ± 2,5	57,8 ± 2,0	47,1 ± 3,0
Peonidina-3-O-glucosido	10,4 ± 0,7	19,5 ± 0,2	18,1 ± 1,1	15,5 ± 0,6	11,7 ± 0,8
Malvidina-3-O-glucosido	110 ± 2	189 ± 9,1	124 ± 3,1	169 ± 8	160 ± 10
Delfinidina-3-O-(6-o-acetil)glucósido	13,0 ± 0,3	22,5 ± 0,3	21,0 ± 0,9	19,7 ± 1,4	13,2 ± 0,9
Petunidina-3-O-6-acetilglucósido	39,6 ± 0,6	82,4 ± 1,4	61,4 ± 0,9	65,1 ± 2,1	57,1 ± 1,3
Delfinidina-3-O- glucosido coumarato	5,0 ± 0,2	8,3 ± 0,2	7,3 ± 0,5	5,1 ± 0,1	4,7 ± 0,2
Peonidina-3-O-6- acetilglucósido	2,6 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,8 ± 0,1
Malvidina-3-O-6- acetilglucósido	15,6 ± 0,4	39,2 ± 0,8	31,3 ± 0,8	24,6 ± 1,4	22,8 ± 1,7
Cianidina-3-O-6 glucosido coumarato	2,24 ± 0,1	2,74 ± 0,0	3,07 ± 0,1	2,10 ± 0,0	2,18 ± 0,1
Petunidina-3-O-6 glucosido coumarato	6,36 ± 0,0	12,6 ± 0,5	13,4 ± 0,3	8,98 ± 0,9	6,27 ± 0,9
Peonidina-3-O-6 glucosido coumarato	5,31 ± 0,0	9,63 ± 0,2	8,99 ± 0,4	5,67 ± 0,3	5,77 ± 0,3
Malvidina-3-O-6 glucosido coumarato	33,4 ± 8,0	56,4 ± 0,5	47,1 ± 0,1	32,2 ± 1,5	35,0 ± 1,7
<b>TOTAL</b>	<b>312<sup>d</sup> ± 9</b>	<b>575<sup>a</sup> ± 15</b>	<b>442<sup>b</sup> ± 2</b>	<b>449<sup>b</sup> ± 17</b>	<b>397<sup>c</sup> ± 9</b>
<b>Flavonoles</b>					
Ácido gálico	4,0 ± 0,2	6,1 ± 0,5	6,4 ± 0,2	5,9 ± 0,2	4,1 ± 0,3
Catequina	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,0
<b>TOTAL</b>	<b>4,42<sup>c</sup> ± 0,20</b>	<b>6,87<sup>a</sup> ± 0,42</b>	<b>7,21<sup>a</sup> ± 0,22</b>	<b>6,03<sup>b</sup> ± 0,25</b>	<b>4,73<sup>c</sup> ± 0,17</b>
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>					
Ácido caftarico	12,0 ± 1,1	8,1 ± 0,3	4,3 ± 0,3	5,3 ± 0,2	5,9 ± 0,2
Ácido caféico	5,9 ± 1,1	4,4 ± 0,1	5,7 ± 0,1	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2
Ácido cutárico	8,0 ± 0,3	6,1 ± 0,2	6,8 ± 0,3	4,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2
Ácido cumárico	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,3	4,9 ± 0,1	2,4 ± 0,3	1,3 ± 0,1
<b>TOTAL</b>	<b>29,6<sup>a</sup> ± 1,4</b>	<b>22,0<sup>b</sup> ± 0,3</b>	<b>21,6<sup>b</sup> ± 0,3</b>	<b>15,7<sup>c</sup> ± 0,6</b>	<b>13,1<sup>d</sup> ± 0,2</b>
<b>Flavonoles</b>					
Quercetina 3-O-galactosido	16,8 ± 0,7	11,4 ± 0,6	12,3 ± 0,3	9,5 ± 0,9	8,8 ± 0,5
Miricetina 3-O-glucosido	13,4 ± 0,5	10,4 ± 0,8	11,1 ± 0,4	5,5 ± 0,1	6,8 ± 0,7
Quercetina 3-O-glucuronido	3,8 ± 0,4	4,6 ± 0,5	3,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	3,4 ± 0,1
Quercetina 3-O-glucosido	4,5 ± 0,1	3,1 ± 0,4	2,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1
Kaempferol 3-O-glucosido	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Miricetina	2,4 ± 0,1	7,5 ± 0,5	5,0 ± 0,1	6,3 ± 0,2	9,6 ± 0,4
Quercetina	0,8 ± 0,1	4,7 ± 0,2	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,1	6,2 ± 0,5
Kaempferol	0,2 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,1
<b>TOTAL</b>	<b>41,9<sup>ab</sup> ± 0,5</b>	<b>42,8<sup>a</sup> ± 3,1</b>	<b>39,7<sup>ab</sup> ± 0,7</b>	<b>29,4<sup>c</sup> ± 0,7</b>	<b>38,0<sup>b</sup> ± 1,1</b>

Observando los cuatro grupos de compuestos polifenólicos, la aplicación de piraclostrobin según las BPA proporciona vinos con mayor contenido polifenólico de manera significativa que los vinos tratados con boscalid acorde a las BPA, independientemente del grupo polifenólico. De manera general, e independientemente de las aplicaciones, los vinos tratados con boscalid presentan menor contenido en polifenoles que los tratados con piraclostrobin, independientemente de cuando se realice la aplicación.

En cuanto a las coordenadas CIELab (ver tabla III.11.), los vinos tratados con piraclostrobin, independientemente de las aplicaciones, presentaron tonalidades más rojizas, seguidos por los vinos procedentes de uvas tratadas con boscalid y, finalmente el testigo. Con respecto a la coordenada b\*, se puede decir que los vinos tratados con boscalid presentan menos tonos azulados que piraclostrobin y, ambos tratamientos, menos que el testigo, siendo éste el vino con mayor tonalidad azulada.

Tabla III.11. Coordenadas CIELab de los vinos estudiados en 2008

Coordenadas	a*	b*	L*
Testigo	46,50 <sup>b</sup> ± 2,40	30,20 <sup>b</sup> ± 1,05	44,58 <sup>NS</sup> ± 2,69
Piraclostrobin BPA	54,90 <sup>a</sup> ± 3,30	33,83 <sup>ab</sup> ± 3,25	39,94 <sup>NS</sup> ± 2,72
Piraclostrobin PAC	53,28 <sup>ab</sup> ± 3,24	33,49 <sup>ab</sup> ± 3,17	38,33 <sup>NS</sup> ± 1,53
Boscalid BPA	52,10 <sup>ab</sup> ± 4,30	37,99 <sup>a</sup> ± 3,09	41,91 <sup>NS</sup> ± 3,03
Boscalid PAC	50,66 <sup>ab</sup> ± 1,36	36,71 <sup>ab</sup> ± 2,12	42,87 <sup>NS</sup> ± 1,41

Por último, la coordenada L\* que corresponde con la luminosidad de los vinos indica que los vinos más oscuros corresponden a los vinos con piraclostrobin y los más claros al testigo, presentando los vinos boscalid valores intermedios, aunque dicha propiedad no parece ser significativa entre los vinos

estudiados. Los valores obtenidos para dichos vinos estuvieron cerca de los presentados en la figura III.2. para los vinos tintos jóvenes, color rojo púrpura, cuyas coordenadas medias son:  $a^* = 50$ ,  $b^* = 34$  y  $L^* = 34$ .

#### ***Influencia en las características sensoriales. Test Dúo-Trío.***

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 20/31 en el caso del vino elaborado con uvas tratadas con piraclostrobin y 16/28 para el correspondiente al tratamiento con boscalid. El número de respuestas correctas que debían darse para que las muestras difieran en un nivel de significación superior al 5% es 21 y 19 para piraclostrobin y boscalid, respectivamente. No se estimó conveniente realizar un análisis descriptivo debido a la no diferenciación encontrada en el test.

#### ***VINIFICACIÓN 2009***

#### ***Influencia sobre levaduras y bacterias. Evolución de la fermentación alcohólica y maloláctica.***

Las cepas variedad tempranillo procedentes de la parcela de Aldeanuela de Ebro fueron tratadas con Cabrio Top® y Bellis según las BPA y las PAC y Cantus® únicamente acorde las BPA. Se dejaron un número de filas sin tratar con el fin de tener un testigo de la parcela. La uva tinta variedad Tempranillo se vendimió en cajas el día 30/09/09, recogándose aproximadamente 200 kg de uva para cada tratamiento y otros 200 kg de uvas control.

La pasta procedente de la despalladora-estrujadora se encubó en depósitos de fermentación de acero inoxidable de 50 L. Se añadió anhídrido sulfuroso en una cantidad de 50 mg L<sup>-1</sup>. La elaboración se realizó por triplicado tanto para el testigo-control como para cada uno de los tratamientos. El día 01/10/2009 se inocularon levaduras de la cepa *Uvaferm*® VRB (*Saccharomyces cerevisiae*). Los depósitos fueron bazuqueados dos veces por día. Una vez terminada la fermentación alcohólica, 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 *Oenococcus oeni*.

La figura III.23. representa los resultados del contenido en azúcar (expresados en porcentaje respecto al contenido inicial) del proceso de fermentación obtenido para el vino control y para los tratamientos con piraclostrobin y boscalid.

Se observa en todos los casos una evolución similar de las fermentaciones entre los mostos de uvas tratadas con respecto al control. La fermentación finalizó entre 7- 8 días para todos los tratamientos y el control. La presencia de residuos de piraclostrobin y boscalid en el mosto, incluso a altas concentraciones, no parece tener influencia en la actividad de las levaduras fermentativas ni por tanto en la evolución de la fermentación alcohólica.

En el caso de la fermentación maloláctica, la duración fue similar para el testigo y los vinos procedentes de uvas tratadas siendo de 29 y 32 días para cabrio top y de 31 y 32 días para Bellis, según BPA y PAC, respectivamente. En el caso de cantus, la fermentación tuvo lugar en 31 días y el vino testigo finalizó en

30 días. De forma similar a la fermentación alcohólica, ni el tratamiento en campo ni la presencia de residuos de ambos fungicidas en mosto parecen interactuar con las bacterias lácticas, responsables de llevar a cabo esta fermentación.

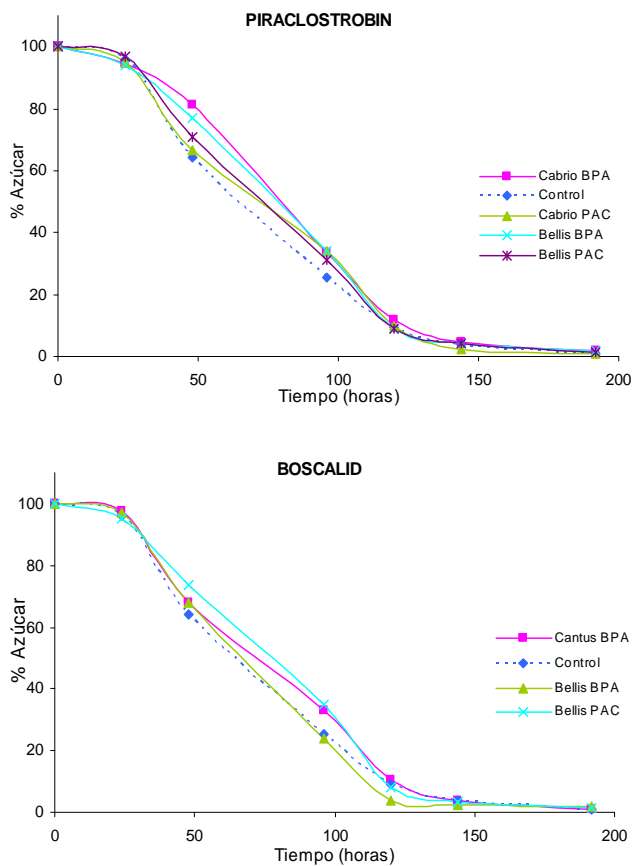


Figura III.23. Evolución de la fermentación alcohólica en 2009

### *Influencia sobre parámetros enológicos*

Los resultados obtenidos para los parámetros enológicos determinados como se explican en este capítulo para los diferentes tratamientos se muestran en la figura III.24. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



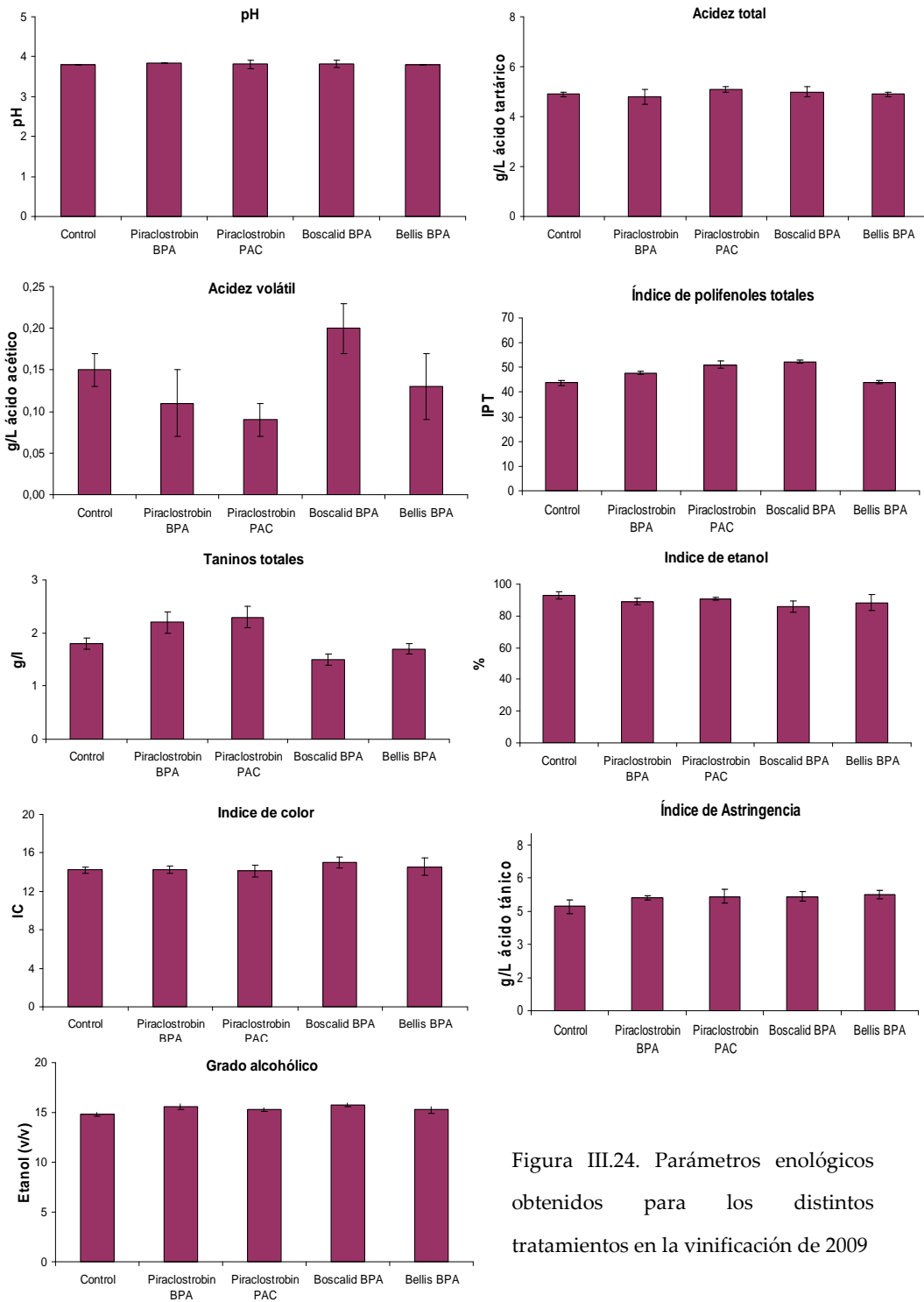


Figura III.24. Parámetros enológicos obtenidos para los distintos tratamientos en la vinificación de 2009

Como se puede observar, los parámetros pH, acidez total, índice de etanol, índice de color e índice de astringencia no presentaron diferencias significativas ni entre los diferentes tratamientos ni el vino testigo.

Grado alcohólico e IPT mostraron una tendencia similar a la vinificación del año anterior, siendo el testigo el vino que menores valores ofrece para ambos parámetros enológicos. En cuanto al comportamiento de los taninos totales, se puede decir que, al igual que ocurría en 2008, piraclostrobin ofreció el valor más alto seguido por el resto de tratamientos, siendo entre ellos no significativos. Sólo los tratamientos individuales de piraclostrobin resultaron ser diferentes al testigo.

Las concentraciones obtenidas para los compuestos polifenólicos de los vinos se muestran en la tabla III.12. En la campaña 2009, el vino control mostró una tendencia similar al vino control de 2008. Mientras que los valores de antocianos y flavanoles fueron los menores encontrados de entre todos los vinos, los obtenidos para los ácidos hidroxicinámicos y flavonoles fueron los más altos.

Sin embargo, en 2009, con respecto a los vinos que fueron tratados con algún fungicida, se observa que boscalid presenta, en este caso y contrariamente a lo ocurrido en 2008, valores superiores que piraclostrobin para los cuatro grupos de compuestos polifenólicos.

El vino procedente de cepas tratadas con la mezcla bellis, presentó un comportamiento intermedio entre el vino tratado únicamente con boscalid y el tratado con piraclostrobin para ácidos hidroxicinámicos y antocianos. Para los otros dos grupos, flavanoles y flavonoles, se obtuvieron los resultados más bajos que los tratamientos individuales.

Tabla III.12. Concentración obtenida por UPLC/MS-MS para los compuestos fenólicos en 2009

Año 2009	Concentración de compuestos polifenólicos (mg/L)			
Compuesto	Control	Cabrio Top (BPA)	Cantus (BPA)	Bellis (BPA)
<b>Antocianos</b>				
Delfinidina-3-O-glucosido	12,2 ± 3,6	13,9 ± 1,8	16,9 ± 0,2	16,4 ± 2,5
Cianidina-3-O-glucosido	1,87 ± 0,05	1,90 ± 0,14	1,96 ± 0,04	1,94 ± 0,42
Petunidina-3-O-glucosido	24,3 ± 5,2	37,1 ± 5,6	34,1 ± 0,4	38,8 ± 2,0
Peonidina-3-O-glucosido	7,56 ± 1,42	7,71 ± 1,2	8,38 ± 0,4	11,7 ± 1,9
Malvidina-3-O-glucosido	100 ± 15	113 ± 21	137 ± 2	147 ± 6
Delfinidina-3-O-(6-o-acetil)glucósido	5,31 ± 1,22	6,34 ± 0,91	8,26 ± 0,37	5,43 ± 0,33
Petunidina-3-O-6-acetilglucósido	26,2 ± 3,4	48,8 ± 7,1	40,9 ± 4,8	39,2 ± 1,7
Delfinidina-3-O- glucosido coumarato	3,16 ± 0,43	3,25 ± 0,87	4,52 ± 0,21	2,99 ± 0,84
Peonidina-3-O-6- acetilglucósido	2,21 ± 0,18	2,39 ± 0,37	2,58 ± 0,11	2,31 ± 0,75
Malvidina-3-O-6- acetilglucósido	17,8 ± 3,4	22,5 ± 1,3	28,4 ± 1,3	19,2 ± 1,9
Cianidina-3-O-6 glucosido coumarato	1,56 ± 0,05	1,55 ± 0,04	n.d	n.d
Petunidina-3-O-6 glucosido coumarato	4,97 ± 0,24	9,25 ± 0,16	5,72 ± 1,02	3,68 ± 0,57
Peonidina-3-O-6 glucosido coumarato	4,06 ± 0,53	3,76 ± 0,77	6,01 ± 0,16	3,19 ± 0,62
Malvidina-3-O-6 glucosido coumarato	21,5 ± 3,0	34,8 ± 5,6	31,6 ± 3,5	29,4 ± 1,3
<b>TOTAL</b>	<b>231<sup>b</sup> ± 46</b>	<b>303<sup>ab</sup> ± 26</b>	<b>330<sup>a</sup> ± 11</b>	<b>321<sup>a</sup> ± 25</b>
<b>Flavonoles</b>				
Ácido gálico	5,28 ± 0,22	6,10 ± 0,81	9,43 ± 1,52	4,26 ± 0,15
Catequina	0,69 ± 0,10	0,67 ± 0,11	0,99 ± 0,06	0,234 ± 0,03
<b>TOTAL</b>	<b>5,97<sup>bc</sup> ± 0,40</b>	<b>6,77<sup>b</sup> ± 0,67</b>	<b>10,42<sup>a</sup> ± 1,06</b>	<b>4,50<sup>c</sup> ± 0,18</b>
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>				
Ácido caftárico	6,18 ± 0,87	5,69 ± 0,69	4,87 ± 0,53	4,78 ± 0,81
Ácido caféico	4,67 ± 0,20	4,42 ± 0,52	3,99 ± 0,06	4,12 ± 0,37
Ácido cutárico	8,0 ± 0,3	6,1 ± 0,2	4,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2
Ácido cumárico	4,80 ± 0,78	4,89 ± 0,18	3,78 ± 0,35	3,95 ± 1,18
<b>TOTAL</b>	<b>22,9<sup>a</sup> ± 2,6</b>	<b>18,2<sup>b</sup> ± 1,0</b>	<b>22,0<sup>ab</sup> ± 1,4</b>	<b>20,1<sup>ab</sup> ± 1,5</b>
<b>Flavonoles</b>				
Quercetina 3-O-galactosido	4,18 ± 0,16	4,40 ± 0,61	4,35 ± 0,18	4,79 ± 0,43
Miricetina 3-O-glucosido	7,58 ± 0,39	8,61 ± 0,34	7,80 ± 1,24	5,51 ± 0,43
Quercetina 3-O-glucuronido	1,75 ± 0,26	1,35 ± 0,11	1,69 ± 0,12	1,64 ± 0,35
Quercetina 3-O-glucosido	2,22 ± 0,17	1,35 ± 0,14	2,26 ± 0,2	1,58 ± 0,23
Kaempferol 3-O-glucosido	n.d	n.d	n.d	n.d
Miricetina	2,08 ± 0,13	1,39 ± 0,02	2,48 ± 0,43	2,73 ± 0,09
Quercetina	1,13 ± 0,07	0,56 ± 0,07	1,44 ± 0,12	0,21 ± 0,03
Kaempferol	0,23 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,212 ± 0,03	0,13 ± 0,01
<b>TOTAL</b>	<b>19,2<sup>a</sup> ± 1,6</b>	<b>17,8<sup>ab</sup> ± 0,9</b>	<b>20,2<sup>a</sup> ± 0,6</b>	<b>16,1<sup>b</sup> ± 0,3</b>

En cuanto a las coordenadas CIElab (ver tabla III.13.), se observa que los vinos elaborados con uvas tratadas presentaron tonos más rojos y una mayor claridad. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas para la coordenada  $b^*$ . La mezcla de ambos plaguicidas, es decir, los vinos tratados con bellis, presentan valores intermedios entre los tratamientos individuales para las tres coordenadas

Tabla III.13. Coordenadas CIElab de los vinos estudiados en 2009

Coordenadas	$a^*$	$b^*$	$L^*$
Testigo	36,05 <sup>b</sup> ± 2,42	32,45 <sup>NS</sup> ± 2,06	43,45 <sup>b</sup> ± 5,36
Piraclostrobin BPA	45,05 <sup>a</sup> ± 4,01	36,84 <sup>NS</sup> ± 4,58	60,60 <sup>a</sup> ± 1,40
Boscalid BPA	37,74 <sup>ab</sup> ± 4,03	30,44 <sup>NS</sup> ± 1,94	56,13 <sup>a</sup> ± 4,76
Bellis	40,08 <sup>ab</sup> ± 1,06	30,91 <sup>NS</sup> ± 2,10	58,40 <sup>a</sup> ± 5,40

### ***Influencia en las características sensoriales. Test Dúo-Trío***

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 8/17 en el caso del vino elaborado con uvas tratadas con piraclostrobin y 7/17 para el correspondiente al tratamiento con boscalid. El número de respuestas correctas que debían darse para que las muestras difieran en un nivel de significación superior al 5% es 10 para ambos tratamientos. No se estimó conveniente realizar un análisis descriptivo debido a la poca diferenciación encontrada en el test.

## VINIFICACIÓN 2010

### *Influencia sobre levaduras y bacterias. Evolución de la fermentación alcohólica y maloláctica.*

Las cepas variedad tempranillo procedentes de la parcela de Aldeanueva de Ebro fueron tratadas con Cabrio Top® y Cantus® acorde las buenas prácticas agrícolas y Bellis® según BPA y PAC. Se dejaron un número de filas sin tratar con el fin de tener un testigo de la parcela. La uva tinta variedad Tempranillo se vendimió en cajas el día 04/10/10, recogándose aproximadamente 200 kg de uva para el tratamiento y otros 200 kg sin tratamiento alguno para el vino control.

La pasta procedente de la despalladora-estrujadora se encubó en depósitos de fermentación de acero inoxidable de 50 L. Se añadió anhídrido sulfuroso en una cantidad de 50 mg L<sup>-1</sup>. La elaboración se realizó por duplicado tanto para el testigo-control como para cada uno de los tratamientos. El día 05/10/2010 se inocularon levaduras de la cepa *Uvaferm*® VRB (*Saccharomyces cerevisiae*). Los depósitos fueron bazuqueados dos veces por día. Una vez terminada la fermentación alcohólica, 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 *Oenococcus oeni*.

La figura III.25. representa los resultados del contenido en azúcar (expresados en porcentaje respecto al contenido inicial) del proceso de fermentación obtenidos para los tratamientos con piraclostrobin y boscalid.

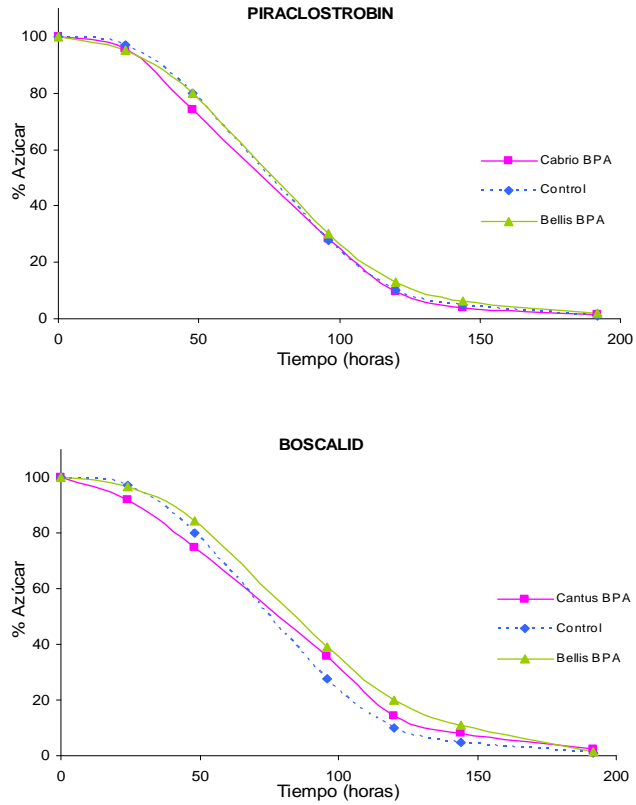


Figura III.25. Evolución de la fermentación alcohólica 2010

Se observa en todos los casos una evolución similar de las fermentaciones entre los mostos de uvas tratadas con respecto al control. La fermentación finalizó en aproximadamente 8 días para todos los tratamientos y el control. La presencia de residuos de piraclostrobin y boscalid en el mosto, incluso a altas concentraciones, no parecieron tener influencia en la actividad de las levaduras fermentativas ni por tanto en la evolución de la fermentación alcohólica.

En el caso de la fermentación maloláctica, la duración fue similar para el testigo y los vinos procedentes de uvas tratadas siendo de 36 días para el testigo, 34 para Cabrio Top (piraclostrobin), 37 para Cantus (boscalid) y 36 para bellis (mezcla) en ambas aplicaciones. De forma similar a la fermentación alcohólica, ni el tratamiento en campo ni la presencia de residuos de ambos fungicidas en mosto parecen interactuar con las bacterias lácticas, responsables de llevar a cabo esta fermentación.

### ***Influencia sobre parámetros enológicos***

Los resultados obtenidos para los parámetros enológicos determinados como se explican en este capítulo para los diferentes tratamientos se muestran en la figura III.26. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los parámetros de pH, acidez total, índice de color e índice de astringencia no mostraron diferencias significativas entre tratamientos y testigo. Sin embargo, para IPT y grado alcohólico el testigo ofreció valores más bajos que el resto de tratamientos. Por el contrario, se obtuvieron las mayores concentraciones para éste en cuanto a taninos totales (similar a la mezcla de fungicidas) y acidez volátil (similar a piraclostrobin).

Los compuestos polifenólicos resumidos en la tabla III.14 mostraron comportamientos muy similares a los años anteriores, sobre todo con respecto a la campaña de 2008. Los resultados obtenidos para el vino testigo sigue la tendencia vista para los dos años anteriores: los valores para antocianos y flavanoles son más altos que para los vinos tratados con fungicidas, independientemente de tratamiento y aplicación. Por el contrario, y siguiendo con el comportamiento similar de este vino, los resultados obtenidos para la concentración de ácidos

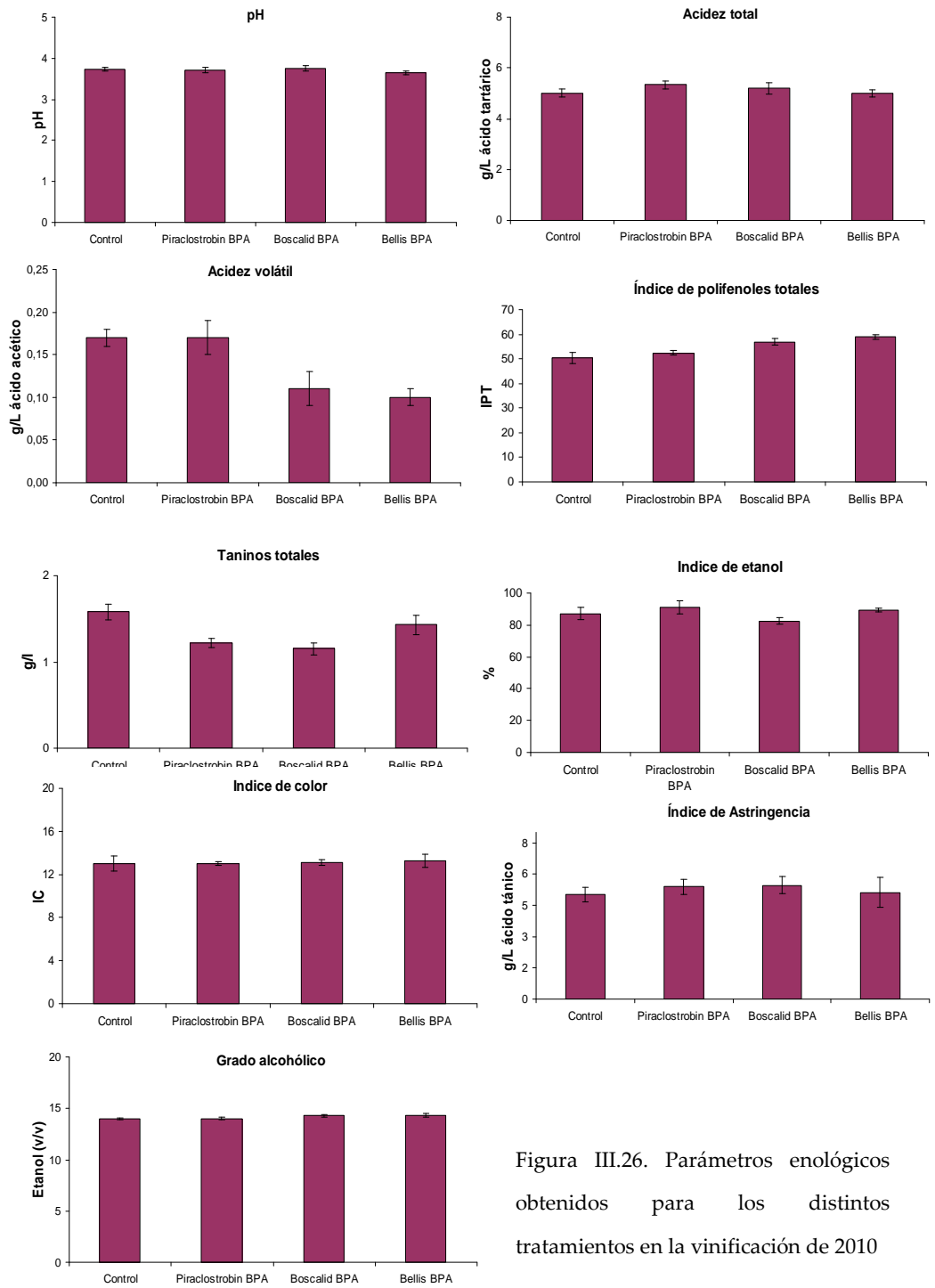


Figura III.26. Parámetros enológicos obtenidos para los distintos tratamientos en la vinificación de 2010



Tabla III.14. Concentración obtenida por UPLC/MS-MS para los compuestos fenólicos en 2010

Año 2010	Concentración de compuestos polifenólicos (mg L <sup>-1</sup> )			
Compuesto	Control	Cabrio Top (BPA)	Cantus (BPA)	Bellis (BPA)
<b>Antocianos</b>				
Delfinidina-3-O-glucosido	29,2 ± 2,5	43,4 ± 1,9	31,6 ± 2,9	36,1 ± 2,6
Cianidina-3-O-glucosido	1,78 ± 0,10	2,20 ± 0,34	2,14 ± 0,34	1,46 ± 0,26
Petunidina-3-O-glucosido	32,5 ± 0,8	52,8 ± 4,0	41,0 ± 1,4	47,2 ± 5,9
Peonidina-3-O-glucosido	11,7 ± 2,1	11,3 ± 1,9	8,69 ± 1,4	13,0 ± 2,4
Malvidina-3-O-glucosido	94,6 ± 1,2	153 ± 22	149 ± 19	159 ± 14
Delfinidina-3-O(6-o-acetil)glucósido	12,2 ± 2,6	17,8 ± 2,3	15,3 ± 1,62	14,2 ± 1,8
Petunidina-3-O-6-acetilglucósido	35,1 ± 2,7	48,9 ± 11,8	40,0 ± 6,2	49,9 ± 5,2
Delfinidina-3-O- glucosido coumarato	5,55 ± 1,03	6,52 ± 1,24	5,66 ± 0,88	8,55 ± 0,70
Peonidina-3-O-6- acetilglucósido	4,01 ± 0,45	3,39 ± 1,26	3,11 ± 0,02	6,01 ± 1,37
Malvidina-3-O-6- acetilglucósido	15,6 ± 1,8	26,9 ± 3,9	22,2 ± 3,6	24,4 ± 4,8
Cianidina-3-O-6 glucosido coumarato	3,04 ± 0,89	6,10 ± 0,78	4,07 ± 3,56	5,47 ± 1,22
Petunidina-3-O-6 glucosido coumarato	8,50 ± 0,57	11,1 ± 1,7	11,3 ± 1,18	9,71 ± 2,14
Peonidina-3-O-6 glucosido coumarato	4,97 ± 0,59	6,71 ± 0,46	6,67 ± 1,04	6,09 ± 0,42
Malvidina-3-O-6 glucosido coumarato	24,0 ± 2,7	27,0 ± 3,3	27,6 ± 2,7	36,0 ± 2,7
<b>TOTAL</b>	<b>283<sup>c</sup> ± 16</b>	<b>417<sup>a</sup> ± 19</b>	<b>369<sup>b</sup> ± 21</b>	<b>418<sup>a</sup> ± 4</b>
<b>Flavonoles</b>				
Ácido gálico	5,42 ± 0,42	9,61 ± 1,03	7,14 ± 1,72	4,86 ± 0,99
Catequina	1,66 ± 0,28	6,03 ± 0,23	1,94 ± 0,86	2,69 ± 0,78
<b>TOTAL</b>	<b>7,08<sup>c</sup> ± 0,71</b>	<b>15,6<sup>a</sup> ± 0,80</b>	<b>9,07<sup>b</sup> ± 0,85</b>	<b>7,56<sup>bc</sup> ± 0,20</b>
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>				
Ácido caftárico	8,59 ± 0,93	5,60 ± 0,61	7,23 ± 1,02	6,41 ± 0,54
Ácido caféico	0,87 ± 0,03	0,58 ± 0,15	0,52 ± 0,08	0,90 ± 0,02
Ácido cutárico	6,69 ± 01,3	4,86 ± 1,03	7,52 ± 1,30	5,08 ± 0,40
Ácido cumárico	5,64 ± 0,52	4,53 ± 0,19	3,51 ± 0,33	4,45 ± 0,64
<b>TOTAL</b>	<b>21,8<sup>a</sup> ± 0,2</b>	<b>15,6<sup>c</sup> ± 0,77</b>	<b>18,9<sup>b</sup> ± 0,75</b>	<b>16,8<sup>c</sup> ± 0,79</b>
<b>Flavonoles</b>				
Quercetina 3-O-galactosido	4,82 ± 0,32	7,53 ± 0,71	5,07 ± 0,08	6,70 ± 1,26
Miricetina 3-O-glucosido	7,55 ± 0,12	5,97 ± 0,68	6,34 ± 0,28	4,69 ± 0,73
Quercetina 3-O-glucuronido	3,39 ± 0,65	3,75 ± 0,51	4,34 ± 0,09	4,45 ± 0,63
Quercetina 3-O-glucosido	1,84 ± 0,12	1,31 ± 0,07	1,68 ± 0,23	0,98 ± 0,15
Kaempferol 3-O-glucosido	n.d	n.d	n.d	n.d
Miricetina	6,67 ± 0,51	6,55 ± 0,62	4,57 ± 0,11	5,16 ± 0,11
Quercetina	0,94 ± 0,04	0,82 ± 0,02	0,72 ± 0,03	0,77 ± 0,04
Kaempferol	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>TOTAL</b>	<b>25,2<sup>a</sup> ± 0,4</b>	<b>25,9<sup>a</sup> ± 1,6</b>	<b>22,7<sup>b</sup> ± 0,8</b>	<b>22,7<sup>b</sup> ± 0,2</b>

hidroxicinámicos y flavonoles fue la mayor de todos los vinos estudiados (éstos últimos de manera similar a piraclostrobin).

Comparando entre tratamientos, piraclostrobin ofreció valores más altos para todos los compuestos excepto para los ácidos hidroxicinámicos. La mezcla de ambos fungicidas presenta valores muy bajos para todos los grupos polifenólicos, excepto para antocianos.

En cuanto a las coordenadas CIElab (ver tabla III.15.), se observa que los vinos testigo, elaborados con uvas sin tratar presentan mayor valor para la coordenada a\* aunque su valor no difieren significativamente respecto a los tratamientos por lo que no se puede decir que sean más rojos. Además, los vinos elaborados con uvas tratadas son más azulados y más claros. Observando los vinos tratados con los fungicidas objeto de estudio, piraclostrobin ofrece los vinos menos azulados y más oscuros, mientras que boscalid y la mezcla de ambos presentan vinos similares, más azulados y con una mayor claridad, siendo ésta última significativamente similar al testigo.

Tabla III.15. Coordenadas CIElab de los vinos estudiados en 2010

Coordenadas	a*	b*	L*
Testigo	42,16 <sup>NS</sup> ± 2,76	38,34 <sup>a</sup> ± 3,04	37,66 <sup>b</sup> ± 1,81
Piraclostrobin BPA	37,14 <sup>NS</sup> ± 2,09	35,67 <sup>ab</sup> ± 2,02	44,41 <sup>ab</sup> ± 1,87
Boscalid BPA	40,33 <sup>NS</sup> ± 1,89	31,23 <sup>b</sup> ± 2,84	46,26 <sup>a</sup> ± 2,96
Bellis	39,15 <sup>NS</sup> ± 2,96	30,54 <sup>b</sup> ± 2,47	46,08 <sup>a</sup> ± 4,40

### ***Influencia en las características sensoriales. Test Dúo-Trío***

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 14/25 en el caso del vino elaborado con uvas tratadas con piraclostrobin (aplicación con Cabrio Top®) y 15/25 para el correspondiente al tratamiento con boscalid (aplicación con Cantus®). El número de respuestas correctas que debían darse para que las muestras difieran en un nivel de significación superior al 5% es 18 para ambos tratamientos. No se estimó conveniente realizar un análisis descriptivo debido a la poca diferenciación encontrada en el test.

### **III.4.6. INFLUENCIA EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VINOS**

La Figura III.27 muestra la proyección de los vinos y las variables (composición química analizada en los vinos) sobre las dos primeras dimensiones obtenidas del Análisis de Componentes Principales (PCA), las cuales acumulan más del 59% de la varianza original. Esta gráfica puede ser utilizada para mostrar una idea de los efectos que los distintos tratamientos estudiados han tenido sobre la composición química de los vinos.

La componente 1 fue caracterizada positivamente por la acidez volátil (correlación 0,86) y negativamente por antocianos (-0,72), flavonoles (-0,93), taninos totales (-0,78) y acidez total (-0,83).

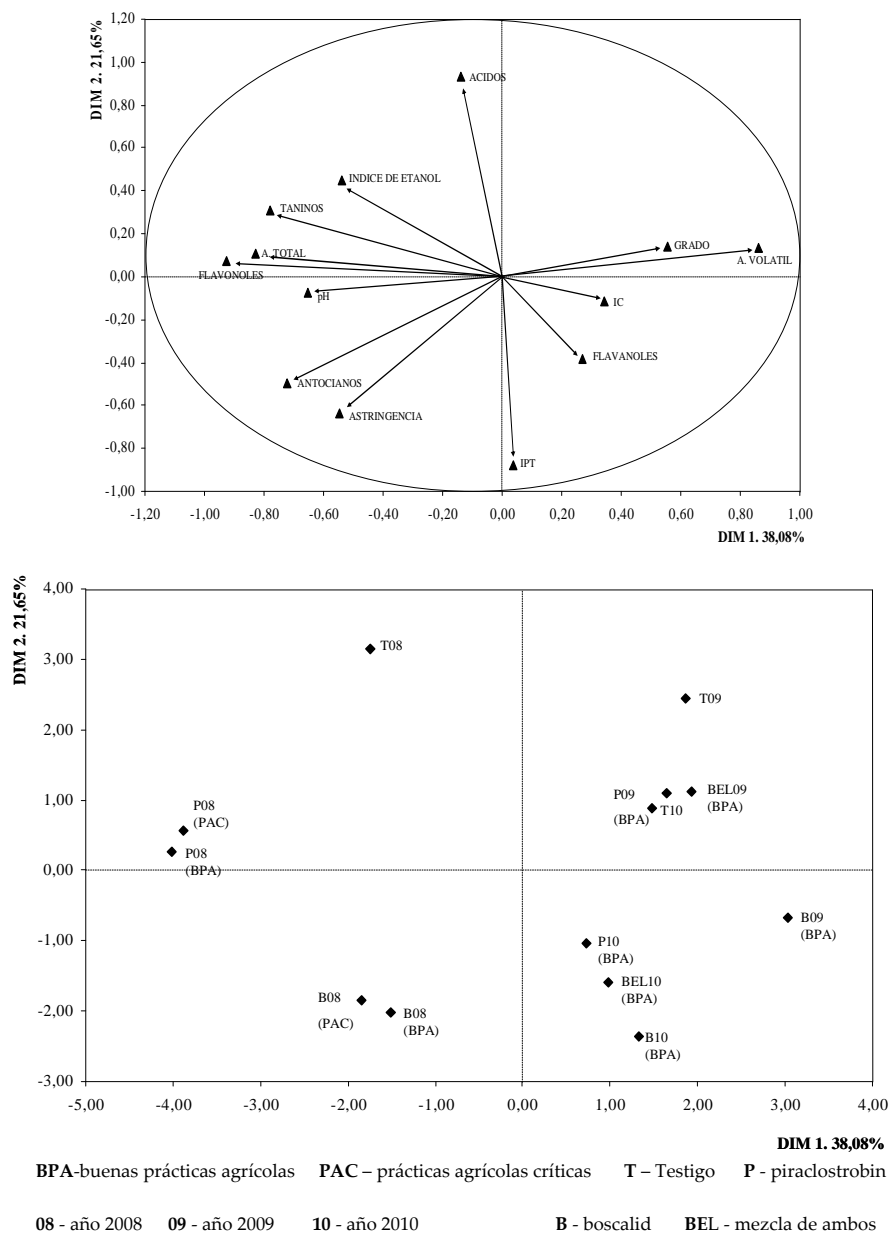


Figura III. 27. Análisis de componentes principales

En el caso de la componente 2, se caracterizó positivamente por la concentración de ácidos hidroxicinámicos mostrando una correlación entre el factor y dicha variable de 0,93 y negativamente por la variable IPT con una correlación de -0,88. La proyección de los vinos en el mapa de estas dos primeras componentes muestra que los vinos correspondientes al año 2008 se sitúan a la izquierda del plano y los de los años 2009 y 2010 a la derecha, indicando que estos vinos son muy diferentes en las variables que definen la componente 1. Además, en las tres campañas estudiadas, la componente 2 separa los vinos control de los vinos tratados, de tal forma que los vinos control tienen mayor contenido en ácidos hidroxicinámicos, menor IPT, y menor cantidad de antocianos.

Los vinos elaborados con uvas tratadas con boscalid, independientemente de las aplicaciones realizadas, bajo BPA o PAC, aparecen situados a la derecha del gráfico y más abajo que los vinos elaborados con uvas tratadas con piraclostrobin o la mezcla de ambos, teniendo estos vino mayor contenido en polifenoles totales. Los vinos elaborados con bellis (mezcla de piraclostrobin y boscalid) parecen presentar valores intermedios entre los tratamientos individuales.

El año 2008 es el único de los tres en el que se evaluó la influencia de los vinos elaborados bajo PAC. Se observa que, a pesar de ser diferentes aplicaciones y vinificaciones totalmente independientes, los vinos elaborados con el mismo fungicida dieron lugar a vinos finales con características muy similares, estando situados en el gráfico los vinos con aplicación bajo BPA al lado de los vinos con aplicación bajo PAC.

**DEGRADACIÓN DE PIRACLOSTROBIN Y  
BOSCALID: HIDRÓLISIS, FOTÓLISIS Y  
FOTOCATÁLISIS**

---



Las principales vías de degradación de plaguicidas incluyen fotólisis, hidrólisis y procesos de oxidación/reducción. La degradación fotoquímica es uno de los principales procesos de transformación y uno de los factores que controla el destino de pesticidas y otras sustancias químicas en el medioambiente. En la superficie de sistemas acuáticos, las reacciones de hidrólisis y fotólisis contribuyen de forma significativa en la conversión y degradación de plaguicidas. Es por ello interesante conocer en qué grado se degradan por cada proceso y cuáles son los productos de degradación o metabolitos generados.

Varios pesticidas absorben la luz solar ( $\lambda > 295$  nm) y pueden ser degradados bajo reacciones de fotólisis directa, conduciendo a la formación de varios productos. Procesos de degradación con luz natural son comparados normalmente con estudios realizados utilizando una lámpara de arco de xenón. Estos estudios en laboratorio permiten conocer el comportamiento de los pesticidas después de su aplicación en el medioambiente, con el fin de obtener información de su cinética de degradación, tiempo de vida media y productos de degradación que pudieran ser formados bajo la luz natural.

En la actualidad existen varios métodos para la eliminación de restos de pesticidas presentes en agua como son la degradación microbiana o térmica. Aunque estos métodos están disponibles para degradar pesticidas, presentan algunas limitaciones como coste o tiempo que consumen. Durante los últimos años, los trabajos se han focalizado en el proceso fotocatalítico usando  $\text{TiO}_2$  como catalizador. Dicho catalizador promueve la formación de radicales hidroxilo, los cuales son capaces de atacar y destruir moléculas orgánicas como son los pesticidas.



### **III.5.1. HIDRÓLISIS Y FOTÓLISIS: ESTUDIOS**

#### *Hidrólisis*

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon en medio acuoso y por triplicado 40 mL de disoluciones tampón con valores de pH 3,6, 6,2, 9,2 y 12,0 y concentraciones de fungicida aproximadas a 1 mg L<sup>-1</sup> y 3,4 mg L<sup>-1</sup> respectivamente para piraclostrobin y boscalid, manteniéndose en oscuridad (botes opacos ámbar) a tres temperaturas distintas (4 °C, 25 °C y 50 °C) para comprobar el efecto del pH y la temperatura en el proceso de hidrólisis. La concentración inicial se determinó por HPLC-DAD mediante una calibración con patrones de fungicida de concentración conocida. Posteriormente, se analizaron de cada ensayo muestras de 0,5 mL de volumen tomadas en los días 5, 10, 15, 30 y 60 siendo cuantificadas inmediatamente por HPLC-DAD, sin necesidad de concentrar. Los experimentos fueron llevados a cabo por separado para cada fungicida.

#### *Fotólisis*

Para el estudio de degradación fotolítica se utilizó una unidad de simulación solar Oriol equipada con una lámpara de arco de xenón a 150 W. La celda de cuarzo de 25 mL de capacidad se colocó a 5 cm de la fuente de radiación. Un volumen de 25 mL de diferentes disoluciones tampón (pH 3,6, 6,2 and 12,0) y concentraciones de ambos fungicidas se colocaron en la celda y se irradiaron con la lámpara de Xe. Los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente y en total ausencia de luz. Las concentraciones iniciales de piraclostrobin y boscalid en las disoluciones acuosas utilizadas para el estudio fueron de aproximadamente

1,0 y 3,4 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, condicionada dicha concentración a la solubilidad de ambos fungicidas en agua.

A intervalos específicos de tiempo fueron extrayéndose diferentes alícuotas de 0,5 mL de la celda, determinando la concentración de fungicida por inyección directa en HPLC-DAD. Las alícuotas se tomaron hasta que la concentración del fungicida disminuyó en aproximadamente un 90% respecto a la concentración inicial. Se tuvo en cuenta que la disminución del volumen de la celda después de sacar las alícuotas durante los experimentos no fuera superior al 20% del volumen inicial para evitar que el proceso se viera afectado.

#### *Parámetros cinéticos*

Para evaluar la velocidad de degradación de los fungicidas piraclostrobin y boscalid en los procesos de hidrólisis y fotólisis, los datos experimentales se ajustaron al siguiente modelo:

$$\ln C_t = \ln C_0 - Kt$$

donde  $C_t$  es la concentración de fungicida en el tiempo  $t$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $C_0$  es la concentración inicial obtenida en el tiempo  $t = 0$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $K$  es la constante de disipación del fungicida y  $t$  es el tiempo en días de degradación.

Usando dicho ajuste se obtuvieron la constante de degradación  $k$  para ambos procesos (pendiente del ajuste) y los tiempos de vida media, calculados mediante la expresión  $t_{1/2} = \ln 2/k$ . En el caso de la hidrólisis, los parámetros cinéticos fueron determinados únicamente en los casos que mostraron degradación del fungicida por esta vía.

### *Identificación de los productos de degradación o metabolitos*

En los experimentos de hidrólisis que mostraron degradación, las muestras fueron directamente analizadas por HPLC-MS para la identificación de los productos de degradación, sin necesidad de concentrar la muestra.

Sin embargo, en el proceso de fotólisis se llevo a cabo una preconcentración de la muestra antes de analizarla por UPLC-MS en el caso de piraclostrobin o de HPLC-MS para boscalid con el fin de detectar los metabolitos generados, los cuales se encuentran en bajas concentraciones. Así, muestras de 25 mL fueron irradiadas a diferentes tiempos establecidos (a cada muestra le corresponde un tiempo de irradiación) en función de la duración de la degradación de cada fungicida a los diferentes pHs. Esta duración es conocida gracias al estudio de fotólisis realizado anteriormente. Las disoluciones degradadas (25 mL cada una) se evaporaron a sequedad en rotavapor y los residuos se redisolviaron en 1 mL de metanol, concentrando así los productos de degradación 25 veces.

## **III.5.2. HIDRÓLISIS Y FOTÓLISIS: RESULTADOS**

### **III.5.2.1. Piraclostrobin**

#### *Hidrólisis*

La degradación de piraclostrobin en disolución acuosa y en ausencia de luz se monitorizó a diferentes pHs y temperaturas durante 60 días. Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en la tabla III. 16. y en el *Anexo VII*. Se observaron variaciones significativas en la degradación respecto a ambos parámetros estudiados. Los resultados indican que piraclostrobin no tiene buena

estabilidad química en disolución acuosa y que el proceso hidrolítico juega un papel importante en la desaparición de este fungicida en el medio acuoso.

Tabla III.16 . Concentración (mg L<sup>-1</sup>) de piraclostrobin en el proceso de hidrólisis a 4 ± 2 °C, 25 ± 2 °C y 50 ± 2 °C en disolución acuosa a distintos pHs.

Piraclostrobin (mg L <sup>-1</sup> )												
Días	4°C ± 2°C				25°C ± 2°C				50°C ± 2°C			
	pH 3,6	pH 6,2	pH 9,2	pH 12,0	pH 3,6	pH 6,2	pH 9,2	pH 12,0	pH 3,6	pH 6,2	pH 9,2	pH 12,0
0	0,95	0,98	0,99	0,92	0,95	0,98	0,99	0,92	0,95	0,98	0,99	0,92
5	0,89	0,94	0,95	0,71	0,91	0,89	0,92	nd	0,93	0,52	0,47	nd
10	0,94	0,93	0,93	0,33	0,96	0,87	0,93	nd	0,95	0,20	0,19	nd
15	0,93	0,95	0,93	0,15	0,96	0,90	0,95	nd	0,93	0,08	0,07	nd
30	0,92	0,93	0,88	nd	0,93	0,92	0,89	nd	0,91	nd	nd	nd
60	0,92	0,93	0,89	nd	0,92	0,88	0,85	nd	0,91	nd	nd	nd

ND: < LD (0,05 mg L<sup>-1</sup>)

A pH 12, el compuesto desaparece en todos los casos, independientemente de la temperatura, lo cual indica que a pH fuertemente básico la hidrólisis se ve favorecida. A temperaturas elevadas, el valor más alto estudiado, 50°C, muestra un proceso de hidrólisis más acentuado incluso a pH neutro. Sin embargo, a pH ácido no se observan diferencias significativas entre la concentración inicial y la obtenida después de 60 días de experimento en ninguna de las temperaturas estudiadas.

Todas las condiciones que presentaron degradación hidrolítica mostraron un ajuste lineal con coeficientes de determinación entre 0,959 y 0,996. La constante de degradación aumentó con el pH y la temperatura. Los tiempos de vida media obtenidos variaron de 5776 a 7701 min en las disoluciones tampón a diferentes pHs. Cuando ambos parámetros, temperatura y pH fueron altos (50 °C and pH 12)

el proceso hidrolítico causa una degradación de más del 99% de piraclostrobin en menos de 5 días.

En cuanto al estudio de productos de degradación en la hidrólisis, se encontró un único metabolito de  $m/z = 195$  (M+1) clorado, siendo el mismo en todos los casos independientemente de las condiciones de pH y temperatura. El compuesto se obtiene de la ruptura del enlace O-C del grupo éter, rompiendo la molécula de piraclostrobin por la mitad como se puede observar en la figura III.28. Los cromatogramas de piraclostrobin y el subproducto obtenido y sus espectros pueden verse en el *Anexo VII*.

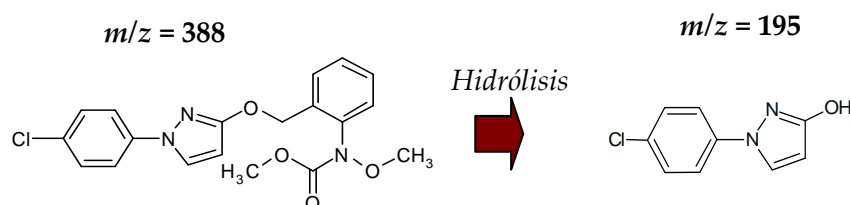


Figura III. 28. Ruta hidrolítica de piraclostrobin

#### *Fotólisis*

Los resultados obtenidos mostraron un 90% de degradación a pH ácido (pH=3,6), neutro (pH=6,2) y básico (pH=12) después de 5 h, 4 h y 3,5 h de irradiación, respectivamente. El estudio cinético del fungicida se llevó a cabo bajo condiciones de fotólisis, siguiendo todas las cinéticas un modelo de degradación de primer orden independientemente del pH. Los coeficientes de determinación en los tres casos (a pH ácido, neutro y básico) fueron superiores a 0,99. Los valores obtenidos para los tiempos de vida media se encontraron entre 74 (a pH básico) y

94 min (a pH ácido). Estos valores indican que la velocidad de degradación disminuye conforme baja el pH. Los valores altos de pH (medio básico) favorecen la degradación fotolítica del compuesto.

Una vez identificados los subproductos de degradación de la manera explicada en el apartado anterior, se propuso una ruta degradativa fotolítica para piraclostrobin basada en las estructuras encontradas. Dicha ruta se muestra en la figura III.29 A). Como se puede observar, tuvieron lugar dos procesos diferentes de forma simultánea:

- i) El compuesto 2 se obtuvo debido al proceso de hidrólisis que tiene lugar al mismo tiempo que la fotólisis. Esto implica que el proceso hidrolítico de piraclostrobin juega un importante papel durante el proceso de fotólisis. En la figura III.29 B). Se puede observar que la concentración de esta sustancia aumenta ligeramente después de 3 h de degradación, disminuyendo posteriormente.
- ii) El resto de fotoproductos se obtuvieron a través de la fotólisis de piraclostrobin. La etapa inicial implica la pérdida de cloro y posterior ataque al anillo de un grupo hidróxido dando lugar a dos isómeros (compuestos 3 y 4) en función de la posición en la que se coloque éste último. Ambos productos alcanzan su máxima concentración una hora después de comenzar el experimento para continuar disminuyendo lentamente hasta la finalización del estudio.
- iii) La posterior ruptura del enlace entre el grupo 4-hidroxifenilo y el pirazol (enlace N-C) condujo a la formación del compuesto 5, el cual alcanzó su

concentración máxima en aproximadamente 1,5 horas de comenzado el experimento, como puede verse en la figura III.29 B).

Los resultados obtenidos en este estudio fueron comparados con otros trabajos relacionados con la degradación de estrobilurinas. En ellos, la hidrólisis de azoxistrobin [Boudina *et al.*; 2007] y trifloxistrobin [Jingyu Chen *et al.*; 2008] mostraron mediante el proceso de hidrólisis la ruptura del enlace éter, la misma que se da en el caso de piraclostrobin, dando lugar a un compuesto similar al compuesto 2.

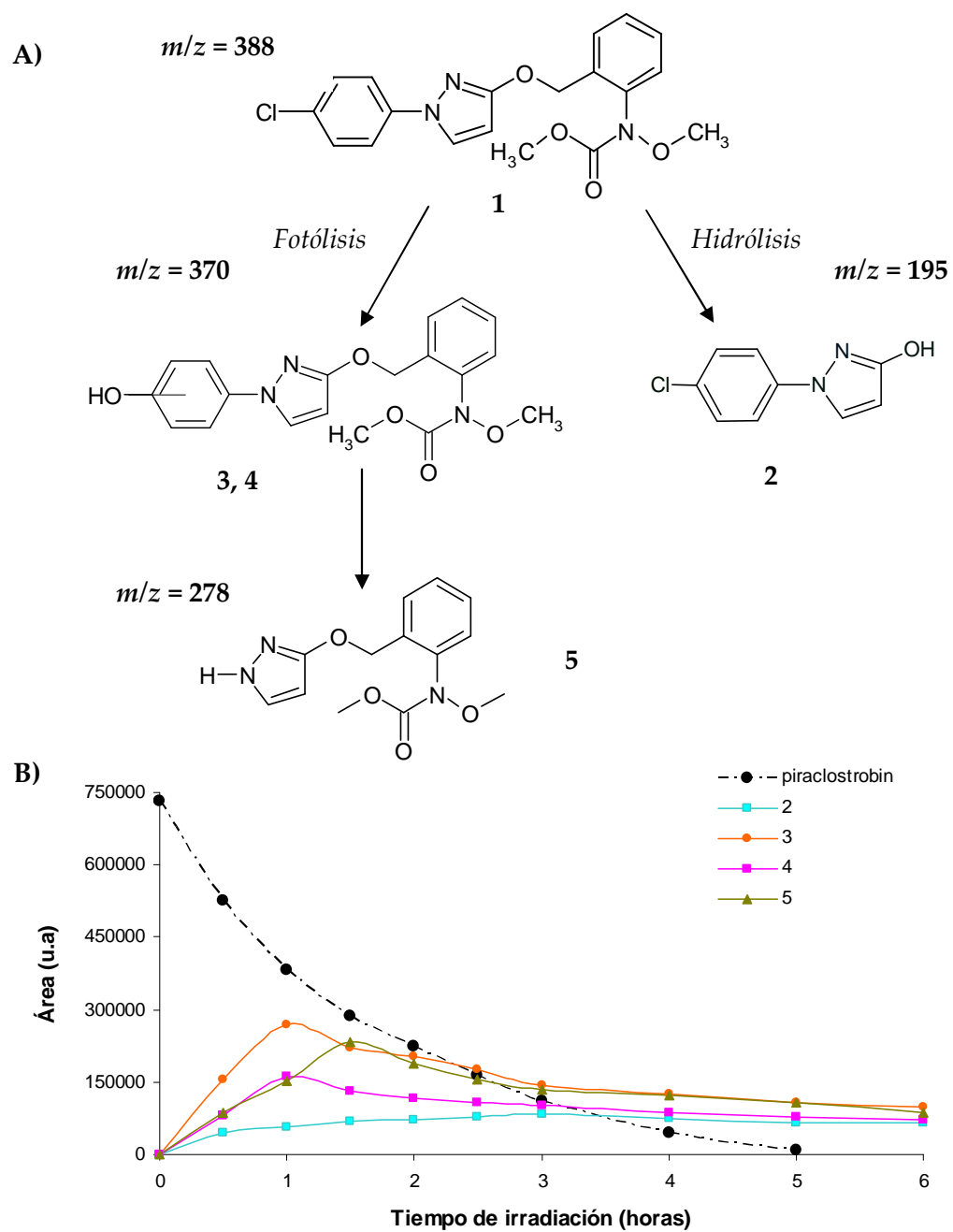


Figura III.29. (A) Ruta degradativa de piraclostrobin. (B) Evolución de los productos de degradación durante la fotólisis.



### III.5.2.2. Boscalid

#### *Hidrólisis*

La degradación de boscalid en disolución acuosa y en ausencia de luz se monitorizó a diferentes pHs y temperaturas durante 60 días. Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en la tabla III. 6. Boscalid, al contrario que piraclostrobin, no presenta variaciones significativas en la concentración a lo largo de los días de estudio, independientemente del pH o la temperatura.

Tabla III.17. Concentración (mg L<sup>-1</sup>) de boscalid en el proceso de hidrólisis a 4 ± 2 °C, 25 ± 2 °C y 50 ± 2 °C en disolución acuosa a distintos pHs

Boscalid (mg L <sup>-1</sup> )												
Días	4 ± 2°C				25 ± 2°C				50 ± 2°C			
	pH 3,6	pH 6,2	pH 9,2	pH 12,0	pH 3,6	pH 6,2	pH 9,2	pH 12,0	pH 3,6	pH 6,2	pH 9,2	pH 12,0
0	3,61	3,57	3,55	3,62	3,61	3,57	3,55	3,62	3,61	3,57	3,55	3,62
5	3,60	3,61	3,53	3,63	3,64	3,63	3,60	3,65	3,65	3,66	3,66	3,52
10	3,64	3,58	3,56	3,63	3,66	3,61	3,64	3,63	3,66	3,63	3,65	3,63
15	3,64	3,56	3,55	3,62	3,57	3,60	3,62	3,61	3,57	3,58	3,60	3,62
30	3,58	3,58	3,51	3,63	3,61	3,57	3,61	3,54	3,55	3,58	3,52	3,54
60	3,59	3,60	3,49	3,60	3,63	3,48	3,51	3,49	3,57	3,51	3,46	3,51

#### *Fotólisis*

Los resultados obtenidos mostraron un 95% de degradación a pH ácido, neutro y básico después de 21 h, 12 h y 8,5 h de irradiación, respectivamente. Estos valores indican que la degradación fotolítica está favorecida a valores de pH más básicos.

Las cinéticas estudiadas siguieron un modelo de degradación de primer orden independientemente del pH. Los coeficientes de determinación en los tres casos (a un pH ácido de 3,6, pH neutro de 6,2 y a un pH básico de 12,0) fueron superiores a 0,988. Los valores obtenidos para los tiempos de vida media oscilaron entre 151 y 330 min. La velocidad de degradación disminuyó con la disminución del pH, obteniendo una degradación fotolítica más rápida a pH alcalino y por tanto, con una constante cinética mayor [*Anexo VIII*].

Se identificaron seis productos de degradación principales. El tiempo de retención de estos productos, cromatogramas, pesos moleculares y estructuras se muestran en el *Anexo VIII*. Basada en estas moléculas, se estableció una ruta de degradación fotolítica para boscalid, consistente en varios pasos propuestos en la figura III.30. Como se puede observar, los fotoproductos se formaron a través de tres vías distintas:

- i.) En primer lugar, la molécula de boscalid es atacada por radicales hidroxilo ( $\text{OH}\bullet$ ) en los anillos bencénicos que presenta la molécula obteniendo dos productos monohidroxilados (2 y 3) los cuales alcanzan sus máximos de concentración aproximadamente 4h después de comenzar la irradiación como se puede ver en la figura III.31.
- ii.) El segundo grupo de productos se obtuvo a partir de los subproductos anteriores con pérdida de un átomo de cloro conduciendo a los productos 4 y 5, los cuales alcanzaron su máximo a las 6 horas de irradiación. Como no es posible determinar cuál es el átomo de cloro que se pierde, en la figura III.30. se muestran los cuatro isómeros posibles.

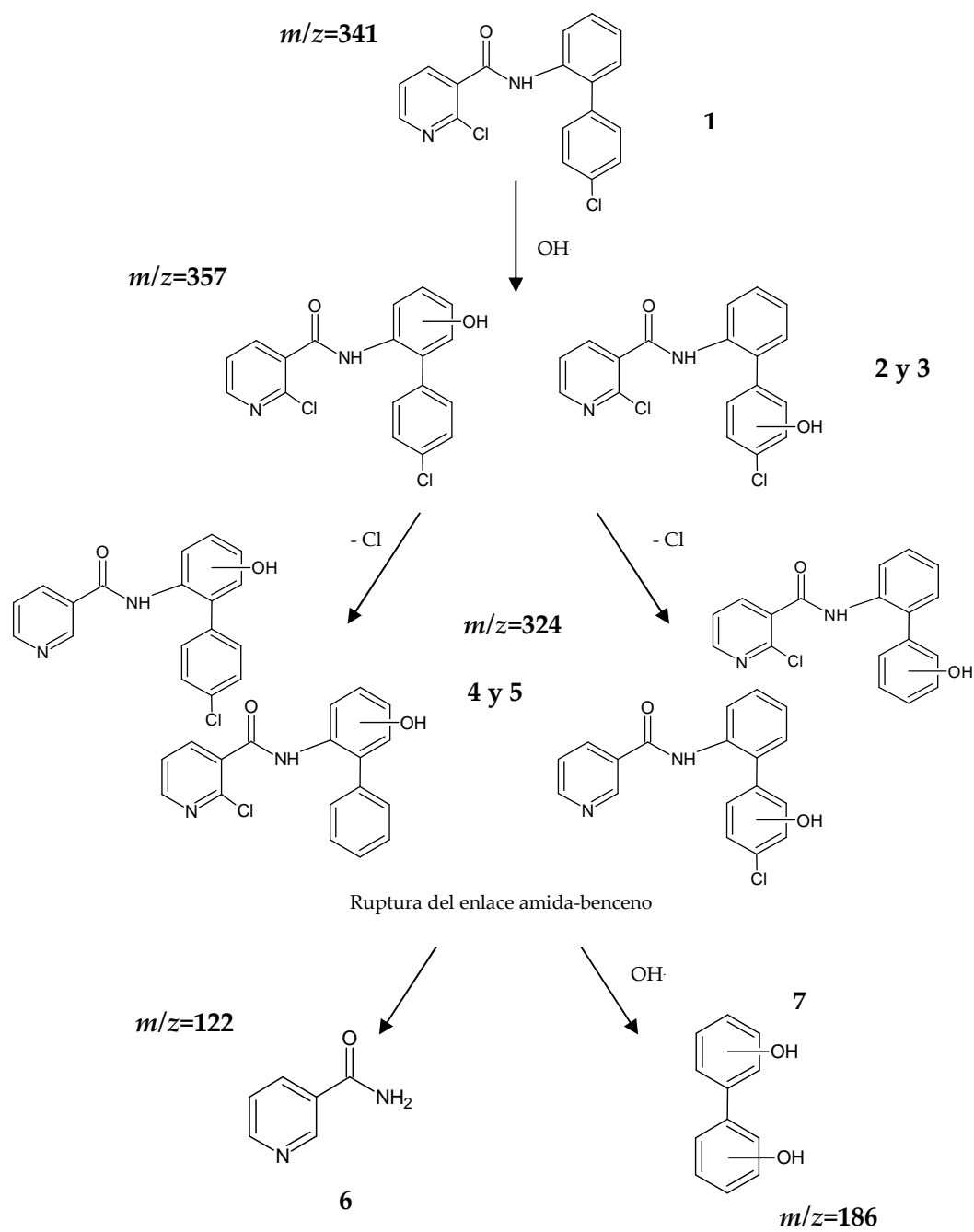


Figura III.30. Mecanismo de degradación fotolítica para boscalid

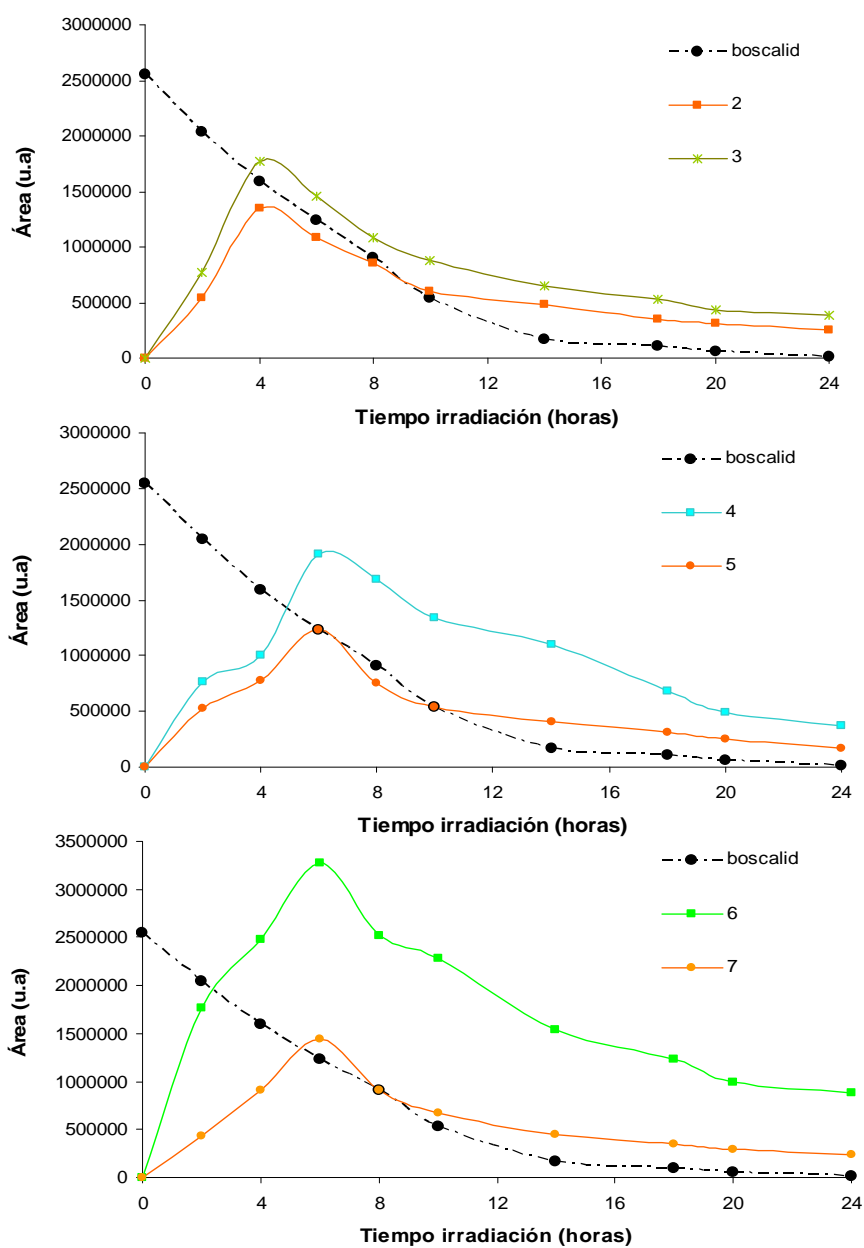


Figura III.31. Evolución de boscalid y sus productos de degradación (A) Productos monohidroxilados (B) Productos con  $m/z$  357 (pérdida de cloro) (C) Evolución de los dos subproductos obtenidos de la ruptura del enlace amida-benceno.

iii.) Los dos últimos productos de degradación se forman debido a la ruptura del enlace N-C de los grupos amida-benceno respectivamente, obteniendo así los compuestos **6** y **7**. Como se puede ver en la figura III.30. donde se representa el mecanismo posible de degradación, el producto **6** resulta de la ruptura de dicho enlace en moléculas que no poseen la piridina hidroxilada y que además han perdido el átomo de cloro. El producto **7** corresponde a la otra mitad de la molécula teniendo como origen moléculas con uno de los anillos bencénicos hidroxilados que han perdido un átomo de cloro, sufriendo posteriormente una segunda hidroxilación. Ambos productos alcanzaron su máximo a las 6 h de comenzar la irradiación (ver figura III.31).

