

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Contaminazione indiretta
da prodotti fitosanitari: il caso dei residui
di fungicidi negli oli di oliva**

Francesca Di Domenico, Patrizia De Sanctis,
Mauro Di Pasquale, Guido Enrico Pellegrini, Ettore Coni
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

10/35

Istituto Superiore di Sanità

Contaminazione indiretta da prodotti fitosanitari: il caso dei residui di fungicidi negli oli di oliva.

Francesca Di Domenico, Patrizia De Sanctis, Mauro Di Pasquale, Guido Enrico Pellegrini, Ettore Coni
2010, ii, 50 p. Rapporti ISTISAN 10/35

I Prodotti Fitosanitari (PF) sono preparati contenenti una o più sostanze attive in grado di garantire e/o migliorare la produzione agricola. Attualmente il numero di PF è elevatissimo e l'Unione Europea (UE) rappresenta oggi un quarto del mercato mondiale dei PF. I più impiegati sono i fungicidi (43%), seguiti da erbicidi (36%) e dagli insetticidi (12%). La tossicità di alcuni PF pone rischi e costi connessi con il loro uso. In questo contesto un elemento emergente di possibile ricaduta negativa sulle colture agricole è rappresentato dalla presenza accidentale di residui dei fungicidi antibotritici nell'olio di oliva. Tale inquinamento è attribuibile solo a fenomeni di contaminazione indiretta dovuta a deriva, lisciviazione e percolazione, e non a trattamenti specifici sulla coltura. Nel rapporto sono descritte le sostanze attive all'origine del fenomeno e sono riportate le cause, l'incidenza e gli effetti della contaminazione. Infine, sono stati analizzati campioni di olio extravergine d'oliva e di oli d'oliva normalmente commercializzati in Italia. L'identificazione e la determinazione quantitativa hanno interessato residui di fungicidi dicarbossimidici.

Parole chiave: Prodotti fitosanitari; Residui di fitosanitari; Fungicidi dicarbossimidici; Tossicità; Deriva, Lisciviazione; Percolazione; Olio d'oliva; Olio extravergine d'oliva

Istituto Superiore di Sanità

Cross contamination by plant protection products: the case of fungicide residues in olive oils.

Francesca Di Domenico, Patrizia De Sanctis, Mauro Di Pasquale, Guido Enrico Pellegrini, Ettore Coni
2010, ii, 50 p. Rapporti ISTISAN 10/35 (in Italian)

Plant Protection Products (PPP) are chemical preparations containing one or more active substances able to guarantee and/or improve agricultural production. Currently, the number of PPP is very high and the European Union (EU) represents one quarter of the world market for PPP. The most used PPP are fungicides (43%), followed by herbicides (36%) and insecticides (12%). The toxicity of some PF poses risks and costs associated with their use. In this framework, an emerging concern for crops is the accidental presence of fungicide residues in olive oil. This pollution is not due to a direct treatment of olive trees but it is attributable only to the phenomena of cross contamination (drift, leaching and percolation). This report describes the active substances causing the phenomenon and also shows the causes, the incidence and the effects of contamination. Finally, samples of extra virgin olive oil and olive oil marketed in Italy were analyzed. The identification and quantitative determination of fungicide residues involved dicarboximidic compounds.

Key words: Plant protection products; Fungicides residues; Dicarboximidic fungicides; Toxicity; Drift; Leaching; Percolation; Olive oil; Extra virgin olive oil

Si ringrazia l'Associazione Italiana dell'Industria Olearia (ASSITOL) e la Federazione Nazionale del Commercio Oleario (Federolio) per il sostegno economico e operativo dato all'indagine.

Per informazioni su questo documento scrivere a: ettore.coni@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Di Domenico F, De Sanctis P, Di Pasquale M, Pellegrini GE, Coni E. *Contaminazione indiretta da prodotti fitosanitari: il caso dei residui di fungicidi negli oli di oliva*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/35).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2010

INDICE

Introduzione.....	1
-------------------	---

PARTE GENERALE

Prodotti fitosanitari	5
Formulazioni commerciali	5
Quadro normativo	6
Fungicidi dicarbossimidici	9
Procimidone	9
Aspetti biochimici	9
Dati tossicologici	10
Quadro normativo.....	11
Utilizzo in agricoltura.....	12
Iprodione.....	14
Aspetti biochimici	14
Dati tossicologici.....	15
Quadro normativo.....	15
Utilizzo in agricoltura.....	15
Vinclozolina.....	16
Aspetti biochimici	17
Dati tossicologici.....	17
Quadro normativo.....	18
Utilizzo in agricoltura.....	18
Clozolate	19
Aspetti biochimici	19
Dati tossicologici.....	19
Quadro normativo.....	20
Utilizzo in agricoltura.....	20
3,5-dicloroanilina	21
Aspetti biochimici	21
Dati tossicologici.....	21
Quadro normativo.....	22
Presenza in agricoltura.....	22
Fungicidi dicarbossimidici negli oli di oliva: un'apparente anomalia	23
Definizione dei fenomeni di deriva, lisciviazione e percolazione dei PF.....	24
Deriva	24
Lisciviazione e percolazione	26
Metodi reperibili in letteratura per la determinazione dei PF	28

PARTE SPERIMENTALE

Scopo del lavoro	33
Metodo di analisi	34
Campionamento	34
Principio del metodo	34
Reattivi e materiali	34
Apparecchiature	35
Procedimento	35
Analisi	35
Condizioni strumentali HPLC	35
Validazione del metodo analitico	37
Risultati	38
Parametri di validazione.....	38
Risultati del monitoraggio dei dicarbossimidici nell'olio d'oliva	42
Conclusioni	45
Bibliografia	46

INTRODUZIONE

I Prodotti Fitosanitari (PF) sono preparati contenenti una o più sostanze attive in grado di garantire e/o migliorare la produzione agricola. I PF evitano che colture e prodotti siano danneggiati da organismi ad essi nocivi, per esempio eliminando o riducendo attacchi da parte di parassiti o competizioni con erbe infestanti. I PF hanno un ruolo essenziale nel garantire un approvvigionamento annuale costante di prodotti agricoli, nel limitare l'impiego di manodopera e nel ridurre la domanda di terreni adibiti a colture alimentari, liberando superfici da destinare ad altri usi. Il termine "PF" ha sostituito i vecchi termini di fitofarmaci, presidi fitosanitari, antiparassitari e pesticidi (DL.vo 194/1995 e DPR 290/2001) (1, 2). In funzione della loro attività i PF si possono classificare in: acaricidi, avicidi, battericidi, biocidi, diserbanti (erbicidi e algicidi), fungicidi (o anticrittogamici), fisiofarmaci, fitoregolatori, fumiganti, insetticidi, molluschicidi (o limacidi), nematocidi, ovicidi, repellenti e attrattivi, rodenticidi (topicidi e talpicidi) e viricidi. I principali impieghi per cui i PF possono essere autorizzati, sono: agricoltura, orticoltura, viticoltura, colture protette (serre), silvicoltura, conservazione dei prodotti vegetali, zootecnia, giardini e parchi e protezione delle piante da interni.

Con circa 320.000 tonnellate annue di sostanze attive vendute, l'Unione Europea (UE) rappresenta oggi un quarto del mercato mondiale dei PF. I tipi di prodotti maggiormente impiegati sono i fungicidi (43% circa del mercato), seguiti da erbicidi (36%) e dagli insetticidi (12%). Nel 2000 le sostanze attive più vendute in Italia sono state il fungicida zolfo (14 ton), i diserbanti a base di dicamba (13 ton) e di glifosate (8 ton), l'insetticida olio minerale (6 ton), i fungicidi rame ossicloruro (4 ton) e mancozeb (4 ton).

L'elevata tossicità di alcuni PF pone rischi e costi connessi con il loro uso. I rischi possono insorgere in seguito all'esposizione diretta (operai industriali addetti alla produzione dei PF e operatori addetti all'applicazione sulle colture) o indiretta (consumatori e persone presenti in loco). Gli agricoltori sono la categoria più esposta al rischio d'intossicazione acuta per inalazione e contatto diretto. La popolazione generale invece può essere soggetta ad eventuali effetti tossici cronici dovuti alla persistenza delle sostanze, al loro bioaccumulo e agli effetti irreversibili quali, ad esempio, cancerogenicità ed effetti negativi sul sistema immunitario e su quello endocrino.

Per quanto riguarda i rischi per l'ambiente, la deriva di nebulizzazione, la lisciviazione e lo scolo sono fonti diffuse di propagazione incontrollata di PF nell'ambiente, che comportano un inquinamento dei suoli e delle acque. L'uso dei PF può anche avere effetti tossici sul sistema immunitario o endocrino di mammiferi, pesci e uccelli ed effetti indiretti sugli ecosistemi, come per esempio l'impoverimento della biodiversità. Stabilire gli effetti tossici a lungo termine di una sostanza è molto difficile, ecco perché la legislazione fissa tempi di sospensione e limiti massimi di tolleranza con ampi margini di sicurezza. Residui di PF si possono trovare negli alimenti in seguito ai trattamenti, ma anche in seguito a contaminazione ambientale d'acque e terreni, dovuta per esempio a scarichi industriali e urbani. Le sostanze autorizzate per i trattamenti sono disciplinate in Italia dal DL.vo 194/1995 (1), recepimento della Direttiva CEE 414/1991 (3). Attualmente è in corso in UE la revisione delle autorizzazioni di tutti i PF che erano in commercio il 26/07/1993. Il Reg. CE 2076/2002 (4) ha prorogato il termine per tale revisione al 2008. Il DM 18/12/2003 (5), recepimento delle Direttive 60/2003/CE, 62/2003/CE e 69/2003/CE, stabilisce in Italia i Limiti Massimi di Residuo (LMR) di sostanze attive contenute nei PF tollerati nei prodotti alimentari, nonché gli intervalli minimi di sicurezza (tempi di sospensione) che devono intercorrere tra l'ultimo trattamento e la raccolta, affinché la sostanza attiva in questione si degradi lasciando solo tracce in concentrazioni accettabili negli alimenti.

La persistenza di una sostanza chimica in una coltura o in un prodotto agricolo dipende da molti fattori: la singola molecola, il tipo di suolo, l'umidità e il pH del terreno, l'estensione delle colture, le tecniche di conservazione. In base a questi parametri i vari PF si possono dividere come riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Persistenza nell'ambiente di alcune classi di PF

Categoria	Durata attività	Esempi di PF
Non persistenti	Da 1 a 12 settimane	Organofosfati
Moderatamente persistenti	Da 1 a 18 mesi	Carbammati
Persistenti	Da 2 a 5 anni	Organoclorurati
Permanenti	Degrado a residuo permanente	Contengono Mercurio (Hg), Arsenico (As), Piombo (Pb)

Difficilmente un solo PF è sufficiente per proteggere una coltura: più spesso se ne usano diversi, in periodi temporali successivi. Ci sono prodotti che si spandono sul terreno prima della semina, altri che preservano i semi affinché possano germogliare, poi quelli che difendono la pianta e, infine, quelli che proteggono i frutti fino al momento della raccolta. La valutazione del rischio, che porta alla definizione degli LMR e dei tempi di sospensione, avviene ancora oggi per singoli PF. Tuttavia esistono vari approcci per la valutazione di miscele, poiché non si possono escludere effetti sinergici o antagonisti tra più sostanze compresenti su uno stesso alimento o comunque nella dieta d'ogni individuo. Le prime stime di rischio di miscele di PF non hanno tuttavia evidenziato rilevanti elementi di preoccupazione, perché le concentrazioni tollerate negli alimenti in base ai LMR sono sufficientemente basse da escludere generalmente l'esistenza di fenomeni di potenziamento/sinergia d'effetti tossici.

Il rapporto è diviso in due parti: una di carattere generale sui fungicidi dicarbossimidici utilizzati come PF in agricoltura, e una relativa allo studio sperimentale condotto per verificare la presenza dei residui di fungicidi in campioni di olio di oliva e di olio extravergine di oliva di produzione nazionale.

Parte generale

PRODOTTI FITOSANITARI

Formulazioni commerciali

Nello studio dei PF e dei loro effetti è importante conoscere la loro formulazione commerciale che può variare da prodotto a prodotto per specificità di azione e caratteristiche chimico-fisiche ma che in linea generale può essere così schematizzata:

- *Principio o sostanza attiva (PA)*
È la sostanza che esplica l'azione tossica contro il patogeno ed è importante conoscerne le caratteristiche chimico-fisiche come ad esempio solubilità in acqua, solubilità in solventi organici, pH, punto di fusione, stabilità chimica. Il PA può essere liquido o solido: tra questi ne troviamo di idrosolubili e poco solubili in acqua.
- *Coadiuvanti*
Aumentano l'efficacia delle sostanze attive e migliorano la distribuzione, vi sono diverse categorie di coadiuvanti:
 - *Solventi*
Il più comune è l'acqua; generalmente sono sostanze liquide in grado di sciogliere altre sostanze (idrocarburi alifatici, aromatici, glicoli, chetoni).
 - *Disperdenti*
Impiegati per i PF che si presentano in polvere, caricano elettricamente le particelle ritardandone la sedimentazione ed evitano l'agglomerazione delle particelle di principio attivo e inerti finemente macinati.
 - *Emulsionanti*
Impiegati per i PF liquidi, sono tensioattivi formati da una parte idrofila e una parte idrofoba.
 - *Bagnanti*
Hanno la funzione di far diminuire la tensione superficiale delle goccioline di miscela aumentandone così la superficie e favorendo una migliore distribuzione dei PF sulla vegetazione.

Nei preparati commerciali di PF possiamo trovare inoltre un'altra categoria di sostanze utilizzate nella formulazione; gli *Additivi* che sono miscele complesse e si distinguono in:

- *Oli minerali*
Idrocarburi alifatici (C₁₀-C₆₀) che esplicano la funzione di migliorare la distribuzione e il contatto vegetale-principio attivo.
- *Oli vegetali*
Esteri di acidi grassi e glicerolo, non fitotossici, che limitano la fotodecomposizione del principio attivo, migliorano la penetrazione e il potere ricoprente e riducono il fenomeno di deriva.

Le formulazioni dei fitofarmaci che si trovano in commercio sono molteplici, e ognuna di queste differisce per stato fisico e quindi per le modalità di preparazione e impiego in campo:

- *Polveri secche*
Sono una miscela di principio attivo, in genere presente a basse percentuali, (<10%, eccetto che per lo zolfo) e di vettori minerali (silice, argilla e talco).

- *Polveri bagnabili*
Il principio attivo è miscelato a inerti e macinato, questo tipo di formulazione assicura una buona dispersione e sospensione in acqua.
- *Soluzioni e polveri solubili in microcapsule*
Il principio attivo è inglobato in capsule che permettono la fuoriuscita della sostanza attiva in maniera graduale.
- *Sospensioni concentrate (paste o flawable)*
Il principio attivo è macinato in acqua per mezzo di mulini fino a portarlo alle dimensioni di 1-4 µm. I vantaggi dell'impiego sono dati dalla facilità di miscelazione con altri formulati, alla maggiore copertura e resistenza al dilavamento e da una degradazione rapida nel terreno.
- *Emulsioni concentrate*
Il principio attivo è sciolto in solventi organici, l'aggiunta di un emulsionante impedisce la separazione dei due liquidi.

Quadro normativo

Il quadro normativo europeo di riferimento relativo all'immissione sul mercato e alla commercializzazione dei PF per uso agricolo è definito dalla Direttiva 91/414/CEE (3), recepita in Italia dal DL.vo 194 del 17/03/1995 (1) e dal DPR 290 del 23 aprile 2001 (2). La direttiva stabilisce che le sostanze attive contenute nei PF sono approvate per l'uso nell'Unione Europea solo a seguito di una specifica autorizzazione derivante da un'attenta valutazione della sicurezza dei prodotti stessi nonché dei possibili effetti nocivi sulla salute dell'uomo, degli animali e dell'ambiente.

Al momento dell'autorizzazione all'immissione in commercio di un PF, viene fissato su ogni prodotto di origine vegetale l'LMR per la sostanza attiva presente nel PF.

La prima direttiva europea in materia di livelli massimi di residui di PF risale alla Direttiva 76/895/CEE del Consiglio, del 23 novembre 1976 (6), che fissa le quantità massime di residui dei PF consentiti sugli e negli ortofrutticoli. Da quel momento, innumerevoli sono state le Direttive adottate dal Consiglio e dalla Commissione Europea ai fini della definizione di oltre 45.000 livelli massimi di residui ammessi nei prodotti di origine animale, nei prodotti ortofrutticoli e nei prodotti cerealicoli.

Tuttavia, nonostante il notevole normativo sforzo compiuto dall'UE, più di 10.000 combinazioni di PF e prodotti vegetali restavano fuori da ogni tipo di regolamentazione comunitaria, motivo per cui ogni Stato membro era libero di stabilire autonomamente i propri livelli massimi di residui consentiti relativamente ad una vasta gamma di prodotti alimentari.

È evidente come, nell'ottica di un mercato interno caratterizzato dalla libera circolazione di merci, persone, servizi e capitali, tale situazione comportasse notevoli incertezze e difficoltà tanto per i commercianti che per i consumatori. Da un lato, infatti, l'import/export dei generi alimentari era subordinato al rispetto di ben 27 liste di LMR (una per ogni Stato membro); dall'altro, la possibilità che un alimento con un LMR superiore al limite tollerato in un determinato Stato membro potesse, invece, essere accettabile per altri Stati membri creava un certo grado di apprensione in merito alla qualità e alla sicurezza dei prodotti alimentari in circolazione.

Oggi gli LMR sono disciplinati in Italia dal DM 27 agosto 2004 (integrato con i successivi aggiornamenti di cui l'ultimo DM 23.07.2008), che contiene i limiti massimi di residui fissati a livello comunitario e i limiti massimi di residui fissati a livello nazionale (7).

La normativa vigente risponde alla fondamentale esigenza di assicurare, a partire dalla fase di sperimentazione del PF, della sua registrazione fino all'ultimo stadio della sua utilizzazione, le necessarie autorizzazioni al fine di preconstituire, attraverso procedure adeguate, vari strumenti di controllo. I PF sono classificati in base alla loro maggiore o minore tossicità. Per ciascuno di essi la legge prevede un intervallo di sicurezza, vale a dire un preciso intervallo di tempo tra l'ultimo trattamento e la raccolta dei prodotti, o nel caso di trattamenti post-raccolta, tra l'applicazione del prodotto e l'immissione sul mercato.

