

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Sezione di Igiene e Tecnologia Alimentare

DOTTORATO DI RICERCA IN
“METODOLOGIE ANALITICHE NELLA TECNOLOGIA ALIMENTARE E
NELL’ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE”
XIX ciclo - VET/04

**DETERMINAZIONE MEDIANTE GLC-NPD E HPLC-FL
DI PESTICIDI ORGANOFOSFORATI
IN LATTE CRUDO**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. ROBERTO ROSMINI

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa PATRIZIA STICCA

Docente Guida:

Chiar.mo Prof. GIAMPIERO PAGLIUCA

Anno Accademico 2005/2006

Indice

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introduzione alla ricerca dei pesticidi nel latte | 1 |
| 1.1 | I pesticidi | 2 |
| 1.1.1 | <i>Cenni generali</i> | 2 |
| 1.1.2 | <i>Contaminazione degli alimenti</i> | 4 |
| 1.1.3 | <i>I pesticidi organofosforati</i> | 5 |
| 1.1.4 | <i>Caratteristiche chimiche</i> | 6 |
| 1.1.5 | <i>I pesticidi oggetto della ricerca</i> | 8 |
| 1.1.6 | <i>Meccanismo d'azione e biotrasformazione</i> | 23 |
| 1.1.7 | <i>Tossicità</i> | 23 |
| 1.2 | Il Glyphosate | 25 |
| 1.2.1 | <i>Introduzione</i> | 25 |
| 1.2.2 | <i>Meccanismo d'azione</i> | 27 |
| 1.2.3 | <i>Il glyphosate nell'ambiente</i> | 28 |
| 1.2.4 | <i>Metodi analitici per la determinazione del glyphosate</i> | 30 |
| 1.3 | Legislazione | 32 |
| 1.3.1 | <i>Generalità</i> | 32 |
| 1.3.2 | <i>Residui di pesticidi negli alimenti di origine animale</i> | 33 |
| 1.3.3 | <i>Autorità competenti nel controllo dei pesticidi</i> | 35 |
| 1.4 | Scopo del lavoro | 36 |
| 2 | Presentazione del metodo sperimentale | 39 |
| 2.1 | I campioni di latte | 39 |
| 2.2 | OPPs | 40 |
| 2.2.1 | <i>I prodotti chimici</i> | 40 |
| 2.2.2 | <i>Strumentazione</i> | 41 |
| 2.2.3 | <i>Condizioni analitiche</i> | 42 |
| 2.2.4 | <i>Estrazione dei pesticidi dal latte</i> | 42 |
| 2.2.5 | <i>Validazione del metodo</i> | 45 |
| 2.2.6 | <i>Controllo della purezza dei solventi</i> | 49 |
| 2.3 | Glyphosate | 49 |
| 2.3.1 | <i>I prodotti chimici</i> | 49 |
| 2.3.2 | <i>Strumentazione</i> | 51 |
| 2.3.3 | <i>Condizioni analitiche</i> | 51 |
| 2.3.4 | <i>Derivatizzazione</i> | 52 |
| 2.3.5 | <i>Estrazione del glyphosate dal latte</i> | 53 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3 | Risultati e discussione | 57 |
| 3.1 | Messa a punto della metodica per la determinazione degli OPPs | 57 |
| 3.1.1 | <i>Condizioni gascromatografiche</i> | 57 |
| 3.1.2 | <i>Scelta dello standard interno</i> | 60 |
| 3.1.3 | <i>Estrazione dei pesticidi dal latte</i> | 62 |
| 3.1.4 | <i>Validazione della metodica</i> | 62 |
| 3.2 | Analisi dei campioni | 66 |
| 3.2.1 | <i>Risultati</i> | 67 |
| 3.2.2 | <i>Discussione dei risultati delle analisi dei campioni</i> | 68 |
| 3.3 | Messa a punto dell'analisi per la determinazione del glyphosate | 70 |
| 3.3.1 | <i>Derivatizzazione</i> | 71 |
| 3.3.2 | <i>Condizioni cromatografiche</i> | 73 |
| 3.3.3 | <i>Prime fasi estrattive dalla matrice</i> | 77 |
| 3.3.4 | <i>Purificazione del campione tramite SPE</i> | 78 |
| 3.3.5 | <i>Prove su matrice e metodica finale</i> | 82 |
| 3.4 | Conclusioni | 86 |
| | Bibliografia | 89 |

Capitolo 1

Introduzione alla ricerca di pesticidi nel latte

La ricerca di residui di pesticidi nel latte riveste un ruolo importante per quanto riguarda la qualità di questo alimento per valutarne la sicurezza e i possibili rischi per la salute umana.

Nel secolo scorso grandi sforzi sono stati fatti nel migliorare la produttività agricola facendo in modo di produrre maggiori quantità da campi coltivati sempre meno estesi con meno lavoro. L'utilizzo dei pesticidi ha sicuramente apportato dei benefici nell'aumentare le produzioni agricole ma, a causa del fenomeno di bioaccumulo lungo la catena alimentare, tali sostanze possono rappresentare un rischio e una minaccia sia per la salute animale che per quella umana.

Nel mondo livelli allarmanti di pesticidi sono stati ritrovati nell'aria, nell'acqua, nel suolo così come negli alimenti e in materiale biologico.

Tra i pesticidi gli organofosforati vengono ampiamente utilizzati in agricoltura a causa della loro elevata efficacia e selettività, il relativo basso costo ma soprattutto per la loro breve persistenza nell'ambiente in confronto ai pesticidi organoclorurati. Nonostante ciò gli organofosforati restano dei composti molto tossici e durante la loro breve permanenza nell'ambiente possono contaminare il suolo, le acque e in particolar modo le piante.

È possibile, pertanto, ritrovare residui di pesticidi sia nei prodotti di origine vegetale sia nei prodotti di origine animale, tra cui il latte, come conseguenza dei vari passaggi nella catena alimentare.

Per tale motivo la legislazione sugli organofosforati è sempre più restrittiva ed in continuo aggiornamento al fine di vietare l'utilizzo di quelli particolarmente pericolosi, e di abbassare sempre di più il valore del limite massimo residuale (MRL) negli alimenti per tutti gli altri.

Il latte rappresenta un alimento essenziale sia per i bambini che per gli adulti ed è pertanto di fondamentale importanza rilevare e quantificare la presenza di eventuali residui nocivi per la salute umana. Esso è un fedele specchio dell'ecosistema che lo circonda, dell'ambiente e delle pratiche che portano alla produzione di alimenti per animali.

Alcune sostanze indesiderate, sia che abbiano o meno effetti negativi sulla salute animale, possono essere secrete dopo l'elaborazione attraverso l'animale stesso ed il suo apparato emuntorio: i loro residui potrebbero in alcuni casi incidentali avere effetto sulla salute dei consumatori.

È importante che la presenza di residui e contaminanti nel latte e nei suoi derivati sia la più bassa possibile e venga pertanto monitorata in modo mirato con frequenza adeguata al rischio.