### **III.5.3. FOTOCATÁLISIS: ESTUDIO Y RESULTADOS**

Los experimentos de irradiación fueron llevados a cabo en una celda Pirex de 60 mL que contenía la disolución acuosa del pesticida junto al catalizador, TiO<sub>2</sub>, en agitación irradiándose con una lámpara de mercurio que emite en el UV cercano. El paso de agua a través del fotoreactor era continuo para mantener una temperatura constante  $20 \pm 2$  °C. Se utilizó un filtro de 340 nm y se midió en cada experimento el flujo que pasaba a través del reactor.

Así, 25 mL de diferentes disoluciones acuosas de piraclostrobin (2,3 mg L<sup>-1</sup>) o de boscalid (3,5 mg L<sup>-1</sup>) se colocaban en el reactor adicionando a su vez 12,5 mg de TiO<sub>2</sub> en el caso de piraclostrobin o 62,5 mg del mismo catalizador para boscalid. Para llevar a cabo el estudio cinético, se tomaron alícuotas de 300 µL en intervalos de 10-15 min y se filtraron a través de filtros de PVDF de 0,45 µm antes de analizarlas por HPLC-DAD. Todos los experimentos tuvieron lugar a pH neutro y la temperatura estuvo fijada en  $20 \pm 2$  °C.

Una vez conocido el tiempo de degradación total de cada fungicida, se llevaron a cabo varias degradaciones de 25 mL cada una a tiempos determinados (15, 30, 60, 90 y 180 minutos) concentrándose posteriormente por SPE (utilizando cartuchos C<sub>18</sub> y eluyendo con 0,5 mL de metanol) y analizándose por HPLC-MS/MS. Para entender mejor el mecanismo de degradación, se siguió también la evolución de los productos de degradación obtenidos una vez ya identificados realizando para ello una degradación posterior y tomando pequeñas alícuotas a intervalos regulares de tiempo (10-15 min), siendo inyectadas posteriormente en HPLC-MS. Estas alícuotas fueron tomadas durante 360 min asegurando así el estudio de la evolución completa de todos los metabolitos, desde los que aparecen al inicio de la degradación hasta los ácidos carboxílicos [ver *Anexo IX*].

Con el fin de identificar los últimos subproductos de la degradación, ácidos carboxílicos, las mismas alícuotas fueron analizadas por cromatografía de exclusión iónica usando el sistema HPLC-UV equipado con una columna de intercambio catiónico.

### **III.5.3.1. Piraclostrobin**

La degradación fotocatalítica de piraclostrobin tuvo lugar en las condiciones comentadas anteriormente. Los resultados obtenidos mostraron que el decaimiento se ajusta a una curva exponencial, siguiendo un comportamiento de primer orden de acuerdo con el modelo de Langmuir-Hinshelwook. Alrededor del 99% de piraclostrobin se degradó después de 60 minutos de irradiación a pH neutro (6,2 ± 0,1).

Se realizó un estudio sobre el efecto del pH en la degradación fotocatalítica de este fungicida fijando dicho parámetro a 2,0/ 4,1/ 7,9 y 10,0. La velocidad de

degradación obtenida fue menor a pH básico, debido a repulsiones electroestáticas entre la molécula de fungicida y el catalizador (*Anexo IX*).

La Figura III.32. muestra el mecanismo de degradación fotocatalítica establecido en función de las estructuras obtenidas para los fotoproductos y su evolución a lo largo del proceso degradativo:

- i) La molécula de piraclostrobin es atacada por radicales hidroxilo en los anillos clorofenil y pirazol pertenecientes a la mitad izquierda de la molécula dando lugar a los productos **2**, **4** y **5**, los cuales alcanzaron su máxima concentración entre los 20 y 30 minutos de comenzar la irradiación (ver figura III.33.). La posición de los grupos OH se determinó por los espectros de fragmentación de los fotoproductos comparados con el espectro de piraclostrobin y mediante el estudio de densidad de cargas que se realizó para este trabajo (*Anexo IX*).
- ii) El compuesto **3** se obtuvo de la misma manera que los compuestos anteriores mediante la hidroxilación del anillo aromático, en este caso, de la mitad derecha de la molécula de piraclostrobin. La posición de este grupo fue confirmada por el fragmento  $m/z=210$  correspondiente a la mitad derecha de la molécula con el -OH en el anillo bencénico. Posteriormente, la pérdida del grupo N-metoxi condujo a la formación de los compuestos **6** y **7**, los cuales alcanzaron su máximo a los 25 minutos de irradiación, figura III.33.
- iii) Posteriormente, la sustitución de un átomo de cloro por un grupo OH dio lugar al compuesto **10** y la ruptura del enlace entre los grupos 4-hidroxifenil y pirazol condujo a la formación del fotoproducto **11**.

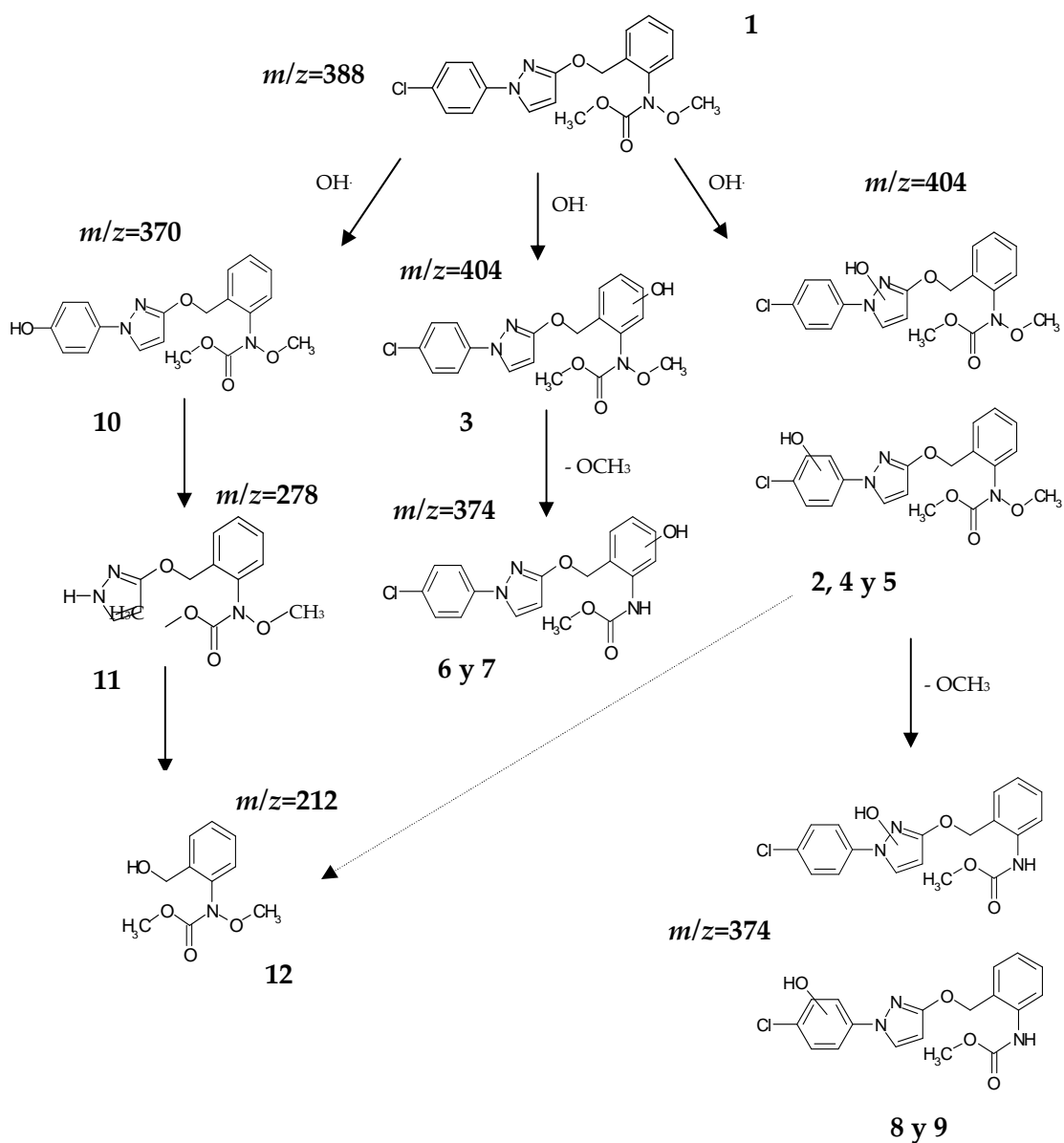


Figura III.32. Mecanismo de degradación fotocatalítica para piraclostrobin



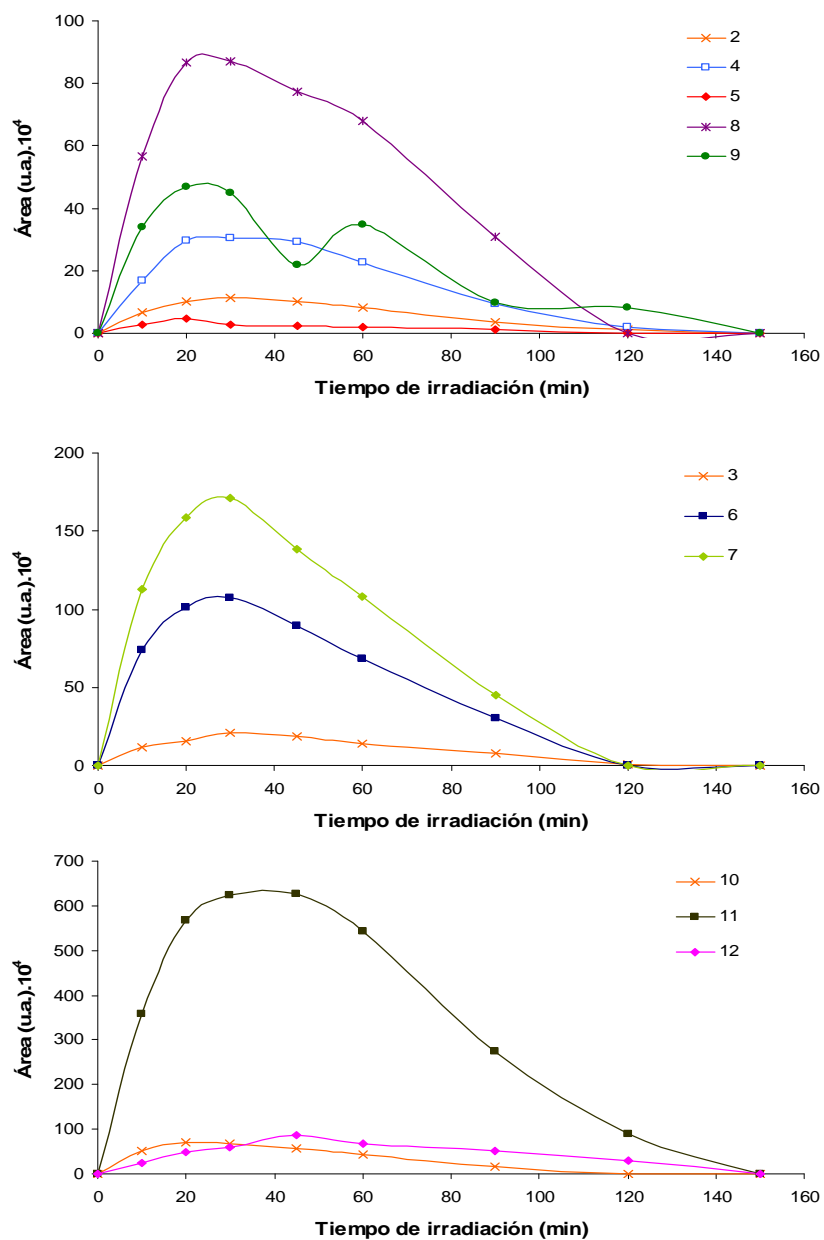


Figura III. 33. Evolución, distribuida en grupos por su semejanza en estructura, de los productos de degradación obtenidos de la degradación fotocatalítica de piraclostrobin.

El compuesto número **12** podría tener dos orígenes aunque en ambos con la misma reacción; la ruptura del enlace C-O perteneciente al grupo pirazol y al oxígeno del grupo iloximetil de los productos con la mitad derecha de la molécula sin hidroxilar. Por tanto, los productos 2, 4 y 5 y el producto 11 conducirían a la formación del compuesto **12**.

### **III.5.3.2. Boscalid**

La degradación fotocatalítica de boscalid tuvo lugar en las condiciones comentadas anteriormente. Los resultados obtenidos mostraron que el decaimiento se ajusta a una curva exponencial, siguiendo un comportamiento de primer orden de acuerdo con el modelo de Langmuir-Hinshelwook. Alrededor del 99% de este fungicida se había degradado después de 90 minutos de irradiación.

Se realizó un estudio particular sobre este fungicida sobre la influencia de diversos factores como pH, flujo de fotones, presencia de sales y concentración de oxígeno sobre la velocidad de descomposición del fungicida. Este estudio está explicado con detalle en el *Anexo X*. A modo de resumen, indicar que la velocidad de degradación de boscalid aumenta a pH básico, con alta cantidad de fotones y mayor concentración de oxígeno disuelto en la disolución. Sin embargo, la presencia de cationes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> o de aniones como CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> presentes de manera general en el agua, producen un efecto contrario disminuyendo la velocidad de degradación fotocatalítica.

Se estableció el siguiente mecanismo de degradación fotocatalítica (ver figura III.34.) basado en las estructuras obtenidas para los productos de degradación y su evolución a lo largo del proceso degradativo:

- i.) En primer lugar, la molécula de boscalid **1** es atacada por radicales  $\text{OH}\bullet$  en posiciones  $-\text{H}$  en los tres anillos (bencenos y piridina) formando cuatro productos monohidroxilados **2**, **3**, **4** y **5** alcanzando éstos su concentración máxima a los 15 minutos de iniciar la irradiación y disminuyendo progresivamente hasta desaparecer una vez pasados 70 minutos (ver figura III.35.). Los productos **2**, **4** y **5** se obtienen por hidroxilación de los anillos bencénicos mientras que en el caso del producto **3**, la hidroxilación se da en la piridina.
- ii.) El segundo grupo de productos de degradación resulta de la hidroxilación de los primeros (2-5) obteniendo así siete productos dihidroxilados, del **6** al **12**. Estos productos comienzan a aparecer durante los primeros minutos de irradiación y su concentración aumenta hasta los 30 minutos (ver figura III.35.).
- iii.) Los últimos intermedios se producen debido a la ruptura del enlace amida conduciendo a la formación de los productos 13-18. Como se puede ver en la figura III. 34. Los compuestos 13, 14 y 15 resultan de la ruptura de dicho enlace en moléculas con el anillo de piridina hidroxilado (productos 3, 6 y 12) y el producto 16 proviene de las moléculas dihidroxiladas sólo en los anillos de benceno (compuestos 7-11). La descarboxilación de este compuesto conduce a la formación del compuesto 17. Además, los productos dihidroxilados que presentan dos grupos hidroxilos en posiciones contiguas pueden dar una descarboxilación mediante la reacción photokolbe, obteniendo así el producto 18 con la apertura del anillo aromático.



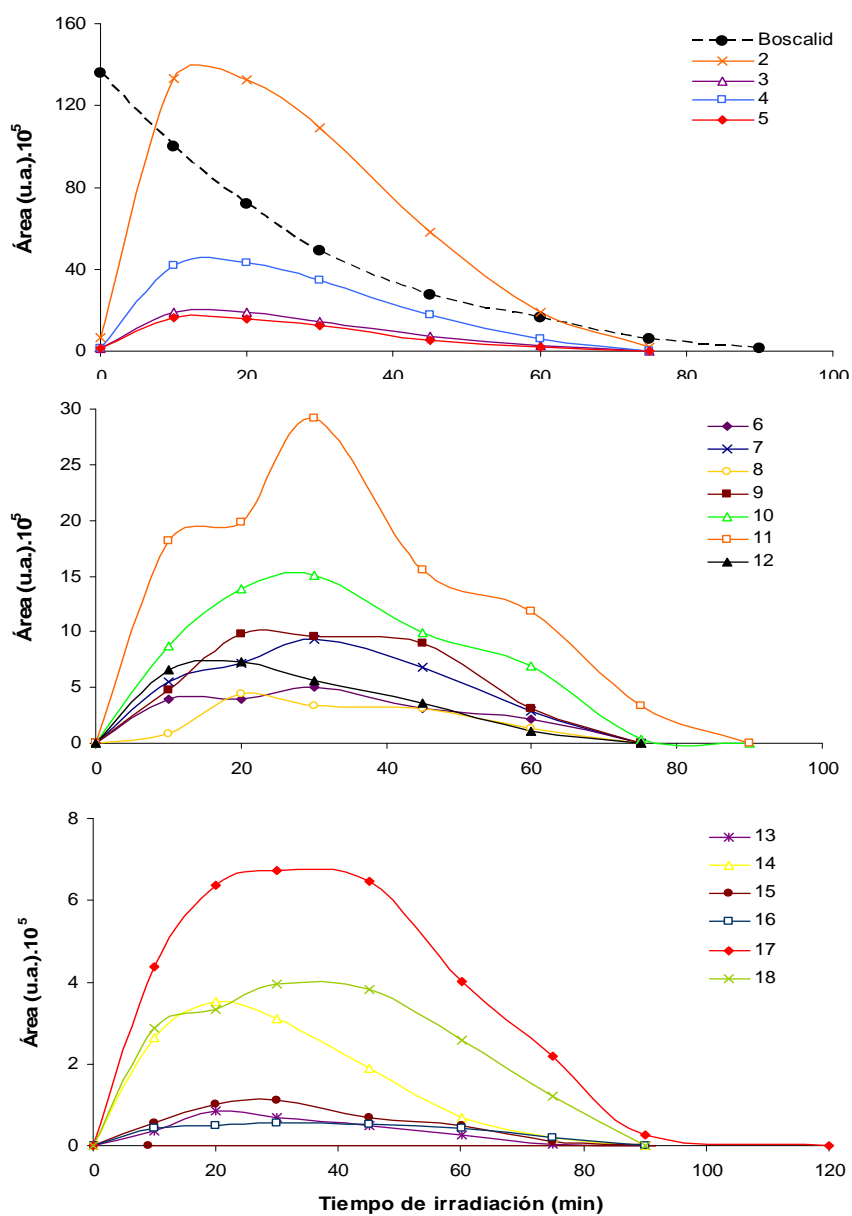


Figura III.35. Evolución de los productos de degradación, agrupados por semejanza en estructura o por vía de degradación, durante la degradación fotocatalítica de boscalid.

## **CONCLUSIONES**

---



A partir de los resultados obtenidos en los diferentes trabajos realizados, así como de las interpretaciones que de ellos surgieron, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

### **DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS**

- Se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación de los fungicidas boscalid, captan, diclofluanida, fluquinconazol, quinoxifen, penconazol, piraclostrobin y vinclozolin en las muestras del proceso fermentativo de mostos (mosto, mosto en fermentación y vino) basado en la extracción en fase sólida con determinación por cromatografía de gases y detector espectrometría de masas y detector de captura electrónica. El método propuesto obtiene elevados rendimientos de extracción y buenos ajustes lineales. La presencia de azúcar y etanol en las muestras de fermentación no afectó a la determinación de estos plaguicidas. El efecto matriz encontrado para todos ellos fue compensado con un calibrado en matriz.
- Se ha optimizado con diseño de experimentos, desarrollado y validado un método de extracción de plaguicidas en uva mediante microondas (MAE) con determinación por cromatografía de gases. El método ofrece elevadas recuperaciones y buena linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. La mezcla que presentó mejores recuperaciones fue hexano/acetona (1:1).
- Se ha desarrollado y validado un método rápido y simple de extracción con disolvente orgánico para la determinación de residuos de boscalid, captan, diclofluanida, fluquinconazol, quinoxifen, penconazol,



piraclostrobin y vinclozolin en uvas tintas. El disolvente utilizado fue acetato de etilo.

- Se ha optimizado con diseño de experimentos, desarrollado y validado un método de extracción de plaguicidas en uva mediante dispersión de matriz en fase sólida (MSPD). La linealidad y repetibilidad son buenas, así como las recuperaciones.

## **ESTUDIO DE LOS RESIDUOS EN LAS DIFERENTES PARTES DE LA UVA**

- Se han desarrollado y validado métodos rápidos y simples de extracción para la determinación de residuos de boscalid, captan, diclofluanida, fluquinconazol, quinoxifen, penconazol, piraclostrobin y vinclozolin en uvas tintas. La metodología incluye tres métodos para la extracción de residuos en tres partes de la uva: superficie exterior (extracción con agua), hollejo o piel (extracción con acetato de etilo), y pulpa (extracción por microondas). Los métodos ofrecen buenas recuperaciones, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad.
- El estudio de movilidad de los ocho 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. Las cinéticas estudiadas para la retención de estos compuestos fue en todos los casos de primer orden con respecto al tiempo. La cantidad de residuos retenidos fue mayor en piel. Se observó penetración de todos los fungicidas en pulpa, siendo mayor dicha penetración para los fungicidas

penetrantes o sistémicos. La relación entre las concentraciones de piel y pulpa no dependió de la concentración inicial. Se observa una correlación entre la penetración en pulpa y el modo de acción del fungicida, de contacto o sistémico, excepto para penconazol. 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.

## PROCESOS DE VINIFICACIÓN

- El proceso de fermentación alcohólica provocó un gran descenso en la cantidad de residuos inicial encontrada en las uvas vendimiadas tratadas con los fungicidas. El resto de etapas de elaboración del vino contribuyeron también a la disminución de residuos, aunque en menor medida. Los porcentajes de reducción medios totales encontrados para piraclostrobin y boscalid fueron del 99% y del 80%, respectivamente.
- A partir de los resultados obtenidos para el estudio de la evolución de la fermentación alcohólica y maloláctica, se deduce que la presencia de piraclostrobin con una concentración máxima de 2 mg L<sup>-1</sup> y la presencia de boscalid con 4 mg L<sup>-1</sup> no afecta al curso de ambas fermentaciones.

## PARÁMETROS ENOLÓGICOS

- El vino control presenta durante los tres años de estudio valores más bajos de IPT, antocianos y flavanoles y los valores más altos para los ácidos hidroxicinámicos y flavonoles en comparación con los vinos elaborados con uvas tratadas con los fungicidas objeto de estudio.

- El análisis sensorial (test dúo-trío) realizado con los vinos elaborados, testigo y tratamientos con piraclostrobin y/o boscalid, los diferentes años no reveló diferencias significativas.

## **PROCESOS DE DEGRADACIÓN**

- El proceso de hidrólisis produce una degradación de piraclostrobin en los experimentos con pH básico y temperatura alta. Sin embargo boscalid permanece estable en el tiempo incluso en condiciones extremas.
- Ambos fungicidas se degradan totalmente (>95%) mediante fotólisis siendo la velocidad de degradación de piraclostrobin mayor que la de boscalid. Se identifican los metabolitos de ambos y se proponen mecanismos de degradación.
- Se consigue también una degradación total de ambos fungicidas, piraclostrobin y boscalid, mediante fotocátalisis utilizando TiO<sub>2</sub> como catalizador. Los tiempos de vida media se reducen considerablemente con respecto la degradación fotolítica.
- Factores como el pH, la concentración de oxígeno, la cantidad de fotones y la presencia de sales parecieron tener influencia en el proceso fotocatalítico de boscalid, así como el pH para piraclostrobin. Se identificaron los metabolitos correspondientes y se establecieron los mecanismos de degradación.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Ahmed, S.; Rasul, M.G.; Brown, R.; Hashib, M.A. (2011). "Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: A short review". *Journal of Environmental Management*, 92 (3), 311-330.
- 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*, 1216 (45), 7630-7638.
- 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.
- Assadi, Y.; Rezaee, M.; Milani Hosseini M.R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. (2006). "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction". *Journal of Chromatography A*, 1116 (1-2), págs. 1-9.
- Barahona, F.; Gjelstad, A.; Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. (2010). "Hollow fiber-liquid-phase microextraction of fungicides from orange juices". *Journal of Chromatography A*, 1217, 1989-1994.

- Barker, S.A.; Long, A.R.; Short, C.R. (1989). "Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion". *Journal of Chromatography*, 475, 353-361.
- Berhanu, T.; Megersa, N.; Solomon, T.; Jönsson, J.Å. (2008). "A novel equilibrium extraction technique employing hollow fibre liquid phase microextraction for trace enrichment of freely dissolved organophosphorus pesticides in environmental waters". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 88, 933-945.
- Bolaños, P.P.; Romero-González, R.; Frenich, A.G.; Vidal, J.L.M. (2008). "Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1208, 16-24.
- Bonnechère, A.; Hanot, V.; Van Loco, J. (2011). "A rapid and environmental friendly determination of the dithiocarbamate metabolites ethylenethiourea and propylenethiourea in fruit and vegetables by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1218 (29), 4627-4631.
- Boudina, A.; Emmelin, C.; Baaliouamer, A.; Paissé, O.; Chovelon, J.M. (2007). Photochemical transformation of azoxystrobin in aqueous solute. *Chemosphere*, 68, 1280-1288.
- Cabanis, J.C.; Cooper, J.F. (1991). Résidus de produits phytosanitaires dans les vins. *Revue Française d'Oenologie*, 130, 43-50.

- Cabras, P.; Meloni, M.; Pirisi, F.M. (1987). "Pesticide fate from vine to wine". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 99, 83-117.
- Cabras, P.; Meloni, M.; Melis, M.; Farris, G.A.; Budroni, M.; Satta, T. (1994). "Interactions between lactic acid bacteria and fungicides during lactic fermentations". *Journal of Wine Research*, 5 (1), 53-59.
- Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L.; Pirisi, F.M.; Cabitza, F.; Pala, M.; Farris, G.A.; Sotgiu, C.; Minelli, E.V. (1997a). "Persistence and metaolism of folpet in grapes and wine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (2), 476-479.
- Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L. (1997b). "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.; Melis, M.; Pirisi, F.M.; Cabitza, F.; Pala, M. (1998) "Pesticide residues in raisin processing". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (6), 2309-2311.
- 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.; Angioni, A.; Garau, V.L.; Pirisi, F.M.; Cabitza, F.; Pala, M.; Farris, G.A. (2000a). "Fate of quinoxyfen in grapes, wine and their processing products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (12), 6128-6131.
- Cabras, P.; Angioni, A. (2000b). "Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (4), 967-973.



- Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L.; Pirisi, F.M.; Cabitza, F.; Pala, M.; Farris, G.A. (2001). "Fenhexamid residues in grapes and wine". *Food Additives and Contaminants*, 18 (7), 625-629.
- Caldas S. S.; Costa F. P.; Primel E. G. (2010). "Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection". *Analytical Chimica Acta*, 665, 55 - 62.
- 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.
- Camino-Sánchez, F.J.; Zafra-Gómez, A.; Ruiz-García, J.; Bermúdez-Peinado, R.; Ballesteros, O.; Navalon, A.; Vilchez, J.L. (2011). "UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 accredited method for the determination of 121 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (3), 427-440.
- Canosa, P.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Cela, R. (2007). "Determination of parabens and triclosan in indoor dust using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with tandem mass spectrometry". *Analytical Chemistry*, 79 (4), 1675-1681.
- Canosa Rodríguez, María del Pilar. (2008). "Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales". Tesis doctoral. Directores: D. Isaac Rodríguez Pereiro y Dña. Elisa María Rubí Cano

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela.

- Carpinteiro, I.; Ramil, M.; Rodríguez, I.; Cela, R. (2010). "Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1217 (48), 7484-7492.
- Carreté, R.; Vidal, M.T.; Bordons, A.; Constantí, M. (2002). "Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*". *FEMS Microbiology Letters*, 211 (2), 155-159.
- Carreté, R.; Reguant, C.; Rozés, N.; Constantí, M.; Bordons, A. (2006). "Analysis of *Oenococcus oeni* in simulated microvinifications with some stress compounds". *America Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3), 356-362.
- Cela, R.; Lorenzo, R. A.; Casais, M. C.; "Técnicas de separación en Química Analítica". Editorial Síntesis. 2002.
- Cervera, M.I.; Medina, C.; Portolés, T.; Pitarch, E.; Beltrán, J.; Serrahima, E.; Pineda, L.; Muñoz, G.; Centrich, F.; Hernández F. (2010). "Multi-residue determination of 130 multiclass pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 (7), 2873-2891.
- 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.

- Chu, X.-G.; Hu, X.-Z.; Yao, H.-Y. (2005). "Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection". *Journal of Chromatography A*, 1063 (1-2), 201-210.
- COM/2006/0372 final. Comunicación de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones- Estrategia temática sobre el uso sostenible de los plaguicidas.
- Comitini, F. ; Ciani, M. (2008). "Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes". *Annals of Microbiology*, 58 (3), 489-493.
- Coppola, L.; Comitini, F.; Casucci, C.; Milanovic, V.; Monaci, E.; Marinozzi, M.; Taccari, M.; Ciani, M.; Vischetti, C. (2011). "Fungicides degradation in an organic biomixture: Impact on microbial diversity". *New Biotechnology*, 29 (1), 99-106.
- 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". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 369 (7-8), 647-651.
- Coscollá Ramón, 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 résidus de produits phytosanitaires: Congormité aux LMR dans les raisins, résidus dans les vins. *Phytoma, la défense des végétaux*, 492, 31-36.

Cunha S. C.; Fernandez J. O.; Oliveira M. B. P. P. (2009). "Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid-liquid microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1216 (51), 8835-8844.

Decreto Ministeriali 27 agosto 2004. Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. Prodotti fitosanitari: limiti massimi di residui della sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione. *Gazzetta Ufficiale* n° 292 del 14 dicembre 2004, Supplemento Ordinario n° 179.

Decreto del Ministero della Salute—19 aprile 2006. Prodotti fitosanitari: recepimento delle direttive 2005/70/CE, 2005/74/CE e 2005/76/CE della Commissione e aggiornamento del decreto del Ministro della salute 27 agosto 2004 concernente i limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione (pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 162 del 14 luglio 2006).

Decreto del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali—23 luglio 2008. Prodotti fitosanitari: aggiornamento del decreto del Ministro della salute 27 agosto 2004 concernente i limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione. Diciannovesima modifica (pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 265 del 12 novembre 2008).

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.
- De Melo Abreu, S.; Caboni, P.; Pirisi, F.M.; Cabras. P.; Alvés, A.; Garau, V.L. (2006a). "Residues of the fungicide famoxadone in grapes and its fate during wine production". *Food Additives and Contaminants*, 23 (3), 289-294.
- De Melo Abreu, S.; Caboni, P.; Cabras. P.; Garau, V.L.; Alvés, A. (2006b). "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.
- Dimou, A.D.; Sakkas, V.A.; Albanis, T.A. (2005). "Metolachlor photodegradation study in aqueous media under natural and simulated solar irradiation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (3), 694-701.
- Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 309, de 24 de noviembre de 2009, 71-86.
- Directiva 79/117/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1978, relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L33, de 8 de febrero de 1979, 36-40.

- Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 230, de 19 de agosto de 1991, 1-32.
- Doignon, F.; Rozes, N. (1992). "Effect of triazole fungicides on lipid metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*". *Letters in Applied Microbiology*, 15 (4), 172-174.
- Domínguez, J.; Hernández, J.L.; Otero, D.; Pastrana, L.; Pazos, Y. (1995). "Los residuos antibióticos en las fermentaciones vnicas. Incidencias en la calidad del vino". *Viticultura y Enología Profesional*, 14, 111-123.
- Dvorak, V.; Shopfer, J.F. (1970). "Remanence de l'Euparene et vinification". *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture and Horticulture*, 2, 99-104.
- Edder, P.; Ortelli, D.; Viret, O.; Cognard, E.; De Montmollin, A.; Zali, O. (2009). "Control strategies against grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr) and corresponding fungicide residues in grapes and wines". *Food Additives and Contaminants Part A*, 26 (5), 719-725.
- Edlin, D.; Narbad, A.; Dichinson, J.R.; Lloyd. (1995). The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters*, 125, 311.
- Erney, D.R.; Gillespie, A.M.; Gilvydis, D.M.; Poole, C.F. (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. *Journal of Chromatography*, 638 (1), 57-63.

- FAO. (2003), Food and Agriculture Organization, Global Food security and the role of sustainable fertilization, Organización de Naciones Unidas (2003) Roma, Italia.
- Fattouch, S.; Raboudi-Fattouch, F.; Ponce, J.V.G.; Forment, J.V.; Lukovic, D.; Marzouki, N.; Vidal, D.R. (2010). "Concentration dependent effects of commonly used pesticides on activation versus inhibition of the quince (*Cydonia Oblonga*) polyphenol oxidase". *Food and Chemical Toxicology*, 48 (3), 957-963.
- Fernández M.J.; Oliva, J.; Barba, A.; Cámara, M.A. (2005a). "Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 804-811.
- Fernández M.J.; Oliva, J.; Barba, A.; Cámara, M.A. (2005b). "Effects of clarification and filtration processes on the removal of fungicide residues in red wines (var. Monastrell)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (15), 6156-6161.
- Ferrer, I.; Furlong, E.T. (2002). "Accelerated solvent extraction followed by on-line solid-phase extraction coupled to ion trap LC/MS/MS for analysis of benzalkonium chlorides in sediment samples". *Analytical Chemistry*, 74 (6), 1275-1280.
- Fontana, A.R.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Altamirano, J.C.; Cela, R. (2011). "Solid-phase extraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for the selective determination of fungicides in wine samples". *Journal of Chromatography A*, 1218 (16), 2165-2175.

- Fuentes, E.; Báez, M.E.; Labra, R. (2007). "Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil". *Journal of Chromatography A*, 1169 (1-2), 40-46.
- Gao, H.-J.; Kang, C.-L.; Song, Y.-H.; Guo, P.; Lang, X.-H.; Peng, F. (2011). "Comparison of the photoconversion of para-chlorophenol under simulated sunlight and UV irradiation in ice". *Water Science and Technology*, 64 (4), 841-847.
- 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.
- 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.
- Garau, V.L.; De Melo-Abreu, S.; Caboni, P.; Angioni, A.; Alves, A.; Cabras, P. (2009). "Residue-free wines: fate of some quinone outside inhibitor (QoI) fungicides in the winemaking process". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (6), 2329-2333.
- Gatidou, G.; Iatrou, E. (2011). "Investigation of photodegradation and hydrolysis of selected substituted urea and organophosphate pesticides in water". *Environmental Science and Pollution Research*, 18 (6), 949-957.
- Giroud, N.; Dorge, S.; Trouvé, G. (2010). "Mechanism of thermal decomposition of a pesticide for safety concerns: Case of Mancozeb". *Journal of Hazardous Materials*, 184 (1-3), 6-15.



- González-Rodríguez, R.M.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. (2009). "Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1216 (32), 6033-6042.
- González-Rodríguez, R.M.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. (2011a). "Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new active substances against downy mildew". *Food Chemistry*, 125, 549-560.
- González-Rodríguez, R.M.; Noguerol-Pato, R.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. (2011b). "Application of new fungicides under good agricultural practices and their effects on the volatile profile of white wines". *Food Research International*, 44, 397-403.
- Guadalupe, Z.; Soldevilla, A.; Sáenz-Navajas, M.P.; Ayestarán B. (2006). "Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation". *Journal of Chromatography A*, 1112 (2006) 112.
- Gutiérrez Valencia, T.M.; García de Llasera, M.P. (2011). "Determination of organophosphorus pesticides in bovine tissue by an on-line coupled matrix solid-phase dispersion-solid phase extraction-high performance liquid chromatography with diode array detection method". *Journal of Chromatography A*, 1218 (39), 6869-6877.

- Hajšlová, J.; Davidek, J.; Fišerová, L.; Velišek, J. (1984). "The influence of some pesticides on the quality of apples". I. Enzymatic browning reactions". *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 178 (5), 382-385.
- Hatzidimitriou, E.; Darriet, P; Bertrand, A.; Dubourdiou, D. (1997). "Folpet hydrolysis-incidence on the initiation of the alcoholic fermentation". *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31 (1), 51-55.
- Hernández-Borges, J.; Ravelo-Pérez, L.M.; Hernández-Suárez, E.M.; Carnero, A.; Rodríguez-Delgado, M.Á. (2008). "Determination of abamectin residues in avocados by microwave-assisted extraction and HPLC with fluorescence detection". *Chromatographia*, 67 (1-2), 69-75.
- Hernández-Soriano, M.C.; Peña, A.; Mingorance, M.D. (2007). "Response surface methodology for the microwave-assisted extraction of insecticides from soil samples". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389 (2), 619-630.
- Hu, J.-Y.; Liu, C.; Zhang, Y.-C.; Zheng, Z.-X. (2009). "Hydrolysis and photolysis of diacylhydrazines-type insect growth regulator js-118 in aqueous solutions under abiotic conditions". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82 (5), 610-615.
- Iesce, M.R.; Della Greca, M.; Cermola, F.; Rubino, M.; Isidori, M.; Pascarella, L. (2006). "Transformation and ecotoxicity of carbamic pesticides in water". *Environmental Science and Pollution Research*, 13 (2), 105-109.
- Ismail, A.A.; Bahnemann, D.W. (2011). "Mesoporous titania photocatalysts: Preparation, characterization and reaction mechanisms". *Journal of Materials Chemistry*, 21 (32), 11686-11707.

- Jain, S.; Yamgar, R.; Jayaram, R.V. (2009). "Photolytic and photocatalytic degradation of atrazine in the presence of activated carbon". *Chemical Engineering Journal*, 148 (2-3), 342-347.
- 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 chlorpyrifos-methyl, methiocarb, dicofol, and cyproconazol". *Journal of Separation Science*, 30, 547-556.
- Jingyu Chen; Binh Loo; Chittaranjan Ray. (2008). Determination of trifloxystrobin and its metabolites in Hawaii soils by ASE-LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1829–1837.
- Lambropoulou, D.A.; Konstantinou, I.K.; Albanis, T.A.; Fernández-Alba, A.R. (2011). "Photocatalytic degradation of the fungicide Fenhexamid in aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions: Identification of intermediates products and reaction pathways." *Chemosphere*, 83 (3), 367-378.
- Larue, F. (1991). IBS: des fongicides qui perturbent les fermentations. *Vitis*, 139, 106-108.

- 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.
- Levine I.N.; Physical Chemistry, 1ª edición, McGraw-Hill Book Co.; New York, 1978.
- Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino. *Boletín Oficial del Estado* nº 165, de 11 de julio, 27165-27179.
- Lian, Y.-J.; Pang, G.-F.; Shu, H.-R.; Fan, C.-L.; Liu, Y.-M.; Feng, J.; Wu, Y.-P.; Chang, Q.-Y. (2010). "Simultaneous determination of 346 multiresidue pesticides in grapes by PSA-MSPD and GC-MS-SIM". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (17), 9428-9453.
- 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.
- Liu, P.; Xu, Y.; Li, J.; Liu, J.; Cao, Y.; Liu, X. (2012). "Photodegradation of the isoxazolidine fungicide syp-z048 in aqueous solution: Kinetics and photoproducts". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (47), 11657-11663.
- López, M.; Ortiz, F.; Navas, J.A.; Cuenca, I.; Egido, J.; Fernández, M.; Justicia, L.; López, J.; Martínez, A.; González, A.; García, C.; Moya, I. (2000). "Aplicación de plaguicidas". Junta de Andalucía. Servicio de Publicaciones y Divulgación. Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Sevilla (España).
- Manzanilla-Cano, J.A.; Barceló-Quintal, M.H.; del Alcocer-Can, L.C.; Coral-Martínez, T.I. (2010). "Effect of fulvic acid on the photochemical degradation of

- methylparathion". *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 45 (4), 274-278.
- Marin, M.L.; Lhiaubet-Vallet, V.; Santos-Juanes, L.; Soler, J.; Gomis, J.; Arques, A.; Amat, A.M.; Miranda, M.A. (2011). "A photophysical approach to investigate the photooxidation mechanism of pesticides: Hydroxyl radical versus electron transfer". *Applied Catalysis B: Environmental*, 103 (1-2), 48-53.
- Martins, J.; Esteves, C.; Simões, T.; Correia, M.; Delerue-Matos, C. (2011). "Determination of 24 pesticide residues in fortified wines by solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (13), 6847-6855.
- Mazellier, P.; Zamy, C.; Sarakha, M. (2010). "Phototransformation of oxamyl in aqueous solution". *Environmental Chemistry Letters*, 8 (1), 19-24.
- Mazza, G. y Brouillard, R. (1990). "The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions". *Phytochemistry*, 29, 1097-1102.
- Meilgard C.E.; Civille G.V.; Carr B.T. (2007). "Overall difference tests: does a sensory difference exist between sample. *Sensory Evaluation Techniques*". 4<sup>th</sup> 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.
- 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 (1-2), 135-142.
- 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.
- Mukhopadhyay, M.; Daswat, D.P. (2013). "Photochemical degradation of 4-chlorophenol in the aqueous phase using peroxyacetic acid (PAA)". *Science and Technology*, 67 (2), 440-445.
- 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 disappearance". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 264-270.
- Navarro, M.; Picó, 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 (1-2), 201-209.
- Navarro, S.; Pérez, G.; Navarro, G.; Mena, L.; Vela, N. (2007). "Variability in the fermentation rate and colour of young lager beer as influenced by insecticide and herbicide residues". *Food Chemistry*, 105 (4), 1495-1503.
- Noguerol-Pato, R.; González-Rodríguez, R.M.; González-Barreiro, C.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. (2011). "Influence of tebuconazole residues on the aroma composition of Mencía red wines". *Food Chemistry*, 124, 1525-1532.

- Ochiai, N.; Fujimura, M.; Oshima, M.; Motoyama, T.; Ichiishi, A.; Yamada-Okabe, H.; Yamaguchi, I. (2002). "Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in *Candida albicans*". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66 (10), 2209-2215.
- Office International de la Vigne et du Vin (OIV). International Analysis Methods of Wines and Must, Paris, France 1990.
- Oliva, J.; Barba, A.; San Nicolás, F.T. & Payá, P. (2005). Efectos de residuos de fungicidas en la composición fenólica de vinos tintos (var. Monastrell). *Tecnología del vino*, 23, 37-40.
- Oliva, J.; Payá, P.; Cámara, M.A.; Barba, A. (2007a). "Removal of pesticides from white wine by the use of fining agents and filtration". *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 72 (2), 171-180.
- Oliva, J.; Payá, P.; Cámara, M.A.; Barba, A. (2007b). "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.; Cayuela, M.; Payá, P.; Martínez-Cacha, A.; Cámara, M.A.; Barba, A. (2007c). "Influence of fungicides on grape yeast content and its evolution in the fermentation". *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 72 (2), 181-189.
- Oliva, J.; Mulero, J.; Payá, P.; Cámara, M.A.; Barba, A. (2009). "Influence of several fungicides on the antioxidant activity of red wines (var. Monastrell)". *Journal of Environmental Science and Health part B*, 44 (6), 546-552.

Ordonnance du DFI sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC, RS 817.021.23) du 26 juin 1995 (Etat le 1er janvier 2009).

OSEC (2010). Le Département Fédéral de l'intérieur (DFI) de la Suisse. Ordonnance du DFI sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC, RS 817.021.23) du 26 juin 1995 (Etat le 15 avril 2010).

Paíga, P.; Morais, S.; Correia, M.; Delerue-Matos, C.; Alves, A. (2009). "Determination of carbamate and urea pesticide residues in fresh vegetables using microwave-assisted extraction and liquid chromatography". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89 (3), 199-210.

Peng, X.; Feng, L.; Li, X. (2013). Pathway of diethyl phthalate photolysis in seawater determined by gas chromatography-mass spectrometry and compound-specific isotope analysis. *Chemosphere*, 90 (2), 220-226.

Pensado, L.; Casais, M.C.; Mejuto, M.C.; Cela, R. (2005). "Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples". *Journal of Chromatography A*, 1077 (2), 103-109.

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 (1), 146-150.

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.



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.

Plantard, G.; Goetz, V. (2012). "Experimental and numerical studies of a solar photocatalytic process in a dynamic mode applied to three catalyst media". *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 62, 129-136.

Real Decreto 162/1991 del Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, de 8 de febrero, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Fabricación, Comercialización y Utilización de los Plaguicidas. *Boletín Oficial del Estado* nº40, de 15 de febrero de 1991, 5372-5379.

Real Decreto 2163/1994 del Ministerio de la Presidencia, de 4 de noviembre, por el que se implanta el sistema armonizado comunitario de autorización para comercializar y utilizar productos fitosanitarios. *Boletín Oficial del Estado* nº 276, de 18 de noviembre de 1994, 35452-35463.

Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero, por el que se establece los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal. *Boletín Oficial del Estado* nº 58, de 9 de marzo de 1994, 7723-7726.

Real Decreto 3349/1983 de la Presidencia del Gobierno, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas. *Boletín Oficial del Estado* nº20, de 24 de enero de 1984, 1850-1856.

Reglamento (CE) 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre, relativo a la comercialización de productos sanitarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 309, de 24 de noviembre de 2009.

Reglamento (CE) 149/2008 de la Comisión, de 29 de enero, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo mediante el establecimiento de los anexos II, III, IV que estipulan límites máximos de residuos para los productos que figuran en el anexo I de dicho Reglamento. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 58, de 1 de marzo de 2008, 1-398.

Reglamento (CE) 178/2006 de la Comisión, de 1 de febrero, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo con vistas a establecer el anexo I que incluye la lista de alimentos y piensos a los que se aplican contenidos máximos de residuos de plaguicidas. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 29, de 2 de febrero de 2006, 3-25.

Reglamento (CE) 256/2009 de la Comisión, de 23 de marzo, por el que se modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de azoxistrobina y fludioxonil en determinados productos. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 81, de 27 de marzo de 2009, 3-14.

Reglamento (CE) 260/2008 de la Comisión, de 18 de marzo, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, estableciendo el anexo VII con la lista de combinaciones de sustancia activa y producto a las que se aplica la excepción respecto al tratamiento por fumigación posterior a la cosecha. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 76, de 19 de marzo de 2008, 31-32.

Reglamento (CE) 299/2008 de la Comisión, de 11 de marzo, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a los límites máximos de residuos en plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal, por lo que se refiere a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 97, de 9 de abril de 2008, 67-71.

Reglamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 70, de 16 de marzo de 2005, 1-16.

Reglamento (CE) 839/2008 de la Comisión, de 31 de julio, por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los anexos II, III y IV relativos a límites máximos de residuos de plaguicidas en el interior o en la superficie de determinados productos. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L 234, de 30 de agosto de 2008, 1-216.

Reulet, P.; De la Rocque, B; Cugier, J.P. (1996). "Enquête 1995 sur les résidus 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, J.; Stonestreet, E. (1965). "Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge". *Bulletin de la Société Chimique de France*, 9, 2649-2652.

- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Duburdieu, D. (1999). "Phenolic Compounds. En "Handbook of enology. Vol. 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments". John Wiley & sons. Ltd. Chichester. 129-186.
- Rodríguez-Cabo, T.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Cela, R. (2011). "Dispersive liquid-liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography-mass spectrometry determination of fungicides in wine". *Journal of Chromatography A*, 1218 (38), 6603-6611.
- Romero-González, R.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J.L.; Prestes, O.D.; Grió, S.L. (2011). "Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 1218 (11), 1477-1485.
- 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.
- Ruediger, G.A.; Pardon, K.H.; Sas, A.N.; Godden, P.W.; Pollnitz, A.P. (2005). "Fate of pesticides during the winemaking process in relation to malolactic fermentation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (8), 3023-3026.
- Ruiz Hernández, M. (2004). Tratado de vinificación en tinto (2ª Edición). AMV ediciones, Madrid.

- Rung, B.; Schwack, W. (2005). "Aminoparathion: A highly reactive metabolite of parathion. 1. Reactions with polyphenols and polyphenol oxidase". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (23), 9140-9145.
- Saad M. M. Ismail; Hussein M. Ali; Ramadan A. Habibas. (1993). "GC-ECD and GC-MS Analyses of Profenofos Residues and Its Biochemical Effects in Tomatoes and Tomato Products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 610-615.
- 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.
- Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J. (1997). "Quick gas chromatographic method for determining common pesticides in musts and wines". *Chromatographia*, 44 (5-6), 320-324.
- Sanagi, M.M.; Ghani, N.F.Y.A.; Miskam, M.; Ibrahim, W.A.W.; Aboul-Enein, H.Y. (2010) "Analysis of organophosphorus pesticides in vegetable samples by hollow fiber liquid phase microextraction coupled with gas chromatography-electron capture detection". *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33, 693-703.
- Sánchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Tadeo, J.L. (2008). "Determination of organochlorine pesticides in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry". *Talanta*, 74 (5), 1211-1217.
- Sandín-España, P.; Sevilla-Morán, B.; Calvo, L.; Mateo-Miranda, M.; Alonso-Prados, J.L. (2013). *Microchemical Journal*, 106, 212-219.

- Santos, C. (1997). Aplicación de fungicidas antibotróficos en vid: eficacia, residuos y consecuencias enológicas. Ph. D. Dissertation, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid (España).
- Sanz-Asensio, J.; Plaza-Medina, M.; Martínez-Soria, M.T.; Pérez-Clavijo, M. (1999a). "Study of photodegradation of the pesticide ethiofencarb in aqueous and non-aqueous media, by gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 840 (2), 235-247.
- Sanz-Asensio, J.; Martínez-Prado, A.P.; Plaza-Medina, M.; Martínez-Soria, M.T.; Pérez-Clavijo, M. (1999b). "Behaviour of acephate and its metabolite methamidophos in apple samples". *Chromatographia*, 49 (3-4), 155-160.
- Sapis-Domercq, S. (1980). "Etude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vies". *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 14, 155-181.
- Sarafraz-Yazdi, A.; Assadi, H.; Wan Ibrahim, W.A. (2012). "Determination of triazole fungicides using hollow fiber liquid phase microextraction prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis". *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51 (7), 3101-3107.
- Sarris, D.; Kotseridis, Y.; Linga, M.; Galiotou-Panayotou, M.; Papanikolaou, S. (2009). "Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* strain on enriched pasteurized grape musts". *Engineering in Life Sciences*, 9 (1), 29-37.

- Teixeira, M.J.; Aguiar, A.; Afonso, C.M.M.; Alves, A.; Bastos, M.M.S.M. (2004). "Pesticide intoxications in the Centre of Portugal: Three years analysis". *Analytica Chimica Acta* 513 (1), 333-340.
- Tomlin C. (2003). "The pesticide manual". 13ª Edición. British Crop Protection Council Publications. Farnham (Reino Unido).
- Ubeda, J; Briones, A.I; Izquierdo, P.M. (1996). Alimentación, Equipos y Tecnología 15 (2), 117.
- Ukpebor, J.E.; Halsall, C.J. (2012). "Effects of dissolved water constituents on the photodegradation of fenitrothion and diazinon". *Water, Air, and Soil Pollution*, 223 (2), 655-666.
- Vaquero-Fernández L, Sáenz-Hernández 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.
- Vaquero-Fernández, L.; Sanz-Asensio, J.; López-Alonso, M.; Martínez-Soria, M.-T. (2009). " Analysis of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid, and penconazol in must and wine from red grapes by solid-phase extraction and gas chromatography". *Analytical Letters*, 42 (12), 1761-1783.
- Vaquero-Fernández, L.; Sanz-Asensio, J.; Fernández-Zurbano, P.; López-Alonso, M.; Martínez-Soria, M.-T. (2012). "Determination of fungicide pyrimethanil in

- grapes, must, fermenting must and wine". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (8), 1960-1966.
- Vidal, M.T.; Poblet, M.; Constantí, M.; Bordons, A. (2001). "Inhibitory effect of copper and dichlofluanid on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation". *American Journal of Enology and Viticulture*, 52 (3), 223-229.
- 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.
- Viñas, P.; Martínez-Castillo, N.; Campillo, N.; Hernández-Córdoba, M. (2010). "Liquid-liquid microextraction methods based on ultrasound assisted emulsification and single-drop coupled to gas chromatography-mass spectrometry for determining strobilurin and oxazole fungicides in juices and fruits". *Journal of Chromatography A*, 1217 (42), 6569-6577.
- Weber, J.; Kurková, R.; Klánová, J.; Klán, P.; Halsall, C.J. (2009a). "Photolytic degradation of methyl-parathion and fenitrothion in ice and water: Implications for cold environments". *Environmental Pollution*, 157 (12), 3308-3313.
- Weber, J.; Halsall, C.J.; Wargent, J.J.; Paul, N.D. (2009b). "A comparative study on the aqueous photodegradation of two organophosphorus pesticides under simulated and natural sunlight". *Journal of Environmental Monitoring*, 11 (3), 654-659.
- Wilkowska, A.M.; Biziuk, M. (2010). "Rapid method for the determination of organochlorine pesticides and PCBs in fish muscle samples by microwave-



- assisted extraction and analysis of extracts by GC-ECD". *Journal of AOAC International*, 93 (6), 1987-1994.
- Xie, J.; Wang, P.; Liu, J.; Lv, X.; Jiang, D.; Sun, C. (2011). "Photodegradation of lambda-cyhalothrin and cypermethrin in aqueous solution as affected by humic acid and/or copper: Intermediates and degradation pathways". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30 (11), 2440-2448.
- 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.
- Yang, X.; Zhang, H.; Liu, Y.; Wang, J.; Zhang, Y.C.; Dong, A.J.; Zhao, H.T.; Sun, C.H.; Cui, J. (2011). "Multiresidue method for determination of 88 pesticides in berry fruits using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry: Determination of 88 pesticides in berries using SPE and GC-MS". *Food Chemistry*, 127 (2), 855-865.
- 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 (2), 269-274.
- Zamora, F.; Luengo, G.; Margalef, P.; Magrina, M. y Arola, L. (1994). "Effect of drawing off on colour and phenolic compounds composition of red wine". *Revista española de ciencia y tecnología de alimentos*, 34, 663-671.

- Zamora Marín, F. (2003). "Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos". 1<sup>th</sup> edition. AMV EDICIONES. MUNDI-PRENSA. Madrid (España).
- Zang X. H.; Wu Q. H.; Zhang M. Y.; Xi G. H.; Wang Z. (2009). "Development of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique". *Chinese Journal Analytical Chemistry*, 37 (2), 161-168.
- 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.
- Zhang, Y.; Yang, J.; Shi, R.; Su, Q.; Gao, Y.; Zhu, X. (2011). "Development of an analytical method based on accelerated solvent extraction, solid-phase extraction clean-up, then GC-ECD for analysis of fourteen organochlorine pesticides in cereal crops". *Chromatographia*, 73 (3-4), 385-391.
- Zhou, X; Zang, X.-H; Wang, D.-Y.; Cui, P.-L, Wang,Z. (2009). "Dispersive liquid-liquid microextraction method coupled with gas chromatography for determination of chlorothalonil, captan and folpet residues in grape samples". *Fenxi Huaxue/Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37, 41-45.
- Zironi, R.; Farris, G.; Cabras, P.; Fatichenti, F. (1991). "I residui antiparassitari dall'uva al vino". *Atti Accademica Italiana Vite e Vino*, 43, 352-369.



**ANEXOS**

---



**ANEXO I. Optimization and validation of a simple and fast method for the determination of fungicides in must and wine samples by SPE and GC/MS**

---



## RESIDUES AND TRACE ELEMENTS

## Optimization and Validation of a Simple and Fast Method for the Determination of Fungicides in Must and Wine Samples by SPE and GC/MS

LAURA LAGUNAS-ALLUÉ, JESÚS SANZ-ASENSIO, and MARIA-TERESA MARTÍNEZ-SORIA<sup>1</sup>  
University of La Rioja, Department of Chemistry, Madre de Dios, 51, La Rioja, 26006, Spain

**A rapid, simple, and low-cost method based on SPE was optimized and validated for simultaneous determination of eight fungicides belonging to different chemical classes in must and wine. The method involves extraction of 10 mL of must or wine samples with a C<sub>18</sub> cartridge using 5 mL of dichloromethane as the elution solvent. Separation and final determination of the fungicides (vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid, and pyraclostrobin) was performed by GC coupled to single quadrupole MS. Recoveries at 10, 50, and 100 µg/L were between 71 and 106% in both matrixes for the fungicides evaluated. The calculated LOQ ranged from 1.5 to 3.4 µg/L in must and 1.1 to 3.8 µg/L in wine. Matrix effects observed for wine and must samples were overcome by using matrix-matched calibration. The developed method was linear at concentrations within the tested interval, with coefficients of determination higher than 0.999. The expanded uncertainties at 10 µg/L were <20% for all analytes. Intralaboratory precision in terms of the Horwitz ratio of the fungicides evaluated was below 0.5, suggesting the ruggedness of the method. The proposed method was applied to determine fungicide residues in must samples obtained from red grapes treated with two new commercial formulations, as well as in their corresponding final wines.**

The misuse of pesticides may leave harmful residues in grapes after harvest that may pass to the must and eventually to the wine during fermentation, which involves a possible health risk. Therefore, maximum residue levels (MRLs) for pesticide residues in a variety of agricultural foods were established by the European Union (EU) to protect consumers' health. Nevertheless, for most of the studied fungicides, MRLs have not been established in wine. For wines elaborated in the EU from September, 2008 (1), MRLs were established for boscalid (5000 µg/L), captan (20 µg/L), and pyraclostrobin (1000 µg/L). Other countries, such as Italy or Switzerland, have also established MRLs (2–4) for some of the fungicides (vinclozolin, dichlofluanid, and boscalid in Switzerland at 1000 µg/L in all cases, and quinoxyfen, boscalid, and pyraclostrobin in Italy at 10, 1000, and 50 µg/L, respectively).

Analytical methods for determining pesticide residues in wine production involve several extraction and purification steps to remove the potentially interfering compounds that are generally present at higher concentrations than the pesticide residues. SPE has been proposed for the extraction of pesticides from must and wine samples (5, 6) as alternative to liquid–liquid extraction (7, 8). In most applications, a volume of sample in the range from 10 to 50 mL is passed through an RP SPE sorbent, then analytes are recovered using an organic solvent. Other current extraction techniques, such as single-drop microextraction the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe method; hollow fiber liquid phase microextraction; solid-phase microextraction (SPME); and stir bar sorptive extraction (SBSE) have also been applied to determination of fungicides in wine (9–13). Among all of these techniques mentioned previously, SPME is the most widely used for analysis of pesticides in wine. Although this technique normally provides higher selectivity than SPE, the ethanol content of wine significantly reduces its extraction efficiency when compared to water samples (14, 15); moreover, the kinetics of the extraction is relatively slow, and there are differences in the yield of the process depending on the wine matrix. These disadvantages are also common to SBSE, the applicability of which is restricted to low-polarity fungicides showing a high affinity for the polydimethylsiloxane sorbent (16).

Chromatographic separation and identification were achieved by GC with a nitrogen-phosphorous detector, electron capture detector, or MS detection (10, 17) or by HPLC for compounds not volatile or thermally unstable. In this case, UV, diode array, and MS detector are the most-used detectors and give good results (18, 19).

Different kinds of fungicides against diseases of grapes—i.e., vinclozolin (dicarboximide), dichlofluanid (sulfamide), penconazol (triazole), captan (phthalimide), quinoxyfen (quinoline), and fluquinconazol (triazole), and two new generation fungicides, boscalid (carboxamide) and pyraclostrobin (strobilurin)—widely used in the Qualified Designation of Origin Rioja, were selected for the study.

In spite of the great number of SPE publications, well-described and validated SPE methods for the extraction of the tested fungicides in must and wine are scarce. A few articles have been reported using SPE for analysis of dichlofluanid (6, 19), penconazol (6, 20), and vinclozolin (19, 21–23), only one regarding SPE extraction of captan and fluquinconazol (24) and boscalid and pyraclostrobin in grapes and wines (25), and none for quinoxyfen.

To our knowledge, an instrumental method for the simultaneous determination of these eight multiclass fungicides, included in integrated pest management strategies in Spanish viticulture (except dichlofluanid), in must and wines has not been reported.

Received September 16, 2011. Accepted by AK December 21, 2011.  
<sup>1</sup> Corresponding author's e-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es  
DOI: 10.5740/jaoacint.11-402



**Table 1. Retention times, target ion, and qualifier ions for the target pesticides by GC/MS**

Compounds	$t_R$ window, min <sup>a</sup>	Target ion $I_1$ , $m/z$	Qualifier ion $I_2$ , $m/z$	Qualifier ion $I_3$ , $m/z$	$[I_2]/[I_1]$ (RSD, %) <sup>b</sup>	Tolerances $[I_2]/[I_1]$ (RSD, %) <sup>c</sup>	$[I_3]/[I_1]$ (RSD, %) <sup>b</sup>	Tolerances $[I_3]/[I_1]$ (RSD, %) <sup>c</sup>
Vinclozolin	7.51–7.60	212	285	198	0.74 (7)	10	0.87 (6)	10
Dichlofluanid	8.66–8.73	123	224	167	0.34 (11)	15	0.43 (14)	15
Penconazol	10.00–10.07	248	159	—	0.86 (7)	10	—	—
Captan	10.19–10.24	79	149	—	0.22 (13)	20	—	—
Quinoxifen	13.19–13.25	237	307	272	0.29 (7)	15	0.43 (11)	15
Tetradifon	14.92–15.00	159	356	111	0.50 (9)	15	0.90 (6)	10
Fluquinconazol	16.52–16.57	340	108	—	0.26 (14)	20	—	—
Boscalid	17.28–17.33	140	342	112	0.45 (8)	15	0.33 (9)	15
Pyraclostrobin	18.21–18.27	132	164	325	0.36 (12)	15	0.14 (15)	20

<sup>a</sup> Retention time.<sup>b</sup> Intensity ratio of the two ions, target and qualifier ion at 100 µg/L in must and wine matrix-matched standards.<sup>c</sup> Default recommended maximum permitted tolerances for relative ion intensities (% of base peak) using GC/electron impact MS according to SANCO guidelines.

Efficient analytical methods for the determination of boscalid and pyraclostrobin are thus demanded because both fungicides have been recently introduced in viticulture. The method based on SPE and determination by GC/MS was optimized to obtain lower cost and more accuracy for determining residues of the eight fungicides in must and wine.

## Experimental

### Chemicals and Reagents

Pesticide analytical standards of vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxifen, fluquinconazol, boscalid, and pyraclostrobin with purity higher than 99.0% were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Tetradifon from Riedel-de-Haën with a purity of 99.5% was used as an internal standard (IS). All were stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

HPLC grade methanol, ethyl acetate, acetone, acetonitrile, and dichloromethane were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained using a Milli-RO plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Billerica, MA).

For SPE, 500 mg  $C_{18}$  (Bond Elut<sup>®</sup> LRC- $C_{18}$  INT) cartridges were supplied by Varian (Middelburg, The Netherlands).

Two new commercial formulations, Cantus<sup>®</sup> (50% boscalid) and Cabrio Top<sup>®</sup> (5% pyraclostrobin), were supplied by BASF Española (Tarragona, Spain).

### Standard Preparation

Fungicide stock solutions (500 mg/L) and intermediary solutions (10 and 1 mg/L) were prepared in methanol. Stock and intermediary standard solutions of the IS, tetradifon, were prepared in the same way in ethyl acetate. All standard solutions were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . They were stable over a period of at least 3 months (tested against newly prepared solutions by comparing the detector responses). Intermediary solutions were used to spike wine and must matrixes.

### SPE Procedure

The sample preparation procedure and, in particular, the sorbent of the cartridge was chosen according to our experience in wine and must analysis (11). A Visiprep<sup>®</sup> SPE vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA) was used to simultaneously process 12 tubes. A wine or must volume of 10 mL was percolated through a  $C_{18}$  cartridge, previously conditioned with 5 mL methanol and 3 mL water. Then, the cartridge was rinsed with 10 mL water-methanol (9 + 1, v/v) to clean up the cartridge and was dried under an applied vacuum for 20 min to remove excess water. Finally, the retained fungicides were eluted with 5 mL dichloromethane, evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream, redissolved with 10 mL ethyl acetate, and 100 µg/L tetradifon was added. Tetradifon was used as an IS to compensate for any sample and injection volume changes and to correct the variability in GC injection and MS detection response.

### Instrumentation and Chromatographic Conditions

The analysis of the target fungicides was carried out on an Agilent Technologies (Santa Clara, CA) GC 7890A chromatograph coupled to a 5975C MS quadrupole mass selective detector. Chromatographic separations were done by using an HP-5MS capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm id  $\times$  0.25 µm film thickness). The initial oven temperature was set at  $100^\circ\text{C}$ , increased to  $185^\circ\text{C}$  at  $40^\circ\text{C}/\text{min}$ , kept for 5 min, increased at a rate of  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  to  $300^\circ\text{C}$ , and held for 3 min. The volume of sample was 2 µL, injected in the splitless mode. The injector temperature was set at  $250^\circ\text{C}$ . Helium (99.9999% purity) was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. The mass spectrometer was operated with electron ionization (70 eV) using a 6 min solvent delay. The interface temperature was  $310^\circ\text{C}$ , and ion source temperature was  $230^\circ\text{C}$ .

### GC/MS Analysis

Initially, full-scan MS was performed by scanning  $m/z$  of 50–550 to confirm the retention times of the analytes and to

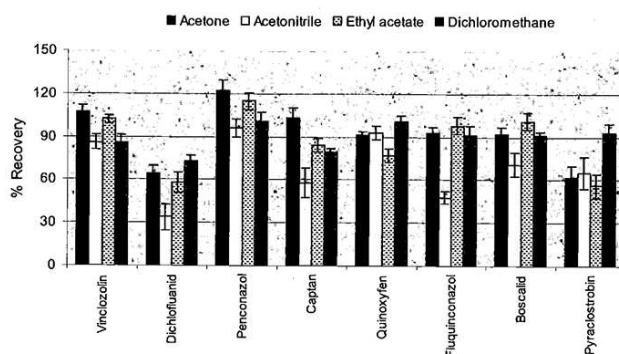


Figure 1. SPE recoveries using various extraction solvents for the elution step.

select the most abundant ion (base peak) and qualifier ions for each target compound. Once ions were selected for all analytes, selected ion monitoring was performed for determination of the fungicide residues.

#### Optimization of the SPE Method

Different parameters were studied in order to develop the SPE method to determine these fungicides in real must and wine samples. These included the following: eluent solvent parameters and volume, composition and volume of the solid-phase wash, and breakthrough volume.

(a) *Elution solvent.*—The following different solvents were initially considered for SPE elution because of the wide range of polarity and solubility exhibited by the compounds investigated: ethyl acetate, acetonitrile, acetone, and dichloromethane. Acetone, ethyl acetate, and acetonitrile were selected as solvents because of their effectiveness for extraction of polar and nonpolar pesticides from a diverse range of matrixes, and dichloromethane was also considered to be one of the investigated solvents because it has an ability to lower the extraction of polar coextractants.

The must and wine samples (10 mL) fortified at a level of 50 µg/L for each fungicide were extracted in triplicate by SPE with C<sub>18</sub> cartridges, previously conditioned and eluted with 10 mL (5 mL + 5 mL) of the solvents mentioned above.

(b) *Composition and volume of the solid-phase wash.*—Once the elution solvent was chosen, a study of the wash step was carried out. Thus, 10 mL wine and must samples were both spiked at the same concentration of pesticides and percolated through the SPE cartridge. Later, these cartridges were washed with different proportions of water–methanol (10+0, 9+1, 7+3, and 5+5, v/v) before elution with organic solvent to check the influence of this step. In addition, different volumes (2, 5, and 10 mL) for the selected water–methanol mixture were checked in order to obtain the cleanest chromatograms without loss of compounds.

(c) *Breakthrough volume.*—An assay to determine breakthrough volume was performed according to the procedure described by Hennion (26) and Dopico-García et al. (27). It consisted of preconcentrating samples of increasing volumes, each containing the same amount of analytes. Volumes of samples

of 5, 25, 50, 100, and 250 mL, spiked with a mixture of pesticide standards, were used to determine the breakthrough volume.