Gli LMR (o limiti legali) sono stabiliti in funzione:

- 1) delle caratteristiche tossicologiche della sostanza attiva contenuta nel PF (o dei suoi metaboliti);
- 2) del rischio di esposizione del consumatore alla sostanza attiva valutato mediante il confronto fra la quantità di PF assumibili con la dieta e la Dose Giornaliera Accettabile (DGA) (Dose Giornaliera Ammissibile, assumibile per tutta la vita senza apprezzabile rischio per la salute);
- 3) dell'utilizzazione del pesticida secondo la Buona Pratica Agricola (BPA), ossia sulla base del rispetto delle condizioni di impiego (dosi, numero di trattamenti, intervallo di sicurezza) riportate nell'etichetta, applicate in modo tale che il livello del residuo che non può risultare sia il più basso possibile e comunque inferiore al limite tossicologico.

L'autorizzazione all'impiego dei prodotti commerciali è concessa dal Ministro della Salute, solo se la somma dei limiti massimi autorizzati per ogni sostanza sulle diverse colture, considerando la dieta, non supera il valore della DGA.

I limiti massimi di residui previsti su ciascuna coltura, in quanto limiti legali (e non tossicologici), possono variare fra le diverse nazioni. Tuttavia, tra gli Stati aderenti all'Unione Europea, per evitare inconvenienti nel libero scambio dei prodotti agricoli, è in fase di attuazione un processo di armonizzazione dei limiti legali che consentirà di uniformare le diverse legislazioni nazionali attualmente in vigore.

La stessa normativa prevede adeguati interventi formativi, nell'intento di educare gli stessi operatori coinvolti ad adottare misure di prevenzione degli eventi e delle situazioni in grado di nuocere alla salute umana e di procurare danno all'ambiente.

Nel settembre del 2008, con l'entrata in vigore del Reg. CE 396/2005 (8), concernente i livelli massimi di residui dei PF nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale, il panorama europeo, in materia di residui è cambiato notevolmente.

Il Reg. CE 396/2005 (8) si applica a tutti i prodotti agricoli destinati al consumo umano e animale, sia come alimenti o mangimi freschi che come prodotti trasformati e/o composti, che potrebbero contenere al loro interno, o anche in superficie, residui di PF e procede, attraverso sette allegati, all'elencazione di:

- una lista completa dei prodotti agroalimentari a cui si applica il regolamento, secondo quanto già definito dal Reg. CE 178/2006 (9) (Allegato I);
- una lista dei livelli massimi di residui validi in tutta l'UE già prima della riforma (Allegato II);
- una lista dei livelli massimi di residui che prima della riforma erano stabiliti in autonomia dai singoli Stati membri ma che, grazie ad un laborioso processo di armonizzazione, risultano attualmente validi in tutta l'UE (Allegato III);
- una lista di PF a basso rischio, per cui non è necessario stabilire dei livelli massimi di residui (Allegato IV);

- una lista di PF per cui, come livello massimo di residui consentito, si applica un valore generale pari allo 0,01 mg/kg (Allegato V – ancora da pubblicare);
- una lista dei fattori di conversione dei livelli massimi di residui per i prodotti alimentari trasformati (Allegato VI – ancora da pubblicare);
- una lista di PF utilizzati come fumiganti, per i quali gli Stati membri sono autorizzati ad applicare deroghe speciali prima che i relativi prodotti vengano immessi sul mercato (Allegato VII).

Attualmente, il panorama legislativo comunitario in materia di PF è oggetto di una estesa riforma, proposta dalla Commissione Europea e recentemente approvata dal Consiglio e dal Parlamento Europeo, con il duplice obiettivo di introdurre una nuova direttiva quadro sull'uso sostenibile dei PF nonché di modificare la vigente Direttiva 91/414/CEE (3) definendo criteri ancora più rigorosi per l'approvazione e la commercializzazione dei PF.

L'obiettivo è quello di rafforzare la protezione sia dell'ambiente che della salute umana e animale, imponendo agli Stati membri l'adozione di tutte le misure necessarie ad incentivare una difesa fitosanitaria con uso limitato di PF, privilegiando, in tal modo, tutte quelle pratiche o quei prodotti che, pur raggiungendo lo scopo prefissato, presentano un fattore di rischio minore per l'ambiente e la salute dell'uomo, a tutto vantaggio dell'agricoltura biologica, di tecniche colturali alternative e di metodi più equilibrati di fertilizzazione e irrigazione del terreno.

La riforma entrerà in vigore nel 2011: da quel momento, gli Stati membri avranno a disposizione un periodo di cinque anni al fine di adottare "piani di azione nazionali" che stabiliscano degli obiettivi quantitativi di utilizzo dei PF e definiscano tempi e misure per la riduzione dei rischi e dell'impatto ambientale derivante dalla loro immissione. Nello stilare i propri piani d'azione, gli Stati membri dovranno tenere in considerazione sia l'impatto sanitario, sociale, economico e ambientale delle misure previste che le singole condizioni e circostanze a livello nazionale, regionale e locale.

Per quanto riguarda, invece, il monitoraggio e il controllo delle tipologie di PF utilizzati, l'Unione Europea ha deciso di procedere attraverso due diverse direttrici:

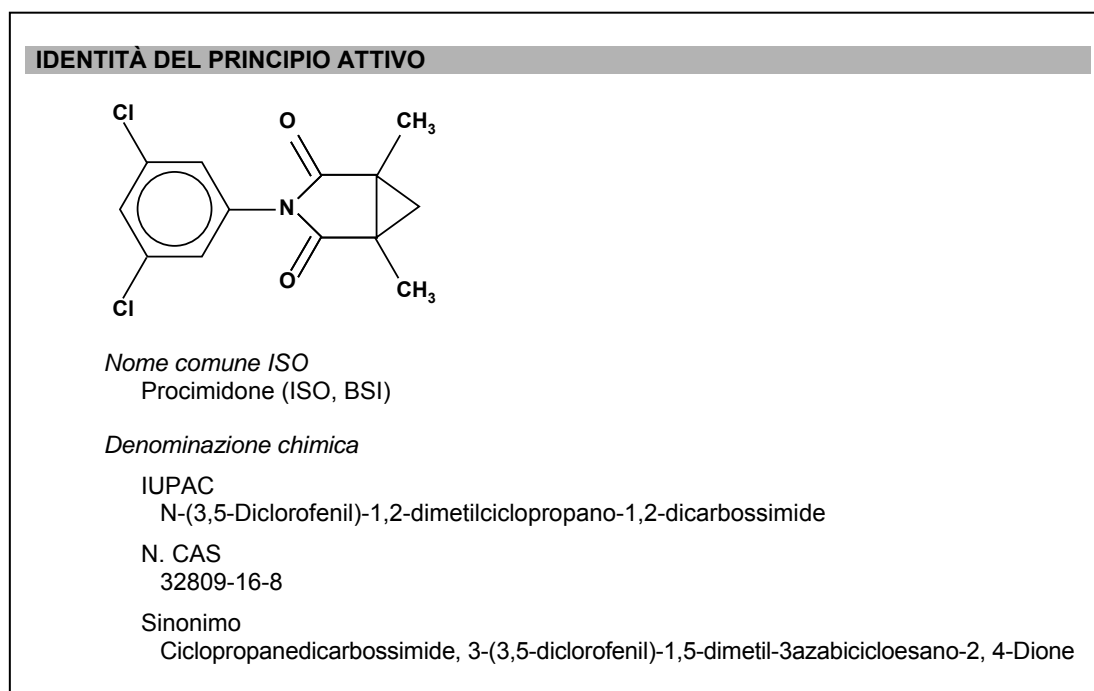
- 1) elaborazione di un elenco delle sostanze attive autorizzate, sulla base di criteri e procedure stabiliti dallo stesso regolamento, affidando un ruolo fondamentale all'Autorità europea per la sicurezza alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA). L'eventuale immissione di un PF non contemplato nel suddetto elenco sarà subordinata all'ottenimento di una specifica autorizzazione da parte dello Stato membro competente, in base sia alle disposizioni comunitarie che al tipo di area agricola interessata e al motivo di utilizzazione di quella determinata sostanza;
- 2) progressivo divieto di immissione dei PF altamente nocivi, per un periodo complessivo della durata di dieci anni. In particolare, sarà vietato l'uso dei PF in aree specifiche, quali parchi, giardini pubblici, aree ricreative, cortili scolastici e parchi gioco, nonché nelle aree adiacenti strutture sanitarie.

FUNGICIDI DICARBOSSIMIDICI

Si riportano di seguito le denominazioni IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e il numero CAS (*Chemical Abstracts Service*) dei quattro fungicidi dicarbossimidici e del relativo prodotto di degradazione comune con alcuni cenni sulle caratteristiche biochimiche, tossicologiche e di impiego desunte dalle valutazioni fatte dalla Commissione della *Food Agriculture Organization* e dalla *World Health Organization* nei *Joint Meeting Pesticides Residue* (FAO/WHO JMPR). Inoltre viene indicato lo stato dell'arte a livello normativo.

Procimidone

Il procimidone è stato valutato dalla FAO/WHO JMPR nel 1981, 1982, 1989 e nel 1998 (10). È un fungicida dicarbossimidico inibente la germinazione delle spore, la crescita dei miceli e la sintesi dei trigliceridi nei funghi. È utilizzato in frutticoltura, viticoltura e orticoltura contro la *Botrytis* spp., la *Sclerotinia* spp., la *Monilia* spp., la *Alternaria* spp., la *Fusarium* spp. e il *Rhizoctonia* spp.



Aspetti biochimici

Studi condotti con il ^{14}C hanno dimostrato che il procimidone (radioattivo) somministrato fino a 100 mg/kg sia nei topi che nei ratti, viene rapidamente assorbito (C_{max} 2-8 h) ed eliminato (> 80% in 2 h).

A dosi più elevate, la percentuale escreta nelle feci aumenta; a 250 mg/kg di peso corporeo, il 24-33 % viene eliminata dopo 168 h. L'incremento della radioattività fecale è riconducibile ad un aumento del procimidone non assorbito (il 18-27% della dose somministrata). Solo bassi livelli (< 0,3%) di radioattività sono stati rilevati 168 h dopo la somministrazione orale, mentre i livelli più elevati sono stati riscontrati nel grasso.

La principale via metabolica per il procimidone nei topi e nei ratti, si basa sull'ossidazione dei gruppi metilici dei derivati acidi idrossimetilici o carbossilici, sul taglio dei gruppi ammidici e sulla glucuronide formazione dei metaboliti risultanti. Nelle scimmie, nei conigli e nei ratti chimerici con fegato umanizzato (ripopolato di epatociti umani), si è verificata una maggiore escrezione urinaria dei coniugati glucuronidi rispetto a topi e ratti normali.

Nei ratti i derivati glucuronidi presenti nella bile, si decongiungono e l'aglicone si riassorbe portando a una prolungata fase di eliminazione e ad una AUC (*Area Under Curve*, area sotto la curva, quantità di principio attivo presente nel flusso ematico in un intervallo di tempo, dopo somministrazione) relativamente alta.

In studi condotti *in vitro* su preparati di fegato di uomo, coniglio, ratti e scimmie, è stato dimostrato che il tasso del metabolismo del procimidone e dell'idrossi-procidone è significativamente inferiore nei ratti rispetto alle altre specie considerate.

Il procimidone ha un'elevata affinità di legame *in vitro* (92-98%) per le proteine del plasma quando viene incubato con il plasma dei ratti, delle scimmie, dei conigli e umano.

Alcuni studi cinetici sono stati poi effettuati nei ratti, conigli e scimmie per indagare gli effetti sull'apparato riproduttivo.

Dopo una singola dose, le scimmie hanno valori di C_{max} molto più bassi della totale radioattività rispetto ai conigli e ai ratti, ma a dosi fino a 125 mg/kg di peso corporeo, i conigli hanno valori di AUC bassi a causa della rapida eliminazione.

Nelle scimmie il componente predominante nel plasma è il procimidone; nei conigli i metaboliti acidi mentre nei ratti i metaboliti alcolici.

Dopo la somministrazione di 14 dosi alla concentrazione di 37,5-500 mg/kg di peso corporeo giorno, i valori di C_{max} e AUC per la radioattività totale erano simili sia nei topi che nelle scimmie.

Questi risultati dimostrano che le dosi somministrate negli studi per lo sviluppo della tossicità nelle scimmie, hanno prodotto una concentrazione plasmatica della radioattività, ma con un differente profilo metabolico.

Nelle indagini sul trasferimento del procimidone e dei metaboliti nel feto ci sono differenze tra le specie.

Dopo somministrazione di dosi pari a 125 mg/kg di peso corporeo giorno, la concentrazione del procimidone e dei metaboliti nel feto è significativamente maggiore nei ratti piuttosto che nei conigli o nelle scimmie, così come la concentrazione relativa del metabolita idrossi-procidone (PCM-CH₂OH) (10).

Dati tossicologici

Il procimidone ha una bassa tossicità per via orale (*Lethal Dose 50%*, LD₅₀ > 5000 mg/kg di peso corporeo) per via cutanea (LD₅₀ > 2500 mg/kg di peso corporeo) e dopo 4 h di esposizione per via inalatoria (LD₅₀ > 1,5 mg/kg di peso corporeo).

Il DGA, fissato a 0-0,1 mg/kg di peso corporeo (11), si basa su un NOAEL (*No-Observed Adverse Effect Level*) di 125 mg/kg di peso corporeo al giorno. In studi sub-cronici, è stato rilevato un minimo aumento di incidenza di tumori nel fegato nei topi, nei ratti invece una diminuzione di peso a dosi di 48 e 97 mg/kg di peso corporeo al giorno. A queste dosi, è stata diagnosticata una iperplasia interstiziale testicolare e ovarica delle cellule stromali. Il NOAEL

per la tossicità generale e per la carcinogenicità è risultato di 14 mg/kg di peso corporeo al giorno.

Negli studi condotti sui ratti di seconda generazione, sono stati riportati infertilità e anomalie degli organi sessuali maschili sia negli adulti che nei neonati a un livello di dose di 50 mg/kg.

Gli effetti sulla riproduzione e sull'induzione dei tumori nei testicoli dei ratti in studi a lungo termine, vengono interpretati sulla base degli effetti del procimidone sul sistema endocrino.

È stato rilevato che il pesticida si lega al recettore degli androgeni con una affinità simile a quella del farmaco antiandrogeno, Flutamide, utilizzato per il trattamento dei tumori della prostata.

Nei ratti il meccanismo di azione prevede il coinvolgimento dei recettori degli androgeni, perturbando i controlli di feedback sull'LH (*Luteinizing Hormone*, ormone luteinizzante ipofisario) e sui livelli del testosterone.

Sebbene questo modello di azione sia rilevante nell'uomo, ci sono prove a suggerire che l'essere umano rispetto ai ratti, è meno sensibile ai tumori interstiziali dei testicoli indotti chimicamente, a causa delle differenze nella sensibilità dell'LH sul numero dei recettori delle cellule di Leydig e nell'espressione dei recettori per l'LH.

Inoltre il procimidone ha dato esito negativo in saggi per la teratogenicità e mutagenicità sia nei ratti che nei conigli.

Allo stato attuale l'EPA (*Environmental Protection Agency*) ha classificato questa sostanza come possibile cancerogeno per l'uomo.

Quadro normativo

Il procimidone risponde ai medesimi requisiti in Italia come in Europa, perché i protocolli che utilizziamo oggi per la registrazione sono protocolli approvati dalla UE.

Il primo protocollo risale alla direttiva 91/414/CEE recepita con il DL.vo 194 del 17 marzo 1995 relativa all'immissione in commercio dei PF, successivamente è stata aggiornata con la direttiva 2006/132/CE per l'iscrizione nell'allegato I (12).

L'iscrizione di una sostanza attiva nell'allegato I è possibile per un periodo non superiore a dieci anni, ed è effettuata solo se si può ritenere che i PF che la contengono soddisfino i seguenti requisiti:

- a) assenza di effetti nocivi sulla salute dell'uomo e degli animali nonché sulle acque sotterranee e di effetti inaccettabili sull'ambiente, correlati ai residui derivanti da un'applicazione del preparato in conformità alle buone pratiche fitosanitarie, nonché la possibilità di determinare detti residui, se significativi dal punto di vista tossicologico o ambientale, con metodi analitici di applicazione corrente;
- b) assenza di effetti nocivi sulla salute dell'uomo e degli animali e di effetti inaccettabili sull'ambiente, associati all'impiego dei preparati, secondo un'applicazione conforme ai principi delle buone pratiche fitosanitarie;

Per l'iscrizione inoltre si tiene conto, dei seguenti elementi: della DGA per l'uomo; il livello ammissibile di esposizione dell'operatore; la stima del destino e della distribuzione nell'ambiente nonché dell'impatto sulle specie non bersaglio.

Tuttavia dalla relazione di valutazione della sostanza attiva procimidone riesaminata dalla Commissione nell'ambito del Comitato permanente per la catena alimentare il 3 marzo 2006, sono emerse preoccupazioni per quanto concerne i suoi effetti tossici intrinseci, in particolare potrebbe interferire con il sistema endocrino. Attualmente l'organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economici (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico, OCSE) sta elaborando orientamenti sulle prove allo scopo di affinare ulteriormente la valutazione dei

possibili effetti nocivi sul sistema endocrino; al termine il procimidone sarà sottoposto ad esame ulteriore.

Per cui nella Direttiva 2006/132/CE, si evince la necessità di attuare restrizioni riguardanti il periodo di iscrizione e le colture su cui l'impiego è autorizzato.

La proposta originariamente presentata dal comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali, prevedeva di limitare a sette anni il periodo di iscrizione.

Alla luce del riesame si è ridotto il periodo da sette anni a diciotto mesi con la finalità di ridurre ulteriormente i rischi garantendo una nuova valutazione prioritaria della sostanza. La sostanza attiva procimidone è stata iscritta nell'allegato I della direttiva dal 1 gennaio 2007 fino al 30 giugno 2008.