Tra questi residui fanno parte anche i pesticidi organofosforati la cui presenza nel latte può derivare da due cause principali:

- contaminazione diretta dell'animale, in seguito all'utilizzo di tali composti come insetticidi contro i parassiti esterni dell'animale stesso
- contaminazione indiretta dell'animale, in seguito all'assunzione di foraggio ed acqua contaminati direttamente o indirettamente per fenomeni di deriva

Il presente lavoro di ricerca è stato suddiviso in due parti:

1) messa a punto e validazione di una metodica analitica in gascromatografia accoppiata a rivelatori specifici per il fosforo (GLC-NPD) per la determinazione di 15 pesticidi appartenenti alla classe degli organofosforati, un gruppo specifico di pesticidi, ad azione prevalentemente insetticida ed il cui ampio spettro d'azione ne ha favorito una larga diffusione:

- Acephate
- Azinphos-ethyl
- Chlorpyrifos
- Chlorpyrifos-methyl
- Diazinon
- Disulfoton
- Methacrifos
- Methamidophos
- Methidation
- Oxidemethon-methyl
- Parathion-ethyl
- Phorate
- Pirimiphos-methyl
- Pyrazophos
- Triazophos

2) messa a punto di una metodica analitica mediante cromatografia liquida accoppiata a rivelatore fluorimetrico (HPLC-FL) per la determinazione del glyphosate, erbicida organofosforato le cui caratteristiche chimico-fisiche, diverse da tutti gli altri pesticidi analizzati, hanno indotto alla scelta dell'analisi mediante cromatografia liquida.

1.1 I pesticidi

1.1.1 Cenni generali

L'Agenzia di Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) definisce come pesticida ogni sostanza o miscela di sostanze intese a prevenire, distruggere o mitigare insetti, animali, vegetali o microrganismi indesiderabili o nocivi. I pesticidi possono anche essere descritti come qualsiasi agente fisico, chimico o biologico in grado di eliminare animali o vegetali indesiderati o nocivi. [1]

Il termine generico di pesticida viene considerato come un sinonimo di insetticida, in realtà oltre alle principali classi di pesticidi usati in agricoltura, che comprendono insetticidi, erbicidi e fungicidi, altri gruppi di pesticidi sono gli acaricidi, i larvicidi, i rodenticidi, i feromoni, i regolatori di crescita delle piante, i repellenti, etc.

Oltre 800 pesticidi formulati in differenti prodotti sono registrati dall'EPA per l'utilizzo negli Stati Uniti, dove circa il 75% di essi vengono usati per l'agricoltura ed il restante 25% per uso domestico. [2]

Questi composti possono essere classificati secondo diversi criteri:

- secondo le loro caratteristiche chimiche: organoclorurati, organofosforati, carbamati, etc.
- in base all'organismo bersaglio: insetticidi, erbicidi, fungicidi, rodenticidi, acaricidi, etc.
- in base al loro meccanismo d'azione [3]

Nei secoli l'uomo ha sviluppato molti metodi ingegnosi nell'intento di controllare gli invertebrati, i vertebrati e i microrganismi che minacciano costantemente le sue fonti di cibo e la sua salute. La letteratura antica è ricca di descrizioni di malattie delle piante, del flagello degli insetti e delle misure prese per il loro controllo. Prima del 1000 A.C. i Cinesi utilizzarono lo zolfo come fumigante. Per le sue proprietà fungicide, lo zolfo elementare fu usato nel 1800 in Europa contro la ruggine delle piante che ricopriva i frutti. Nel sedicesimo secolo i Cinesi applicarono quantità moderate di composti contenenti arsenico con la funzione di insetticidi. Nel 1690 furono spruzzati come insetticidi gli estratti acquosi delle foglie di tabacco e fu introdotta la nux vomica (i semi della *Strychnos nux-vomica*) per uccidere i roditori. Verso la metà del 1800 furono usati come insetticidi sia la radice ridotta in polvere della *Derris elliptica*, che contiene rotenone, che il piretro estratto dai fiori di crisantemo.

L'era della moderna chimica di sintesi iniziò negli anni trenta e portò allo sviluppo di una serie di composti, quali gli insetticidi alchiltiocianati, i fungicidi ditiocarbamati, e vari fumiganti quali il di-bromuro di etilene, il bromuro di metile, l'ossido di etilene e il disolfuro di carbonio. All'inizio della seconda guerra mondiale erano allo studio numerosi pesticidi, quali il diclorodifeniltricloroetano (DDT), il dinitrocresolo, l'acido 4-cloro-o-tolil ossiacetico (MCPA) e l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D). Nel dopo guerra ci fu un rapido sviluppo del campo agrochimico, caratterizzato dall'introduzione di molti insetticidi, fungicidi, erbicidi, e altri pesticidi. [1]

In nessun campo della chimica organica sintetica vi fu mai una simile varietà di strutture chimiche, che nascevano dall'applicazione dei principi della chimica ai meccanismi di azione nelle specie bersaglio, al fine di rendere i pesticidi selettivi e specifici e ridurre, quindi, i loro effetti tossici su altre forme di vita.

È importante notare che, nonostante lo sviluppo odierno di derivati di seconda e terza generazione dei primi pesticidi chimici, tutti i pesticidi

presentano intrinsecamente un certo grado di tossicità per alcuni organismi viventi, altrimenti non sarebbero di alcun uso pratico.

Sfortunatamente la selettività dei pesticidi per le specie bersaglio non è così alta come si potrebbe sperare per cui, spesso, specie non-bersaglio vengono intossicate in quanto posseggono dei sistemi fisiologici e/o biochimici simili a quelli degli organismi bersaglio. Un pesticida completamente sicuro non esiste; ci sono tuttavia pesticidi che possono essere usati in modo sicuro e/o che presentano un minimo rischio per la salute umana, quando vengono utilizzati rispettando le avvertenze poste sull'etichetta. [4]

Nonostante le attuali controversie sull'uso dei pesticidi e sulla presenza di residui nel cibo, nell'acqua e nell'aria, questi agenti rappresentano ancora una componente essenziale per salvaguardare i raccolti e la salute umana. A tal proposito non vanno dimenticati i benefici ottenuti dal loro uso nel passato quali: la soppressione di un'epidemia di tifo a Napoli da parte del DDT nel 1944; il controllo della "cecità da fiume" (oncocerciasi) nell'Africa occidentale per eliminazione dell'insetto vettore (mosca nera) mediante l'uso di temefos; ed il controllo della malaria in Africa, in Medio Oriente e in Asia tramite l'eliminazione della popolazione di zanzare portatrice del plasmodio della malaria in seguito all'uso di un'ampia varietà di insetticidi. [5]

1.1.2 Contaminazione degli alimenti

Fra le contaminazioni "accidentali" degli alimenti, generalmente conseguenti a contaminazioni ambientali operate da attività produttive prevalentemente agricole, ma anche industriali e domestiche, i pesticidi occupano una posizione importante.

Il problema tossicologico più importante dei fitofarmaci è certamente quello degli effetti a lungo termine, prevalentemente legati alla possibile presenza di residui nei prodotti alimentari. [6]

Tra gli alimenti il latte costituisce da sempre uno degli alimenti più importanti per l'uomo venendo utilizzato come tale o sotto forma di prodotti di trasformazione e derivati.

Numerose sono le sostanze che una volta pervenute nell'organismo dell'animale sono in grado di passare nel latte, per cui sia composti utilizzati a fini terapeutici sia assunti inconsapevolmente con gli alimenti o con l'acqua di bevanda, o per contatto, possono alterarne la genuinità. L'interesse di tale dato di fatto non si rivolge solo al consumatore diretto, ma anche alla possibilità che dette sostanze estranee, possano alterare i processi di trasformazione di tale alimento.