#### Method Validation

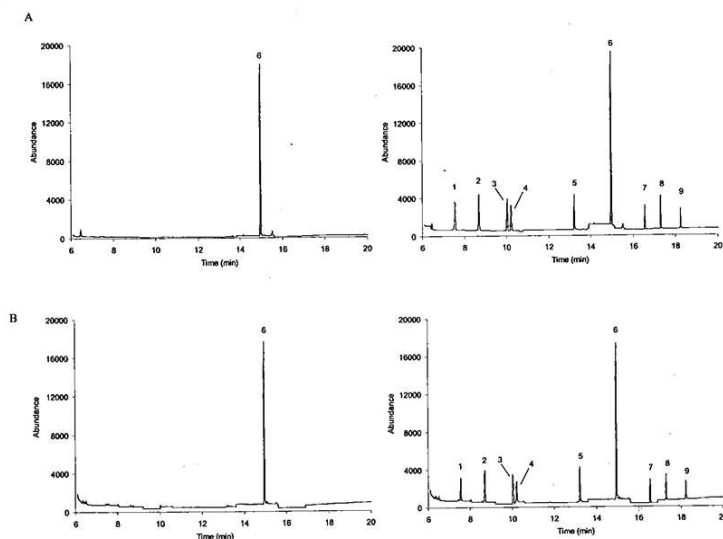
Validation was performed according to SANCO/10684/2009 guidelines (28) concerning the performance of methods for pesticide residue monitoring. Performance characteristics studied were selectivity, linearity, LOD, LOQ, recovery, precision, and matrix effects. Global uncertainty was determined for all the pesticides according to the EURACHEM/CITAC Guide (29).

According to the SANCO guidelines, a quantitative analytical method should be demonstrated at initial and extended validation as being capable of providing mean recovery values at each spiking level within the range 70–120%, and repeatability and reproducibility RSD ≤20%, for all compounds to be determined using the method.

(a) *Selectivity.*—The selectivity of the method was tested by injecting extracts of nonspiked must and wine samples (30).

(b) *Linearity.*—Different approaches to quantification of pesticide residues in fresh fruits and vegetables can be considered in order to reduce the quantitative errors from the matrix effects: use of the standard addition method; standards in residue-free matrix spiked with standards (matrix-matched standards); deuterated internal and/or surrogate standards; and analyte protectants (28). In this study, matrix-matched calibration was used. Must and wine samples obtained from untreated grapes were subjected to the SPE method described above. These blank extracts were spiked with variable amounts of fungicides. The calibration curves for all the compounds in must and wine matrixes were obtained by plotting the fungicide to the IS peak area ratio against the concentration for each compound of the corresponding calibration standards at six calibration levels ranging between close to each LOQ to 100 µg/L. Linearity was checked by calculating the determination coefficient,  $r^2$ , of the linear regression equations in matrix-matched standard solutions in the concentration ranges studied.

(c) *LOD and LOQ.*—LOD and LOQ of the overall method were calculated as the concentration giving S/N=3 and S/N=10, respectively. These limits were estimated using the SPE extract of must and wine samples spiked at 10 µg/L.



**Figure 2.** GC/MS chromatograms obtained after SPE of: (A) extract from blank and spiked must (10 µg/L); and (B) extract from blank and spiked wine (10 µg/L). Peak identification: 1, vinclozolin; 2, dichlofluanid; 3, penconazol; 4, captan; 5, quinoxifen; 6, tetradifon (IS; 100 µg/L); 7, fluquinconazol; 8, boscalid; and 9, pyraclostrobin.

(d) *Precision.*—Precision was evaluated by means of repeatability and intermediate precision measurements. Repeatability was evaluated by way of five consecutive replicates of the analysis on the “blank” must and wine samples spiked with the analytes at three concentrations levels (10, 50, and 100 µg/L), on a single day.

Intermediate precision was determined separately at a fortification level of 10 µg/L for all the analytes by calculating the RSD of five analyses of the same must and wine samples performed over 5 days within 1 month. Horwitz ratio (HorRat) pertaining to intralaboratory precision, which indicates the acceptability of a method with respect to precision (31), was calculated for all the fungicides in the following way:

$$\text{HorRat} = \text{RSD}/\text{Prsd}$$

where Prsd is the predicted RSD calculated by the equation:

$$\text{Prsd} = 2C^{-0.15}$$

where  $C$  is the concentration expressed as mass fraction (e.g., 10 ng/g =  $10 \times 10^{-9}$ ).

(e) *Recovery.*—To evaluate the accuracy of the present method, a standard mixture solution of the eight target fungicides was added to must and wine samples at three fortification levels (10, 50, and 100 µg/L). Quantification in the recovery samples was performed by internal calibration using matrix-matched standards.

#### Matrix Effects

(a) *Matrix effect in GC analysis.*—The main consequence

of matrix effects is an increasing (ion enhancement) or decreasing analyte signal (ion suppression) in the presence of the matrix (real sample) with respect to the same analyte in solvent (standard solution; 32, 33). Therefore, matrix effects were evaluated by comparison of the slope of a calibration curve based on the matrix-matched standards of must or wine with the slope of the pure solvent-based calibration curve. A higher slope of the matrix calibration curve indicates matrix-induced signal enhancement, whereas a lower slope represents signal suppressions. Tetradifon (IS) was added to both calibration solutions.

(b) *Matrix effects between samples in the SPE method.*—In view of the change in composition of the samples during alcoholic fermentation (in the transformation of grape must into wine), the possible matrix effects in the sample treatment process must be studied. Therefore, to check the matrix effects, several samples of different matrixes (red, white, and rose wines and red and white must) were spiked with the target compounds at four different concentration levels within the linear range studied previously (analyses were performed in duplicate), and the slopes of the linear calibration functions obtained for the different spiked wines were compared by the application of statistical tests.

#### Uncertainty Evaluation

Global uncertainty was determined for all the fungicides at the level of 10 µg/L according to the statistical procedure of the EURACHEM/CITAC Guide CG 4 (29). Five individual sources of uncertainty were taken into account:



Table 2. Analytical features of the GC/MS method designed for analysis of fungicides in must and wine samples

Fungicide	Must				Wine				MRL		
	Linear range, $\mu\text{g/L}^a$	$r^2$ <sup>b</sup>	LOD, $\mu\text{g/L}$	Slope ratio, extract/solvent	Linear range, $\mu\text{g/L}^a$	$r^2$ <sup>b</sup>	LOD, $\mu\text{g/L}$	Slope ratio, extract/solvent	$t_{\text{cal}}^c$	Italy, $\mu\text{g/L}$	Switzerland, $\mu\text{g/L}$
Vinclozolin	3–110	0.9996	0.8	1.3	3–110	0.9991	1.1	1.4	6.49	—	1000
Dichlorofluanid	3–105	0.9991	1.0	1.4	3–105	0.9990	0.6	1.4	12.29	—	1000
Penconazol	2–103	0.9990	0.7	1.2	2–103	0.9992	0.8	1.3	8.81	—	—
Capitan	4–108	0.999	1.3	1.3	4–108	0.9983	1.5	1.4	14.60	—	—
Quinoxifen	2–120	0.9991	0.7	1.1	1–120	0.9991	0.4	1.2	5.25	10	—
Fluquinconazol	3–105	0.9992	1.2	1.5	3–105	0.9992	1.2	1.4	8.71	—	—
Boscalid	3–112	0.9990	1.2	1.3	2–112	0.9991	0.9	1.2	7.53	1000	—
Pyraclostrobin	4–133	0.9998	1.1	1.0	3–133	0.9991	1.3	0.9	0.10	50	—

<sup>a</sup> Concentration range for calibration curve.<sup>b</sup> Coefficient of determination.

$$t_{\text{cal}} = \frac{(b_1 - b_2)}{\sqrt{(s_1^2 + s_2^2)}}$$

uncertainty associated with the calibration graph ( $u_1$ ), day-wise uncertainty associated with precision ( $u_2$ ), analyst-wise uncertainty associated with precision ( $u_3$ ), day-wise uncertainty associated with accuracy/bias ( $u_4$ ), and analyst-wise uncertainty associated with accuracy/bias ( $u_5$ ). The uncertainties were calculated as follows:

$$u_j = \frac{s}{b_j} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_p - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}}$$

where  $s$  is the SD of the residuals of the calibration curve,  $b_j$  is the slope of the calibration curve,  $p$  is the number of measurements of the unknown,  $n$  is the number of points used to form the calibration curve,  $c_p$  is the calculated concentration of the analyte from the calibration curve,  $\bar{c}$  is the average of all of the standards used to make the calibration curve, and  $c_i$  ( $i=1, 2, \dots, n$ ) is the concentration of each calibration standard used to create the calibration curve.  $U_2 = s_1/n^{1/2}$  where  $s_1$  is the SD of the results obtained from a single analyst on different days and  $n$  is the number of assays.  $U_3 = s_2/n^{1/2}$  where  $s_2$  is the SD of the results obtained from different analysts on a particular day, and  $n$  is the number of assays.  $U_4 = s_1(\eta)/n^{1/2}$  where  $s_1(\eta)$  is the SD of the percentage recoveries obtained from a single analyst on different days, and  $n$  is the number of assays.  $U_5 = s_2(\eta)/n^{1/2}$  where  $s_2(\eta)$  is the SD of the percentage recoveries obtained from different analysts on a particular day and  $n$  is the number of assays.

The global uncertainty ( $U$ ) was calculated as:

$$U = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_4^2 + u_5^2}$$

Evaluation of total uncertainty was done assuming that all the contributions were independent of each other. A coverage factor of 2 was considered at the confidence level of 95% to evaluate the expanded uncertainty at a 10  $\mu\text{g/L}$  fortification level.

#### Application to Real Must and Wine Samples

(a) *Samples from local markets.*—In order to assess the performance of the method, 16 wine and must samples of Spanish origin were collected from the local markets and analyzed by SPE and GC/MS.

(b) *Vinification process samples.*—Another study to evaluate the applicability of the proposed method was carried out by determining residues of two new fungicides (boscalid and pyraclostrobin) in must and wine obtained from red grape samples (cv. Tempranillo).

Red grapes were harvested in September 2008 from cv. Tempranillo grapevines at a vineyard in Aldeanueva de Ebro, La Rioja, Spain. Two new commercial formulations against grey mold, downy mildew, and powdery mildew were applied on red grapes Cantus (50% boscalid) and Cabrio Top (5% pyraclostrobin) at the recommended doses (1 and 2 kg/ha, respectively). These applications were performed in recommended periods corresponding to different phenological stages; using the harvested grapes, microvinifications (50 kg) were performed with each treated grape as common

**Table 3. Recovery ( $n = 5$ ), repeatability ( $n = 5$ ), and HorRat ( $n = 25$ ) of analysis of must and wine by the GC/MS method**

Fungicide	Must; recovery, RSD, % $\pm$ SD				Wine; recovery, RSD, % $\pm$ SD			
	10 $\mu\text{g/L}^a$	50 $\mu\text{g/L}^a$	100 $\mu\text{g/L}^a$	HorRat, 10 $\mu\text{g/L}^b$	10 $\mu\text{g/L}^a$	50 $\mu\text{g/L}^a$	100 $\mu\text{g/L}^a$	HorRat, 10 $\mu\text{g/L}^b$
Vinclozolin	92 $\pm$ 3	86 $\pm$ 6	90 $\pm$ 2	0.24	86 $\pm$ 6	84 $\pm$ 4	86 $\pm$ 6	0.26
Dichlofluanid	77 $\pm$ 6	74 $\pm$ 5	74 $\pm$ 8	0.27	75 $\pm$ 6	74 $\pm$ 6	71 $\pm$ 7	0.31
Penconazol	100 $\pm$ 5	103 $\pm$ 2	101 $\pm$ 4	0.18	98 $\pm$ 1	105 $\pm$ 4	106 $\pm$ 3	0.23
Captan	73 $\pm$ 3	76 $\pm$ 4	76 $\pm$ 6	0.31	71 $\pm$ 5	74 $\pm$ 9	77 $\pm$ 7	0.33
Quinoxifen	95 $\pm$ 4	98 $\pm$ 4	90 $\pm$ 5	0.18	103 $\pm$ 4	97 $\pm$ 6	93 $\pm$ 5	0.26
Fluquinconazol	101 $\pm$ 6	91 $\pm$ 7	96 $\pm$ 3	0.22	101 $\pm$ 3	96 $\pm$ 3	98 $\pm$ 5	0.19
Boscalid	102 $\pm$ 4	98 $\pm$ 3	93 $\pm$ 7	0.22	97 $\pm$ 6	93 $\pm$ 4	92 $\pm$ 5	0.25
Pyraclostrobin	94 $\pm$ 4	96 $\pm$ 6	91 $\pm$ 8	0.27	98 $\pm$ 7	99 $\pm$ 8	98 $\pm$ 4	0.28

<sup>a</sup>  $n = 5$ .<sup>b</sup>  $n = 25$ .

processing in Qualified Designation of Origin Rioja. Residue levels of pyraclostrobin and boscalid were analyzed by SPE and GC/MS during all steps of the vinification process.

## Results and Discussion

### GC/MS Analysis

The dwell time for ion monitoring was 100 ms/ion. The fungicides determined by GC/MS were eluted between 6 and 20 min. Selected ions ( $m/z$ ) used for confirmation and quantification, target and qualifiers ion, and the intensity ratios are shown in Table 1. The intention was to select the most abundant ions of higher  $m/z$ , which provided more sensitivity and selectivity.

### SPE

**Elution solvent.**—Figure 1 shows the average recoveries of the target compounds in wine matrix using different extraction solvents. The behavior of the target compounds in both must and wine matrixes was similar (therefore, results for must sample are not shown). Dichloromethane exhibited recoveries >70% for

all of the investigated fungicides. Even in the case of the lowest recovery (73% for dichlofluanid), the overall repeatability of the method was good enough to ensure a reliable determination of the target compounds. On the other hand, acetonitrile provided the lowest recoveries for most of the fungicides (between 34 and 96%). In the case of acetone and ethyl acetate, recoveries were higher than 80% for almost all the fungicides, except for dichlofluanid and pyraclostrobin with values lower than 60%. In addition, the extracts obtained with the acetone, acetonitrile, and ethyl acetate were heavily pigmented, containing large amounts of matrix coextractants and providing high noise and low sensitivity together with poorer precision. Therefore, elution was performed with a total volume of 5 mL of dichloromethane.

**Composition and volume of the solid-phase wash.**—Once all the cartridges were washed with the different water–methanol proportions, elution was performed as explained above, and recoveries were calculated. By increasing the proportion of methanol in the wash solvent, a reduction in the extraction recoveries of the fungicides was observed. Water–methanol (5 + 5, v/v) and (7 + 3, v/v) led to low recoveries of 23–58% and 43–88%, respectively. The loss of compounds in these water–methanol mixtures was due to their greater solubility in the organic solvent.

**Table 4. Slopes  $\pm$  SD from standard curves obtained for the different matrixes<sup>a</sup>**

Compound	White wine ( $b_A \pm s_{bA}$ ) $10^{-3}$	Rose wine ( $b_B \pm s_{bB}$ ) $10^{-3}$	Red wine ( $b_C \pm s_{bC}$ ) $10^{-3}$	White must ( $b_D \pm s_{bD}$ ) $10^{-3}$	Red must ( $b_E \pm s_{bE}$ ) $10^{-3}$	Levene's test <i>P</i> -values	ANOVA <i>P</i> -values
Vinclozolin	8.45 $\pm$ 0.16	8.52 $\pm$ 0.10	8.48 $\pm$ 0.13	8.36 $\pm$ 0.12	8.38 $\pm$ 0.11	0.966	0.764
Dichlofluanid	12.57 $\pm$ 0.25	12.43 $\pm$ 0.15	12.70 $\pm$ 0.22	12.54 $\pm$ 0.19	12.82 $\pm$ 0.14	0.880	0.157
Penconazol	10.81 $\pm$ 0.14	10.52 $\pm$ 0.12	10.72 $\pm$ 0.19	10.82 $\pm$ 0.08	10.44 $\pm$ 0.11	0.797	0.09
Captan	7.43 $\pm$ 0.11	7.29 $\pm$ 0.08	7.32 $\pm$ 0.09	7.45 $\pm$ 0.14	7.47 $\pm$ 0.10	0.856	0.278
Quinoxifen	13.98 $\pm$ 0.29	14.21 $\pm$ 0.23	14.34 $\pm$ 0.44	13.47 $\pm$ 0.43	13.81 $\pm$ 0.48	0.864	0.123
Fluquinconazol	9.53 $\pm$ 0.10	9.76 $\pm$ 0.13	9.74 $\pm$ 0.12	9.59 $\pm$ 0.15	9.45 $\pm$ 0.17	0.955	0.078
Boscalid	10.49 $\pm$ 0.11	10.38 $\pm$ 0.18	10.51 $\pm$ 0.16	10.29 $\pm$ 0.13	10.24 $\pm$ 0.09	0.924	0.082
Pyraclostrobin	7.74 $\pm$ 0.09	7.87 $\pm$ 0.09	7.86 $\pm$ 0.11	7.71 $\pm$ 0.12	7.70 $\pm$ 0.14	0.952	0.198

<sup>a</sup>  $b_A$  = Slope of white wine,  $b_B$  = slope of rose wine,  $b_C$  = slope of red wine,  $b_D$  = slope of white must,  $b_E$  = slope of red must.  $S_{bA}$  =  $S_D$  of slope  $b_A$ ,  $S_{bB}$  = SD of slope  $b_B$ ,  $S_{bC}$  = SD of slope  $b_C$ ,  $S_{bD}$  = SD of slope  $b_D$ , and  $S_{bE}$  = SD of slope  $b_E$ .

**Table 5. Individual and global uncertainties for each pesticide expressed as relative measures, calculated at 10 µg/L**

Compounds	Must						Wine							
	Calibration curve		Precision			Global uncertainty	Expanded uncertainty	Calibration curve		Precision			Global uncertainty	Expanded uncertainty
	u <sub>1</sub>	u <sub>2</sub>	u <sub>3</sub>	u <sub>4</sub>	u <sub>5</sub>			U	2U	u <sub>1</sub>	u <sub>2</sub>	u <sub>3</sub>		
Vinclozolin	0.090	0.018	0.024	0.018	0.031	0.102	0.204	0.099	0.016	0.026	0.015	0.026	0.108	0.216
Dichlofluanid	0.092	0.013	0.016	0.022	0.022	0.099	0.198	0.094	0.017	0.013	0.024	0.019	0.101	0.202
Penconazol	0.085	0.008	0.026	0.009	0.022	0.093	0.186	0.061	0.008	0.018	0.009	0.019	0.068	0.136
Captan	0.079	0.014	0.014	0.017	0.022	0.086	0.172	0.082	0.018	0.016	0.023	0.022	0.091	0.182
Quinoxifen	0.061	0.012	0.020	0.011	0.025	0.070	0.140	0.072	0.015	0.015	0.017	0.019	0.079	0.158
Fluquinconazol	0.057	0.009	0.019	0.010	0.022	0.065	0.130	0.060	0.009	0.017	0.012	0.021	0.068	0.136
Boscalid	0.072	0.009	0.023	0.008	0.026	0.081	0.162	0.079	0.014	0.021	0.012	0.023	0.087	0.174
Pyraclostrobin	0.063	0.015	0.023	0.016	0.025	0.075	0.150	0.076	0.010	0.020	0.010	0.020	0.083	0.166

Conversely, water-methanol (9 + 1, v/v) showed recoveries from 78 to 98%, similar to pure water addition. Both mixtures provided similar recoveries, but the addition of a small volume of methanol led to cleanest chromatograms due to the elimination of most methanol-soluble interferences without loss of the target compounds.

Therefore, water-methanol (9 + 1, v/v) was selected for the C<sub>18</sub> cartridge wash step. Different studied volumes of this mixture (2, 5, and 10 mL) showed no significant differences in the final recoveries. However, with volume increases, there were fewer matrix interferences. Therefore, 10 mL of water-methanol (9 + 1, v/v) was chosen as the mixture for solid-phase wash step.

**Breakthrough volume.**—An analysis of variance (ANOVA) performed with the raw data revealed the absence of significant differences ( $P > 0.05$ ) between the assayed volume of sample except for dichlofluanid (when the volume was 100 mL, the recoveries started to diminish in must samples). Thus, this method can be utilized for analyzing samples up to 250 mL of must and wine samples contaminated with these compounds, except for dichlofluanid in must, for which the breakthrough volume was 100 mL.

#### Method Validation

The proposed conditions generated narrow and reproducible

**Table 6. Pesticide concentrations (µg/L) for positive results of the analyzed real samples**

Compound	Must samples			Wine samples	
	Must A	Must B	Must C	Wine A	Wine B
Captan	ND <sup>a</sup>	N.D.	ND	<LOQ <sup>b</sup>	<LOQ <sup>b</sup>
Fluquinconazol	ND	3.8 ± 0.2	ND	ND	<LOQ <sup>c</sup>
Penconazol	ND	5.1 ± 0.4	<LOQ <sup>d</sup>	3.7 ± 0.2	ND
Vinclozolin	4.0 ± 0.3	ND	ND	<LOQ <sup>e</sup>	ND

<sup>a</sup> ND = Not detected.

<sup>b</sup> LOQ = 3.8 µg/L.

<sup>c</sup> LOQ = 2.9 µg/L.

<sup>d</sup> LOQ = 2.1 µg/L.

<sup>e</sup> LOQ = 3.2 µg/L.

chromatographic peaks; no interfering peaks were observed in blank sample chromatograms (Figure 2) of wine and must extracts fortified with the fungicides, proving sufficient selectivity for the analysis of the target fungicides.

The linear ranges and  $r^2$  values, LODs, LOQs, and MRLs in the EU, Switzerland, and Italy are listed in Table 2. Chromatographic response was checked up to approximately 100 µg/L (according to the concentration of each fungicide in the stock solution) with  $r^2 > 0.999$  showing, in all the cases, good linearity for the tested fungicides.

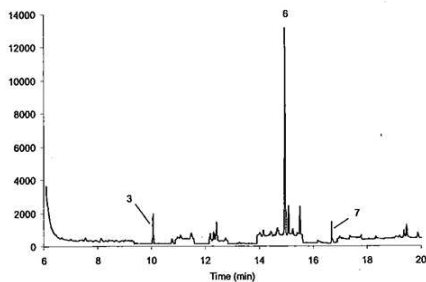
LODs ranged from 0.7 to 1.3 µg/L and 0.4 to 1.5 µg/L for must and wine, respectively. LOQs were between 1.5 and 3.4 µg/L in must and 1.1 to 3.8 µg/L in wine. From these data, it can be shown that, for the majority of the compounds, both limits were similar for must and wine samples. Moreover, LODs and LOQs tested for wines were lower than MRLs established by the EU, Switzerland, or Italy.

Recovery, repeatability expressed as SD, and intermediate precision expressed as HorRat values are summarized in Table 3 for three fortification levels. In all instances, satisfactory results were found, with recovery values between 71 and 106%, not related to the spiking level and complying with the requirements of SANCO/10684/2009 (28). As can be seen in Table 3, RSD values were within the acceptable range of <20%, according to SANCO guidelines. The HorRat values obtained were lower than 0.5 for all the compounds at 10 µg/L. Thus, the method provided a satisfactory level of intralaboratory precision.

#### Matrix Effects

**Matrix effects in GC analysis.**—Table 2 summarizes the ratio values for slopes in sample extracts and solvent. Differences in response were observed for almost all fungicides. Most of them, except pyraclostrobin in wine, displayed enhancement of the signal. Vinclozolin, dichlofluanid, captan, and fluquinconazol showed the highest signal enhancement (ratio values of 1.4) in wine samples, while in must samples, only dichlofluanid showed this value. A Student's *t*-test (34) was done to compare the slope of regression lines in must, wine, and ethyl acetate obtained for each compound studied. The results for this test showed that there were significant differences at the 95% confidence level between the slopes obtained in ethyl acetate and must for all target





**Figure 3.** SIM chromatogram of a real must sample obtained by SPE containing penconazol at a concentration of 5.1 µg/L and fluquinconazol at 3.8 µg/L. For compound identification, see Figure 2.

analytes except captan, quinoxifen, and pyraclostrobin, and only for pyraclostrobin and boscalid in wine samples.

**Matrix effects between samples in the SPE method.**—Table 4 shows the summarized results obtained for each compound in the different matrixes. Certain conclusions may be drawn from a statistical data analysis. First, Levene's test was applied in order to check variance homogeneity; *P*-values higher than 0.05 were obtained in all cases, indicating no statistically significant differences among the variances. According to these results, one-way ANOVA was carried out in order to compare the slopes between must and wine samples. *P*-values higher than 0.05 showed there were no matrix effects between different samples; therefore, the method could be used regardless of the matrix.

#### Uncertainty Evaluation

Global uncertainty of the fungicides evaluated varied up to 11%. The expanded uncertainties ranged from 13.0 to 20.4% and from 13.6 to 21.6% in must and wine samples, respectively. The uncertainty values for all the fungicides were similar in must and wine matrixes, except for penconazol. As seen in Table 5, higher uncertainties were observed for dichlofluand and vinclozolin.

Uncertainties in precision and bias were low (0.8–2.6 and 0.8–3.1%, respectively); however, the uncertainty associated with the calibration curve (in each case, within 5.7–9.9%) contributed considerably toward the global uncertainty. Because the uncertainty level was equal to or below 11% for all the compounds in must and wine samples, the method performance could be considered satisfactory for the whole range of these fungicides.

#### Application to Real Must and Wine Samples

**Samples from local markets.**—Results of the positive analyzed must and wine samples are summarized in Table 6. A chromatogram of a positive real must sample (must B) found to contain penconazol (5.1 ± 0.4 µg/L) and fluquinconazol (3.8 ± 0.2 µg/L) is shown in Figure 3. Confirmation criteria were that the retention times of the compounds in the sample be within ±0.5% of the respective retention times in matrix-matched calibration standards and the intensity ratios  $[I_2]/[I_1]$  and  $[I_3]/[I_1]$

of the target and qualifier ions in the sample be within 20% of the respective ratios in matrix-matched calibration standards (Table 1; 33). The concentrations of the fungicides in musts and wines analyzed were found to be lower than 10 µg/L, and only three fungicides—fluquinconazol, penconazol, and vinclozolin—were determined at concentrations slightly higher than the LOQs (Table 2).

**Vinification process samples.**—The proposed method was applied to determine residues of two new fungicides (boscalid and pyraclostrobin) in musts and wines obtained from red grape samples (cv. Tempranillo). The vinification process with red grapes was performed by following the winemaking process described before. Residue levels of pyraclostrobin and boscalid are presented in Table 7. To determine the dissipation of fungicide residues during the entire process, the total residual concentration present in the sample was calculated. The pesticide concentration present in pressed musts was considered as 100% in each case and the starting point to study the disappearance of the fungicides.

Boscalid and pyraclostrobin concentrations found in must pressed samples were very low. Once the must was pressed, alcoholic fermentation started. This vinification step had a considerable effect on the decrease in these fungicide residues; no residual levels were detected for pyraclostrobin, while the proportion of boscalid remaining in the racked wine was 65%.

Once alcoholic fermentation finished, malolactic fermentation took place. At the end of this step, the reduction of boscalid was 25%. The dissipation in this step was lower than in alcoholic fermentation.

The clarification and filtration processes, the last two winemaking stages, did not play an important role in the reduction of boscalid residues, showing a decrease of 10% for clarification and 7% for filtration. Boscalid concentration remaining in final wine was 8.8 µg/L, much lower than MRLs set in Switzerland and Italy (6–8), as summarized in Table 2.

#### Conclusions

The SPE and GC/MS method described in this paper allows the rapid determination of the fungicides vinclozolin, dichlofluand, penconazol, captan, quinoxifen, fluquinconazol, boscalid, and pyraclostrobin in must and wine samples. The method has been validated according to SANCO/10684/2009 guidelines and global uncertainties have been calculated. The method offers good recoveries, linearity, precision, and accuracy, and is highly sensitive. Matrix effects were overcome by using matrix-matched calibration. The uncertainty associated with the analytical method was lower than 10% for all compounds tested. The different composition of the matrixes, must and wine, does not affect the sensitivity of the method, giving similar LOD and LOQ values for both.

Captan, fluquinconazol, penconazol, and vinclozolin residues were found in five of the 16 analyzed samples. Boscalid and pyraclostrobin concentrations were determined in musts and wines obtained from red grapes previously treated with these substances. A total dissipation of pyraclostrobin was observed, while boscalid residues showed a decrease of 75% during all steps of the winemaking process, including clarification and filtration.

The proposed analytical procedure is low cost, rapid, and easy to perform, and could be utilized for regular monitoring of these pesticide residues to ensure food safety.

**Table 7. Concentration of fungicide residues and percentage remaining (n = 3) in each stage**

Samples	Pyraclostrobin		Boscalid	
	Concn, µg/L	Remaining, %	Concn, µg/L	Remaining, %
Pressed must	29.1 ± 1.2	100 ± 3.7	34.5 ± 1.6	100 ± 3.7
Racked wine	<LOD <sup>a</sup>	<LOD <sup>a</sup>	22.4 ± 1.1	65 ± 4.2
Final malolactic fermentation	<LOD <sup>a</sup>	<LOD <sup>a</sup>	14.6 ± 0.9	42 ± 2.1
Clarified wine	<LOD <sup>a</sup>	<LOD <sup>a</sup>	11.0 ± 0.6	32 ± 2.7
Filtered wine	<LOD <sup>a</sup>	<LOD <sup>a</sup>	8.8 ± 0.8	25 ± 1.3

<sup>a</sup> LOD<sub>wine</sub> = 1.3 mg/L.

### Acknowledgments

We thank the University of La Rioja for the FPI grant to Laura Lagunas-Allué, ADER for the project 2005-I-ID-00065, INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), MEC/FEDER for the AGL2005-02313/ALI project, BASF Española and Bodegas D. Mateos S.L.

### References

- The Australian Wine Research Institute, <https://www.awri.com.au> (accessed July 28, 2011)
- Decreto del Ministerio del Trabajo, de la Salud y de las Políticas Sociales—23 julio 2008. Productos fitosanitarios: actualización del decreto del Ministro de la Salud 27 agosto 2004 concerniente a límites máximos de residuos de las sustancias activas en los productos destinados a la alimentación. Diciannovesima modificación (publicado en la Gaceta Oficial n. 265 del 12 noviembre 2008)
- Decreto del Ministerio de la Salud—19 abril 2006. Productos fitosanitarios: recepción de las directivas 2005/70/CE, 2005/74/CE y 2005/76/CE de la Comisión y actualización del decreto del Ministro de la Salud 27 agosto 2004 concerniente a límites máximos de residuos de las sustancias activas en los productos destinados a la alimentación (publicado en la Gaceta Oficial n. 162 del 14 julio 2006)
- Ordonnance du DFI sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC, RS 817.021.23) du 26 juin 1995 (Etat le 1<sup>er</sup> janvier 2009)
- Economou, A., Boitsi, H., Antoniou, S., & Tsiipi, D. (2009) *J. Chromatogr. A* **1216**, 5856–5867. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.031>
- Vaquero-Fernández, L., Sanz-Asensio, J., López-Alonso, M., & Martínez-Soria, M.T. (2009) *Anal. Lett.* **42**, 1761–1783. <http://dx.doi.org/10.1080/00032710903060644>
- De Melo Abreu, S., Correia, M., Herbert, P., Santos, L., & Alves, A. (2005) *Food Addit. Contam.* **22**, 549–556. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030500137918>
- Vaquero-Fernández, L., Sanz-Asensio, J., López-Alonso, M., & Martínez-Soria, M.T. (2009) *J. Sci. Food Agric.* **89**, 750–757. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.3508>
- Garbi, A., Sakkas, V., Fiamingos, Y.C., Stalikas, C.D., & Albanis, T. (2010) *Talanta* **82**, 1286–1291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.06.046>
- Jiang, Y., Li, X., Xu, J., Pan, C., Zhang, J., & Niu, W. (2009) *Food Addit. Contam.* **26**, 859–866. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030902822794>
- Martins, J., Esteves, C., Simoes, T., Correia, M., & Delerue-Matos, C. (2010) *J. Agric. Food Chem.* **59**, 6847–6855
- Hayasaka, Y., MacNamara, K., Baldock, G.A., Taylor, R.L., & Pollnitz, A.P. (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* **375**, 948–955
- Ravelo-Pérez, L.M., Hernández-Borges, J., Borges-Miguel, T.M., & Rodríguez-Delgado, M.A. (2007) *Electrophoresis* **28**, 4072–4081. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200700251>
- Urruty, L., & Montury, M. (1996) *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3871–3877. <http://dx.doi.org/10.1021/jf960039g>
- Lambropoulou, D.A., Konstantinou, I.K., & Albanis, T.A. (2000) *J. Chromatogr. A* **893**, 143–156. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00750-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00750-0)
- Viñas, P., Aguinaga, N., Campillo, N., & Hernández-Córdoba, M. (2008) *J. Chromatogr. A* **1194**, 178–183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.039>
- Patil, S.H., Banerjee, K., Dasgupta, S., Oulkar, D.P., Patil, S.B., Jadhav, M.R., Savant, R.H., Adsule, P.G., & Deshmukh, M.B. (2009) *J. Chromatogr. A* **1216**, 2307–2319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.091>
- Braga, J.W.B., Bottoli, C.B.G., Jardim, I.C.S.F., Goicoechea, H.C., Olivieri, A.C., & Poppi, R.J. (2007) *J. Chromatogr. A* **1148**, 200–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.018>
- Soleas, G.J., Yana, J., Hom, K., & Goldberg, D.M. (2000) *J. Chromatogr. A* **882**, 205–212. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00254-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00254-5)
- Montes, R., Rodríguez, I., Ramil, M., Rubi, E., & Cela, R. (2009) *J. Chromatogr. A* **1216**, 5459–5466. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.048>
- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Arias, E., & Bernal, J. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 657–663. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1383>
- Matisová, E., Kakalíková, L., Lesko, J., & de Zeeuw, J. (1996) *J. Chromatogr. A* **754**, 445–454. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00326-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00326-3)
- Pang, G.F., Fan, C.L., Liu, Y.M., Ca, Y.Z., Zhang, J.J., Fu, B.L., Li, X.M., & Wu, Y.P. (2006) *Food Addit. Contam.* **23**, 777–810. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030600657997>
- Saito, Y., Yamamoto, A., Kodama, S., Ohto, M., Ohura, T., & Matsunaga, A. (2000) *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **41**, 321–325. <http://dx.doi.org/10.3358/shokueishi.41.321>
- González-Rodríguez, R.M., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2009) *J. Chromatogr. A* **1216**, 6033–6042. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.046>
- Hennion, M.C. (1991) *Trends Anal. Chem.* **10**, 317–323. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-9936\(91\)87007-S](http://dx.doi.org/10.1016/0165-9936(91)87007-S)
- Dopico-García, M.S., López-Vilarinho, J.M., & González-Rodríguez, M.V. (2005) *Talanta* **66**, 1103–1107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.01.050>
- SANCO/10684/2009, *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, Uppsala, Sweden
- EURACHEM/CITAC Guide CG 4 *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement* (2000) 2nd Ed., London, UK
- Ribani, M., Grespan-Botolli, C.B., Collins, C.H., & Sales-Fontes, I.C. (2004) *Quim. Nova* **27**, 771–780. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Horwitz, W., & Albert, R. (2006) *J. AOAC Int.* **89**, 1095–1109
- Banerjee, K., Oulkar, D.P., Patil, S.B., Jadhav, M.R., Dasgupta, S., Patil, S.H., Bal, S., & Adsule, P.G. (2009) *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4068–4078. <http://dx.doi.org/10.1021/jf900358r>
- Radšić, M., Grujić, S., Vasiljević, T., & Laušević, M. (2009) *Food Chem.* **113**, 712–719. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.103>
- Kleinbaum, D., Kupper, L., & Muller, K. (1998) *Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods*, 3rd Ed., Duxbury Press, Boston, MA





**ANEXO II. Validation of a microwave-assisted extraction  
gas chromatography detection method for the  
determination of fungicides in grapes**

---



## Validation of a microwave-assisted extraction gas chromatography detection method for the determination of fungicides in grapes†

L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio and M. T. Martínez-Soria\*

Received 6th July 2011, Accepted 21st September 2011

DOI: 10.1039/c1ay05406f

A microwave assisted extraction (MAE) method was developed for the simultaneous extraction of eight pesticides, vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, captan, quinoxyfen, fluquinconazole, boscalid and pyraclostrobin, in grapes. The different parameters affecting the MAE method, such as temperature, extraction time and nature and volume of the extraction solvent, were evaluated. The experimental procedure was optimized using a multivariate statistical approach and the final analyses were carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). These eight fungicides could be efficiently extracted from 2.0 g of grapes with 10 mL of hexane/acetone (1 : 1, v/v) mixture at 105 °C in 10 minutes with microwave power set at 100% (600 W). Using the optimized conditions, the method was validated in terms of accuracy and precision. A matrix effect study was also carried out using different grape samples. Recoveries from spiked grape samples ranged from 82 to 107% and relative standard deviations were less than 10%. Detection and quantification limits ranged from 0.7 to 1.7 µg kg<sup>-1</sup> and 2.2 to 5.8 µg kg<sup>-1</sup>, respectively, which were lower than the maximum residue limits of the pesticides in grape samples established by the European Union. Uncertainty assessment of measurement obtained by applying the proposed analytical method was estimated according to EURACHEM/CITAC guide. The expanded uncertainties were below 26% and 7% at two concentration levels, 10 and 50 µg kg<sup>-1</sup>, respectively.

### 1. Introduction

Grey mold (*Botrytis cinerea*), powdery mildew (*Uncinula necator*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*) are the most common fungi encountered in vineyards control. Different kinds of fungicides are widely used in the treatment of diseases of grapes. The use of these substances provides unquestionable benefits in providing a plentiful, low-cost supply of high-quality fruits and vegetables, but unfortunately, their incorrect application may leave harmful residues, which involve possible health risk.<sup>1-3</sup> Their toxicity makes it necessary to analyse pesticide residues in grapes intended for human consumption.<sup>4-6</sup> In recent years, more and more attention has been paid to this issue and many countries have established more rigid maximum residue limits (MRLs) for the pesticides in grapes. Table 1 shows the structures of pesticides studied and the established MRLs by the European legislation in grapes.

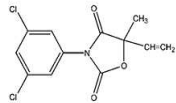
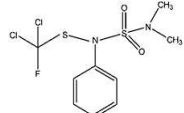
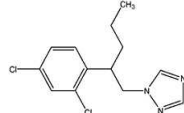
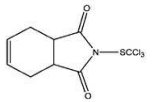
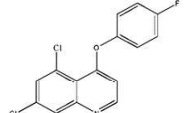
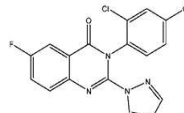
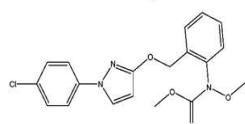
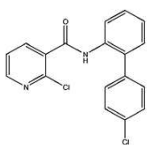
These MRLs make necessary the development of highly sensitive multiresidue methods to analyze pesticides in different sample matrices. The analytical methods used to monitor pesticide residues require the extraction and isolation of pesticides

from the studied matrix and a final determination with chromatographic procedures. The extraction methods for the target fungicides proposed in the literature were based on a simple one step solid-liquid extraction (SLE) or QuEChERS with: acetone/dichloromethane for dichlofluanid, captan, penconazole and vinclozolin or captan with acetone/petroleum ether (40–60 °C) (50 : 50, v/v) in grapes, must and wine samples;<sup>7,8</sup> acetone/dichloromethane/light petroleum for 171 pesticides and metabolites (including boscalid, dichlofluanid, fluquinconazole, penconazole and pyraclostrobin) in crops (fruits, vegetables and cereals);<sup>9</sup> hexane/ethyl acetate for the extraction of penconazole and quinoxyfen from grapes, must and wine during the wine-making process<sup>10</sup> and single organic solvents like ethyl acetate (10 mL) for dichlofluanid, penconazole and pyraclostrobin residues in grapes,<sup>11</sup> hexane (10 mL) for quinoxyfen in grapes, must and wine<sup>12</sup> or acetonitrile (10–15 mL) for fluquinconazole, penconazole, pyraclostrobin, quinoxyfen and vinclozolin in grape, lemon, onion and tomato samples<sup>13</sup> and for 140 pesticides including dichlofluanid, captan, penconazole, quinoxyfen and vinclozolin in cereals.<sup>14</sup> Chromatographic separation and identification were achieved by gas chromatography (GC) with mass spectrometric (MS), MS/MS detection, nitrogen-phosphorus (NPD) or electron-capture (ECD)<sup>7,10,12-14</sup> detection, and liquid chromatography (LC) with diode-array (DAD), ultraviolet (UV) or MS.<sup>8,9,11,13,15</sup>

Departamento de Química Analítica, Department of Chemistry, Universidad de La Rioja, Madre de Dios, 51, La Rioja, 26006 Logroño, Spain. E-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es; Fax: +34 941299621; Tel: +34 941 299 629

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c1ay05406f

**Table 1** Family, chemical structure and MRLs of target compounds in grapes

Family	Common name	Chemical structure	MRL <sub>grapes</sub> <sup>a</sup> /μg kg <sup>-1</sup>
Dicarboximide fungicides	Vinclozolin		5000
Phenylsulfamide fungicides	Dichlofluaniid		10 <sup>b</sup>
Triazole fungicides	Penconazole		200
Phthalimide fungicides	Captan		20
Quinoline fungicides	Quinoxifen		1000
Conazole fungicides	Fluquinconazole		50
Strobilurin fungicides	Pyraclostrobin		2000
Anilide fungicides	Boscalid		5000

<sup>a</sup> By European legislation. <sup>b</sup> Excluded from the Annex I of the Directive 91/414/EEC. Default MRL of 10 μg kg<sup>-1</sup>.

These techniques are widely used to analyze contaminants in foods but they are time-consuming. In the last few years, new analytical procedures have recently been developed for the determination of pesticides in food and environmental

samples. These new techniques have advantages over conventional methods with respect to solvent consumption, time of analysis, sample amount requirements and automation feasibilities.

Microwave assisted extraction (MAE) is known as a more environmentally friendly process with economic advantages than the current extraction methods<sup>16,17</sup> used for the simultaneous determination of pesticides from semisolid and solid samples such as soil, sediments, and plants.<sup>18–20</sup> The main virtue of MAE is the reduction of extraction time and organic solvents but first, several operational parameters should be optimized such as extraction temperature, extraction time, *etc.* For this purpose, the use of experimental designs offers a number of advantages for the optimization process, including most notably that a lower number of experiments can provide more information and it is possible to study interaction effects between variables.

In spite of the great number of MAE publications, no further publications regarding MAE extraction have been published for vinclozolin, dichlofluanid, captan, penconazole, quinoxifen, fluquinconazole, boscalid and pyraclostrobin in fruits and vegetables. Therefore, the aim of this work was to develop a fast and sensitive determination method based on MAE for the quantitative and selective determination of vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, captan, quinoxifen, fluquinconazole, boscalid and pyraclostrobin residues from grape samples using GC-MS detection.

The optimization of the significant variables involved in the extraction processes was carried out by experimental design. A fractional factorial design was performed to evaluate the significant variables and interactions and a central composite design was carried out in order to optimize extraction conditions. Once the best working conditions had been selected, the performance characteristics were established in terms of linearity, precision, uncertainty and detection and quantification limits. Recoveries were checked by a recovery study with spiked samples. Finally, different grape samples collected in La Rioja were analyzed in order to assess sample matrix effects.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Pesticide analytical standards of penconazole, captan, dichlofluanid, vinclozolin, pyraclostrobin, boscalid, fluquinconazole and quinoxifen with purity higher than 99.0% were supplied by Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Tetradifon was acquired from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) with a purity of 99.5% and was used as internal standard (IS).

Anhydrous sodium sulfate, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (99.5%), and glass wool were supplied from Scharlab (Barcelona, Spain).

HPLC grade ethyl acetate, methanol, acetone, *n*-hexane, acetonitrile and dichloromethane were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained in a Milli-RO plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

### 2.2. Standard preparation

Fungicide stock solutions (*ca.* 500 mg L<sup>-1</sup>) and intermediary solutions (10 and 1 mg L<sup>-1</sup>) were prepared in methanol. Stock and intermediary standard solutions of the IS, tetradifon, were prepared in the same way in ethyl acetate. All standard solutions were stored at -20 °C. They were stable over a period of at least three months. Standard working mixtures were prepared by

appropriate dilution of the intermediary solutions with methanol and stored at 4 °C for seven days. These standard working mixtures were used to spike grape samples.

### 2.3. Sample preparation

Sample preparation is an essential part of a solvent extraction procedure. For an efficient extraction to occur, solvents must make contact with the target analytes, so high surface areas are recommended.

Red grapes were purchased from *cv.* Tempranillo grapevines of Qualified Designation of Origin Rioja at vineyard in Aldeanueva de Ebro, La Rioja, Spain. These vines had not been treated with phytosanitary products. Several bunches of grapes (approximately 2 kg) were bought in the supermarket for each real sample. Later, the quartering method was carried out up to the final weight 100 grams, so we consider the sample was representative. These samples were chopped into small pieces in a glass and homogenized using a crusher (Heidolph Silent-Crusher M, Schwabach, Germany) and spiked with penconazole, captan, dichlofluanid, vinclozolin, pyraclostrobin, boscalid, fluquinconazole and quinoxifen. These samples were allowed to stand 72 hours. After this time, the sample was homogenized (juice included) and put into the extraction vessels.

### 2.4. MAE extraction

MAE experiments were performed using an MARS-microwave sample preparation unit (CEM, Corp., Matthews, N.C.) equipped with a solvent detector. The MARS was able to simultaneously extract forty-eight solid samples in a Teflon-lined extraction vessel (volume of 50 mL) under identical extraction conditions (temperature and pressure). Samples were accurately weighed (2.0 g) into the PTFE-lined extraction vessel. Subsequently, 10 mL of hexane/acetone (1 : 1) mixture were added as an extraction solvent. The oven was set to a power of 600 W, ramped to 105 °C within 5 min, and held at this temperature for 10 min while stirring at the highest setting. After extraction, the vessels were cooled to room temperature before being opened. Next, the water of the supernatant from each vessel was removed using anhydrous sodium sulfate and was filtered through glass wool. The residue was rinsed three times with 2 mL of hexane/acetone (1 : 1, v/v) and combined with the supernatant. Finally, the extracts were evaporated using a low volume concentrator (Zymark TurboVap II Vortex evaporator, Hopkinton, MA, USA) under a gentle stream of nitrogen evaporator and adjusted to a final volume of 5 mL with hexane/acetone (1 : 1, v/v). Tetradifon was added as internal standard at a concentration of 100 µg L<sup>-1</sup>.

### 2.5. Method validation

Validation was performed according to guide SANCO/10684/2009 (ref. 21) concerning the performance of methods for pesticide residue monitoring. Performance characteristics studied were matrix effect, linearity, limits of detection/quantification, recovery and precision. Decision limit and detection capability were calculated according to Decision 2002/657/EC.<sup>22</sup> An uncertainty evaluation was also carried out.



### 2.5.1. Matrix effect assessment

**Matrix-effect in GC analysis.** Determination of pesticide residues in food matrices may be adversely affected by a phenomenon commonly known as “matrix-effect chromatography”.<sup>23–25</sup> Some factors such as the nature of pesticide, the nature of the matrix, and the pesticide-to-matrix ratio may affect the sample matrix effect induced. In GC, this phenomenon occurs in the injector port, in the separative system (retention gap and/or analytical column) and also causes ionization potential modification of analytes. The main consequence of the matrix effect is an increasing (ion enhancement) or decreasing analyte signal (ion suppression) in the presence of the matrix (real sample) with respect to the same analyte in solvent (standard solution).<sup>26,27</sup> The matrix effect was evaluated by comparison of the slope of a calibration graph based on the matrix-matched standards of grapes with the slope of the pure solvent based calibration graph.

**Matrix effects between samples in the MAE method.** Four varieties of grapes (*cv.* Tempranillo, used during the method performance, *cv.* Grenache, *cv.* White Grenache and *cv.* Viura) collected at different vineyards of La Rioja were examined to study the matrix effect. It was initially confirmed that all grape samples were not contaminated with the studied fungicides. Once chopped and homogenized, all the samples were spiked at a level of 50 µg kg<sup>-1</sup> and treated following the experimental procedure described. Triplicate analyses were performed for each grape sample.

Quantification was performed using the calibration line for each fungicide. The concentrations obtained for each target compound in the four varieties after MAE were compared statistically using an analysis of variance (ANOVA).

**2.5.2. Linearity.** A matrix matched calibration was used to minimize error. Untreated grape samples were subjected to the optimized extraction method. These blank extracts were spiked with six different levels of concentration for each analyte. The quantification was based on the internal calibration graph obtained by the least squares method using the fungicide to the internal standard peak area ratio for each compound.

**2.5.3. LOD and LOQ.** The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of the overall method were calculated as the concentration giving a signal-to-noise ratio of three ( $S/N = 3$ ) and ten ( $S/N = 10$ ), respectively. These limits were estimated using the MAE extract of a grape sample spiked at 10 µg kg<sup>-1</sup>.

**2.5.4. Decision limit and detection capability ( $CC\alpha$  and  $CC\beta$ ).** Decision 2002/657/EC,<sup>22</sup> to ensure both the quality and the correct interpretation of the analytical results attained by control official laboratories, introduces two new parameters,  $CC\alpha$  (decision limit) and  $CC\beta$  (detection capability), that replace the old concepts of limit of detection and limit of quantification.  $CC\alpha$  was defined as the limit above which samples are concluded to be noncompliant, with an error probability  $\alpha$  of 5%, while  $CC\beta$  was defined as the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability  $\beta$  of 5%.

There are different ways of calculating the decision limit and the detection capability for substances with a permitted limit established. In this case,  $CC\alpha$  and  $CC\beta$  were determined by analysing 20 blank grape samples spiked with the analyte(s) at the LOQ calculated and at the decision limit, respectively.

**2.5.5. Recovery.** A recovery study was performed to evaluate the bias of the method by applying the optimized MAE method to the extraction of residue free grapes samples spiked at two levels of concentration, 10 and 50 µg kg<sup>-1</sup> in ten replicates. Quantification in the recovery samples was performed using matrix-matched standards. Results from fortification studies were statistically analyzed using Excel to calculate average recovery of each pesticide and their standard deviations.

**2.5.6. Precision.** Precision was assessed by analyzing spiked grape samples containing known concentrations of the investigated pesticides. Method precision was studied within-a-day (repeatability) and among-days (intermediate precision) at two fortification levels (10 and 50 µg kg<sup>-1</sup>) for all compounds by calculating the relative standard deviation (RSD). Horwitz ratio (HorRat) pertaining to intra-laboratory precision, which indicates the acceptability of a method with respect to precision,<sup>28</sup> was calculated for all the pesticides in the following way:

$$\text{HorRat} = \text{RSD}/\text{Prsd} \quad (1)$$

where RSD stands for relative standard deviation and Prsd is the predicted relative standard deviation.  $\text{Prsd} = 2C^{-0.13}$ , where  $C$  is the concentration expressed as mass fraction.

**2.5.7. Uncertainty evaluation.** The uncertainty of measurement obtained by applying the proposed analytical method was estimated using the bottom-up approach on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC guide.<sup>29</sup> Uncertainty associated with standard preparation ( $u_1$ ), uncertainty associated with calibration curve ( $u_2$ ), uncertainty associated with precision ( $u_3$ ) and uncertainty associated with accuracy ( $u_4$ ) were evaluated for all the target compounds at two spiking levels. The combined uncertainty ( $u_c$ ) was calculated as:

$$u_c(y) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_4^2}$$

and reported as expanded uncertainty ( $U$ ) which provides an interval within which the value of the measure is believed to lie with a higher level of confidence.  $U$  was obtained by multiplying  $u_c(y)$ , the combined standard uncertainty, by a coverage factor  $k$  ( $U = u_c(y) \times k$ ). The choice of the factor  $k$  was based on the level of confidence desired. For a level of confidence of 95%, the  $k$  value used was 2.

## 2.6. Chromatographic conditions

GC separation was performed using an Agilent Technologies GC 6890N coupled to a 5975C MS mass selective detector. Chromatographic separations were done by using a HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm film thickness).

The initial oven temperature was set at 100 °C, increased to 185 °C at 40 °C min<sup>-1</sup> and kept for 5 min, increased at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup> to 300 °C, held for 3 min. The volume of the sample

was 2  $\mu\text{L}$ , injected in splitless mode. The injector temperature was set at 250  $^{\circ}\text{C}$ . Helium (99.999% purity) was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.5  $\text{mL min}^{-1}$ . The mass spectrometer was operated in electron ionization (70 eV), with 6 min solvent delay. The interface temperature was kept at 310  $^{\circ}\text{C}$  and the ion source temperature was kept at 230  $^{\circ}\text{C}$ . The dwell time for ion monitoring was 100 ms per ion. Selected monitoring ion (SIM) mode was used (198, 212 and 285  $m/z$  for vinclozolin; 123, 167, and 224  $m/z$  for dichlofluanid; 159 and 248  $m/z$  for penconazole; 79 and 149  $m/z$  for captan; 237, 272 and 307  $m/z$  for quinoxifen; 111, 159 and 356  $m/z$  for tetradifon; 108 and 340  $m/z$  for fluquinconazole; 112, 140 and 342  $m/z$  for boscalid; 132, 164, and 325  $m/z$  for pyraclostrobin).

## 2.7. Data analysis

The StatGraphics Centurion Version XV was used to generate the experimental designs and data processing.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of MAE procedure

**3.1.1. Preliminary experiments.** The major parameters affecting the pesticide extraction efficiency by MAE are temperature, extraction time, nature and solvent volume. Preliminary investigations were performed to choose the extraction solvent. For an efficient extraction, the solvent must be able to solute the target compounds while leaving the sample matrix intact. The polarity of the extraction solvent should closely match that of the target analytes. In order to evaluate the extraction solvent efficiency, samples were extracted with acetonitrile, acetone, hexane/ethyl acetate (1 : 1, v/v), dichloromethane/ethyl acetate (1 : 1, v/v) and hexane/acetone (1 : 1, v/v). In the case of acetonitrile and acetone the extract collected contained a large amount of interferences as evidenced by the colour of the residue obtained after solvent evaporation, although recovery values obtained were >70% for almost all the analytes. On the other hand, hexane/ethyl acetate (1 : 1, v/v) and dichloromethane/ethyl acetate (1 : 1) tested as elution solvent produce lower recoveries (<60%) for some pesticides. The mixture hexane/acetone (1 : 1) provided the best recoveries of the pesticides and the cleanest chromatograms.

**3.1.2. Screening design.** A factorial design was performed to study the influence of several factors on the MAE procedure and to search the optimal experimental conditions. Four variables were selected to define the experimental field: temperature (*A*), extraction time (*B*), % hexane (in the mixture hexane/acetone) (*C*) and solvent volume (*D*). Table 2 summarizes the two levels for each factor involved in the design which corresponded to the minimum and maximum values of the ranges investigated.

A  $2^{4-1}$  fractional factorial design was applied to evaluate the main effects. The factorial design raised in this study has resolution IV. This design is capable of obtaining clear estimates of all main effects. However, some or all of the two-factor interactions are confounded with other two-factor interactions or block effects. In this manner, it was possible to screen four factors without performing a very large number of experiments. Table 3 shows the completed matrix design. The  $2^{4-1}$  fractional

**Table 2** Factors and levels considered in the  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design

Factor	Code	Low level (-)	High level (+)
Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	A	70	120
Time/minutes	B	2	10
% Hexane	C	40	80
Solvent volume/mL	D	5	20

factorial design, which involved 11 experiments, was performed in duplicate and randomly in order to avoid strange effects. All experiments were carried out with grapes spiked at 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  with each studied pesticide and 2.0 g as the sample weight. A preliminary set of experiments was performed for the extraction temperature. When the temperature was above 120  $^{\circ}\text{C}$ , solvent evaporation was observed. Thus, the experimental design range was set to 70–120  $^{\circ}\text{C}$ . The amounts of grape sample and variable (B, C and D) levels were selected on the basis of the literature about MAE extractions of pesticides from vegetable and food matrices.<sup>30,31</sup>

Once all the experiments had been carried out, the data were processed and evaluated. The analysis of variance (ANOVA) was carried out for each compound (data not shown).  $R^2$  values showed that the adjusted model accounted for 94–98% of the variance of the peak area. Pareto charts were also obtained. For the sake of simplicity only Pareto charts for boscalid and captan are included in Fig. 1, showing the general behaviour (all the pesticides considered exhibited the same behaviour except captan). The Pareto charts illustrate the influence (proportional to the bar lengths) that each variable (main effect) has on the response of some of the studied pesticides. These charts also include a vertical line corresponding to the 95% confidence interval. The main effects or interactions exceeding this reference line may be considered statistically significant. Factors with a negligible effect on the response at a significance level of 95% were screened out. The signs + and - represent positive and negative effects, respectively. The positive effect indicates that extraction is better at high levels of the respective variables within the range studied while the negative effect indicates that extraction is better at low levels.

**Table 3** Design matrix of the  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design

Run	Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	Time/minutes	% Hexane	
			Hexane	Solvent volume/mL
1	95	6	60	12.5
2	70	2	80	20
3	120	2	80	5
4	120	10	80	20
5	70	2	40	5
6	120	2	40	20
7	70	10	40	20
8	95	6	60	12.5
9	70	10	80	5
10	120	10	40	5
11	95	6	60	12.5



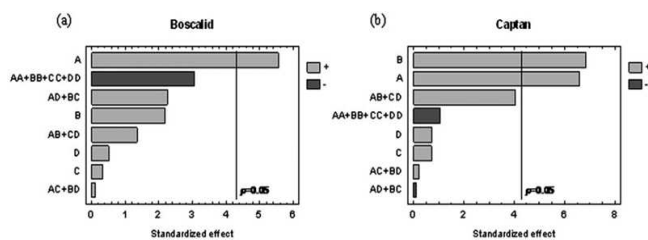


Fig. 1 Pareto charts for selected pesticides obtained from the  $2^{4-1}$  fractional factorial experimental design: boscalid (a) and captan (b). (A) temperature, (B) extraction time, (C) % hexane, and (D) solvent volume. Vertical lines define the 95% confidence interval.

As can be seen in Fig. 1, % hexane and solvent volume had little influence on the pesticide extraction efficiency. In MAE, the extraction temperature is one of the most relevant parameters to optimize. For all target pesticides, temperature was a significant factor and as expected, it caused higher yields when it was used at high level. Finally, a positive influence of extraction time was confirmed just for captan. For other compounds, a higher extraction time led to higher chromatographic responses, but was not a significant variable. Therefore, optimization of these two significant factors was carried out.

**3.1.3. Central composite design.** On the basis of the results of the fractional factorial design, the variables *C* and *D* were considered as non-relevant and were therefore fixed at 50% hexane (in the mixture hexane/acetone) and 10 mL, respectively. The two remaining variables (*A* and *B*) were studied according to a central composite design (CCD) consisting of a factorial design  $2^2$  with four star points located at  $\pm\alpha$  from the centre of the experimental domain. The value of the axial distance  $\alpha$  for this design was 1.414 in order to establish the rotatability condition. The design was also completed with eight experiments at the central point (orthogonality condition). Therefore, the complete design consisted of 16 randomly performed experiments. The range of the variables was changed according to the results of the fractional factorial design. The influence of temperature (*A*) was studied at 80 °C (low level) and 120 °C (high level) and 2 minutes and 14 minutes were considered as high and low levels, respectively, for time extraction (*B*). The design matrix is shown in Table 4. All the experiments were carried out using 2.0 g of sample spiked at 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 10 mL of hexane/acetone (1 : 1).

In order to determine the optimal values for the two variables studied, the response surfaces and the main effect plots were drawn for all the compounds. Fig. 2 shows, as an example, the main effect plots and the response surfaces obtained for captan and boscalid. Generally, most of the pesticides showed a similar behaviour related to the most suitable extraction conditions. The response surfaces for the other pesticides (except dichlofluanid) were similar to that for boscalid. Analyzing the surface responses and the main effect plots it was found that the extraction of these compounds was favoured at high temperature and time values.

Determination coefficients obtained showed that the model accounted for 88% (boscalid and vinclozolin) to 95% (fluquinconazole). An ANOVA test was used to assess whether factors or interactions showed a statistically significant

contribution to the variance of the response. Results of ANOVA are shown in Table 5 where *F*-ratios and *p*-values are given. The *F*-ratio measures the contribution of each factor and interaction on the variance of the response while the *p*-value tests the statistical significance of each factor and interaction. At a 95% confidence level, a main factor or a factor interaction is statistically significant when its *p*-value is lower than 0.05. The results revealed that temperature was the most important variable affecting extraction efficiency and this factor was significant for all pesticides. On the other hand, the extraction time was significant only for captan. As regards the interaction between the temperature and extraction time, it was significant only for pyraclostrobin and fluquinconazole. These interaction plots are illustrated in Fig. 3a and b, respectively.

For other target compounds, Fig. 3c illustrates an example (interaction plot for vinclozolin) showing the general behaviour except for captan. The interaction plot for captan (Fig. 3d) clearly shows that high temperature values lead to more efficient extractions. The same conclusion regarding the most satisfactory temperatures is drawn from Fig. 3c in which it is confirmed that 14 min for extraction time instead of 2 min does not change the obtained responses (not extraction time influence). However, when captan is analyzed, a significant response improvement was

Table 4 Matrix of the  $2^2$  central composite experimental design

Run	Temperature/°C	Time/min
1	120	8
2	114	12
3 (C)	100	8
4 (C)	100	8
5	86	12
6 (C)	100	8
7	100	14
8 (C)	100	8
9 (C)	100	8
10	86	4
11	80	8
12	114	4
13 (C)	100	8
14	100	2
15 (C)	100	8
16 (C)	100	8

(C), central point

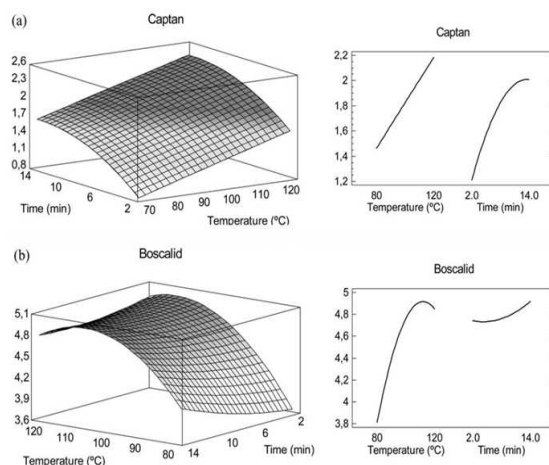


Fig. 2 Main effect plots and response surfaces estimated from the central composite experimental design by plotting temperature versus extraction time for: captan (a) and boscalid (b).

observed after 14 min of extraction. Therefore, it can be seen that extraction time was only significant for this fungicide.

Because of these different behaviours obtained for studied compounds, the overall desirability function was calculated as the geometric mean of the normalised individual response functions in order to determine the optimal values for the two variables. Fig. 4 shows the temperature–extraction time plot. As can be seen, the overall optimum was located at 105 °C and 10 minutes for the extraction temperature and time, respectively. These conditions were selected for further experiments.

### 3.2. Performance characteristics

With the aim of verifying that the MAE and GC-MS developed method was suitable for the quantitative determination of pesticides in grapes, method quality parameters were estimated (Table 6).

### 3.2.1. Matrix effect assessment

*Matrix-effect in GC analysis.* The matrix effect was evaluated by comparison of the slope of a calibration graph based on the matrix-matched standards of grapes with the slope of the pure solvent based calibration graph. A higher slope of the matrix calibration indicates matrix-induced signal enhancement, whereas a lower slope represents signal suppressions. Tetradifon (IS) was added to both calibration solutions.

Table 6 summarizes the ratio values for slopes in grape samples and solvent. Differences in response were observed for almost all pesticides. Most of them, except fluquinconazole, displayed the enhancement of the signal. Vinclozolin showed the highest signal enhancement (ratio value of 2.0). A Student's *t*-test was made to compare the slopes of the lines of regression (in grapes and hexane/acetone (1 : 1)) obtained for each compound studied. The results for this test showed that there were significant differences at the 95% confidence level between the slopes

Table 5 ANOVA results showing the significance of main effects and interactions (in bold significant effects at 95% confidence level)

	Factors				Interactions					
	A <sup>a</sup>		B <sup>b</sup>		AA		AB		BB	
	F-Ratio	p-Value	F-Ratio	p-Value	F-Ratio	p-Value	F-Ratio	p-Value	F-Ratio	p-Value
Vinclozolin	63.45	<b>0.00</b>	1.30	0.28	14.33	<b>0.00</b>	0.01	0.92	0.20	0.66
Dichlofluanid	12.95	<b>0.00</b>	2.89	0.12	2.61	0.14	0.36	0.56	0.06	0.81
Penconazole	97.13	<b>0.00</b>	0.17	0.69	41.17	<b>0.00</b>	0.07	0.80	4.73	0.06
Captan	5.27	<b>0.04</b>	6.45	<b>0.03</b>	0.00	0.99	0.00	0.96	1.87	0.20
Quinoxifen	79.02	<b>0.00</b>	0.23	0.64	33.54	<b>0.00</b>	4.09	0.07	3.30	0.10
Fluquinconazole	87.34	<b>0.00</b>	0.77	0.40	83.11	<b>0.00</b>	9.19	<b>0.01</b>	2.75	0.13
Boscalid	42.46	<b>0.00</b>	1.20	0.30	29.15	<b>0.00</b>	1.36	0.27	0.74	0.41
Pyraclostrobin	118.15	<b>0.00</b>	0.54	0.48	37.29	<b>0.00</b>	14.13	<b>0.00</b>	1.05	0.33

<sup>a</sup> A, temperature. <sup>b</sup> B, time.

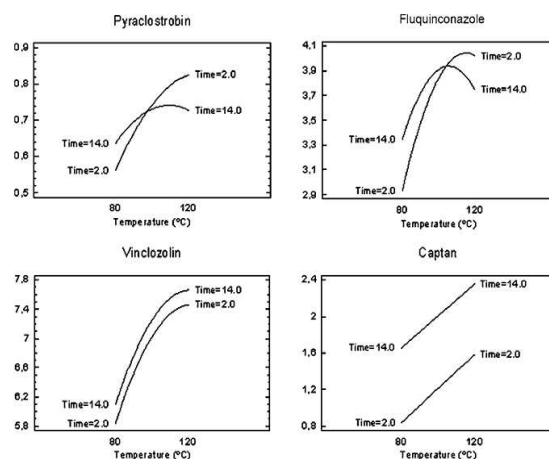


Fig. 3 Interaction between extraction time and temperature: significant interactions for pyraclostrobin (a) and fluquinconazole (b). Non-significant interaction plots for some representative compounds: vinclozolin (c) and captan (d).

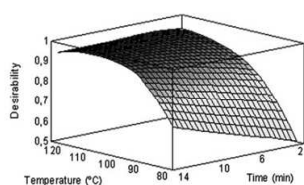


Fig. 4 Desirability function for temperature and extraction time.

obtained in solvent and grapes for all target analytes, except fluquinconazole and boscalid.

*Matrix effects between samples in the MAE method.* An analysis of variance performed with the raw data revealed the absence of significant differences ( $p > 0.05$ ) between the types of

grapes for all fungicides. The observed variability (RSD) between the analyzed spiked grape samples was in general lower than 10% that can be attributed to the experimental error (see Table 6), revealing the absence of the matrix effect when a MAE and GC-MS method is employed for extracting dichlofluanid, vinclozolin, penconazole, captan, quinoxifen, fluquinconazole, boscalid and pyraclostrobin from grapes. These results demonstrate that the developed method allows the quantification of the target compounds in grape samples of different variety.

**3.2.2. Linearity.** Linearity was checked up to  $5000 \mu\text{g kg}^{-1}$  for all the compounds. The calibration curves were linear in this range with determination coefficients higher than 0.99 but due to the low concentrations expected in real samples, the calibration standards used for the validation of the proposed method ranged between close to each LOQ to one hundred  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Good linearity was achieved, the coefficients varying between 0.999 and 0.9996 (Table 6).

Table 6 Performance characteristics of the proposed method for fungicides in grapes

Compound	Linear range/ $\mu\text{g kg}^{-1}$	$r^2$	LOD/ $\mu\text{g kg}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g kg}^{-1}$	CC $\alpha$ / $\mu\text{g kg}^{-1}$	CC $\beta$ / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Recovery $\pm$ repeatability (RSD, %) <sup>a</sup>		HorRat (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	HorRat (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Slope ratio (grape extract/ solvent)
							10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$			
Vinclozolin	5–110	0.9995	1.3	4.4	5.1	5.9	100 $\pm$ 6	93 $\pm$ 4	0.23	0.31	2.0
Dichlofluanid	3–105	0.999	0.9	3.1	3.6	3.9	83 $\pm$ 5	82 $\pm$ 4	0.33	0.35	1.5
Penconazole	4–125	0.9992	1.1	3.7	4.2	4.9	93 $\pm$ 8	85 $\pm$ 4	0.27	0.28	1.3
Captan	5–125	0.999	1.5	4.9	5.4	5.9	91 $\pm$ 8	96 $\pm$ 4	0.37	0.35	1.2
Quinoxifen	2–101	0.9995	0.7	2.2	2.4	2.7	95 $\pm$ 7	99 $\pm$ 2	0.22	0.23	1.4
Fluquinconazole	4–105	0.9991	1.1	3.7	4.0	4.5	98 $\pm$ 7	88 $\pm$ 4	0.27	0.30	0.9
Boscalid	4–112	0.9992	1.0	3.5	4.0	4.5	100 $\pm$ 5	86 $\pm$ 6	0.30	0.36	1.0
Pyraclostrobin	6–110	0.9996	1.7	5.8	6.5	7.3	87 $\pm$ 7	107 $\pm$ 8	0.33	0.41	1.4

<sup>a</sup> Mean value  $\pm$  SD ( $n = 10$ ).

**3.2.3. LOD and LOQ.** LODs ranged from 0.7 to 1.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and LOQs from 2.2 to 5.8  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , complying with the regulated MRLs in grapes by the European legislation (see Table 1). Fig. 5 shows SIM chromatograms obtained for an untreated grape sample and spiked grape sample containing all the target pesticides at a concentration level of 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Limits obtained for all pesticides in grapes were lower than those reported in the previous works (Table 7), except for penconazole and pyraclostrobin in one of the references<sup>10</sup> dealing with the extraction of these pesticides from grapes.