Inoltre, allo stato attuale l'EPA ha classificato questa sostanza come possibile cancerogeno per l'uomo, sull'evidenza anche del fatto che può persistere per parecchie settimane al suolo con pericolo di contaminazione delle falde acquifere.

Utilizzo in agricoltura

Il procimidone è un fungicida utilizzato nelle piante da frutto e nelle orticole, viene somministrato con frequenza sulle parti aeree fino a poco prima del raccolto al fine di evitare la formazione della muffa durante il trasporto e la distribuzione.

È usato anche per le giovani piante e/o lo strato superficiale del suolo contro le malattie (da Sclerotinia, Botrytis cinerea).

Una delle frequenti applicazioni del procimidone, riguarda la vite, dal momento che la difesa antiparassitaria è un delicato aspetto della viticoltura specializzata che ha l'esigenza di produrre uva sana sia dal punto di vista della sua integrità commerciale, sia per l'assenza di residui di PF.

I principali parassiti noti in viticoltura sono la *Plasmopara viticola*, la *Uncinula necator* e la *Botrytis cinerea*.

Attualmente la muffa grigia, ovvero la Botrytis cinerea, è la malattia che provoca i danni più ingenti nei vigneti di tutto il mondo.

A seguito dell'infezione si verificano alterazioni a carico degli acini che interessano il metabolismo cellulare causando modificazioni della composizione chimico-fisica e biologica (13, 14).

Nel programma di difesa contro la Botrytis sono stati utilizzati diversi fungicidi, ma buoni risultati sono stati ottenuti solo con alcuni derivati attivi della 3,5-dicloroanilina (3,5-DCA) appartenenti alla famiglia dei dicarbossimidi come la vinclozolina, l'iprodione, il clozolate e il procimidone (15, 16).

L'utilizzo dei fungicidi è in continuo incremento poiché la loro corretta applicazione non comporta problemi di interesse pubblico in materia di salute e ambientale.

Tuttavia, sebbene una perdita dei PF si verifichi durante la vinificazione, è possibile trovare consistenti residui nel vino come conseguenza di frequenti applicazioni di ingenti dosi, connessi ad un non appropriato rispetto di intervallo di tempo tra il trattamento e il raccolto (17, 18).

Numerose indagini sperimentali sono state condotte sul trattamento e sui residui dei PF nei vigneti di Italia.

In Sardegna, è stato finanziato un programma di controllo dei residui dei PF sui vini nell'isola, finalizzato al miglioramento e alla certificazione della qualità.

Nei campioni la totale assenza o la diminuzione dei residui, tra cui quelli del procimidone, è stata attribuita al processo di trasformazione dell'uva nel vino, soprattutto in caso di vinificazione con successiva macerazione (19).

Similmente, in uno studio effettuato per determinare in quale misura i residui del fitofarmaco si accumulavano nelle uve, dopo tre trattamenti con il preparato ad intervalli mensili, i risultati

hanno dimostrato che i livelli di residui del fungicida diminuiscono durante la vinificazione (20).

Risultati discordanti sono stati riportati da Dugo e i suoi collaboratori (21) che hanno rilevato in campioni di uva raccolti nel vigneto situato sul monte Etna, una quantità variabile di procimidone compresa tra 0,1 e 2,0 µg/kg.

La presenza del fungicida è stata riscontrata sia nell'uva che ha subito il lavaggio, sia nei vini dopo 150 giorni dall'irrorazione.

Di particolare importanza risulta lo studio effettuato da Cabras (22) sui fattori che influenzano la probabilità di trovare residui dei PF nel vino, quali la velocità di fermentazione, la temperatura, l'agitazione e il tempo di macerazione. La quantità di procimidone rilevata nei vini è stata di 10 mg/L.

Il procimidone secondo il DM del 27 agosto 2004, è presente nell'elenco dei prodotti PF ammessi alla difesa della vite.

Dato il frequente impiego del PF nei vigneti, la comunità europea ha stabilito le quantità massime di residui, che riflettono l'uso delle quantità minime necessarie per una lotta antiparassitaria adeguata.

L'LMR per il PF nell'uva è di 5 µg/kg mentre per il vino è di 0,5 µg/kg.

Un altro campo di applicazione del PF riguarda i vegetali, in particolare sono stati condotti studi sulla presenza dei residui del procimidone nella lattuga, pomodori e nel cetriolo coltivati nelle serre.

Le concentrazioni dei residui differiscono tra le specie di ortaggi trattati e dipendono dal tempo di raccolta, dalle dimensioni e dalla modalità di applicazione del prodotto chimico.

Nel tempo non sono state rilevate differenze nelle concentrazioni dei residui, derivanti da una o due somministrazioni del fungicida, ad eccezione della lattuga. Il residuo contenuto nel cetriolo coltivato ad uso industriale, è stato superiore al limite legale (3 mg/kg), tuttavia con il lavaggio è stato eliminato circa il 22-24% del residuo mentre sbucciandolo circa il 79-85%.

Di conseguenza è ragionevole affermare che si possano effettuare una o due applicazioni del procimidone con un lasso di tempo di 14 giorni, mentre una soltanto per il cetriolo destinato al consumo in insalate.

Nel pomodoro invece, la concentrazione del PF rilevata in inverno è superiore a quella del raccolto del vegetale in primavera.

Inoltre a prescindere dai vegetali i livelli di residuo del procimidone sono più bassi in quelli maturi rispetto a quelli acerbi e più piccoli di dimensione (23).

Di particolare importanza risulta lo studio effettuato da Mehmet (24), il quale ha esaminato l'applicazione del fungicida sui pomodori coltivati nelle serre in tempi diversi.

I livelli di residuo diminuiscono a seconda dell'intervallo di tempo che intercorre tra la pre- e la post-raccolta e a seguito dei trattamenti di lavaggio, sbucciatura e del tempo di stoccaggio effettuato a 4° C per 7 e 14 giorni.

L'utilizzo del procimidone, come si evince in letteratura, è esteso anche alle piantagioni di fragole.

In particolare il tasso di residuo del PF, è stato stimato durante la lavorazione per il succo di fragola, il vino e la marmellata.

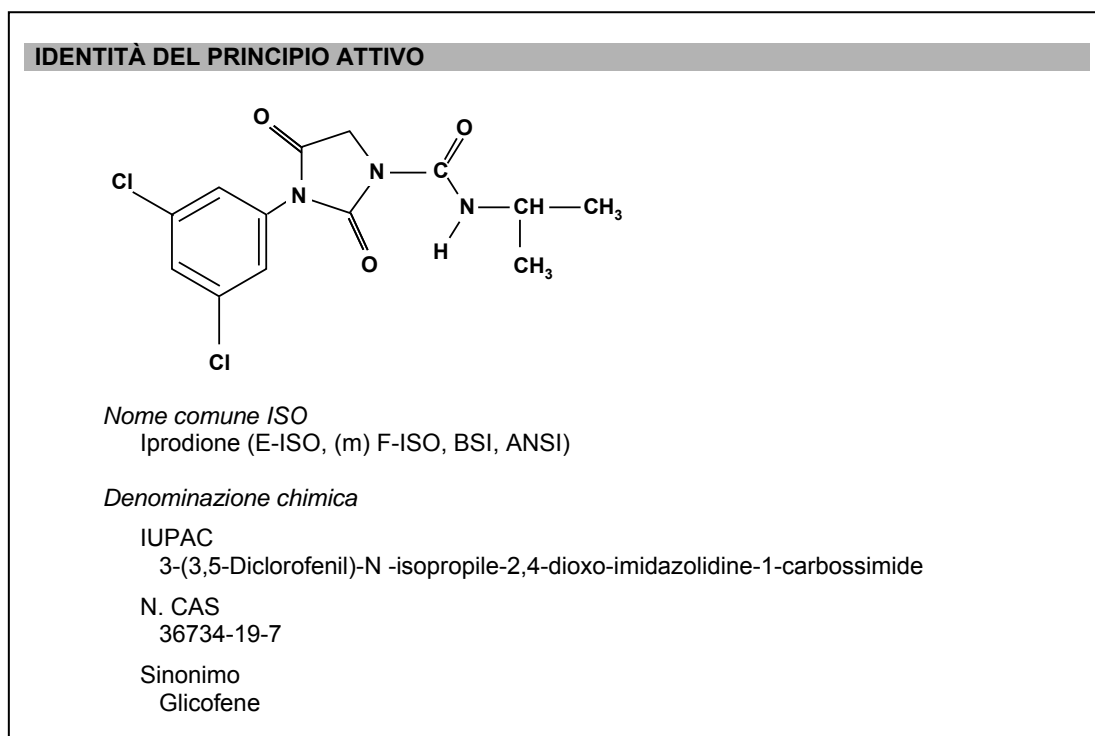
Un controllo dei campioni non trattati, è stato confrontato con le materie prime trattate con dosi raccomandate del PF e con un campione avente un tasso di applicazione sei volte più elevato.

Il residuo più elevato è stato rilevato nella polpa dopo la pressione del frutto mentre valori più bassi sono stati registrati nei succhi di frutta e nei vini. Ciò dipende da alcuni passaggi nel processo di lavorazione quali la spremitura e la chiarificazione responsabili della diminuzione di residuo del fungicida dal 50 al 100%.

Al contrario se il frutto è trasformato come nella preparazione di frutta o marmellate, i residui sono elevati per mancanza dei passaggi di trasformazione (25).

Iprodione

L'iprodione è stato valutato dalla FAO/WHO JMPR nel 1977 e nel 1992 (26). È un fungicida dicarbossimide con proprietà protettive ed eradicante, in particolare inibisce la germinazione delle spore e la crescita dei miceli nei funghi. Viene utilizzato per il controllo delle malattie in frutticoltura, viticoltura, orticoltura, nei raccolti di cotone, girasole, cereali, e può essere impiegato come fungicida post-raccolta e per il trattamento dei sementi.



Aspetti biochimici

La farmacocinetica è stata studiata nei ratti mediante somministrazione dell'iprodione radioattivo a vari dosaggi.

Campioni di sangue, urine e feci sono stati prelevati dopo 7 giorni di trattamento. A seguito di una singola somministrazione a bassa dose (50 mg/kg di peso corporeo giorno), il 90% del PF è stato eliminato in 4 giorni principalmente attraverso le urine. L'escrezione urinaria correlata con un maggiore assorbimento della dose, è stata più evidente nei maschi rispetto alle femmine. I picchi di concentrazioni ematiche sono stati raggiunti in 2-4 ore e le concentrazioni più elevate sono state riscontrate nei tessuti, nel fegato e nell'intestino. L'emivita di eliminazione è stata stimata di 9 h per i maschi e 7 h per le femmine in base alla curva di concentrazione del sangue nel tempo.

Un secondo gruppo ha ricevuto una singola somministrazione a dose elevata (900 mg/kg di peso corporeo) di iprodione marcato (¹⁴C-iprodione). Il 90% della dose somministrata è stato eliminato in

2 giorni nei maschi e in 3 giorni nelle femmine. Il singolo alto dosaggio è stato assorbito in misura minore rispetto alla singola dose sulla base della maggiore escrezione fecale. Il picco di concentrazione nel sangue è stato raggiunto in 6 h, ad un livello di concentrazione circa 3 volte superiore quello ottenuto dopo somministrazione singola della bassa dose. Dopo 7 giorni, le concentrazioni nei tessuti erano inferiori a 10 mg/kg, mentre l'emivita di eliminazione della singola dose elevata era il doppio rispetto alla singola bassa dose. A seguito di una esposizione multipla a basso dosaggio, il 90% dell'iprodione somministrato è stato eliminato in 3 giorni principalmente nelle urine. Le concentrazioni nei tessuti sono state tutte inferiori a 1 mg/kg.

Successivamente studi su gruppi di 3 maschi e 3 femmine di ratto, sono stati condotti per determinare il tasso di assorbimento cutaneo dopo la somministrazione per 24 h di una dose di 185 mg/kg di peso corporeo di ¹⁴C-iprodione.

Dai risultati è emerso che il 93% della dose è stata riscontrata nella cute, mentre solo lo 0,65 % è stato assorbito. Inoltre lo 0,45% del prodotto radiomarcato è stato trovato nelle urine e nelle feci e il rimanente 0,15% è stato rinvenuto nella carcassa (26).

Dati tossicologici

Studi condotti nei ratti hanno evidenziato bassa tossicità acuta per via orale ($LD_{50} > 2000$ mg/kg di peso corporeo), per via cutanea ($LD_{50} > 2500$ mg/kg di peso corporeo) e dopo 4 h di inalazione ($LD_{50} > 5,16$ mg/L).

In studi sub-cronici è stato rilevato un'incidenza di tumori nel fegato, prostata, reni e un cambiamento dei pesi, iperplasia e atrofia nelle vescicole seminali.

Effetti di tossicità a lungo termine rilevati sia nei topi che nei ratti, hanno interessato fegato, reni, organi genitali con la comparsa di ematopoiesi extramidollare ed emosiderosi della milza.

Inoltre è stata riscontrata cancerogenicità nei ratti al livello delle cellule interstiziali di Leydig, mentre nei topi al livello del fegato.

Altri studi tossicologici hanno evidenziato una inibizione della secrezione di testosterone sia *in vivo* che *in vitro*, un debole legame competitivo dei recettori degli androgeni, inibizione del trasporto del colesterolo nei mitocondri, inibizione dell'attività enzimatica, una induzione della cyp450 e infine una proliferazione degli epatociti.

Inoltre l'iprodione ha dato esito negativo in saggi per la genotossicità (26).

Quadro normativo

Il primo protocollo per l'iprodione risale al DM del 20 giugno 2003 con l'inclusione dello stesso nell'allegato 1 del DL.vo 17 marzo 1995 n. 194 (1), in attuazione della Direttiva 2003/31/CE (27). Successivamente con il decreto del 31 luglio 2007, recepito con la Direttiva 2007/7/CE, 2007/8/CE, 2007/9/CE, 2007/12/CE e 2007/28/CE della Commissione (28) e aggiornamento del DM 27 agosto 2004, gli impieghi e gli intervalli di sicurezza indicati nell'allegato 3, sostituiscono quelli dell'allegato 5 del decreto del Ministro della Salute 27 agosto 2004 (7).

Utilizzo in agricoltura

Gli effetti di lavaggio, stoccaggio, peeling e produzione di succhi sono stati monitorati nelle mele trattate con l'iprodione. L'analisi statistica ha dimostrato una riduzione della sostanza attiva compresa tra il 18-38%.

La produzione di succhi e la sbucciatura hanno ridotto significativamente i residui all'1-24%. Tuttavia la quantità di sostanza attiva non è diminuita quando le mele sono state oggetto di semplice lavaggio o carotaggio (29).

Una delle frequenti applicazioni dell'iprodione riguarda gli alberi di pesco. I frutti sono stati raccolti 15 giorni dopo l'applicazione e sottoposti a lavaggio o ad un trattamento di post-raccolta che prevedeva una immersione in una soluzione di iprodione allo 0,05%, peeling chimico e stoccaggio in una cella frigorifera. I campioni provenienti da ogni trattamento sono stati analizzati per determinare la concentrazione dei residui. La concentrazione dell'iprodione nelle pesche trattate nei frutteti è stata di 1,23 mg/kg, mentre nella frutta lavata il residuo è diminuito a 0,61 mg/kg.

Lo stoccaggio effettuato a 20°C non ha influenzato la presenza di residui, mentre il peeling chimico ha rimosso l'82,5-95% dei residui.

Nelle pesche in scatola la concentrazione di iprodione è risultata molto bassa, circa 0,01-0,10 mg/kg (30). L'iprodione, come si evince in letteratura, viene applicato anche in orticoltura nei pomodori coltivati nelle serre.

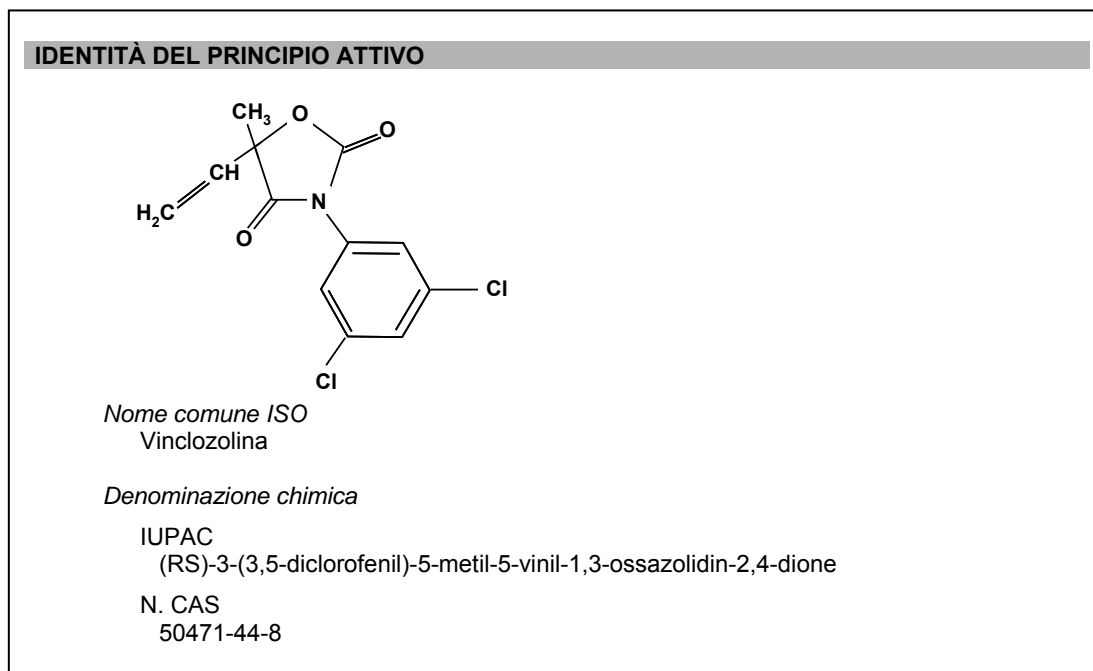
Dopo le applicazioni di due aliquote diverse (una doppia e singola dose), i residui erano al di sotto del limite stabilito di 5 mg/kg.