La presenza di pesticidi e di altri contaminanti ambientali nel latte può dipendere dall'assunzione attraverso la via digerente (alimenti ed acqua da bere), la via cutanea (per contatto), la via respiratoria (inalazione durante i trattamenti). Per quanto riguarda l'assunzione attraverso la via digerente, essa può avvenire quando gli animali si alimentano con foraggi freschi, fieni ed insilati o anche granaglie inquinati direttamente, per irrorazione con

parassitici per la conservazione o la difesa dai parassiti, per inquinamento ambientale, dalle acque di irrorazione, o indirettamente per passaggio delle sostanze dal terreno inquinato nelle piante. L'assunzione può anche avvenire se gli inquinanti contaminano l'acqua da bere degli animali. Attraverso la cute l'assorbimento dei pesticidi può avvenire quando gli animali sono sottoposti a trattamenti per eliminare gli ectoparassiti, o passano in campi irrorati di recente con antiparassitari, o quando vengono lasciati nella stalla durante la disinfestazione.

In quest'ultimo caso ovviamente l'assorbimento avviene anche per via inalatoria. [7]

I pesticidi assunti passano così nel latte e, se in quantità sufficiente, possono determinare gli effetti tossici caratteristici di tali composti. In particolare gli organofosforati tendono a legarsi in modo covalente alle proteine, e ciò può portare ad una loro persistenza nel latte. Infatti è stato provato che la caseina può legare tali sostanze soprattutto attraverso residui seril e fosfoseril. [8]

Inoltre le proprietà lipofile di molti organofosforati favoriscono il loro accumulo in matrici ricche di lipidi come il latte. [9]

Per questi motivi il latte può essere una delle possibili fonti di esposizione agli organofosforati. La determinazione di tali residui nel latte è quindi molto importante per valutare in modo corretto e completo il rischio per il consumatore, con particolare attenzione alla sicurezza dei bambini e degli anziani. [10]

1.1.3 I pesticidi organofosforati

Nel vasto mondo dei pesticidi occupa un posto rilevante il gruppo degli organofosforati; sostanze prevalentemente insetticide il cui ampio spettro d'azione e relativa breve persistenza nell'ambiente ne hanno favorito una larga diffusione.

Appartengono alla classe degli organofosforati molti composti con strutture diverse che sono stati sintetizzati al fine di trovare agenti altamente tossici per gli insetti e relativamente innocui per le specie non bersaglio.

Esistono oltre 200 esteri organofosforici presenti in migliaia di formulazioni.

Gli insetticidi organofosforici furono sintetizzati per la prima volta nel 1937, ma si dimostrarono troppo tossici e, sfortunatamente, sotto l'influenza nazista durante la seconda guerra mondiale, vennero sviluppati come armi chimiche. Nonostante sia vero che tutti gli esteri fosforici derivino dai gas nervini, è anche vero che gli insetticidi in uso oggi sono almeno quattro "generazioni" lontani da quei primi composti altamente tossici.

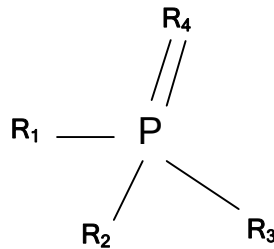
Il primo organofosforato ad essere commercializzato come insetticida fu il tetraetilpirofosfato (TEPP) che, sebbene molto efficace, era estremamente tossico e chimicamente instabile, essendo facilmente idrolizzato in presenza di umidità. La ricerca successiva, che fu diretta allo sviluppo di composti chimicamente più stabili e poco persistenti nell'ambiente, portò alla sintesi del parathion nel 1944 e successivamente al suo analogo ossigenato, il paraoxon. Sebbene questi due composti avessero le

proprietà desiderate di un insetticida (bassa volatilità, stabilità chimica alla presenza della luce solare e in acqua, buona efficacia), entrambi si dimostrarono estremamente dannosi nei mammiferi e poco selettivi. L'elevato numero di intossicazioni dovute al parathion fornì lo stimolo per la ricerca di composti analoghi che fossero più selettivi per le specie bersaglio e meno tossici per tutte le altre quali l'uomo, gli animali domestici e selvatici. [1]

Nonostante si siano in seguito sintetizzati nuovi insetticidi, quali gli esteri dell'acido carbammico, più sicuri e selettivi, che hanno portato ad una diminuzione dell'utilizzo degli organofosforati, questi rimangono tuttora un importante gruppo di pesticidi.

1.1.4 Caratteristiche chimiche

A causa del vasto numero e dell'ampia varietà chimica di questi composti risulta difficile classificarli; possono comunque essere genericamente rappresentati dalla seguente struttura:



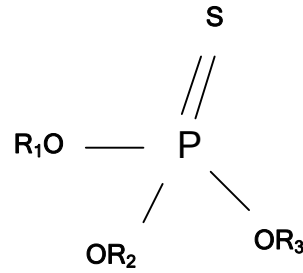
dove al centro, come punto fisso e caratteristico del gruppo, vi è un atomo di fosforo pentavalente, legato a quattro residui di diversa natura che determinano le proprietà chimico-fisiche dei vari pesticidi.

Tre sono le principali classi nelle quali sono inseriti i principi attivi presi in considerazione nella prima fase della ricerca (il pesticida glyphosate verrà trattato nel Paragrafo successivo):

- fosforotioati (con un atomo di zolfo)
- fosforoditioati (con due atomi di zolfo)
- fosforoamidotioati (con un atomo di zolfo ed un gruppo amidico)

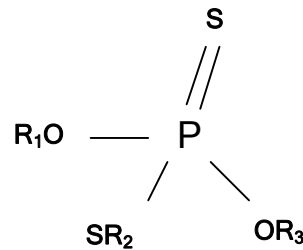
Fosforotioati:

- Chlorpyrifos
- Chlorpyrifos-methyl
- Diazinon
- Methacrifos
- Oxidemethon-methyl
- Parathion-ethyl
- Parathion-methyl
- Pirimiphos-methyl
- Pyrazophos
- Tryazophos



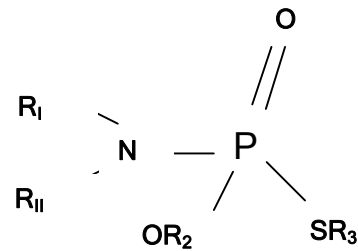
Fosforoditioati:

- Azinphos-ethyl
- Disulfoton
- Methidation
- Phorate



Fosforoamidotioati:

- Acephate
- Methamidophos



Risulta evidente che la diversa struttura molecolare determina la formazione di composti caratterizzati da differente comportamento chimico-fisico e tossicologico.

1.1.5 I pesticidi oggetto della ricerca

Nel presente lavoro di ricerca sono stati analizzati tutti gli insetticidi organofosforati avente un limite massimo residuale (MRL) nel latte fissato dalla Commissione Europea (CE). [11]

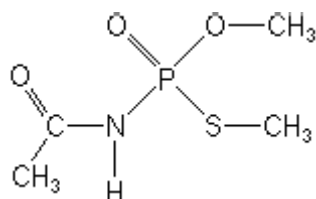
Di seguito sono riportate alcune caratteristiche relative a ciascun pesticida analizzato.

Acephate

È un insetticida-aficida citotropico particolarmente efficace per contatto ed ingestione su lepidotteri ed emitteri, con un'azione pronta e persistente.