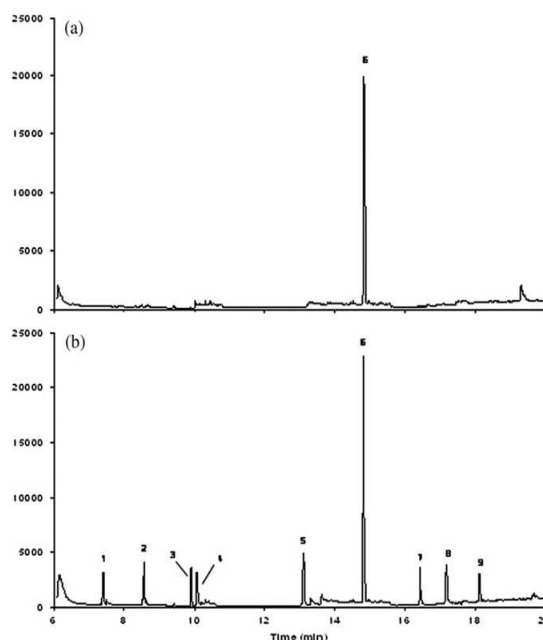
**3.2.4. Decision limit ( $CC\alpha$ ) and detection capability ( $CC\beta$ ).** Being the LOQs equal to or lower than the maximum residue limits established by European legislation (see Tables 1 and 6), the  $CC\alpha$  values were calculated by analysing 20 blank grape samples spiked at the LOQ levels of the method for each compound. The spiking level concentration plus 1.64 times the corresponding standard deviation represents the  $CC\alpha$ . Then, the  $CC\beta$  values were calculated by analyzing 20 blank spiked samples at corresponding calculated  $CC\alpha$  level for each analyte. The concentration at the  $CC\alpha$  plus 1.64 times the corresponding standard deviation equals the  $CC\beta$ . Table 6 summarises the obtained  $CC\alpha$  and  $CC\beta$  for the target compounds.

**Table 7** Comparison of experimental LOQs of the proposed method with respect to LOQs published by other authors

Fungicide	LOQs in grapes/ $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Present method	Consulted references
Vincllozolin	4.4	10 <sup>d</sup>
Dichlofluanid	3.1	5 <sup>b</sup> , 8, 7 <sup>a</sup> , 10 <sup>f</sup>
Penconazole	3.7	2.5 <sup>a</sup> , 5 <sup>d</sup> , 10 <sup>e</sup> , 10.1 <sup>a</sup>
Captan	4.9	10 <sup>e</sup> , 50.5 <sup>a</sup>
Quinoxifen	2.1	5 <sup>d</sup> , 10 <sup>f</sup>
Fluquinconazole	3.7	10 <sup>f</sup>
Boscalid	3.5	10 <sup>f</sup>
Pyraclostrobin	5.8	2.5 <sup>b</sup> , 10 <sup>e</sup> , 600 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Ref. 7 by GC-ECD. <sup>b</sup> Ref. 11 by LC-MS/MS. <sup>c</sup> Ref. 9 by LC-MS/MS. <sup>d</sup> Ref. 10 by GC-ECD. <sup>e</sup> Ref. 8 by GC-ITMS. <sup>f</sup> Ref. 12 by GC-ECD. <sup>g</sup> Ref. 15 by HPLC-DAD.

**3.2.5. Precision.** Results for precision are summarized in Table 6. As regards the intra-day precision RSDs obtained varied between 2.2% and 9.4%. They were within the acceptable range, (RSD) <20%, according to Document SANCO/10684/2009.<sup>21</sup> The HorRat values obtained were lower than 0.5 for all the compounds at two concentration levels. Thus, the method provided a satisfactory level of intra-laboratory precision.



**Fig. 5** GC-MS chromatograms of extracts of untreated grape (A) and untreated grape spiked at 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (B) obtained by the proposed MAE in optimum conditions. Peak identification: (1) vinclozolin; (2) dichlofluanid; (3) penconazole; (4) captan; (5) quinoxifen; (6) tetradifon (I.S.); (7) fluquinconazole; (8) boscalid; (9) pyraclostrobin.



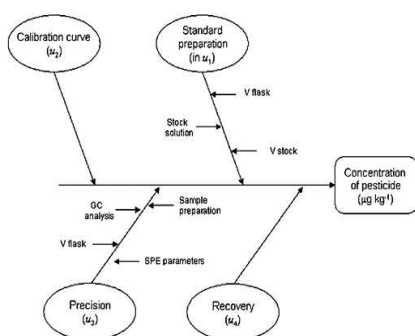


Fig. 6 Cause and effect diagram of the main uncertainties evaluated in pesticide analysis.

**3.2.6. Recovery.** Average recoveries ranged from 82% to 107% in grape samples at the two levels of concentration studied (Table 6). According to SANCO guide, the method provided a satisfactory level of accuracy.

**3.2.7. Uncertainty evaluation.** The main uncertainty sources (Fig. 6) were identified and quantified, followed by the determination of the combined uncertainty ( $u_c(y)$ ) using a Gauss propagation model. In the present determination the following four main individual uncertainty sources were taken into account:

**U<sub>1</sub>.** Uncertainty associated with standard preparation ( $u_1 = u_{\text{std}}$ ):

$$u_{\text{std}} = \sqrt{u(C_1)^2 + u(C_2)^2 + \dots + u(C_i)^2}$$

where  $u(C_1)$ ,  $u(C_2)$ , and  $u(C_i)$  are the uncertainties associated with the individual standards used in the calibration curve. The standard uncertainty associated with the preparation of each calibration standard ( $u(C_i)$ ) was calculated by taking into account the uncertainty associated with the stock standard solution concentration ( $u(C_{\text{stock}})$ ), the plus volume of stock standard solution ( $u(V_{\text{stock}})$ ), and the uncertainty of the final measured volume in the volumetric flask ( $u(V_{\text{flask}})$ ) as follows:

$$u(C_i) = C_i \sqrt{\left(\frac{u(C_{\text{stock}})}{C_{\text{stock}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{stock}})}{V_{\text{stock}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{flask}})}{V_{\text{flask}}}\right)^2}$$

where  $u(C_{\text{stock}}) = C_{\text{stock}} \sqrt{(u(m_{\text{comp}})/m_{\text{comp}})^2 + (u(V_{\text{dil}})/V_{\text{dil}})^2}$ , associated with the uncertainty of the mass of standard compound weighted ( $u(m_{\text{comp}})$ ) and the dilution volume of the latter quantity ( $u(V_{\text{dil}})$ ). Whenever an individual standard was prepared from a working solution  $C_i$  the uncertainty of the working solution was taken into account instead of the uncertainty of stock solution.

**U<sub>2</sub>.** Uncertainty associated with the calibration curve ( $u_2 = (u(x_0)/x_0)$ ):

$$u(x_0) = \frac{S_y}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

where  $S_y$  is the residual standard deviation,  $b$  is the slope of the calibration curve,  $N$  is the number of standards used in the calibration curve,  $n$  is the number of experimental values obtained for each  $x$  value,  $y_0$  is the experimental value of  $y$  for which the concentration  $x_0$  will be calculated by the calibration

curve,  $\bar{y}$  is the average of the  $y_i$  values and  $\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$  is the sum of the obtained concentration (given by the calibration curve) minus the average concentration of the standards used in the calibration curve.

**U<sub>3</sub>.** Uncertainty associated with precision ( $u_3 = u(x_0)/x_0 = s_n/n^{1/2}$ ) expressed as a relative standard deviation obtained from intermediate precision assays for different levels of concentration, where  $s_n$  is the standard deviation of the experimental data for precision and  $n$  is the number of assays.

**U<sub>4</sub>.** Uncertainty associated with accuracy ( $u_4 = s_{\text{rec}}/n^{1/2}$ ) expressed by the recovery percentage obtained from spiking assays, in the absence of certificated reference material, where  $s_{\text{rec}}$  is the standard deviation of the recovery and  $n$  is the number of assays.

A significance test was used to determine whether the mean recovery was significantly different from 1.0. The test statistic  $t$  was calculated using the following equation:<sup>29</sup>

Table 8 Partial ( $u_1$ – $u_4$ ), combined ( $u_c$ ) and expanded uncertainties ( $U$ ) associated with the results (expressed as relative measures) referred to standard preparation ( $u_1$ ), calibration curve ( $u_2$ ), precision ( $u_3$ ) and accuracy ( $u_4$ )

Compound	10 µg kg <sup>-1</sup>						50 µg kg <sup>-1</sup>					
	Cal.				Combined uncertainty	Expanded uncertainty	Cal.				Combined uncertainty	Expanded uncertainty
	Standards curve	Precision	Accuracy	Accuracy			Standards curve	Precision	Accuracy	Accuracy		
$u_1$	$u_2$	$u_3$	$u_4$	$u_c$	$U$	$u_1$	$u_2$	$u_3$	$u_4$	$u_c$	$U$	
Vinclozolin	0.009	0.076	0.014	0.019	0.080	0.160	0.009	0.013	0.016	0.013	0.026	0.051
Dichlofluandid	0.009	0.098	0.020	0.013	0.010	0.203	0.009	0.018	0.018	0.009	0.028	0.056
Penconazole	0.010	0.124	0.013	0.025	0.128	0.256	0.010	0.023	0.014	0.009	0.030	0.060
Captan	0.010	0.097	0.023	0.025	0.103	0.206	0.010	0.015	0.017	0.013	0.028	0.056
Quinoxifen	0.008	0.082	0.014	0.022	0.087	0.174	0.008	0.014	0.011	0.006	0.021	0.042
Fluquinconazole	0.009	0.090	0.017	0.022	0.095	0.190	0.009	0.016	0.015	0.013	0.027	0.054
Boscalid	0.009	0.094	0.019	0.016	0.098	0.195	0.009	0.017	0.018	0.019	0.033	0.065
Pyraclostrobin	0.009	0.060	0.024	0.022	0.069	0.138	0.009	0.009	0.020	0.025	0.035	0.070

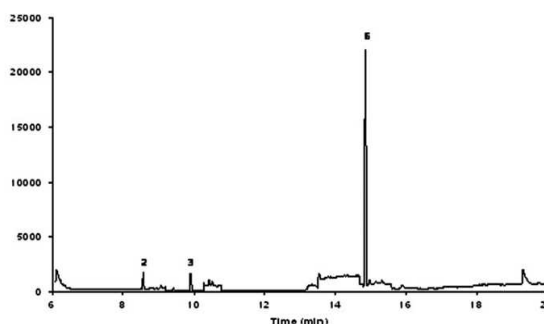


Fig. 7 SIM chromatogram of real grape sample obtained by MAE containing penconazole at a concentration of  $5.3 \mu\text{g kg}^{-1}$  and dichlofluanid at  $4.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ . For compound identification, see Fig. 5.

$$t = \frac{|1 - \text{Rec}|}{u_4}$$

This value is compared with the 2-tailed critical value  $t_{\text{crit}}$ , for  $n - 1$  degrees of freedom at 95% confidence (where  $n$  is the number of results used to estimate recovery). If  $t$  is greater than or equal to the critical value  $t_{\text{crit}}$  than Rec is significantly different from 1. In this work, most of the  $t$  values were higher than  $t_{\text{crit}}$  (2.262) and ranged from 2.273 for quinoxifen at 10 ppb to 20.0 for dichlofluanid at 50 ppb. However, vinclozolin, fluquinconazole, boscalid, pyraclostrobin (all of them at 10 ppb) and quinoxifen at 50 ppb showed  $t$  values  $< 2.263$ .

The combined uncertainty ( $u_c(y)$ ) was calculated as:

$$u_c(y) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_4^2}$$

and expanded uncertainty ( $U$ ) was calculated as  $U = u_c(y) \times 2$  (95% of confidence level).

The uncertainties were calculated for two spiking levels (10 and  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and the data, expressed as relative measures, are presented in Table 8. For the lower concentrations, the major uncertainty source was the calibration curve interpolation ( $u_2$ ). At the low and high spiking levels, for all the compounds, the % relative expanded uncertainty values were below 26% and 7%, respectively. These results suggest that the overall variance of the method was higher at the low concentration level but in all cases investigated, the expanded uncertainty values obtained are significantly lower than the "default" value of 50% proposed by SANCO/10684/2009.<sup>21</sup>

#### 4. Application

Real grape samples collected from local markets in La Rioja were analyzed using the developed MAE method. In all analyzed samples none of the target compounds were found at concentration levels above the MRLs. As an example, Fig. 7 shows the GC-MS in SIM mode chromatogram obtained for one of these samples where two of the target pesticides, penconazole, and dichlofluanid were detected, at a concentration of 5.3 and  $4.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively.

#### 5. Conclusions

The MAE of dichlofluanid, vinclozolin, penconazole, captan, quinoxifen, fluquinconazole, boscalid and pyraclostrobin from grape samples was studied. The MAE instrumental parameter settings and extractant solvents were easily optimized by applying experimental design. A fractional factorial screening design followed by central composite design enabled us to select the parameters that affect the extraction efficiency and to find the maximum analyte recoveries that could be obtained upon simultaneous determination. It was demonstrated that the hexane/acetone (1 : 1, v/v) mixture was an efficient solvent for the extraction of these pesticides. MAE can be used to extract multi-class fungicides from grape samples with good recoveries in a short extraction time (10 min) and with a small volume of solvent (10 mL). The method was validated and demonstrated to be reliable and linear in the concentration range of interest. LODs and LOQs were below the current legal limits established by the EU. Grape samples could be extracted without any clean-up procedure for the extracts and internal calibrations performed with grape-matched standards gave quantitative and reproducible results. Expanded uncertainties evaluated for the concentration ranges studied were below 26%.

#### Acknowledgements

The authors want to thank the University of La Rioja for the FPI grant to Laura Lagunas-Allué and the Government of La Rioja for the project ANGI 2004/18, INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), MEC/FEDER for the AGL2005-02313/ALI project and Bodegas D. Mateos S.L.

#### References

- 1 A. Agüera, M. Contreras, J. Crespo and A. R. Fernández-Alba, *Analyst*, 2002, **127**, 347.
- 2 D. Ortelli, P. Edder and C. Corvi, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **520**, 33.
- 3 J. L. Martínez-Vidal, M. C. Pablos-Espada, A. Garrido-Frenich and F. J. Arrebola, *J. Chromatogr., A*, 2000, **867**, 235.
- 4 J. J. Ramos, R. Rial-Otero, L. Ramos and J. L. Capelo, *J. Chromatogr., A*, 2008, **1212**, 145.
- 5 C. Lesueur, P. Knittel, M. Gartner, A. Mentler and M. Fuerhacker, *Food Control*, 2008, **19**, 906.

- 6 W. Li, Y. J. Wu, D. M. Qin, Y. Ma, Y. J. Sun and S. P. Qiu, *Chromatographia*, 2008, **67**, 761.
- 7 S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, N. Vela and J. Oliva, *J. Chromatogr., A*, 2000, **882**, 221.
- 8 A. Angioni, V. L. Garau, A. A. Del Real, M. Melis, E. V. Minelli, C. Tuberoso and P. Cabras, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 6761.
- 9 M. Hiemstra and A. de-Kok, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1154**, 3.
- 10 G. Di Bella, M. Saitta, F. Salvo, M. Nicotina and G. Dugo, *Ital. J. Food Sci.*, 2003, **15**, 427.
- 11 K. Banerjee, D. P. Oulkar, S. Dasgupta, S. B. Patil, S. H. Patil, R. Savant and P. G. Adsule, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1173**, 98.
- 12 P. Cabras, A. Angioni, V. L. Garau, F. M. Pirisi, F. Cabitza, M. Pala and G. A. Farris, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 6128.
- 13 C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler and M. Fuerhacker, *Food Control*, 2008, **19**, 906.
- 14 S. Walorczyk, *J. Chromatogr., A*, 2008, **1208**, 202.
- 15 S. de Melo Abreu, P. Caboni, P. Cabras, V. L. Garau and A. Alves, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **573-574**, 291.
- 16 V. Camel, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 229.
- 17 K. Srogi, *Anal. Lett.*, 2006, **39**, 1261.
- 18 J. Hernández-Borges, L. M. Ravelo-Pérez, E. M. Hernández-Suárez, A. Carnero and M. A. Rodríguez-Delgado, *Chromatographia*, 2008, **67**, 69.
- 19 Z. Vryzas, A. Tsaboula and E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Sep. Sci.*, 2007, **30**, 2529.
- 20 M. Barriada-Pereira, M. J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez and E. Fernández-Fernández, *J. Chromatogr., A*, 2004, **1061**, 133-139.
- 21 *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, Document No. SANCO/10684/2009, January 2010.
- 22 *Commission Decision 2002/657/EC Implementing Council Directive 96/23/EC on the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results*, European Union, Brussels, 12th August 2002.
- 23 D. R. Erney, A. M. Gillespie, D. M. Gilvydis and C. F. Poole, *J. Chromatogr., A*, 1993, **638**, 57.
- 24 U. Menkissoglu-spiroudi and A. Fotopoulou, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2004, **84**, 15.
- 25 T. Schmeck and B. W. Wenclawiak, *Chromatographia*, 2005, **62**, 159-165.
- 26 K. Banerjee, D. P. Oulkar, S. B. Patil, M. R. Jadhav, S. Dasgupta, S. H. Patil, S. Bal and P. G. Adsule, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 4068.
- 27 M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević and M. Laušević, *Food Chem.*, 2009, **113**, 712.
- 28 W. Horwitz and R. Albert, *J. AOAC Int.*, 2006, **89**, 1095.
- 29 *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*, ed. S. L. R. Ellison, M. Rosslein and A. Williams, EURACHEM/CITAC, 2nd edn, 2000.
- 30 A. Bouaid, A. Martín-Esteban, P. Fernández and C. Cámara, *J. Anal. Chem.*, 2000, **367**, 291.
- 31 M. Barriada-Pereira, M. J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez and E. Fernández-Fernández, *Talanta*, 2007, **71**, 1345.

**ANEXO III. Response surface optimization for determination of pesticide residues in grapes using MSPD and GC/MS: assessment of global uncertainty**

---





## Response surface optimization for determination of pesticide residues in grapes using MSPD and GC-MS: assessment of global uncertainty

L. Lagunas-Allué · J. Sanz-Asensio ·  
M. T. Martínez-Soria

Received: 29 April 2010 / Revised: 15 July 2010 / Accepted: 19 July 2010 / Published online: 9 August 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** In this work, a simple and low-cost method based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) and gas chromatography to determine eight multi-class pesticides such as vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid, and pyraclostrobin in grapes is described. Fungicide residues were identified and quantified using gas chromatography–mass spectrometry in selected ion monitoring mode (GC-MS, SIM). The experimental variables that affect the MSPD method, such as the amount of solid phase, solvent nature and elution volume were optimized using an experimental design. The best results were obtained using 0.5 g of grapes, 1.0 g of silica as clean-up sorbent, 1.50 g of C<sub>18</sub> as bonded phase and 10 mL of dichloromethane/ethyl acetate (1:1, v/v) as eluting solvent. Significant matrix effects observed for most of the pesticides tested were eliminated using matrix-matched standards. The pesticide recoveries in grapes samples were better than 80% except for captan. Intra-laboratory precision in terms of Horwitz ratio of the pesticides evaluated was below 0.5, suggesting ruggedness of the method. The quantification limits of the pesticides were in the range of 3.4–8.7 µg kg<sup>-1</sup>, which were lower than the maximum residue limits (MRLs) of the pesticides in grapes samples established by the European legislation. Decision limits (CC<sub>α</sub>) and detection capability (CC<sub>β</sub>) have been calculated. The expanded uncertainties at two levels of concentration were <20% for all analytes.

**Keywords** Matrix solid-phase dispersion · Experimental design · Uncertainty · Grapes · Gas chromatography

L. Lagunas-Allué · J. Sanz-Asensio · M. T. Martínez-Soria (✉)  
Departamento de Química, Universidad de La Rioja,  
Madre de Dios, 51,  
26006 La Rioja, Spain  
e-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es

### Introduction

Grapes are an important crop in Spain and worldwide. High relative humidity and rains favor fungal grapevine diseases as gray mold (*Botrytis cinerea*), powdery mildew (*Uncinula necator*), and downy mildew (*Plasmopara viticola*) which are generally fought using high amounts of different pesticides [1]. 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 [2]. Therefore, sensitive analytical methods of detection and quantification of pesticide residues must be developed to control residue levels in grapes in order to verify their compliance with the maximum residue levels (MRLs) established by the European Commission [3]. However, most known screening methods involve tissue preparation and several extraction, purification and concentration steps, which are often the limiting steps and make them expensive to perform when many samples must be analyzed.

The extraction method for the target fungicides proposed in the literature was based on a simple one step solid–liquid extraction (SLE) or QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) method with: acetone/dichloromethane for dichlofluanid, captan, penconazol, and vinclozolin in grapes, must, and wine samples [4]; acetone/dichloromethane/light petroleum for 171 pesticides and metabolites (including boscalid, dichlofluanid, fluquinconazol, penconazol, and pyraclostrobin) in crops (fruits, vegetables, and cereals) [5]; hexane/ethyl acetate for the extraction of penconazol and quinoxyfen from grapes, must, and wine during the wine-making process [6] and single organic solvents like ethyl acetate (10 mL) for dichlofluanid, penconazol and pyraclostrobin residues in grapes [7] or acetonitrile (10–15 mL) for

fluquinconazol, penconazol, pyraclostrobin, quinoxyfen, and vinclozolin in grape, lemon, onion, and tomatoes samples [8] and for 140 pesticides including dichlofluanid, captan, penconazol, quinoxyfen, and vinclozolin in cereals [9]. Chromatographic separation and identification were achieved by gas chromatography (GC) with mass spectrometric (MS), MS/MS detection, nitrogen-phosphorus (NPD) or electron-capture (ECD) [4, 6, 8, 9] detection, and liquid chromatography (LC) with diode-array (DAD), ultraviolet (UV) or MS [5, 7, 8, 10].

These procedures have some drawbacks such as: they are time consuming, require high amount of sample and solvents, and lack sufficient specificity to avoid false positives. That is the reason why they are replaced with faster, less expensive, and easy-handled protocols. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is a relatively recent extraction and clean-up technique used for the simultaneous determination of pesticides from semisolid and solid samples such as apple, tomatoes, potatoes, soil, cattle feed, and propolis [11–16] and that provides a good alternative to traditional extraction techniques for chromatographic analysis. MSPD can be carried out simultaneously with sample homogenization, extraction, and clean-up using a relative small sample size, low solvent volume and minimum amount of sample. In comparison with methods based on solid-liquid extraction (SLE and QuEChERS), it is slightly less expensive and requires smaller samples and less toxic solvents. In MSPD, the sample is blended together with the selected solid phase, such as C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, CN, Florisil, alumina, and silica, and the mixture is placed in columns for the extraction of compounds. The elution of the MSPD column with a solvent or solvent sequence can normally provide clean extracts, which, if necessary, can be further purified.

In spite of the great number of MSPD publications, well-described and validated MSPD methods for the extraction of pesticides applied to grapes are scarce. Methods for the extraction of carbamates such as carbofuran, methiocarb, oxamyl from orange, grape, onion, and tomato samples and extraction of chlorothalonil, vinclozolin, endosulfan, procymidone, hexaconazole, and fenarimol from commercial fruit juices (orange, apple, grape, pineapple, and peach) has been reported in the literature [17, 18]. Few publications of MSPD extraction for vinclozolin has been studied in propolis [12], vegetables or agricultural crops [19, 20] and fruit juices [18]; MSPD extraction for captan in fruits and vegetables [14, 20] and carrots samples [21] and only one publication for dichlofluanid in fruits and vegetables [20]. No further publications regarding penconazol, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid, and pyraclostrobin MSPD extraction have been published.

Therefore, the aim of this work was to develop a fast and sensitive determination method based on MSPD for the quantitative and selective determination of vinclozolin,

dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid, and pyraclostrobin residues from grapes samples using GC-MS detection. These fungicides were selected and studied since they are widely used in the Qualified Designation of Origin Rioja, with two of them being pyraclostrobin and boscalid, new generation fungicides introduced recently in viticulture. Chemical structure, chemical group and properties, diseases control, and mode of action of these fungicides are shown in Table 1.

Once the bonded phase was selected, a central composite design was carried out in order to optimize extraction conditions of MSPD, such as amount of sorbent, eluent composition and eluting volume. Desirability function approach was employed to optimize the responses of the pesticide recoveries. Once the best working conditions had been selected, the performance characteristics were established in terms of linearity, precision, uncertainty and detection, and quantification limits. The accuracy was checked by a recovery study with spiked samples. Finally, the method was applied to analyze fungicide residues in real grape samples.

## Experimental

### Chemicals

### Reagents

Standards pesticides of penconazol, captan, dichlofluanid, vinclozolin, pyraclostrobin, boscalid, fluquinconazol, and quinoxyfen with purity higher than 99.0% were acquired from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Tetradifon from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) with a purity of 99.5% was used as internal standard (IS). Standard stock solutions (500 mg L<sup>-1</sup>) were prepared in methanol. The working standard solutions were prepared by diluting the stock solutions as required in methanol.

Research-grade aluminum oxide (STD grade, 58 Å), florisil, silica gel (Merck grade 9385, 60 Å), and octyldecyl-functionalized silica gel 9–12%, C<sub>18</sub>, were supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Syringes barrel of 10 mL were supplied from Scharlab (Barcelona, Spain) and the cellulose filters from Restek (Barcelona, Spain).

### Solvents

Ethyl acetate, methanol, and dichloromethane, all HPLC-grade, were obtained from Scharlab. Ultrapure water was obtained in a Milli-RO plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

**Table 1** Chemical structure, chemical group and properties, diseases control, and mode of action of fungicides studied

Fungicide	Chemical Structure	Chemical group and properties	Diseases control. Mode of action
Vinclozolin		Dicarboximide MW <sup>a</sup> = 286.11 S <sup>b</sup> = 3.4 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.02	Grey mold Non-systemic with protective action. Prevents spore germination and mycelial growth. Endocrine disruptor.
Dichlofluanid		Sulphamide MW <sup>a</sup> = 333.23 S <sup>b</sup> = 1.3 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.7	Grey mold Non-systemic with protective action. Foliar with protective action
Captan		Phthalimide MW <sup>a</sup> = 300.61 S <sup>b</sup> = 5.2 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 2.5	Grey mold and downy mildew Non-systemic with protective and curative action Mitochondrial respiration inhibitor.
Penconazol		Triazole MW <sup>a</sup> = 284.18 S <sup>b</sup> = 73 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.72	Powdery mildew Systemic with curative and protective action, Acts by interfering with ergosterol biosynthesis
Quinoxifen		Quinolyne MW <sup>a</sup> = 308.13 S <sup>b</sup> = 0.047 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 4.66	Powdery mildew Systemic with protective properties. Translocates and inhibits appressoria development stopping infections.
Fluquinconazol		Triazole MW <sup>a</sup> = 376.17 S <sup>b</sup> = 1.15 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.24	Powdery Mildew Systemic with protectant and eradicant activity. Disrupts membrane function.
Boscalid		Carboxamide MW <sup>a</sup> = 343.21 S <sup>b</sup> = 4.6 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 2.96	Grey mold Systemic with protective action. Protectant, foliar absorption, inhibits spore germination and germ tube elongation.
Pyraclostrobin		Strobilurin MW <sup>a</sup> = 387.82 S <sup>b</sup> = 1.9 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.99	Downy and Powdery Mildew Systemic with protective and curative action. Respiration inhibitor (QoI fungicide).

<sup>a</sup> Molecular weight (g mol<sup>-1</sup>)<sup>b</sup> Water solubility at 20 °C (mg L<sup>-1</sup>)<sup>c</sup> Octanol/water partition coefficient at pH 7 and 20 °C



### Apparatus

A Zymark TurboVap II Vortex evaporator (Hopkinton, MA, USA) was used to evaporate MSPD extracts of dichloromethane/ethyl acetate (1:1) under a nitrogen stream.

A Heidolph SilentCrusher M (Scwachbach, Germany) was used to chopper grape samples in the developed method.

A Visiprep<sup>®</sup> vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA) was used to simultaneously process 12 samples in MSPD.

**Sample preparation and fortification** Red grapes were collected from *cv.* Tempranillo grapevines of Qualified Designation of Origin Rioja at vineyard in Aldeanueva de Ebro, La Rioja, Spain. These vines had not been treated with phytosanitary products. A representative portion of sample (100 g of grapes) was chopped into small pieces and homogenized using a crusher. Fortified samples were prepared by adding different volume of standard solutions to grapes resulting in final concentrations ranging from 4 to 125  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of pesticides in the sample. The fortified grapes samples were left to stand for 72 h before extraction to allow the spike solution to penetrate into the matrix. Two replicates were analyzed at each fortification level.

### Extraction procedure

A representative portion of the sample (0.5 g) was then gently blended with 1.50 g of  $\text{C}_{18}$ , into a glass mortar using a glass pestle, until a homogeneous, semi-dry mixture was obtained. This homogenized mixture was transferred to a column constructed from a syringe barrel with a cellulose filter at the bottom and filled with 1.0 g of adsorbent (silica). A second filter was placed on top of the sample before compression. Ten milliliters of dichloromethane/ethyl acetate (1:1) were added to the column and the sample was allowed to elute dropwise applying a slight vacuum. The eluent was collected into a graduated conical tube and concentrated, under stream of nitrogen, to 5 mL. Before GC-MS analysis, tetradifon was added in a concentration of 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  as internal standard.

### Chromatographic conditions

GC separation was performed using an Agilent Technologies GC 6890N coupled to a 5975C MS Mass Selective Detector. The analytical column used was a HP-5MS with 30 m of length, 0.25 mm of internal diameter, and 0.25  $\mu\text{m}$  of film thickness.

The initial oven temperature was set at 100 °C, increased to 185 °C at 40 °C  $\text{min}^{-1}$  and kept for 5 min, increased at a rate of 10 °C  $\text{min}^{-1}$  to 300 °C for 3 min. The volume of sample was 2  $\mu\text{L}$ , injected in splitless mode. The injector

temperature was set at 250 °C. Helium (99.999% purity) was used as carrier gas at constant flow rate of 1.5  $\text{mL min}^{-1}$ . The mass spectrometer was operated in electron impact (70 eV of ion energy), with 6-min solvent delay, the interface temperature and the ion source were kept at 310 °C and 230 °C, respectively.

### Data analysis

The StatGraphics Centurion Version XV was used to generate the experimental designs and data processing.

## Results and discussion

### GC-MS separation

Initially, a mass range of 50–550 was scanned to confirm the retention times of analytes. For determination of the fungicide residues, selected ion monitoring (SIM) mode was performed. The dwell time for ion monitoring was 100 ms per ion. The fungicides determined by GC-MS were eluted between 6 and 20 min. Tetradifon, proved to be a good IS to correct the variability in gas chromatographic injection and mass spectrometric detection response. The proposed conditions generated narrow and reproducible chromatographic peaks and there were no interferences in the extracts obtained from red grapes in the GC-MS chromatogram.

Selected ions ( $m/z$ ) used for confirmation and quantification, target and qualifiers ion, and the ratios are shown in Table 2. The intention was to select the most abundant ions of higher  $m/z$ , which are the most characteristic ones. When it was possible to select more than one ion, the identities of the peaks could be confirmed through ratios of their respective abundances.

### Optimization of the MSPD extraction

The most suitable extraction parameters were evaluated to achieve the highest recoveries for vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxifen, fluquinconazol, boscalid, and pyraclostrobin from grapes.

Efficiency of MSPD extractions depends on the amount of sample, type and quantity of bonded phase, and nature and volume of the eluting solvent. The polarities of the sorbent and the elution solvent are known to be key factors in MSPD, since they determine both the efficacy of the extraction and the purity of the final extracts.

### Bonded phase and clean-up step

Preliminary investigations were performed to choose the bonded phase. Different solid phases— $\text{C}_{18}$ , florilil, and

**Table 2** Retention times, target ion and qualifier ions for the target pesticides by GC-MS

Compound	$t_R$ (min) <sup>a</sup>	Target ion $I_1$ ( $m/z$ )	Qualifier ion $I_2$ ( $m/z$ )	Qualifier ion $I_3$ ( $m/z$ )	$[I_2]/[I_1]$ (RSD%) <sup>b</sup>	$[I_3]/[I_1]$ (RSD%) <sup>b</sup>
Vinclozolin	7.7	212	285	198	0.72 (9)	0.89 (8)
Dichlofluanid	8.8	123	224	167	0.35 (8)	0.42 (11)
Penconazol	10.1	248	159	—	0.83 (6)	—
Captan	10.3	79	149	—	0.19 (11)	—
Quinoxifen	13.3	237	307	272	0.31 (9)	0.39 (15)
Tetradifon <sup>c</sup>	15.1	159	356	111	0.49 (7)	0.93 (9)
Fluquinconazol	16.7	340	108	—	0.26 (12)	—
Boscalid	17.4	140	342	112	0.42 (9)	0.31 (7)
Pyraclostrobin	18.3	132	164	325	0.31 (14)	0.12 (12)

<sup>a</sup> Retention time.<sup>b</sup> Intensity ratio of the two ions, target and qualifier ion, (% relative standard deviation) in must and wine matrix-matched standards.<sup>c</sup> Internal standard (IS)

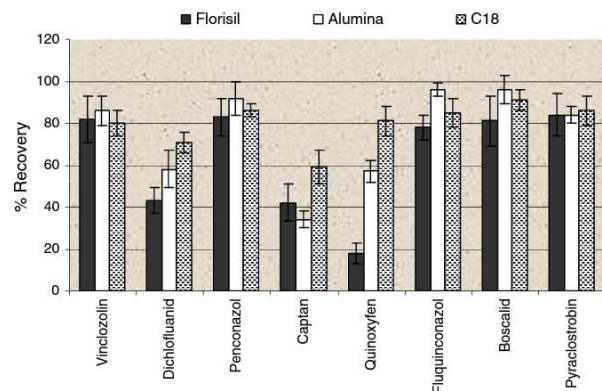
alumina—were selected on the basis of the literature about MSPD extractions of pesticides from vegetable and food matrixes [14, 18–20, 22, 23] and tested using a one-to-one ratio support to sample (0.5 g of solid phase and 0.5 g of grapes) spiked with pesticides at 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of each compound. Florisil, alumina, and  $C_{18}$  were assayed using a sequence of two solvents with a different polarity (10 mL of dichloromethane plus 10 mL of ethyl acetate), being the most suitable for the studied compounds. They were selected based on previous successful investigations of our laboratory [24, 25].

A clean-up procedure for fruit and vegetable extracts could be recommended. To this end, the addition of a silica layer in the bottom part of the syringe was used. Different authors previously reported silica as the most useful solid support for clean-up of vegetable extracts [26].

Figure 1 shows recoveries obtained with the three different bonded phases studied plus silica as clean-up

support. As can be seen, when  $C_{18}$  was used, the recovery percentages of target compounds were above 70%, which was clearly higher than the recoveries with florisil or alumina which led to low recoveries for some compounds such as dichlofluanid, captan and quinoxifen. Therefore,  $C_{18}$  was the adsorbent selected for MSPD because it gave the best recovery averages for most of the studied compounds and the lowest variation in the values obtained. Table 1 summarizes Log  $K_w$  values which are between 2.5 and 4.66, showing a low polarity of the target compounds. If  $C_{18}$  phase and the target pesticides are taken into account, similar characteristics dealing with polarity are found. Thus, non-polar phases are the most suitable for the extraction of these pesticides.

The proposed clean-up allowed to maintain the recoveries, removed interferences compounds and provided a drier sample. Characteristic examples of GC-MS chromatograms of grape samples extracted with  $C_{18}$  with and without

**Fig. 1** Recovery percentages of pesticides obtained by MSPD using different bonded phases plus silica as clean-up step

clean-up step are shown in Fig. 2a and b, respectively. When comparing these chromatograms, it can be easily seen that a cleaner chromatogram is produced after the application of the clean-up step with 1.0 g of silica. This amount of silica was considered appropriate since the obtained extracts were clean enough to be directly subjected to chromatographic analysis removing other matrix compounds contained in grapes samples avoiding interfering peaks, higher background, and deterioration of the chromatographic column.

#### Optimization of extraction variables

Central composite design (CCD) is one of the most frequently used response surface designs, which is constructed from several factor combinations. The design consists of three distinct sets of experimental runs: a factorial design in the factors studied, each having two levels; a set of center points, experimental runs whose values of each factor are the medians of the values used in the factorial portion, which is often replicated in order to improve the precision of the experiment; a set of axial points, experimental runs identical to the center points except for one factor, which will take on values both below and above the median of the two factorial levels, and

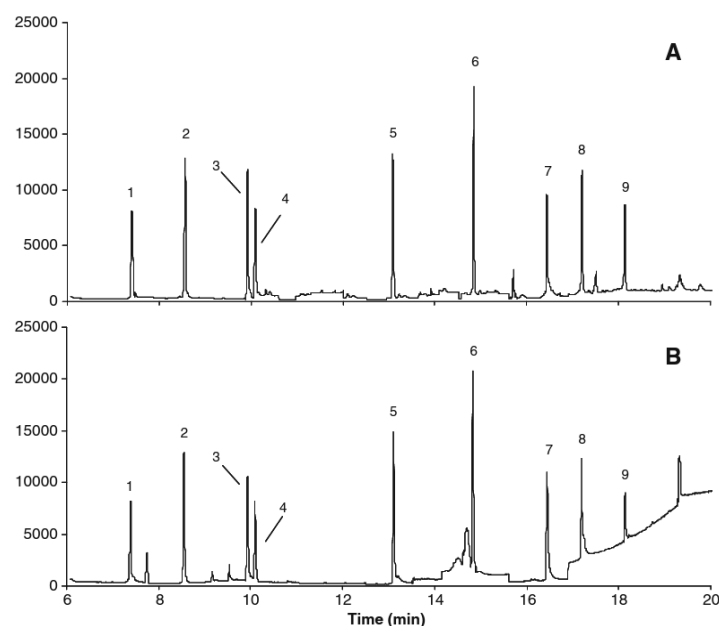
typically both outside their range. All factors are varied in this way. The main effects, interaction effects, and quadratic effects were optimized and evaluated in this design.

In order to reduce the time to achieve the optimal working conditions, an experimental design was applied to investigate the effect of the remaining variables: amount of solid phase  $C_{18}$  (A), percentage of ethyl acetate in a mixture dichloromethane–ethyl acetate (B) and volume of eluting mixture (C). The influence of amount of solid phase was studied between 0.5 g (low level) and 2 g (high level) and 0% and 100% of ethyl acetate were considered as low and high levels, respectively, for the percentage of this solvent. The volume of ethyl acetate/dichloromethane (eluting mixture) was in the range of 5–20 mL.

A CCD consisting of a  $2^3$  factorial design with six points located at  $\pm\alpha$  from the center of the experimental domain was performed. The value of axial distance  $\alpha$  was 1.68 and it was also completed with nine central points to make the experimental design rotatable and orthogonal. Therefore, a total of 23 experiments (values are listed in Table 3) were randomly performed. These experiments were developed with samples that had not been treated with pesticides spiked at  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

An analysis of variance (ANOVA) was used to assess whether factors or interactions showed a statistically

**Fig. 2** GC-MS chromatograms of spiked grapes at  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  obtained by MSPD using  $C_{18}$  as bonded phase. (a) With 1 g of silica as clean-up (b) without clean-up step. Peak identification: 1 vinclozolin; 2 dichlofluanid; 3 penconazol; 4 captan; 5 quinoxifen; 6 tetradifon (I.S.); 7 fluquinconazol; 8 boscalid; 9 pyraclostrobin



**Table 3** Matrix of the central composite experimental design

Run	Pattern	Comment	Amount of C <sub>18</sub> (g)	Ethyl acetate (%)	Solvent volume (mL)
1	(-1, -1, -1)	Full factorial	0.8	20	8
2	(0, 0, - $\alpha$ )	Star	1.25	50	5
3	(-1, +1, +1)	Full factorial	0.8	80	17
4	(0, - $\alpha$ , 0)	Star	1.25	0	12.5
5	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
6	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
7	(-1, -1, +1)	Full factorial	0.8	20	17
8	(-1, +1, -1)	Full factorial	0.8	80	8
9	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
10	(+1, +1, +1)	Full factorial	1.7	80	17
11	(+1, +1, -1)	Full factorial	1.7	80	8
12	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
13	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
14	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
15	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
16	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
17	(- $\alpha$ , 0, 0)	Star	0.5	50	12.5
18	(0, 0, $\alpha$ )	Star	1.25	50	20
19	( $\alpha$ , 0, 0)	Star	2.0	50	12.5
20	(0, $\alpha$ , 0)	Star	1.25	100	12.5
21	(0, 0, 0)	Center	1.25	50	12.5
22	(+1, -1, -1)	Full factorial	1.7	20	8
23	(+1, -1, +1)	Full factorial	1.7	20	17

significant contribution to the variance of the response obtained (fungicide to the internal standard peak area ratio). Results of ANOVA are shown in Table 4, where *F* ratios and *p* values are given. The *F* ratio measures the contribution of each factor or interaction on the variance of the response, while the *p* value tests the statistical significance of each factor and interaction. At a 95% confidence level, a main factor or a factor interaction is statistically significant when its *p* value is lower than 0.05. The results showed that the amount of adsorbent (A) and

percentage of ethyl acetate (B) were the most important variables affecting extraction efficiency. These factors were significant for all compounds except for captan and penconazol, respectively. On the other hand, the eluting volume (C) was not significant for any of the target compounds in the range studied (5 to 20 mL).

Only the interaction amount of C<sub>18</sub>-percentage of ethyl acetate (AB) was significant for several pesticides (dichlofluanid, penconazol, quinoxifen, vinclozolin, and fluquinconazol).

**Table 4** ANOVA results showing the significance of main effects and interactions (in italics significant effects at 95% confidence level; *p* value < 0.05)

	Factors						Interactions					
	A		B		C		AB		BC		AC	
	<i>F</i> ratio	<i>p</i> value	<i>F</i> ratio	<i>p</i> value	<i>F</i> ratio	<i>p</i> value	<i>F</i> ratio	<i>p</i> value	<i>F</i> ratio	<i>p</i> value	<i>F</i> ratio	<i>p</i> value
Vinclozolin	14.40	<i>0.00</i>	12.80	<i>0.00</i>	0.10	0.76	12.70	<i>0.00</i>	0.02	0.89	0.07	0.79
Dichlofluanid	9.08	<i>0.01</i>	6.94	<i>0.02</i>	0.19	0.67	9.46	<i>0.01</i>	0.69	0.42	0.01	0.94
Penconazol	183	<i>0.00</i>	1.29	0.28	1.38	0.26	11.39	<i>0.01</i>	0.03	0.86	0.12	0.73
Captan	0.43	0.52	11.18	<i>0.01</i>	0.78	0.39	1.44	0.25	0.47	0.50	0.86	0.37
Quinoxifen	20.29	<i>0.00</i>	16.27	<i>0.00</i>	0.08	0.78	8.34	<i>0.01</i>	0.07	0.85	0.04	0.80
Fluquinconazol	14.00	<i>0.00</i>	26.72	<i>0.00</i>	0.23	0.64	8.43	<i>0.01</i>	0.46	0.51	0.01	0.92
Boscalid	13.80	<i>0.00</i>	16.45	<i>0.00</i>	0.00	0.98	3.17	0.09	1.84	0.20	0.53	0.48
Pyraclostrobin	7.03	<i>0.02</i>	24.32	<i>0.00</i>	0.14	0.72	4.15	0.06	0.05	0.83	0.05	0.82



The response surfaces were drawn to obtain the optimum of the variables studied in the CCD. Figure 3 shows, as an example, the response surfaces obtained for vinclozolin and penconazol.  $R^2$  values showed that the adjusted model accounted for 82–96% of peak area variability.

Generally, almost all pesticides showed a similar behavior related to the most suitable extraction conditions. The response surfaces for quinoxifen, dichlofluanid, captan, fluquinconazol, pyraclostrobin, and boscalid were similar to that for vinclozolin. An optimal response was observed at 1.35 g of bonded phase  $C_{18}$  and 12 mL of the solvent mixture with 60% of ethyl acetate. For pyraclostrobin and dichlofluanid showed very similar behavior with a 70% of ethyl acetate. However, for penconazol, the best response was obtained at the same solvent volume (12 mL) but at an amount of  $C_{18}$  of 2.0 g and at 30% of ethyl acetate in the mixture dichloromethane/ethyl acetate.

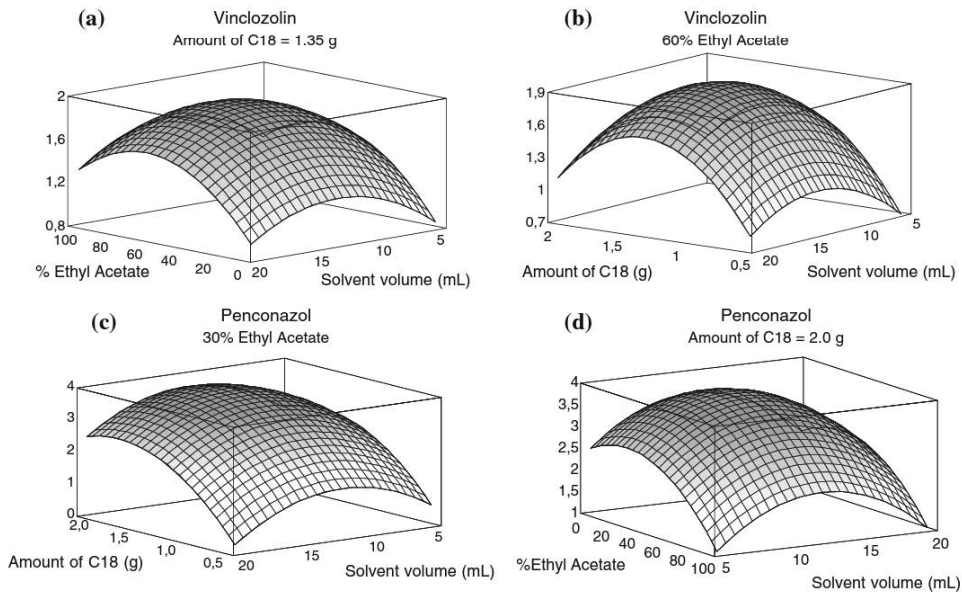
The search for the experimental conditions that optimize the eight responses simultaneously requires the use of the desirability function approach. The procedure involves creating a desirability function for each individual response ( $d_i$ ), defined as a partial desirability function. Then an overall desirability function ( $D$ ), maximized by choosing

the best extraction variable conditions, is defined as the weighted geometric mean of the partial desirability functions. Therefore, the function  $D$  was calculated over the experimental domain using equation as follows:

$$D = \left( \prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}}$$

where  $d_i$  is the partial desirability function of each response obtained from the transformation of the individual response of each experiment, and  $P_i$  is the weight of the individual function, which reflects the importance of each response, normalized so that  $\sum_{i=1}^n P_i = 1$ . Weights also emphasize the upper or lower bounds or the target values of the individual responses. Taking into account all requirements for each response, it can be chosen the extraction variable conditions that maximize  $D$ . One can see that a high value of  $D$  is obtained only if all individual desirabilities ( $d_i$ ) are high. The values of  $D$  computed from the observed responses allow us to locate the optimal region.

According to the overall results of optimization study, the following experimental conditions are chosen: 1.5 g of bonded-phase solid support  $C_{18}$  (a three-to-one ratio support to sample)



**Fig. 3** Response surfaces estimated from the central composite design: (a) percent ethyl acetate vs. solvent volume for vinclozolin; (b) amount of solid phase vs. solvent volume for vinclozolin; (c) amount of solid

phase vs. solvent volume for penconazol; (d) percent ethyl acetate vs. solvent volume for penconazol

and 10 mL of the mixture dichloromethane/ethyl acetate with a percentage of ethyl acetate of 50%, as shown in Fig. 4.

### Validation

#### Matrix effect

Matrix effects are known to be problematic in pesticide analysis using LC-MS and GC-MS [27–29]. Some factors may affect sample matrix effect induced such as the nature of pesticide, the nature of the matrix, the pesticide-to-matrix ratio. In LC-MS, ion suppression can occur in the ion source to cause a reduced signal when matrix co-elutes with the analyte peaks and in GC, the matrix-induced chromatographic response enhancement effect can occur when co-extractive fill active sites in the chromatographic system, which causes higher analyte transfer efficiency, thus greater signal in the presence of matrix [30, 31]. Different approaches on quantification of pesticide residues in fresh fruits and vegetables can be considered in order to reduce the quantitative errors from the matrix effects: (1) use of the standard addition method; (2) use of standards in residue-free matrix spiked with standards (matrix-matched standards); (3) use of deuterated internal and/or surrogate standards; (4) compensation of the calculated results by a matrix factor, and (5) use of analyte protectants.

The matrix effect was evaluated by comparison of the slope of a calibration graph based on the matrix-matched

standards of grapes with the slope of the pure solvent based calibration graph. A higher slope of the matrix calibration indicates matrix-induced signal enhancement, whereas, a lower slope represents signal suppressions. The internal standard, tetradifon, was added to both calibration solutions.

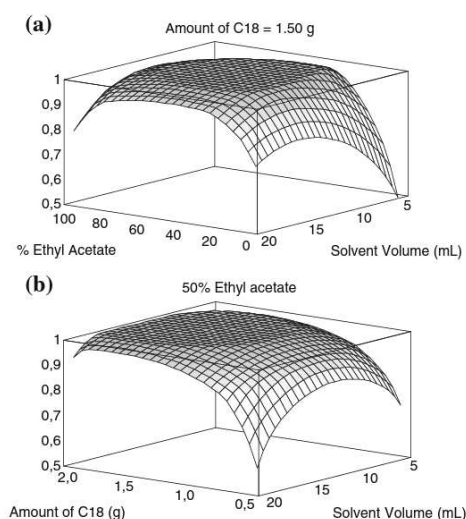
Table 5 summarizes the ratio values for slopes in sample extract and solvent. Differences in response were observed for almost all pesticides. Most of them, except quinoxifen, displayed the enhancement of the signal. Vinclozolin and dichlofluanid showed the highest signal enhancement (ratio values of 1.8 and 2.1, respectively) while penconazole, captan, fluquinconazole and pyraclostrobin yield ratio values from 1.2 to 1.6. A Student's *t* test was made to compare the slopes of the lines of regression (in grape and ethyl acetate) obtained for each compound studied. The results for this test showed that there were significant differences at the 95% confidence level between the slopes obtained in ethyl acetate and grape for all target analytes, except quinoxifen and boscalid. Therefore, for an accurate quantification, the use of matrix-matched standards was required.

#### Quality parameters of the proposed method

The linear and residual ranges, determination coefficients, LOD and LOQ, decision limit and detection capability ( $CC\alpha$  and  $CC\beta$ ), repeatability, expressed as the relative standard deviation (RSD) and HorRat are listed in Table 5.

A matrix-matched calibration was used in this study. Untreated grapes samples were subjected to the optimized extraction method. These blank extracts were spiked with six different levels of concentration for each analyte. Calibration curves were obtained by the least squares method using the fungicide to the internal standard peak area ratio for each compound. Chromatographic response was checked up to  $5,000 \mu\text{g kg}^{-1}$  with determination coefficients higher than 0.99. The method was linear in this range but due to the low concentrations expected in real samples, the calibration standards used for the validation of the proposed method and the analysis of real samples were prepared ranging between close to each LOQ to  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  with determination coefficients  $>0.999$ . Besides, a residual study was performed in order to avoid unjustified reliance on determination coefficients, to ensure that the fit was satisfactory in the region relevant to the residues detected. As can be seen in Table 5, residuals were below 5% for all pesticides. According to guide SANCO/10684/2009 [32], residuals must not deviate by more than  $\pm 20\%$  ( $\pm 10\%$  in cases where the MRL is approached or exceeded).

LOD and LOQ of the overall method were calculated as the concentration giving a signal-to-noise ratio of three ( $S/N=3$ ) and ten ( $S/N=10$ ), respectively. These limits were estimated using the MSPD extract of grapes samples spiked at  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . LODs and LOQs ranged from 1.0 to



**Fig. 4** Desirability functions: (a) percent ethyl acetate vs. solvent volume; (b) amount of solid phase vs. solvent volume

**Table 5** Performance characteristics of the proposed method for pesticides in grapes

Compound	Linear Range ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$r^2$ <sup>a</sup>	Residuals range	LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\alpha$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	MRLs <sup>b</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Repeatability RSD		HorRat (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Slope ratio (grape extract/solvent)
									(%)	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
Vinclozolin	8–110	0.9996	0.1–1.3%	2.2	7.5	8.3	8.5	5000	8.8	6.1	0.36	1.8
Dichlofluanid	4–105	0.9992	0.5–3.3%	1.2	4.1	4.6	5.1	10 <sup>c</sup>	9.0	7.8	0.45	2.1
Penconazol	5–125	0.999	0.1–4.1%	1.5	4.9	5.7	6.4	200	8.6	5.4	0.29	1.6
Captan	7–125	0.999	0.3–4.8%	2.1	7.0	7.8	8.8	20	9.6	7.6	0.48	1.2
Quinoxifen	4–101	0.9992	0.1–2.8%	1.0	3.4	3.7	4.0	1000	6.2	5.6	0.36	0.9
Fluquinconazol	6–105	0.999	0.2–3.1%	1.8	6.0	6.8	7.6	500	8.2	4.9	0.40	1.5
Boscalid	6–112	0.9992	0.2–2.3%	1.6	5.4	6.1	6.9	5000	4.8	3.5	0.35	1.1
Pyraclostrobin	9–110	0.9995	0.5–2.1%	2.6	8.7	10.0	11.3	2000	8.8	6.7	0.29	1.3

<sup>a</sup> Determination coefficient<sup>b</sup> By European legislation for wine grapes<sup>c</sup> Excluded from the Annex I of the Directive 91/414/EEC. Default MRL of 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ 

2.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and from 3.4 to 8.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively (Table 5).

In order to ensure both the quality and the correct interpretation of the analytical results, Decision 2002/657/EC [33] introduces two new parameters,  $CC\alpha$  (decision limit) and  $CC\beta$  (detection capability).  $CC\alpha$  was defined as the limit above which samples are concluded to be noncompliant, with an error probability  $\alpha$  of 5%, while  $CC\beta$  was defined as the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability  $\beta$  of 5%.

With the LOQs being equal to or lower than the maximum residue limits established by European legislation (see Table 5), the  $CC\alpha$  values were calculated by analyzing 20 blank grapes samples spiked at the LOQ levels of the method for each compound. The spiking level concentration plus 1.64 times the corresponding standard deviation, represents the  $CC\alpha$ . Then, the  $CC\beta$  values were calculated by analyzing 20 blank spiked samples at corresponding calculated  $CC\alpha$  level for each analyte. The concentration at the  $CC\alpha$  plus 1.64 times the corresponding standard deviation equals the  $CC\beta$ .

RSD values were calculated at two fortification levels, 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (concentration close to all LOQs for pesticides studied) and five times this concentration (around 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), under repeatability conditions ( $n=5$ , same day) and at the high level (50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) under intermediate precision ( $n=5$ , measurements at five different days) conditions. Intermediate precision was determined separately for all analytes by calculating the RSD of five analyses of the same grapes samples performed over 5 days within 1 month. Horwitz ratio (HorRat) pertaining to intra-laboratory precision, which indicates the acceptability of a method with respect to precision [34], was calculated for all pesticides in the following way:

$$\text{HorRat} = \text{RSD}/\text{Prsd} \quad (1)$$

where RSD stands for relative standard deviation and Prsd is the predicted relative standard deviation,  $\text{Prsd} = 2^{(1-0.5 \log C)}$ , where  $C$  is the concentration expressed as mass fraction (e.g., 10  $\text{ng g}^{-1} = 10 \times 10^{-9}$ ). As can be seen in Table 5, the method was precise with RSD values ranging from 3.5 to 9.6%. They were within the acceptable range,  $\text{RSD} < 20\%$ , according to Document SANCO/10684/2009 [32]. The HorRat values obtained were lower than 0.5 for all compounds at 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Thus, the method provided satisfactory level of intra-laboratory precision.

In order to check accuracy, a recovery study was carried at two concentration levels (Table 6). Average recoveries were between 82% and 120%, except for captan, which gave lower recoveries (from 68% to 76%). Lower recoveries of captan have been repeatedly reported in the literature [14]. The cause was attributed to irreversible



**Table 6** Recovery study of pesticides in grapes

Fungicide	Added ( $\mu\text{gkg}^{-1}$ )	Found ( $\mu\text{gkg}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Recovery (%) <sup>a</sup>
Vinclozolin	11.0	9.8±0.8	89±7
	55.0	58.7±5.0	107±9
Dichlofluanid	10.4	9.2±0.7	88±8
	52.0	43.0±3.2	82±6
Penconazol	12.9	12.8±0.6	99±5
	54.5	49.0±3.5	90±7
Captan	12.9	8.8±0.8	68±9
	54.5	41.4±3.3	76±8
Quinoxifen	10.2	9.2±0.8	90±9
	51.0	45.4±3.3	89±7
Fluquinconazol	10.4	12.5±0.9	120±7
	52.0	50.0±4.0	96±8
Boscalid	11.2	11.5±0.8	103±7
	56.1	48.5±2.2	86±4
Pyraclostrobin	13.9	12.3±0.7	88±6
	59.5	56.5±4.2	95±7

<sup>a</sup> Mean value±SD (n=10)

adsorption by the solid phase or lack of solubility in most organic solvents.

The values of the quality parameters obtained have been compared with those obtained by other authors. In all cases, absolute recovery values published were between 80–120% with precision values below 15% [4–8, 10, 35, 36]. The main differences were in LOQs, as can be seen in Table 7. Limits obtained with the proposed method for all pesticides

**Table 7** Comparison of experimental LOQs of proposed method respect to LOQs published by other authors in grapes

Fungicide	LOQs ( $\mu\text{gkg}^{-1}$ )	
	Present method	Consulted references
Vinclozolin	7.5	10 <sup>a</sup>
Dichlofluanid	4.1	5 <sup>b</sup> ; 8.7 <sup>b</sup> ; 10 <sup>c</sup>
Penconazol	4.9	2.5 <sup>b</sup> ; 5 <sup>d</sup> ; 10 <sup>e</sup> ; 10.1 <sup>a</sup>
Captan	7.0	10 <sup>e</sup> ; 50.5 <sup>a</sup>
Quinoxifen	3.4	5 <sup>d</sup> ; 10 <sup>f</sup>
Fluquinconazol	6.0	10 <sup>e</sup>
Boscalid	5.4	10 <sup>e</sup>
Pyraclostrobin	8.7	2.5 <sup>b</sup> ; 10 <sup>e</sup> ; 600 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> [4] by GC-ECD<sup>b</sup> [7] by LC-MS/MS<sup>c</sup> [5] by LC-MS/MS<sup>d</sup> [6] by GC-ECD<sup>e</sup> [35] by GC-ITMS<sup>f</sup> [36] by GC-ECD<sup>g</sup> [10] by HPLC-DAD

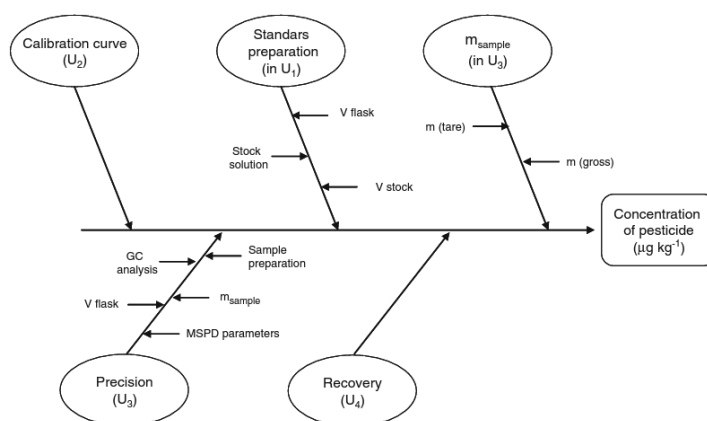
were lower than those reported in previous works by other authors except for penconazol and pyraclostrobin in one of the references [7] dealing with the extraction of these pesticides from grapes. The detection systems used for the determination of these target compounds as ECD in GC [4, 6, 36] and DAD in HPLC [10] provide, in general, less sensitivity in the analysis of this kind of compounds. Besides, in most methods developed in literature, the extraction was based on a simple step (solid–liquid extraction) with solvents like ethyl acetate, acetone and hexane without clean-up after extraction [4–6, 10, 35, 36]. In this work, a clean-up step with silica together with use of a sensitive detection system, MS, led to cleaner chromatograms and higher signal/noise ratios.

Regarding the total time of analysis, which nowadays is becoming one of the most important factors, simultaneous extractions can be performed in the Visiprep<sup>®</sup> vacuum manifold used to simultaneously process 12 samples in MSPD, while only sequential extractions can be conducted with SLE and QuEChERS methods. Besides, dispersion and cleaning of the samples for MSPD are carried out simultaneously in only one step.

#### Uncertainty evaluation

The uncertainty of measurement obtained by applying the proposed analytical method (Fig. 5) was estimated using them bottom-up approach on the basis of in-house validation data according to EURACHEM/CITAC guide [37]. The main uncertainty sources were identified and quantified, followed by the determination of the combined uncertainty ( $u_c(y)$ ) using a Gauss propagation model.

**Fig. 5** Cause and effect diagram of the main uncertainties evaluated in pesticide analysis



Expanded uncertainty ( $U$ ) was calculated using a coverage factor  $k=2$  (95% of confidence level):  $U = u_c(y) \times k$ . In the present determination the following four main individual uncertainty sources were taken into account:

$U_1$  Uncertainty associated with standard preparation ( $U_1 = u_{std}$ ) which is concentration-dependent, calculated by the propagation errors approach, considering the uncertainty of the laboratory apparatus used:

$$u_{std} = \sqrt{u(C_1)^2 + u(C_2)^2 + \dots + u(C_i)^2}$$

where  $u(C_1)$ ,  $u(C_2)$ , and  $u(C_i)$  are the uncertainties associated with the individual standards used in the calibration curve. The standard uncertainty associated with the preparation of each calibration standard ( $u(C_i)$ ) was calculated by taking into account the uncertainty associated with the stock standard solution concentration ( $u(C_{stock})$ ), the plus volume of stock standard solution ( $u(V_{stock})$ ), and the uncertainty of the final measured volume in the volumetric flask ( $u(V_{flask})$ ) as follows:

$$u(C_i) = C_i \sqrt{\left(\frac{u(C_{stock})}{C_{stock}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{stock})}{V_{stock}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{flask})}{V_{flask}}\right)^2}$$

where  $u(C_{stock}) = C_{stock} \sqrt{(u(m_{comp})/m_{comp})^2 + (u(V_{dil})/V_{dil})^2}$ , associated with the uncertainty of the mass of standard compound weighted ( $u(m_{comp})$ ) and the dilution volume of the latter quantity ( $u(V_{dil})$ ). Whenever an individual standard was prepared from a working solution  $C_i$  the uncertainty of the working solution was taken into account instead of the uncertainty of stock solution.

$U_2$  Uncertainty associated with the calibration curve ( $U_2 = u(x_o/x_o)$ ) which derives from the uncertainty associated with the result obtained by the calibration curve:

$$u(x_o) = \frac{S_y}{b} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

where  $S_y$  is the residual standard deviation,  $b$  is the slope of the calibration curve,  $N$  is the number of standards used in the calibration curve,  $n$  is the number of experimental values obtained for each  $x$  value,  $y_o$  is the experimental value of  $y$  for which the concentration  $x_o$  will be calculated by the calibration curve,  $\bar{y}$  is the average of the  $y_i$  values and  $\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2$  is the sum of the obtained concentration (given by the calibration curve) minus the average concentration of the standards used in the calibration curve.

$U_3$  Uncertainty associated with precision ( $U_3 = u(x_o)/x_o = s_n/n^{1/2}$ ) expressed as a relative standard deviation obtained from intermediate precision assays for different levels of concentration, where  $s_n$  is the standard deviation of the experimental data for precision, and  $n$  is the number of assays.

$U_4$  Uncertainty associated with accuracy.  $U_4 = s_{rec}/n^{1/2}$  expressed by the recovery percentage obtained from spiking assays, in the absence of certificated reference material, where  $s_{rec}$  is the standard deviation of the recovery, and  $n$  is the number of assays. The global uncertainty ( $U(X)$ ) was calculated as:

$$U(X) = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2}$$

The uncertainties were calculated for two spiking level (10 and 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and the data, expressed as relative measures, are presented in Table 8.

Evaluation of total uncertainty was done assuming that all contributions were independent of each other. A coverage factor of 2 was considered at the confidence level of 95% to evaluate the expanded uncertainty at both levels of fortification. The expanded uncertainties of the pesticides ranged up to a maximum of 19.6% and 7.2% at 10 and 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. At 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , lower uncertainties were observed for vinclozolin (10.8%) and pyraclostrobin (11.8%) while for 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , the values obtained for uncertainties were similar for all compounds (from 5.2% to 7.2%). At the low spiking level, the major uncertainty source was the calibration curve interpolation ( $U_2$ ), which varied between 4.4% for vinclozolin to 8.9% for dichlofluanid. However, at the high spiking level, a similar contribution for all uncertainties was observed, being uncertainties associated with precision and accuracy slightly higher than that associated with standards and calibration curve. These results suggest that the overall variance of the method was higher at the low concentration level but in all cases investigated, the expanded uncertainty values obtained are significantly lower than the “default” value of 50% proposed by SANCO/10684/2009 [32].

Application to real samples

To further demonstrate the utility and performance of the MSPD method, grapes samples were obtained from local markets and analyzed in duplicated. Out of ten analyzed grapes, six were found to be without detectable pesticide residues.

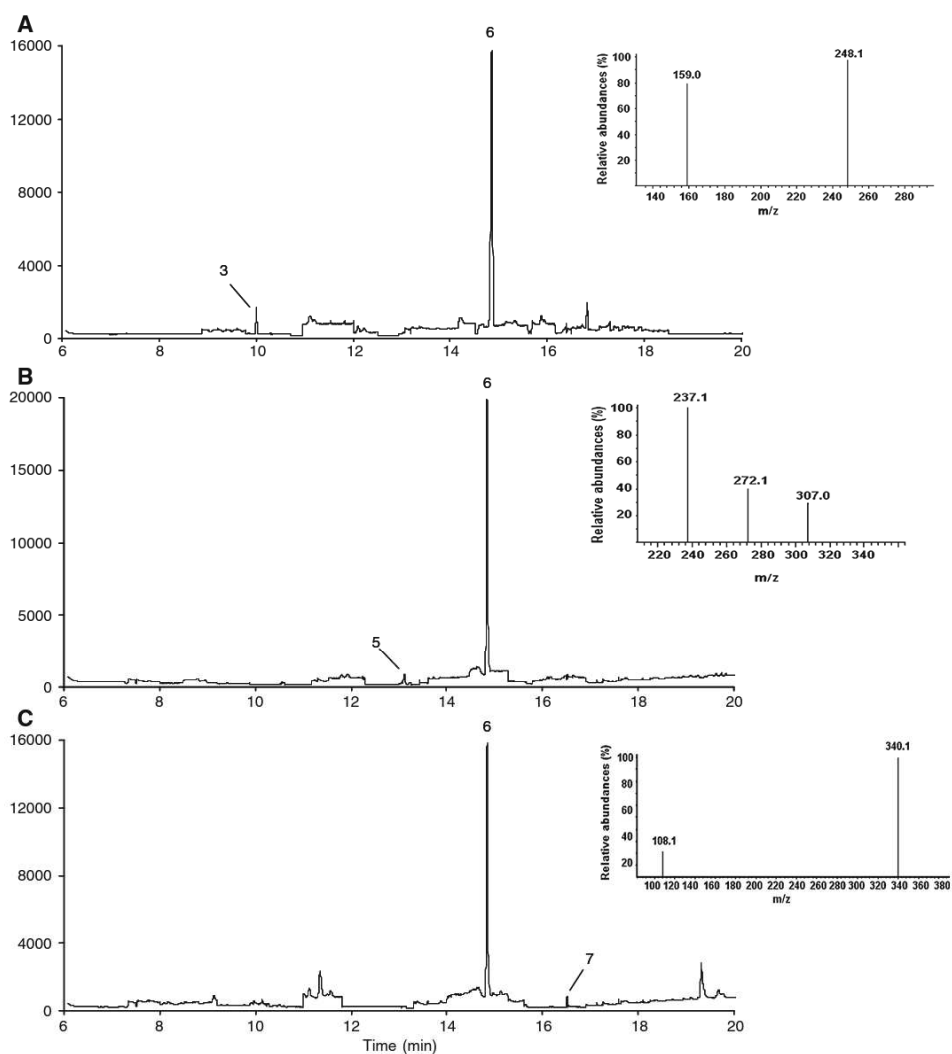
Penconazol was positively detected in two samples at concentration of 9.8 and 6.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The concentrations found in the samples were always lower than the maximum residue limits established for penconazol (Table 5). Two samples contained also traces of fungicide residues (quinoxyfen and fluquinconazol) however at concentration levels below the quantification limit (Table 5). Confirmation criteria were that the retention times of the compounds in the sample to be within  $\pm 2\%$  of the respective retention times in matrix-matched calibration standards and the relative abundances of the target and qualifiers ions. Figure 6 shows the corresponding chromatograms for the positive real grapes samples analyzed where extraction was performed by MSPD.

Conclusions

MSPD followed by GC-MS has been validated for determining eight fungicides belonging to the several

Table 8 Partial ( $U_1$ - $U_4$ ), global (U) and expanded uncertainties associated to the results (expressed as relative measures) referred to standards preparation ( $U_1$ ), calibration curve ( $U_2$ ), precision ( $U_3$ ) and accuracy ( $U_4$ )

Compound	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$											
	Standards $U_1$	Cal. curve $U_2$	Precision $U_3$	Accuracy $U_4$	Global uncertainty U	Expanded uncertainty 2U	Standards $U_1$	Cal. curve $U_2$	Precision $U_3$	Accuracy $U_4$	Global uncertainty U	Expanded uncertainty 2U
Vinclozolin	0.009	0.044	0.020	0.022	0.054	0.108	0.009	0.008	0.018	0.028	0.036	0.072
Dichlofluanid	0.009	0.089	0.030	0.025	0.098	0.196	0.009	0.013	0.021	0.019	0.032	0.064
Penconazol	0.010	0.086	0.019	0.016	0.090	0.180	0.010	0.012	0.015	0.022	0.031	0.062
Captaf	0.010	0.076	0.029	0.028	0.086	0.173	0.010	0.014	0.024	0.019	0.035	0.070
Quinoxifen	0.008	0.081	0.018	0.031	0.089	0.178	0.008	0.011	0.017	0.025	0.034	0.068
Fluquinconazol	0.009	0.085	0.024	0.028	0.093	0.186	0.009	0.013	0.019	0.025	0.035	0.070
Boscalid	0.009	0.088	0.018	0.022	0.093	0.186	0.009	0.013	0.017	0.013	0.026	0.052
Pyraclostrobin	0.009	0.053	0.018	0.016	0.059	0.118	0.009	0.009	0.014	0.022	0.029	0.058



**Fig. 6** SIM chromatograms and ion ratios of the real grapes samples obtained by MSPD containing penconazol at a concentration of  $6.7 \mu\text{g kg}^{-1}$  (a), quinoxifen (b) and fluquinconazol (c). For compound identification, see Fig. 2

chemical classes, vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxifen, fluquinconazol, boscalid, and pyraclostrobin, from grape samples. The method uses  $\text{C}_{18}$  (solid phase) with silica (clean dispersion sorbent) and a mixture of dichloromethane/ethyl acetate (1:1) as elution solvent

and provides good selectivity, accuracy, precision, and sensitivity for identification and quantification at low levels of concentration of the determined pesticides, being the LOQs obtained lower than the limit values established by European legislation. In addition, the method is simple and

it requires only a small sample size, and offers considerable savings in terms of solvent consumption, cost of materials, sample manipulation and analysis time, making MSPD an attractive alternative for the more conventional extraction techniques. The applicability of the method to routine analysis was tested in real samples with good performance.