La tipologia di stoccaggio è stata valutata come possibile responsabile della presenza del PF.

Livelli statisticamente più elevati sono stati rilevati durante la conservazione post-raccolta rispetto a quelli riscontrati nei pomodori appena raccolti. Il livello medio di residuo determinati in questi ultimi, raccolti 12 giorni dopo l'applicazione, è stato di 0,69 mg/kg, mentre nei pomodori post-raccolta conservati per lo stesso periodo è stato di 0,86 mg/kg (31).

Vinclozolina

La vinclozolina, fungicida dicarbossimide introdotto in agricoltura nel 1970, è stata valutata dalla FAO/WHO JMPR nel 1986 e 1988 (32). Viene utilizzato per il controllo di varie tipologie di funghi sia in frutticoltura che in orticoltura e agisce inibendo la germinazione delle spore.



Aspetti biochimici

L'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione della vinclozolina radioattiva sono stati esaminati in gruppi di 24 ratti maschi Wistar dopo la somministrazione singola per via cutanea di dosi pari a 0,002, 0,02, 0,2 e 2 mg/cm² di ¹⁴C vinclozolina, equivalenti a 0,13, 1,3, 13 e 130 mg/kg di peso corporeo.

Le dosi sono state applicate per 10 h con una semi-medicazione occlusiva e gli animali sono stati sacrificati a 0,5, 1, 2, 4, 10, e 72 ore dopo l'inizio del trattamento.

È stata rilevata sia una riduzione dell'assorbimento come percentuale della dose in aumento, che un aumento dopo una prolungata esposizione. La vinclozolina radioattiva è stata assorbita nelle urine e nelle feci.

Dopo la morte dei ratti o 10 h successive all'inizio del trattamento, la cute trattata è stata lavata con acqua. La vinclozolina non assorbita è stata pari al 53-99% della dose. La cute trattata degli animali sacrificati fino a 10 h conteneva il 4-23% della dose, mentre quella degli animali sacrificati a 72 h conteneva lo 0,6-4%.

In tutti i dosaggi, il fegato conteneva i livelli più elevati del radioattivo, seguito dai reni, dalle ghiandole surrenali, plasma, cervello, sangue e testicoli.

Campioni di urina e feci sono stati analizzati per determinare l'identità dei metaboliti. Il principale metabolita della vinclozolina è stato il N-(3,5-diclorofenil)-2-metil-2,3,4-triidrossiamide dell'acido butanoico che rappresentava il 42% del prodotto radioattivo nell'urina escreto come glucuronide coniugato o solfato, e il 60-90% nelle feci, escreto in forma libera. Questo metabolita è presente anche nel sangue, nei reni e nel fegato (32).

Dati tossicologici

La vinclozolina ha una bassa tossicità per via orale (LD₅₀ >10.000 mg/kg nel ratto e circa 8000 mg/kg nelle cavie) per via cutanea (LD₅₀ < 72.000 mg/kg) e dopo 4 ore di esposizione per via inalatoria (LD₅₀ > 29 mg/L di aria nei ratti).

La DGA fissata a 0-0,07 mg/kg di peso corporeo si basa su un NOAEL di 7 mg/kg di peso corporeo al giorno con un fattore di sicurezza di 100.

In studi sub-cronici con la vinclozolina è stato rilevato un minimo aumento della ghiandola surrenale nei cani dopo somministrazione di 7,5 mg/kg di peso corporeo al giorno in entrambi i sessi, mentre i maschi presentavano un aumento anche nelle dimensioni della prostata.

Dosi leggermente superiori nelle donne, provocavano dei cambiamenti nella struttura della ghiandola surrenale.

In studi successivi condotti sui cani, sono stati confermati effetti cronici anche con quantità minori di vinclozolina, circa 2,5 mg/kg di peso corporeo.

Uno studio effettuato per 2 anni nei ratti, ha mostrato una riduzione di peso e cambiamenti nella composizione del sangue a basse dosi (25 mg/kg di peso corporeo).

Nei ratti maschi, dopo somministrazioni di vinclozolina a dosi di 15 mg/kg per 6 mesi, è stata rilevata la presenza di goccioline di grasso nei tubuli all'interno del rene.

I principali effetti tossici indotti dalla vinclozolina e/o dai suoi metaboliti, sono riconducibili alla sua attività antiandrogena.

Gli studi dimostrano che esercita i suoi effetti durante le fasi di sviluppo degli animali e danneggiando la loro capacità riproduttiva.

Nei ratti, la somministrazione di basse dosi (< 3 mg/kg) determina una diminuzione del peso della prostata, una riduzione del peso degli altri organi sessuali, sviluppo di capezzoli e una diminuzione della distanza ano-genitale nei ratti maschi.

A dosaggi più elevati, la riduzione del peso dell'organo sessuale maschile è maggiore, aggravato da malformazioni sessuali quali una riduzione della dimensione del pene, testicoli ectopici e da ulteriori ambiguità nella formazione del sistema urogenitale.

In alcuni studi, è stata riportata anche una riduzione della fertilità, pubertà ritardata e formazione di calcoli renali.

Dal momento che i recettori degli androgeni sono conservati nelle specie, effetti antiandrogenici sono ipotizzabili anche nell'uomo.

Inoltre la vinclozolina ha dato esito negativo in saggi per la teratogenicità e mutagenicità sia nei ratti che nei conigli.

Tuttavia una recente revisione della vinclozolina da parte dell'EPA, ha riportato effetti cancerogeni nei ratti e la possibilità che possa influenzare lo sviluppo e la funzione del sistema neuro-endocrino (32).

Quadro normativo

La vinclozolina in base ai riferimenti normativi degli ultimi anni, e in particolare con il decreto dell'8 gennaio 2007, non è stata iscritta nell'allegato I del decreto legislativo 17 marzo 1995, n. 194, a seguito della sua mancata inclusione nell'allegato I della direttiva 91/414/CEE del consiglio del 15 luglio 1991, con revoca delle autorizzazioni all'immissione in commercio dei PF contenenti detta sostanza attiva (33).

Invece, il Reg. CE 1097/2009 della Commissione Europea del 16 novembre 2009, modifica l'allegato 2 del Reg. CE 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di vinclozolina in o su determinati prodotti.

Nel parere espresso dalla Commissione delle Comunità europee del 16 settembre 2008, l'autorità ha concluso che sussiste il rischio che sia superata la DGA e la Dose Acuta di Riferimento (DAR) per uno o più gruppi di consumatori con gli attuali LMR per alcuni frutti e ortaggi. Si evince quindi la necessità di abbassare gli attuali LMR per tali colture (34).

Utilizzo in agricoltura

Durante il programma di difesa contro la *Botrytis cinerea*, residui del fungicida vinclozolina, sono stati rilevati nella lattuga, nei pomodori e nei cetrioli coltivati nelle serre.

Le concentrazioni dei residui differiscono tra le specie di ortaggi trattati e dipendono in gran parte dal tempo di raccolta, dalle dimensioni del frutteto e dalla modalità di applicazione del PF. Le differenze maggiori sono state rilevate nella lattuga, mentre il contenuto dei residui nei cetrioli erano superiori al limite legale (3 mg/kg).

Con la procedura di lavaggio dei cetrioli, il residuo è diminuito del 22-24% rispetto alla sbucciatura con il 79-85% in meno.

Nei pomodori raccolti d'inverno invece, la presenza di residui è stata maggiore rispetto a quelli raccolti in primavera.

Inoltre indipendentemente dal tipo di ortaggio, i livelli di residui rilevati sono stati più bassi in quelli maturi e di dimensioni maggiori rispetto a quelli acerbi e più piccoli.

Un altro fattore importante è stato il tipo di applicazione del PF sulle colture. Infatti i residui della vinclozolina se usata come compresse di vaporizzazione, sono stati inferiori al 35-65% in tutti gli ortaggi, rispetto alla formulazione in polvere (35).

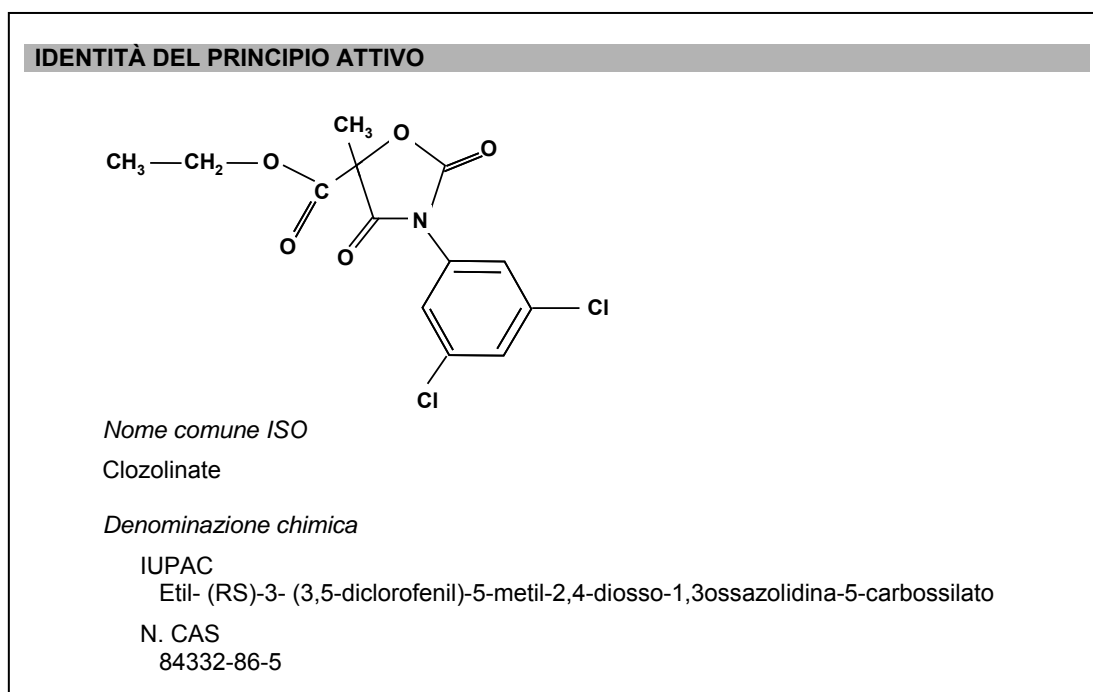
Una delle frequenti applicazioni della vinclozolina riguarda la vite per il controllo della muffa grigia.

In uno studio si è pertanto monitorata per circa 2 mesi la scomparsa della vinclozolina nel succo d'uva bianca sterilizzato e conservato a 40 °C, al fine di simulare rapidamente il tempo di vita del prodotto a temperatura ambiente che è di 1 anno.

Il tempo di permanenza del PF a questa temperatura è risultato essere di 11 giorni; quindi i dati evidenziano una rapida degradazione (36).

Clozolate

Il clozolate è un fungicida sistemico con azione protettiva e curativa utilizzato come spray fogliare contro la *Botrytis* spp., *Sclerotinia* spp., e *Monilia* spp., nelle piante ornamentali, in frutticoltura e orticoltura (37).



Aspetti biochimici

In base alle scarse informazioni presenti in letteratura, si evince che il clozolate è il prodotto della reazione tra il 3,5-diclorofenilisocianato con l'idrossimetil dietilmalonate in benzene, seguito dall'aggiunta della trietilamina.

Inoltre la sostanza attiva una volta formata, è rapidamente metabolizzata ed escreta; i metaboliti sono idrossilati in 4 posizioni del benzene e l'oxazolina viene modificata (37, 38).

Dati tossicologici

Studi condotti nei ratti hanno evidenziato per il clozolate una bassa tossicità sia per via orale (con una LD₅₀ >4500 mg/kg; mentre nei topi è LD₅₀ >10.000 mg/kg) che cutanea (con LD₅₀ >5000 mg/kg).

Sulla base della valutazione della WHO, come PF è improbabile che presenti rischio acuto durante il normale utilizzo, inoltre ci sono a tutt'oggi prove limitate di un effetto cancerogeno.

Tuttavia il clozolate è pericoloso per l'ambiente infatti può provocare a lungo termine effetti negativi per gli organismi acquatici.

Studi condotti nei gatti e nei topi con somministrazioni giornaliere di clozolate con dosi pari a 70 mg/kg per 90 giorni, non hanno prodotto effetti patologici (38, 39).

Quadro normativo

Il clozolate in base all'ultimo decreto del 26 gennaio 2001 del 13 ottobre 2000, non è iscritto nell'allegato I della Direttiva 91/414/CEE del Consiglio, come conseguenza d'insufficienti informazioni fornite non a dimostrare che i PF contenenti la sostanza attiva sia conformi ai requisiti specificati all'articolo 5, paragrafo 2, della direttiva su indicata.

Inoltre è stato previsto un periodo di moratoria per lo smaltimento, l'immagazzinamento, la commercializzazione e l'utilizzazione delle scorte esistenti (40, 41).

Utilizzo in agricoltura

Il clozolate è un fungicida dicarbosimide utilizzato principalmente nelle viti. I livelli massimi di residui non sono stati ancora fissati dalla FAO/WHO e sono in fase di valutazione nell'UE.

Sperimentazioni sul campo sono state effettuate in Grecia su due varietà di uva da tavola per 2 anni, al fine di valutare i residui rimanenti dopo l'applicazione secondo le buone pratiche agricole.

Le analisi effettuate hanno mostrato che in tutti i campioni, i residui del clozolate erano inferiori al limite stabilito di 5 mg/kg dopo 21 giorni dall'applicazione del PF.

Inoltre la procedura di lavaggio rimuove una quantità consistente del fungicida, fino all'80%, che tra l'altro sembra essere non sistematico sulle uve, riducendo così l'esposizione dei consumatori (42).

Di particolare importanza risulta uno studio effettuato per monitorare l'influenza di 2 tipi di processi di vinificazione (con o senza macerazione) sul comportamento del clozolate e del suo metabolita. Dalle analisi risulta che il fungicida è assente nei vini ottenuti con entrambi i processi (43).

Un altro campo di applicazione riguarda i vegetali, in particolare è stato effettuato uno studio sulla presenza di residui del fungicida somministrato nella formulazione a spruzzo in due tipologie di lattuga, una le cui foglie esterne avvolgono la parte interna e l'altra dalla forma aperta.

Dai dati riportati è stato rilevato un aumento dei residui nelle foglie esterne rispetto a quelle interne. Tuttavia sono stati riscontrati residui se pur minimi anche in quest'ultime, ciò accade quando le piante sono ancora giovani e le foglie esterne non coprono completamente quelle interne.

D'altra parte, nella lattuga romana a causa della particolare forma a calice, l'interno ricopre parzialmente le foglie esterne e il comportamento dei residui sarà opposto a quello osservato per la lattuga con le foglie esterne avvolgenti quelle interne.

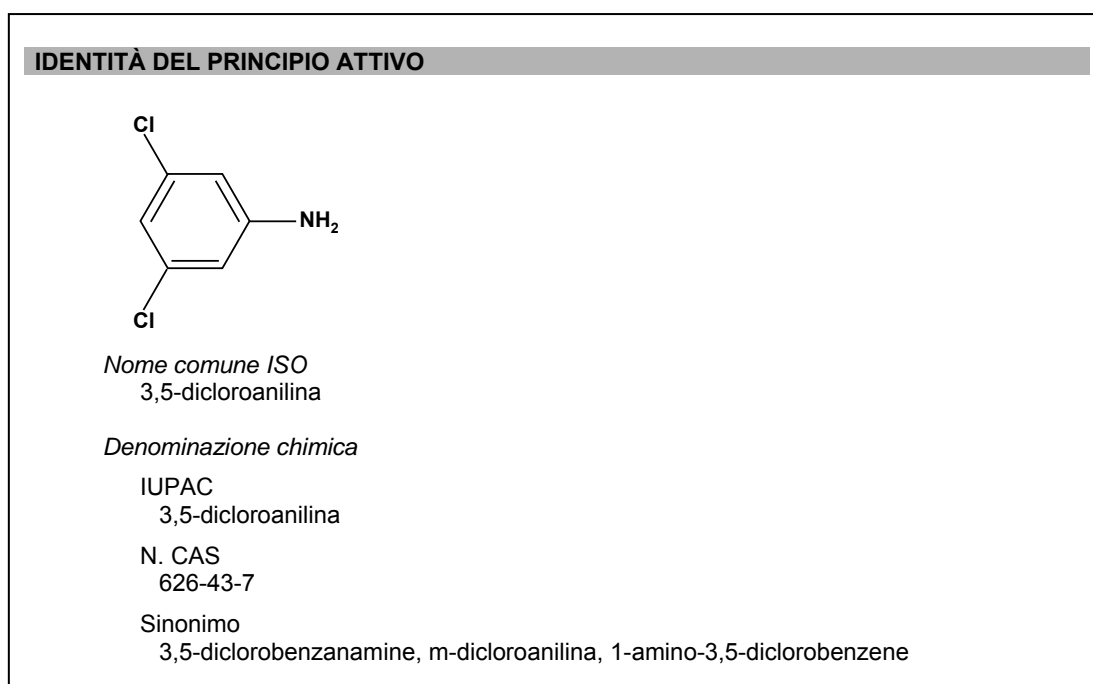
I residui diminuiscono con il tempo sia per effetto della diluizione dovuta alla crescita della pianta che alla degradazione del composto.

Per quanto riguarda l'influenza dei sistemi d'irrigazione sui residui, è stato rilevato che il sistema a spruzzo non riduce la concentrazione rispetto al gocciolamento localizzato.

Tuttavia si è concluso che la parte commestibile della lattuga con le foglie esterne avvolgenti quelle interne, non conteneva residui dopo 2 settimane di trattamento, mentre l'esterno della lattuga romana presentava un alto contenuto di residui immediatamente dopo la somministrazione (44).

3,5-dicloroanilina

La 3,5-DCA è il prodotto di degradazione dei fungicidi dicarbosimidici utilizzati in agricoltura, quali l'iprodione, la vinclozolina, il clozolate e il procimidone (45).



Aspetti biochimici

Dal punto di vista biochimico, la 3,5-DCA subisce facilmente idrossilazione sull'anello aromatico per formare o-, m- o p-aminofenolo.