Nome chimico: O,S-dimethyl-acetylphosphoramidothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₄H₁₀NO₃PS

Proprietà chimiche e fisiche: temperatura ambiente è in fase solida, incolore, maleodorante, ha una solubilità di circa 650 g/L in acqua; il suo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di - 0,9 (Log P_{ow}). Si decompone a temperature intorno ai 90 °C. [12] [13] [14]

Utilizzo: viene utilizzato prevalentemente come insetticida spray fogliare, la cui attività sistemica ha una moderata persistenza (10-15 giorni). Esplica la sua azione soprattutto sugli insetti "succhiatori" quali afidi, includendo specie resistenti su pomacee, drupacee, agrumi, vite, olivo, barbabietola da zucchero, mais, tabacco, fragola, orticole, floricole e ornamentali. Trova un largo impiego nella lotta contro la *Piralide* nelle colture di mais. Le principali formulazioni di utilizzo sono in polvere solubile, in spray e in granuli. [15]

Degradazione: rapida, con un tempo di dimezzamento minore di 3 giorni in terreni aerobi e di 6 giorni in terreni anaerobi. Il composto viene metabolizzato in methamidophos, sostanza più persistente nelle piante rispetto all'acephate. [12] [13]

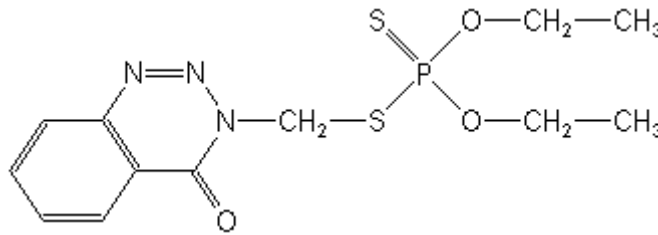
Classe di tossicità: EPA III. [16] [17]

Azinphos-ethyl

É un insetticida citotropico ad ampio spettro d'azione, indicato per la difesa di diverse colture arboree ed erbacee.

Nome chimico: S-3,4(dihydro-4-oxobenzolo[d]-[1,2,3]-triazin-3-ylmethyl) O,O-diethyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₁₂H₁₆N₃O₃PS₂

Proprietà chimiche e fisiche: è una sostanza incolore con punto di fusione di 50 °C; solubilità in acqua scarsissima di 4-5 mg/L a 20 °C; il suo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,18 (Log P_{o/w}). Viene idrolizzato rapidamente in substrati alcalini, più stabile in quelli acidi. [12] [13] [14]

Utilizzo: è un insetticida ed acaricida non sistemico che agisce per contatto ed ingestione contro numerosi insetti, quali afidi, cimici, cocciniglie, cicaline etc. su diverse colture come pomacee, vite, soia, erba medica, colza, frumento etc.

Degradazione: è un prodotto che manifesta un elevato potere residuo e la cui efficacia non viene influenzata dalla temperatura. Nel suolo il tempo di emivita è di diverse settimane con la formazione di vari metaboliti. [13] [14]

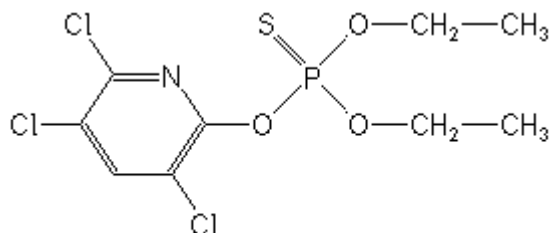
Classe di tossicità: EPA I. [16] [17]

Chlorpyrifos

É un insetticida che agisce per contatto, ingestione ed inalazione, indicato per combattere numerosi fitofagi delle principali colture.

Nome chimico: O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₉H₁₁Cl₃NO₃PS

Proprietà chimiche e fisiche: è un solido cristallino, incolore e maleodorante con il punto di fusione di 41-44 °C. È poco solubile in acqua (2mg/L a 25 °C) e il suo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 5,1 (Log P_{o/w}). Presenta il più alto peso molecolare tra i composti analizzati (PM 350,62). [12] [13] [14]

Utilizzo: è un insetticida a largo spettro d'azione che agisce direttamente sull'insetto come veleno da contatto. Viene usato in diverse colture come soia, girasole, mais, alberi da frutta etc. In formulazione microgranulare è indicato per combattere gli insetti del terreno quali maggiolini, grillotalpa, larve di ditteri e formiche. Trova impiego non solo in campo agricolo, ma anche domestico e in veterinaria è usato come ectoparassitocida su diverse specie animali. [13] [14]

Degradazione: nella distribuzione al terreno persiste per due-tre mesi e non trasmette odori o sapori sgradevoli alle parti eduli delle colture. Negli organismi animali viene attivato, mediante il sistema microsomiale P₄₅₀, a chlorpyrifos-oxon. La moderata tossicità del chlorpyrifos, in confronto agli altri fosforotioati, è da rapportarsi ai processi di detossificazione catalizzati dalle esterasi. Questi enzimi, infatti, presentano una maggiore affinità per tale composto, rispetto ad altri fosfati-oxon. [12]

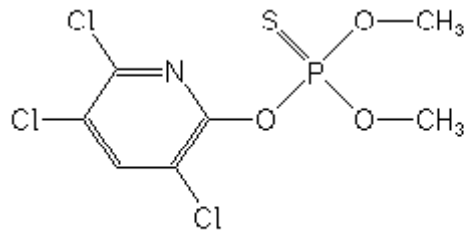
Classe di tossicità: EPA II. [16]

Chlorpyrifos-methyl

È un insetticida a largo spettro d'azione ed a persistenza non elevata che agisce per contatto, per ingestione e per vapore.

Nome chimico: O,O-dimethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: $C_7H_7Cl_3NO_3PS$

Proprietà chimiche e fisiche: è un solido cristallino, incolore, con un punto di fusione compreso tra 45-46 °C. La sua solubilità in acqua è scarsa (4mg/L a 25 °C) e il suo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 4,3 (Log $P_{o/w}$). È abbastanza stabile in condizioni neutre mentre viene rapidamente idrolizzato in ambiente acido e alcalino. [12] [13]

Utilizzo: è molto attivo contro le larve di lepidotteri in genere e in particolare contro le ricamatrici dei fruttiferi (*Pandemis*, *Capua*, *Cacoecia*), con elevato potere abbattente anche nei confronti di larve già protette nelle foglie. Inoltre esplica un notevole controllo sulle neanidi delle cocciniglie di fruttiferi ed agrumi. [14]

Degradazione: subisce una degradazione microbica trasformandosi in 3,5,6-trichloropyridin-2-ol che viene successivamente degradato in un composto organoclorurato e carbon dioxide. [13]

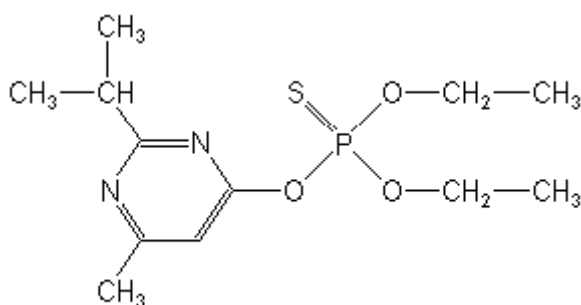
Classe di tossicità: EPA III. [16]

Diazinon

È un insetticida polivalente che possiede azione citotropica ed agisce sui fitofagi per contatto ed ingestione.