**Acknowledgments** The authors want to thank the University of La Rioja for the FPI grant to Laura Lagunas-Allué, ADER for the project 2005-I-ID-00065, INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), MEC/FEDER for the AGL2005-02313/ALI project and Bodegas D. Mateos S.L.

## References

- Coscollá R (2004) Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada, 5ª Edición, Ed. Mundi-Prensa, 329–355
- Teixeira MJ, Aguiar A, Afonso CMM, Alves A, Bastos MMSM (2004) *Anal Chim Acta* 513:333–340
- Commission Regulation (EC) No. 149/2008 of 29 January 2008 amending Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto, Official Journal L58, 1 March 2008, European Union, Brussels, Belgium, p 0001
- Navarro S, Barba A, Navarro G, Vela N, Oliva J (2000) *J Chromatogr A* 882:221–229
- Hiemstra M, de-Kok A (2007) *J Chromatogr A* 1154:3–25
- Di Bella G, Saitta M, Salvo F, Nicotina M, Dugo G (2003) *Ital J Food Sci* 15:427–432
- Banerjee K, Oulkar DP, Dasgupta S, Patil SB, Patil SH, Savant R, Adsule PG (2007) *J Chromatogr A* 1173:98–109
- Lesueur C, Knittel P, Gartner M, Mentler A, Fuehracker M (2008) *Food Control* 19:906–914
- Walorczyk S (2008) *J Chromatogr A* 1208:202–214
- de Melo Abreu S, Caboni P, Cabras P, Garau VL, Alves A (2006) *Anal Chim Acta* 573–574:291–297
- Fang G, Min G, He J, Zhang C, Qian K, Wang S (2009) *J Agric Food Chem* 57:3040–3045
- Santana Dos Santos TF, Aquino A, Dórea HS, Navickiene S (2008) *Anal Bioanal Chem* 390:1425–1430
- Menezes Filho A, Navickiene S, Dórea HS (2006) *J Braz Chem Soc* 17:874–879
- Navarro M, Picó Y, Marín R, Mañes J (2002) *J Chromatogr A* 968:201–209
- Fernández-Álvarez M, Llompart M, Lamas JP, Lores M, García-Jares C, Cela R, Dagnac T (2009) *J Chromatogr A* 1216:2832–2842
- Shen X, Cai J, Gao Y, Su Q (2006) *Chromatographia* 64:71–77
- Fernández M, Picó Y, Mañes J (2000) *J Chromatogr A* 871:43–56
- Tadeo JL, Sánchez-Brunete C (2003) *Chromatographia* 57:793–798
- Viana E, Moltó JC, Font G (1996) *J Chromatogr A* 754:437–444
- Morzycka B (2002) *Chem Anal* 47:571–583
- Contieri Abad F, Winck PR, Benvenuti EV, Do Carmo Ruaro Peralba M, Bastos Caramão E, Alcaraz Zini C (2007) *J Sep Sci* 30:2109–2116
- Kristenson EM, Ramos L, Brinkman UATH (2006) *Trends Anal Chem* 25:96–111
- Menezes-Filho A, Navickiene S, Dórea HS (2006) *J Braz Chem* 17:874–879
- Lagunas-Allué L, Crespo-Crespo D, Vaquero-Fernández L, Martínez-Soria MT, Fernández-Zurbano P, Sanz-Asensio J (2008) European Pesticide Residue Workshop Symposium (EPRW), Berlin, Germany PA 34: 131
- Lagunas-Allué L, Vaquero-Fernández L, Martínez-Soria MT, Fernández-Zurbano P, Sanz-Asensio J (2007) Euroanalysis XIV Symposium, Antwerp, Belgium, p 488, S9 & S13
- Barker SA, Long AR (1992) *J Liq Chromatogr* 15:2071–2089
- Erney DR, Gillespie AM, Gilvydis DM, Poole CF (1993) *J Chromatogr A* 638:57–63
- Menkissoglu-spirodi U, Fotopoulou A (2004) *Int J Environ Anal Chem* 84:15–27
- Schmeck T, Wenclawiak BW (2005) *Chromatographia* 62:159–165
- Banerjee K, Oulkar DP, Patil SB, Jadhav MR, Dasgupta S, Patil SH, Bal S, Adsule PG (2009) *J Agric Food Chem* 57:4068–4078
- Radišić M, Grujić S, Vasiljević T, Laušević M (2009) *Food Chem* 113:712–719
- Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/10684/2009, January 2010
- Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC on the performance of analytical methods and the interpretation of results, European Union, Brussels, August 12, 2002
- Horwitz W, Albert R (2006) *J AOAC Int* 89:1095–1109
- Angioni A, Garau VL, Aguilera Del Real A, Melis M, Minelli EV, Tuberoso C, Cabras P (2003) *J Agric Food Chem* 51:6761–6766
- Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Cabitza, Pala FM, Farris GA (2000) *J Agric Food Chem* 48:6128–6131
- Ellison LR, Rosslein M, Williams A (eds) Quantifying uncertainty in analytical measurements, 2nd edn, EURACHEM/CITAC, 2000





**ANEXO IV. Comparison of four methods for the determination of fungicide residues in grapes through gas chromatography-mass spectrometry**

---





## Comparison of four extraction methods for the determination of fungicide residues in grapes through gas chromatography–mass spectrometry

L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria\*

Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios, 51, 26006 Logroño, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 28 March 2012  
Received in revised form  
28 September 2012  
Accepted 31 October 2012  
Available online 6 November 2012

**Keywords:**  
Grapes  
Fungicides  
GC–MS  
MSPD  
MAE  
QuEChERS  
Ethyl acetate

### ABSTRACT

Four different methods for simultaneous extraction of vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, captan, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin from grapes were optimized and further tested. Microwave assisted extraction (MAE), matrix solid-phase dispersion (MSPD), solid–liquid extraction (SLE) and QuEChERS were compared in terms of their limits of detection and quantification and recoveries. For MAE, MSPD and ethyl acetate extraction, the optimal conditions were optimized by using experimental designs. The analysis was performed using gas chromatography–mass spectrometry in the selected ion monitoring mode (GC–MS, SIM). The proposed methods showed good sensitivity, limits of quantification were lower than MRLs and precision (expressed as relative standard deviation) ranged from 2.9 to 11.1%. The recoveries obtained from MAE, MSPD, SLE and QuEChERS were in the range 78–100%, 66–102%, 58–88% and 68–96%, respectively. In addition, the four methods were compared in two ways: by means of calibration curves obtained with 10 fortified samples in the studied range of concentrations and by the application of statistical tests such as Levene's test (to study variance homogeneity), ANOVA and Tukey's test (in case of Levene's test was satisfactory) for the assessment of the information obtained in the analysis of real samples. Both ways of comparison led to the same results: no differences between the four methods for the extraction of vinclozolin, dichlofluanid, quinoxyfen, fluquinconazol and pyraclostrobin were found. However, there were differences for the analysis of captan, boscalid and penconazole.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The best control of fungal diseases in the vineyards is achieved through the use of good cultural practices and suitable fungicide selection. Several different fungicides, such as vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, captan, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin, are widely used to control pest and diseases caused by various fungal pathogens in grapes. The structures and chemical properties of these compounds are shown in Table 1.

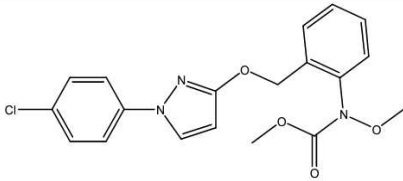
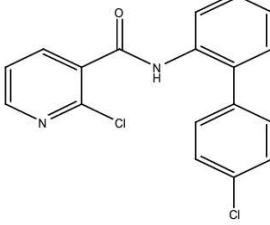
As a result of the use of fungicides in viticulture, residues can remain on grapes after harvest and they could be transferred to the wine [1–3]. Therefore, there has been a growing interest in the detection and quantification of pesticide residues in agricultural produce intended for human consumption. As a consequence, the European Union Commission established maximum residue limits (MRLs) in fruits and vegetables [4] to ensure that they are not present at levels that may pose a health risk.

Pesticides are used to control pests in vegetables, fruits, cereal grains, and cotton, as well as ornamental plants, trees and vines. The monitoring of trace levels of pesticides in environmental and food samples is imperative because of their widespread use in agriculture but the sample preparation methods to monitor multiresidues of pesticides in grapes are scarce. Ideally, a sample preparation should be rapid, simple, cheap, environmentally friendly and provide clean extracts. Traditionally pesticide analyses were performed by the time- and solvent-consuming Soxhlet extraction [5,6] for solid samples and by liquid–liquid extraction (LLE) for liquid samples [7,8], which have been replaced by more environmentally friendly procedures including pressurized liquid extraction (PLE) [9,10], solid phase extraction (SPE) [11,12], QuEChERS [13,14], microwave-assisted extraction (MAE) [15,16] and matrix solid-phase dispersion (MSPD) [17,18].

Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is an extraction and clean up technique used for semisolid and solid samples that provides a good alternative to traditional extraction techniques for chromatographic analysis. MSPD includes sample homogenization, cellular disruption, exhaustive extraction, fractionation and clean up in a simple process in which a small amount of sample (0.1–5 g) is blended with the selected solid phase (such as C18, C8, silica, florisil or alumina) followed by gravitational elution of compounds with

\* Corresponding author at: Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios, 51, 26006 Logroño, Spain. Tel.: +34 941 299 629; fax: +34 941 299 621. E-mail address: [maria-teresa.martinez@unirioja.es](mailto:maria-teresa.martinez@unirioja.es) (M.T. Martínez-Soria).

Table 1 (Continued)

Family	Common name	Chemistry structure	Chemical properties
Strobilurin	Pyraclostrobin		MW <sup>a</sup> = 343.21 S <sup>b</sup> = 4.6/45,000 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 2.96
Carboxamide	Boscalid		MW <sup>a</sup> = 387.82 S <sup>b</sup> = 1.9/100,800 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.99

<sup>a</sup> Molecular weight (g mol<sup>-1</sup>).

<sup>b</sup> Water solubility at 20 °C (mg L<sup>-1</sup>)/methanol solubility at 20 °C (mg L<sup>-1</sup>).

<sup>c</sup> Octanol/water partition coefficient at pH 7 and 20 °C.

a small volume of an appropriate solvent. When necessary, further purification with adsorbents can be performed.

Microwave assisted extraction (MAE) seems to be an analytical technique of interest since these instruments enable simultaneous extractions of organic pollutants at high pressure and temperature, facilitating rapid and selective analyte desorption from complex matrices. The extraction efficiency has been comparable or better than that obtained by traditional methods, considerably reducing extraction times and solvent volumes [19].

The QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) method is an acetonitrile partitioning and dispersive solid-phase extraction (d-SPE) method well known for its applicability in simultaneous analysis of a large number of pesticides in a variety of food matrices [20,21]. QuEChERS was developed from an extraction method for pesticides in fruits and vegetables, coupled with a clean-up method that removes sugars, lipids, organic acids, sterols, proteins, pigments and excess water. This technique offers a user-friendly alternative to traditional liquid–liquid and solid phase extractions. The process involves two simple steps. First, the homogenized samples are extracted and partitioned using an organic solvent and salt solution. Then, the supernatant is further extracted and cleaned using a dispersive solid phase extraction (d-SPE) technique. The method has already received worldwide acceptance because of the simplicity and high throughput enabling a laboratory to process significantly larger number of samples in a given time as compared to the earlier methods [22,23]. QuEChERS multimethod has been implemented in numerous laboratories for the analysis of apolar, middle polar and polar pesticides in non-fatty food samples and has received the distinction of an AOAC official method [24] for multiple pesticides in fruits and vegetables. In case of fatty food samples, it is used the modified QuEChERS [25,26].

In spite of the advantages of the methods above mentioned, many of the methods proposed in the literature for the analysis of fungicides in fruits and vegetables are based on simple one step solid–liquid extraction (SLE) using one solvent or mixtures of several ones [27–30]. Therefore, the aim of this study was the application of four methods, MAE, MSPD, SLE and QuEChERS, for the

extraction of fungicides from grapes samples in order to compare the efficiency of each one in the determination of these compounds with gas chromatography (GC) coupled with a simple quadrupole mass selective detector (MS). The comparison was carried out in terms of analytical parameters (LOD, repeatability, recovery, . . .) as well as by means of calibration curves obtained with fortified samples and statistical tests applied for the assessment of the results obtained in the analysis of real samples with all the methods validated. In the first case, slope and ordinate at the origin of calibration curves were compared statistically at the 95% confidence level. For real samples, Levene's test was applied in order to check variance homogeneity. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used. These parametric statistical tests could be used as the data were normally distributed.  $P < 0.05$  ( $P$  value is the probability) was considered statistically significant.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

Standards of penconazole, captan, dichlofluanid, vinclozolin, pyraclostrobin, boscalid, fluquinconazol and quinoxifen with purity higher than 99.0% were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Tetradifon from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) with a purity of 99.5% was used as quantification Injection Internal Standard (I-I-ISTD) to compensate for any sample and injection volume changes and to correct the variability in gas chromatographic injection and mass spectrometric detection response. HPLC grade ethyl acetate, acetic acid (HAc), methanol, acetone, acetonitrile, hexane and dichloromethane were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained in a Milli-RO plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Anhydrous sodium sulphate (99.5%), sodium chloride, magnesium sulphate, syringes barrel of 10 mL and glass wool were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Octyldecyl-functionalized silica gel 9–12%, C<sub>18</sub>, and Bondesil-PSA (poly-styrene-acrylate)



were supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Cellulose filters were from Restek (Barcelona, Spain).

## 2.2. Standard preparation

Fungicide stock solutions (ca. 500 mg L<sup>-1</sup>) and intermediary solutions (10 and 1 mg L<sup>-1</sup>) were prepared in methanol. Stock and intermediary standard solutions of the I-ISTD, tetradifon, were prepared in the same way in ethyl acetate. All standard solutions were stored at -20 °C. They were stable over a period of at least three months. Intermediary solutions were used to spike grape samples and blank grape extracts (to plot the calibration curves).

## 2.3. Sample preparation

Red grapes were purchased from cv. Tempranillo grapevines of Rioja Appellation d'Origine. at a vineyard in Aldeanueva de Ebro, La Rioja, Spain. These vines had not been treated with phytosanitary products. A representative portion of sample (1 kg of grapes) was chopped into small pieces and homogenized using a crusher (Heidolph SilentCrusher M, Schwabach, Germany) and spiked with penconazole, captan, dichlofluanid, vinclozolin, pyraclostrobin, boscalid, fluquinconazol and quinoxyfen. These samples were allowed to stand 72 h before extraction. Another portion of 1 kg with no detectable levels of the target compounds was used in order to obtain the "blank extracts" for the matrix-matched calibrations carried out with all the methods.

## 2.4. Grapes samples extraction

Four extraction methods were assessed and compared in this study: (i) matrix solid phase dispersion; (ii) microwave assisted extraction; (iii) ethyl acetate extraction method and (iv) the QuEChERS method for the analysis of pesticide in grape samples.

### 2.4.1. Matrix solid phase dispersion

A representative portion of the sample (0.5 g) was gently blended with 1.50 g of C<sub>18</sub>, into a glass mortar using a glass pestle, until a homogeneous, semi-dry mixture was obtained. This homogenized mixture was transferred to a column constructed from a syringe barrel with a cellulose filter at the bottom and filled with 1.0 g of adsorbent (silica). A second filter was placed on top of the sample before compression. 10 mL of dichloromethane/ethyl acetate (1:1) were added to the column and the sample was allowed to elute dropwise applying a slight vacuum. The eluent was collected into a graduated conical tube and concentrated, under stream of nitrogen, to 5 mL and subjected to GC-MS analysis. Tetradifon was added at a concentration of 100 µg L<sup>-1</sup>. All samples were extracted in duplicate.

### 2.4.2. Microwave assisted extraction

MAE experiments were performed (in duplicate) using an MARS-microwave sample preparation unit (CEM, Corp., Matthews, NC) equipped with a solvent detector. The MARS was able to simultaneously extract 48 solid samples in a Teflon-lined extraction vessel (volume of 50 mL) under identical extraction conditions (temperature and pressure). Samples were accurately weighed (2.0 g) into the PTFE-lined extraction vessel. Subsequently, 10 mL of hexane/acetone (1:1) mixture were added as an extraction solvent. The oven was set to a power of 600 W, ramped to 105 °C within 5 min, and held at this temperature for 10 min while stirring at the highest setting. After extraction, the vessels were cooled to room temperature before being opened. Next, the water of the supernatant from each vessel was removed using anhydrous sodium sulphate and was filtered through glass wool. The residue was rinsed three times with 2 mL of solvent and combined with the

supernatant. Finally, the extracts were evaporated using a low volume concentrator (Zymark TurboVap II Vortex evaporator, Hopkinton, MA, USA) under a gentle stream of nitrogen evaporator and adjusted to a final volume of 5 mL with hexane/acetone (1:1). Tetradifon was added after extraction (concentration of 100 µg L<sup>-1</sup>) and samples were analyzed by GC-MS.

### 2.4.3. QuEChERS

Ten grams of the homogenized sample were weighed (in duplicate) in a 50 mL centrifuge tube. Grape samples were extracted with 10 mL of acetonitrile (HAc 1.0%, v/v) for 1 min with a vortex mixer. Afterwards, 4 g of anhydrous MgSO<sub>4</sub> and 1 g of NaCl were added. The mixture was then vortexed for another minute and centrifuged for 6 min at 5000 rpm. An aliquot of 5 mL was drawn from the supernatant to another centrifuge tube, cleaned by dispersive solid-phase extraction with 125 mg of PSA and 750 mg of magnesium sulphate and the mixture was shaken for 1 min. Then, centrifugation was carried out at 5000 rpm for 3 min. Following centrifugation, the I-ISTD solution was added and homogenized by agitation. The supernatant was put into a vial and analyzed by GC-MS.

### 2.4.4. Solid liquid extraction

Fifteen grams of grapes, 12 mL of ethyl acetate and 0.015 g of NaCl were mixed in a 50 mL centrifuge tube. The mixture was homogenized with the crusher for 2 min and then centrifuged at 6000 rpm for 15 min. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulphate and filtered through glass wool. The extract was concentrated at 5 mL in the TurboVap<sup>®</sup>. Tetradifon was added at 100 µg L<sup>-1</sup> and the sample was analyzed by GC-MS. All samples were extracted in duplicate.

## 2.5. Validation methods

Validation was performed according to the SANCO/12495/2011 guide [31] which stipulates the validation methods for pesticide residues monitoring. Performance characteristics studied were matrix effect, linearity, limits of detection/quantification, recovery and precision.

## 2.6. Chromatographic conditions

GC separation was performed using an Agilent Technologies GC 6890N coupled to a 5975C MS Mass Selective Detector. The analytical column used was a HP-5MS with 30 m of length, 0.25 mm of internal diameter and 0.25 µm of film thickness.

The initial oven temperature was set at 100 °C, increased to 185 °C at 40 °C min<sup>-1</sup> and kept for 5 min, increased at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup> to 300 °C for 3 min. The volume of sample was 2 µL, injected in splitless mode with a splitless time of 0.9 min. The injector temperature was set at 250 °C. Helium (99.999% purity) was used as carrier gas at constant flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. The mass spectrometer was operated in electron impact (70 eV of ion energy), with 6 min solvent delay, the interface temperature was kept at 310 °C and ion source temperature was kept at 230 °C. The dwell time for ion monitoring was 100 ms per ion. Selected monitoring ion (SIM) mode was used. The ions utilized for confirmation and quantification, target and qualifiers ion, and the ratios are shown in Table 2.

## 2.7. Data analysis

The StatGraphics Centurion Version XV was used to generate the experimental designs.

Data were statistically analyzed in SPSS version 12.0. One way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey's B test were

**Table 2**

Retention times, target and qualifier ions for the target pesticides by GC–MS.

Compound	$t_R$ (min) <sup>a</sup>	Target ion I <sub>1</sub> (m/z)	Qualifier ion I <sub>2</sub> (m/z)	Qualifier ion I <sub>3</sub> (m/z)
Vinclozolin	7.7	212	285	198
Dichlofluanid	8.8	123	224	167
Penconazole	10.1	248	159	–
Captan	10.3	79	149	–
Quinoxifen	13.3	237	307	272
Tetradifon	15.1	159	356	111
Fluquinconazol	16.7	340	108	–
Boscalid	17.4	140	342	112
Pyraclostrobin	18.3	132	164	325

<sup>a</sup> Retention time.

used in order to compare the concentrations obtained in samples. *P* value < 0.05 was taken as the level of significance. Homogeneity of variance was assessed using the Levene's test.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimized conditions of the methods

##### 3.1.1. MSPD

Preliminary investigations were performed to choose the bonded phase [18]. Different solid-phases – C<sub>18</sub>, florisil and alumina – were tested using 0.5 g of grapes spiked with the target pesticides. C<sub>18</sub> was the adsorbent selected for MSPD because it gave the best recovery averages for most of the studied compounds and the lowest variation in the values obtained. In addition, a clean-up procedure for fruit and vegetable extracts could be recommended. To this end, 1 g of silica was added the bottom part of the syringe.

In order to reduce the time to achieve the optimal working conditions, a central composite design (CCD) was applied to investigate the effect of the remaining variables: amount of solid phase C<sub>18</sub> (0.5–2.0 g), percentage of ethyl acetate in a mixture dichloromethane–ethyl acetate (0–100%, v/v) and volume of eluting mixture (5–20 mL). The results showed that the amount of adsorbent and percentage of ethyl acetate were the most important variables affecting extraction efficiency. These factors were significant for all the compounds except for captan and penconazol, respectively. On the other hand, the eluting volume (C) was not significant for any of the target compounds in the range studied. The search for the experimental conditions that optimize the eight responses simultaneously required the use of the desirability function approach. According to the overall results of optimization study, the following experimental conditions were chosen: 1.5 g of bonded-phase solid support C<sub>18</sub> (a three-to-one ratio support to sample) and 10 mL of the mixture dichloromethane/ethyl acetate with a percentage of ethyl acetate of 50% (v/v).

##### 3.1.2. MAE

The major parameters affecting the pesticide extraction efficiency by MAE are temperature, extraction time, nature and solvent volume. Preliminary investigations were performed to choose the extraction solvent [15]. In order to evaluate the extraction solvent efficiency, samples were extracted with acetonitrile, acetone, hexane/ethyl acetate (1:1), dichloromethane/ethyl acetate (1:1) and hexane/acetone (1:1). The mixture hexane/acetone (1:1) provided the best recoveries of the pesticides and the cleanest chromatograms.

A 2<sup>4-1</sup> fractional factorial design was performed to study the influence of several factors on the MAE procedure and to search the optimal experimental conditions. Four variables were selected to define the experimental field: temperature (70–120 °C), extraction

time (2–10 min), % hexane (40–80%, v/v, in the mixture hexane/acetone) and solvent volume (5–20 mL). For all target pesticides, temperature was a significant factor and as expected it caused higher yields when it was used at high level. Finally, extraction time positive influence was confirmed just for captan. For other compounds, a higher extraction time led to higher chromatographic responses, but was not a significant variable. Therefore, optimization of these two significant factors was carried out.

On the basis of these results, the variables % hexane and solvent volume were considered as non-relevant and were therefore fixed at 50% and 10 mL, respectively. The two remaining variables, temperature and extraction time, were studied according to a CCD consisting of a factorial design 2<sup>2</sup> with four star points located at  $\pm\alpha$  from the center of the experimental domain. The influence of temperature was studied at 80 °C (low level) and 120 °C (high level) and 2 min and 14 min were considered as high and low levels, respectively, for extraction time. In order to determine the optimal values for the two variables, the overall desirability function was calculated as the geometric mean of the normalized individual response functions and the overall optimum was located at 105 °C and 10 min for the extraction temperature and time, respectively. These conditions were selected for further experiments.

##### 3.1.3. SLE: ethyl acetate extraction

Many variables affect extraction (salt addition, type of solvent, agitation, sample weight or solvent volume). In order to find the best conditions, NaCl concentration (0.0–0.12 M), sample weight (10–25 g) and solvent volume (10–30 mL) were tested by experimental design for the eight pesticides and a central composite design was performed. It consisted of a 2<sup>3</sup> factorial design with six star points located at  $\pm\alpha$  from the center of the experimental domain. The value of axial distance  $\alpha$  was 1.68 in order to establish the rotatability condition. The design was also completed with nine central points. Therefore, a total of 23 experiments were randomly performed using ethyl acetate as extraction solvent. In order to identify the optimal values for the three variables, surface responses were drawn for all the compounds. Sample weight was a significant factor for almost all the pesticides (except for dichlofluanid and pyraclostrobin) and it caused higher yields when it was used at low level. Solvent volume negative influence was confirmed just for boscalid and fluquinconazol and the extraction was better at low levels of NaCl concentration. The maximization of the desirability function yielded values of 15 g, 12 mL and 0.01 M for the sample weight, solvent volume and NaCl concentration, respectively.

Once these factors were optimized, the agitation was studied. Different types and times for agitation were tested. Manual, orbital and crusher agitation were performed for 2, 5 and 10 min. The results showed that 2 min of agitation with a crusher led to the maximum recoveries.



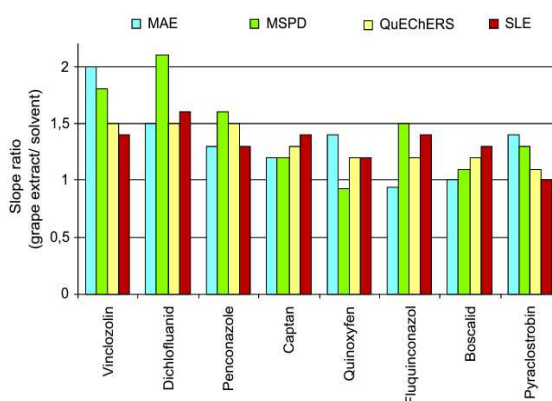


Fig. 1. Slope ratios (grape extract/solvent) for the target fungicides with four different extraction methods.

### 3.2. Validation of the method

#### 3.2.1. Matrix effect assessment

Determination of pesticide residues in food matrices may be adversely affected by a phenomenon commonly known as the “matrix-effect chromatographic” [32–34]. Some factors may affect sample matrix effect induced such as the nature of pesticide, the nature of the matrix, the pesticide-to-matrix ratio. In GC, this phenomenon occurs in the injector port, in the separative system (retention gap and/or analytical column) and also causes ionization potential modification of analytes. The main consequence of matrix effect is an increasing (ion enhancement) or decreasing analyte signal (ion suppression) in the presence of the matrix (real sample) in respect to the same analyte in solvent (standard solution). The matrix effect was evaluated by comparison of the slope of a calibration graph based on the matrix-matched standards of grapes with the slope of the pure solvent based calibration graph.

Fig. 1 showed the slope ratios for the eight fungicides with the four extraction methods. A Student's *t*-test was made to compare the slopes of the lines of regression obtained for each compound studied. The results for this test showed that there were significant differences at the 95% confidence level between the slopes obtained in solvent and grape extracts for all target analytes except fluquinconazol and boscalid for MAE, quinoxifen and boscalid for MSPD and pyraclostrobin for QuEChERS and SLE.

#### 3.2.2. Linearity of the chromatographic method

In this study, a matrix-matched calibration was used in order to reduce the quantitative errors from the matrix effects. The matrix blank was prepared as for analysis of samples with each validated method. These blanks are extracts of sample known to contain the typical compounds of grapes but no detectable residues of the studied analytes [31]. Target pesticides were added with variable amounts of fungicides to these blank extracts in the last step of extraction according to the method. The calibration curves for all of the compounds were obtained by plotting the fungicide to the I-ISTD peak area ratio against the concentration for each compound of the corresponding calibration standards at six calibration levels ranging between close the calculated LOQ according to the extraction method used to close  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

All the compounds presented a linear behavior with GC–MS in the standard concentration range. The determination coefficients for the eight target fungicides varied from 0.994 to 0.999 for

QuEChERS and 0.997 to 0.9991 for ethyl acetate extraction while 0.999–0.9995 for MAE and 0.999–0.9996 for MSPD.

#### 3.2.3. Limits of detection and quantification

The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of the overall method were calculated as the concentration giving a signal-to-noise ratio of 3 ( $S/N=3$ ) and 10 ( $S/N=10$ ), respectively.

Table 3 shows the LOD and LOQ values (in  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , ppb) obtained from grapes extracts analyzed by GC–MS. The lowest LODs/LOQs were achieved with MAE ( $0.7\text{--}1.7 \mu\text{g kg}^{-1}/2.2\text{--}5.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and the highest with QuEChERS ( $1.2\text{--}4.3 \mu\text{g kg}^{-1}/4.1\text{--}14.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) and SLE ( $1.5\text{--}4.1 \mu\text{g kg}^{-1}/4.9\text{--}13.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). The use of acetonitrile (QuEChERS) and ethyl acetate might favor the extraction of analytes from grapes matrices but together with a large amount of interferences as evidenced by the color of the residue obtained after solvent evaporation. These results in less clean extracts leading to the drawbacks of higher LOD and LOQ.

Quinoxifen showed the lowest values of LOD/LOQ for the MAE, MSPD and SLE methods. In case of QuEChERS, the lowest values were obtained from penconazole and vinclozolin. On the other hand, pyraclostrobin was the fungicide that presented the highest values for all the methods.

These obtained values show the four methods provide adequate LOQs for the analysis of grapes with the target analytes at concentrations lower than the maximum residue limits (MRLs) established by the European Union Commission in the maximum residue levels.

#### 3.2.4. Recovery

A recovery study was performed to evaluate the bias of the method by applying the optimized methods to the extraction of residue free grapes samples spiked at two levels of concentration, 10 and  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  in five replicates. Quantification of the recovery samples was performed by internal calibration using matrix-matched standards as explained in Section 3.2.2 and recoveries were reported as percentages of the spike quantity. Results from fortification studies were statistically analyzed using Excel to calculate average recovery of each pesticide and their standard deviations.

Recovery efficiency is an important factor when an analytical method is evaluated. Fig. 2 presents the recoveries achieved for the eight fungicides with the four extraction methods. In most cases analytical recoveries were between 70 and 120% [31] except



**Table 3**LOD, LOQ and MRL in  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of grapes samples.

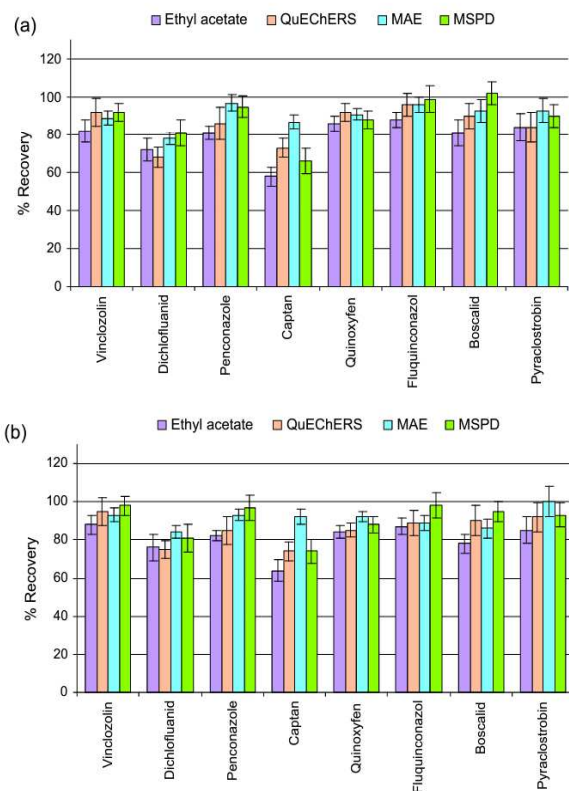
Fungicides	MAE		MSPD		QuEChERS		Ethyl acetate		MRL <sup>a</sup>
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	
Vinclozolin	1.3	4.4	2.2	7.5	1.2	4.2	2.7	8.9	10 <sup>b</sup>
Dichlofluanid	0.9	3.1	1.2	4.1	2.3	7.6	1.8	6.1	10 <sup>b</sup>
Penconazole	1.1	3.7	1.5	4.9	1.2	4.1	1.9	6.3	200
Captan	1.5	4.9	2.1	7.0	3.8	12.5	3.3	10.9	20
Quinoxifen	0.7	2.2	1.0	3.4	1.8	5.9	1.5	4.9	1000
Fluquinconazol	1.1	3.7	1.8	6.0	2.6	8.6	3.0	10.0	500
Boscalid	1.0	3.5	1.6	5.4	2.4	8.5	3.2	10.6	2000
Pyraclostrobin	1.7	5.8	2.6	8.7	4.3	14.3	4.1	13.6	5000

<sup>a</sup> Established by the European Union Commission.<sup>b</sup> Excluded from the Annex I of the Directive 91/414/EEC. Default MRL of  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

for dichlofluanid at low concentration (68% for QuEChERS and captan at both concentration levels (58% and 64%) after ethyl acetate extraction. The lowest recoveries were obtained with the ethyl acetate extraction (ranged from 58 to 88%). The remaining methods produced similar results: QuEChERS (between 86 and 96%), MSPD (between 66 and 102%) and MAE (ranged from 78 to 100%).

### 3.2.5. Precision

The precision in the conditions of repeatability (five replicate analyses performed on the same day) and intermediate precision (five samples on three different days) was determined separately for a standard concentration of  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  for all compounds by calculating the relative standard deviation (RSD). Horwitz ratio (HorRat) pertaining to intra-laboratory precision, which indicates



**Fig. 2.** Recovery (%) of the pesticides from grapes ( $n=5 \times 2$  days) with error bars representing the standard deviation: (a) at  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  and (b) at  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Table 4**  
Repeatability (expressed as RSD%) and HorRat ratio at 50 µg kg<sup>-1</sup> of extraction methods for fungicides in grapes.

Fungicides	Repeatability (n=5)				HorRat			
	MAE	MSPD	QuEChERS	Ethyl acetate	MAE	MSPD	QuEChERS	Ethyl acetate
Vinclozolin	3.4	6.1	8.1	6.8	0.31	0.36	0.49	0.47
Dichlofluanid	4.5	7.8	8.4	11.1	0.35	0.45	0.37	0.54
Penconazole	5.0	5.4	10.7	5.2	0.28	0.29	0.46	0.35
Captan	7.8	7.6	8.8	9.8	0.35	0.48	0.31	0.42
Quinoxifen	2.2	5.6	5.6	5.0	0.23	0.36	0.28	0.39
Fluquinconazol	3.8	4.9	6.9	4.7	0.30	0.40	0.34	0.37
Boscalid	3.7	3.5	9.1	6.0	0.36	0.35	0.42	0.38
Pyraclostrobin	6.6	6.7	10.1	8.3	0.41	0.29	0.44	0.34

the acceptability of a method with respect to precision [35], was calculated for all the fungicides in the following way:

$$\text{HorRat} = \frac{\text{RSD}}{\text{Prsd}} \quad (1)$$

where RSD stands for relative standard deviation and Prsd is the predicted relative standard deviation.  $\text{Prsd} = 2^{(1-0.5\log C)}$ ; where C is the concentration expressed as mass fraction (e.g. 10 ng g<sup>-1</sup> = 10 × 10<sup>-9</sup>).

The repeatability, expressed as relative standard deviations (RSD, %) for five replicate analyses performed on the same day at the optimum conditions obtained for each factor, spiked at 50 µg kg<sup>-1</sup> of the target compounds was similar and acceptable below 20% [31] for all the methods (Table 4): MAE (RSD between 2.9 and 6.4%); MSPD (RSD between 3.5 and 7.8%); QuEChERS method (RSD between 5.6 and 10.7%) and ethyl acetate extraction (RSD between 3.4 and 11.1%). Nevertheless, it was slightly higher for QuEChERS and SLE methods.

Precision in terms of HorRat (single laboratory) at 50 µg kg<sup>-1</sup> level was less than 0.50 (except for dichlofluanid with ethyl acetate method) for all the fungicides (Table 4), indicating satisfactory repeatability and ruggedness of the methodology [35,36].

### 3.3. Comparison of the four methods

#### 3.3.1. Regression lines with spiked samples

Grape samples spiked at different concentration levels of the target fungicides were analyzed with all the methods validated

**Table 6**  
Pesticide concentrations (µg kg<sup>-1</sup>) found in real samples by different methods (mean ± 2s).

Fungicide	MAE	MSPD	QuEChERS	Ethyl acetate
Vinclozolin	16.7 ± 2.1	18.2 ± 1.7	13.3 ± 2.0	14.7 ± 1.9
Penconazole	32.6 ± 1.6	31.5 ± 3.4	28.0 ± 1.4	23.2 ± 1.1
Boscalid	24.9 ± 2.2	27.5 ± 2.1	24.6 ± 1.4	21.7 ± 2.2
Pyraclostrobin	12.1 ± 1.1	14.5 ± 0.8	12.9 ± 1.2	13.6 ± 0.7

and explained in previous sections. Additions were performed at 10 concentration levels in duplicate.

When two methods are to be compared at different analyte concentrations the use of regression lines is normally adopted [37]. One axis of a regression graph is used for the results obtained by the new method and the other axis for the results obtained by applying the comparison method to the same samples. The most precise method should be placed in the abscissa axis. Each point on the graph thus represents a single sample analyzed by two separate methods. Both methods are then applied to calculate the slope (b), the intercept (a) and the determination coefficient (R<sup>2</sup>) of the regression line. It is considered that two methods lead to the same results if the slope and the intercept obtained from the regression line drawn with the concentrations of the samples analyzed by both methods are significantly equal to 0 and 1, respectively, at the 95% significance level.

Therefore, 10 grape samples spiked with the target fungicides were extracted with the four studied methods, MSPD, MAE, SLE and QuEChERS, and regression lines were plotted. Penconazole, together with captan, were the fungicides showing more

**Table 5**  
Slopes, intercepts and correlation coefficients (R<sup>2</sup>) of the regression lines (in bold significant differences at 95% confidence level; slope ≠ 1 and/or intercept ≠ 0).

Fungicide	MAE-MSPD			MAE-SLE			MAE-QuEChERS		
	Slope (b ± 2s <sub>b</sub> )	Intercept (a ± 2s <sub>a</sub> )	R <sup>2</sup>	Slope (b ± 2s <sub>b</sub> )	Intercept (a ± 2s <sub>a</sub> )	R <sup>2</sup>	Slope (b ± 2s <sub>b</sub> )	Intercept (a ± 2s <sub>a</sub> )	R <sup>2</sup>
Vinclozolin	1.13 ± 0.15	-5.56 ± 8.90	0.976	1.01 ± 0.21	-9.73 ± 12.80	0.939	0.99 ± 0.27	-3.16 ± 16.30	0.901
Dichlofluanid	0.97 ± 0.10	3.07 ± 5.59	0.986	0.87 ± 0.16	-0.76 ± 9.21	0.953	0.83 ± 0.22	-0.65 ± 13.58	0.908
Penconazole	0.89 ± 0.19	4.94 ± 12.0	0.937	<b>0.75 ± 0.21</b>	4.88 ± 13.38	0.897	0.87 ± 0.14	7.53 ± 9.11	0.960
Captan	0.96 ± 0.12	3.18 ± 6.99	0.978	1.01 ± 0.18	-10.60 ± 11.18	0.952	<b>0.84 ± 0.10</b>	-1.26 ± 6.30	0.978
Quinoxifen	0.92 ± 0.10	2.38 ± 6.29	0.982	0.95 ± 0.12	2.46 ± 7.43	0.976	0.86 ± 0.19	5.27 ± 11.94	0.929
Fluquinconazol	0.98 ± 0.13	1.80 ± 7.59	0.976	0.89 ± 0.12	-1.85 ± 7.39	0.972	0.94 ± 0.12	1.00 ± 7.13	0.976
Boscalid	0.91 ± 0.13	5.45 ± 7.90	0.972	0.93 ± 0.14	-5.10 ± 8.50	0.968	1.01 ± 0.17	-1.96 ± 10.32	0.960
Pyraclostrobin	1.01 ± 0.10	-0.19 ± 4.28	0.992	1.07 ± 0.21	-4.94 ± 12.77	0.945	1.09 ± 0.17	-6.76 ± 10.37	0.964
Fungicide	MSPD-SLE			MSPD-QuEChERS			SLE-QuEChERS		
	Slope (b ± 2s <sub>b</sub> )	Intercept (a ± 2s <sub>a</sub> )	R <sup>2</sup>	Slope (b ± 2s <sub>b</sub> )	Intercept (a ± 2s <sub>a</sub> )	R <sup>2</sup>	Slope (b ± 2s <sub>b</sub> )	Intercept (a ± 2s <sub>a</sub> )	R <sup>2</sup>
Vinclozolin	0.91 ± 0.17	-4.81 ± 10.91	0.980	0.88 ± 0.24	1.99 ± 15.35	0.897	0.97 ± 0.17	6.39 ± 9.12	0.955
Dichlofluanid	0.90 ± 0.12	-3.72 ± 6.92	0.976	0.84 ± 0.20	-2.80 ± 12.10	0.914	0.93 ± 0.34	4.83 ± 16.50	0.833
Penconazole	<b>1.15 ± 0.11</b>	0.80 ± 5.59	0.988	0.94 ± 0.14	4.31 ± 8.80	0.966	1.08 ± 0.22	5.44 ± 11.67	0.942
Captan	0.99 ± 0.12	<b>-8.69 ± 7.23</b>	0.978	0.92 ± 0.12	-0.77 ± 6.61	0.976	1.19 ± 0.22	-8.44 ± 10.90	0.953
Quinoxifen	0.96 ± 0.11	0.63 ± 6.78	0.980	0.92 ± 0.23	3.87 ± 13.42	0.916	0.90 ± 0.20	3.62 ± 12.21	0.929
Fluquinconazol	1.08 ± 0.12	4.38 ± 6.14	0.982	0.96 ± 0.08	-0.41 ± 4.99	0.988	1.04 ± 0.15	3.89 ± 8.00	0.968
Boscalid	<b>0.86 ± 0.06</b>	-1.34 ± 3.75	0.992	0.95 ± 0.17	3.05 ± 10.66	0.953	1.07 ± 0.20	4.71 ± 10.58	0.949
Pyraclostrobin	1.08 ± 0.17	-5.14 ± 10.10	0.964	1.08 ± 0.17	-6.32 ± 10.37	0.962	0.99 ± 0.15	-0.30 ± 8.95	0.966

**Table 7**

Additional factors for consideration for the extraction of pesticides from grapes by MAE, MSPD, QuEChERS and ethyl acetate extraction (SLE).

Factor	MAE	MSPD	QuEChERS	Ethyl acetate extraction
Sample weight	2 g	0.5 g	10 g	15 g
Extraction time	10 min (plus 5 for the ramp and 30 min for cooling)	2 h	1 h 30 min	1 h 30 min
Extraction temperature	105 °C	25 °C	25 °C	25 °C
Solvent volume	10 mL (hexane/acetone 1:1)	10 mL (DCM/ethyl acetate 1:1)	10 mL (acetonitrile, HAC 1.0%)	12 mL (ethyl acetate)
Equipment costs	High	Low	Low	Low
Sequential or simultaneous operation	Up to 48 vessels can be used simultaneously	Up to 12 assemblies	Up to 6 assemblies	Up to 6 assemblies

differences between methods. Confidence intervals of the slopes and the intercepts at 95% significance level as well as the correlation coefficients for the regression lines are summarized in Table 5. It can be seen from the data that there were no significant differences between methods for vinclozolin, dichlofluanid, fluquinconazol, quinoxifen and pyraclostrobin confirmed by the slopes and intercepts close to 1 and 0, respectively. Besides, these fungicides showed a good agreement between all the methods. The determination coefficients were 0.897–0.980 for vinclozolin, 0.91–0.99 for dichlofluanid, 0.98–0.99 for fluquinconazol, 0.96–0.99 for quinoxifen and 0.97–0.99 for pyraclostrobin. Dichlofluanid showed the highest deviation from the linear behavior. However, the concentrations of captan analyzed by QuEChERS, MSPD and SLE were lower than those of MAE. In the case of penconazole, the obtained concentrations by SLE were significantly different to those of MSPD and MAE. The analysis of boscalid with the four methods led also to different results between MSPD–SLE.

### 3.3.2. Statistical analysis of real samples

Pesticide concentrations in grape samples collected from the local markets were analyzed and compared by applying the four methods studied.

Out of 12 analyzed grapes, 9 were found to be without detectable pesticide residues. In one of positive samples, two of the studied fungicides (vinclozolin and pyraclostrobin) were detected. For the other two samples, only one target fungicide was found for each. The results of the analysis are listed in Table 6. All samples were analyzed by duplicate.

The comparison of the obtained results with these methods (MAE, MSPD, SLE and QuEChERS) was carried out by using different statistical tests [38]. First, Levene's test was applied in order to check variance homogeneity; *p* values higher than 0.05 were obtained in all cases indicating not statistically significant differences among the variances. According to these results, one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out for each sample. This test showed there were no significant differences between methods for vinclozolin and pyraclostrobin (*P* value > 0.05 in all cases), however *P* values lower than 0.05 were obtained for penconazole and boscalid. Thus, the Tukey's test was used in order to determine which methods differ from the rest. Thus, once Tukey's test was carried out for penconazole and boscalid, it was observed that SLE method differed from MAE and MSPD in the case of penconazole. For boscalid, SLE and MSPD were the methods showing significant differences between them. These results were comparable to those which were obtained by the comparison of methods by means of regression lines with spiked samples (previous section).

### 3.3.3. Comparison of the analysis process

In addition to extraction recoveries, it is interesting to compare the relative merits of each extraction technique. Additional factors, such as solvent consumption, extraction time, sample weight,

equipment, costs, need to be considered. These are summarized in Table 7. Due to inherent differences in the extraction conditions, a direct comparison among the methods at exactly identical conditions was not possible. For example, different solvent systems were employed for the four procedures in this study and the selection of the solvents was based on the results reported in the literature. Consequently, it is reasonable to expect that the differences among the four procedures partly resulted from difference in reagents employed.

QuEChERS, ethyl acetate extraction and MSPD procedure do not require sophisticated instruments or materials while MAE needs a microwave oven which is not available in all the laboratories. Concerning the volume of organic solvents required four techniques are clearly better than traditional procedures. Regarding the total time of analysis, which nowadays is becoming one of the most important factors, MAE is faster than MSPD, QuEChERS and ethyl acetate extraction because although MAE requires further cooling to obtain the final extract and an additional handling to separate the extract from the solid sample matrix after extraction, simultaneous extractions can be performed in the microwave oven while only sequential extractions can be conducted with the other three methods. Besides prior to extraction, sample preparation for these three last methods is more tedious and time consuming, since the dispersion and cleaning of the samples with C<sub>18</sub> and silica for MSPD, the addition of PSA, MgSO<sub>4</sub> and NaCl for QuEChERS and the NaCl addition for ethyl acetate method implies the weight of these materials.

## 4. Conclusions

Factors influencing the extraction efficiency of MAE, MSPD and SLE were optimized by experimental design. The best results for MAE were obtained with the extraction of 2.0 g of sample with 10 mL hexane:acetone (50:50) at a temperature of 105 °C. Final conditions for MSPD were 0.5 g of grape fruit mix with 1.5 g of bonded-phase solid support C18 (a three-to-one ratio support to sample) and 10 mL of the mixture dichloromethane/ethyl acetate with a percentage of ethyl acetate of 50% (v/v). For SLE method, the maximization of the desirability function yielded values of 15 g, 12 mL and 0.01 M for the sample weight, solvent volume and NaCl concentration, respectively. The agitation was 2 min with a crusher.

Recoveries were good and similar for MAE, MSPD and QuEChERS and lower for SLE. The calculated LOQs were lower than the MRLs established for these compounds in grape fruit. The lowest LOQs for the analysis of the selected pesticides were achieved with MAE and the highest with QuEChERS and SLE.

The comparison of the four methods by means of calibration curves obtained with spiked samples as well as by the use of statistical tests showed that there were no significant differences between the extraction with one or another method for vinclozolin, dichlofluanid, quinoxifen, fluquinconazol and pyraclostrobin. Nevertheless, there were significant differences between MAE and



QuEChERS for the analysis of captan, between SLE and MSPD for the determination of boscalid and between SLE and MSPD or MAE for penconazole.

The proposed methods provide simple and rapid procedures for the simultaneous determination of vinclozolin, dichlofluanid, penconazole, captan, quinoxifen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin in grape samples. MAE has demonstrated to be more sensitive and faster than others due to simultaneous extractions that can be performed in the microwave oven while only sequential extractions can be conducted with the other three methods. However, low cost and nonspecific instrumentation demands are the advantages of these three methods in sample preparation, while MAE requires microwave oven which is not available in all the laboratories.

#### Acknowledgements

The authors want to thank the University of La Rioja for the FPI grant to Laura Lagunas-Allué and the Government of La Rioja for the project ANGI 2004/18, INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), MEC/FEDER for the AGL2005-02313/ALI project and Bodegas D. Mateos S.L.

#### References

- [1] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, J. Bernal, L. Toribio, *Food Chem.* 104 (2007) 216.
- [2] R.M. González-Rodríguez, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *J. Sci. Food Agric.* 89 (2009) 2625.
- [3] J. Oliva, P. Payá, M.A. Cámara, A. Barba, *J. Environ. Sci. Health B* 42 (2007) 775.
- [4] Comisión Regulation (EC) No. 149/2008 of 29 January 2008 amending Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I, Official Journal L58, 1 March 2008, European Union, Brussels, Belgium, p. 0001.
- [5] Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Vol. I, 15th edition, 1990.
- [6] G.H. Tan, K. Vijayaletchumy, *Pestic. Sci.* 40 (1994) 121–126.
- [7] S. De Melo Abreu, M. Correia, P. Herbert, L. Santos, A. Alves, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 549.
- [8] L. Vaquero-Fernández, J. Sanz-Asensio, M. López-Alonso, M.T. Martínez-Soria, *J. Sci. Food Agric.* 89 (2009) 750.
- [9] D. García-Rodríguez, A.M. Carro-Díaz, R.A. Lorenzo-Ferreira, R. Cela-Torrijos, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2940–2949.
- [10] M. Brutti, C. Blasco, Y. Picó, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1–10.
- [11] J.Y. Hu, Y.C. Zhang, H. Yan, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 1459–1466.
- [12] R.M. González-Rodríguez, R. Rial-Otero, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *J. Chromatogr. A* 1196–1197 (2008) 100–109.
- [13] S.W.C. Chung, B.T.P. Chan, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4815–4824.
- [14] J. Wang, W. Chow, D. Leung, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 1513–1538.
- [15] L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria, *Anal. Methods* 3 (2011) 2881–2892.
- [16] M. Barriada-Pereira, M.J. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández, *Talanta* 71 (2007) 1345–1351.
- [17] M.G.D. Silva, A. Aquino, H.S. Doireá, S. Navickiene, *Talanta* 76 (2008) 680–684.
- [18] L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1509–1523.
- [19] A.M. Carro, R.A. Lorenzo, *Analyst* 126 (2001) 1005–1010.
- [20] M. Anastasiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [21] S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, P. Van Bodegraven, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 595–614.
- [22] C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 11–23.
- [23] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 98–109.
- [24] AOAC Official Method 2007.01, Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.
- [25] U. Koesukwiwat, S.J. Lehotay, K. Mastovska, K.J. Dorweiler, N. Leepipatiboon, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5950.
- [26] P. Georgakopoulos, R. Zachari, M. Mataragas, P. Athanasopoulos, E.H. Drosinos, P.N. Skandamis, *Food Chem.* 128 (2011) 536.
- [27] C. Lesueur, P. Knittel, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control* 19 (2008) 906–914.
- [28] J. Fenoll, P. Hellín, C.M. Martínez, P. Flores, *Chromatographia* 72 (2010) 857–866.
- [29] M. Hiemstra, A. de-Kok, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 3–25.
- [30] G. Di Bella, M. Saitta, F. Salvo, M. Nicotina, G. Dugo, *Ital. J. Food Sci.* 15 (2003) 427–432.
- [31] Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/12495/2011, January 2012.
- [32] D.R. Erney, A.M. Gillespie, D.M. Gilvydis, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 638 (1993) 57.
- [33] U. Menkissoglu-spirodi, A. Fotopoulou, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 15.
- [34] T. Schmeck, B.W. Wenclawiak, *Chromatographia* 62 (2005) 159–165.
- [35] W. Horwitz, R. Albert, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1095–1109.
- [36] W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1980) 1344–1354.
- [37] J. Miller, J. Miller, *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4th edition.
- [38] D. Penn, T.L. Willet, M. Glazebrook, M. Snow, W.D. Stanish, *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 17 (2009) 260–265.



**ANEXO V. Mobility and distribution of eight fungicides in surface, skin and pulp in grapes. An application to pyraclostrobin and boscalid**

---



---

## MOBILITY AND DISTRIBUTION OF EIGHT FUNGICIDES IN SURFACE, SKIN AND PULP IN GRAPES. AN APPLICATION TO PYRACLOSTROBIN AND BOSCALID

L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria\*

*Departamento de Química Analítica. Universidad de La Rioja. Madre de Dios, 51. La Rioja, 26006, Spain.*

---

### Abstract

The study discusses the mobility and distribution of vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin residues in surface, skin and pulp in red grapes. A lab test was carried out by immersing grapes in solutions with different concentrations of fungicides and for different periods of time; followed by a determination of the fungicide residues by GC-ECD with an additional confirmation by GC-MS. The distribution between surface, skin and pulp of the grapes was also determined. The percentage sorption ranged from 6.4 to 116%. Results showed that sorption values depended on the time that grapes had been in contact with the fungicide solutions, but not on the initial concentration of solutions. Residues were mainly found in skin, with percentages ranging from 53.0 to 88.4% of total residues. In pulp, these values ranged from 9.6 to 41.7%. Pyraclostrobin showed higher penetration than the other compounds. A field test using three new commercial formulations containing pyraclostrobin, boscalid and a mixture of both was carried out by applying these formulations to a vineyard. When fungicides were applied individually the ratios of the skin/pulp residues were similar to those obtained in lab; whereas when a mixture of both pesticides was sprayed results showed a lower penetration of the fungicides in the grape pulp.

*Keywords: Pesticides; grapes; sorption; distribution; penetration.*

---

### 1. Introduction

Spain is the country with the largest cultivated vineyard area in the world and it is the third country in terms of volume of wine produced [Castellucci, 2008]. Grey mould (*Botrytis cinerea*), powdery mildew (*Uncinula necator*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*) are the most commonly targeted fungi and they are controlled through the use of pesticides [Coscollá, 2004]. Despite the apparent benefits of these products, pesticide poisoning is an increasing worldwide problem, particularly in rural areas, in fact pesticides are the greatest cause of severe toxicity and death from acute poisoning worldwide [Agtiera, Contreras, Crespo & Fernández-Alba, 2002; Ortelli, Edder & Corvi, 2004]. In the case of vines undesirable pesticide residues can remain on the grapes after harvest and fungicides can be transmitted to the must and then to the wine during fermentation [Cabras, Angioni & Garau, 2000; Fernández González, Rial Otero, Cancho Grande & Simal Gándara, 2003; Nozal, Bernal, Jiménez, Martín & Bernal, 2005] affecting the fermentation process as well as the final quality of the product and negatively affect the flavour of the wine. Recently, an increasing awareness of this issue has led to many countries establishing stricter maximum residue limits (MRLs) for different substances. These MRLs have prompted the development of highly sensitive multiresidue methods in order to analyze pesticides in different sample matrices. Thus, highly sensitive and selective techniques are being developed to monitor pesticide residues. Traditionally pesticides have been analyzed in different matrices by gas

chromatography with mass spectrometry detection [Ochiai et al., 2005; Kotionia, Liapis & Ziogas, 2007; Guan, Brewer, Garris & Morgan, 2010], however some highly polar and/or thermolabile compounds are not suitable for GC analysis, due to their low volatility and the poor repeatability of the measurements. A liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) is a suitable technique since it does not require derivatization and both positive analyte identification and quantification can be performed in one step [Moriwaki, 2005; Famigliani, Palma, Termopoli, Truffelli & Cappiello, 2009]. In order to achieve sensitivity and selectivity, LC coupled to tandem mass spectrometry via an electrospray ionization interface (ESI) is becoming a frequent technique for the determination of pesticides in different matrices [Hiemstra & de-Kok, 2007; Banerjee et al., 2007].

The different modes of action of the phytosanitary products applied may explain the different location and concentration of their residues in fruits and vegetables. In this way while both systemic and penetrating (local systemic) pesticides are expected to be found in the pulp, those which work through direct contact are more likely to appear in the skin [Coscollá, 2004]. In spite of this, pesticide residues are normally determined in the whole grapes and there are few published data reporting the levels found in both the skin and pulp of fruits.

---

Corresponding author. Phone: (+34) 941 299 629, Fax: (+34) 941299621.  
e-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es (M. Martínez-Soria)

---



In these studies, different penetration of pesticides into the pulp has been observed in fruits such as apples [Pérez-Clavijo, Plaza Medina, Sanz Asensio & Galbán Bernal, 1996; Sanz-Asensio, Martínez-Prado, Plaza-Medina, Martínez-Soria & Pérez-Clavijo, 1999] and grapes [Teixeira, Aguiar, Afonso, Alves & Bastos, 2004; Cabras et al., 2000; Vaquero-Fernández, Sanz-Asensio, López-Alonso & Martínez-Soria, 2009].

The present study was designed to determine, for different fractions of grape, the residue levels of eight fungicides widely used in grapevines in the AOC Rioja (vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin). A summary of the chemical structure, chemical group and properties, as well as the diseases and the mode of action of these fungicides is shown in Table 1. Results obtained in lab for pyraclostrobin, boscalid and the mix of both were compared with those obtained in a field test carried out in the vineyard during 35 days.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

#### 2.1.1. Reagents and solvents

Pesticide analytical standards of vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxyfen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin with purity higher than 99.0% were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Tetradifon from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) with a purity of 99.5% was used as Internal Standard (IS). All standard stock solutions ( $500 \text{ mg l}^{-1}$ ) were prepared in methanol and stored at  $-20^\circ\text{C}$  in the dark.

For vine spraying Cantus® (50% w/w boscalid), Cabrio Top® (5% w/w pyraclostrobin) and Bellis®, a mixture of both fungicides (pyraclostrobin 12.8% w/w; boscalid 25.2% w/w), were supplied by BASF Española S.A. (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulphate (99.5%) and glass wool were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). HPLC grade ethyl acetate, hexane, acetone and methanol were supplied by Scharlab. Ultrapure water was obtained in a Milli-RO plus system together with a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA).

#### 2.1.2. Apparatus

For grape surface and skin, residue extractions were carried out with water and ethyl acetate respectively, using a Branson 5510 Ultrasonics (Barcelona, Spain).

A Zymark TurboVap® II (Hopkinton, MA, USA) was used to evaporate extracts of hexane/acetone under a nitrogen stream.

For solid-phase extraction, octadecylsilane 500 mg (LiChrolut RP-18) cartridges were supplied by Varian (Middelburg, The Netherlands). 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.

MAE experiments were performed using an MARS-microwave sample preparation unit (CEM, Corp., Matthews, N.C) equipped with a solvent detector. The MARS was able to extract simultaneously forty-eight solid samples in a Teflon-lined extraction vessel under identical extraction conditions (temperature and pressure).

### 2.2. Study in field

The field trials were conducted from July to September 2009 in an experimental vineyard belonging to AOC Rioja located in Aldeanueva de Ebro, La Rioja, Spain. The vineyard produces red grapes from the *V. vinifera* cv. Tempranillo, a common variety in this Apellation. Three new commercial formulations against grey mould, downy mildew and powdery mildew were applied: Cantus®, Cabrio Top® and Bellis® at the recommended doses (1, 2 and 0.8 kg per hectare, respectively).

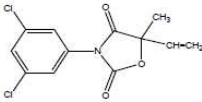
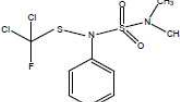
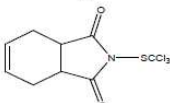
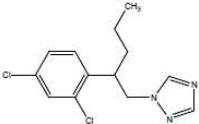
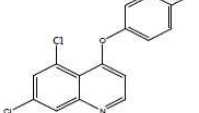
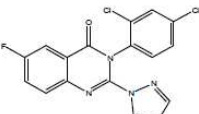
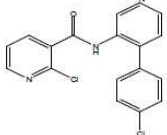
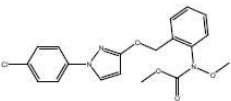
Samples were collected 1, 3, 7, 15, 25 and 35 days after treatment from different parts of the bunch (top, middle and bottom).

Grapes without phytosanitary treatments were considered as control grapes in order to compare their results with those obtained with grapes treated with boscalid, pyraclostrobin and the mix. Samples from both the treated and the control vines were frozen at  $-20^\circ\text{C}$  in 150 ml flasks containing 75 grapes each until analyzed.

### 2.3. Study of sorption and distribution in grapes in laboratory

Fungicides sorption was studied by soaking 25 g of untreated grapes in 50 ml of aqueous solution spiked with three fungicide concentration levels (0.50, 2.00 and  $5.00 \text{ mg l}^{-1}$  corresponding to 1, 4 and  $10 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively) in a 250 ml beaker. The samples were kept in the dark at  $4^\circ\text{C}$  for 1, 3, 7, 15, 25 and 35 days (the longest safety period for all compounds). The spiking concentrations were similar or higher than MRLs fixed by the European Union ( $0.01 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for vinclozolin,  $0.01 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for dichlofluanid,  $0.2 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for penconazol,  $0.02 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for captan,  $1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for quinoxyfen,  $0.05 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for fluquinconazol,  $5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for boscalid and  $2 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  for pyraclostrobin). Three replicates were carried out. The fungicide sorption in the whole grape was calculated as the sum of the three parts: surface, skin and pulp.

Table 1. Chemical structure, chemical group and properties, diseases control and mode of action of fungicides studied

Fungicide	Chemical Structure	Chemical group and properties	Diseases control. Mode of action
Vinclozolin		Dicarboximide MW <sup>a</sup> = 286.11 S <sup>b</sup> = 2.6/1540 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.02	Grey mold Non-systemic with protective action. Prevents spore germination and mycelial growth. Endocrine disruptor.
Dichlofluamid		Sulphamide MW <sup>a</sup> = 333.23 S <sup>b</sup> = 1.3/10800 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.70	Grey mold Non-systemic with protective action. Foliar with protective action
Captan		Phthalimide MW <sup>a</sup> = 300.61 S <sup>b</sup> = 5.2/4000 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 2.50	Grey mold and downy mildew Non-systemic with protective and curative action Mitochondrial respiration inhibitor.
Penconazol		Triazole MW <sup>a</sup> = 284.18 S <sup>b</sup> = 73/730000 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.72	Powdery mildew Systemic with curative and protective action. Acts by interfering with ergosterol biosynthesis
Quinoxifen		Quinolyne MW <sup>a</sup> = 308.13 S <sup>b</sup> = 0.047/21500 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 4.66	Powdery mildew Systemic with protective properties. Translocates and inhibits appressoria development stopping infections.
Fluquinconazol		Triazole MW <sup>a</sup> = 376.17 S <sup>b</sup> = 1.15/3480 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.24	Powdery Mildew Systemic with protectant and eradicant activity. Disrupts membrane function.
Boscalid		Carboxamide MW <sup>a</sup> = 343.21 S <sup>b</sup> = 4.6/45000 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 2.96	Grey mold Penetrate (local systemic) with protective action. Protectant, foliar absorption, inhibits spore germination and germ tube elongation.
Pyraclostrobin		Strobilurin MW <sup>a</sup> = 387.82 S <sup>b</sup> = 1.9/100800 Log K <sub>ow</sub> <sup>c</sup> = 3.99	Downy and Powdery Mildew Penetrate (local systemic) with protective and curative action. Respiration inhibitor (QoI fungicide).

<sup>a</sup> Molecular weight (g mol<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup> Water solubility at 20 °C (mg L<sup>-1</sup>)/Methanol solubility at 20 °C (mg L<sup>-1</sup>).

<sup>c</sup> Octanol/water partition coefficient at pH 7 and 20 °C.



---

#### 2.4. Processing of the grapes

The grapes, spiked at different concentration levels and days, were weighed and processed as follows:

##### *Washing procedure*

To dissolve the pesticide residues that remained on the exterior of the berries 25 g of grapes were soaked in 50 ml of tap water in a 250 ml glass. The glass was then placed in an ultrasound bath and shaken for 30 min to dissolve the residues located on the surface of the grapes. After that water was extracted for SPE. The C<sub>18</sub> cartridge was activated with 5 ml of methanol and then 3 ml of ultrapure water and the sample was percolated through a C<sub>18</sub> cartridge. A washing step of the cartridge with 10 ml of water/methanol (9/1) was then carried out. The extract retained in the solid phase was eluted with 2 + 2 ml of ethyl acetate. The final volume was adjusted to 5 ml with ethyl acetate (Method 1).

##### *Solvent extraction of fungicides in grape skin*

Once the washing water had been removed, the grapes were left to dry on filter paper at room temperature. After that, they were placed in a 250 ml glass with 50 ml of ethyl acetate in order to extract the fungicide residues absorbed in 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. Therefore, 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 sulphate anhydrous, evaporated and adjusted to a final volume of 2 ml with ethyl acetate. Then, samples were filtered and clean extracts were directly injected in GC-ECD (Method 2).

##### *Solvent extraction of fungicides in the whole grape*

Grapes were crushed after removal of ethyl acetate for skin extraction. Microwave assisted extraction (MAE) was carried out for the determination of fungicides in pulp. Grapes samples were accurately weighed (2 g) and transferred to the PTFE-lined extraction vessel. Subsequently, 10 ml of hexane/acetone (1:1) mixture were added as an extraction solvent. The oven was set to a power of 600 W, ramped up to 105°C within 5 min, and held at this temperature for 10 min while stirring at the highest setting. After extraction, the vessels were cooled to room temperature before being opened. Next, the

removed using anhydrous sodium sulphate and was filtered through glass wool. The residue was rinsed three times with 2 ml of solvent and combined with the supernatant. Finally, the extracts were evaporated using a Turbovap evaporator and adjusted to a final volume of 1 ml with hexane/acetone (1:1) (Method 3).

The quantification for GC analysis was performed using tetradifon as internal standard at a concentration of 0.1 mg l<sup>-1</sup>.

#### 2.5. Instrumentation and chromatographic conditions

An Agilent Technologies GC 6890N equipped with an ECD Electron-Capture Detector system, an autosampler 7683 (Agilent) and a split-splitless injector, connected to a HP ChemStation (Hewlett-Packard) was used for the determination of fungicides vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxifen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin. The capillary column was a HP-5 (30 m × 0.32 mm i.d. with 0.25 µm of crosslinked 5% phenylmethyl siloxane). The temperatures of the injector and detector were 250°C and 300°C, respectively. The oven temperature programme was as follows: initial temperature was 100°C, increased to 185°C at 40°C min<sup>-1</sup>. This temperature was kept for 5 min, raised to 300°C (10°C min<sup>-1</sup>) and held for 2 min. Total run time was 20.63 min. The volume of sample was 2 µl, injected in splitless mode with a purge time of 0.9 min. Helium (99.999 % purity) was the carrier gas at 4 ml min<sup>-1</sup> and Ar/CH<sub>4</sub> as makeup gas for ECD, at 56 ml min<sup>-1</sup>.

The confirmation of the fungicides was carried out on an Agilent Technologies GC 7890A coupled to a 5975C MS Mass Selective Detector. The analytical column used was a HP-5MS with 30 m of length, 0.25 mm of internal diameter and 0.25 µm of film thickness. Sample volume, injector temperature and oven programme were the conditions above mentioned for GC-ECD system. Helium (99.999 % purity) was used as carrier gas at constant flow rate of 1.5 ml min<sup>-1</sup>. The mass spectrometer was operated in electron impact (70 eV of ion energy), with 6 min solvent delay, the interface temperature was kept at 310°C and ion source temperature was kept at 230°C. The dwell time for ion monitoring was 100 ms per ion. Selected monitoring ion (SIM) mode was used (198, 212 and 285 *m/z* for vinclozolin; 123, 167, and 224 *m/z* for dichlofluanid; 159 and 248 *m/z* for penconazol; 79 and 149 *m/z* for captan; 237, 272 and 307 *m/z* for quinoxifen; 111, 159 and 356 *m/z* for tetradifon; 108 and 340 *m/z* for fluquinconazol; 112, 140 and 342 *m/z* for boscalid; 132, 164, and 325 *m/z* for pyraclostrobin).

### 3. Results and discussion

Three analytical methodologies were implemented, validated and used to compare the pesticide levels on the surface, within the skin and in the whole grape. Performance characteristics were established in terms of linearity, selectivity, detection and quantification limits (LOD and LOQ), accuracy (by recovery from spiked samples) and precision.

#### 3.1. Validation of the analytical methodologies

Under the operational conditions, the chromatographic separation achieved is satisfactory for three methods used. Chromatograms for injected samples proved to be lacking in interfering peaks that co-eluted with the pesticides studied. The proposed conditions generated narrow and reproducible chromatographic peaks. The GC-MS method allowed confirmation of the fungicides with good resolution and did not show interfering peaks.

The linearity in the response was studied using a matrix matched calibration. Matrix standard calibrations were performed for washing water and ethyl acetate from skins, and a matrix-matched calibration were carried out for pulp with untreated grapes samples subjected to the optimized extraction method (MAE). Six-point (average of two injections) calibration curves were constructed using tetradifon as internal standard. The analyte to internal standard peak area ratio was used as an analytical signal for constructing the calibration graphs. The linear range was from 10 to 5000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Good linearity was obtained for each target analytes for the three extraction methods with the correlation coefficients all greater than 0.999.

Table 2 summarizes the LOD and LOQ (values in  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), recoveries and precision expressed as RSD (in %) of samples obtained from three methods analyzed by GC-ECD.

To evaluate accuracy, grape samples were spiked with a volume of working standard solution and processed according to the procedures described above. Recoveries were higher than 78 %. Intermediate precision was assessed by calculating the recoveries obtained after independent extractions carried out on three different days; day-to-day precision. Relative standard deviations were below 10% (Table 2). They were within the acceptable range: 70–120% with relative standard deviation (RSD) < 20% [27]. LOQs ranged from 7.2 to 25.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in surface (washing water); from 7.5 to 26.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in skin (ethyl acetate); and from 5.0 to 27.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in pulp, which are below the legislated maximum residue levels.

A matrix-matched calibration and solvent calibration were also carried out for the GC-MS method in the same range in MAE grape extracts, water extracts and in ethyl acetate; an excellent

linearity was also obtained (correlation coefficients > 0.9993) in all cases. The GC-MS confirmation method showed LODs and LOQs below 1.7 and 5.8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for all compounds, values considerably below the fixed MRLs. Recovery and accuracy were determined at three concentration levels and analyzed in triplicate. The analytical method presented had recoveries > 73% and precisions (repeatability) < 10.3 %.

The analytical methods proved to be sensitive enough to analyse the likelihood that very small amounts of pesticide residues are present in grapes.