La 3,5-DCA può anche subire N-acetilazione o N-ossidazione per formare acetanilide o idrossilammina, rispettivamente.

Sia l'aminofenolo che il fenilidrossilammina convertono l'emoglobina in metaemoglobina all'interno dei globuli rossi (46).

Dati tossicologici

Pochissime informazioni sono attualmente disponibili riguardo la caratterizzazione e il meccanismo di tossicità della 3,5-DCA.

Tuttavia gli organi bersaglio per la tossicità dell'anilina sono gli eritrociti, la milza, il fegato e i reni. L'emolisi e metaemoglobinemia sono state documentate a seguito dell'esposizione degli eritrociti alla 3,5-DCA.

Le attuali informazioni a disposizione sono concentrate sulla tossicità renale associata a un danno renale caratterizzato da elevate concentrazioni di azoto ureico nel sangue, da una diminuita produzione urinaria e da un ridotto trasporto di ioni organici nei tubuli prossimali (46).

Quadro normativo

La 3,5-DCA essendo il prodotto di degradazione finale dei 4 dicarbosimidici precedentemente citati, non è disciplinato da normative per quanto riguarda la sua immissione in commercio e l'impiego per uso agricolo.

Tuttavia nel momento in cui sono stati fissati gli LMR per i 4 dicarbosimidici, i limiti di ogni sostanza attiva sono una somma dei composti e di tutti i metaboliti contenenti la frazione 3,5-DCA, espressi in 3,5-DCA.

Recentemente nel Reg. CE 901/2009 del 28 novembre 2009, visto Il Reg. CE 396/2005 del 23 febbraio 2005 concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei e sui prodotti alimentari di origine vegetale e animale, si evince che qualora la definizione del residuo di un antiparassitario includa sostanze attive, metaboliti e/o prodotti di degradazione, gli Stati membri comunicano i risultati dell'analisi in conformità della definizione giuridica del residuo. Se del caso, i risultati di ciascuno dei principali isomeri o metaboliti menzionati nella definizione di residuo, vanno forniti separatamente (47).

Presenza in agricoltura

In letteratura sono di frequente riportati studi concernenti la presenza del PF, come prodotto di degradazione metabolica dei fungicidi iprodione, vinclozolina e procimidone, nei programmi di difesa antiparassitaria in viticoltura.

Pertanto una valutazione della cancerogenicità è stata effettuata come risultato di tutti e 3 gli usi chimici nei prodotti nel vino.

La stima del rischio cancerogeno per il consumo del cibo e del vino è stata di $1,3 \times 10^{-6}$, considerando il Q1* stabilito per la p-cloroanilina (APC), dal momento che esiste una somiglianza strutturale tra la 3,5-DCA e APC.

L'EPA ritiene che l'uso dell'ACP Q1* rappresenti una ragionevole stima del rischio (45).

In uno studio eseguito per verificare l'influenza del processo di vinificazione (con o senza fermentazione) sul residuo di un dicarbosimide quale il clozolate e del metabolita 3,5-DCA, è risultato che la fermentazione non ha influito sul contenuto del metabolita presente in minime quantità.

Inoltre la 3,5-DCA è stata completamente eliminata con il passaggio su carbone attivo (97-100%) a differenza del passaggio su una miscela di bentonite e gelatina che portava a una riduzione più modesta (26-36%). Una miscela di bentonite-gelatina e carbone ha portato a un'eliminazione intermedia del metabolita (82-90%).

Durante la fase d'imbottigliamento invece, il metabolita era assente solo nei vini trattati con 1 g/ litro di carbone, mentre la sua concentrazione oscillava tra lo 0,01-0,27 mg/L negli altri casi. Nessun cambiamento nella concentrazione del metabolita è stato trovato 6 mesi dopo lo stoccaggio (43).

Tuttavia, pur essendo stata proposta come prodotto di degradazione dei dicarbosimidici, risultati discordanti sono stati riportati da Cabras e i suoi collaboratori (17) che nelle analisi di controllo della Botrytis cinerea nella vite a pH=3 e alla temperatura di 4,3°C, la 3,5-DCA non è stata individuata come un prodotto di degradazione dei composti.

FUNGICIDI DICARBOSSIMIDICI NEGLI OLI DI OLIVA: UN'APPARENTE ANOMALIA

La denominazione di 'olio di oliva' è riservata al prodotto della lavorazione dell'oliva (*Olea europaea*), senza aggiunta di sostanze estranee o di oli di altra natura.

Attualmente in Italia è considerato olio di oliva commestibile (art. 1-4 legge n. 1407 del 13/11/60) un olio che contiene non più del 4% in peso di acidità espressa come acido oleico e che all'esame organolettico non riveli odori sgradevoli (48).

I componenti principali dell'olio di oliva sono i triacilgliceroli, gli acidi grassi liberi e alcuni costituenti non gliceridici (0,5-1,5%).

L'olio di oliva è un ingrediente della dieta dei paesi che si affacciano sul Mar Mediterraneo e la sua produzione rappresenta una componente importante nell'economia degli stessi.

La sua coltivazione ha coinvolto diverse epoche, popoli e culture, fino ad arrivare ai giorni nostri, nei quali il processo tecnologico ha contribuito a migliorare la gestione colturale e la caratterizzazione delle cultivar italiane, nonché all'ottenimento di prodotti qualitativamente superiori.

Negli ultimi anni, l'olio di oliva è stato molto rivalutato nel campo medico-farmacologico in virtù degli indiscussi ruoli benefici sulla salute umana.

A tutti gli effetti è, infatti, considerato un alimento che grazie al contenuto di alcune sostanze antiossidanti, gioca un ruolo fondamentale nella prevenzione delle malattie dell'apparato digerente, dell'invecchiamento osseo, delle malattie cardiovascolari, dell'arteriosclerosi e di alcuni tipi di tumori (49-51).

Data l'importanza dell'olio di oliva per l'economia di molti paesi, il controllo dei residui dei PF, rappresenta una delle priorità sanitarie più rilevanti nell'ambito della sua produzione, ed ha la finalità di garantire sia un elevato livello di protezione del consumatore sia la qualità del prodotto stesso.

Le piantagioni di olivo, infatti, sono ad alto rischio di potenziali perdite derivanti dagli attacchi di parassiti, pertanto è necessario un attento monitoraggio e una combinazione di vari metodi di controllo per mantenere al di sotto dei livelli le popolazioni di parassiti che causano perdite inaccettabili per la qualità e la resa della coltura.

In letteratura sono riportate numerose indagini sperimentali volte ad analizzare residui di PF nelle piante di olivo (52-54). Questi residui persistono durante la fase di raccolta e conducono alla contaminazione delle olive utilizzate per la produzione dell'olio di oliva. Conseguentemente sia l'Unione Europea che la Commissione Alimentare della FAO ha stabilito dei livelli massimi di residuo dei PF nelle olive e nell'olio di oliva.

Una delle problematiche evidenziate è la mancanza di LMR per alcuni PF sui prodotti trasformati.

Di conseguenza i vari principi attivi sono stati suddivisi in "normati" se posseggono un LMR sul trasformato e "non normato" se questo è assente.

Nei programmi di controllo su olio di oliva, è stata riscontrata l'anomalia derivante dalla riscontrata presenza dei 4 fungicidi dicarbossimidici sopra descritti e del prodotto di degradazione comune 3,5-DCA. Come ricordato i 4 PF sono utilizzati principalmente per il trattamento della vite ma non dell'olivo. Da indagini effettuate ciò sembra sia da imputare a fenomeni di deriva (55) durante i trattamenti antibotritici su vite in coltivazioni consociate di olivo e vite (56).

Il DM 27 agosto 2004 non fissa il limite massimo dei residui specifico per olive e, conseguentemente, per l'olio di oliva.

Nel caso in cui una sostanza attiva non è autorizzata sulla coltura, se il prodotto è coltivato in Italia, vale il limite di 0,01 mg/kg stabilito dall'articolo 4 comma 7 del DM 27 agosto 2004.

Quindi una partita di olive italiane, contenente residui dei dicarbossimidici non superiori a 0,01 mg/kg, è da considerarsi regolamentare.

È stato proposto inoltre, che per calcolare il limite nell'olio di oliva occorre considerare l'eventuale diluizione o concentrazione secondo quanto previsto dall'articolo 4 comma 5 del DM 27 agosto 2004 (7).

Recentemente, nella circolare del Ministro della salute dell'11 maggio del 2009, si riporta una nota esplicativa riguardante l'applicazione di fattori di concentrazione /diluizione, di sostanze attive applicabili ai prodotti di trasformazione. Per le sostanze attive lipofile, tra cui i fungicidi dicarbossimidici, il fattore di concentrazione /diluizione riferito al processo di produzione dell'olio di oliva, è pari a 5x inteso in questo caso come fattore di concentrazione.

Il valore si basa sulla resa del processo tecnologico di produzione che è stato mediamente stimato pari al 20%, ovvero da 5 kg di olive si ottiene 1 kg di olio di oliva (57).

Per valutare ad esempio la concentrazione del procimidone nell'olio si è considerata la solubilità in acqua e il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (*Octanol-Water Partition Coefficient*, K_{ow}). La solubilità in acqua del procimidone è pari a 4,5 mg/L e il K_{ow} si attesta ad un valore di 1380.

È stato quindi stimato che la totalità di procimidone si concentra nell'olio di oliva. Sulla base di queste considerazioni il limite del fungicida nell'olio di oliva di origine italiana, è pari a 0,05 mg/kg.

Per partite di olive di origine non italiana, si è considerato il limite inferiore convenzionale di determinazione analitica fissato alla voce altra frutta (che comprende le olive in mancanza di un limite specifico) pari a 0,02 mg/kg.

Utilizzando la stessa metodologia il limite del procimidone nell'olio di oliva di origine non italiana, è pari a 0,1 mg/kg.

In agricoltura la contaminazione ambientale da prodotti fitosanitari, che segue i trattamenti specifici sulle colture, avviene attraverso fenomeni naturali di deriva, lisciviazione e percolazione.

Definizione dei fenomeni di deriva, lisciviazione e percolazione dei PF

Deriva

Lo spostamento e la dispersione dei prodotti irrorati durante il trattamento antiparassitario delle colture verso obiettivi diversi da quelli prefissati viene descritto come "fenomeno di deriva" (55).

Il fenomeno si verifica sempre quando particelle sufficientemente piccole e in sospensione dopo la nebulizzazione, non raggiungono in modo diretto e con sufficiente velocità la loro superficie bersaglio, vale a dire la pianta da trattare.

Quantitativamente, come deriva si intende la differenza tra la quantità prevista come deposito per un dato appezzamento e la quantità effettivamente depositata all'interno dell'appezzamento stesso.

Tale deriva è caratterizzata, oltre che dalla presenza di goccioline, dalla quota che passa allo stato gassoso e da quella che si combina con le particelle che compongono il pulviscolo

atmosferico, con successivo passaggio allo stato solido in forma di cristalli e/o particelle amorfe.

La quota che si produce nel passaggio a fase gassosa e/o a cristallizzazione dipende soprattutto dal tipo di principio attivo presente nelle goccioline. L'esatta quantificazione del fenomeno non è semplice da valutare. Generalmente nelle adiacenze della coltura trattata, la maggior quantità di sostanza nella deriva si trova in fase liquida, mentre solo una piccola parte è già individuabile in fase solida.

Il materiale in sospensione può salire direttamente negli strati atmosferici più alti, spinto da correnti ascensionali, o essere trasportato dal vento prevalentemente in linea orizzontale. È generalmente questa ultima frazione ad essere determinante per un diretto inquinamento, in quanto può depositarsi sulle colture vicine.

La quota di principio attivo che raggiunge il bersaglio è molto modesta, sempre considerevolmente inferiore al 100%; secondo alcuni dati sperimentali (58), può essere addirittura pari all'1-3% dell'antiparassitario irrorato.

Il ritrovamento di quantità dosabili del PF in aree a distanze variabili dai campi trattati dipende da alcuni fattori, tra cui:

– *Tipo di composto*

Le due proprietà di un prodotto che ne possono influenzare la distribuzione in aree lontane dal bersaglio sono la stabilità e la volatilità. Composti stabili durante lo stoccaggio possono divenire instabili quando vengono dispersi sotto forma di goccioline o di vapore. Inoltre, la maggiore o minore resistenza ai processi di ossidazione o di idrolisi che possono verificarsi in presenza di ossigeno, vapor d'acqua e radiazioni ultraviolette, rende più o meno consistente la possibilità di trasferimento del prodotto tal quale. La volatilità diviene un fattore critico in relazione al passaggio in atmosfera di quantità più o meno rilevanti di principio attivo anche in fasi successive a quelle del trattamento. I PF possono evaporare dalle particelle di aerosol nel momento stesso della nebulizzazione. È del tutto evidente che estese applicazioni ed elevati dosaggi possono determinare consistenti liberazioni di principio attivo in aria. Per i prodotti solubili in acqua si realizza infine una particolare forma di trasferimento in aria, dovuta all'evaporazione dell'acqua, che funge da veicolo di trasporto. A sua volta, la disponibilità di principio attivo dipende dalla velocità con cui si instaurano i processi di degradazione della sostanza.

– *Dose di utilizzo*

La dose è di per sé ininfluente nel fenomeno di deriva; può però divenire un fattore non trascurabile nell'interpretare eventuali effetti negativi a breve distanza (effetti fitotossici da diserbante nelle colture limitrofe la zona trattata).

– *Condizioni metereologiche*

Tra le condizioni metereologiche in grado di influenzare il fenomeno della deriva il ruolo più importante è, ovviamente, giocato dal vento, che non solo trasporta le goccioline dell'aerosol fuori dall'area trattata, ma può facilitare il fenomeno dell'evaporazione del prodotto. Il vento si è dimostrato essere la variabile più importante nel determinismo della deriva, rispetto anche all'incremento della pressione a livello degli ugelli dell'erogatore.

– *Tipologia della coltura da trattare*

Il tipo di coltivazione, in particolare per quanto riguarda i frutteti, a seconda della forma e delle dimensioni delle piante può svolgere una più o meno marcata azione di schermatura nei confronti del getto di aerosol e condizionare così il fenomeno di deriva. Tale azione dipende, oltre che dal tipo di coltura, dallo stadio della vegetazione, dalla distanza interfilare e dallo spessore delle file.

Lisciviazione e percolazione

Sempre maggiore è la necessità di garantire la massima sicurezza ambientale, degli operatori e dei prodotti alimentari nell'ambito delle attività agricole. Sotto questo punto di vista, particolare importanza assumono le fasi di preparazione e distribuzione dei PF e quella di gestione dei prodotti residui (miscela residua nell'irroratrice, acque di lavaggio delle attrezzature, contenitori vuoti dei PF, ecc.). Queste ultime, in particolare, rappresentano anche una possibile forma di inquinamento puntiforme del suolo e delle acque da PF che si somma a quella, spesso più conosciuta, e riconducibile alla deriva. Diversi studi condotti soprattutto in nord Europa (59-61) hanno evidenziato che la contaminazione delle acque (superficiali o di falda) da PF è dovuta per più del 50% a inquinamento di tipo puntiforme. Ad esempio, è stato verificato che partendo da una dose di principio attivo di 2,5 kg/ha, in media 7 g di esso, finiscono nelle acque di falda e che circa il 30% di tale quantitativo proviene dalla fase di lavaggio delle irroratrici. Tutto ciò a seguito del fatto che l'area adibita a questa operazione è, generalmente, sempre la medesima, risulta caratterizzata da una superficie assai contenuta (10-20 m²) ed è posizionata in prossimità del punto di presa dell'acqua che, spesso, proviene da un pozzo. L'inquinamento puntiforme può, però, essere considerevolmente limitato con una presa di coscienza del problema da parte degli operatori (62) e con una serie di miglioramenti delle pratiche adottate e, soprattutto, delle attrezzature (macchine irroratrici correttamente funzionanti e regolate e dotate di adeguata componentistica) e infrastrutture presenti in azienda (aree attrezzate per lavaggio irroratrice, locali adeguati per lo stoccaggio dei contenitori di fitofarmaci, ecc).

Oltre all'inquinamento puntiforme, altri due principali processi sono coinvolti nella veicolazione dei PF nell'ambiente, la lisciviazione e lo scolo o percolazione. Il termine lisciviazione è utilizzato in idrogeologia per indicare il processo per cui gli elementi solubili del suolo, per effetto dello scorrimento e della percolazione delle acque, vengono trasportati o migrano negli strati più profondi. Da controlli analitici recenti, emerge che uno dei PF più utilizzati in viticoltura, il procimidone, è presente in concentrazioni superiori ai limiti, essenzialmente nelle acque superficiali delle zone viticole del Piemonte, in gran parte di quelle dell'Emilia Romagna, ma anche in Umbria, Campania, Sicilia.

Questi risultati sono dovuti alla potenziale capacità di lisciviazione del procimidone, fungicida di interesse ambientale e sanitario, dato che viene ritrovato nei corpi idrici ed è rilevante per la sua attività antiandrogenica. Nonostante abbia una bassa solubilità, una bassa tensione di vapore, un coefficiente di assorbimento del carbonio organico (*organic carbon adsorption coefficient*, K_{OC}) moderato e un'emivita di degradazione a pH > 6, per cui viene rapidamente idrolizzato, tale composto può legarsi al materiale organico solubile che né facilita la mobilità e il trasporto limitandone la degradazione stessa.

Lo scolo o percolazione è un'altra rilevante fonte di inquinamento di PF considerati potenziali distruttori endocrini di impatto ambientale. Ciò deriva dal fatto che la maggior parte delle molecole sono liposolubili rendendo impossibile una loro rapida eliminazione dall'organismo che li accumula nei grassi. Nel processo di percolazione l'acqua è il recettore indiretto dell'uso del prodotto per infiltrazione nel profilo verticale del terreno. A seguito dei complessi fenomeni di trasformazione e degradazione a cui sono soggetti i PF, vengono prodotti numerosi e spesso poco conosciuti prodotti intermedi chiamati nell'insieme "metaboliti, prescindendo dalle reazioni coinvolte (biotiche e/o abiotiche).