Nome chimico: O,O-diethyl O-2isopropyl-6-methylpyrimidin-4-yl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₁₂H₂₁N₂O₃PS

Proprietà chimiche e fisiche: è un liquido incolore con il punto di ebollizione di 83-84 °C. La solubilità in acqua a temperatura ambiente è di 60 mg/L e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,3 (Log P_{o/w}). Si decompone a temperature superiori ai 120 °C. [12] [13]

Utilizzo: è un insetticida conosciuto da tempo il cui utilizzo risale agli anni cinquanta. I suoi campi di impiego sono principalmente due: a) nel trattamento della coltura e del terreno di olivo, agrumi, drupacee, melo, pero, melograno, nocciolo, girasole, barbabietola da zucchero, floricole, ornamentali, forestali e pioppo; b) impiego (solo con formulazioni granulari) per il trattamento in pre-emergenza o pre-semina come geodisinfezzante del terreno destinato a colture di patata, carota e mais. [14]

Degradazione: è poco persistente nel suolo. Il tempo di dimezzamento è tra 2-4 settimane. Enzimi batterici rendono più veloce la degradazione del diazinon nel suolo. La persistenza in acqua dipende molto dal grado di acidità. A pH acido metà della concentrazione iniziale del composto viene degradato in 12 ore, a pH neutro in 6 mesi. Nelle piante, una bassa temperatura ed un alto contenuto di olio, incrementano la persistenza del diazinon. Il range di permanenza va da 2 a 14 giorni. [13]

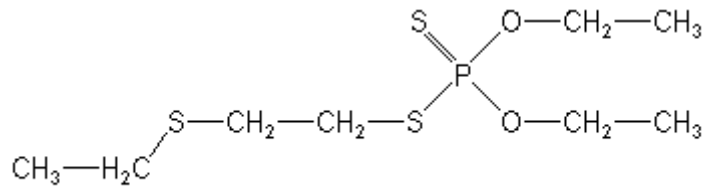
Classe di tossicità: EPA II o III, a seconda delle formulazioni. [16]

Disulfoton

È un insetticida ed acaricida sistemico; assorbito dalle radici si distribuisce su tutta la pianta e mantiene una lunga attività residua.

Nome chimico: O,O-diethyl S-2-ethylthioethyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₈H₁₉O₂PS₃

Proprietà chimiche e fisiche: è un olio incolore con odore pungente. Il punto di fusione è inferiore a -25 °C ed è scarsamente solubile in acqua (12 mg/L a 20 °C). Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,95 (Log P_{o/w}). Stabile nelle normali condizioni di stoccaggio degli alimenti, viene idrolizzato in media alcalini. [12] [13]

Utilizzo: è un insetticida ed acaricida sistemico, assorbito dalle radici si distribuisce su tutta la pianta e mantiene una lunga attività residua. Viene usato nel controllo di insetti “succhiatori” in colture quali patate, cereali, mais, frutta e piante ornamentali. [13]

Degradazione: nelle piante viene metabolizzato rapidamente e, come negli animali, i due metaboliti principali sono il disulfoton sulfoxide e il sulfone. Lo stesso metabolismo avviene nel suolo e nell’acqua. [13]

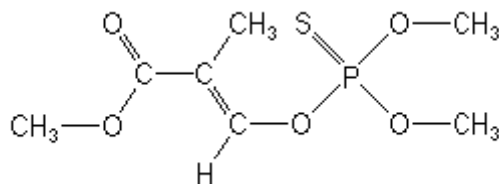
Classe di tossicità: EPA I. [16]

Methacrifos

È un insetticida ed acaricida sistemico che viene assorbito per contatto diretto, per via digerente e respiratoria.

Nome chimico: (E)-O-2-methoxycarbonylprop-1-enyl O,O-dimethyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₇H₁₃O₅PS

Proprietà chimiche e fisiche: è un liquido incolore con una solubilità in acqua di 400 mg/L a 20 °C. Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,0 (Log $P_{o/w}$); è relativamente instabile in condizioni alcaline. Si decompone a temperature superiori ai 200 °C. [12] [13]

Utilizzo: è un insetticida ed acaricida sistemico che viene assorbito per contatto diretto, per via digerente e respiratoria. Causa un rapido abbattimento degli insetti, e presenta una lunga attività residuale. Viene usato soprattutto per il controllo di artropodi in prodotti stoccati. [13]

Degradazione: viene rapidamente escreto negli animali; il metabolismo prevede l'idrolisi dell'estere metilico.

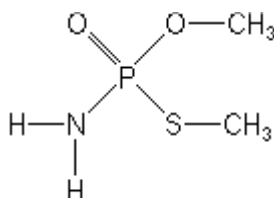
Classe di tossicità: EPA II. [16]

Methamidophos

È un insetticida-acaricida sistemico attivo per contatto ed ingestione contro numerosi fitofagi.

Nome chimico: O,S-dimethyl phosphoramidothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₂H₈NO₂PS

Proprietà chimiche e fisiche: è un solido cristallino, incolore, con odore pungente. Il punto di fusione è di 45 °C. È molto solubile in acqua (200 g/L a 20 °C). Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di -0,8 (Log $P_{o/w}$). Presenta insieme all'acephate il peso molecolare più basso di tutti i composti analizzati (PM 141,12). [12] [13]

Utilizzo: è un prodotto che si caratterizza per la capacità di penetrare nei tessuti vegetali e per la lunga durata d'azione. In particolare viene usato contro insetti ed acari di drupacee (albicocco, pesco, susino), pomacee (melo e pero), barbabietola da zucchero, patata, mais, floricole in pieno campo e da serra. [14]

Degradazione: rappresenta un metabolita molto tossico della degradazione dell'acephate; nel suolo e nell'acqua presenta un tempo di emivita di alcuni giorni. [13]

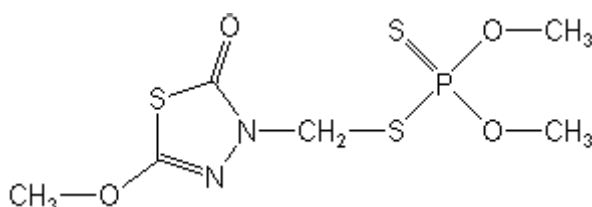
Classe di tossicità: EPA I. [16]

Methidation

È un insetticida a largo spettro d'azione e spiccata attività anticoccidica che agisce sui fitofagi per contatto ed ingestione.

Nome chimico: S-2,3-dihydro-5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3-ylmethyl phosphorodithioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₆H₁₁N₂O₄PS₃

Proprietà chimiche e fisiche: è un solido cristallino incolore con punto di fusione compreso tra 39 e 40 °C. La solubilità in acqua è di 250 mg/L a 20 °C e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 2,2 (Log P_{o/w}). [12] [13]

Utilizzo: agisce per contatto ed ingestione ed è in grado di penetrare nei tessuti vegetali (azione citotropica), raggiungendo così gli insetti protetti ed annidati entro e fra i tessuti vegetali. È caratterizzato inoltre da una notevole persistenza d'azione e da un'alta attività biologica anche a basse temperature. Gli insetti controllati sono cocciniglie, afidi, tripidi, tignole, minatrici, cimici e ricamatori. È un fosfororganico revocato in Europa, ma mantenuto in Italia fino al 2007 per usi essenziali sull'olivo. [14]

Degradazione: è poco persistente nel suolo, il tempo di dimezzamento è di circa 7 giorni. Il composto viene rapidamente degradato nel suolo e nell'acqua mediante processi chimici, fotolitici e biologici. In condizioni alcaline il methidation viene rapidamente degradato da reazioni chimiche. Non è stato mai ritrovato nelle falde acquifere, questo si deve, probabilmente, al breve tempo di dimezzamento del composto e alla sua degradazione. [13]

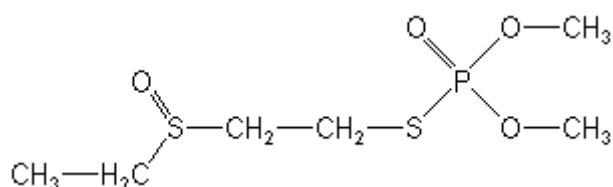
Classe di tossicità: EPA I. [16]

Oxidemethon-methyl

È un insetticida ad azione sistemica (per assorbimento fogliare e radicale) e per contatto, caratterizzato da una rapida penetrazione nei vegetali trattati e da una lunga durata dell'attività biologica.