#### 3.2. Study of fungicides sorption

Grapes in contact with solutions containing three different concentration levels of the fungicides were analysed. The amounts of residues present in the whole grapes were determined by the proposed methods and the percentage sorption of fungicide relative to its concentration in the solution was calculated. Table 3 shows the results for each compound in all the concentration and time situations.

The amount of sorbed fungicide increased by increasing the initial concentration of solutions for any time period. This increase was higher the higher the contact time. However, the sorption percentage that was found did not depend on the initial fungicide concentration in contact with grapes for the same contact time. Quinoxifen was the most sorbed fungicide, followed by pyraclostrobin, fluquinconazol  $\approx$  boscalid, penconazol, vinclozolin, dichlofluanid and captan. In the first sample taken (between the first and the third days) the sorbed quantity, considering the three different concentration levels studied, ranged between 6.4 to 10.2% for captan and 85.6 to 92.7% for quinoxifen. A different behaviour between the different pesticides is apparent, especially between the former two.

To ascertain the fungicide sorption rate at each studied concentration, the experimental data have been fitted to the following mathematical model [Fernández González et al., 2003]:

$$C_t = C_0 e^{-Kt}$$
$$\ln C_t = \ln C_0 - Kt$$

where  $C_t$  is the residue concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) at time  $t$  (days);  $C_0$  is the theoretical initial residue concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) at  $t = 0$ ;  $k$  is the fungicide sorption constant; and  $t$  is the time that grapes have been in contact with the solution. This type of analysis, a first-order kinetic, makes it possible to predict the amount of fungicide residues over time using the correlation that exists between the absorbed residues



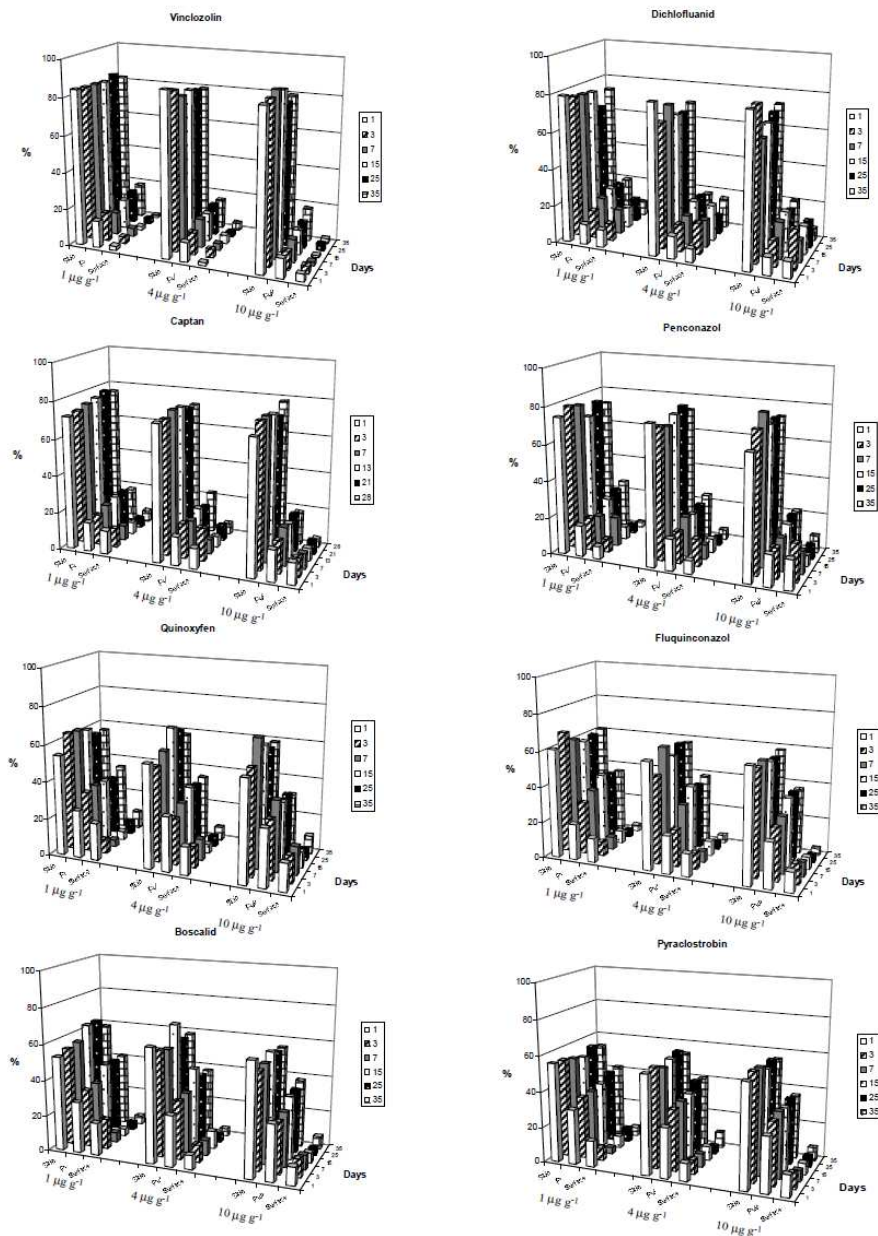


Figure 1. Distribution of fungicides in surface, skin and pulp in grapes that have been in contact with three spiked solutions (1, 4 and 10 µg g<sup>-1</sup>), during 1, 3, 7, 15, 25 and 35 days.

**Table 2.** Validation parameters of the analytical methodologies by GC-ECD

Fungicides	Method 1: washing			Method 2: grape skin			Method 3: whole grape		
	LOD/LOQ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Precision (RSD, %)	Recovery <sup>c</sup> (%)	LOD/LOQ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Precision (RSD, %)	Recovery <sup>c</sup> (%)	LOD/LOQ <sup>a</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Precision (RSD, %)	Recovery <sup>c</sup> (%)
Vinclozolin	2.6 / 8.7	6.4	88	4.0 / 13.3	5.4	94	3.1 / 10.3	4.5	94
Dichlofluanid	2.2 / 7.5	8.4	78	2.2 / 7.5	9.2	86	2.7 / 9.0	4.5	82
Penconazol	3.7 / 12.2	4.6	102	3.3 / 11.1	4.3	92	2.4 / 8.0	5.6	88
Captan	5.1 / 16.9	3.5	81	5.4 / 17.8	9.8	86	5.0 / 16.6	7.9	97
Quinoxifen	2.1 / 7.2	1.8	82	2.5 / 8.4	3.1	90	1.5 / 5.0	5.2	100
Fluquinconazol	2.2 / 7.6	4.3	94	2.9 / 9.7	3.9	91	2.6 / 8.8	5.9	90
Boscalid	4.3 / 14.4	5.5	96	4.9 / 16.3	6.1	94	2.1 / 6.9	4.7	84
Pyraclostrobin	7.5 / 25.0	2.2	93	7.9 / 26.3	4.4	97	8.2 / 27.1	7.6	104

<sup>a</sup> Limit of detection/limit of quantification.

<sup>b</sup> Precision: expressed by repeatability assays of nine grape samples

<sup>c</sup> Recovery: calculated from six grape samples spiked with working standard solution

and time. It is also possible to study if an existing correlation between variables is more or less significant from a statistical point of view, using the number of pairs of values used in the coefficient calculus. The following equation is then employed [Miller & Miller, 2002]:

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

where  $r$  is the correlation coefficient; and  $(n-2)$  is degrees of freedom. From this equation, the values of a Student's  $t$ -test distribution can be obtained and then compared with  $t$ -tabulated values ( $t_4: 0.05 = 2.776$ ). The fitting results are presented in Table 4. As data shows, the linear correlation between  $\ln C_t$  and time was good for all the pesticides in all assays, with correlation coefficients  $r > 0.810$  for penconazol. 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. Considering the sorption constant value, a sorted list of fungicides (Hi to Lo) is as follows: penconazol > captan > dichlofluanid  $\geq$  boscalid  $\approx$  vinclozolin > fluquinconazol > pyraclostrobin > quinoxifen. The very low values found in the former two fungicides are due to the high sorption that occurs within the grape from the first day of study (85.7% and 52.4% respectively).

### 3.3 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. Fig. 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 mode of action of these fungicides (contact or systematic pesticides) and the fungicide concentration in contact with grapes, with > 53.0% of the residues for all the fungicides. In pulp, the residue amounts ranged from 9.6 to 41.7%.

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 Fig. 2. The studied pesticides are grouped as a function of the  $Q$  ratio. Non-systemic pesticides as vinclozolin, dichlofluanid and captan showed  $Q$  values lower than 0.45 whereas systemic or local penetrant such as quinoxifen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin showed values above 0.45. Penconazol is the only exception as although it is a systemic pesticide it shows  $Q$  values lower than 0.45.

Therefore, penetration in pulp was higher for systemic and local penetrant pesticides and, except for penconazol, a correlation between the pesticide's mode of action and its preferential localization—skin or pulp— were found. Similar results were found in previous studies concerning pesticide penetration in fruits; residues of non-systemic pesticides as folpet [Cabras et al., 2000; Teixeira et al., 2004] or dichlofluanid [Pérez-Clavijo et al., 1996] were mainly

Table 3. Fungicide residues and scorpion percentage in grapes samples that have been in contact with three different solutions during different times.

Days	Solution concentration																		
	1 $\mu\text{g g}^{-1}$			4 $\mu\text{g g}^{-1}$			10 $\mu\text{g g}^{-1}$			1 $\mu\text{g g}^{-1}$			4 $\mu\text{g g}^{-1}$			10 $\mu\text{g g}^{-1}$			
	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	Days	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	Days	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	Days	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	Days	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	Days	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	Days	
<b>Vinclozolin</b>																			
1	0.24	24.2	1	0.86	21.6	1	1.86	18.4	1	0.86	85.7	1	3.71	92.7	1	8.84	88.4	1	8.84
3	0.30	29.9	3	1.04	26.1	3	2.41	24.0	3	0.89	89.2	3	3.78	94.5	3	8.68	86.4	3	8.68
7	0.37	36.7	7	1.51	37.8	7	3.18	31.0	7	0.94	93.5	7	3.87	96.8	7	9.03	90.3	7	9.03
15	0.44	44.0	15	1.69	42.2	15	3.72	37.7	15	0.99	98.8	15	4.14	103	15	9.28	92.8	15	9.28
25	0.52	51.5	25	1.94	48.4	25	4.74	47.3	25	1.01	101	25	4.36	109	25	10.6	106	25	10.6
35	0.59	59.4	35	2.30	57.3	35	5.24	52.3	35	1.11	111	35	4.67	116	35	10.7	107	35	10.7
<b>Dichlofluanid</b>																			
1	0.15	14.6	1	0.57	14.3	1	1.38	13.8	1	0.37	36.8	1	1.33	33.3	1	3.31	33.1	1	3.31
3	0.12	12.4	3	0.67	16.8	3	1.17	11.7	3	0.39	39.0	3	1.74	43.5	3	3.97	39.7	3	3.97
7	0.17	17.2	7	0.83	20.7	7	1.58	15.8	7	0.49	48.7	7	2.08	52.1	7	4.69	46.9	7	4.69
15	0.18	18.4	15	0.96	24.0	15	2.10	21.0	15	0.58	58.2	15	2.49	62.2	15	6.14	61.4	15	6.14
25	0.25	24.8	25	1.05	26.3	25	2.68	26.8	25	0.68	68.4	25	2.66	66.4	25	6.88	68.8	25	6.88
35	0.34	34.3	35	1.51	37.9	35	3.19	31.9	35	0.74	74.1	35	2.91	72.8	35	7.68	76.8	35	7.68
<b>Penconazol</b>																			
1	0.14	13.8	1	0.47	11.8	1	1.78	17.8	1	0.33	32.6	1	1.13	28.0	1	2.78	27.8	1	2.78
3	0.16	16.0	3	0.77	19.2	3	2.20	22.0	3	0.35	35.1	3	1.34	33.6	3	3.66	36.6	3	3.66
7	0.21	21.1	7	1.68	42.1	7	2.31	23.1	7	0.43	42.8	7	1.56	39.3	7	4.61	46.1	7	4.61
15	0.58	58.2	15	2.17	54.3	15	5.33	53.3	15	0.53	53.2	15	2.04	51.3	15	5.83	58.3	15	5.83
25	0.60	59.9	25	2.44	60.9	25	6.29	62.9	25	0.62	62.2	25	2.66	66.7	25	7.03	70.3	25	7.03
35	0.64	64.2	35	2.45	61.2	35	6.62	66.2	35	0.72	72.4	35	3.03	75.5	35	7.37	73.7	35	7.37
<b>Captafan</b>																			
1	0.06	6.4	1	0.37	9.2	1	0.89	8.9	1	0.52	52.4	1	2.03	50.8	1	4.67	46.7	1	4.67
3	0.10	10.2	3	0.51	12.7	3	1.02	10.2	3	0.60	60.5	3	2.54	63.6	3	5.82	58.2	3	5.82
7	0.13	13.0	7	0.61	15.3	7	1.74	17.4	7	0.66	65.6	7	2.79	69.8	7	6.23	62.4	7	6.23
15	0.18	17.9	15	0.83	20.7	15	2.15	21.5	15	0.75	75.1	15	3.09	77.2	15	6.87	68.7	15	6.87
25	0.22	22.1	25	1.02	25.6	25	2.75	27.5	25	0.84	84.2	25	3.30	82.4	25	7.91	79.1	25	7.91
35	0.27	26.6	35	1.27	31.7	35	3.08	30.8	35	0.88	88.2	35	3.65	91.1	35	8.28	82.8	35	8.28



**Table 4.** Statistical parameters derived from the linear fit of the data for the fungicides sorption during time

Fungicide	Solution concentration								
	1 $\mu\text{g g}^{-1}$			4 $\mu\text{g g}^{-1}$			10 $\mu\text{g g}^{-1}$		
	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>t</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>t</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>t</i>
Vinclozolin	0.945	0.024	5.796	0.919	0.026	4.682	0.937	0.028	5.370
Dichlofluanid	0.925	0.027	7.019	0.934	0.025	7.536	0.971	0.028	8.165
Penconazol	0.901	0.048	4.167	0.813	0.042	2.792	0.927	0.041	4.938
Captan	0.920	0.038	4.704	0.960	0.033	6.838	0.924	0.035	4.841
Quinoxifen	0.972	0.007	8.362	0.996	0.007	30.43	0.963	0.007	7.137
Fluquinconazol	0.960	0.021	6.862	0.893	0.020	3.968	0.947	0.023	5.883
Boscalid	0.976	0.023	9.066	0.978	0.028	9.401	0.920	0.026	4.695
Pyraclostrobin	0.944	0.014	5.741	0.907	0.014	4.307	0.923	0.015	4.808

Notes: *r* = correlation coefficient; *k* = constant rate; *t* = calculated value of a Student's *t*-test distribution at 95% confidence level; *t*-tabulated 4; 0.05 = 2.776

found in the skin of apples and grapes while systemic pesticides as acefato [Sanz-Asensio et al., 1999], oxadixyl, azoxystrobin or procymidone [Teixeira et al., 2004] showed a larger penetration in the pulp.

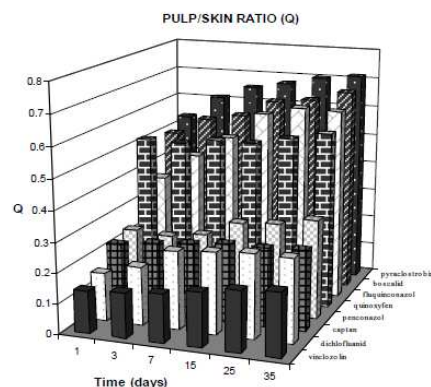
#### 4. Analysis of red grapes from La Rioja (Spain)

The overall methodology was applied to determine pyraclostrobin and boscalid in cv. Tempranillo grapevines treated with Cantus®, Cabrio Top® and Bellis®. 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.

##### *Pyraclostrobin*

The evolution of pyraclostrobin residues was compared between the different comercial products applied: Cabriotop (with a 5% pyraclostrobin) and Bellis (a mixture of pyraclostrobin and boscalid) (Fig. 3A and 3B, respectively). A high reduction in both pesticides residues over time was observed with decrease of approximately 90% between days 1 to 35. The reduction was due to dissipation and/or degradation by the environmental conditions. The initial and final concentration as well as the evolution for the pyraclostrobin residues was very close between the different parts of the grape –surface, skin and pulp– for both treatments in the samples taken from the fungicide spraying until 35 days later.

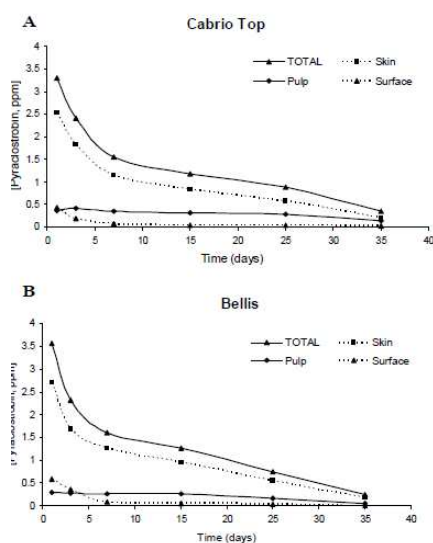
Residue dissipation within the different grape parts studied fitted a first-order kinetic with *r*<sup>2</sup> values



**Figure 2.** Calculated pulp/skin concentration ratios (*Q*) for the target fungicides. Average values for three different concentrations.

ranging between 0.828 and 0.992. Table 5 shows the *k* and *r*<sup>2</sup> values for each treatment. For grapes treated with Bellis the dissipation constants for the different parts of the grape were slightly higher in all cases, the smallest differences occurred in the skin. Besides this, dissipation in pulp showed two different behaviors in the Bellis treatment while it showed only one in the Cabrio Top treatment.





**Figure 3.** Evolution of pyraclostrobin residues in different parts of grape during 35 days after applications in field: A) Cabrio Top, individual treatment; B) Bellis, mixture of boscalid and pyraclostrobin.

The values between the final concentrations found in pulp and skin ( $Q$ ) for pyraclostrobin in both treatments was  $Q_{PC} = 0.668 \pm 0.017$  for Cabrio Top and  $Q_{PB} = 0.301 \pm 0.020$  for Bellis. Field values for the Cabrio Top treatment were comparable to those obtained in the laboratory for this active material,  $0.534 < Q < 0.714$ .

However, in the Bellis treatment, pulp penetration in the field was lower although it had started with very similar concentrations on day 1.

#### Boscalid

In a similar way as with pyraclostrobin, a significative reduction in the residues of boscalid was observed, mainly on the surface, due to the dissipation and/or degradation of the active material as the grapes were exposed to different meteorological conditions during the period. Boscalid was analyzed in grapes treated with Cantus and Bellis. Fungicide evolution in the three different parts of the grape was not similar in either treatments (Fig. 4A and 4B). Differences in the behaviour of the pesticide residues evolution in the skin during the first 10 days were found as well as the evolution of the concentration in pulp throughout the study. Both the initial concentration and the concentration after 35 days were slightly higher in the individual treatment: Cantus. However if the different parts of the grape were considered almost identical values for pesticide residues were found in skin for both the first day and the 35th day samples. In pulp the initial and final concentrations were higher for Cantus, as opposed to what happened on the grape surface, where the higher amount of residues occurred in the Bellis treatment.

In a similar way as it was carried out for pyraclostrobin, the kinetics of boscalid residues dissipation were studied in each of the different parts of the grape obtaining  $r^2$  values ranging between 0.766 and 0.994. Table 6 shows the kinetic parameter  $k$  and the regression parameter  $r^2$  for each treatment. In this case the behaviour and the constants showed small differences between both treatments, in this way the amount of boscalid on the surface remained almost constant although it decreased faster in the Cantus treatment.

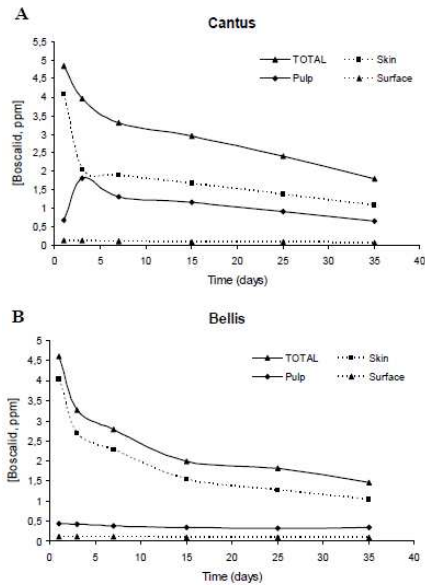
In pulp, an increase in the boscalid residues in the Cantus treatment was observed up to day 3, from then on, the concentration diminished; however in the Bellis treatment they showed a decrease from day 1.

**Table 5.** Statistical parameters for pyraclostrobin

	Cabrio Top			Bellis		
	$k$	Days	$r^2$	$k$	Days	$r^2$
Total	-0.1238	1 - 7	0.991	-0.1271	1 - 7	0.946
	-0.0518	7 - 35	0.919	-0.0671	7 - 35	0.927
Surface	-0.2823	1 - 7	0.970	-0.3303	1 - 7	0.992
	-0.0605	7 - 35	0.936	-0.0908	7 - 35	0.916
Skin	-0.0662	1 - 35	0.959	-0.0694	1 - 35	0.958
Pulp	-0.0272	1 - 35	0.828	-0.0116	1 - 7	0.980
				-0.0796	15 - 35	0.953

**Table 6.** Statistical parameters for boscalid

	Cantus			Bellis		
	<i>k</i>	Days	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>k</i>	Days	<i>r</i> <sup>2</sup>
Total	-0.0253	1-35	0.953	-0.0775	1-7	0.852
Surface	-0.0206	1-35	0.937	-0.0120	15-35	0.988
Skin	-0.0198	3-35	0.994	-0.0875	1-7	0.824
Pulp	-0.0289	3-35	0.956	-0.0268	7-35	0.946
				-0.0084	1-35	0.766



**Figure 4.** Evolution of boscalid residues in different parts of grape during 35 days after applications in field: A) Cantus, individual treatment; B) Bellis, mixture of boscalid and pyraclostrobin.

In skin Bellis treatment showed a faster kinetic up to day 7 and afterwards a similar dissipation rate to the one found in Cantus. In this case, pulp and skin concentration ratio (*Q*) for boscalid were  $Q_{BC} = 0.602 \pm 0.035$  for Cantus and  $Q_{BB} = 0.329 \pm 0.013$  for Bellis.

Field values in the individual treatment (Cantus) were comparable to those found in the penetration study in the laboratory for this active material:  $0.496 < Q < 0.679$ . However, in the Bellis treatment, the observed

penetration was lower; its value was approximately half of the maximum value, a similar behaviour to that found for pyraclostrobin. Therefore results showed that sorption is reduced if the another fungicide is present in the same solution that contacts the berry. This behaviour suggests competition for penetration in pulp.

#### 4. Conclusions

A simple, rapid, liquid extraction method was developed for the determination of vinclozolin, dichlofluanid, penconazol, captan, quinoxifen, fluquinconazol, boscalid and pyraclostrobin 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.

The study of fungicides mobility in the laboratory showed that sorption did not depend on the initial spiked concentration and it increased with contact time. All pesticides studied showed first-order kinetics for the sorption during time. The highest concentrations of residues were found in the skin. Penetration into the pulp was observed for all fungicides. It was found that the ratios between pulp and skin residues (*Q*) did not depend on the initial spiked concentration but rather on a correlation between each pesticide's mode of action and its preferential localization—skin or pulp.

Distribution within the different parts of the grape was studied in the field for pyraclostrobin and boscalid. The dissipation of residues in each of the parts of the grapes for both pyraclostrobin and boscalid fitted a first-order kinetic. In the case of products that applied only one of the pesticides, *Q* ratio values were very similar to those found in laboratory.

In the case of Bellis (pyraclostrobin + boscalid) the *Q* ratios were lower to those found in the lab, approximately half in value, which indicates a competitive effect between both active materials to penetrate in the pulp.



---

## References

- Agüera, A.; Contreras, M.; Crespo, J.; Fernández-Alba, A.R. Multiresidue method for the analysis of multiclass pesticides in agricultural products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analyst* 2002, 127, 347-354.
- Banerjee, K.; Oulkar, D.P.; Dasgupta, S.; Patil, S.B.; Patil, S.H.; Savant, R.; Adsule, P.G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2007, 1173, 98-109.
- Barriada-Pereira, M.; González-Castro, M.J.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D.; Fernández-Fernández, E. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta* 2007, 71, 1345-1351.
- Cabras, P.; Angioni, A.; Caboni, P.; Garau, V.L.; Melis, M.; Pirisi, F.M.; Cavitas, F. Distribution of folpet on the grape surface after treatment. *J. Agr. Food Chem.* 2000, 48, 915-916.
- Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L. Fate of quinoxifen residues in grapes, wine, and their processing products. *J. Agr. Food Chem.* 2000, 48, 6128-6131.
- Castellucci F. Report on the State of World Vitiviniculture in 2007. International Organization of Vine and Wine (OIV) Congress in Verona, Italy (2008).
- Coscollá, R. Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. 5ª Edición. Ed. Mundí-Prensa. 2004, Capítulo XIII: 329-355.
- Famigliani, G.; Palma, P.; Termopoli, V.; Truffelli, H.; Cappiello, A. Single-step LC/MS method for the simultaneous determination of GC-amenable organochlorine and LC-amenable phenoxy acidic pesticides. *Anal. Chem.* 2009, 81, 7373-7378.
- Fernández González, J.; Rial Otero, R.; Cancho Grande, B.; 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.* 2003, 86, 1008-1014.
- García-Rodríguez, D.; Carro-Díaz, A.M.; Lorenzo-Ferreira, R.A. Supercritical fluid extraction of polyhalogenated pollutants from aquaculture and marine environmental samples: A review. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1333-1345.
- Gfrerer, M.; Chen, S.; Lankmayr, E.P.; Quan, X.; Yang, F. Comparison of different extraction techniques for the determination of chlorinated pesticides in animal feed. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 1861-1867.
- Gonçalves, C.; Carvalho, J.J.; Azenha, M.A.; Alpendurada, M.F. Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite design and analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2006, 1110, 6-14.
- Guan, H.; Brewer, W.E.; Garris, S.T.; Morgan, S.L. Disposable pipette extraction for the analysis of pesticides in fruit and vegetables using gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 1867-1874.
- Hiemstra, M.; de-Kok, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2007, 1154, 3-25.
- Hussen, A.; Westbom, R.; Megersa, N.; Mathiasson, L.; Björklund, E. Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil. *J. Chromatogr. A* 2007, 1152, 247-253.
- Kotonia, C.A.; Liapis, K.S.; Ziogas, V.N. Determination of residues of 14 insecticides and metabolites in grapes and peaches by gas chromatography - Mass spectrometry. *Fresenius Environmental Bulletin* 2007, 16, 223-226.
- Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/2007/3131, 31/October/2007.
- Miller, J.N.; Miller, J.C. (2002). *Estadística 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.
- Moriwaki, H. Liquid chromatographic- mass spectrometric methods for the analysis of persistent pollutants: Polycyclic aromatic hydrocarbons, organochlorine compounds and perfluorinated compounds. *Current Organic Chemistry* 2005, 9, 849-857.
- Nozal, MaJ.; Bernal, J.L.; Jiménez, J.J.; Martín, MaT.; Bernal, J. Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2005, 1076, 90-96.
- Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Kanda, H.; Yamagami, T.; David, F.; Tienpont, B.; Sandra, P. 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. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1083-1092.
- Ortelli, D.; Edder, P.; Corvi, C. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid
-

- 
- chromatography - electrospray - tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2004, 520, 33-45.
- Otake, T.; Aoyagi, Y.; Numata, M.; Yarita, T. Evaluation of microwave-assisted extraction for the analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish. *J. AOAC Int.* 2008, 91, 1124-1129.
- Pérez-Clavijo, M.; Plaza Medina, M.; Sanz Asensio, J.; Galbán Bernal, J. Decay study of pesticide residues in apple samples. *J. Chromatogr. A.* 1996, 740, 146-150.
- Sanz-Asensio, J.; Martínez-Prado, A.P.; Plaza-Medina, M.; Martínez-Soria, M.T.; Pérez-Clavijo, M. Behaviour of acéphale and its metabolite methamidophos in apple samples. *Chromatographia* 1999, 49, 155-160.
- Shrivastava, K.; Wu, H.F. Ultrasonication followed by single-drop microextraction combined with GC/MS for rapid determination of organochlorine pesticides from fish. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 380-386.
- Teixeira, M.J.; Aguiar, A.; Afonso, C.M.M.; Alves, A.; Bastos, M.M.S.M. Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology. *Anal. Chim. Acta.* 2004, 513, 333-340.
- Vaquero-Fernández, L.; Sanz-Asensio, J.; López-Alonso, M.; Martínez-Soria, M. T. Fate and distribution of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol fungicides from treated grapes intended for winemaking. *Food Addit. Contam. Part A* 2009, 26, 164-171.



**ANEXO VI. Evolution of pyraclostrobin and boscalid residues during elaboration of red wine. Effect of wine-making procedures in their disappearance**

---



---

## EVOLUTION OF PYRACLOSTROBIN AND BOSCALID RESIDUES DURING ELABORATION OF RED WINE. EFFECT OF WINE-MAKING PROCEDURES IN THEIR DISSAPPEARANCE

L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria\*

*Departamento de química analítica. Universidad de La Rioja. Madre de dios, 51. La Rioja, 26006, Spain.*

---

### Abstract

The effect of winemaking procedures on the concentration of two new generation fungicides, boscalid (control of grey mold) and pyraclostrobin (control of powdery and downy mildew) in red wine was evaluated.

The eliminated percentage in the winemaking process was >88% for boscalid under good agricultural practices and 75% when critical agricultural practices were applied. Concentration of pyraclostrobin in final wines did not overcome the LOD for this fungicide in any case. Alcoholic and malolactic fermentations produced the highest decrease in these fungicide residues. The disappearance rate was calculated for both steps as pseudo first order kinetics and the half-life ( $t_{1/2}$ ) was in the range from 4.1 (alcoholic fermentation) to 14.4 (malolactic fermentation) days for pyraclostrobin and from 8.9 (alcoholic fermentation) to 117 (malolactic fermentation) days for boscalid.

The effects of five clarification agents (egg albumin, bentonite plus gelatin, charcoal, PVPP and silica gel) on the removal of boscalid and pyraclostrobin residues applied directly to a racked red wine were also studied. The greatest elimination was obtained in wines clarified with charcoal (82.9-84.2 % elimination for pyraclostrobin; 74.6-78.0 % for boscalid) and the lowest in those clarified with silica gel (between 9% and 12% for both pesticides).

*Keywords: Pesticide residues; wine; clarification; winemaking process; disappearance rate*

---

### 1. Introduction

The incidence of diseases in vineyards, especially fungal diseases, is one of the main reasons for the economic losses registered in the viticulture sector. Grey mold (*Botrytis cinerea*), powdery mildew (*Uncinula necator*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*) are common fungal diseases of all species of cultivated and wild grapes (*Vitis* species) in grape growing areas of the world [1]. The best control of these fungi is achieved through the use of good cultural practices and suitable fungicide selection. Fungicides of a new generation such as boscalid and pyraclostrobin have recently been introduced in viticulture practices [2].

Boscalid [2-Chloro-N(4'-chloro-biphenyl-2-yl)-nicotinamide] is a completely new active ingredient belonging to the anilid group of fungicides via a completely novel mode of action that interferes with the enzyme succinate ubiquinone reductase (complex II) in the mitochondrial electron transport chain [3]. This novel mode of action makes it an excellent candidate for the prevention and treatment of the grey mold (*Botrytis cinerea*) in fruit plants and vines.

Pyraclostrobin [methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yloxy]methyl} phenyl}(N-methoxy) carbamate] is a completely new active ingredient belonging to the strobilurins group of fungicides. These kind of fungicides acts through inhibition of

mitochondrial respiration by blocking electron transfer within the respiratory chain, which in turn causes important cellular biochemical processes to be severely disrupted, and results in cessation of fungal growth [4]. Pyraclostrobin is recommended for the prevention and treatment of powdery mildew and downy mildew in fruit plants and vines.

The main properties of these new fungicides are their broad spectrum of action, their special penetration and redistribution properties and their long-term stability, which results in better long-term efficacy, allowing the use of lower concentrations of active substances.

The use of these substances provides unquestionable benefits but unfortunately, their incorrect application may leave harmful residues, which involve possible health risk [5, 6]. Because of their toxicity, making it necessary to analyse pesticide residues in grapes intended for human consumption [2, 7-9] and maximum residue levels (MRLs) for pesticide residues in a variety of agricultural foods were established by European Union to protect consumer's health. Nevertheless, for the most of the studied fungicides MRLs have not been established in wine.

---

Corresponding author. Phone: (+34) 941 299 629, Fax: (+34) 941299621.  
E-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es (M. Martínez-Soria)



However, for wines elaborated in the European Union from September 2008, MRLs were established for the studied fungicides. In addition, other countries such as Italy or Switzerland have also established them [10-12]. Table 1 summarized the established MRLs by the different legislations in grapes and wine.

The presence of pesticides in viniferous grapes could pass to the must and eventually to the wine during fermentation after all the winemaking processes [13-15]. The activity of yeasts and bacterias can be affected by the presence of pesticides residues [6, 16, 17] which may associate with stuck and sluggish alcoholic fermentations and with problems in malolactic fermentation. These effects could also alter the concentrations of certain compounds responsible for the sensory quality of wine, such as phenolic compounds and/or aroma compounds [18, 19].

The objectives of this study were (i) to know the evolution of two recent fungicides, boscalid and pyraclostrobin and the mixture of both fungicides, during the elaboration of red wines and (ii) to evaluate the influence of wine-making procedures (alcoholic and malolactic fermentations, clarification and filtration) in the elimination of the residues of those compounds when two different fungicide treatments were carried out. The first one was carried out under good agricultural practices (GAP), obeying the preharvest interval (PHI), and the second one under critical agricultural practices (CAP), applying one week before harvesting. Results obtained in lab for pyraclostrobin, boscalid and the mix of both were compared with those obtained in a field test carried out in the vineyard during 35 days.

## 2. Experimental

### Field trials

The field trials were conducted from May to October, 2008, 2009 and 2010 in an experimental vineyard belonging to Qualified Designation of Origin Rioja located in Aldeanueva de Ebro, La Rioja, Spain. The vineyard produces the red grape *V. vinifera* cv. Tempranillo, a common variety in this area. The vineyard plot had a size of 3000 m<sup>2</sup> and was divided into seven groups of 6 rows each with 40-50 vines per row. The row and vine spacing was of 2.6 and 1.2 m, respectively. Vines were eight years old and planted to goblet training.

In order to avoid a contamination between treatments, only the two central rows of every group were harvested. Six groups of vines were treated with three new commercial formulations against grey mold, downy mildew and powdery mildew: Cantus® (50% boscalid), Cabrio Top® (5% pyraclostrobin) and Bellis® (25.2% boscalid + 12.8% pyraclostrobin) while the other group was left untreated (control). The formulations were sprayed with a HARDI atomizer

**Table 1.** Maximal residue limits ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

Fungicide	MRL			
	Wine grapes <sup>a</sup>	UE wine <sup>b</sup>	Italy <sup>c</sup>	Switzerland <sup>c</sup>
Boscalid	5000	5000	1000	1000
Pyraclostrobin	2000	1000	50	-

<sup>a</sup> By European legislation.

<sup>b</sup> By European legislation for wines elaborated from September 2008.

<sup>c</sup> Established for wines

(Denmark), ensuring that bunches. Applications were carried out when there was no rain predicted for at least 24 hours. Phytosanitary treatments were carried out under GAP and CAP:

**GAP:** Cantus, Cabrio Top and Bellis were applied at the recommended doses (1.2 kg ha<sup>-1</sup>, 2 kg ha<sup>-1</sup> and 1 kg ha<sup>-1</sup>, respectively) and respecting the established preharvest time for each product (28, 35 and 15 days, respectively).

Cabrio Top® was applied in May (inflorescence elongating, flowers closely pressed together) and June (full flowering and berries small, bunches begin to hang 4-6 mm). Cantus® application was performed in July (2008 and 2010) or August (veraison; 2009) and for Bellis maximum 2 applications between May and August.

**CAP:** the commercial formulations were applied one week before the harvest in order to ensure the presence of pyraclostrobin and boscalid in grapes and to study their dissipation in the vinification process. Treated and untreated grapes were harvested in October 2008, 2009 and 2010. All grapes samples were previously analyzed to determine the initial fungicide level.

### Winemaking processes

Using the harvested grapes, micro-vinifications (50 kg) were performed with each treated grape; two repetition of each vinification was carried out. The winemaking process (Fig. 1) was identical for all vinification experiments, as follows. Grapes were crushed and pressed to obtain the must and 50 mg L<sup>-1</sup> of SO<sub>2</sub> was added. Musts were inoculated with selected yeasts Uvaferm® VRB (*Saccharomyces cerevisiae*) purchased from Lallemand (Denmark). The evolution of the fermentative process was controlled at all times by measuring the sugar content. Fermentation had a regular course (8-10 days) in all flasks. After alcoholic fermentation, the wine was racked to separate it from lees, supplied with SO<sub>2</sub> and malolactic fermentation took place by inoculating lactic bacterias MBR *Alpha Oenococcus oeni* (Lallemand, Denmark).

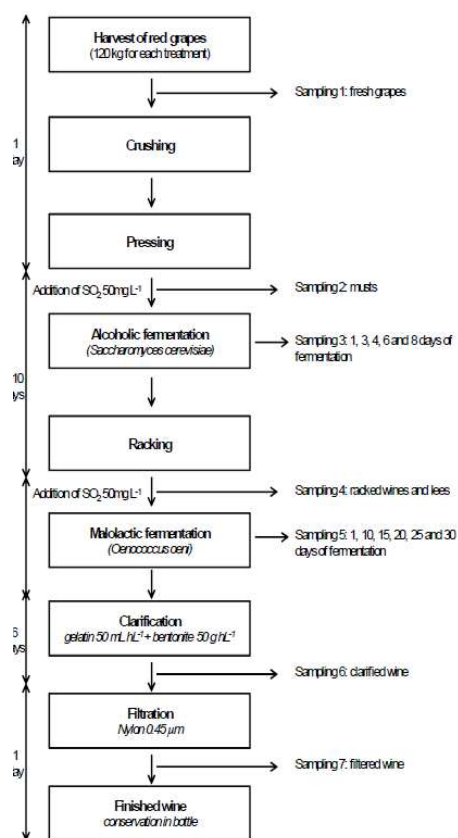


Figure 1. Scheme for standard wine making

Final wines were clarified with gelatine (50 mL hL<sup>-1</sup>) plus bentonite (20 g hL<sup>-1</sup>) and bottled. Residue levels of pyraclostrobin and boscalid were analyzed by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry (SPE-CG-MS) during all steps of fermentative process.

**Clarification step:** Clarification tests were carried out on 1 L samples of residue-free assessed red wine spiked with pyraclostrobin and boscalid at two concentration levels. The clarifying agents used were bentonite plus gelatin, egg albumin, charcoal, PVPP (polyvinylpyrrolidone) and silica gel. The doses were those used in standard enological practice.

After clarification, the cleared wine and the control samples (without clarification) were analyzed for pesticide residues. Each clarification test was performed by duplicate.

#### Fungicide determination

##### Chemicals

Pesticide analytical standards of pyraclostrobin and boscalid with purity higher than 99.0 % were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Individual stock standard solutions (1000 mg L<sup>-1</sup>) of fungicides and intermediary solutions were prepared in methanol. Tetradifon from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) with a purity of 99.5 % was used as internal standard (IS) to correct the variability in gas chromatographic injection and mass spectrometric detection response. An individual stock solution (1000 mg L<sup>-1</sup>) and a working solution (10 mg L<sup>-1</sup>) were prepared in ethyl acetate. All solutions were stored at -20°C. Calibration standard solutions for GC-MS analysis were prepared evaporating extracts of untreated must and wine under gentle nitrogen stream by using a TurboVap® II evaporator from Zymark (Warrington, UK) and redissolving with ethyl acetate the remained matrix.

HPLC grade methanol, ethyl acetate, and dichloromethane 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 500 mg (Bond Elut® LRC-C18 INT) cartridges were supplied by Varian (Middelburg, The Netherlands). Clarifying Agents, Commercially albumin, bentonite, gelatin, charcoal, PVPP, and silica gel purchased from Agrovin (Logroño, Spain) were used.

Nylon filters (0.45 μm pore size) were used for filtration (Supelco Inc., Bellefonte, PA).

#### Extraction procedure

##### a) Extraction in grapes and lees

MAE experiments were performed using an MARS-microwave sample preparation unit (CEM, Corp., Matthews, N.C) equipped with a solvent detector. Samples were accurately weighed (2.0 g) into the PTFE-lined extraction vessel. Subsequently, 10 mL of hexane/acetone (1:1) mixture were added as an extraction solvent. The oven was set to a power of 600 W, ramped to 105°C within 5 min, and held at this temperature for 10 min while stirring at the highest setting. After extraction, the vessels were cooled to room temperature before being opened. Next, the water of the supernatant from each vessel was removed using anhydrous sodium sulphate and was



filtered through glass wool. The residue was rinsed three times with 2 mL of hexane/acetone (1:1, v/v) and combined with the supernatant. Finally, the extracts were evaporated using a low volume concentrator (Zymark TurboVap II Vortex evaporator, Hopkinton, MA, USA) under a gentle stream of nitrogen evaporator and adjusted to a final volume of 5 mL with hexane/acetone (1:1, v/v) that contains tetradifon ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) as IS.

#### b) Extraction in must and wine

Visiprep® SPE vacuum manifold from Supelco (Bellefonte, PA) was used to simultaneously process 12 tubes. Therefore, a wine or must volume of 10 mL was eluted through a C18 cartridge, previously conditioned with 5 mL of methanol and 3 mL of water. Then, the cartridge was eluted with 10 mL of water/methanol (9:1, v/v) to clean up the cartridge and was dried under an applied vacuum for 20 min to remove water excess. Finally, the retained fungicides were eluted with 5 mL of dichloromethane, evaporated to dryness under gentle nitrogen stream and redissolved with 10 mL of the ethyl acetate and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of tetradifon was added.

For the analysis of must and wine samples, the analytes were extracted, as described above. All the samples (must or wine) are extracted for duplicated and analyzed by gas chromatography.

#### Instrumentation and chromatographic conditions

The analysis of boscalid and pyraclostrobin residues was carried out on an Agilent Technologies GC 7890A chromatograph coupled to a MS 5975C quadrupole mass selective detector. Chromatographic separations were done by using a HP-5MS capillary column ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.} \times 0.25 \mu\text{m}$  film thickness). The initial oven temperature was set at  $100^\circ\text{C}$ , increased to  $185^\circ\text{C}$  at  $40^\circ\text{C}/\text{min}$  and kept for 5 min, increased at a rate of  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  to  $300^\circ\text{C}$  and hold for 3 min. The volume of sample was  $2 \mu\text{L}$ , injected in splitless mode. The injector temperature was set at  $250^\circ\text{C}$ . Helium (99.9999 % purity) was used as carrier gas at constant flow rate of  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ . The mass spectrometer was operated in electron ionization ( $70 \text{ eV}$ ), with 6-min solvent delay. The interface temperature was kept at  $310^\circ\text{C}$  and ion source temperature was kept at  $230^\circ\text{C}$ . A mass range of  $m/z$  50–550 was scanned to confirm the retention times of analytes. For the determination of fungicide residues, selected ion monitoring (SIM) mode was used. For each target compound the most abundant ions of higher  $m/z$  were selected ( $112$ ,  $140$  and  $342 \text{ m/z}$  for boscalid;  $132$ ,  $164$ , and  $325 \text{ m/z}$  for pyraclostrobin;  $111$ ,  $159$  and  $356 \text{ m/z}$  for tetradifon), which were the most characteristic ones. Confirmation criteria were that the retention times of the compounds in the

sample to be within  $\pm 0.5\%$  of the respective retention times in matrix-matched calibration standards and the intensity ratios of the target and qualifiers ions, in the sample to be within 20% of those obtained from the standard material.

## Results and discussion

### Analytical performance

Chromatographic response was checked up to  $5000 \mu\text{g L}^{-1}$  with determination coefficients  $r^2 > 0.999$  showing, in all the cases, a good linearity for both pesticides in grape, must and wine matrices. The obtained detection limits for boscalid were  $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $1.2$  and  $0.9 \mu\text{g L}^{-1}$  and for pyraclostrobin were  $1.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ,  $1.1$  and  $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$  in grapes, must and wine, respectively.

To determine percent recovery of pyraclostrobin and boscalid, untreated matrices were spiked with concentrations of pesticides in the range  $10$ – $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ . The results of recovery analysis were compared with those in standard dilutions used in the fortification. The recovery assays were replicated five times. After the evaporation of the spiking solvent, the samples were processed in the way indicated previously.

Mean recoveries ( $n=5$ ) were higher than 86% for both pesticides in grapes with RSDs ranged were lower than 8%. In must and wine, the recoveries from fortified samples were in the range of 91–102% with RSDs of 2.8–8.4%.

The limits of quantification calculated for grapes were  $3.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  for boscalid and  $5.8 \mu\text{g kg}^{-1}$  for pyraclostrobin. In must and wine, the limits for the same compounds were  $2.4$  and  $2.1 \mu\text{g kg}^{-1}$  for boscalid and  $3.3$  and  $3.1 \mu\text{g kg}^{-1}$  for pyraclostrobin, respectively. These limits were, in all cases, very inferior to the maximum residue limit (MRL) established by the different legislations for those compounds, as it can be seen in Table 1. The obtained values allowed us to affirm that the used extraction method is appropriate for the determination of residual levels of pyraclostrobin and boscalid in these three matrices.

### Dissipation of residues

In order to study the evolution of pyraclostrobin and boscalid residues during the different wine elaboration steps, several samples were taken including grapes, must, alcoholic and malolactic fermentation, lees, clarified and filtered wine. The residual concentrations found during the vinification process are summarized in Table 2 for pyraclostrobin (Cabrio Top), Table 3 for boscalid (Cantus) and Table 4 for both fungicides (Bellis). The total amount present in the crushed grapes was considered as 100% in each

Table 2. Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$  or  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) of fungicide pyraclostrobin and percentage remaining (n=4). Stage in the clarification process with bentonite plus gelatin

Stage		[Pyraclostrobin; $\mu\text{g kg}^{-1}$ or $\mu\text{g L}^{-1}$ ] (% remaining)					
		Year 2008		Year 2009		Year 2010	
		GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>	GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>	GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>
<i>Crushed grapes</i>		< LD <sup>1</sup>	1358 (100)	58 (100)	1567 (100)	< LD <sup>1</sup>	--
<i>Alcoholic fermentation</i>	Must 1 days	< LD <sup>2</sup>	597 (44)	29.1 (50)	651 (42)	< LD <sup>2</sup>	--
	Must 3 days	< LD <sup>2</sup>	464 (34)	< LD <sup>2</sup>	545 (35)	< LD <sup>2</sup>	--
	Must 4 days	< LD <sup>2</sup>	398 (29)	< LD <sup>2</sup>	478 (31)	< LD <sup>2</sup>	--
	Must 6 days	< LD <sup>2</sup>	274 (20)	< LD <sup>2</sup>	398 (25)	< LD <sup>2</sup>	--
	Must 8 days	< LD <sup>2</sup>	181 (13)	< LD <sup>2</sup>	270 (17)	< LD <sup>2</sup>	--
<i>Lees</i>		< LD <sup>1</sup>	1522	< LD <sup>1</sup>	1489	< LD <sup>1</sup>	--
	1 days	< LD <sup>3</sup>	186 (14)	< LD <sup>3</sup>	240 (15)	< LD <sup>3</sup>	--
	10 days	< LD <sup>3</sup>	124 (9)	< LD <sup>3</sup>	171 (11)	< LD <sup>3</sup>	--
	15 days	< LD <sup>3</sup>	91 (7)	< LD <sup>3</sup>	137 (9)	< LD <sup>3</sup>	--
<i>Malolactic Fermentation</i>	20 days	< LD <sup>3</sup>	68 (5)	< LD <sup>3</sup>	98 (6)	< LD <sup>3</sup>	--
	25 days	< LD <sup>3</sup>	51 (4)	< LD <sup>3</sup>	80 (5)	< LD <sup>3</sup>	--
	30 days	< LD <sup>3</sup>	36 (3)	< LD <sup>3</sup>	61 (4)	< LD <sup>3</sup>	--
	<i>Wine not clarified</i>	< LD <sup>3</sup>	29 (2)	< LD <sup>3</sup>	63 (4)	< LD <sup>3</sup>	--
<i>Wine clarified</i>	< LD <sup>3</sup>	< LD <sup>3</sup>	< LD <sup>3</sup>	26 (2)	< LD <sup>3</sup>	--	
<i>Filtered wine</i>	< LD <sup>3</sup>	< LD <sup>3</sup>	< LD <sup>3</sup>	< LD <sup>3</sup>	< LD <sup>3</sup>	--	

<sup>a</sup> Good Agricultural practices  
<sup>b</sup> Critical agricultural practices  
<sup>1</sup> LD (grapes) = 1.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$   
<sup>2</sup> LD (must) = 1.1  $\mu\text{g L}^{-1}$   
<sup>3</sup> LD (wine) = 1.3  $\mu\text{g L}^{-1}$

Table 3. Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$  or  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) of fungicide boscalid and percentage remaining (n=4). Stage in the clarification process with bentonite plus gelatin

Stage		[Boscalid; $\mu\text{g kg}^{-1}$ or $\mu\text{g L}^{-1}$ ] (% remaining)					
		Year 2008		Year 2009		Year 2010	
		GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>	GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>	GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>
<i>Crushed grapes (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</i>		91 (100)	3383 (100)	408 (100)	--	198 (100)	--
<i>Alcoholic fermentation (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	Must 1 days	34 (38)	1592 (47)	124 (30)	--	77 (38)	--
	Must 3 days	30 (34)	1518 (45)	119 (29)	--	67 (34)	--
	Must 4 days	28 (31)	1474 (43)	115 (28)	--	61 (31)	--
	Must 6 days	24 (26)	1409 (42)	88 (22)	--	54 (27)	--
	Must 8 days	23 (25)	1348 (40)	75 (18)	--	44 (22)	--
<i>Lees (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</i>		137	2687	396	--	169	--
<i>Malolactic Fermentation (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	1 days	22 (24)	1292 (38)	73 (18)	--	43 (22)	--
	10 days	18 (20)	1241 (37)	66 (16)	--	38 (18)	--
	15 days	17 (18)	1177 (35)	63 (15)	--	35 (18)	--
	20 days	16 (18)	1143 (34)	58 (14)	--	33 (17)	--
	25 days	15 (17)	1123 (33)	57 (14)	--	31(16)	--
<i>Wine not clarified (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>	30 days	14 (16)	1076 (32)	55 (13)	--	27 (14)	--
		14 (16)	1071 (32)	54 (13)	--	28 (14)	--
<i>Wine clarified (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>		11 (12)	908 (27)	46 (11)	--	22 (11)	--
<i>Filtered wine (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</i>		9 (10)	839 (25)	37 (10)	--	18 (9)	--

<sup>a</sup> Good Agricultural practices

<sup>b</sup> Critical agricultural practices

<sup>1</sup> LD (grapes) =  $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$

<sup>2</sup> LD (must) =  $1.2 \mu\text{g L}^{-1}$

<sup>3</sup> LD (wine) =  $0.9 \mu\text{g L}^{-1}$

Table 4. Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$  or  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) of fungicides pyraclostrobin and boscalid and percentage remaining (n=4) in the application under GAP of Bellis. Stage in the clarification process with bentonite plus gelatin

Stage	[Fungicide concentration; $\mu\text{g kg}^{-1}$ or $\mu\text{g L}^{-1}$ ] (% remaining)								
	Year 2009				Year 2010				
	Boscalid		Pyraclostrobin		Boscalid		Pyraclostrobin		
	GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>	GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>	GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>	GAP <sup>a</sup>	CAP <sup>b</sup>	
<i>Crushed grapes</i> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	266 (100)	3201 (100)	<LD <sup>1</sup>	1044 (100)	113 (100)	3527 (100)	<LD <sup>1</sup>	1312 (100)	
<i>Alcoholic fermentation</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1 days	109 (41)	1376 (43)	<LD <sup>2</sup>	491 (47)	36 (32)	1622 (46)	<LD <sup>2</sup>	695 (53)
	3 days	98 (37)	1304 (41)	<LD <sup>2</sup>	374 (36)	32 (28)	1524 (43)	<LD <sup>2</sup>	584 (45)
	4 days	87 (33)	1233 (38)	<LD <sup>2</sup>	322 (31)	29 (26)	1477 (42)	<LD <sup>2</sup>	526 (40)
	6 days	76 (29)	1167 (36)	<LD <sup>2</sup>	257 (25)	26 (23)	1384 (39)	<LD <sup>2</sup>	398 (30)
	8 days	63 (24)	1056 (33)	<LD <sup>2</sup>	167 (16)	22 (19)	1279 (37)	<LD <sup>2</sup>	287 (22)
<i>Lees</i> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		254	2881	<LD <sup>1</sup>	769	87	3357	<LD <sup>1</sup>	1103
	1 days	61 (23)	1042 (33)	<LD <sup>3</sup>	159 (15)	20 (18)	1283 (36)	<LD <sup>3</sup>	271 (21)
<i>Malolactic fermentation</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	10 days	57 (21)	1003 (31)	<LD <sup>3</sup>	102 (10)	16 (13)	1244 (35)	<LD <sup>3</sup>	187 (14)
	15 days	53 (20)	964 (30)	<LD <sup>3</sup>	76 (7)	15 (12)	1198 (34)	<LD <sup>3</sup>	149 (11)
	20 days	50 (19)	913 (28)	<LD <sup>3</sup>	57 (5)	14 (12)	1166 (33)	<LD <sup>3</sup>	98 (7)
	25 days	45 (17)	841 (26)	<LD <sup>3</sup>	38 (4)	13 (12)	1120 (32)	<LD <sup>3</sup>	73 (6)
	30 days	44 (17)	800 (25)	<LD <sup>3</sup>	27 (3)	13 (12)	1087 (31)	<LD <sup>3</sup>	61 (5)
<i>Wine not clarified</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	44 (17)	794 (25)	<LD <sup>3</sup>	26 (2)	14 (12)	1079 (30)	<LD <sup>3</sup>	58 (4)	
<i>Wine clarified</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	35 (13)	651 (20)	<LD <sup>3</sup>	6 (1)	10 (9)	862 (24)	<LD <sup>3</sup>	13 (1)	
<i>Filtered wine</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	32 (12)	603 (19)	<LD <sup>3</sup>	<LD <sup>3</sup>	7 (6)	796 (22)	<LD <sup>3</sup>	<LD <sup>3</sup>	

<sup>a</sup> Good Agricultural practices

<sup>b</sup> Critical agricultural practices

<sup>1</sup> LD (grapes) = 1.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$

<sup>2</sup> LD (must) = 1.1  $\mu\text{g L}^{-1}$

<sup>3</sup> LD (wine) = 1.3  $\mu\text{g L}^{-1}$



case and the starting point to study the disappearance of the fungicides.

To ascertain the dissipation rate of residues in each winemaking process, the experimental data have been fitted to the following mathematical model [20]:

$$R_t = R_0 e^{-Kt}$$

$$\ln R_t = \ln R_0 - Kt$$

In eq (a),  $R_t$  is the residue concentration at time  $t$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $R_0$  is the theoretical initial residue concentration at  $t = 0$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ),  $K$  is the fungicide decay constant, and  $t$  is the time of vinification steps. In eq (b),  $\ln R_0$  and  $K$  are constants, and  $\ln R_t$  and  $t$  are variables; the second one depends on the first.

This type of analysis allows the behaviour of fungicide residues during the winemaking process to be known, by showing the correlation that exists between the residual levels and the time and also the fungicide decay constants. These values of  $K$  represent the tendency of the residues of each fungicide to be reduced to a greater or lesser degree during the overall winemaking process, depending on factors such as degradation, adsorption on skins and lees or on clarifying agents, variety of grape, and winemaking method, among others.

In addition, it is also possible to study if the correlation existing between variables is more or less significant according to the statistical point of view. The following equation is then used

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

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. Two studies were carried out for each vinification, one for the alcoholic fermentation and another one for malolactic fermentation. The results of the fit are presented in Table 5 for the first one and Table 6 for the last one.

#### Pyraclostrobin

##### *Good Agricultural Practices*

The PHI was respected in the moment to carry out the vintage. A maximum of three applications at 12–14 day intervals, commencing at flowering are recommended for Cabrio Top and two for Bellis. These commercial formulations are unlikely to be applied within three months of harvest and therefore detectable residues of pyraclostrobin were not found in the harvested grapes.

##### *Critical Agricultural Practices*

To ensure the presence of pyraclostrobin residues

in grapes and to study their dissipation in the vinification process, Cabrio Top and Bellis were applied seven days before harvest during two years, 2008 and 2009 for the first one and 2009–2010 for the second one. Residual concentrations obtained in harvested grapes seven days after treatment ( $1358 \mu\text{g kg}^{-1}$  in 2008 and  $1567 \mu\text{g kg}^{-1}$  in 2009 for Cabrio Top;  $1044$  and  $1312 \mu\text{g kg}^{-1}$  for Bellis in 2009 and 2010, respectively) were below the MRL ( $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) established in the EU.

Once the must was pressed, the proportion remaining in the must was only 42–53%. Therefore this vinification step had a considerable effect on the decrease in these fungicide residues. In the following winemaking step, the fungicide residues continued to decrease; Pyraclostrobin showed a high tendency to be adsorbed, with only about 13–22% remaining in the obtained wine after 8 days of alcoholic fermentation.

Once alcoholic fermentation finished, malolactic fermentation took place producing a decrease of a 10–17% in pyraclostrobin residues. Residues remaining after this step (< 5% in both cases) disappeared with clarification (bentonite plus gelatin) and filtration process, the last two winemaking stages before bottling. Concentrations in final wines (Table 2 and Table 4) at the end of the sampling did not overcome the LOD for this fungicide in any case. These results are similar to those found in the bibliography. Studies carried out with this fungicide indicate that the elimination is practically 100% [22, 23].

The behaviour of Cabrio Top formulation in grapes was recently studied by González-Rodríguez et al. in two papers. In one of them [22], Cabrio Top (dose  $333 \text{ g hL}^{-1}$ ) was applied twice in may to prevent downy mildew and residues of pyraclostrobin were not detected in harvested grapes. In the second paper [14], one month after treatment with Cabrio Top (using a dose of  $200 \text{ g hL}^{-1}$ ), the residual concentration determined of pyraclostrobin was  $237 \pm 5 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Garau et al. [23], showed that pyraclostrobin residues in grapes were  $380 \pm 15 \mu\text{g kg}^{-1}$  one day after treatment with Cabrio Top (at  $150 \text{ g hL}^{-1}$ ); this level decreased to  $90 \pm 6 \mu\text{g kg}^{-1}$  after 28 days, according to a pseudo-first order kinetics with a half-life of  $5.4 \pm 1.9$  days.

##### *Kinetic study*

As can be seen from data of tables 5 and 6, the linear correlation between  $\ln R_t$  and the time was good in all assays, with correlation coefficients  $>0.9823$  for alcoholic fermentation and  $>0.9851$  for malolactic fermentation. Data obtained indicate that there was statistically significant correlation between the quantity of residues remaining and the time with  $t$  values  $>$  theoretical  $t$  value at the 95% confidence level ( $t_{(n=3)} = 3.18$  for alcoholic fermentation and  $t_{(n=4)} = 2.78$  for malolactic fermentation).

**Table 5.** Statistical parameters derived from the linear fit of the data during the time employed in alcoholic fermentation

Treatment	Fungicide	Year	Application	$r^2$	$K$	$t_{1/2}$ (days)	$t$
Cabrio Top	Pyraclostrobin	2008	CAP	0.9907	-0.1678	4.1	20.6
		2009	CAP	0.9922	-0.1208	5.7	22.8
Cantus	Boscalid	2008	GAP	0.9122	-0.0609	11.4	6.45
		2008	CAP	0.9496	-0.0227	30.5	8.68
		2009	GAP	0.9620	-0.0776	8.9	10.1
		2010	GAP	0.9951	-0.0711	9.1	13.4
Bellis	Pyraclostrobin	2009	CAP	0.9823	-0.1454	4.8	14.9
		2010	CAP	0.9950	-0.1249	5.6	28.2
	Boscalid	2009	GAP	0.9809	-0.0767	9.0	14.3
		2009	CAP	0.9823	-0.0365	19.0	14.9
		2010	GAP	0.9719	-0.0673	10.3	11.8
		2010	CAP	0.9777	-0.0325	9.1	13.2

$K$  values for alcoholic fermentation were similar in all cases, between different years and formulations. The same happened to the  $K$  values of malolactic fermentation.

The half-life, calculated as pseudo first-order kinetics, were very similar between both formulations: 4.1 and 4.7 under GAP; 5.7 and 5.6 under CAP for Cabrio Top and Bellis, respectively, for alcoholic fermentation. This indicates that pyraclostrobin decreased quickly, and it suggests that the residues in wine might be very low even after several treatments in field. In the case of malolactic fermentation, the obtained values for the half-time were higher (between 11.7 and 14.4 days).

#### *Boscalid*

##### *Good Agricultural Practices*

Cantus (50% boscalid) and Bellis were the commercial formulations used in treatment against grey mould. The first one was applied in August, 2008, 2009 and 2010 respecting the PHIs, 28 days and the second one. Residues due to the Cantus application ranged from 91.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (vinification in 2008) to 408  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (vinification in 2009), lower than its EU LMR (5000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), using a dose of 1.2  $\text{kg ha}^{-1}$  and around 90 days after treatment in 2008 and 2010 or 60 days in 2009. These values are not in agreement with those published by Gabriolotto et al. [24] who found  $260 \pm 180 \mu\text{g kg}^{-1}$  in grapes after 98 days of treatment with Cantus (dose 480  $\text{g ha}^{-1}$ ) or with González-Rodríguez who obtained boscalid residues ranged from 780  $\mu\text{g kg}^{-1}$  to 1200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  after 90 days of being treated with

300  $\text{g Cantus ha}^{-1}$  [23]. However, Edder et al. [25] determined a residual level of 410  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in grapes two months after treatment with a dose of 1.2  $\text{kg cantus ha}^{-1}$ , results very similar to those obtained in this paper (408  $\mu\text{g kg}^{-1}$  with an identical dose after 60 days approximately of treatment in 2009).

In the case of Bellis application, residue concentration values obtained in 2009 were 266  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 113  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in 2010.

After pressing, residues of boscalid distributed between the liquid phase (must) and the solid phase (pomaces), with approximately 60% of initial residues in this last one. In the following winemaking step, alcoholic fermentation, residues decreased an approximately 15% in all cases. Once the must was fermented and racked, the percentage eliminated by the malolactic fermentation was between 5-8%.

Clarification with gelatine plus bentonite as clarifying agents in winemaking process performed in this paper. Its main use in winemaking is the elimination of positively charged unstable proteins to prevent protein breakdown. For this study, an elimination of boscalid residues between 2-4% took place, very similar to filtration which produced a decrease of 1-3%. Concentrations in filtered red wines (Table 3) were 9-37  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of boscalid for Cantus application and 7-32  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in Bellis application. The % reduction when Cantus was used was very high all years, 90% in 2008 and 2010, 91% in 2009. The same value range was obtained when the treatment was carried out with Bellis (88% in 2009 and 94% in 2010). Identical results were obtained by González-Rodríguez et al. who found percentages of reduction during white winemaking process from 87% to 92%.



**Table 6.** Statistical parameters derived from the linear fit of the data during the time employed in malolactic fermentation

Treatment	Fungicide	Year	Application	$r^2$	$K$	$t_{1/2}$ (days)	$t$
Cabrio Top	Pyraclostrobin	2008	CAP	0.9948	-0.0568	12.2	27.7
		2009	CAP	0.9885	-0.0481	14.4	22.6
Cantus	Boscalid	2008	GAP	0.9523	-0.0126	55.0	8.94
		2008	CAP	0.9840	-0.0063	110	15.7
		2009	GAP	0.9770	-0.0100	69.3	13.0
		2010	GAP	0.9827	-0.0153	45.3	15.1
Bellis	Pyraclostrobin	2009	CAP	0.9911	-0.0615	11.7	21.1
		2010	CAP	0.9851	-0.0543	12.8	16.3
	Boscalid	2009	GAP	0.9738	-0.0122	56.8	12.2
		2009	CAP	0.9471	-0.0095	73.0	8.46
		2010	GAP	0.9355	-0.0150	46.2	7.62
		2010	CAP	0.9824	-0.0059	117	14.9

#### Critical Agricultural Practices

To ensure the presence of boscalid residues in grapes and to study their dissipation in the vinification process, Cantus was applied seven days before harvest the first year of this study, 2008. Next years were not necessary due to boscalid residues were detected in grapes treated under GAP. For Bellis, this formulation was applied two years under CAP in order to ensure the presence of pyraclostrobin in the vinification process, not for boscalid. Concentrations obtained in grapes were high, 3383  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in 2008 (Cantus), 3201  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in 2009 (Bellis) and 3527  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in 2010 (Bellis) (below the MRL, 5000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) but decreased quickly to 1592  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 1376  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 1622  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively, after pressing. The % reduction was approximately between 7-10% and 5-8% in alcoholic and malolactic fermentations, respectively. Clarification and filtration steps led to a reduction of the remaining residues in 5-6% and 1-2%, respectively. The vinification process allowed, in this case, the dissipation of boscalid residues in high percentage (75-81%) but lower than those obtained with treatments respecting the PHIs.

#### Kinetic study

As can be seen from data of tables 5 and 6, the linear correlation between  $\ln Rt$  and the time was good in all assays, with correlation coefficients  $>0.9122$  in alcoholic fermentation and  $> 0.9355$  for malolactic fermentation. Data obtained indicate that there was statistically significant correlation between the quantity of residues remaining and the time with  $t$  values  $>$  theoretical  $t$  value at the 95% confidence level ( $t_{(n-3)} = 3.18$  for alcoholic fermentation and  $t_{(n-4)} = 2.78$

for malolactic fermentation).

$K$  values for alcoholic fermentation were higher (approximately 5 times) than those obtained for the malolactic fermentation showing that the first one produced a higher dissipation of boscalid residues. The values for both fermentations were similar during the three years depending on the application, GAP or CAP, but regardless of the formulation used for the treatment. Therefore,  $K$  values for alcoholic fermentation ranged between 0.0609  $\text{days}^{-1}$  to 0.0776  $\text{days}^{-1}$  for GAP and from 0.0227  $\text{days}^{-1}$  to 0.0365  $\text{days}^{-1}$  under CAP. In the case of malolactic fermentation, the obtained values were: 0.010-0.0153  $\text{days}^{-1}$  according GAP and 0.0059-0.0095  $\text{days}^{-1}$  under CAP. Therefore, it can be observed una relación inversamente proporcional entre la velocidad de decaimiento de los residuos de boscalid y la concentración inicial encontrada en mosto; a mayor concentración, menores valores de  $K$  se obtienen.

#### Effects of clarification process on fungicides elimination

The effects of five clarification agents (egg albumin, bentonite plus gelatin, charcoal, PVPP, and silica gel) on the removal of boscalid and pyraclostrobin residues applied directly to a racked red wine were studied.

The egg albumin removes a large number of phenols and mellows the rich wines in astringent tannins. Compared to other clarifying agents, it offers the advantage of not modifying the sensory qualities. However, it is not as widely uses as other clarifying agents [26].

**Table 7.** Effect of clarification agents on fungicide concentration

Clarifying substance	Commercial name	Dose	% ± SD pyraclostrobin (46 µg L <sup>-1</sup> )	% ± SD pyraclostrobin (492 µg L <sup>-1</sup> )	% ± SD boscalid (53 µg L <sup>-1</sup> )	% ± SD boscalid (516 µg L <sup>-1</sup> )
Egg albumin	Ovovin	15 g hL <sup>-1</sup>	26.5 ± 2.1	29.6 ± 1.2	18.8 ± 2.1	16.5 ± 1.7
Bentonite + Gelatin	Maxibent G Stargel	50 g hL <sup>-1</sup> + 10 ml hL <sup>-1</sup>	34.0 ± 3.6	38.3 ± 4.3	22.0 ± 1.8	23.7 ± 1.2
Charcoal	Croer F-10X	50 g hL <sup>-1</sup>	84.2 ± 3.7	82.9 ± 2.0	74.6 ± 6.6	78.0 ± 5.1
PVPP	Divergan	50 g hL <sup>-1</sup>	20.1 ± 1.3	20.9 ± 0.8	24.9 ± 3.1	23.3 ± 1.3
Silica gel	Silisol	70 mL hL <sup>-1</sup>	10.7 ± 1.7	12.2 ± 2.4	11.0 ± 1.6	9.1 ± 1.1

Bentonite is a natural clay consisting of aluminium and silicon oxides [27]. The surface area is negatively charged, allowing for ion exchange and other electrostatic interactions. Its main use in winemaking is the elimination of positively charged proteins, because this is, today, the only efficient system to prevent protein breakdown, and hence its stabilizing effect through the removal of unstable proteins from the wine is more important than the clarification it produces. It is, therefore, used with gelatin to enhance the clarifying action [28, 29]. Gelatin should never be used alone because it leads to a slight enrichment of proteins, especially in low tannin content wines (white wines) [26].

Charcoal does not produce flocculation of the colloids, which cause the cloudiness. Its use produces decoloring and deodorizing wines, although it has a high affinity for benzenoid and nonpolar substances [30].

PVPP is a synthetic, high molecular weight, cross-linked polymer of poly(vinylpyrrolidone), and its mechanism of absorption is through hydrogen bonding between the carbonyl groups of the polyamide and phenolic hydrogens [31]. The interest in PVPP for winemaking lies in the specific nature of its action on the polyphenols in wine, to the extent that due to its insolubility in hydroalcoholic media its application is aimed at the removal of those phenol compounds which produce, through condensation, oxidative alterations in wine (catechins and other flavonoids).

Thus, it affects both taste and hue, lessening the sharpness and browning in white wines and highlighting the hue of red wines of excessive tannin content [26].

Finally, silica gel shows high capacity to fix tannin substances and polyphenols that cannot be removed by other clarifying agents [31].

Table 6 shows the doses applied and the elimination percentages of pyraclostrobin and boscalid at two concentration levels (50 µg kg<sup>-1</sup> and 500 µg kg<sup>-1</sup> approximately) corresponding to each clarification

agent. Percentages were calculated by taking as 100% the total amount of residues present in the nonclarified wine.

From the data, the order of effectiveness of the different clarifying agents on the two fungicides was as follows:

#### *Pyraclostrobin*

Charcoal > bentonite + gelatine > egg albumin > PVPP > silica gel

#### *Boscalid*

Charcoal > PVPP ≈ bentonite + gelatine > egg albumin > silica gel

The most effective clarifying agent for both pesticides was charcoal and, on the other hand, silica gel proved to be insufficient to reduce significantly the residual contents of fungicides.