Molti metaboliti sono, a loro volta, trasformati e mineralizzati, ma a volte si formano sostanze sufficientemente stabili, mobili e dotate di caratteristiche tossicologiche rilevanti che possono giungere nei corpi idrici attraverso la percolazione stessa. Ad oggi, i dati della letteratura scientifica e i risultati delle attività di monitoraggio, provenienti anche dal nostro

Paese, indicano la presenza di diversi metaboliti nei corpi idrici superficiali e sotterranei, che derivano, in genere, da quei PF a maggior impatto sul territorio. Le concentrazioni raggiunte dai metaboliti sono spesso ragguardevoli, superando in diversi casi i limiti di 0,1 e 0,5 µg/L stabiliti per il parametro “antiparassitari” dalla normativa europea e nazionale per le acque potabili (63, 64).

Altri aspetti tipici della contaminazione dovuta ai metaboliti è che essi possono essere ritrovati in acqua a concentrazioni superiori rispetto ai PF da cui derivano e anche in loro assenza, per cui se non sono appositamente ricercati, possono sfuggire ai controlli di routine.

METODI REPERIBILI IN LETTERATURA PER LA DETERMINAZIONE DEI PF

L'analisi dei residui dei PF nell'olio d'oliva, è molto impegnativa a causa della complessità intrinseca della matrice, costituita prevalentemente da trigliceridi (98-99%).

Questo ha condotto alla necessità di adottare diverse strategie volte ad isolare o ad estrarre la frazione contenente i PF dalla matrice lipidica, tenendo conto che molti di essi sono lipofili e quindi tendono a rimanere e concentrarsi nel grasso.

Il pretrattamento del campione è quindi un passo fondamentale dell'intera procedura analitica, tanto che diversi metodi adottano tecniche di estrazione e purificazione spinta del campione stesso, al fine di evitare che piccole quantità di lipidi possano interferire nella successiva separazione.

Uno dei metodi di estrazione più adottato fa ricorso alla cromatografia a gel di permeazione (*Gel Permeation Chromatography*, GPC) con o senza una preliminare fase di ripartizione liquido-liquido. Un'aliquota di olio d'oliva precedentemente disciolto in esano saturato con acetonitrile è iniettato all'interno del sistema GPC. Il sistema GPC comprende una pompa HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), un collettore e un rivelatore; le colonne sono costituite da polimeri a microsferi porose che permettono la separazione dei composti in base al loro peso molecolare e non secondo le proprie caratteristiche chimico-fisiche. Utilizzando questo principio, la frazione dei PF è separata dalla frazione a più alto peso molecolare costituita dai trigliceridi. Il metodo fornisce buone percentuali di recupero per una ampia varietà di PF e può essere facilmente adottato ricorrendo all'automatizzazione della GPC tramite un software dedicato. L'elevato grado di automazione è il vantaggio chiave rispetto ad altri metodi manuali come l'estrazione in fase solida (*Solid-Phase Extraction*, SPE) (65).

Un metodo alternativo alla GPC, resta comunque l'SPE, che comprende una preliminare fase di ripartizione liquido-liquido, seguita da una o più fasi di estrazione e purificazione utilizzando diversi materiali sorbenti quali, ad esempio, florosil, allumina o silica gel. I risultati ottenuti con questa tecnica sono pienamente soddisfacenti, ottenendo elevate percentuali di recupero e un minore consumo di solventi organici. Al contrario, il metodo richiede tempi lunghi e diverse fasi manuali (66).

Recentemente il metodo MSPD (*Matrix Solid-Phase Dispersion*) è stato descritto per l'analisi dei PF sia nell'olio di oliva che nelle olive (67). È una strategia basata sull'SPE nella quale una fine dispersione della matrice è mescolata con un materiale assorbente (silica, allumina o C₁₈). Prima della fase MSPD, una preliminare fase di ripartizione liquido-liquido è eseguita con acetonitrile saturato con etere di petrolio. L'estratto ottenuto viene miscelato con amminopropile e trasferito su delle minicolonne, dove gli analiti vengono eluiti con un piccolo volume di un idoneo solvente di eluizione. Tale metodologia riduce l'uso di solventi tossici e accelera il processo di trattamento dei campioni.

Tuttavia, la necessità di poter contare su un metodo semplice, rapido, economico e, soprattutto, "multi-residuo", ha indirizzato la ricerca a sviluppare un nuovo protocollo analitico denominato "QuEChERS" (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) per il pretrattamento dei campioni (68). Il metodo si basa principalmente su una ripartizione liquido-liquido con acetonitrile seguita da una purificazione con SPE. In quest'ultima fase si utilizzano differenti sorbenti, invece del solo PSA: C₁₈ (amina secondaria primaria: *Primary/Secondary Amine*, PSA) e carbone nero grafitato (*Graphitized Carbon Black*, GCB). I risultati sono promettenti, con buone percentuali di recupero per la maggior parte dei PF. Solo alcuni PF

meno polari (organoclorati), presentano un minor recupero (circa 70%). Uno dei vantaggi è l'uso di piccole quantità di solventi organici e la possibilità di trattare fino a 10 campioni/ora.

Parallelamente ai metodi suindicati, da parte del Comitato Europeo di Normazione (CEN), in base ai dati sperimentali relativi a metodi sottoposti a verifica da diversi laboratori internazionali, sono state formulate delle norme di riferimento quali la UNI EN 12393-2:2009 (69) che specifica quattro metodi di estrazione e purificazione di campioni di alimenti di origine vegetale per la determinazione quantitativa dei residui dei PF:

- Metodo L
estrazione con acetone e ripartizione liquida-liquida con diclorometano e purificazione su colonne silice gel/charcoal;
- Metodo M
estrazione con acetone e ripartizione liquida-liquida con diclorometano/petrolio;
- Metodo N
estrazione con acetone e ripartizione liquida-liquida con diclorometano o cicloesano/etilacetato, purificazione su gel di permeazione e cromatografia su silice-gel;
- Metodo P
estrazione con etilacetato e se necessario purificazione su gel di permeazione.

La separazione cromatografica dei PF è, al contrario della fase di pretrattamento dei campioni, meno problematica soprattutto dopo l'avvento e l'ingente sviluppo della cromatografia gassosa o liquida accoppiata alla spettrometria di massa (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS; e *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS).

La GC-MS è indicata per l'analisi di composti volatili e non polari, laddove il rivelatore spettrofotometrico di massa fornisce selettività sufficiente per rilevare residui di PF a concentrazioni basse sia nelle olive che nei campioni di olio d'oliva. La tecnica più utilizzata nei laboratori per l'analisi di residui di PF è la GC-MS con un analizzatore quadrupolo in modalità SIM. Buoni risultati in termini di selettività e sensibilità, si ottengono quando si applica allo strumento un secondo MS. La GC-MS/MS, utilizzando un triplo quadrupolo nel controllo di reazioni selezionate (*Selective Reaction Monitoring*, SRM) o strumenti a trappola di ioni (*Ion Trap*, IT), consente una identificazione e quantificazione di un gran numero di composti in matrici complesse.

Negli ultimi anni, la formulazione e l'utilizzo dei PF più polari ha richiesto l'adozione anche dell'LC-MS come strumentazione complementare alla GC-MS. Inoltre, gli effetti della matrice lipidica osservati con l'utilizzo della GC-MS, sono in genere più evidenti rispetto a quando è applicata l'LC-MS. Infine, la sensibilità che si ottiene mediante la GC-MS è spesso insoddisfacente, tenendo conto dei limiti di residui definiti per la matrice olio.

Un'altra tecnica che offre caratteristiche interessanti per l'analisi dei PF in matrici complesse, si basa sull'impiego di spettrometri di massa a tempo di volo (*Time-Of-Flight Mass Spectrometry*, TOF MS). In particolare l'LC-TOF-MS, viene utilizzato per la determinazione di molte classi di PF in campioni vegetali (70), e recentemente per l'analisi di erbicidi nei residui di olio d'oliva (71). Il vantaggio principale di questa metodologia è la possibilità di identificare e caratterizzare i più comuni prodotti di degradazione dei PF negli alimenti, sconosciuti o non bersaglio, senza l'utilizzo a priori di standard di PF.

A livello europeo, anche per la separazione cromatografica dei PF, il CEN ha formulato una norma, nello specifico la UNI EN 12393-3:2009 (72), che fornisce una guida su alcune tecniche raccomandate per la determinazione di residui di PF in alimenti di origine vegetale e su prove di conferma.

Parte sperimentale

SCOPO DEL LAVORO

La salubrità e la sicurezza degli alimenti in relazione alla tutela della salute dei cittadini sono oggi riconosciuti dall'Unione Europea come obiettivi ad alta priorità. In conseguenza di ciò assumono una rilevanza sempre maggiore i controlli analitici finalizzati alla verifica dei contaminanti e dei residui nei prodotti alimentari. In questo contesto un elemento emergente di rischio per la salute pubblica è rappresentato dalla presenza di residui di PF negli alimenti di origine vegetale.

Di particolare interesse è la contaminazione indiretta di prodotti vegetali laddove fenomeni di deriva, lisciviazione e percolazione possono trasportare i PF nell'ambiente e causare la persistenza di principi attivi su piante non trattate (56). Questo è il caso della riscontrata presenza di fungicidi antibotritici, nell'olio di oliva. Tali fungicidi sono impiegati in agricoltura, sia direttamente sul frutto (mela, pera, fragola, uva, pomodoro, ecc.) sia sulla pianta (melo, pero, vite, ecc.) per proteggere i raccolti dalla *Botrytis cinerea*, ma in olivicoltura il trattamento non è effettuato perché inessenziale.

Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto quello di individuare su olio di oliva e olio extravergine d'oliva, la presenza accidentale di fungicidi dicarbossimidici quali procimidone, vinclozolina, iprodione, clozolate e del prodotto finale di degradazione comune, la 3,5-DCA.

L'identificazione e la determinazione analitica dei residui dei PF e del relativo prodotto di degradazione sono state realizzate mediante l'applicazione di una metodologia analitica articolata in tre fasi:

1. estrazione e purificazione degli analiti dalla matrice oleosa;
2. separazione cromatografica mediante HPLC con eluizione a gradiente degli analiti;
3. rivelazione e identificazione dei composti estratti con rivelatore multicanale a serie di fotodiodi (*Diode Array Detector*, DAD).

METODO DI ANALISI

Nel presente lavoro la tecnica strumentale impiegata per la determinazione quali-quantitativa dei PF dicarbossimidici è stata l'HPLC-DAD. Nello specifico è stato adottato un protocollo analitico già descritto in letteratura apportando delle modifiche principalmente alla fase di pretrattamento del campione (73).

Campionamento

Il campionamento degli oli è stato effettuato nei depositi della grande distribuzione di dodici città italiane rappresentative delle regioni del nord, centro e sud Italia.

Tutti gli oli oggetto d'analisi si trovano attualmente in commercio, sono reperibili nei supermercati o nei discount e appartengono a marchi noti a livello nazionale o a sottomarche diffuse solo a livello regionale.

In particolare, per la determinazione dei fungicidi dicarbossimidici, sono stati analizzati in totale 60 campioni di olio, ripartiti in 30 di olio extravergine di oliva e 30 di olio di oliva.

Principio del metodo

Il metodo prevede una doppia estrazione liquido-liquido con solvente organico. I PF sono poi determinati mediante HPLC con rivelatore spettrofotometrico a sequenza di diodi (DAD).

Reattivi e materiali

I solventi, acetonitrile e acqua impiegati sia per l'estrazione che per la preparazione dell'eluente hanno un grado di purezza almeno per HPLC.

Per quanto riguarda gli standard di PF dicarbossimidici sono stati utilizzati i seguenti:

- iprodione
(purezza 99,2%)
- procimidone
(purezza 99,5%)
- vinclozolina
(purezza 99,5%)
- clozolate
(purezza 98%)
- 3,5-DCA
(purezza 98%)

Da questi standard dicarbossimidici vengono preparate soluzioni standard madri di 3,5-DCA, iprodione, procimidone, vinclozolina e clozolate alla concentrazione di 1 mg/mL in acetonitrile (stabili per 3 mesi a 4 °C).

Successivamente si preparano una o più soluzioni standard di lavoro a partire dalle soluzioni madre, diluendo opportunamente con acetonitrile.

Apparecchiature

Le apparecchiature utilizzate sono le seguenti:

- agitatore vortex;
- bagno ad ultrasuoni;
- bilancia analitica;
- bilancia tecnica;
- cromatografo liquido con rivelatore spettrofotometrico (DAD);
- filtri di nylon a membrana da 0,22 μm ;
- evaporatore rotante;
- normale vetreria da laboratorio.

Procedimento

Si pesano 5 g di olio in un provettone di vetro da 50 mL e si aggiungono 20 mL di acetonitrile. Successivamente si trasferisce il provettone nel bagnetto ad ultrasuoni per 20 min, terminata la sonicazione il provettone è posto obliquamente in congelatore a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per una notte in modo da consentire la separazione per solidificazione dell'olio. Il giorno seguente si preleva il surnatante e lo si trasferisce in un pallone per rotavapor da 50 mL. Sul residuo di olio si ripete l'estrazione aggiungendo 20 mL di acetonitrile fresco, seguita da sonicazione e da un secondo congelamento. Al termine della seconda estrazione, il surnatante è riunito al surnatante della prima estrazione nel pallone da 50 mL. La soluzione campione è poi ridotta fino ad un volume di circa 1 mL mediante evaporazione su evaporatore rotante, filtrata su filtri di nylon da 0,2 μm e trasferito in una vial da autocampionatore per l'iniezione in HPLC/DAD (54).

Analisi

Condizioni strumentali HPLC

In questo studio si è proceduto a sviluppare una separazione a gradiente in modo da eluire tutti i 4 PF, oggetto d'indagine, e il loro prodotto di degradazione in maniera efficace. Le condizioni di eluizione prevedono l'adozione di una miscela di acetonitrile e acqua in rapporto variabile secondo lo schema riportato in Tabella 2.

Tabella 2. Gradiente per la separazione dei PF nella matrice olio

Minuti	Flusso	CH ₃ CN	H ₂ O
0	1 mL/min	50%	50%
5	1 mL/min	50%	50%
20	1 mL/min	60%	40%
22	1 mL/min	50%	50%
25	1 mL/min	50%	50%

Lo sviluppo e la messa a punto del metodo ha portato all'adozione delle condizioni operative riportate in Tabella 3.

Tabella 3. Condizioni operative per la messa a punto del metodo

Parametro	Caratteristiche
Colonna	RP-C18 Spherisorb-ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm
Temperatura della colonna	ambiente
Volume di iniezione	50 µL
Tipo di eluizione	gradiente
Flusso della fase mobile	1,0 mL/min
Fase mobile	CH ₃ CN/ H ₂ O
Tempo della corsa	25 min
Lunghezza d'onda di rivelazione	212 nm

In queste condizioni i tempi di ritenzione dei quattro PF considerati e del loro prodotto di degradazione sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4. Tempi di ritenzione dei cinque PF

Pesticida	Tempo di ritenzione
3,5-DCA	10.007 minuti
Iprodione	13.800 minuti
Procimidone	14.755 minuti
Vinclozolina	17.226 minuti
Clozolate	17.968 minuti

In Figura 1 è riportato un cromatogramma tipo, ottenuto iniettando una soluzione standard contenente i quattro PF e il loro prodotto di degradazione.

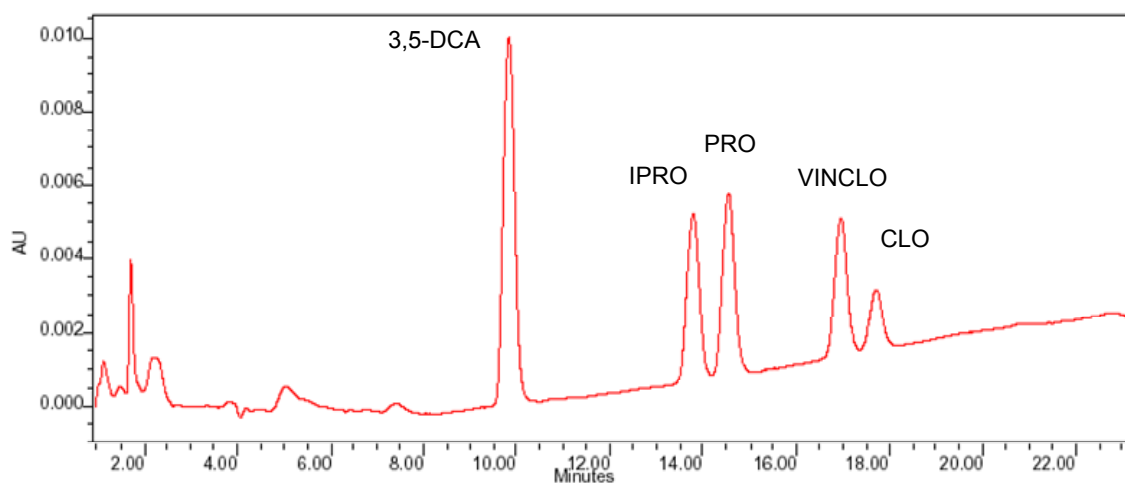


Figura 1. Cromatogramma eseguito con gradiente, di una soluzione standard dei cinque dicarbosimidici in esame

Validazione del metodo analitico

La validazione di metodo analitico è definita come la “conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi ad una specifica utilizzazione o applicazione prevista siano soddisfatti” (ISO 9000-2000). Il processo di validazione ha quindi l’obiettivo di dimostrare la validità per l’utilizzo di un metodo mediante la valutazione di tutti i parametri utili a tale scopo.

Al fine di ottenere la validazione del metodo analitico dei dicarbossimidici nell’olio d’oliva, sono stati considerati i seguenti parametri: accuratezza, precisione, linearità, limite di rilevabilità (*Limit Of Detection*, LOD) e limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ).

In assenza di un materiale di riferimento certificato (MRC) per i fungicidi nell’olio d’oliva o in matrici similari, l’accuratezza del metodo è stata valutata mediante il metodo dei recuperi. Una matrice bianca (olio non contaminato da PF), è stata fortificata con iprodione, procimidone, vinclozolina, clozolate e 3,5-DCA ognuno a 3 livelli di concentrazione (50, 100, 150 µg L⁻¹). Per ogni livello sono stati analizzati 6 duplicati indipendenti.