Nome chimico: S-2-ethylsulphinyethyl O,O-dimethyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₆H₁₅O₄PS₂

Proprietà chimiche e fisiche: è un liquido incolore completamente miscibile in acqua e con un punto di fusione minore di -20 °C. Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di -0,7 (Log P_{o/w}). [12] [13]

Utilizzo: viene impiegato su melo, pero, barbabietola da zucchero, frumento, patata e tabacco per il controllo di vari fitofagi quali: afidi, tripidi, larve di ditteri, cicaline, cimici, con azione collaterale contro il raghetto giallo. [14]

Degradazione: viene rapidamente degradato ed eliminato sia negli animali sia nelle piante che nel suolo e nell'acqua. [13]

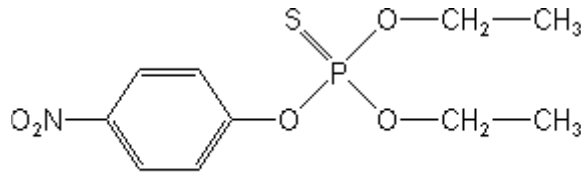
Classe di tossicità: EPA I. [16]

Parathion-ethyl

È un insetticida che agisce principalmente per contatto, oltre che per ingestione ed asfissia, contro numerosi fitofagi.

Nome chimico: O,O-diethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: $C_{10}H_{14}NO_5PS$

Proprietà chimiche e fisiche: è un liquido giallognolo con odore acre pungente. Il punto di fusione è di $6,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. È poco solubile in acqua (11 mg/L a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,8 ($\text{Log } P_{o/w}$). [12] [13]

Utilizzo: è un insetticida ad ampio spettro d'azione usato in molte colture contro numerose specie di insetti. Ha azione non sistemica, agisce per contatto diretto e come fumigante. Non è fitotossico eccetto che per alcune piante ornamentali, per il sorgo e per alcune varietà di mele, pere e pomodori. Sviluppa una rapida azione iniziale ed una lunga persistenza; inoltre, manifesta un buon potere citotropico che permette la penetrazione, in profondità, nei tessuti vegetali trattati. [14]

Degradazione: si lega molto alle particelle del suolo, in poche settimane viene degradato da processi chimici e biologici. Rimane nella parte più superficiale del suolo dove subisce la fotodegradazione. La luce solare converte il parathion nel suo metabolita attivo paraoxon, molto più tossico del parathion. La degradazione è accelerata dal pH alcalino, dai microrganismi del suolo, dalla luce solare, dalle piante e dall'acqua. Nell'acqua rimane per non più di una settimana e nelle piante per non più di un mese. [13]

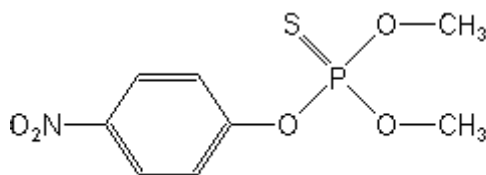
Classe di tossicità: EPA I. [16]

Parathion-methyl

È un insetticida che agisce principalmente per contatto, oltre che per ingestione ed asfissia, contro numerosi fitofagi.

Nome chimico: O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₈H₁₀NO₅PS

Proprietà chimiche e fisiche: è un solido cristallino incolore e inodore con un punto di fusione compreso tra 35 e 36 °C. La sua solubilità è scarsa in acqua (55 mg/L a 20 °C) e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,0 (Log P_{o/w}). [12] [13]

Utilizzo: è un insetticida ed acaricida non sistemico attivo per contatto diretto, per inalazione o per ingestione. È caratterizzato da un vasto spettro d'azione e presenta in genere il medesimo campo di attività del Parathion-ethyl, rispetto al quale risulta più efficace contro alcuni fitofagi, quali psilla del pero, afidi, mosca delle olive e bega del garofano. Sviluppa una rapida azione iniziale ed una lunga persistenza ed inoltre manifesta una buona capacità di penetrazione (effetto citotropico) nei tessuti vegetali. [14]

Degradazione: nei mammiferi dopo somministrazione orale viene escreto completamente con le urine in 24 ore. I più importanti metaboliti nell'uomo sono il 4-nitrophenol e il dimethyl phosphate. Nelle piante i maggiori metaboliti sono il p-nitrophenol e il p-s-demethyl parathion-methyl. Nel suolo possiede una media mobilità dove viene degradato rapidamente. [14]

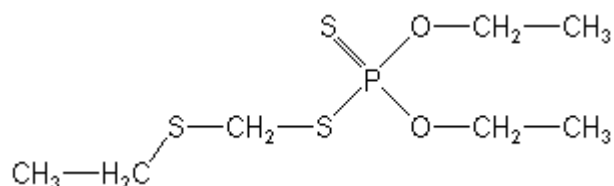
Classe di tossicità: EPA I. [14]

Phorate

È un fosfororganico sistemico che agisce per contatto, ingestione ed asfissia, indicato per la geodisinfestazione totale o localizzata dei terreni di varie colture.

Nome chimico: O,O-diethyl S-ethylthiomethyl phosphorodithioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₇H₁₇O₂PS₃

Proprietà chimiche e fisiche: è un liquido incolore parzialmente solubile in acqua (50 mg/L a 25 °C), il punto di ebollizione è di 118-120 °C e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,9 (Log P_{ow}). [12] [13]

Utilizzo: distribuito nei periodi delle semine o dei trapianti protegge le piantine per tutto il primo e il più delicato periodo di vegetazione, sia dall'attacco di parassiti delle radici e del colletto (agrostidi, atomarie, blaniuli, elateridi, grillotalpe, maggiolini, mosche e punteruoli delle radici, stipule e nematodi dei generi *Meloidogyne* e *Pratylenchus*), sia da precoci attacchi di parassiti delle foglie e degli steli (afidi, mosche minatrici, ragno rosso). [14]

Degradazione: è moderatamente persistente nel suolo, con un tempo di dimezzamento di 60 giorni. La persistenza nel suolo è influenzata dal tipo di terreno e dal suo contenuto di materiale organico, dalla pioggia e dal pH. In acqua con pH acido il tempo di dimezzamento va da qualche giorno a poche settimane, in relazione alla temperatura; in acqua con pH alcalino il tempo di dimezzamento è molto più breve. [12] Il phorate in quanto tale non è persistente nelle piante, ma viene metabolizzato in sulfoxide e sulfone. Questa trasformazione si ha per alcuni giorni dopo l'applicazione del phorate sulla pianta. Dopo circa 80 giorni non si ritrovano più residui di phorate e dei suoi metaboliti nelle piante. [13]

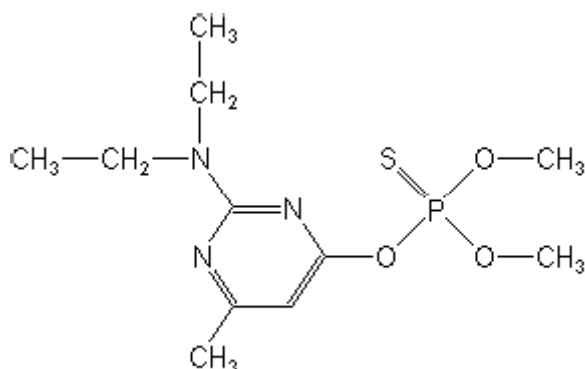
Classe di tossicità: EPA I. [16]

Pirimiphos-methyl

È un insetticida ad ampio spettro d'azione, translaminare, indicato per la difesa di diverse colture e per la difesa dei cereali immagazzinati.