It should be taken into account that the use of charcoal has important drawbacks, such as losses of compounds responsible of the aroma and colour in wine. Similar happens for PVPP, affecting the taste and hue of wine. Therefore, the best option is the use of bentonite and gelatine for both pesticides because these clarifying agents reduce the boscalid and pyraclostrobin contents and do not generate the drawbacks describe above.

#### **Conclusions**

After treatments with three commercial formulations, Cabrio Top, Cantus and Bellis, under GAP and CAP, the residue levels of boscalid and pyraclostrobin were under the MRLs. No effect on the alcoholic or malolactic fermentation was observed, even in the presence of higher concentrations than those found in the grapes treated under critical agricultural practices at harvest time.

According to the results of this study, both new fungicides showed a continuous decrease throughout



---

the red winemaking process. High adsorption onto pomaces from must was observed for boscalid and pyraclostrobin. Data showed that pyraclostrobin could be used to produce wine free of detectable amount of residues and boscalid showed an elimination percentage between 75% and 90%.

Results of clarification test showed that bentonite plus gelatine is the best clarifying agent for these pesticides, leading to a high elimination without drawbacks in wine.

#### Acknowledgements

The authors want to thank the Government of La Rioja for the project ANGI 2004/18, INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), MEC/FEDER for the project AGL2005-02313/ALI project and the University of La Rioja for the FPI grant given to Laura Lagunas-Allué.

#### References

- [1] Coscollá R (2004) Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada, 5ª Edición, Ed. Mundi-Prensa, 329-355.
- [2] European Commission, Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Off J L230:1-194 (1991).
- [3] C. Q. Zhang, S. K. Yuan, H. Y. Sun, Z. Q. Qi, M. G. Zhou, G. N. Zhu. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid, Plant Pathology 56, Issue 4, 646-653, 2007.
- [4] Dave W Bartlett, John M Clough, Jeremy R Godwin, Alison A Hall, Mick Hamer and Bob Parr-Dobrzanski. The strobilurin fungicides, Pest. Manag. Sci 58, 649-662 (2002).
- [5] Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Pirisi, F.M., Farris, G.A., Madau, G., Emonti, G. "Pesticides in fermentative processes of wine", Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (1999), 3854-3857.
- [6] Calhella, R.C., Andrade, J.V., Ferreira, I.C., Estevinho, L.M. "Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process", Food Microbiology 23 (2006), 393-398.
- [7] Real Decreto 198/2000 de 11 de Febrero, del Ministerio de la Presidencia, por el que se modifica el RD 280/1994, de 18 de Febrero, por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal (BOE N° 39, de 15/02/2000).
- [8] Real Decreto 280/1994 de 18 de Febrero, del Ministerio de la Presidencia, por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal (BOE N° 58, de 9/03/1994).
- [9] Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.
- [10] Decreto del Ministerio del Trabajo, della Salute e delle Politiche Sociali—23 luglio 2008. Prodotti fitosanitari: aggiornamento del decreto del Ministro della salute 27 agosto 2004 concernente i limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione. Diciannovesima modifica (pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 265 del 12 novembre 2008).
- [11] Decreto del Ministero della Salute—19 aprile 2006. Prodotti fitosanitari: recepimento delle direttive 2005/70/CE, 2005/74/CE e 2005/76/CE della Commissione e aggiornamento del decreto del Ministro della salute 27 agosto 2004 concernente i limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione (pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 162 del 14 luglio 2006).
- [12] Ordonnance du DFI sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC, RS 817.021.23) du 26 juin 1995 (Etat le 1er janvier 2009).
- [13] Angioni, A.; Dedola, F.; Garau, V.L.; Schirra, M., Caboni, P. (2011). Fate of iprovalicarb, indoxacarb, and boscalid residues in grapes and wine by GC-ITMS Analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (12), pp. 6806-6812.
- [14] González-Rodríguez, R.M.; Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2009). Efficacy of new commercial formulations to control downy mildew and dissipation of their active fungicides in wine after good agricultural practices. Journal of the Science of Food and Agriculture 89 (15), 2625-2635.
- [15] Fernández, M.J.; Oliva, J.; Barba, A.; Cámara, M.A. (2005). Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 804-811.
- [16] Čuš F and Raspor P, The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts. Lett Appl Microbiol 47:54-59 (2008).
- [17] Zara, S; Caboni, P.; Orro, D.; Farris, G.A.; Pirisi, F.; Angioni, A. (2011). Influence of fenamidone, indoxacarb, pyraclostrobin and deltamethrin on the population of natural yeast microflora during winemaking of two sardinian grape cultivars. J. of Environmental Science and Health-Part B Pesticides,

- 
- Food Contaminants and Agriculturas Wastes 46 (6), pp. 491-497.
- [18] Oliva, J.; Barba, A.; San Nicolás, F.T. & Payá, P. (2005). Efectos de residuos de fungicidas en la composición fenólica de vinos tintos (var. Monastrell). *Tecnología del vino*, 23, 37-40.
- [19] García MA, Oliva J, Barba A, Cámara MA, Pardo F and Díaz-Plaza EM. Effect of fungicide residues on the aromatic composition of White wine inoculated with three *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Agric Food Chem* 52:1241–1247 (2004).
- [20] Timme, G.; Frehse, H. Statistical Interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. *Pflanzenschutz Nachr. Bayer* 1980, 33, 47-60.
- [21] Miller JN, Miller JC. (2002). *Estadística 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.
- [22] González-Rodríguez, R.M.; Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2011). Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new active substances against downy mildew. *Food Chemistry* 125, 549-560.
- [23] Garau, V.L., De Abreu, S.M., Caboni, P., Angioni, A., Alves, A., Cabras, P. Residue-free Wines: Fate of Some Quinone outside Inhibitor (QoI) Fungicides in the Winemaking Process. *J Agr Food Chem*. 57 (2009), pp. 2329-2333.
- [24] Gabriolotto C, Monchiero M, Nègre M, Spadaro D, Gullino ML. (2009). Effectiveness of control strategies against *Botrytis cinerea* in vineyard and evaluation of the residual fungicide concentrations. *J. Environ. Sci Health B*. 44: 389-396.
- [25] Edder P, Ortelli D, Viret O, Cognard E, De Montmollin A, Zali O. 2009. Control strategies against grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.:Fr) and corresponding fungicide residues in grapes and wines. *Food Addit Contam A*. 26:719-725.
- [26] Molina Úbeda, R. *Teoría de la Clarificación de Mostos y Vinos y sus Aplicaciones Prácticas*; Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 2000.
- [27] Leske, P. A.; Bruer, N. G. C.; Capdeboscq, V. An evaluation of some characteristics of commercial bentonites. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 1995, 10, 73-77.
- [28] Peynaud, E. *Procédés de stabilisation des vins*. In *Connaissance et Travail du Vin*; Peynaud, E., Ed.; Dunod: Paris, France, 1983.
- [29] Girard, G. *Bases Scientifiques et Technologiques de l'oenologie*; Technique et Documentation-Lavoisier: Paris, France, 2001.
- [30] Boulton, R. B.; Singleton, V. L.; Bisson, L. F.; Kunkee, R. E. *Principles and Practices of Winemaking*; Chapman and Hall: New York, 1996.
- [31] Doner, L. W.; Be'card, G.; Irwin, P. L. Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 753-757.
-



**ANEXO VII. Hydrolysis and photolysis of pyraclostrobin  
in water**

---





---

## HYDROLYSIS AND PHOTOLYSIS OF PYRACLOSTROBIN IN WATER

L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria\*

*Departamento de química analítica. Universidad de La Rioja. Madre de dios, 51. La rioja, 26006, Spain.*

---

### Abstract

The hydrolysis and photolysis of the pesticide pyraclostrobin [2-Chloro-N(4'-chloro-biphenyl-2-yl)-nicotinamide] in aqueous solutions were assessed under controlled conditions in this study. Experimental results for hydrolysis showed that pyraclostrobin was not stable at high temperatures and basic aqueous solutions.

By continuous exposure to light at  $\lambda > 295$  nm from a xenon arc lamp, pyraclostrobin was rapidly photodegraded with half-life-time of 74-94 min, mainly due to the scission of the 4-hydroxyphenyl and pyrazol bond (N-C bond). The rate of photodecomposition of pyraclostrobin in aqueous solutions followed first-order kinetics at different pHs. Under hydrolysis conditions, only one photoproduct was obtained via C-O (ether group) cleavage. In the case of the photolysis, three major photoproducts were detected and tentatively identified according to UPLC-MS/MS spectral information. The photoproduct of hydrolysis was found in the photolysis process which means that both processes coexisted.

The corresponding photolysis pathway of pyraclostrobin was also proposed. The results obtained indicate that hydrolysis and direct photoreaction are important dissipation pathways of pyraclostrobin in natural water systems.

Keywords: *Hydrolysis, Photolysis, Photoproducts, pathway, water*

---

### 1. Introduction

The increasing production and application of pesticides has caused the pollution of air, soil, ground and surface water which involves a serious risk to the environment as well as to human health. Therefore it has consequently led to increasing concern about the environmental fate of these substances. However, the study of their fate and even their removal from environmental compartments appear to be urgent ecological problems which have to be seriously undertaken.

The principal degradation pathways for pesticides involve photolysis, hydrolysis, dehalogenation and oxidation (Lartiges and Garrigues 1995, Sanz-Asensio et al., 1997, 1999, Vink, 1996). Photochemical degradation is one of the major transformation processes and one of the factors controlling the fate of pesticides and other chemicals in the environment. In the surface layers of aquatic systems, hydrolysis and photochemical reactions can play dominant roles in the conversion and degradation of pesticides. It is then of great interest to know to what extent they can be degraded by such unavoidable processes and to elucidate the by-products that are photogenerated and which can be more harmful than the parent substrate. Several pesticides absorb solar light ( $\lambda > 295$  nm) and can therefore undergo direct photochemical dissociation leading to the formation of various by-products.

It has been demonstrated that the use of different light sources (natural summer sunlight, the suntest apparatus and mercury lamps) under identical aqueous conditions, produces similar degradation products, the

only difference being the kinetics of formation as demonstrated by Chukwudebe et al., 1989, De Bertrand and Barceló, 1991. Natural sunlight photodegradation processes are usually compared with those obtained under controlled conditions, generally using a xenon arc lamp (Chiron et al., 1995, Kochany and Maguire, 1994). These studies allow the modelling of pesticide behaviour after its applications in order to obtain information about the degradation kinetic and half-life and to increase the information available about the degradation products that can be formed under natural conditions.

Pyraclostrobin [methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yloxy)methyl] phenyl}(N-methoxy) carbamate] is a completely new active ingredient belonging to the strobilurins group of fungicides. These kind of fungicides act through inhibition of mitochondrial respiration by blocking electron transfer within the respiratory chain, which in turn causes important cellular biochemical processes to be severely disrupted, and results in cessation of fungal growth. Pyraclostrobin is recommended for the prevention and treatment of powdery mildew and downy mildew in fruit plants and vines.

No data were available for hydrolysis and photolysis of this pesticide in scientific literature.

---

Corresponding author. Phone: (+34) 941 299 629  
E-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es (M.Martínez-Soria)



The present study investigates the photodegradation of the pesticide pyraclostrobin, in aqueous solutions in controlled conditions, using HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector) and UPLC-MS/MS (Tandem Mass Spectrometry) detection to study the photodegradation behaviour and degradation kinetics. Xenon arc lamp irradiation was used. The UPLC-MS/MS system was used in order to determine and identify photoproducts in the solution. Determination of photoproducts permitted the identification of the possible pathways of pyraclostrobin.

## 2. Experimental

### Materials and reagents

Pyraclostrobin, purity >99%, were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany).

HPLC grade methanol was obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Fomic acid and acetonitrile (MS grade, 99% purity) were purchased from Aldrich. Water for HPLC was obtained with a Milli-Q water purification system (Millipore). Other reagents were at least of analytical grade.

Polyvinylidene fluoride (PVDF) filters 0.45 µm were purchased from Sigma Aldrich (Seelze, Germany).

### Solutions

Standard solution containing approximately 1 mg L<sup>-1</sup> (determined by the solubility in water, 1.9 mg L<sup>-1</sup> at 20°C) of pyraclostrobin in water was prepared, protected from light and stored at 4 °C.

Four buffer solutions (pH at 3.6 ± 0.1, 6.2 ± 0.1, 9.2 ± 0.1 and 12.0 ± 0.1) were used to study the hydrolysis of the fungicide. Buffer solutions were prepared as described by Morrica et al., 2001.

### Hydrolysis and Photolysis experiments

#### Hydrolysis Study

Triplicate 40 ml buffer solution samples (pH at 3.6 ± 0.1, 6.2 ± 0.1, 9.2 ± 0.1 and 12.0 ± 0.1), each containing approximately 1 mg L<sup>-1</sup> of pyraclostrobin, were stored in the dark at three different temperatures (4°C, 25°C and 50°C ± 2°C) in erlenmeyer flasks to test the effects of pH and temperature on hydrolysis. Initially, the starting concentration was determined. Samples (0.5 ml) were taken from each bottle at day 5, 10, 15, 30 and 60 and quantified by HPLC-DAD without concentration.

#### Photolysis Study

In the photolytic degradation study, an Oriol solar simulation unit (Oriol, Stratford, USA) with a 150 W Xe arc lamp was used. This system has been

previously reported for pesticide photodegradation studies, under controlled conditions, with similar results to solar photodegradation (Sanz-Asensio et al., 1997). The Xe arc lamp was set to a power of 40 W.

The sample was placed in a quartz cell of 25 ml capacity, at 5 cm from the source and the radiation was directed to the centre of the cell.

A volume of 25 mL of different buffer solutions (pH 3.6, 6.2 and 12.0) of pyraclostrobin were input into the quartz cell and irradiated with the xenon lamp. Experiments were conducted at room temperature (25°C ± 2°C) and kept in the total absence of light except for the source. The initial concentration of pesticide in aqueous solutions (buffer solutions) was approximately 1 mg L<sup>-1</sup>. At specific time intervals between 0.5 and 6 h, samples of 0.5 mL were withdrawn from the reactor, filtered and analyzed by HPLC-DAD.

### Kinetic parameters

To determine the fungicide degradation rate by hydrolysis and photolysis, the experimental data have been fitted to the following mathematical model:

$$C_t = C_0 e^{-Kt}$$

$$\ln C_t = \ln C_0 - Kt$$

where  $C_t$  is the residue concentration (µg g<sup>-1</sup>) at time  $t$  (days);  $C_0$  is the theoretical initial residue concentration (µg g<sup>-1</sup>) at  $t = 0$ ;  $K$  is the fungicide sorption constant; and  $t$  is the time that grapes have been in contact with the solution. Therefore by using the adjustment slope the degradation constants and half-lives for the different conditions tested were obtained. For hydrolysis, the kinetic parameters were calculated only for those experiments that showed that degradation of pyraclostrobin over 60 days.

### Identification of intermediates

In the hydrolysis experiments that showed degradation, the samples were injected directly into UPLC-MS/MS for the identifying the intermediates without a concentration of the sample being necessary. In photolysis degradation, 25 ml aqueous solutions of pyraclostrobin at different pH 3.6, 6.2 and 12.0 were irradiated under light for 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 and 6 h. The degraded solutions (25 ml each) were evaporated under vacuum to dryness using a rotary evaporator Heidolph VV 2000 (Kelheim, Germany) and the residues were dissolved in 1 ml of methanol and the residues were dissolved in 1 ml of methanol. The solutions were then concentrated 25 times. Different fractions obtained were analyzed by UPLC-MS.

**Table 1.** Dissipation of pyraclostrobin at 4 ± 2 °C, 25 ± 2 °C and 50 ± 2 °C in aqueous buffer solutions

Pyraclostrobin (mg L <sup>-1</sup> )												
4°C ± 2°C					25°C ± 2°C				50°C ± 2°C			
Days	pH 3.6	pH 6.2	pH 9.2	pH 12.0	pH 3.6	pH 6.2	pH 9.2	pH 12.0	pH 3.6	pH 6.2	pH 9.2	pH 12.0
0	0.95	0.98	0.99	0.92	0.95	0.98	0.99	0.92	0.95	0.98	0.99	0.92
5	0.89	0.94	0.95	0.71	0.91	0.89	0.92	ND	0.93	0.52	0.47	ND
10	0.94	0.93	0.93	0.33	0.96	0.87	0.93	ND	0.95	0.20	0.19	ND
15	0.93	0.95	0.93	0.15	0.96	0.90	0.95	ND	0.93	0.08	0.07	ND
30	0.92	0.93	0.88	ND	0.93	0.92	0.89	ND	0.91	ND	ND	ND
60	0.92	0.93	0.89	ND	0.92	0.88	0.85	ND	0.91	ND	ND	ND

ND (&lt;LOD = 0.05 mg/L)

#### Analytical determination

**HPLC–DAD analysis:** The primary degradation of pyraclostrobin was analyzed by HPLC–DAD. The analytical column used was a Nucleosil C<sub>18</sub> (150mm×4.6mm, 5µm). The flow rate was 1.0 ml min<sup>-1</sup> and the injection volume was 20 µL. The isocratic elution conditions were methanol/water (70:30, v/v), wavelength, 275 nm.

**HPLC–MS/MS analysis:** The identification of intermediates was performed by UPLC–MS/MS. Analyses were carried out using a Waters Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA). The chromatographic separation of 9 µL sample was performed on an Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm particle size, Waters) by fixing the column heater at 40 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and water (B) both containing 0.1% formic acid with the flow rate at 0.4 ml min<sup>-1</sup> and employing a linear gradient from 5% to 95% A in 6 min, maintained there for 0.50 min and then decreased from 95% to 5% A in 0.1 min, kept at 5% A and finally up to 8 min for reequilibration.

TOF–MS was conducted using a microTOF–Q™ (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) orthogonal-accelerated TOF mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) interface. The parameters for analysis were set using positive ion mode with spectra acquired over a mass range of 50–1000 m/z. For confirmation of the fragmentation and the study of the metabolites samples were analyzed by MS/MS Auto. The other optimum values of the ESI–MS parameters were: capillary voltage, -4500 V in positive, end plate offset voltage, -500 V, dry gas (N<sub>2</sub>) temperature, 185 °C, dry gas flow, 9.0 L min<sup>-1</sup>, nebulizer pressure, 2.0 bar, and spectra rate 2Hz. The flow delivered into the MS detector from HPLC system. The calibrant was a sodium-formate cluster containing 5mM sodium hydroxide and 0.2% formic acid in water–methanol (1:1, v/v), injected at the

beginning of each run with a KDS-100 CE (KDSscientific) syringe pump (Holliston, MA, USA) directly connected to the interface.

All the spectra were calibrated prior to compound identification. All operations were controlled by DataAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonik), which provided a list of possible elemental formulas by using the GenerateMolecularFormula™ Editor.

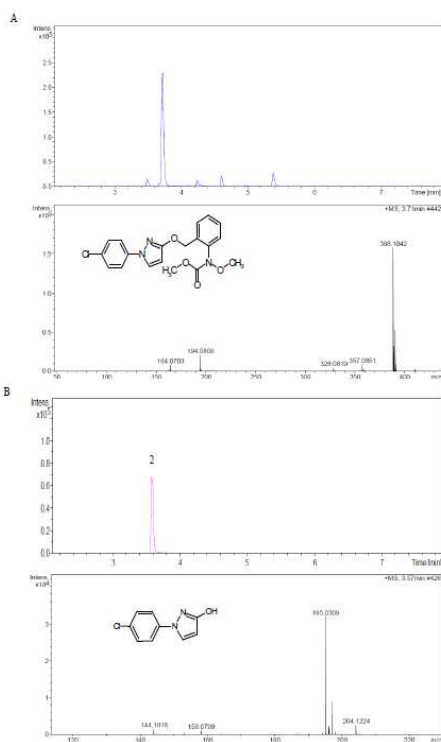
#### Results and discussion

##### Hydrolysis

The degradation of pyraclostrobin in aqueous solution in the absence of light (hydrolysis) at different temperatures was monitored at different pH values. Data observed at different pH and temperatures are presented in Table 1. Significant variations could be observed in degradation with respect to pH and temperature.

The results indicated that pyraclostrobin has substantial chemical stability at acid pH at all studied temperatures. However, at pH 12, the compound disappears regardless of temperature, indicating that at a very alkaline pH hydrolysis is more likely to occur. Hydrolysis is increased at higher temperatures (50 °C) even at neutral pH (pH = 6.2).

The kinetic parameters obtained through the study of the conditions that caused degradation of pyraclostrobin (4 °C at pH 12, 50 °C at pH 6.2, 50 °C at pH 9.2) are summarized in Table 2. All cases show a good linear fit with correlation coefficients between 0.959 and 0.996. The degradation kinetic constant increased with pH and temperature. The half-lives were determined using the equation:  $t_{1/2} = \ln 2/k$  and ranged from 5776 to 7701 min in buffer solutions at different pH. When both parameters were high (50 °C and pH 12) hydrolysis caused degradation > 99% of pyraclostrobin in less than 5 days, resulting in



**Figure 1.** LC-MS chromatograms and MS spectrum of A) pyraclostrobin and B) hydrolysis photoproduct with  $m/z=195$  ( $M+1$ ).

insufficient data being recorded for a kinetic study.

This means that the hydrolytic processes of pyraclostrobin plays an important role during the course of the photolysis experiment.

As regards the study of by-products of hydrolysis, only one photoproduct  $m/z = 195$  ( $M+1$ ) chlorinated was found in all.

#### Photolysis

Under photolysis conditions, the kinetics of the investigated pesticide followed an apparent first-order degradation model. Table 2 lists the values of  $k$  and the linear regression coefficients for first-order kinetics of the photodegradation of the studied compound. All cases studied show a good linear fit with correlation coefficients between 0.991 and 0.994. The results obtained showed a 90% degradation of pyraclostrobin at acid, neutral and basic pH after 300 min, 270 min and 240 min of irradiation, respectively (Figure 2). As can be seen in the inset in Fig.2, the logarithm of the ratio of the initial concentration ( $C_0$ ) to the concentration at a given time ( $C$ ) versus time ( $t$ ) is plotted. Pyraclostrobin degradation at acid, neutral and basic pH followed a pseudo first order kinetic with half-lives ranged from 74 to 92 min in buffer solutions at different pH. The results indicated that the degradation rate decreased with a decrease in pH, and it proceeded faster under an alkaline pH.

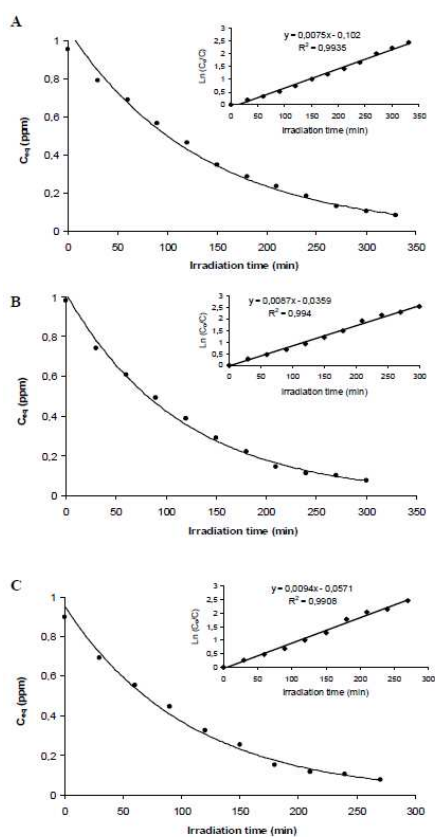
The degradation products obtained were the same regardless of the solution pH and were tentatively identified by studying their mass spectra. Molecular weights of photoproducts were determined by full scan analysis in positive electrospray ionization acquisition mode. Figure 3 shows the single ion monitoring (SIM) trace in positive ionspray of the pyraclostrobin and the 4 major intermediates detected and subsequently identified by interpretation of their MS spectra. These compounds are summarized in Table 3 together with their LC-MS retention times, molecular weights and structure.

**Table 2.** Hydrolysis and photolysis kinetic parameters

Hydrolysis								
4°C, pH 12.0			50°C, pH 6.2			50°C, pH 9.2		
$k \times 10^5$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$	$k \times 10^5$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$	$k \times 10^5$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$
9.0	7701	0.959	11.0	6301	0.993	12.0	5776	0.996
Photolysis								
pH 3.6			pH 6.2			pH 12.0		
$k \times 10^3$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$	$k \times 10^3$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$	$k \times 10^3$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$
7.5	92	0.994	8.7	80	0.994	9.4	74	0.991

Rate constants ( $k$ ), correlation coefficients ( $r^2$ ) and half times ( $t_{1/2}$ )





**Figure 2.** Photolysis degradation of pyraclostrobin at pH 3.6 (A), at pH 6.2 (B) and at pH 12.0 (C). The insets show the linear transform of the integrated first-order kinetics.

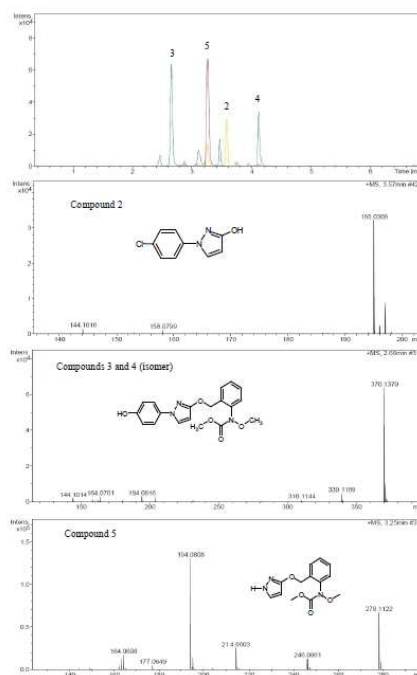
Based on the structures of photoproducts, a possible degradation pathway of photolysis for pyraclostrobin could be proposed (Figure 4). In addition, it can be observed that two different processes took place at the same time. Then, the intermediates were obtained by two different ways:

The compound 2 was obtained through hydrolysis which occurs at the same time as photolysis. Figure 4.B shows that its concentration increases slightly over the first 3 hours of degradation and then it decreases. The other intermediates were obtained by direct photolysis of pyraclostrobin consisted of the

substitution of chloride for an -OH group and an isomer (compounds 3 and 4) which reached their maximum concentration around 1 h and then decreased slightly. The scission of the 4-hydroxyphenyl and pyrazol bond (N-C bond) led to the formation of compound 5 which reached its maximum concentration around 1.5 h according to Fig.4.B.

The results were compared with other studies concerning strobilurin degradation. Thus through hydrolysis, azoxystrobin (Boudina et al., 2007) and trifloxystrobin (Jingyu Chen et al., 2008) showed hydrolytic ether cleavage, the same split occurs in pyraclostrobin by means of hydrolysis and compound number 2 is obtained.

Furthermore, in the pyraclostrobin degradation using TiO<sub>2</sub> as a catalyst, subproducts 3, 4 and 5 appeared, this means that the subproducts obtained through this photocatalytic pathway (Lagunas-Allué et al., 2012) were the same as the ones obtained by photolysis.

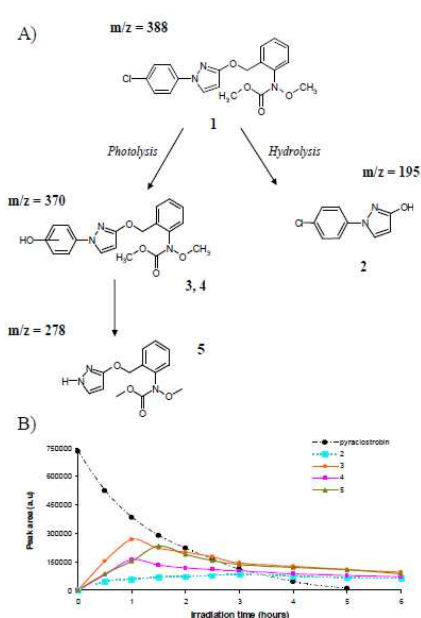


**Figure 3.** LC-MS chromatogram of the mayor intermediates and MS spectrum of compounds 2  $m/z=195$  ( $M+1$ ), compounds 3 and 4  $m/z=370$  ( $M+1$ ) and compound 5  $m/z=278$  ( $M+1$ ).

**Table 3.** Mass spectra data and structures of identified intermediates by LC-MS for irradiated pyraclostrobin

Structure	N°	Retention time (min)	M <sub>r</sub>	Fragment (Intensity)
	1	3.7	388	388 <sup>#</sup> (100) 194 (14) 164 (6) 357 <sup>#</sup> (5) 328 <sup>#</sup> (3)
	2	3.6	195	195 <sup>#</sup> (100) 144 (6) 158 (3)
	3	2.7	370	370 (100) 339 (8)
	4	4.1	195	195 (5) 164 (5)
	5	3.2	278	194 (100) 278 (52) 214 (20) 246 (10) 163 (10) 164 (12)

<sup>#</sup> fragments with chloride



**Figure 4.** (A) Photolytic degradation pathway of pyraclostrobin. (B) Evolution of the photoproducts during degradation of pyraclostrobin.

The only difference was the rate of degradation and formation of intermediates, higher in the presence of the catalyst.

#### Conclusions

The hydrolysis and photolysis studies carried out on pyraclostrobin in aqueous solution have enabled us to better understand the behaviour of this fungicide. Results obtained in this study demonstrate that the dark hydrolysis of pyraclostrobin was strongly affected by pH and temperature. Degradation at high temperatures and basic pH was faster than at low temperatures and acid pH. This also means that the hydrolytic processes of pyraclostrobin plays an important role during the course of the photolysis experiment although the degradation constants obtained were about 100 times smaller than those obtained for the photolytic process.

The rate of photodecomposition of aqueous solutions of pyraclostrobin followed first-order kinetics. The degradation rates are faster under basic pH with the half-lives between 74 and 92 min.

In the case of hydrolysis, only one photoproduct was detected and obtained due to the cleavage of C-O of the ether group and breaking the pyraclostrobin molecule in two moieties. In case of photolysis, 4 photoproducts were identified, being one of them, the same photoproduct of hydrolysis process. It means hydrolysis took place at the same time as photolysis. From the photoproducts above, photolysis pathway was understood that degradation primarily preceded by

---

the loss of chloride and the scission of the 4-hydroxyphenyl and pyrazol bond (N-C bond).

#### Acknowledgements

The authors want to thank the MEC/FEDER for the project AGL2005-02313/ALI, MICINN for the project AGL2011-030378-C03-02 and the University of La Rioja for the FPI grant given to Laura Lagunas-Allué.

#### References

- Boudina, A., Emmelin, C., Baaliouamer, A., Paissé, O., Chovelon, J.M., 2007. Photochemical transformation of azoxystrobin in aqueous solute. *Chemosphere*. 68, 1280–1288.
- Chiron, S., Abian, J., Ferrer, M., Sanchez-Baeza, F., Messegeur, A., Barceló, D., 1995. Comparative photodegradation rates of alachlor and bentazone in natural water and determination of breakdown products. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1287-1298.
- Chukwudebe, A., March, R.B., Othman, M., Fukuto, T.R., 1989. Formation of trialkyl phosphorothioate esters from organophosphorus insecticides after exposure to either ultraviolet light or sunlight. *J. Agric. Food Chem.* 37, 539-545.
- De Bertrand, N., Barceló, D., 1991. Photodegradation of the carbamate pesticides aldicarb, carbaryl and carbofuran in water. *Anal. Chim. Acta.* 254, 235-244.
- Jingyu Chen, Binh Loo, Chittaranjan Ray., 2008. Determination of trifloxystrobin and its metabolites in Hawaii soils by ASE-LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1829–1837.
- Kochany, J., Maguire, J., 1994. Sunlight photodegradation of metolachlor in water. *J. Agric. Food Chem.* 42, 406-412.
- Lagunas-Allué, L., Martínez-Soria, M.-T., Sanz-Asensio, J., Salvador, A., Ferronato, C., Chovelon, J.M., 2012. Degradation intermediates and reaction pathway of pyraclostrobin with TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Appl. Catal. B Environ.* 115-116, 285-293.
- Lartiges, S. B. , Garrigues, P. P., 1995. Degradation kinetics of organophosphorus and organonitrogen pesticides in different waters under various environmental conditions. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1246-1254.
- Morrica, P., Barbato, F.R., Iacovo, R.D., Seccia, S., Ungaro, F., 2001. Kinetics and mechanism of imazosulfuron hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3816–3820.
- Sanz-Asensio, J., Plaza-Medina, M., Martínez-Soria, M.T., 1997. Kinetic Study of the Degradation of Ethiofencarb in Aqueous Solutions. *Pestic. Sci.* 50, 187-194.
- Sanz-Asensio, J., Plaza-Medina, M., Martínez-Soria, M.T., Pérez-Clavijo, M., 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.
- Vink, J.P. M., 1996. Some physicochemical and environmental factors affecting transformation rates and sorption of the herbicide metamitron in soil. *Pestic. Sci.* 46, 113-119.



**ANEXO VIII. Photodegradation of boscalid in water**

---





---

## PHOTODEGRADATION OF BOSCALID IN WATER

L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria\*

*Departamento de química analítica. Universidad de La Rioja. Madre de dios, 51. La rioja, 26006, Spain.*

---

### Abstract

In this study the hydrolysis and photolysis of the fungicide boscalid in aqueous solutions were assessed under controlled conditions. The results of the hydrolysis experiment showed that boscalid is quite stable in aqueous solutions in the dark and with no significant variations observed in degradation under various conditions. Boscalid was resistant to hydrolysis at acid, neutral and basic pH at 4 °C, 25 °C and 50 °C.

By continuous exposure to light at  $\lambda > 295$  nm from a Xenon arc lamp, a complete degradation (>95 %) of fungicide was achieved after 23, 14 and 12 h approximately at pH 3.6, 6.2 and 12.0, respectively. The rates of photodecomposition of boscalid in aqueous solutions followed first-order kinetics. Under irradiation, six major photoproducts were detected and tentatively identified according to HPLC-MS/MS spectral information. The corresponding photolysis pathway of this fungicide was also proposed. The main steps involved: hydroxylation of the aromatic rings (chloro-phenyl or phenyl) followed by the loss of one chloride atom and the scission of the amide bond (N-C bond).

*Keywords: Photolysis; Pathway; Photoproducts; water; boscalid.*

---

### 1. Introduction

The principal degradation pathways for pesticides involve hydrolysis and photolysis. For many pesticide molecules, hydrolysis is a primary route of degradation (Chirirheb et al., 2010; Morrica et al., 2001; Rahm et al., 2005). Water, a principal reactive agent of chemical degradation, is responsible for the considerable breakdown of pesticides in solution, especially in conjunction with extremes pH. Heat, thermal decomposition and cold, particularly freezing temperatures, occasionally contribute to pesticide degradation (Giroud et al., 2010; Weber et al., 2009).

Photochemical degradation is one of the major transformation processes and one of the factors controlling the fate of pesticides and other chemicals in the environment. Several pesticides absorb solar light ( $\lambda > 295$  nm) and can therefore undergo direct photochemical dissociation leading to the formation of various by-products. It has been demonstrated that the use of different light sources (natural summer sunlight, suntest apparatus and mercury lamps) under identical aqueous conditions, produces similar degradation products, the only difference being the kinetics of formation (Bertrand and Barceló, 2009; Chukvudebe et al., 1989). Natural sunlight photodegradation processes are usually compared with those obtained under controlled conditions, generally using a xenon arc lamp (Chiron et al., 1995; Kochany and Maguire., 1994). These studies allow the modelling of pesticide behaviour after its applications, in order to obtain information about the degradation kinetic and half-life and to increase the information available about the

degradation products that can be formed under natural conditions.

Boscalid [2-Chloro-N(4'-chloro-biphenyl-2-yl)-nicotinamide] is a completely new active ingredient belonging to the anilid group of fungicides with a completely novel mode of action recommended for the prevention and treatment of grey mold (*Botrytis cinerea*) in fruit plants and vines.

Systematic studies of the kinetics of pesticide decomposition in aqueous solutions have been reported in the literature (Barceló et al., 2008; Sanz-Asensio et al. 1999; Zamy et al., 2004; Zhao and Hwang, 2009). These studies provide useful information about the dependence of degradation pathways on several degrading agents, the behaviour of a contaminant in aqueous media and the stability of pesticides in different conditions.

No data were available about hydrolysis and photolysis of this pesticide in scientific literature. The present study investigates the photodegradation of the pesticide boscalid, in aqueous solutions in controlled conditions. A Xenon arc lamp irradiation was used and the photodegradation behaviour and degradation kinetics were studied using HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector) and HPLC-MS/MS (Tandem Mass Spectrometry) detection. The HPLC-MS/MS system was used in order to determine and identify photoproducts in the solution.

---

Corresponding author. Phone: (+34) 941 299 629  
E-mail: maria-teresa.martinez@unirioja.es (M.Martínez-Soria)

Determination of photoproducts permitted the identification of the possible pathways of boscalid.

## 2. Experimental

### Materials and reagents

Boscalid, purity >99%, was purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany).

HPLC grade methanol was obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Formic acid and acetonitrile (MS grade, 99% purity) were purchased from Aldrich. Water for HPLC was obtained with a Milli-Q water purification system (Millipore). Any other reagents used were at least of analytical grade. Polyvinylidene fluoride (PVDF) filters 0.45 µm were purchased from Sigma Aldrich (Seelze, Germany).

### Solutions

Standard solution containing approximately 3.5 mg L<sup>-1</sup> (determined by the solubility in water; 4.6 mg L<sup>-1</sup> at 20°C) of boscalid in water was prepared, protected from light and stored at 4 °C.

Four buffer solutions (pH at 3.6 ± 0.1, 6.2 ± 0.1, 9.2 ± 0.1 and 12.0 ± 0.1) were used to study the hydrolysis of the fungicide. The buffer solutions were prepared as described by Morrica et al., 2001.

### Hydrolysis and Photolysis experiments

#### Hydrolysis Study

Triplicate 40 ml buffer solution samples (pH at 3.6 ± 0.1, 6.2 ± 0.1, 9.2 ± 0.1 and 12.0 ± 0.1), each containing approximately 3.5 mg L<sup>-1</sup> of boscalid were stored in the dark at three different temperatures (4°C, 25°C and 50°C ± 2°C) in erlenmeyer flasks to test the effects of pH and temperature on hydrolysis. The starting concentration was determined and samples (0.5 ml) were drawn out from each bottle at day 5, 10, 15, 30 and 60 and quantified by HPLC-DAD without a concentration of the sample being necessary.

#### Photolysis Study

In the photolytic degradation study, an Oriel solar simulation unit (Oriel, Stratford, USA) with a 150 W Xe arc lamp was used. This system has been previously reported for pesticide photodegradation studies, under controlled conditions, with similar results to solar photodegradation (Sanz-Asensio et al., 1997). The Xe arc lamp was set to a power of 80 W.

The sample was placed in a quartz cell of 25 ml capacity, at 5 cm from the source and the radiation was directed towards the centre of the cell.

A volume of 25 mL of different buffer solutions (pH 3.6, 6.2 and 12.0) of boscalid were input into the quartz cell and irradiated. Experiments were conducted at room temperature (25°C ± 2°C) and kept totally in the dark except for the light source. The initial

concentration of pesticide in aqueous solutions (buffer solutions) was approximately 3.5 mg L<sup>-1</sup>. At specific time intervals between 0.5 and 24 h, samples of 0.5 mL were withdrawn from the reactor, filtered and analyzed after direct injection for HPLC-DAD.

### Kinetic parameters

To determine the fungicide degradation rate by hydrolysis and photolysis, the experimental data have been fitted to the following mathematical model:

$$C_t = C_0 e^{-Kt}$$

$$\ln C_t = \ln C_0 - Kt$$

where  $C_t$  is the residue concentration (µg g<sup>-1</sup>) at time  $t$  (days);  $C_0$  is the theoretical initial residue concentration (µg g<sup>-1</sup>) at  $t = 0$ ;  $k$  is the fungicide sorption constant; and  $t$  is the time that grapes have been in contact with the solution. Thus, using the slope of the adjusted model the degradation constants as well as the half-life times for the different conditions were calculated

### Identification of intermediates

In photolysis degradation, different 25 ml aqueous solutions of boscalid at pH 3.6, 6.2 and 12.0 were irradiated under light for 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 20 and 24 h. The degraded solutions (25 ml each) were evaporated under vacuum to dryness using a rotary evaporator Heidolph VV 2000 (Kelheim, Germany) and the residues were dissolved in 1 ml of methanol. The solutions were then concentrated 25 times. Different fractions obtained were analyzed by HPLC-MS.

### Analytical determination

**HPLC-DAD analysis:** The primary degradation of boscalid was followed by HPLC-DAD. The analytical column used was an YP5 B C18 (125mm×4 mm). The flow rate was 1.0 ml min<sup>-1</sup> and the injection volume was 20 µL. The isocratic elution conditions were methanol/water (65:35, v/v); wavelength, 210 nm.

**HPLC-MS/MS analysis:** The identification of intermediates was performed by HPLC-MS/MS. Analyses were carried out using a Waters Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA). The chromatographic separation of 9 µL sample was performed on an HPLC C18 column (125mm×4 mm, 5 µm) by adjusting the column heater to 40 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and water (B) both containing 0.1% formic acid with the flow rate at .0 ml min<sup>-1</sup>. A gradient elution program was employed increasing the concentration from 10% to



**Table 1.** Dissipation of boscalid at  $4 \pm 2$  °C,  $25 \pm 2$  °C and  $50 \pm 2$  °C in aqueous buffer solutions

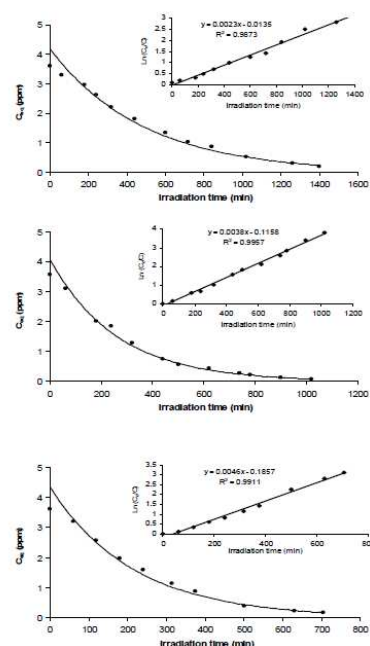
Boscalid (mg L <sup>-1</sup> )		4°C ± 2°C				25°C ± 2°C				50°C ± 2°C			
Days	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH
0	3.6	6.2	9.2	12.0	3.6	6.2	9.2	12.0	3.6	6.2	9.2	12.0	12.0
0	3.61	3.57	3.55	3.62	3.61	3.57	3.55	3.62	3.61	3.57	3.55	3.62	3.62
5	3.60	3.61	3.53	3.63	3.64	3.63	3.60	3.65	3.65	3.66	3.66	3.66	3.52
10	3.64	3.58	3.56	3.63	3.66	3.61	3.64	3.63	3.66	3.63	3.65	3.65	3.63
15	3.64	3.56	3.55	3.62	3.57	3.60	3.62	3.61	3.57	3.58	3.60	3.62	3.62
30	3.58	3.58	3.51	3.63	3.61	3.57	3.61	3.54	3.55	3.58	3.52	3.52	3.54
60	3.59	3.60	3.49	3.60	3.63	3.48	3.51	3.49	3.57	3.51	3.46	3.51	3.51

85% A in 17 min and decreasing from 85% to 10% A in 1 min and finally, keeping it at 10% A for a further 2 min for reequilibration.

TOF-MS was conducted using a microTOF-Q™ (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) orthogonal-accelerated TOF mass spectrometer equipped with a multimode ionization source. The parameters for analysis were set using both negative and positive ion modes with spectra acquired over a mass range of 50–2000 *m/z*. For confirmation of the fragmentation and the study of the metabolites samples were analyzed by MS/MS Auto. The other optimum values parameters were: capillary voltage, ±2500 V; corona voltage 1000 nA; dry gas (N<sub>2</sub>) temperature, 200 °C; dry gas flow, 6.0 L min<sup>-1</sup>; nebulizer pressure, 3.0 bar. The flow delivered into the MS detector from HPLC system. The calibrant was a sodium-formate cluster containing 5mM sodium hydroxide and 0.2% formic acid in water–methanol (1:1, v/v), injected at the beginning of each run with a KDS-100 CE (KDSscientific) syringe pump (Holliston, MA, USA) directly connected to the interface. All the spectra were calibrated prior to compound identification. All operations were controlled by DataAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonik), which provided a list of possible elemental formulas by using the GenerateMolecularFormula™ Editor.

### Results and discussion

The degradation of boscalid in aqueous solution in the absence of light (hydrolysis) at different temperatures was monitored at different pH values. Data observed at different pH and temperatures are presented in Table 2.

**Figure 1.** Photolysis degradation of boscalid at pH 3.6 (A), at pH 6.2 (B) and at pH 12.0 (C). The insets show the linear transform of the integrated first-order kinetics.**Table 2.** Photodegradation kinetics parameters

pH 3.6			pH 6.2			pH 12.0		
$k \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$	$k \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$	$k \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$
2.3	301	0.987	3.8	182	0.996	4.6	151	0.991

No significant variations could be observed in degradation with respect to pH and temperature. The results indicated that boscalid has substantial chemical stability in acid, basic or neutral solutions between 4°C and 50°C.

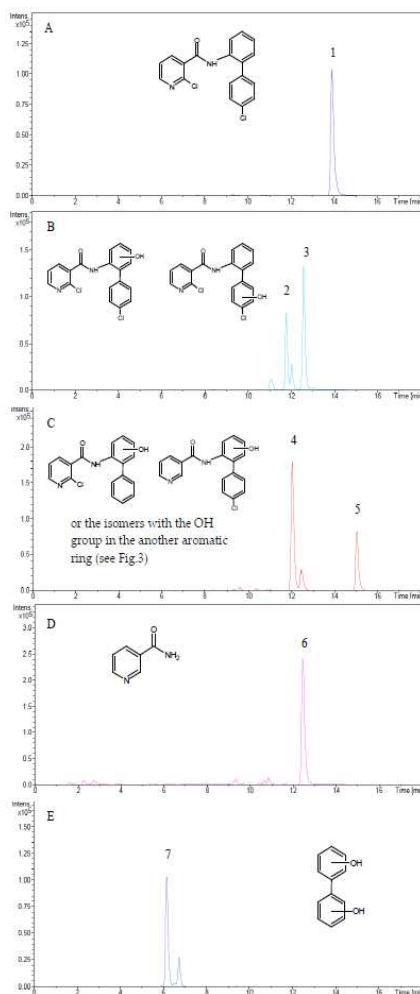
Under photolysis conditions, the kinetics of the investigated pesticide followed an apparent first-order degradation model. Table 2 lists the values of  $k$  and the linear regression coefficients for first-order kinetics of the photodegradation of the studied compound showing values for the coefficients of determination  $> 0.987$ . The obtained results showed a  $> 95\%$  degradation of boscalid at acid, neutral and basic pH after 1400 min, 850 min and 700 min of irradiation, respectively (Figure 1). As can be seen in the inset in Fig. 1, the logarithm of the ratio of the initial concentration ( $C_0$ ) to the concentration at a given time ( $C$ ) versus time ( $t$ ) is plotted. The half-lives were determined from the equation:  $t_{1/2} = \ln 2/k$  and ranged from 151 to 301 min in buffer solutions at different pH (acid, neutral and basic pH). The results indicated that the degradation rate decreased with a decrease in pH, and it proceeded much faster under an alkaline pH.

#### Identification of the organic intermediates

In order to characterize all the organic intermediates, aqueous solutions of boscalid were irradiated under light at different times and analyzed by HPLC-MS/MS. The degradation products obtained were the same regardless of the pH of the solution and they were tentatively identified by studying their mass spectra. Molecular weights of photoproducts were determined by full scan analysis in negative and/or positive electrospray ionization acquisition mode. Figure 2 shows the single ion monitoring (SIM) trace in positive or negative ionspray of the boscalid and the 6 major intermediates detected and subsequently identified by interpretation of their MS spectra. These compounds are summarized in Table 3 together with their LC-MS retention times, molecular weights and structure.

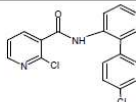
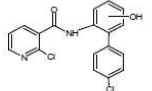
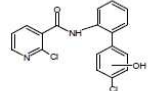
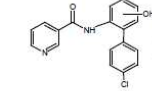
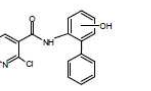


Based on the structures of photoproducts, a possible photolytic degradation pathway of boscalid consisting of several steps was proposed in Figure 3. As can be seen, all the intermediates are formed in mainly three different ways:

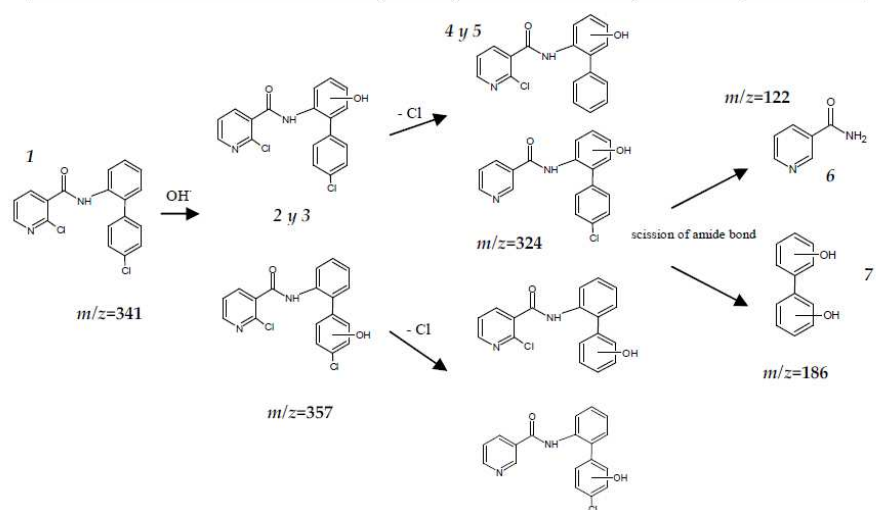
- (i) Firstly boscalid is attacked by  $\text{OH}\cdot$  radicals at -H in the two benzene rings (indicating a regioselective attack for the  $\text{OH}\cdot$  radicals due to the highest electron density of the benzene carbon sites) leading to two monohydroxylated products 2 and 3, which each reach their maximum concentration around 4 h as showed in Figure 4-A. In order to determine the position of the addition (benzene or chloropyridine moieties),



**Figure 2.** LC-MS/MS Chromatograms of boscalid degradation mixtures (A) boscalid  $m/z=343$  (positive) (B) SIM of  $m/z=357$  (negative), (C) SIM of  $m/z=325$  (positive), (D) SIM of  $m/z=123$  (positive), (E) SIM of  $m/z=185$  (negative).

**Table 3.** Mass spectra data and structures of identified intermediates by LC-MS for boscalid irradiation

Structure	N°	Retention time (min)	M <sub>r</sub>	Fragment (Intensity)
	1	13.9	342	343 <sup>#</sup> (100) 307 <sup>#</sup> (46) 140 <sup>#</sup> (5) 112 <sup>#</sup> (1)
	2	11.8	358	357 <sup>#</sup> (100)
	3	12.7	358	244 <sup>#</sup> (52) 240 <sup>#</sup> (61) 112 <sup>#</sup> (5)
	4	12.0	324	325 <sup>#</sup> (100)
	5	15.1	324	307 <sup>#</sup> (3)
or the isomers with the OH group in the another aromatic ring (see Fig.4)				
	6	12.5	122	123 (100) 106 (54)
	7	6.1	186	185 (100) 169 (3) 152 (1)

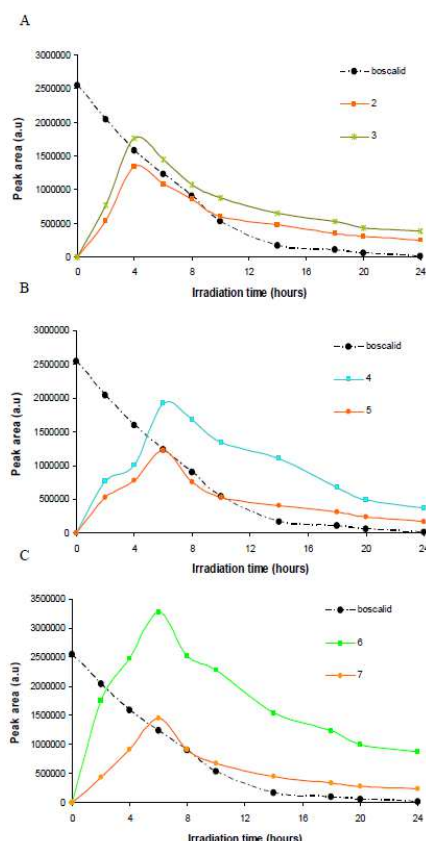


**Figure 3.** Photocatalytic degradation pathway of boscalid

boscalid mass fragmentation spectra was firstly compared to the photoproducts masses observed during product ion scan analysis. Both compounds 2 and 3 exhibited the same molecular fragment as boscalid ( $m/z=112$ ) which corresponds to the characteristic loss 2-Chloropyridine moiety. From this observation, it can be concluded that hydroxylation of these compounds occurred in benzene rings.

(ii) The second category of intermediates resulted from the loss of one chloride atom of the first intermediates (2 and 3) leading to products 4 and 5. These products appeared in the first minutes of irradiation and their concentration increased to reach a maximum at around 6 h (Figure 4-B).

(iii) The two last intermediates consisted of the scission of the amide-benzene bond (N-C bond) leading to the formation of compounds 6 and 7. As can be seen in Figure 3, product 6 resulted from the rupture of the amine bond in molecules with the pyridine moiety not hydroxylated and without the chloride atom and product 7 resulted from the hydroxylation of the aromatic moiety monohydroxylated without the chloride atom. El máximo de estos compuestos coincide en tiempo con el de los compuestos 4 y 5 (6 h; Figure 4-C).



**Figure 4.** (A) Evolution of the monohydroxylated products during degradation of boscalid. (B) Evolution of the products with  $m/z$  357 (loss of chloride) (C) Evolution of the last intermediates, obtained by the rupture of N (amide bond)-benzene during degradation of boscalid.

As mentioned in the introduction, there are no previous studies on hydrolytic or photolytic degradation of the boscalid fungicide or any other fungicides of its family (carboxamide). Thus, the results of this study were compared with those obtained for the photocatalytic degradation carried out by our research group (Lagunas-Allué et al., 2010).

Photocatalysis using  $\text{TiO}_2$  as catalyst generated  $\text{OH}\cdot$  radicals that initiated the degradation through hydroxylation of the molecule. This reaction was initially the same in the photolytic process. Therefore, the beginning of both degradation photolytic and photocatalytic coincides providing the same photoproducts by the attack of  $\text{OH}\cdot$  radicals at aromatic groups. However, the irradiation provided by photolysis seems to favor the breaking of C-Cl bonds, causing the loss of both chlorine atoms. Thus, although the rupture of the molecule (the amide-benzene bond (N-C bond)) is the main degradation pathway for both processes, the final degradation products are not similar.

#### Conclusions

The hydrolysis and photolysis studies carried out on boscalid in aqueous solution have enabled us to better understand the behaviour of this fungicide in the environment.

Results obtained in this study demonstrated that the dark hydrolysis of boscalid in aqueous solution is negligible with respect to the photochemical decomposition. Boscalid is not easily hydrolyzed and thus it is highly persistent and accumulates in various aquatic systems such as rivers and lakes.

The rates of photodecomposition of aqueous solutions followed first-order kinetics under irradiation. The degradation rates were faster under basic pH, with a half-life value of 151 min. Six major



---

photoproducts were detected and identified by HPLC-MS/MS. From the by-products of the photodegradation the photolysis pathway was understood, in this way degradation was initially preceded by the hydroxylation of benzene rings, loss of one chloride atom and the scission of the amide-benzene bond (N-C bond).

#### Acknowledgements

The authors want to thank the Government of La Rioja for the project ANGI 2004/18, INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01), MEC/FEDER for the project AGL2005-02313/ALI project and the University of La Rioja for the FPI grant given to Laura Lagunas-Allué.

#### References

- Barcelo-Quintal, M.H., Cebada-Ricalde, M.C., Trejo-Irigoyen, A.R., Rendon-Osorio, R.B., Manzanilla-Cano, J.A. Kinetic studies of endosulfan photochemical degradations by ultraviolet light irradiation in aqueous medium. *J. Environ. Sci. Health, Part B*. 2008, 43 (2), 120-126.
- Chiron, S.; Abian, J.; Ferrer, M.; Sanchez-Baeza, F.; Messegeur, A.; Barceló, D. Comparative photodegradation rates of alachlor and bentazone in natural water and determination of breakdown products. *Environ. Toxicol. Chem.* 1995, 14, 1287-1298.
- Chnirheb, A.; Harir, M.; Kanawati, B.; Fekete, A.; El Azzouzi, M.; Hertkorn, N.; Schmitt-Kopplin, P. Hydrolysis of mefenpyrdiethyl: An analytical and DFT investigation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 398, 2325-2334.
- Chukwudebe, A.; March, R.B.; Othman, M.; Fukuto, T.R. Formation of trialkyl phosphorothioate esters from organophosphorus insecticides after exposure to either ultraviolet light or sunlight. *J. Agric. Food Chem.* 1989, 37, 539.
- Giroud, N.; Dorge, S.; Trouvé, G. Mechanism of thermal decomposition of a pesticide for safety concerns: Case of Mancozeb. *J. Hazard. Mater.* 2010, 184 (1-3), 6-15.
- Kochany, J.; Maguire, J. Sunlight photodegradation of metolachlor in water. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 406.
- Lagunas-Allué, L., Martínez-Soria, M.-T., Sanz-Asensio, J., Salvador, A., Ferronato, C., Chovelon, J.M. Photocatalytic degradation of boscalid in aqueous titanium dioxide suspension: Identification of intermediates and degradation pathways. *Appl. Catal., B*. 2010, 98 (3-4), 122-131.
- Morrica, P.; Barbato, F.R.; Iacovo, R.D.; Seccia, S.; Ungaro, F. Kinetics and mechanism of imazosulfuron hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3816-3820.
- N. de Bertrand, D. Barceló. Photodegradation of the carbamate pesticides aldicarb, carbaryl and carbofuran in water. *Anal. Chem. Acta*. 1991, 254, 235-244.
- Rahm, S.; Green, N.; Norrgran, J.; Bergman, Å. Hydrolysis of environmental contaminants as an experimental tool for indication of their persistency. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39 (9), 3128-3133.
- Sanz-Asensio, J.; Plaza-Medina, M.; Martínez-Soria, M.T. Kinetic Study of the Degradation of Ethiofencarb in Aqueous Solutions. *Pestic. Sci.* 1997, 50, 187-194.
- Sanz-Asensio, J.; Plaza-Medina, M.; Martínez-Soria, M.T.; Pérez-Clavijo, M. Study of photodegradation of the pesticide ethiofencarb in aqueous and non-aqueous media, by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1999, 840, 235-247.
- Weber, J.; Kurková, R.; Klánová, J.; Klán, P.; Halsall, C.J. Photolytic degradation of methyl-parathion and fenitrothion in ice and water: Implications for cold environments. *Environ. Pollut.* 2009, 157 (12), 3308-3313.
- Zamy, C.; Mazellier, P.; Legube, B. Hydrolysis and photolysis of two organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions: Kinetics and by products. *Journal European d'Hydrologie*. 2004, 35 (1), 47-58.
- Zhao, X., Hwang, H.-M. A study of the degradation of organophosphorus pesticides in river waters and the identification of their degradation products by chromatography coupled with mass spectrometry. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2009, 56 (4), 646-653.





**ANEXO IX. Degradation intermediates and reaction pathway of pyraclostrobin with TiO<sub>2</sub> photocatalysis**

---





## Degradation intermediates and reaction pathway of pyraclostrobin with TiO<sub>2</sub> photocatalysis

Laura Lagunas-Allué<sup>a,c,\*</sup>, María-Teresa Martínez-Soria<sup>a</sup>, Jesús Sanz-Asensio<sup>a</sup>, Arnaud Salvador<sup>b</sup>, Corinne Ferronato<sup>c</sup>, Jean Marc Chovelon<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios, 51, 26006 Logroño, Spain

<sup>b</sup> Laboratoire des sciences Analytiques, UMR 5180, Batiment CPE, 43, Boulevard du 11 novembre 1918, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

<sup>c</sup> Université Lyon 1, CNRS, UMR 5256, IRCELYON, Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon, 2 avenue Albert Einstein, F-69626 Villeurbanne, France

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 5 September 2011  
Received in revised form 8 December 2011  
Accepted 9 December 2011  
Available online 17 December 2011

**Keywords:**  
Pyraclostrobin degradation  
Photocatalysis  
TiO<sub>2</sub>  
Intermediate products  
HPLC-MS/MS

### ABSTRACT

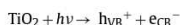
The present study deals with the photocatalytic degradation of the strobilurin pyraclostrobin in the presence of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) as a photocatalyst and UV light irradiation. The obtained results show a complete degradation of pyraclostrobin at pH 6.2, temperature at 20 ± 1 °C and 0.5 g L<sup>-1</sup> of catalyst after 60 min irradiation. Photodegradation of pyraclostrobin exhibited pseudo-first-order reaction kinetics. The rate of photodecomposition of pyraclostrobin was measured using high performance liquid chromatography–diode array detector (HPLC–DAD). The effect of solution pH in the 2–10 range was investigated as well as the reaction intermediates formed during degradation. To obtain a better understanding of the mechanistic details of this TiO<sub>2</sub>-assisted photodegradation of pyraclostrobin with UV-irradiation, the intermediates of the processes were concentrated, separated and identified by the solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography/mass spectrometry (LC–MS/MS) technique. The probable photodegradation pathways were proposed and discussed. The main steps involved: hydroxylation of the aromatic rings (chloro-phenyl, phenyl and pyrazol) followed by the loss of the N-methoxy group, substitution of chloride atom by a hydroxyl group, rupture of the pyrazol and phenyl bond and the scission of the oxygen and pyrazol bond.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In recent years, heterogeneous photocatalysis for total oxidation of many pesticides, herbicides, surfactants and colorings has been studied extensively [1–5]. This technique is based on the use of UV irradiated semiconductors, generally titanium dioxide creating a redox environment which is able to destroy these pollutants oxidizing them into mineralized products like carbon dioxide, water and eventually inorganic ions such as chloride, nitrate, ammonium and sulfate.

Basically, the photodegradation via TiO<sub>2</sub> is initiated by the generation of hole/electron pairs (h<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>) in the semiconductor valence (h<sub>VB</sub><sup>+</sup>) and conduction bands (e<sub>CB</sub><sup>-</sup>), respectively, upon absorption of ultra-violet (UV) light with energy equal to or higher than the corresponding band gap energy (>3.2 eV for TiO<sub>2</sub> anatase) as shown as follows:



\* Corresponding author.  
E-mail address: [laura.lagunas@unirioja.es](mailto:laura.lagunas@unirioja.es) (L. Lagunas-Allué).

The charges carriers, h<sub>VB</sub><sup>+</sup> and e<sub>CB</sub><sup>-</sup>, can recombine, or h<sub>VB</sub><sup>+</sup> can be scavenged by oxidizing species (for example, H<sub>2</sub>O, OH<sup>-</sup>, organic compound), and e<sub>CB</sub><sup>-</sup> by reducing species (for example, O<sub>2</sub>) in the solution leading mainly to the formation of hydroxyl radicals (OH<sup>•</sup>) as well as superoxide radical anions (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and hydroperoxyl radicals (HOO<sup>•</sup>) on the surface of TiO<sub>2</sub>, which are able to destroy a large variety of toxic organic compounds [6–9].

In this study, photocatalytic degradation of pyraclostrobin was carried out by TiO<sub>2</sub> in aqueous solution. Pyraclostrobin is a completely new active ingredient belonging to the strobilurins group of fungicides. This group of fungicides acts through inhibition of mitochondrial respiration by blocking electron transfer within the respiratory chain, which in turn causes important cellular biochemical processes to be severely disrupted, and results in cessation of fungal growth. Pyraclostrobin is recommended for the prevention and treatment of powdery mildew and downy mildew in fruit plants and vines. This pesticide is moderately toxic for bees and extremely toxic for fish. Besides it, pyraclostrobin has been previously found in analysis of surface and groundwater samples [10], therefore it is important to use treatment methods for the removal of this pollutant from water.

The aim of this paper is to assess the effectiveness of the photocatalytic process for the decontamination of water polluted by

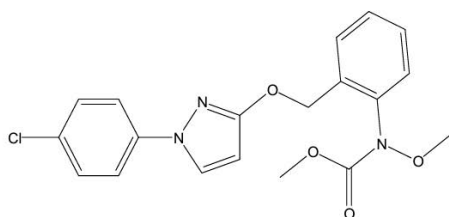


Fig. 1. Chemical structure of pyraclostrobin.

pyraclostrobin, to evaluate the kinetics aspects of the process (adsorption, degradation rate, photolysis, etc.) and the identification of the reaction intermediates for understanding the mechanistic details of the photodegradation in the  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  light process.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and reagents

Pyraclostrobin [methyl N-[2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yloxy]methyl] phenyl](N-methoxy) carbamate (Fig. 1) purity >99% was purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). It was used without further purification.

The solvents used for HPLC analyses were methanol and acetonitrile HPLC grade from SDS Carlo Erba (Peypin, France). Formic acid (MS grade, 99% purity) was from Aldrich. All the solutions were prepared with ultra pure water obtained with a Millipore-Milli Q system. Other reagents were at least of analytical grade.

All the irradiated solutions were prepared from a pyraclostrobin solution containing  $2.3 \text{ mg L}^{-1}$  or  $5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$  and stored at  $4^\circ\text{C}$ . Non-porous titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ , P25, Degussa AG, Germany) with primary particle diameter of 30 nm and specific surface area of ca.  $50 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  was used as the photocatalyst.

Polyvinylidene fluoride (PVDF) filters (0.45  $\mu\text{m}$ ) were purchased from Millipore (Molsheim, France).

### 2.2. Photoreactor and light source

The irradiation experiments were performed using a high pressure mercury UV lamp (PHILIPS HPK 125 W) emitting in the near-UV (mainly around 365 nm) and equipped with an open Pyrex glass cell of ca. 60 mL containing the aqueous suspension magnetically stirred of pyraclostrobin and  $\text{TiO}_2$  powder ( $0.5 \text{ g L}^{-1}$ ). The photoreactor was cooled with a water circulation for carrying out the experiments at  $20^\circ\text{C}$  and filtered with a 340 nm cut-off filter made of Pyrex. The light flux entering the reactor was measured directly using a radiometer (Bioblock, Illkirch, France Scientific model CX-365).

### 2.3. Procedure

A volume of 25 mL of a solution of pyraclostrobin ( $2.3 \text{ mg L}^{-1}$ ) and 12.5 mg of  $\text{TiO}_2$  were put into the reactor and vigorously stirred. The solution was allowed to stay in the dark during 15 min to reach adsorption equilibrium and then, it was irradiated. During kinetic experiments, 300  $\mu\text{L}$  aliquots were sampled during adsorption and at different irradiation times and filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF Millipore filters to remove  $\text{TiO}_2$  particles before analyses.

All the experiments were performed at a natural  $\text{pH} \approx 6.2$ , with the reactor opened to the air and the temperature was initially fixed at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and controlled throughout the experiment.

### 2.4. Solid-phase extraction

Before separating and identifying the intermediates formed during the pyraclostrobin degradation, the irradiated suspensions were concentrated by the solid-phase extraction (SPE) method. A sample volume of 25 mL was passed through the Isolute  $\text{C}_{18}$  cartridges 500 mg/6 mL (International Sorbent Technology, Cambridge, UK), previously conditioned with 6 mL of methanol followed by 6 mL of water using a Varian vacuum manifold. Then, the retained compounds were eluted with two aliquots of 0.5 mL methanol.

### 2.5. Analytical determination

#### 2.5.1. HPLC-UV and HPLC-DAD analyses

The evolution of pyraclostrobin concentration was monitored by HPLC using a Shimadzu LC-10AT binary pump system equipped with a SPD-M10A DAD and fitted with a reverse phase YP5 B  $\text{C}_{18}$  (125 mm  $\times$  4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) and a pre-column. Detection of pyraclostrobin was carried out at 275 nm. The isocratic elution conditions were methanol/water (65:35, v/v). It was eluted with a rate of  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$  and the injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . Carboxylic acids were identified and quantified by ion-exclusion chromatography using the HPLC-UV system (Varian 9010 model) equipped with a COREGEL 87-H3 cation exchange column (300 mm  $\times$  7.8 mm, 9  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase was  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{pH} \approx 2.0$ ) at a flow rate of  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ . The injection volume was 100  $\mu\text{L}$ . The wavelength for detection was 210 nm.

#### 2.5.2. HPLC-MS/MS analysis

The identification of intermediates was performed by HPLC-MS/MS. In order to detect and identify the maximum number of degradation products, a SPE concentration of 25 mL irradiated solution was performed. Then, a 20  $\mu\text{L}$  sample was injected. LC-MS analyses were performed on a system consisting of an HP 1100 series HPLC instrument comprising a binary pump and autosampler (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a API3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA, USA) equipped with a Heated Nebulizer source (APCI). The LC separation was carried out on a Prontosil  $\text{C}_{18}$  column, (125 mm  $\times$  2 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) from Atlantic Labo I.C.S. (Bruges, France). Elution was performed at a flow rate of  $300 \mu\text{L min}^{-1}$  with water containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent A and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent B, employing a linear gradient from 10% B to 100% B in 25 min. MS analysis was carried out mainly in positive ionization mode using a nebulizer current of 4 A. Instrument control, data acquisition and processing were performed using the associated Analyst 1.4.2 software. The mass spectrometer was initially calibrated using polypropylene glycol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Q1 and Q3 were adjusted to  $0.7 \pm 0.1$  a.m.u. FWHM for Full Scan, Product Ion scan and single ion monitoring mode, referred to as unit resolution. The nebulizer (air) and the curtain gas flows (nitrogen) were respectively set at 12 and 10 arbitrary unit (AU). The APCI source was operated at  $500^\circ\text{C}$  with the auxiliary gas flow (air) set at  $8 \text{ L min}^{-1}$ .

Kinetic photo-degradation determinations were performed in single ion monitoring (SIM) (Declustering potential 26 V, Focussing potential 170 V, Entrance potential, 10 V). Structural information was obtained with information dependent acquisition (IDA) enables automated MS to MS/MS acquisition with collision energy at 20 and 40 eV.

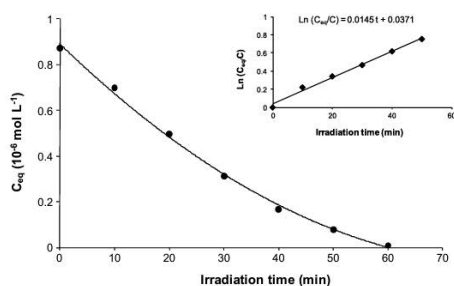


Fig. 2. Photocatalytic degradation of pyraclostrobin ( $5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). The inset shows the linear transform of the integrated first-order kinetics.