Il recupero per ogni campione è stato calcolato attraverso la formula di seguito riportata:

$$\% \text{ recupero} = 100 \times \text{concentrazione media misurata} / \text{livello di fortificazione.}$$

La precisione, espressa come ripetibilità stretta e intermedia, è stata valutata attraverso il calcolo del coefficiente di variazione (CV) percentuale. Come per l’accuratezza, sono stati preparati una serie di campioni di identica matrice bianca fortificati a 3 livelli di concentrazione con i 4 fungicidi e il loro prodotto di degradazione (50, 100, 150 µg L⁻¹).

Per ogni livello l’analisi è stata ripetuta su 6 campioni indipendenti e dalle concentrazioni medie ottenute, le deviazioni standard e i CV rispettivi, si è ricavata la ripetibilità stretta; invece per il calcolo della ripetibilità intermedia, lo stesso ciclo d’analisi è stata ripetuto in altre due occasioni (giornate diverse).

La linearità è stata determinata analizzando mediante l’HPLC-DAD, sia le curve relative alle soluzioni standard sia quelle ottenute in matrice (campioni di olio bianco fortificato).

Il LOD e il LOQ sono parametri che descrivono la sensibilità del metodo analitico per quanto riguarda l’identificazione e la quantificazione di un determinato analita.

Il LOD è la minima concentrazione di analita che con ragionevole affidabilità può essere rivelata ma non quantificata.

Quando il segnale prodotto dalla minima concentrazione di analita è maggiore del limite di determinazione si può dire che l’analita è presente nel campione, ma per stabilire il limite oltre il quale è legittimo eseguire misure quantitative è necessario definire il LOQ (*Limit of Quantification*).

Sulla base di quanto indicato dalla norma ISO 11843:1997 (74), il LOD è stato calcolato analizzando 20 materiali bianchi per matrice mentre il LOQ analizzando sempre 20 materiali bianchi per matrice fortificati con gli analiti al limite di decisione e sommando a quest’ultimo 1,64 volte la deviazione standard.

RISULTATI

Parametri di validazione

Il metodo analitico sviluppato ha dimostrato essere adeguato allo scopo dello studio. I parametri di accuratezza, precisione, linearità, LOD e LOQ relativi a ciascun dicarbossimide sono riportati nelle Tabelle 5-9.

Tabella 5. 3,5-DCA: parametri di validazione del metodo analitico nei campioni di olio d'oliva

Livello di fortificazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recupero medio (%)	Ripetibilità		LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		stretta* CV (%) ***	intermedia** CV (%)***		
50	71	12	23	14	47
100	93	3	20		
150	96	4	18		

* Il valore è la media riferita a 6 campioni indipendenti analizzati lo stesso giorno;

** Il valore è la media riferita a 18 campioni indipendenti analizzati in giorni diversi (6 campioni al giorno per 3 giorni);

***CV: coefficiente di variazione = (DS/ concentrazione media)

Tabella 6. IPRODIONE: parametri di validazione del metodo analitico nei campioni di olio d'oliva

Livello di fortificazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recupero medio (%)	Ripetibilità		LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		stretta* CV (%) ***	intermedia** CV (%)***		
50	68	26	19	16	48
100	86	6	28		
150	91	8	21		

* Il valore è la media riferita a 9 campioni indipendenti analizzati lo stesso giorno;

** Il valore è la media riferita a 18 campioni indipendenti analizzati in giorni diversi (6 campioni al giorno per 3 giorni);

***CV: coefficiente di variazione = (DS/ concentrazione media)

Tabella 7. PROCIMIDONE: parametri di validazione del metodo analitico nei campioni di olio d'oliva

Livello di fortificazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recupero medio (%)	Ripetibilità		LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		stretta* CV (%) ***	intermedia** CV (%)***		
50	61	16	19	6	19
100	65	6	28		
150	78	12	24		

* Il valore è la media riferita a 6 campioni indipendenti analizzati lo stesso giorno;

** Il valore è la media riferita a 18 campioni indipendenti analizzati in giorni diversi (6 campioni al giorno per 3 giorni);

***CV: coefficiente di variazione = (DS/ concentrazione media)

Tabella 8. VINCLOZOLINA: parametri di validazione del metodo analitico nei campioni di olio d'oliva

Livello di fortificazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recupero medio (%)	Ripetibilità		LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		stretta* CV (%) ***	intermedia** CV (%)***		
50	62	11	18	8	26
100	63	13	25		
150	76	9	16		

* Il valore è la media riferita a 6 campioni indipendenti analizzati lo stesso giorno;

** Il valore è la media riferita a 18 campioni indipendenti analizzati in giorni diversi (6 campioni al giorno per 3 giorni);

***CV: coefficiente di variazione = (D.S./ concentrazione media)

Tabella 9. CLOZOLINATE: parametri di validazione del metodo analitico nei campioni di olio d'oliva

Livello di fortificazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recupero medio (%)	Ripetibilità		LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
		stretta* CV (%) ***	intermedia** CV (%)***		
50	55	6	24	9	31
100	70	12	25		
150	74	11	18		

* Il valore è la media riferita a 6 campioni indipendenti analizzati lo stesso giorno;

** Il valore è la media riferita a 18 campioni indipendenti analizzati in giorni diversi (6 campioni al giorno per 3 giorni);

***CV: coefficiente di variazione = (D.S./ concentrazione media)

Per quanto concerne la linearità, sono state calcolate cinque curve di taratura per i quattro dicarbossimidici e il loro prodotto di degradazione comune, iniettando per ciascuno soluzioni standard di lavoro a 0, 50, 100, 150 $\mu\text{g/L}$.

La curva di taratura per la 3,5-DCA è risultata essere lineare nell'intervallo di concentrazioni esaminate con un coefficiente di correlazione (R^2) pari a 0,9982 (Figura 2).

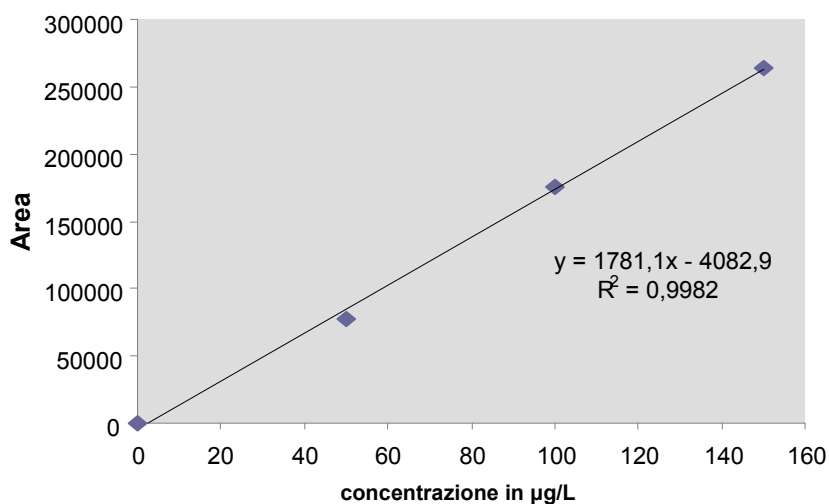


Figura 2. 3,5-DCA: curva di taratura relativa allo standard alle concentrazioni di 0, 50, 100, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$

La curva di taratura per l'iprodione è risultata essere lineare nell'intervallo di concentrazioni esaminate con un coefficiente di correlazione (R^2) pari a 0,9969 (Figura 3).

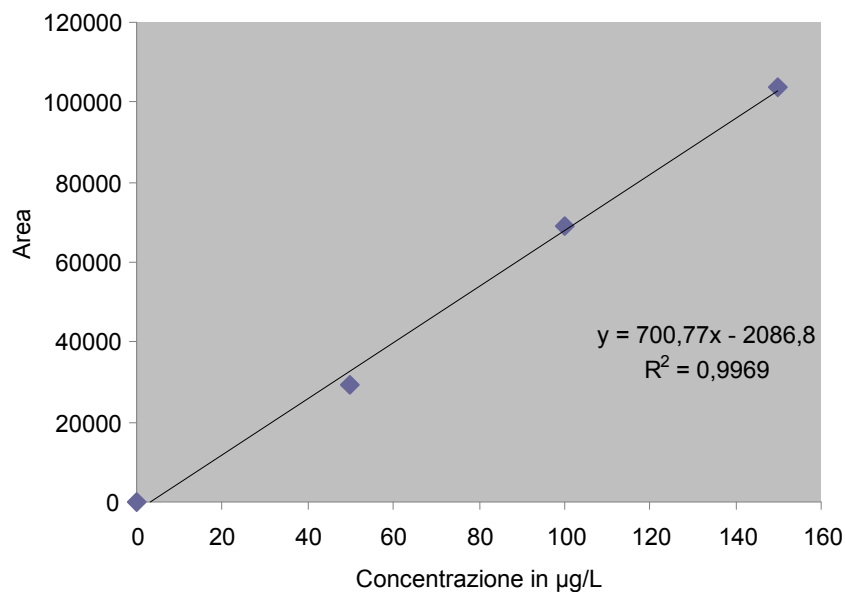


Figura 3. IPRODIONE: curva di taratura relativa allo standard alle concentrazioni di 0, 50, 100, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La curva di taratura per il procimidone è risultata essere lineare nell'intervallo di concentrazioni esaminate con un coefficiente di correlazione (R^2) pari a 0,9997 (Figura 4).

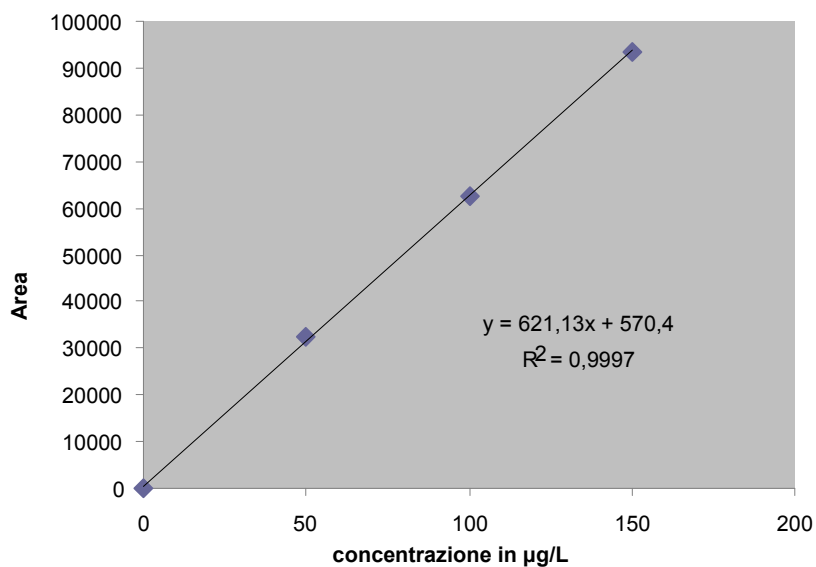


Figura 4. PROCIMIDONE: curva di taratura relativa allo standard alle concentrazioni di 0, 50, 100, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La curva di taratura per la vinclozolina è risultata essere lineare nell'intervallo di concentrazioni esaminate con un coefficiente di correlazione (R^2) pari a 0,9997 (Figura 5).

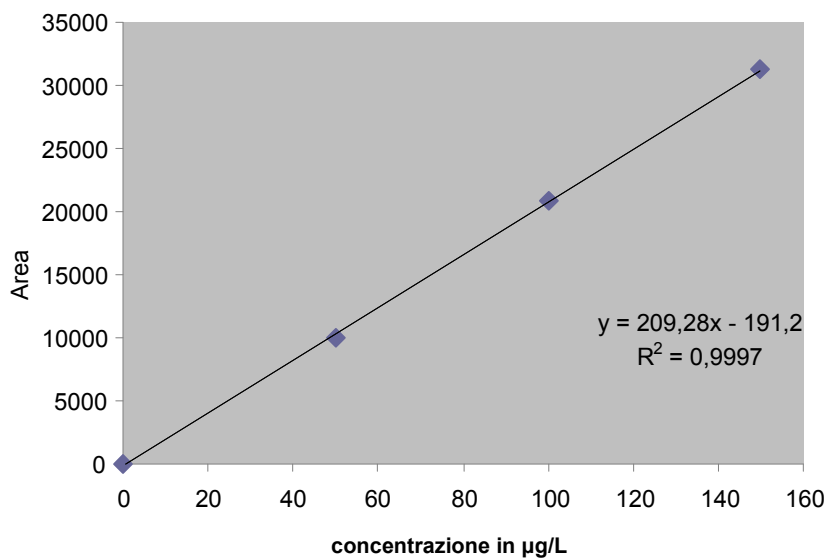


Figura 5. VINCLOZOLINA: curva di taratura relativa allo standard alle concentrazioni di 0, 50, 100, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La curva di taratura per il clozolate è risultata essere lineare nell'intervallo di concentrazioni esaminate con un coefficiente di correlazione (R^2) pari a 0,9991 (Figura 6).

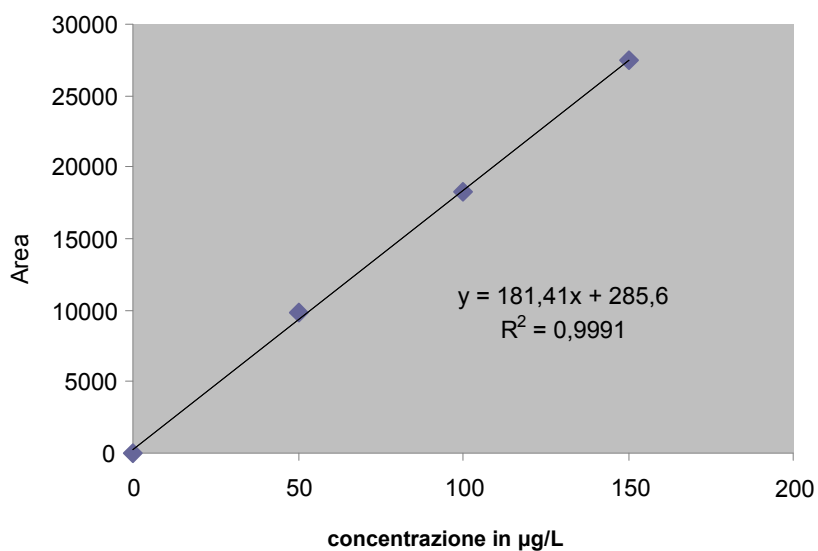


Figura 6. CLOZOLINATE: curva di taratura relativa allo standard alle concentrazioni di 0, 50, 100, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Per tenere conto di eventuali influenze della matrice olio e dei recuperi le stesse rette sono state costruite mediante analisi di campioni costituiti da matrice bianca (olio non contaminato da fungicidi) fortificata con iprodione, procimidone, vinclozolina, clozolate e 3,5-DCA ognuno a 4 livelli di concentrazione (0, 50, 100, 150 $\mu\text{g L}^{-1}$). Per ogni livello sono stati analizzati 6 duplicati indipendenti. La linearità è stata confermata per tutto l'intervallo di concentrazioni esaminate, con R^2 sempre superiore a 0,995.

Risultati del monitoraggio dei dicarbosimidici nell'olio d'oliva

L'analisi qualitativa è stata effettuata attraverso l'identificazione dei picchi incogniti per confronto con i tempi di ritenzione di una soluzione dei dicarbosimidici standard in questione; l'analisi quantitativa è stata eseguita attraverso il metodo della standardizzazione esterna.

Nelle Tabelle 10 e 11 sono riportati i risultati relativi alla presenza dei 4 fungicidi e del loro prodotto di degradazione nei campioni di olio extravergine e nei campioni di olio d'oliva.

Tabella 10. Presenza di PF e del relativo prodotto di degradazione in campioni di olio extravergine di oliva

N. Campioni	3,5-DCA	Iprodione	Procimidone	Vinclozolina	Clozolate
1	+	-	+	+	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	+	-	-
4	-	-	+	+	-
5	+	-	-	+	+
6	+	-	-	+	-
7	-	-	-	-	-
8	+	-	-	+	-
9	+	+	-	-	-
10	+	-	+	-	-
11	-	-	+	-	-
12	-	-	+	-	+
13	+	-	-	+	+
14	+	-	+	-	-
15	-	-	+	-	-
16	+	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-
18	+	-	+	-	-
19	-	-	+	+	+
20	-	-	-	-	-
21	-	+	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	+	+	+	+	+
24	-	-	+	-	-
25	+	-	+	-	-
26	-	-	-	-	-
27	+	+	+	+	-
28	+	-	-	+	-
29	-	-	-	+	-
30	-	-	-	+	-

Il simbolo -: < LOD; il simbolo +: > LOD

Nei 30 campioni di olio extravergine di oliva sono state riscontrate positività per l'iprodione (13%), per il procimidone (46%), per la vinclozolina (40%) e per il clozolate (20%). Infine si è rilevata la presenza del prodotto di degradazione comune ai quattro fungicidi, la 3,5-DCA nel 46% dei campioni analizzati.

Tabella 11. Presenza di PF e del relativo prodotto di degradazione in campioni di olio di oliva

N. Campioni	3,5-DCA	Iprodione	Procimidone	Vinclozolina	Clozolate
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	-
5	+	-	+	-	-
6	-	-	+	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	+	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	+	-	-
13	+	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	+	-	+	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	+	-	-
22	+	-	+	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	+	-	+	-	-
26	-	-	+	-	-
27	-	-	-	+	-
28	-	-	+	-	-
29	-	-	-	+	+
30	-	-	+	-	-

Il simbolo -: < LOD; il simbolo +: > LOD

Nei 30 campioni di olio di oliva, sono state riscontrate positività per il procimidone (12%), per la vinclozolina (2%) e per il clozolate (1%), mentre la presenza dell'iprodione non è stata rilevata. Anche in questi campioni si è rilevata la presenza del prodotto di degradazione comune ai quattro fungicidi, la 3,5-DCA (17%).

La presenza di almeno un fungicida o del loro metabolita è stata rilevata nell'80% dei campioni di olio extravergine d'oliva e nel 50% di quelli di olio d'oliva.