Nome chimico: O-2-diethylamino-6-methylpyrimidin-4-yl O,O-dimethyl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₁₁H₂₀ N₃O₃PS

Proprietà chimiche e fisiche: è un liquido giallo, poco solubile in acqua (5 mg/L a 30 °C) con un punto di fusione di 15-18 °C. Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 4,2 (Log P_{o/w}). [12] [13]

Utilizzo: agisce per contatto ed asfissia contro diversi fitoparassiti. In particolare, fra i parassiti delle colture combatte afidi, cocciniglie, tignole, tignolette, tripidi, mosche, insetti terricoli etc.; fra i parassiti dei cereali immagazzinati risulta efficace contro calandra, silvano, trogoderma, cappuccino, tignola, acarus siro. [14]

Degradazione: è un prodotto che si caratterizza per un'azione rapida ed una scarsa persistenza sulle piante. Nel suolo e nell'acqua il tempo di dimezzamento è inferiore ai 30 giorni, mentre nelle piante il pirimiphos-methyl viene rapidamente eliminato dalla superficie fogliare in seguito alla sua volatilizzazione in 2-3 giorni. [13]

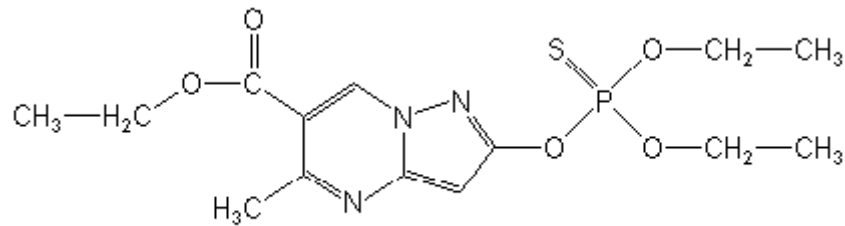
Classe di tossicità: EPA III. [16]

Pyrazophos

Fungicida sistemico ad azione protettiva e curativa.

Nome chimico: Ethyl-2-diethoxyphosphinothioyloxy-5-methylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxylate.

Formula di struttura:



Formula bruta: $C_{14}H_{20}N_3O_5PS$

Proprietà chimiche e fisiche: è un solido cristallino incolore con punto di fusione compreso tra 51 e 52 °C. La solubilità in acqua è scarsa (4,2 mg/L a 20 °C) e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,8 ($\text{Log } P_{o/w}$). [12]
[13]

Utilizzo: fungicida sistemico con azione protettiva e curativa. Viene assorbito dalle foglie e dai germogli e trasportato in tutta la pianta. È utilizzato per il controllo di miceti in un vasto gruppo di colture, in particolare su alberi da frutta oltre che su cereali, alcuni vegetali e piante ornamentali. [13]

Degradazione: il tempo di emivita nelle foglie delle piante di grano è di circa 13 giorni. [13]

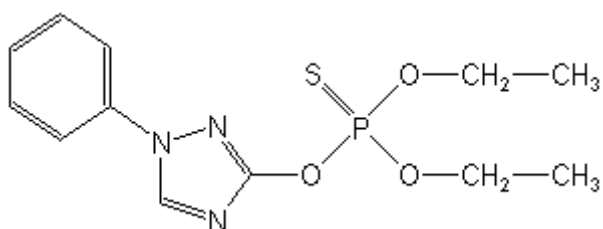
Classe di tossicità: EPA II. [16]

Triazophos

Insetticida-acaricida ad ampio spettro d'azione che agisce per contatto ed ingestione.

Nome chimico: O,O-diethyl O-1-phenyl-1 H-1,2,4-triazol-3-yl phosphorothioate.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₁₂H₁₆N₃O₃PS

Proprietà chimiche e fisiche: è un olio giallo con punto di fusione compreso tra 2 e 5 °C. La solubilità in acqua è di 30-40 mg/L a 20 °C e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è di 3,3 (Log P_{o/w}). [12] [13]

Utilizzo: è un insetticida ed acaricida ad ampio spettro che agisce per contatto diretto o in seguito all'ingestione. Non sistemico, ma penetra in profondità nei tessuti vegetali possedendo anche alcune proprietà nematocida. Protegge piante ornamentali, alberi da frutta, fragole, cereali, barbabietole e canne da zucchero da molte specie di insetti. [13]

Degradazione: viene rapidamente metabolizzato sia nelle piante che nell'ambiente. [13]

Classe di tossicità: EPA II. [16]

| Pesticida | Solubilità in acqua mg/L (°C) | Log P _{o/w} | Classe di tossicità EPA |
|---------------------|-----------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| Acephate | 650.000 (20) | -0,9 | II |
| Azinphos-ethyl | 4-5 (20) | 3,18 | I |
| Chlorpyrifos | 2 (25) | 5,1 | II |
| Chlorpyrifos-methyl | 4 (25) | 4,3 | III |
| Diazinon | 60 (20) | 3,3 | I/II |
| Disulfoton | 12 (20) | 4,0 | I |
| Methacrifos | 400 (20) | 3,0 | I |
| Methamidophos | >200000 (20) | -0,8 | I |
| Methidation | 250 (20) | 2,2 | I |
| Oxidemethon-methyl | 22.000 (20) | -0,7 | I |
| Parathion-ethyl | 11 (20) | 3,8 | I |
| Parathion-methyl | 55 (20) | 3,0 | I |
| Phorate | 50 (25) | 3,9 | I |
| Pirimiphos-methyl | 5 (30) | 4,2 | III |
| Pyrazophos | 4,2 (20) | 3,8 | II |
| Triazophos | 30-40 (20) | 3,3 | II |

Tabella 1.1: Solubilità in acqua, Log P_{o/w} e classe di tossicità EPA dei pesticidi oggetto della ricerca.

1.1.6 Meccanismo d'azione e biotrasformazione

Tutti gli organofosforati, come i carbamati, esercitano la loro azione tossica tramite l'inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi, responsabile della degradazione del neurotrasmettitore acetilcolina.

L'acetilcolinesterasi è caratterizzato dalla presenza nel sito attivo di un residuo di serina che presenta un ossidrile libero (-OH), responsabile dell'attacco nucleofilo all'acetilcolina. Dopo l'attacco dell'ossigeno della serina sul carbonile dell'acetilcolina, la reazione procede con la scissione del complesso tetraedrico. Si libera colina ma l'enzima rimane acetilato.