In order to better understand the reaction mechanisms involved in the photocatalytic degradation of pyraclostrobin, the kinetic evolution of principal intermediates was also followed during the irradiation of a solution of pyraclostrobin ( $2.3 \text{ mg L}^{-1}$ ) under a photonic flux of  $4.6 \times 10^{15} \text{ photons s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ . Thus, aliquots ( $300 \mu\text{L}$ ) of the reaction mixture were sampled at the beginning of the experiment and at regular time intervals (10 or 15 min) during photodegradation process up to 300 min (after filtration to separate the  $\text{TiO}_2$  particles) and analyzed by HPLC–MS/MS. After 150 min of irradiation, degradation products were not detected.

### 2.6. Computer simulations

The optimal geometry of the ground state of the pyraclostrobin molecule was obtained by DFT quantum calculations performed at B3LYP/6-31g level. The atomic charges on the molecule were obtained by fitting to the electrostatic potential according to the Merz–Singh–Kollman scheme [11]. These calculations were carried out using Gaussian 09 software [12].

## 3. Results and discussion

### 3.1. Kinetics of pyraclostrobin degradation

Several experimental studies have indicated that the photocatalytic degradation rates of pesticides over illuminated  $\text{TiO}_2$  could be interpreted by the Langmuir–Hinshelwood (L–H) kinetic model [13–15]. The photocatalytic degradation of  $5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$  pyraclostrobin is presented in Fig. 2 while, in the inset, the logarithm of the ratio of the initial concentration ( $C_0$ ) to the concentration at a given time ( $C$ ) versus time ( $t$ ) is plotted. The degradation fitted

Table 1

The pseudo first-order rate constant  $k_{\text{obs}}$ , half-life  $t_{1/2}$ , and correlation coefficients for photocatalytic degradation of pyraclostrobin at different pH.

pH	$k_{\text{obs}}$ ( $10^{-2} \text{ min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$
10.0	0.54	128.4	0.9681
7.9	0.63	110.0	0.9807
Natural	1.45	47.8	0.9913
4.1	1.56	44.4	0.9939
2.0	1.80	38.5	0.9942

well the exponential decay curve, following first-order behavior consistent to the Langmuir–Hinshelwood model. The rate constant ( $k_{\text{obs}}$ ) was determined by calculating the slope of the line obtained ( $1.4 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ). About 99% of the pyraclostrobin was degraded after UV irradiation for 60 min.

The photolysis (blank experiment without photocatalyst) of the tested pesticide followed also first-order kinetic. The value of the photolysis rate constant ( $k_{\text{phot}}$ ) obtained was  $0.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . As it can be observed from these rate constants, the contribution of the direct photolysis in the photodegradation was low for pyraclostrobin. The photocatalysis process was demonstrated to be around 15 times faster than direct photolysis.

### 3.2. Effect of pH

In this study, the initial pH was maintained at 2.0, 4.1, 7.9 or 10.0 in a suspension of  $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ TiO}_2$  and  $2.3 \text{ mg L}^{-1}$  pyraclostrobin. Whatever the pH values studied, the disappearance of pyraclostrobin obeyed an apparent first-order kinetic. The kinetic rate constant values for the degradation of pyraclostrobin as a function of reaction pH are summarized in Table 1. As reported, the pH of the suspension appeared to have little effect on the rate of disappearance of pyraclostrobin between pH 2.0 and pH 6.2 and gradually decreases upon increasing the pH from pH 7.0 to pH 10.0.

The ionization state of the surface of the photocatalyst can be protonated and deprotonated under acidic and alkaline conditions, respectively, as shown in following equations:



The point of zero charge (pzc) of the  $\text{TiO}_2$  (Degussa P25) is widely reported at pH  $\sim 6.25$  [16]. This means that the  $\text{TiO}_2$  surface is positively charged when the pH is lower than this value and negatively charged above. Therefore, pH value will have a significant effect on the adsorption/desorption properties at the catalyst's surface [17].

Different charge densities may be generated in the pyraclostrobin molecule depending on the type of interaction with the titanium dioxide surface, accelerating or retarding the degradation.

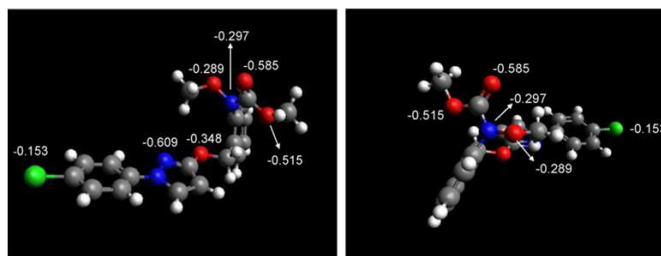
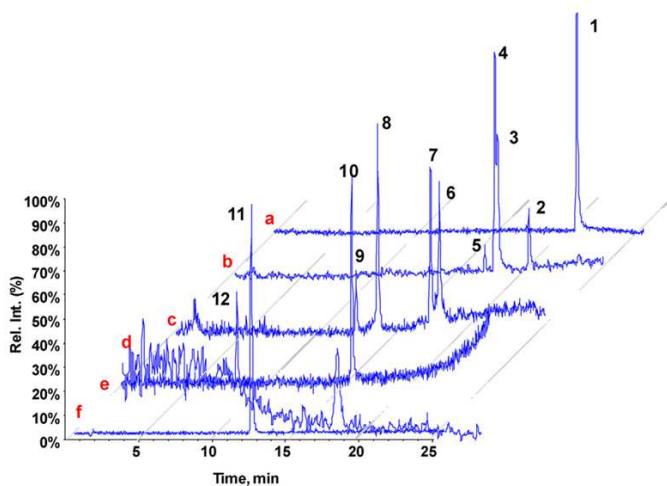


Fig. 3. Charge densities on some atoms in pyraclostrobin.

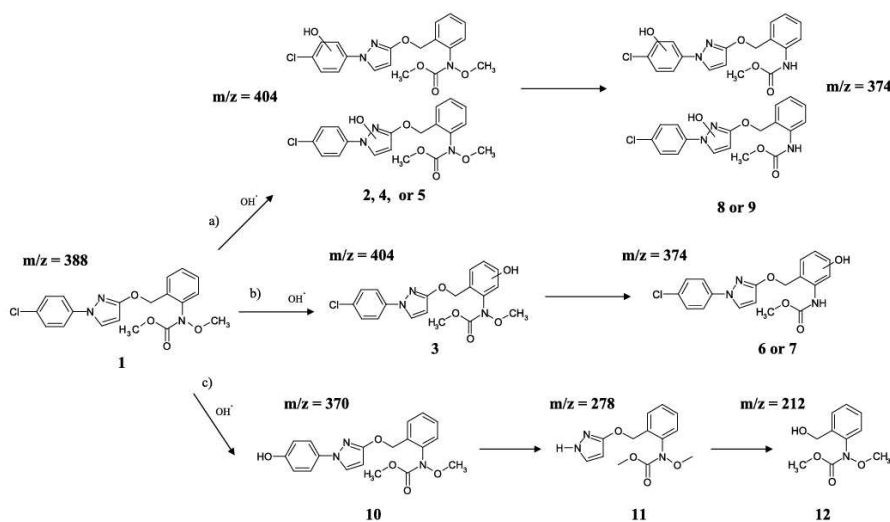




**Fig. 4.** Positive APCI-LC-MS/MS chromatograms of pyraclostrobin degradation mixtures (a) single ion monitoring (SIM)  $m/z=388$  of pyraclostrobin, (b) SIM of monohydroxylated pyraclostrobin  $m/z=404$ , (c) SIM of hydroxylated pyraclostrobin with loss of the N-methoxy group  $m/z=374$ , (d) SIM of  $m/z=370$ , (e) SIM of  $m/z=212$  (f) SIM of  $m/z=278$  (see Table 2 and Fig. 5 for proposed structures).

In order to further predict some details of the adsorption mode of pyraclostrobin on the  $\text{TiO}_2$  surface, point charges of all individual atoms in pyraclostrobin molecule were calculated as it is explained in Section 2.6. Other studies of point charges for explaining pH effect have been reported in previous works [18,19].

Then, at acidic pH, interaction between  $\text{TiOH}_2^+$  and pyraclostrobin would occur through one or more atoms with higher negative charge densities presented in Fig. 3. As it can be observed, negative charges were mainly localized on the nitrogen and the two oxygen atoms of the carbamate group [N (-0.297) and



**Fig. 5.** Photocatalytic degradation pathway of pyraclostrobin.

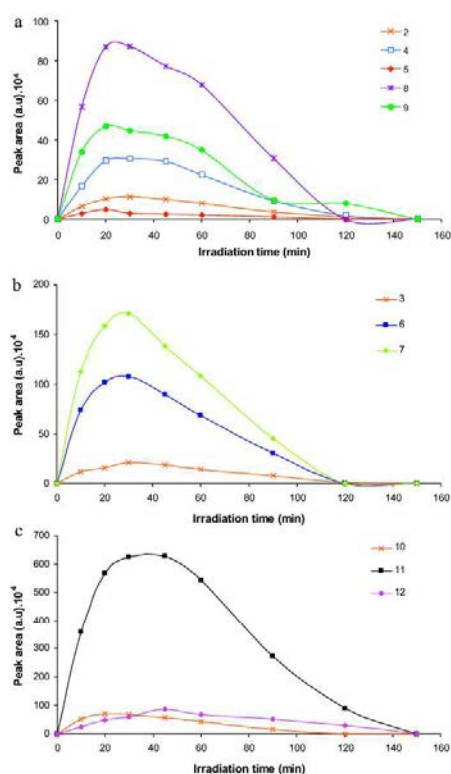


Fig. 6. (a) Evolution of the intermediate compounds during degradation of pyraclostrobin according to way (a) of Fig. 5. (b) Evolution belonging to compounds of way (b) of Fig. 5. (c) Evolution of the intermediates obtained by way (c) of Fig. 5.

( $-\text{C}=\text{O}-$ ;  $-0.585/\text{CH}_3\text{O}-$ ;  $-0.515$ ], on the another two oxygen atoms of pyraclostrobin molecule [N-methoxy ( $-0.289$ ) and yloxymethyl ( $-0.348$ )], on the nitrogen atom of the pyrazol ring ( $-0.609$ ) and on the chloride, with a contribution smaller than the other atoms ( $-0.153$ ). However, this last one and the oxygen atom of the carbamate group ( $-\text{C}=\text{O}-$ ) are the regions showing more accessibility in pyraclostrobin for interactions with catalyst surface. Therefore, when  $\text{TiO}_2$  surface is positively charged below  $\text{pH pzc}$  ( $\approx 6.25$ ) an attractive force between the  $\text{TiOH}_2^+$  surface groups and the pyraclostrobin molecules is operable. By contrast, at alkaline pH, repulsion between surface and pyraclostrobin is much more marked if it is considered that both species are negatively charged, thus preventing interaction and delaying degradation.

### 3.3. Identification and evolution of the organic intermediates

A mixture of five solutions of pyraclostrobin ( $2.3 \text{ mg L}^{-1}$ ) irradiated for 15, 30, 60, 90 and 180 min and concentrated by SPE was analyzed by HPLC-MS/MS in order to characterize all the organic

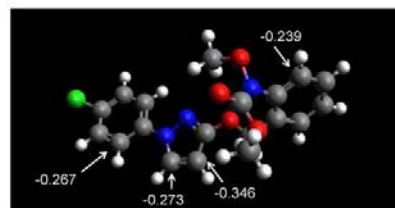


Fig. 7. Higher negative charge densities on C atoms in pyraclostrobin.

intermediates. Blank analysis helped us to discard those peaks coming from the sample handling procedure and chromatographic system.

First, molecular weights of photoproducts were determined by Full scan analysis in negative and/or positive acquisition mode. Then, MS/MS of the major compound were performed in order to obtain structural information of each photoproduct. Fig. 4 shows the single ion monitoring (SIM) trace in positive ionization of the pyraclostrobin and the 11 major intermediates detected and subsequently identified by interpretation of their MS spectra. These compounds are summarized in Table 2 together with their LC-MS retention times, molecular weights, fragments and structure.

Based on the results and on the densities charges, a possible photocatalytic degradation pathway of pyraclostrobin consisting of several steps was proposed in Fig. 5. As can be seen, all the intermediates are formed in mainly three different ways:

(a) In the first case, pyraclostrobin was attacked by  $\text{OH}^\bullet$  radicals in the chlorophenyl and pyrazol rings in left moiety of the pesticide molecule leading to three monohydroxylated products **2**, **4** and **5**, which reached their maximum of concentration around 20 min and decreased progressively to disappear from solution after 120 min, as showed in Fig. 6a.

In order to determine the position of the  $-\text{OH}$  addition, pyraclostrobin mass fragmentation spectra were firstly compared to the photoproducts masses observed during product ion scan analysis. These compounds exhibited the same molecular fragment as pyraclostrobin ( $m/z = 194$ ) which corresponds to the right moiety without hydroxylation. The  $\text{OH}^\bullet$  radicals prefer to attack in atoms with a high negative density. In this moiety of the molecule, it can be observed in Fig. 7 that there were three C atoms with a high negative density (a C atom showed a charge of  $-0.267$  in the chlorophenyl ring and two C atoms with  $-0.273$  and  $-0.346$  in the pyrazol ring) which led to the formation of the three mainly compounds mentioned above (**2**, **4** and **5**). The others C atoms belonging to these two rings showed negative charges lower than  $-0.1$  and positives charges. The loss of the N-methoxy group led to compounds **8** and **9** which were much more concentrated than the first ones.

(b) Compound **3** was obtained in the same way as compounds **2**, **4** and **5** by hydroxylation of the aromatic ring in the right moiety of the pyraclostrobin molecule. The position of the hydroxylation was confirmed by the fragment with  $m/z = 210$  which corresponds to the right moiety with  $-\text{OH}$  in the benzene ring. The most probable position of a possible attack of the  $\text{OH}^\bullet$  radicals would be on the C atom that showed the higher negative charge in the benzene ring ( $-0.239$ ; Fig. 7)

Later, the loss of N-methoxy group led to compound **6** and **7**. As it happened in case (a), these compounds showed a



higher concentration than initial compound **3** (Fig. 6b). The last intermediates consisted of the substitution of chloride for an  $-OH$  group (compound **10**) and the scission of the 4-hydroxyphenyl and pyrazol bond ( $N-C$  bond) leading to the formation of compound **11** (Fig. 6c; this compound could be also obtained directly from pyraclostrobin as it is shown in Fig. 5). The subsequent rupture of the  $-C-O-$  bond of pyrazol and the oxygen of the yloxymethyl group produced compound **12**, which could be also obtained from compounds **8** and **9**.

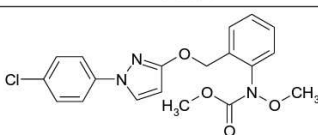
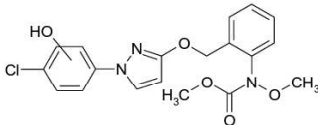
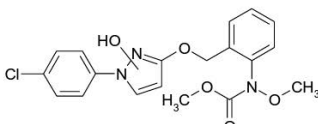
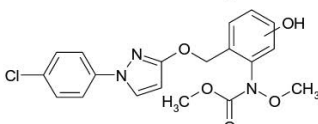
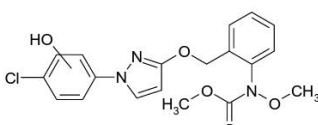
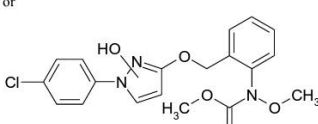
### 3.4. Identification and evolution of carboxylic acids

Four major carboxylic acids (oxalic, glyoxilic, malonic and acetic acids) formed during the degradation of the  $5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$

of pyraclostrobin solution were identified by ion exchange chromatography by comparison of their retention time ( $t_R$ ) with those of standards. They were formed since the beginning of irradiation and reached their maximum concentration after 30–45 min. Their kinetic evolution during the degradation of pyraclostrobin is represented in Fig. 8a.

Glyoxilic and malonic acids reached their maximum concentration of  $7.2$  and  $18.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively after 45 min of irradiation and then diminished progressively. Acetic acid reaches its maximum concentration after 30 min with a value of  $15.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ . However, oxalic acid is accumulated up to  $5.4 \mu\text{mol L}^{-1}$  during 1 h and hence, it is slowly destroyed at 5 h. A tentative mechanism for the formation of carboxylic acids inferred from these data is showed in Fig. 8b.

**Table 2**  
Mass spectra data and structures of identified intermediates by LC-MS for irradiation pyraclostrobin with  $\text{TiO}_2$ .

Structure	Peak n°	Retention time (min)	[M+H]	Fragment (Intensity)
	1	20.4	388	194.1 (100) 164.2 (45) 388.2 <sup>#</sup> (34) 296 <sup>#</sup> (25) 163.2 (18) 324.2 (7.3) 356 <sup>#</sup> 132 <sup>#</sup>
	2	20.1	404	194 (100) 164.1 (63) 162.9 (14) 179.1 (4)
or				
				
	3	17.9	404	210 (100) 195 (20) 180 (15) 178.2 (15)
	4	17.7	404	194.2 (100) 164 (32) 163.3 (16)
or				
				

<sup>#</sup>Fragments with chloride.

Table 2 (Continued)

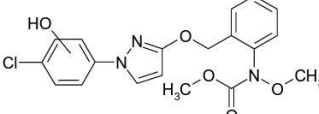
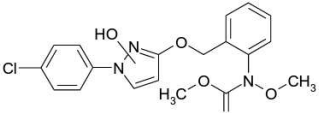
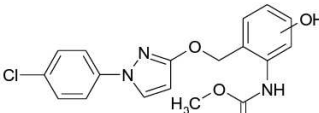
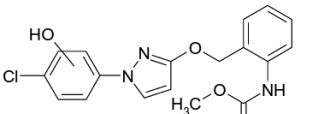
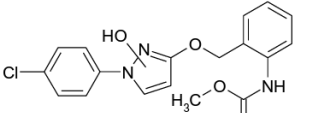
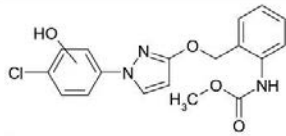
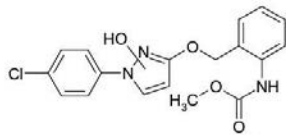
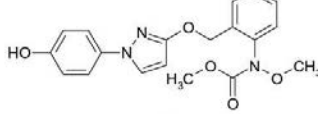
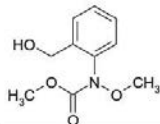
	5	17.0	404	194 (100) 163.8 (30) 163.2 (10)
or				
	6	17.7	374	180.1 (100) 148.2 (13) 195.3 (3) 342.1 (1)
	7	17.1	374	180.1 (100) 148.2 (29) 342.1 (11) 195.3 (2) 215.2 (1.5)
	8	13.4	374	194(100) 164.2 (35) 163 (19) 134 (4) 132 (2)
Or				
				

Table 2 (Continued)

	9	12.0	374	194(100) 164.2(37) 163(23) 263.7(7) 342.1(6)
Or				
	10	15.7	370	194(100) 164.2(42) 163(24) 278.2(16) 338.4(7) 306.1(5)
	11	12.2	278	163.2(100) 194.2(100) 164(73) 213.9(48) 161.8(27) 149.1(17) 132.9(13)
	12	8	212	194(100) 163(10) 133

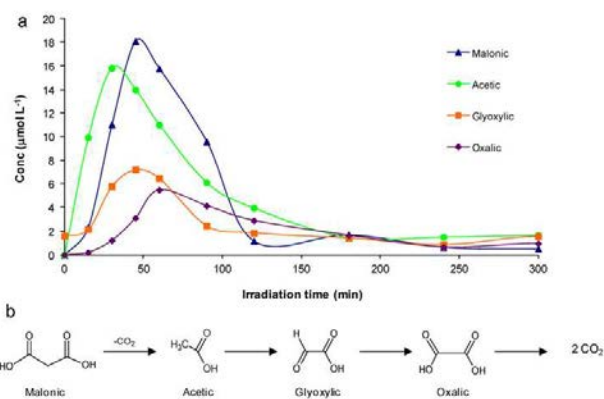


Fig. 8. (a) Formation of carboxylic acids during pyraclostrobin photocatalytic degradation. (b) Proposed scheme for the formation of carboxylic acids.

#### 4. Conclusions

Pyraclostrobin was totally degraded in an aqueous TiO<sub>2</sub> suspension in the dark after 60 min following a pseudo-first-order kinetic behavior. The rate constant for the reaction of pyraclostrobin was calculated as  $k_{\text{obs}} = 1.4 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ . The effect of pH on the rate constant value was studied in the range pH 2–10. The photodegradation rate was found to increase along with decreasing pH.

A careful study of the evolution of pyraclostrobin and the eleven intermediates monitored by HPLC-UV, and their identification using HPLC-APCI-MS/MS, allowed a better understanding of the mechanism of the degradation and a pathway of degradation has been tentatively proposed.

The main steps involve: hydroxylation of the aromatic rings (chloro-phenyl, phenyl and pyrazol) followed by the loss of the N-methoxy group, substitution of chloride atom by a hydroxyl group, rupture of the pyrazol and phenyl bond and the scission of the oxygen and pyrazol bond. Finally, oxidative degradation of pyraclostrobin by hydroxyl radicals leads to the formation of carboxylic acids such as oxalic, glyoxilic, malonic and acetic acids.

#### Acknowledgments

The authors want to thank the University of La Rioja for the FPI grant to Laura Lagunas-Allué and the Government of La Rioja for the project ANGI 2004/18, INIA for the infrastructure provided (project

VIN00-054-C2-01) and MEC/FEDER for the AGL2005-02313/ALI project.

#### References

- [1] A. Lair, C. Ferronato, J.M. Chovelon, J.M. Hermann, J. Photochem. Photobiol. A Chem. 193 (2008) 193–203.
- [2] Vulliet, J.M. Chovelon, C. Guillard, J.M. Hermann, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 159 (2003) 71–79.
- [3] M. Tamimi, S. Qourzal, A. Assabbane, J.M. Chovelon, C. Ferronato, Y. Ait-Ichou, Photochem. Photobiol. Sci. 5 (2006) 477–482.
- [4] G.R.M. Echavia, F. Matzusawa, N. Negishi, Chemosphere 76 (2009) 595–600.
- [5] I. Konstantinou, T.M. Sakellariades, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 398–405.
- [6] O. Carp, C.L. Huisman, A. Reller, Prog. Solid State Chem. 32 (2004) 33–177.
- [7] C.G. Da Silva, J.L. Faria, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 155 (2003) 133–143.
- [8] Daneshvar, D. Salari, A.R. Khataee, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 157 (2003) 111–116.
- [9] A.L. Linsebigler, G. Lu, J.T. Yates, Chem. Rev. 95 (1995) 735–758.
- [10] A. Menezes Filho, F. Neves dos Santos, P.A. de, P. Pereira, Microchem. J. 96 (2010) 139–145.
- [11] U.C. Singh, P.A. Kollman, J. Comput. Chem. 5 (1984) 129–145.
- [12] Gaussian 09, Revision A.1, M.J. Frisch et al. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [13] J.C. D'Oliveria, G. Al-Sayyed, P. Pichat, Environ. Sci. Technol. 24 (1990) 990–996.
- [14] C.S. Rurchi, D.R. Ollis, J. Catal. 122 (1990) 178–192.
- [15] J.M. Herrmann, Top. Catal. 34 (2005) 49–65.
- [16] C. Kormann, D.W. Bahnemann, M.R. Hoffmann, Environ. Sci. Technol. 25 (1991) 494–500.
- [17] S.A. Houas, H. Lachheb, M. Ksibi, E. Elaloui, C. Guillard, J. Herrmann, Appl. Catal. B 31 (2001) 145.
- [18] C. Guillard, S. Horikoshi, N. Watanabe, H. Hidaka, P. Pichat, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 149 (2002) 155.
- [19] S. Horikoshi, N. Serpone, S. Yoshizawa, J. Knowland, H. Hidaka, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 120 (1999) 63.



**ANEXO X. Photocatalytic degradation of boscalid in aqueous titanium dioxide suspension: identification of intermediates and degradation pathways**

---

---





## Photocatalytic degradation of boscalid in aqueous titanium dioxide suspension: Identification of intermediates and degradation pathways

Laura Lagunas-Allué<sup>a,c</sup>, María-Teresa Martínez-Soria<sup>a</sup>, Jesús Sanz-Asensio<sup>a</sup>, Arnaud Salvador<sup>b</sup>, Corinne Ferronato<sup>c</sup>, Jean Marc Chovelon<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios, 51, 26006 Logroño, Spain

<sup>b</sup> Université Lyon 1, CNRS, UMR 5180, Laboratoire des sciences Analytiques, Batiment CPE 43, Boulevard du 11 novembre 1918, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

<sup>c</sup> Université Lyon 1, CNRS, UMR 5256, IRCELYON Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon (IRCELYON), 2 Avenue Albert Einstein, F-69626 Villeurbanne, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 February 2010

Received in revised form 12 May 2010

Accepted 15 May 2010

Available online 18 June 2010

#### Keywords:

Boscalid degradation

Photocatalysis

TiO<sub>2</sub>

Intermediate products

HPLC-MS/MS

### ABSTRACT

The photocatalytic degradation of boscalid in aqueous suspensions was investigated by using titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) as a photocatalyst. Accordingly, a complete degradation of fungicide was achieved by applying the optimal operational conditions of 2.5 g L<sup>-1</sup> of catalyst, natural pH of 6.0 and the temperature at 20 ± 1 °C after 90 min irradiation. Photodegradation of boscalid exhibited pseudo-first-order reaction kinetics. The rate of photodecomposition of boscalid was measured using high performance liquid chromatography–diode array detector (HPLC-DAD) while its mineralization was followed using total organic carbon (TOC) analysis. The influence of physicochemical parameters such as photonic flux, presence of inorganic cations and anions, pH and oxygen concentration on the kinetic process was studied. The identification of reaction intermediate products was carried out using coupled techniques HPLC-MS/MS after a SPE pre-concentration step and a degradation pathway was proposed. By this technique, 17 degradation products were identified.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Grapes are an important crop in Spain and worldwide. High relative humidity and rains favour fungal grapevine diseases which are generally fought using high amounts of different pesticides. A proportion of pesticides inevitably enters the soil and reaches to surface water [1–4] through spraydrift and runoff of soil and suspended sediments. Thus, it could result in a contamination of surface and ground waters, which in turn becomes a potential risk for the environment.

Boscalid [2-chloro-N(4'-chloro-biphenyl-2-yl)-nicotinamide] is a completely new active ingredient belonging to the anilid group of fungicides via a completely novel mode of action recommended for the prevention and treatment of the grey mold (*Botrytis cinerea*) in fruit plants and vines. Its chemical structure is shown in Fig. 1. Boscalid is persistent and by this, it is important to use treatment methods for the removal of this pollutant from water.

There are several methods of removing pesticides from water as microbial degradation, mechanochemical destruction and ther-

mal degradation [5–7]. Although these mentioned methods were available to degrade pesticides, they possessed some limitations such as time-consuming or high manipulation cost. During the past years, some considerations have been focused on the photocatalytic process based on TiO<sub>2</sub> [8–10].

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-based photocatalytic oxidation is a promising technology in water and wastewater treatment because TiO<sub>2</sub> is a cheap, stable, operates in ambient temperature and pressure with low energy photons ( $\lambda < 388$  nm), requires no chemical reagents except oxygen in the ambient air and is nontoxic catalyst [11–13]. The TiO<sub>2</sub>-mediated photocatalysis process has been successfully used to degrade pollutants during the past few years [14–18]. The initial step in TiO<sub>2</sub>-mediated photocatalysis degradation is proposed to involve the generation of an (e<sup>-</sup>/h<sup>+</sup>) pair, leading mainly to the formation of hydroxyl radicals (OH•) as well as superoxide radical anions (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) and hydroperoxyl radicals (HOO•) which are able to destroy a large variety of toxic organic compounds [19,20]. Among them, hydroxyl radicals are the most powerful oxidizing species that TiO<sub>2</sub> photocatalysis produces.

At present, no studies on the removal of boscalid have been reported and a detailed study of the photocatalytic degradation might provide useful information for the use of TiO<sub>2</sub> in the treatment of boscalid in aqueous solution. The aim of this paper is to assess the effectiveness of the photocatalytic process for the decontamination of water polluted by boscalid.

\* Corresponding author. Tel.: +33 472 43 26 38; fax: +33 472 44 81 14.

E-mail addresses: [jean-marc.chovelon@univ-lyon1.fr](mailto:jean-marc.chovelon@univ-lyon1.fr), [chovelon@univ-lyon1.fr](mailto:chovelon@univ-lyon1.fr) (J.M. Chovelon).



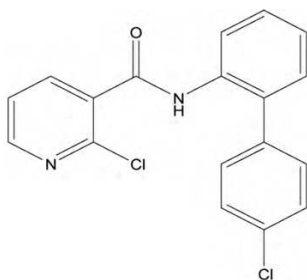


Fig. 1. Chemical structure of boscalid.

Thus, the objectives of the study were (a) to evaluate the kinetics aspects of the process (adsorption, degradation rate, photolysis, etc.) and the influence of various parameters such as pH, photonic flux, oxygen concentration and co-existing substances that may affect the photodegradation of boscalid in the presence of  $\text{TiO}_2$  suspensions, (b) the identification of the reaction intermediates as well as carboxylic acids and their kinetic evolution profiles during the process of boscalid photodegradation for understanding of the mechanistic details of the photodegradation in the  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  light process and (c) monitoring the total organic carbon (TOC).

## 2. Experimental

### 2.1. Materials and reagents

Boscalid was purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Standard solutions containing  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$  of boscalid in water were prepared and protected from light. Non-porous titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ , P25, Degussa AG, Germany) with primary particle diameter of 30 nm and specific surface area of ca.  $50 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  was used as the photocatalyst. The solvents used for HPLC analyses were methanol and acetonitrile, HPLC grade from SDS Carlo Erba (Peypin, France) and water was obtained from a Millipore Waters Milli-Q water purification system (Milli-Q-50 18 M $\Omega$ ). Polyvinylidene fluoride (PVDF) filters (0.45  $\mu\text{m}$ ) were purchased from Millipore (Molsheim, France). Formic acid (MS grade, 99% purity) was from Aldrich. Other reagents were at least of analytical grade.

### 2.2. Photoreactor and light source

The irradiation experiments were carried out in an open Pyrex glass cell of ca. 60 mL containing the aqueous suspension of boscalid and  $\text{TiO}_2$  powder. UV-irradiation was provided by a mercury lamp (Philips HPK 125 W) emitting in the near-UV (mainly around 365 nm) cooled with a water circulation and filtered with a 340 nm cut-off filter made of Pyrex. To adjust the intensity of the light source, various types of mesh screen made of stainless steel were adapted between the lamp and the reactor. The actual light flux entering the reactor was measured directly using a radiometer (Bioblock, Illkirch, France Scientific model CX-365). For all experiments, the suspensions were magnetically stirred and the concentration of  $\text{TiO}_2$  was  $2.5 \text{ g L}^{-1}$ .

### 2.3. Procedure

A volume of 25 mL of a solution of boscalid ( $3.5 \text{ mg L}^{-1}$  or  $10.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and 62.5 mg of  $\text{TiO}_2$  were introduced in the reactor

and vigorously stirred. The solution was allowed to stay in the dark during 15 min to reach adsorption equilibrium and then, it was irradiated. During kinetic experiments, 300  $\mu\text{L}$  aliquots were sampled during adsorption and at different irradiation times and filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  PVDF Millipore filters to remove  $\text{TiO}_2$  particles before analyses.

All the experiments were performed at a natural pH  $\approx 6$ , with the reactor opened to air and the temperature was initially fixed at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  and controlled throughout the experiment. During the photocatalytic degradation of boscalid, the pH was measured and only a slight decrease was observed.

### 2.4. Solid-phase extraction

Before separating and identifying the intermediates formed during the boscalid degradation, the filtered suspensions were concentrated by solid-phase extraction (SPE) method. A sample volume of 25 mL was passed through the Isolute  $\text{C}_{18}$  cartridges 500 mg/6 mL (International Sorbent Technology, Cambridge, UK), previously conditioned with 6 mL of methanol followed by 6 mL of water using a Varian vacuum manifold. Then, the retained compounds were eluted with two aliquots of 0.5 mL methanol.

### 2.5. Analytical determination

#### 2.5.1. HPLC-UV and HPLC-DAD analyses

The primary degradation of boscalid was followed by HPLC-DAD (high pressure liquid chromatography-diode array detector; Shimadzu LC-10AT binary pump and SPD-M10A DAD). The analytical column used was an YP5 B  $\text{C}_{18}$  (125 mm  $\times$  4 mm). The flow rate was  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$  and the injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . The isocratic elution conditions were methanol/water (60:40, v/v); wavelength, 210 nm.

The detection of carboxylic acids was performed using the HPLC-UV system (Varian 9010 model) with a COREGEL 87-H3 cation exchange column (9  $\mu\text{m}$ , 300 mm  $\times$  7.8 mm). The mobile phase was  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH = 2.0) at a flow rate of  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ . The injection volume was 100  $\mu\text{L}$ . The wavelength for detection was 210 nm.

#### 2.5.2. TOC measurements

Total organic carbon (TOC) determinations were carried out using a TOC analyzer BIORITECH model 700 on the filtered irradiated samples of boscalid ( $3.5 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 2.5.3. HPLC-MS/MS analysis

The identification of intermediates was performed by HPLC-MS/MS. In order to detect and identify the maximum number of degradation products, a SPE concentration of 25 mL irradiated solution was performed. Then, a 20  $\mu\text{L}$  sample was injected. LC-MS analyses were performed on a system consisting of an HP 1100 series HPLC instrument comprising a binary pump and autosampler (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a API3000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo IonSpray source. The LC separation was carried out on a Prontosil  $\text{C}_{18}$  column (125 mm  $\times$  2 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) from Atlantic Labo I.C.S (Bruges, France). Elution was performed at a flow rate of  $300 \mu\text{L min}^{-1}$  with water containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent A and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent B, employing a linear gradient from 10% B to 100% B in 25 min. MS analysis was carried out mainly in negative ionization mode using an ion spray voltage of  $-4200 \text{ V}$ . Instrument control, data acquisition and processing were performed using the associated Analyst 1.4.2 software. The mass spectrometer was initially calibrated using polypropylene glycol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Q1 and Q3 were adjusted to  $0.7 \pm 0.1 \text{ a.m.u.}$

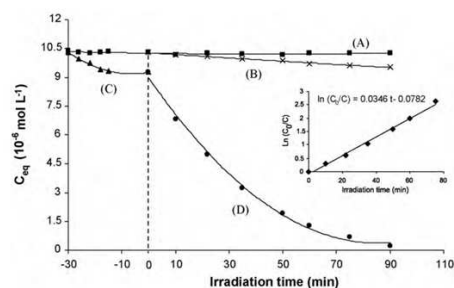


Fig. 2. Hydrolysis (A), direct photolysis (B), adsorption (C) and photocatalytic degradation (D) of boscalid ( $10.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). The inset shows the linear transform of the integrated first-order kinetics.

FWHM for Full Scan, Product Ion scan and single ion monitoring mode, referred to as unit resolution. The nebulizer (air) and the curtain gas flows (nitrogen) were set at 10 arbitrary unit (AU). The IonSpray source was operated at  $500^\circ\text{C}$  with the auxiliary gas flow (air) set at  $8 \text{ L min}^{-1}$ .

First, full scan in positive and negative mode ( $m/z$  range 90–500, scan time, declustering potential  $\pm 46 \text{ V}$ , focussing potential  $\pm 190 \text{ V}$ ) was performed in order to identify the intermediates. Then, product ion scan MS/MS mode (declustering potential  $\pm 46 \text{ V}$ , focussing potential  $\pm 190 \text{ V}$ , collision energy  $30 \text{ eV}$ , precursor ion  $m/z$ : 341, 357 and 373) was used for structure elucidation of the main degradation product. As negative ionization mode gave best sensitivity, this polarity ionization mode was retained for reaction kinetic photodegradation determination in single ion monitoring (SIM) (declustering potential  $-46 \text{ V}$ , focussing potential  $-190 \text{ V}$ ).

For the HPLC–MS/MS kinetic studies of boscalid photodegradation, aliquots of  $300 \mu\text{L}$  of the reaction mixture were taken at the beginning of the experiment and at regular time intervals during irradiation and after filtration to separate the  $\text{TiO}_2$  particles.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Hydrolysis and photolysis

In order to evaluate and compare the efficiency of the photocatalytic process with that of hydrolysis and direct photolysis, preliminary experiments (without the addition of  $\text{TiO}_2$ ) were carried out at the same concentration of boscalid ( $C_0 = 10.3 \mu\text{mol L}^{-1}$  equivalent approximately to  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) and initial pH. Fig. 2 illustrates the time course of the concentration of boscalid under three different experimental conditions: (1) in the dark in absence of  $\text{TiO}_2$  (hydrolysis); (2) UV-irradiation in absence of  $\text{TiO}_2$  (photolysis); (3) UV-irradiation in presence of  $\text{TiO}_2$ . As expected, irradiation of boscalid in absence of  $\text{TiO}_2$  showed no significant photodegradation. After 90 min of irradiation, hydrolysis and direct photolysis contributed less than 2% and 8%, respectively, to the degradation process (Fig. 2, curves A and B, respectively) indicating that the photochemical process are scarcely responsible for the observed fast transformation when the solution was irradiated in the presence of  $\text{TiO}_2$  (Fig. 2, curve D).

#### 3.2. Photocatalytic degradation of boscalid

In the dark with  $\text{TiO}_2$  (Fig. 2, curve C), a slight decrease of boscalid was observed (9%) after 15 min of continuous stirring due to an adsorption of the pesticide on  $\text{TiO}_2$  surface.

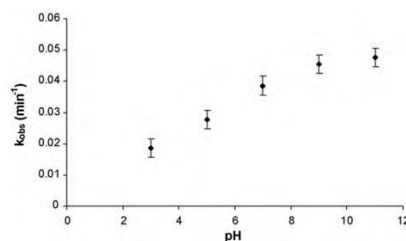


Fig. 3. Effect of pH on degradation kinetics of boscalid.

On the other hand, the complete disappearance of  $10.3 \mu\text{mol L}^{-1}$  solution of boscalid was reached within 90 min (Fig. 2, curve D). Several experimental studies have indicated that the photocatalytic degradation rates of pesticides over illuminated  $\text{TiO}_2$  could be interpreted by the Langmuir–Hinshelwood (L–H) kinetic model [21–23] but we are aware that the present kinetic data are not sufficient to conclude that the L–H mechanism is the most suitable model to describe the photocatalytic process of boscalid.

As can be seen in the inset in Fig. 2, the logarithm of the ratio of the initial concentration ( $C_0$ ) to the concentration at a given time ( $C$ ) versus time ( $t$ ) is plotted. Boscalid degradation follows a pseudo-first-order kinetic. The value obtained for  $k_{\text{obs}}$  was  $0.35 \text{ min}^{-1}$ , determined by calculating the slope of the line. The photocatalysis process was demonstrated to be around 400 times more efficient than boscalid degradation by direct photolysis ( $k_{\text{photolysis}} = 8.9 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ).

#### 3.2.1. Effect of pH

Many studies have indicated that the pH of a solution is an important parameter in the photocatalytic degradation of organic compounds. This is because the pH determines the surface charge properties of the photocatalyst and therefore the adsorption behaviour of the pollutants [24–27]. Therefore, the influence of pH on the degradation of boscalid in the aqueous suspension of  $\text{TiO}_2$  was studied at pH ranging from 3 to 11. These initial pH values were adjusted using NaOH or HCl.

Fig. 3 shows the degradation rate for the decomposition of boscalid as a function of reaction pH. The results indicated that the degradation rate decreased with a decrease in pH, and it proceeded much faster under an alkaline pH. The effect of pH on a photocatalytic reaction is generally ascribed to the surface charge of the photocatalyst and its relation to the ionic form of the organic compound (anionic or cationic). Electrostatic attraction or repulsion between the photocatalyst's surface and the organic molecule is taking place, and these events consequently enhance or inhibit, respectively, the photodegradation rate [28,29].

The ionization state of the surface of the photocatalyst can be protonated and deprotonated under acidic and alkaline conditions, respectively, as shown in following equations:



The point of zero charge (pzc) of the  $\text{TiO}_2$  (Degussa P25) is widely reported at pH  $\sim 6.25$  [30]. Thus, the  $\text{TiO}_2$  surface will remain positively charged in acidic medium (pH  $< 6.25$ ) and negatively charged in alkaline medium (pH  $> 6.25$ ).

The pH value may also influence the amount of hydroxyl radicals ( $\text{OH}^\bullet$ ) formed.  $\text{OH}^\bullet$  can be formed by the reaction between hydroxide ions and light-excited holes ( $h^+$ ) with  $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^\bullet$ . The positive holes are considered as the major oxidation species at low



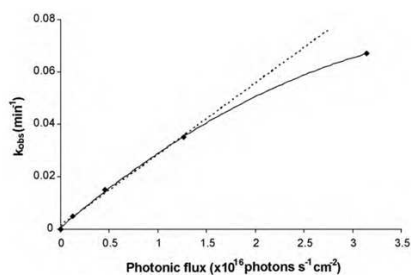


Fig. 4. Influence of the photonic flux on the rate constant of photocatalytic degradation of boscalid.

Table 1

The pseudo-first-order rate constant  $k_{\text{obs}}$ , half-life  $t_{1/2}$ , and correlation coefficients for photocatalytic degradation of boscalid at different oxygen concentrations.

[O <sub>2</sub> ] (mg L <sup>-1</sup> )	$k_{\text{obs}}$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$
0	0.0116	59.8	0.986
9	0.0346	20.0	0.993
18	0.0384	18.1	0.992

pH whereas hydroxyl radicals are considered as the predominant species at neutral or high pH levels [31,32].

In this study it has been shown that the degradation for the model compound under investigation is strongly influenced by the reaction pH as shown in Fig. 3. Since boscalid is an unionizable compound, the observed increase of the degradation rate under an alkaline pH can be attributed to the easier generation of OH<sup>•</sup> by oxidizing more hydroxide ions available on TiO<sub>2</sub> surface.

### 3.2.2. Effect of photonic flux

To investigate the influence of the light flux, this was varied from 0.1 to  $3.2 \times 10^{16}$  photon s<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> and the first-order rate constants of boscalid were measured. The light intensity was regulated by including calibrated grids between the lamp and the reactor. As shown in Fig. 4, different degradation rates were observed when working with different photonic fluxes. The curve obtained shows that for photonic fluxes below  $1.3 \times 10^{16}$  photon s<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>,  $k_{\text{obs}}$  increases almost linearly, indicating that most of the incident photons are efficiently converted into active species that act in the degradation mechanism. For higher photonic fluxes, the additional photons equally increase the concentration in electrons and holes, which favour their recombination rate which is predominant. This means that the efficiency of the photocatalytic process is limited above  $1.3 \times 10^{16}$  photon s<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>.

### 3.2.3. Oxygen concentration

Considering an important role of oxygen in the photocatalytic degradation of pesticides, several experiments were performed at different oxygen concentrations, 0, 9 and 18 mg L<sup>-1</sup>, obtained by using as the reaction gas nitrogen, ambient air or oxygen, respectively. As can be seen in Table 1, oxygen concentration has a positive

effect on the degradation process. The rate constant of photocatalytic degradation is higher in the oxygen saturated solution than in deoxygenated solution. On other hand, similar values were obtained for the disappearance of boscalid in the saturated solution and oxygen naturally present in the aerated solution. These results showed that the presence of oxygen observably increased the photocatalytic degradation efficiency of boscalid. Furthermore, the content of oxygen in air is high enough for the degradation of this pesticide since the degradation efficiency in air was similar with that in oxygen. Hence, all the experiments were performed in ambient air.

It is well established that conductive band electrons ( $e_{\text{CB}}^-$ ) and valence band holes ( $h_{\text{VB}}^+$ ) are generated when TiO<sub>2</sub> is irradiated with light energy greater than its band gap energy (3.2 eV for anatase) [33,34]:



In the illuminated TiO<sub>2</sub> system, one practical problem is the undesired electron-hole pair recombination (in the order of nanoseconds), which is the major energy-wasting step and leads to low quantum yield. As Ollis et al. reported [35], oxygen is essential for photocatalytic degradation of organics compounds. Dissolved molecular oxygen is strongly electrophilic and thus its presence reduces unfavourable electron-hole recombination routes by trapping electrons. During this reaction superoxide radical ion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) which is a reactive species is formed, according to the following reaction:



Superoxide radical ions together with hydroxyl radical (•OH) are reported to be responsible for the heterogeneous TiO<sub>2</sub> photodecomposition of organic substrates.

### 3.2.4. Effects of co-existing substances on the degradation of boscalid

The study of the effects of inorganic salts on the photocatalytic degradation of boscalid is important because inorganic species are present in natural water systems. It is interesting to note that these species could enhance boscalid degradation and other species would restrain boscalid degradation by different mechanisms.

It is well known that the photocatalytic reactions occur at the surface of the semiconductor particle so the adsorption of ions may affect the system performance by competing for the oxidizing radicals or blocking the active sites of the TiO<sub>2</sub> catalyst. The adsorption degree is dependent on the value of pH and on the exchange reactions with the surface hydroxyl groups. Consequently, the point of zero charge (pzc) should be a determining property degradation.

In this study, the effects of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions on the degradation rate of boscalid were examined individually by adding NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> to the system until the resultant solution contained 0.4 M of the cations before the irradiation had begun. According to Table 2, when all the salts were added into aqueous solution, the respective pH values of the solution ranged between 6.3 and 6.7. At these pH values, the TiO<sub>2</sub> surface remains negatively charged. The decrease in reaction rate could be due to the adsorption of these cations on TiO<sub>2</sub>/glass surface. The

Table 2

The pseudo-first-order rate constant  $k_{\text{obs}}$ , half-life  $t_{1/2}$ , and correlation coefficients for photocatalytic degradation of boscalid in presence of different cations and anions.

Cations	$k_{\text{obs}}$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$	Anions	$k_{\text{obs}}$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)	$r^2$
Without cation	0.0346	20.0	0.993	Without anion	0.0346	20.0	0.993
Na <sup>+</sup>	0.0337	20.6	0.995	Cl <sup>-</sup>	0.0351	19.8	0.991
K <sup>+</sup>	0.0325	21.3	0.991	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.0337	20.6	0.995
Ca <sup>2+</sup>	0.0294	23.6	0.986	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.0352	19.7	0.984
Mg <sup>2+</sup>	0.0251	27.6	0.990	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.0215	32.2	0.992

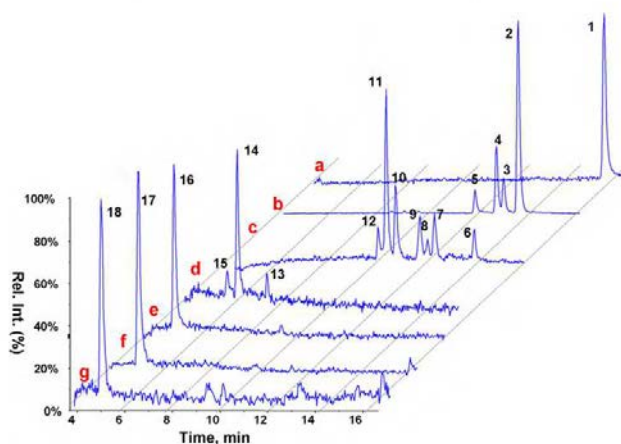


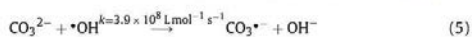
Fig. 5. Negative ionspray LC-MS/MS chromatograms of boscalid degradation mixtures: (a) single ion monitoring (SIM)  $m/z = 341$  of boscalid, (b) SIM of monohydroxylated boscalid  $m/z = 337$ , (c) SIM of dihydroxylated boscalid  $m/z = 373$ , (d) SIM of  $m/z = 172$ , (e) SIM of  $m/z = 156$ , (f) SIM of  $m/z = 112$  and (g) SIM of  $m/z = 224$  (see Table 3 and Fig. 7 for proposed structures).

sequence of inhibition was  $Mg^{2+} > Ca^{2+} > K^{+} > Na^{+}$ . The effect of  $Mg^{2+}$  was the strongest among four cations tested (Table 2). This reveals that the larger the charge and size of cations contained, the more the inhibition of reaction rate increased.

The effects of  $CO_3^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$  and  $Cl^-$  ions on the photodegradation efficiency of boscalid were also investigated by adding  $Na_2CO_3$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $NaNO_3$  and  $NaCl$  at 0.4 M. As shown in Table 2, for  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$  and  $NO_3^-$  no obvious effects on the degradation of boscalid were observed.

The pH values found for these anions were slightly basic in the case of  $CO_3^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$  and similar to  $pH_{pzc}$  for  $Cl^-$  and  $NO_3^-$ . A negligible effect has been already reported by other authors for weakly adsorbed anions such as  $NO_3^-$  or  $SO_4^{2-}$  [29,36,37]. In the case of  $Cl^-$ , Wang et al. [38] indicated that at  $pH < pH_{pzc}$ , the  $Cl^-$  ions are strongly adsorbed on the  $TiO_2$  surface and reduce the photodegradation rate. At neutral or alkaline conditions, the addition of  $Cl^-$  ion did not influence the reaction. A second explanation could be that chloride anions, as others halides, are known to scavenge photo-generated holes [39]. They are oxidized by photoholes to chlorine radicals which are reduced back by electrons to chloride ions, hence reducing the availability of holes and electrons. Chlorine radicals can react with organic compounds via addition/elimination reactions ( $E_0(Cl^{\bullet}/Cl^-) = 2.5 V$ ). Then these two opposite effects of  $Cl^-$  lead in the case of boscalid to an insignificant effect on its degradation rate.

On the contrary, when  $CO_3^{2-}$  was added, the photocatalytic degradation efficiency of boscalid decreased considerably due to the scavenging of hydroxyl free radicals. Radical scavenging could explain why degradation is inhibited by carbonates since these anions are known to strongly scavenge hydroxyl radicals [40]:



The carbonate radicals that are formed can theoretically react with boscalid. However, they have a lower oxidation potential than hydroxyl radicals ( $E_0(CO_3^{\bullet -}/CO_3^{2-}) = 1.85 V$ ,  $E_0(OH^{\bullet}/H_2O) = 2.80 V$ ), so that their reaction on boscalid is less easy to initiate.

### 3.3. Identification of the organic intermediates

In order to characterize all the organic intermediates, a mixture of five solutions of boscalid ( $3.5 mg L^{-1}$ ) irradiated for 15, 30, 60, 90 and 180 min and concentrated by SPE was analyzed by HPLC-MS/MS. This sample represented as much as possible the different intermediates. Blank analysis helped us to discard those peaks coming from the sample handling procedure and chromatographic system. First, molecular weights of photoproducts were determined by Full scan analysis in negative and/or positive ionspray acquisition mode. Then, MS/MS of the major compounds were performed in order to obtain structural information of each photoproduct. Fig. 5 shows the single ion monitoring (SIM) trace in negative ionspray of the boscalid and the 17 major intermediates detected and subsequently identified by interpretation of their MS spectra. These compounds are summarized in Table 3 together with their LC-MS retention times, molecular weights and structure.

As can be seen, compounds 2–5 were identified as monohydroxylated compounds. In order to determine the position of the addition (aromatic or chloropyridine moieties), boscalid mass fragmentation spectra were firstly compared to the photoproducts masses observed during product ion scan analysis. Compounds 2, 4 and 5 exhibited the same molecular fragment as boscalid ( $m/z = 112$ ) which corresponds to the characteristic loss 2-chloropyridine moiety. Compound 3 exhibited a fragment at ( $m/z = 128$ ). From this observation, it can be concluded that hydroxylation of compound 3 occurred in 2-chloropyridine whereas hydroxylation of compounds 2, 4 and 5 occurred in aromatics rings. With the same observation, compounds 7–11 were identified as dihydroxylated compounds with both hydroxyls in aromatics ring and compounds 6 and 12, dihydroxylated compounds with hydroxylation in the aromatic part and in 2-chloro-pyridine moiety. In order to correctly characterise (position of hydroxylation) these compounds, it would be necessary to isolate each hydroxylated compound from the degradation mixture, and to perform its NMR analysis or using an HPLC/ $^1H$  NMR methods [41] or more simply to determine the most probable positions attacked by a hydroxyl radical with theoretical calculations [42].

**Table 3**  
Mass spectra data and structures of identified intermediates by LC-MS for irradiation boscalid with TiO<sub>2</sub>.

No.	Structure	Retention time (min)	[M-H] <sup>-</sup>	Negative fragment
2 4 5		13.7 12.9 11.8	357	112, 244
3		13.1	357	128, 228
6 12		13.8 9.7	373	128, 244
7 8 9 10 11		11.9 11.7 11.5 10.0 9.8	373	112, 269
13 14 15		7.3 5.9 5.7	172	
16		5.0	156	
17		5.1	112	
18		5.0	223	

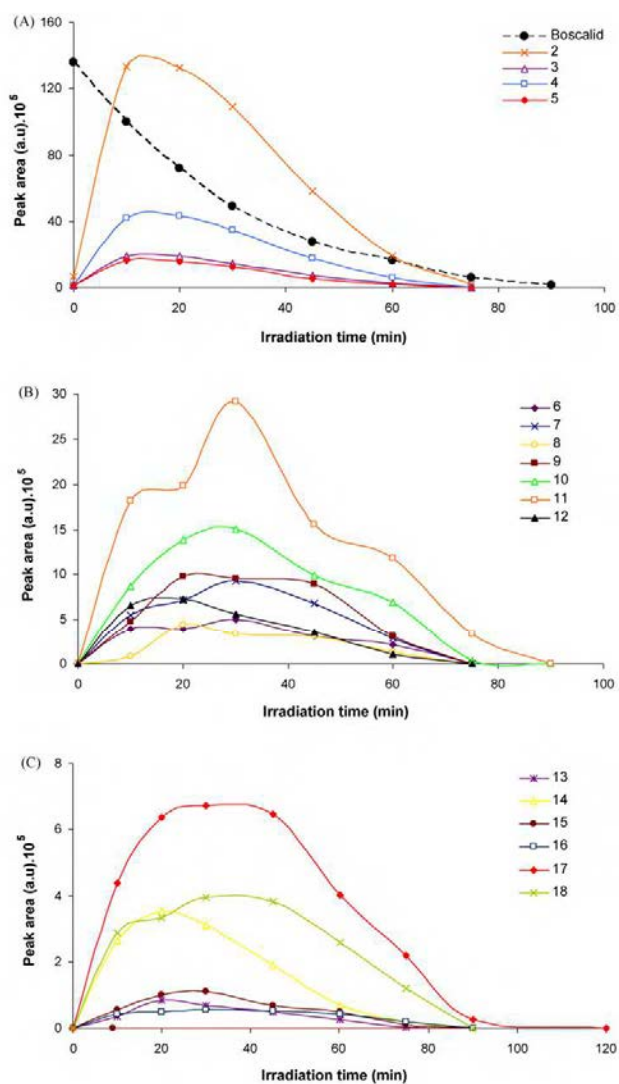


Fig. 6. (A) Evolution of the monohydroxylated products during degradation of boscalid. (B) Evolution of the dihydroxylated products during degradation of boscalid. (C) Evolution of the last intermediates, obtained by the rupture of amide bond, during degradation of boscalid.

#### 3.4. Evolution of intermediates and degradation pathways

In order to better understand the reaction mechanisms involved in the photocatalytic degradation of boscalid, the kinetic evolution of principal intermediates was also followed during the irradiation of a solution of boscalid ( $3.5 \text{ mg l}^{-1}$ )

under a photonic flux of  $1.3 \times 10^{16} \text{ photon s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  (Fig. 6). Thus, aliquots of the reaction mixture were sampled at regular time intervals (10 or 15 min) during photodegradation process up to 360 min and analyzed by HPLC-MS/MS. After 120 min of irradiation, degradation products were not detected.



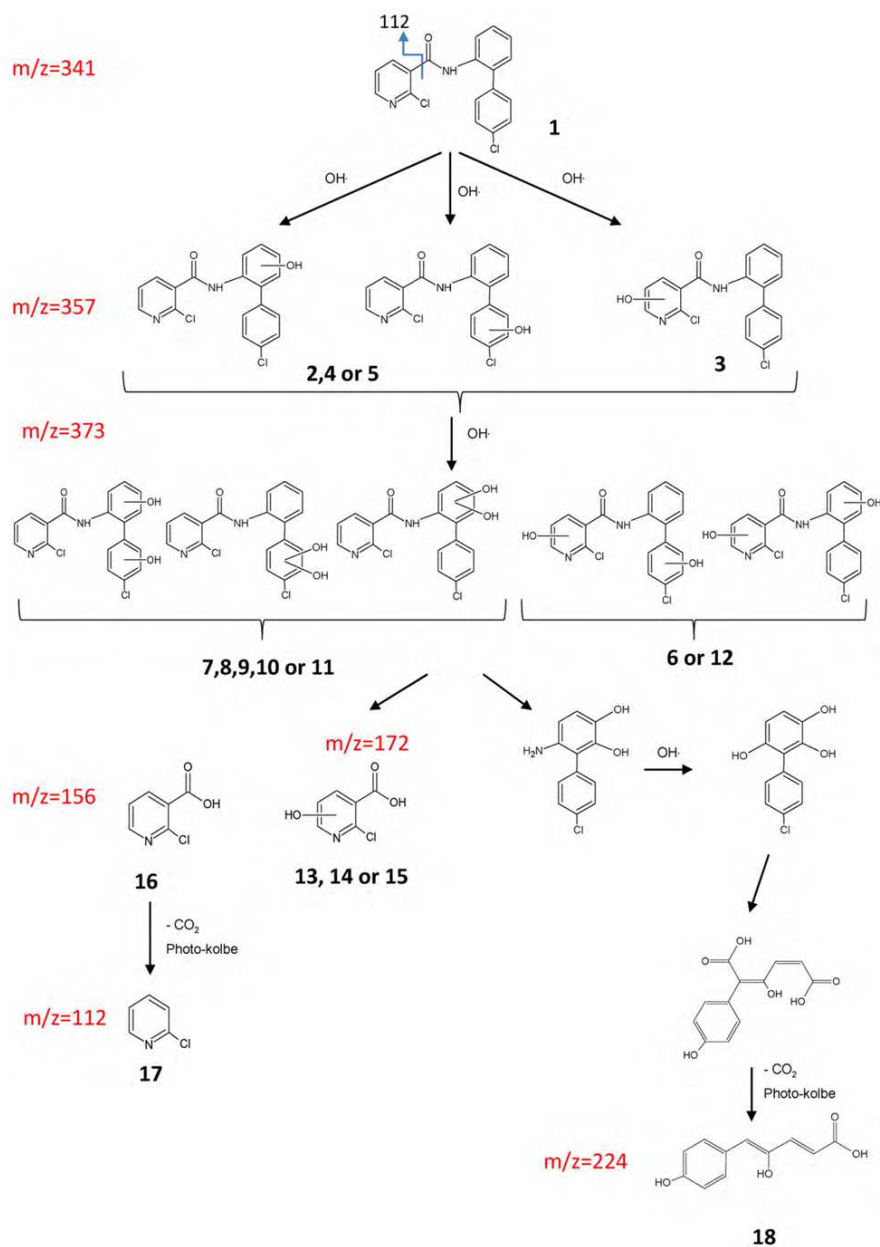


Fig. 7. Photocatalytic degradation pathway of boscalid.

Based on the previous results, a possible photocatalytic degradation pathway of boscalid consisting of several steps was proposed in Fig. 7. As can be seen, all the intermediates are formed in mainly three different ways:

- (i) Firstly boscalid is attacked by  $\text{OH}^\bullet$  radicals at  $-\text{H}$  in the three rings (benzene and pyridine rings) leading to four mono-hydroxylated products **2–5**, which reach their maximum of concentrations around 15 min then decrease progressively to disappear from solution after 70 min, as showed in Fig. 6-a. The products **2**, **4** and **5** are obtained by hydroxylation of the benzene rings whereas the product **3** is obtained by hydroxylation of pyridine. By comparing the evolution profiles for these products it appears that product **2** is the major hydroxylation intermediate whereas products **3–5** are much less important and are formed at very low concentrations, indicating a regioselective attack for the  $\text{OH}^\bullet$  radicals due to the highest electron density of the benzene carbon sites. In addition we can assume (even is HPLC-MS-MS analysis is unable to give us this data) that hydroxyl radicals attack occurs mainly on the carbon in ortho position with respect to chloride atom (product **2**) since it is the most nucleophile.
- (ii) The second category of intermediates results from the hydroxylation of the first intermediates (**2–5**) leading to seven dihydroxylated products **6–12**. These products appear at the first minutes of irradiation and their concentration increases to reach a maximum around 30 min (Fig. 6-b). Product **11** is the most abundant whereas **6** and **12** products are the least concentrated which indicates that the  $\text{OH}^\bullet$  radicals attack occurs mainly in benzene rings and hydroxylation of pyridine moiety represents only a minor pathway.
- (iii) The last intermediates consist of the scission of the amide bond (N-C bond) leading to the formation of compounds **13–18**. As can be seen in Fig. 7, products **13–15** result from the rupture of the amine bond in molecules with the pyridine moiety hydroxylated (**3**, **6** and **12**) and the product **16** from the dihydroxylated products only in benzene rings (**7–11**). The product **16** is the most abundant (Fig. 6-c) because it was obtained from the principal dihydroxylated products (**10** and **11**) and its decarboxylation leads to product **17**. Moreover, the products dihydroxylated with the two hydroxyl groups in neighbour carbon sites could be transformed in product **18** by the opening of the aromatic ring observed throughout the photocatalysis process [43,44] and a final step of decarboxylation via photokolbe reaction [45].

### 3.5. Identification and evolution of carboxylic acids

Carboxylic acids formed during the degradation process of the  $10.3 \mu\text{mol L}^{-1}$  boscalid solution were identified by HPLC-UV. Therefore, irradiated samples of boscalid were analyzed. Five major acids were identified (oxalic, formic, acetic, malonic and glyoxylic) by comparison with commercial standards. They are formed since the beginning of photodegradation. Malonic acid is the first and the major one. Its concentration increases to reach at 45 min a value of  $21.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Acetic acid is the second one. It appears after 15 min of irradiation and is accumulated up to  $19.4 \mu\text{mol L}^{-1}$  and hence, it is slowly destroyed to approximately  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  at 360 min. Glyoxylic and oxalic acids reached their maximum concentration of  $14.2$  and  $8.5 \mu\text{mol L}^{-1}$  after 120 and 90 min of UV-irradiation, respectively, and then diminished slowly. Brillas and Oturan [46] have demonstrated that glyoxylic acid was transformed into oxalic acid. The oxalic disappearance between 100 and 300 min is related to its direct transformation into two molecules of  $\text{CO}_2$ . Formic acid

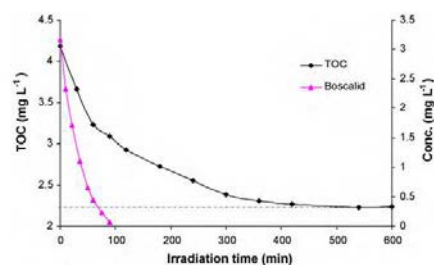


Fig. 8. Total organic carbon (TOC) removal during boscalid photocatalysis.

appears after 120 min resulting mainly from the transformation of acetic acid, and disappears from the solution by transformation into  $\text{CO}_2$ .

### 3.6. Mineralization

Complete mineralization is very important for organic pollutants photocatalysis. The breaking down of the benzene ring and subsequent mineralization leading to water and carbon dioxide could be visualized by the decrease in TOC during the photocatalytic process. To assess the extent of mineralization during the photocatalytic degradation of boscalid, TOC was monitored as shown in Fig. 8. It showed TOC removal followed a much slower rate compared to degradation of boscalid. The mineralization kinetic is rapid at the two first hours of the treatment but becomes much slower at longer time because carboxylic acids formed by oxidative ring opening reactions are less reactive toward hydroxyl radicals compared to the aromatics. Thus, they are degraded more slowly than the pesticide initially introduced. Complete TOC removal was achieved after long irradiation time (around 400 min) to reach a constant number equal to 2.2, which corresponds to the measure of TOC for  $\text{TiO}_2$  aqueous solution (background noise).

## 4. Conclusions

Photodegradation using  $\text{TiO}_2$  as a catalyst is an efficient method for degrading boscalid. At optimal operating parameters, a complete degradation was achieved after 90 min irradiation. On kinetic study, degradation rate of boscalid followed a pseudo-first-order kinetic, suggesting an associative adsorption of the molecule on the  $\text{TiO}_2$  surface. The photodegradation rate was found to increase along with increasing pH, photonic flux and oxygen concentration. In addition, the presence of inorganic cations such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  and anions as  $\text{CO}_3^{2-}$  that are often presented in natural water systems decreased the photocatalytic degradation rate of boscalid.

Seventeen intermediates have been identified and characterized through a mass spectra analysis using HPLC-MS/MS, giving insight into the early steps of the degradation process. The evolution of these intermediates and TOC, allowed a better understanding of the degradation mechanism. The pathway proposed consists of three main competitive pathways: the monohydroxylation of boscalid in benzene and pyridine rings, the dihydroxylation of these first products and the rupture of the N-C bond followed by decarboxylation via photokolbe reaction. Finally, aromatic rings opening leads to the formation of carboxylic acids such as oxalic, formic, acetic, malonic and glyoxylic.



## Acknowledgements

The authors want to thank the University of La Rioja for the FPI grant to Laura Lagunas-Allué and the Government of La Rioja for the project ANGI 2004/18, INIA for the infrastructure provided (project VIN00-054-C2-01) and MEC/FEDER for the AGL2005-02313/ALI project.

## References

- [1] E. Charizopoulos, E. Papadopoulou-Mourkidou, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2363–2368.
- [2] S.P. Hatzilazarou, E.T. Charizopoulos, E. Papadopoulou-Mourkidou, *A.S. Economou. Pest Manage. Sci.* 60 (2004) 1197–1204.
- [3] A. Papastergiou, E. Papadopoulou-Mourkidou, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 63–69.
- [4] D.W. Kolpin, J.E. Barbash, R.J. Gillom, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 558–566.
- [5] L. Fang, *Chin. J. Appl. Ecol.* 11 (2000) 249–252.
- [6] A.K. Hall, J.M. Harrowfield, R.J. Hart, P.G. McCormick, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 3401–3407.
- [7] M. Kim, P.W. Okeefe, *Chemosphere* 41 (2000) 793–800.
- [8] G.H. Liu, Y.F. Zhu, X.R. Zhang, B.Q. Xu, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6279–6284.
- [9] W. Choi, S.J. Hong, Y.S. Chang, Y. Cho, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 4810–4815.
- [10] L. Zan, W.J. Fa, S.L. Wang, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 1681–1685.
- [11] S. Malato, J. Blanco, C. Richter, B. Milow, M.I. Maldonado, *Water Sci. Technol.* 40 (1999) 123–130.
- [12] S. Malato, J. Blanco, A. Vidal, C. Richter, *Appl. Catal. B* 37 (2002) 1–15.
- [13] K. Nagaveni, G. Sivalingam, M.S. Hegde, G. Madras, *Appl. Catal. B: Environ.* 48 (2004) 83–93.
- [14] S.C. Panchangam, A.Y.-C. Lin, K.L. Shaik, C.-F. Lin, *Chemosphere* 77 (2009) 242–248.
- [15] G.K.M. Echavia, F. Matsumura, N. Negishi, *Chemosphere* 76 (2009) 595–600.
- [16] S. Liu, M. Lim, R. Fabris, C. Chow, M. Drikas, R. Amal, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 6218–6223.
- [17] P. Calza, V.A. Sakkas, C. Medana, C. Baiocchi, A. Dimou, E. Pelizzetti, T. Albanis, *Appl. Catal. B: Environ.* 67 (2006) 197–205.
- [18] I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, *Appl. Catal. B: Environ.* 49 (2004) 1–14.
- [19] C.C. Da Silva, J.L. Faria, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 155 (2003) 133–143.
- [20] N. Daneshvar, D. Salari, A.R. Khataee, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 157 (2003) 111–116.
- [21] J.C. D'Oliveira, G. Al-Sayyed, P. Pichat, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 990–996.
- [22] C.S. Rurchi, D.R. Ollis, *J. Catal.* 122 (1990) 178–192.
- [23] J.M. Herrmann, *Top. Catal.* 34 (2005) 49–65.
- [24] J. Matos, A. Garcia, T. Cordero, J.M. Chovelon, C. Ferronato, *Catal. Lett.* 130 (2009) 568–574.
- [25] U.G. Akpan, B.H. Hameed, *J. Hazard. Mater.* 170 (2009) 520–529.
- [26] X. Zhu, C. Yuan, Y. Bao, J. Yang, Y. Wu, *J. Mol. Catal. A* 229 (2005) 95–105.
- [27] C. Fernández, M. Soledad Larrechia, M. Pilar Callao, *Talanta* 79 (2009) 1292–1297.
- [28] C.S. Lua, C.C. Chenb, F.D.H. Maic, K. Li, J. Hazard. Mater. 165 (2009) 306–316.
- [29] L. Wei, Ch. Shifu, Z. Wei, Z. Sujuan, *J. Hazard. Mater.* 164 (2009) 154–160.
- [30] C. Kormann, D.W. Bahnemann, M.K. Hoffmann, *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991) 494–500.
- [31] W.Z. Tang, C.P. Huang, *Water Res.* 29 (1995) 745–756.
- [32] S. Tunesi, M. Anderson, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 3399–3405.
- [33] I.K. Konstantinou, T.M. Sakellariades, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 398–405.
- [34] W. Choi, M.R. Hoffmann, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 1646–1654.
- [35] D.F. Ollis, E. Pelizzetti, N. Serpone, *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991) 1522–1529.
- [36] M. Abdullah, J.K.C. Low, R.W. Matthews, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 6820–6825.
- [37] J.C. D'Oliveira, C. Guillard, C. Maillard, P. Pichat, *J. Environ. Sci. Health A* 28 (1993) 941–956.
- [38] K.H. Wang, Y.H. Hsieh, C.H. Wu, C.Y. Chang, *Chemosphere* 40 (2000) 389–394.
- [39] P. Calza, E. Pelizzetti, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1839–1848.
- [40] A. Lair, C. Ferronato, J.M. Chovelon, J.M. Herrmann, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 193 (2008) 193–203.
- [41] M. Sleiman, P. Conchon, C. Ferronato, J.M. Chovelon, *Appl. Catal. B: Environ.* 71 (2007) 279–290.
- [42] A. Piram, R. Faure, H. Chermette, C. Bordes, B. Herbreteau, A. Salvador, *J. Environ. Anal. Chem.*, accepted, doi: 10.1080/03087319.2010.497920.
- [43] R. Matthews, *J. Catal.* 111 (1998) 264–272.
- [44] S. Chatterjee, S. Sarkar, S.N. Bhattacharyya, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 81 (1994) 199–203.
- [45] B. Krauter, A.J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 10 (1978) 2239–2245.
- [46] E. Brillias, M.A. Oturan, *Pesticides: Impacts Environnementaux*, in: M.A. Oturan, J.M. Mouchel (Eds.), *Gestion et Traitements*, 2007, pp. 61–73 (Chapitre 2).