In generale, l'olio extravergine d'oliva è risultato qualitativamente e quantitativamente più contaminato dell'olio d'oliva. L'andamento è probabilmente da attribuire al processo di raffinazione che subisce l'olio d'oliva. Il processo di produzione che contempla tra l'altro un passaggio su carbone attivo, verosimilmente abbatta i livelli di fungicidi in questa tipologia d'olio.

Per quanto concerne le concentrazioni medie misurate, è da sottolineare la circostanza che sono risultate relativamente basse a conferma del fatto che la contaminazione è di tipo indiretto (deriva, lisciviazione o percolazione) e non è quindi riconducibile a dei trattamenti specifici

sulla coltura. Ciò nonostante, in circa il 60% dei campioni di olio extravergine d'oliva almeno un fungicida o il loro metabolita superava il valore di $50 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, estrapolato dal limite di legge di $10 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, fissato per le olive, considerando una concentrazione di 5x nella produzione dell'olio. Nel caso dell'olio d'oliva, la percentuale di campioni che superava il valore di $50 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ era pari al 17%.

CONCLUSIONI

Dai risultati del monitoraggio si possono trarre alcune conclusioni. La prima riguarda l'incidenza che la contaminazione indiretta da PF può avere per i prodotti alimentari di origine vegetale. Fenomeni di deriva, lisciviazione o percolazione possono comportare il trasferimento di PF su colture non direttamente trattate. Ciò è ancora più marcato per quei PF che avendo carattere lipofilo tendono a essere captati e concentrati da frutti oleosi come le olive.

La seconda conclusione è relativa al fatto che a causa della contaminazione indiretta, più della metà (60%) dei campioni di olio extravergine d'oliva analizzati e il 17% di quelli di olio d'oliva superavano almeno per un fungicida il limite estrapolato di 0,05 mg/kg negli oli extravergine d'oliva e negli oli di oliva. Inoltre in tutti i campioni dove è stata riscontrata la presenza di un fungicida si aveva la contemporanea presenza della 3,5-DCA, prodotto di degradazione dei fungicidi dicarbosimidici.

È ovvio che i risultati ottenuti confermano l'importanza che i coltivatori dovrebbero prestare alle Buone Pratiche Agricole (*Good Agricultural Practices*, GAP) quale elemento chiave per il raggiungimento di un elevato standard di qualità e di sicurezza alimentare. Questo è tanto più vero laddove vi sono coltivazioni consociate di olivo e vite; circostanza piuttosto comune nel nostro Paese.

BIBLIOGRAFIA

1. Italia. Decreto legislativo 17 marzo 1995, n. 194. Attuazione della direttiva 91/414/CEE in materia di immissione in commercio di prodotti fitosanitari. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 122 del 27 maggio 1995.
2. Italia. Decreto del Presidente della Repubblica 23 Aprile 2001, n. 290. Regolamento di semplificazione dei procedimenti di Autorizzazione alla produzione. Alla immissione in commercio e alla vendita di prodotti fitosanitari e relativi coadiuvanti. del 15 Luglio 1991. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 165, *supplemento ordinario* n. 190 del 27 luglio 2001.
3. Comunità Europea. Direttiva 91/414/CEE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15 luglio 1991, relativa all'immissione in commercio di prodotti fitosanitari. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 230 del 19 agosto 1991.
4. Comunità Europea. Regolamento CE n. 2076/02 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 20 novembre 2002 che prolunga il periodo di tempo di cui all'articolo 8, paragrafo 2, della direttiva 91/414/CEE del Consiglio e concernente la non iscrizione di talune sostanze attive nell'allegato I della suddetta direttiva e revoca delle autorizzazioni di prodotti fitosanitari contenenti delle sostanze. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 319/3 del 23 novembre 2002.
5. Italia. Decreto del Ministro della salute 18 dicembre 2003, recepimento delle direttive n. 2003/60/CE, 2003/62/CE, 2003/69/CE concernente i limiti massimi di residui di sostanze attive contenute nei prodotti fitosanitari tollerati nei prodotti destinati all'alimentazione con revoca e modifica di alcuni impieghi relativi ai prodotti fitosanitari. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n.41 del 19 febbraio 2004.
6. Comunità Europea. Direttiva 76/895/CEE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 novembre 1976 che fissa le quantità massime di residui di antiparassitari consentite sugli e negli ortofrutticoli. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 340 del 9 dicembre 1976.
7. Italia. Decreto del Ministro della salute 27 agosto 2004 “Prodotti fitosanitari: limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione”. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n.292, *supplemento ordinario* n. 179 del 14 dicembre 2004.
8. Unione Europea. Regolamento CE n. 396/2005 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 febbraio 2005, concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L 70/1 del 16 marzo 2005.
9. Comunità Europea. Regolamento CE n.178/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 1 febbraio 2006 che modifica il regolamento 396/2005 per introdurre l'allegato I, recante l'elenco dei prodotti alimentari e dei mangimi cui si applicano i livelli massimi di residui di antiparassitari. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 29/3 del 2 febbraio 2006.
10. World Health Organization; Food Agriculture Organization. *Pesticide residues in food. Report of Joint Meeting of the FAO. Panel of experts on pesticides in food and the environment and the WHO core assessment group on pesticides residues*. Rome: Food And Agriculture Organization of the United Nations; 2007. Disponibile all'indirizzo http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/DOWNLOAD/2007_rep/report2007jmpr.pdf; ultima consultazione il 8/9/2010.
11. Food and Agriculture Organization. *Specifications and evaluations for plant protection products: procymidone. Evaluation report: 383/2001*. Rome: FAO; 2001.
12. Direttiva 2006/132/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'11 dicembre 2006 che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio con l'iscrizione della sostanza attiva procymidone. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* n. L 349/22 del 12 dicembre 2006.

13. Surico G, Marchi G. I funghi patogeni della vite. In: Vincenzini M, Romano P, Farris GA (Ed.). *Microbiologia del vino*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 2005. p. 1-37.
14. Vercesi A. Nuove acquisizioni su botrite e altri marciumi del grappolo. *L'Informatore Agrario* 2006;15:76-80.
15. Farris GA, Cabras P, Spanedda L. Pesticide residues in food processing, *Italian Journal Food Science* 1992;3:149-69.
16. Hayes WJ. *Toxicology of pesticide*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1975.
17. Cabras SP, Meloni M, Pirisi FM, Pirisi R. Degradation of dicarboximidic fungicides in wine. *Pest Sci* 1984;15:247-52.
18. Holland PT, McNaughton DE, Malcolm CP. Multiresidue analysis of pesticide in wines by solid-phase extraction. *JAOAC Int* 1994;77:79-86.
19. Cabitza F, Dedola F, Mura S., Ucheddu G, Angioini A, Satta M. Salute e trattamenti fitosanitari. Monitoraggio dei residui di fitofarmaci nei vini Doc della Sardegna. *Vignevini* 1999;29(3):27-9.
20. Garcia-Cazorla J, Xirau-Vayreda M. Persistence of dicarboximidic fungicide residues in grapes, must, and wine. *Am J Enol Vitic* 1994;45(3):338-40.
21. Dugo G, Di Bella G, Cimino G, Mondello L. Residui di procimidone in uve prodotte in Sicilia. *La rivista della Società Italiana dell'Alimentazione* 1992;21:455-9.
22. Flori P, Cabras P. I residui dei fitofarmaci nei vini. *Vignevini* 1990;17(7/8):31-7.
23. Paradjickovic N, Hrlec G, Horvat D. Residues of vinclozolin and procymidone after treatment of greenhouse grown lettuce, tomato and cucumber. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Plant Soil Science* 2004;54(4):241-8.
24. Mehmet F, Cengiz A, Muharrem C, Huseyin G. Residue contents of captan and procymidone applied on tomatoes grown in greenhouses and their reduction by duration of a pre-harvest interval and post-harvest culinary applications. *Food Chemistry* 2007;100:1611-9.
25. Will F, Kruger E. Fungicide residues in strawberry processing. *J Agric Food Chem* 1999;47(3):858-61.
26. IPCS INCHEM. Iprodione (Pesticide residues in food: 1992 evaluations Part II Toxicology). In: *Monographs of toxicological evaluations*. Disponibile all'indirizzo <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v92pr11.htm>; ultima consultazione il 8/10/2010.
27. Decreto del Ministro della salute 23 Giugno 2003. Inclusione delle sostanze attive 2,4-DB, beta-ciflutrin, ciflutrin, iprodione, linuron, idrazide maleico e pentametalin nell'allegato I del decreto legislativo 17 marzo 1995, n.194 in attuazione della direttiva 2003/31/CE. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 219 del 20 settembre 2003.
28. Decreto del Ministro della salute 31 luglio 2007. Prodotti fitosanitari: recepimento delle direttive 2007/7/CE, 2007/8/CE, 2007/9/CE, 2007/12/CE e 2007/28/CE della Commissione. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 254 del 31 ottobre 2007.
29. Rasmussen RR, Paulsen ME, Hansen HCB. Distribution of multiple pesticide residues in apple segments after home processing. *Food Additives & Contaminants* 2003;20(11):1044-63.
30. Lentza-Rizos Chaida. Residues of iprodione in fresh and canned peaches after pre-and post harvest treatment. *J Agric Food Chem* 1995;43(5):1357-60.
31. Omirou M, Vryzos Z, Papadopoulou-Maurkidou E, Economou A. Dissipation rates of iprodione and thiaclopred during tomato production in greenhouse. *Food Chemistry* 2009;116(2):499-504.
32. IPCS INCHEM. Vinclozolin (Pesticide residues in food: 1995 evaluations Part II Toxicological & Environmental) In: *Monographs of toxicological evaluations*. Disponibile all'indirizzo <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr18.htm>; ultima consultazione il 8/10/2010.

33. Italia. Decreto del Presidente della Repubblica 8 Gennaio 2007. Non iscrizione della sostanza attiva vinclozolin nell'allegato I del decreto legislativo 17 marzo 1995, n. 194, a seguito della sua mancata inclusione nell'allegato I della direttiva 91/414/CEE del Consiglio del 15 luglio 1991, e revoca delle autorizzazioni all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari contenenti detta sostanza attiva *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 16 del 20 gennaio 2007.
34. Comunità Europea. Regolamento CE n.1097/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 novembre 2009 che modifica che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di dimetoato, etefon, fenamifos, fenarimol, metamidofos, metomil, ometoato, ossidemeton-metile, procimidone, tiodicarb e vinclozolin in o su determinati prodotti. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 301/6 del 17 novembre 2009.
35. Baumeister M, Stepp M, Dieckmann S, Melzer O, Klopper H, Jurling H, Bender L. Transfer of the fungicide vinclozolin from treated to untreated plants via volatilization. *Chemosphere* 2002;48:75-82.
36. Pase-Juan E, Cancho-Grande B, Rial-Otero R, Simal-Gandara J. The dissipation rates of cyprodione, fludioxonil, procymidone and vinclozoline during storage of grape juice. *Food Control* 2006;17:1012-7.
37. Roberts T, Hutson D. Chlozolate. *Metabolic pathways of agrochemicals. Insecticides and fungicides. Part two*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1999. p. 1157-58.
38. PAN Pesticides Database-Chemical. *Chlozolate*. Pesticide Action Network; 2000-2010. Disponibile all'indirizzo http://www.pesticideinfo.org/Summary_Chemical.jsp?Rec_Id=PC38478; ultima consultazione 16/02/2010.
39. Pesticides Properties Database. Chlozolate. University of Hertfordshire; 2010 Disponibile all'indirizzo <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/>; ultima consultazione 8/10/2010.
40. Comunità Europea. Decisione della Commissione del 13 ottobre 2000 concernente la non iscrizione del Clozolate nell'allegato I della direttiva 91/414/CEE del Consiglio e la revoca delle autorizzazioni di prodotti fitosanitari contenenti detta sostanza attiva. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 263/32 del 18 ottobre 2000.
41. Italia. Decreto del Ministro della salute 26 Gennaio 2001. Non iscrizione della sostanza attiva «Clozolate» nell'allegato I del decreto legislativo 17 marzo 1995, n. 194. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 080 del 5 aprile 2001.
42. Lentza-Rizos C, J. Avramides E, Argyropoulou A, Papadimitriou V, Kokkinaki K. Field trials to determine residues of chlozolate in table grapes. *J Agric Food Chem* 2000;48(6):2522-7.
43. Gennari M, Nègre M, Gerbi V, Raimondo E, Minati JL, Gandini A. Chlozolate fate during vinification process. *J Agric Food Chem* 1992;40:898-900.
44. Cabras P, Meloni M, Manca Maria R, Pirisi FM, Cabitza F, Cubeddu M. Pesticide residues in lettuce. 1. Influence of the cultivar. *J Agric Food Chem* 1988;36:92-5.
45. EPA - Office of prevention, pesticides and toxic substances. *Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) Tolerance Reassessment Progress and Risk Management Decision (TRED) for Procymidone*. Washington: EPA; 2005.
46. Valentovic MA, Bethany A. Rogers, Meadows MK, Conner JT, Williams E, Hong Suk Kil, Rankin GO. Characterization of methemoglobin formation induced by 3,5-dichloroaniline, 4-amino-2,6-dichlorophenol and 3,5-dichlorophenylhydroxylamine. *Toxicology* 1997;118:23-36.
47. Comunità Europea. Regolamento CE n.901/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 settembre 2009 relativo ad un programma comunitario coordinato di controllo pluriennale per il periodo 2010, 2011 e 2012 destinato a garantire il rispetto dei limiti massimi e a valutare l'esposizione dei consumatori ai residui di antiparassitari nei e sui prodotti alimentari di origine vegetale e animale. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 256/14 del 29 settembre 2009.

48. Italia. Decreto legislativo 13 novembre 1960, n. 1407. Norme per la classificazione e la vendita degli oli di oliva. *Gazzetta Ufficiale- Serie Generale* n. 295 del 2 dicembre 1960.
49. Trichopoulou A. Olive oil and breast cancer. *Cancer Causes and Control* 1995;6:475-6.
50. Visioli F, Borsani L, Galli C. Diet and prevention of coronary heart disease the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc Res* (Netherlands) 2000;47(3):419-25.
51. Visioli F, Galli C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J Agric Food Chem* 1998;46:4292-6.
52. Cabras P, Angioni A. Simplified multiresidue method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *Journal of Chromatography A* 1997;761:327-31.
53. Ferrer C, Gòmez MJ. Determination of pesticide residues in olives and oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2005;1069:183-94.
54. Lentza-Rizos C, Avramides EJ. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. *Journal of Chromatography A* 2001;912:135-142.
55. Lorenzin M, Comai M, Giaier C, Betta A. Valutazione della deriva nei trattamenti antiparassitari: un confronto biennale di mezzi per la distribuzione. In: *Seminario Interregionale Antiparassitari e Prevenzione. Atti*. Sondrio, 10 -11 maggio 1991. p.1-5.
56. Vettori G. Controllo dei residui di prodotti fitosanitari: principali evidenze nei “Prodotti Trasformati”. *Petria* 2007;17(3):569-79.
57. Italia. Circolare del Ministero della Salute 11 maggio 2009. Nota esplicativa riguardante i residui di pesticidi: Reg. CE 396/2005 – applicazione dei fattori di processo per sostanze attive.
58. Hall FR, *et al.* Improving agrochemical and fertilizer application technology. *Agricult Res Inst* 1985:15-23.
59. Kreuger J. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *The Science of the Total Environment* 1998;216:227-51.
60. Maillat-Mezeray J, Thierry J, Marquet N, Guyot C, Cambon N. Bassin versant de la Fontaine du Theil – Produire et reconquérir la qualité de l’eau: actions et résultats sur la période 1998-2003. *Perspectives Agricoles* 2004:301-4.
61. Neal C, Neal M, Hill L, Wickham H. River water quality of the River Cherwell: an agricultural clay-dominated catchment in the upper Thames Basin, South Eastern England. *The Science of the Total Environment* 2006;360(1-3):272-89.
62. Fait G, Nicelli M, Trevisan M, Capri E. Un sistema biologico per decontaminare da agrofarmaci le acque di provenienza aziendale. *L’Informatore Agrario* 2004;29:43-5.
63. Comunità Europea. Direttiva 98/83/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 3 Novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 330 del 05.12.1998.
64. Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 52 *supplemento ordinario* n.41. del 3 marzo 2001.
65. Guardia-Rubio M, Fernández de Córdoba ML, Ayora-Cañada MJ, Ruiz-Medina A. Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 2006;231:1108.
66. Yagüe C, Bayarri S, Conchello P, Lázaro R, Pérez-Arquillué C, Herrera A, Ariño A. Determination of pesticides and PCBs in virgin olive oil by multicolumn solid-phase extraction cleanup followed by GC-NPD/ECD and confirmation by ion-trap GC-MS. *J Agric Food Chem* 2005;53(13):5105-9.

67. Ferrer C, Gómez MJ, García-Reyes JF, Ferrer I, Thurman EM, Fernández-Alba AR. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005;1069(2):183-94.
68. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 2003;86(2):412-31.
69. UNI EN 12393-2. *Alimenti di origine vegetale - Metodi multiresidui per la determinazione gascromatografica di residui di pesticidi - Parte 2: Metodi di estrazione e di purificazione*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2009.
70. Ferrer I, García-Reyes JF, Fernández-Alba AR. Identification and quantitation of pesticides in vegetables by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry *Trends Anal Chem* 2005;24(7):671-82.
71. García-Reyes JF, Ferrer C, Thurman EM, Fernández-Alba AR, Ferrer I. Analysis of herbicides in olive oil by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry *J Agric Food Chem* 2006; 2006,54(18):6493-6500.
72. UNI EN 12393-3. *Alimenti di origine vegetale - Metodi multiresidui per la determinazione gascromatografica di residui di pesticidi - Parte 3: Determinazione e prove di conferma*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2009.
73. Vanni A, Gamberini R, Calabria A, Nappi P. Determination and identification of metabolites of the fungicides Iprodione and Procymidone in compost. *Chemosphere* 2000;41(9):1431-1439.
74. ISO 11843:1997. *Capability of detection - Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case - Part 2: Methodology in the linear calibration case*. Geneva: International Organization for Standardization; 1997

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, ottobre-dicembre 2010 (n. 4) 4° Suppl.