La reazione si conclude con la deacetilazione causata dall'attacco di una molecola di acqua. Anche lo stadio idrolitico è soggetto a catalasi generale basica (l'azoto basico dell'istidina accetta un protone dell'acqua) e stabilizzazione dell'addotto tetraedrico attraverso legami ad idrogeno.

La reazione tra un estere organofosforico e il sito attivo dell'acetilcolinesterasi porta alla formazione di un complesso intermedio transitorio che viene poi idrolizzato. Rimane l'acetilcolinesterasi fosforilato, stabile, praticamente non reattivo e inibito in modo quasi irreversibile. [1] Molti degli organofosforati introdotti sul mercato negli ultimi anni (acephate, temephos, dichlorvos, trichlorfon) formano dei legami meno stabili con l'acetilcolinesterasi e l'enzima fosforilato si dissocia più facilmente dall'inibitore e si riattiva.

I pesticidi organofosforati sono soggetti ad un esteso processo di biotrasformazione in tutti gli organismi viventi. Le vie metaboliche e le loro velocità sono altamente specie-specifiche e dipendono dai gruppi chimici legati all'atomo centrale di fosforo.

I processi di detossificazione della Fase I formano solitamente metaboliti reattivi che vengono coniugati nella Fase II formando prodotti più solubili e più facili da eliminare.

Gli esteri organofosforici possono subire attacchi enzimatici in diversi punti della molecola. Solo una reazione, la desolfurazione ossidativa porta ad un aumento della tossicità del prodotto di trasformazione. Questo metabolita risulta più tossico del pesticida di partenza sia per gli insetti che per i mammiferi. Nei tessuti dei vertebrati, però, sono presenti idrolisi aromatiche e alifatiche in grado di idrolizzare il metabolita, mentre gli insetti sono più carenti di questi enzimi; questo determina la loro maggiore sensibilità a tali composti. [1]

1.1.7 Tossicità

Poiché l'azione tossica degli organofosforati si esplica a livello dell'inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi, i sintomi da avvelenamento derivano dall'accumulo di acetilcolina nello spazio intersinaptico, e quindi da una continua stimolazione dei recettori colinergici.

L'ampiezza e l'intensità degli effetti osservabili dipendono dal tipo di pesticida, dalla dose e dalla modalità di esposizione o assunzione.

Tossicità acuta: in generale il potenziamento della trasmissione colinergica esalta l'attività di diverse ghiandole aumentandone le secrezioni, provocando nausea, vomito e crampi addominali, tachicardia, convulsioni e paralisi.

La trasmissione neuromuscolare a livello del muscolo scheletrico è potenziata da basse concentrazioni di principio attivo, mentre essa viene bloccata da alte concentrazioni di tale sostanze.

Il blocco è causato inizialmente da una persistente depolarizzazione della membrana ma, se i livelli di acetilcolina permangono elevati, i recettori colinergici si desensibilizzano; in questo caso l'acetilcolina rimarrà inefficace anche dopo che è avvenuta la ripolarizzazione della membrana.

Sebbene gli inibitori dell'acetilcolinesterasi siano in grado di facilitare la trasmissione colinergica a livello dei gangli del sistema nervoso autonomo, in questi siti la loro azione è meno intensa rispetto a quella che esercitano sulla giunzione neuromuscolare. [18]

Tossicità cronica: ripetute e prolungate esposizioni a piccole dosi di un pesticida organofosforato possono provocare gli stessi effetti di una singola massiccia esposizione. Questo perché molti esteri fosforici producono una inibizione dell'acetilcolinesterasi praticamente irreversibile, perciò si può verificare un blocco dell'enzima anche in seguito a piccole dosi. [5]

Mentre i segni acuti si risolvono nel giro di pochi giorni o settimane, alcuni sintomi, in particolare di natura neurologica, sembrano durare più a lungo.

[1] L'interpretazione dei risultati è tuttavia complicata per la difficoltà di attribuire queste alterazioni esclusivamente all'inibizione dell'acetilcolinesterasi e per l'impossibilità di valutare correttamente l'esposizione.

A seguito dell'intossicazione da organofosforati è necessario agire rapidamente e con un intervento vigoroso. Per contrastare gli effetti iniziali dell'accumulo di acetilcolina sui recettori muscarinici viene utilizzata l'atropina. La somministrazione deve essere continuativa fino alla risoluzione dei sintomi più pericolosi (broncospasmo e bradicardia) e fino ad ottenere segni di atropinizzazione (arrossamento, tachicardia).

Come trattamento aggiuntivo per contrastare gli effetti nicotonici e a carico del sistema nervoso centrale vengono somministrare le ossime (Pralidossima o 2PAM, Toxogonina). Questi antidoti vanno usati il più precocemente possibile, ma solo dopo che i sintomi muscarinici sono stati bloccati dall'atropina.

Le ossime sono dei reattivi delle colinesterasi, con il compito di rimuovere il gruppo fosforilato dell'enzima inibito, liberando così il sito catalitico dell'acetilcolinesterasi e ristabilendo le sue normali funzioni.

Questo trattamento per l'intossicazione da insetticidi anticolinesterasici non offre però protezione contro l'insorgenza di neurotossicità ritardata o altri deficit sensoriali, cognitivi o motori, che, sebbene reversibili in tempi lunghi, compaiono costantemente in seguito ad intossicazioni di questo tipo.[19]

1.2 Il glyphosate

1.2.1 Introduzione

Negli ultimi cinquant'anni, l'agricoltura si è resa sempre più dipendente dai composti chimici per il controllo delle piante infestanti, degli insetti e delle malattie. La rivoluzione chimica in agricoltura degli anni '50 sembrava essere la soluzione ad ogni tipo di problema agricolo. In realtà, oggi, si è visto che la situazione non è così semplice. Molte delle sostanze chimiche usate sono risultate tossiche per l'uomo e per l'ambiente, e gli insetti contro cui erano destinati, presto hanno sviluppato una resistenza contro di essi. Ciò ha portato alla necessità di sintetizzare nuovi insetticidi sempre più potenti.

Tra i nuovi pesticidi il glyphosate è sicuramente quello maggiormente utilizzato in tutto il mondo, rappresentando il 60% degli erbicidi ad ampio spettro venduti globalmente.

Le sue proprietà sono state scoperte dalla società americana Monsanto negli anni settanta ed è stato registrato per la prima volta nel 1974 negli Stati Uniti e in Inghilterra. Viene comunemente commercializzato sotto il nome di Roundup, in misura minore sotto i nomi di Vision, Rodeo, Ranger e Sting. La società Zeneca, concorrente della Monsanto, commercializza il glyphosate con il nome di Touchdown. [20]

Il glyphosate è un erbicida sistemico ad ampio spettro d'azione, che trova impiego sia in agricoltura che in altri campi come per esempio quello domestico. Utilizzato su tutti i tipi di piante annuali e perenni, viene principalmente assorbito dalle piante attraverso le foglie e successivamente trasportato in tutti i tessuti vegetali dove agisce su un sistema enzimatico delle piante.

Il meccanismo d'azione esatto non è ancora ben conosciuto, ma è certo che il glyphosate inibisce il metabolismo di alcuni aminoacidi attraverso l'inibizione competitiva dell'enzima 3-enolpiruvil shikimat 5-fosfato sintetasi (EPSPS) come verrà descritto nei prossimi Paragrafi.

Il glyphosate è un acido debole, comunemente usato sotto forma di sale, distribuito come polvere o come concentrato solubile in acqua. Solitamente gli viene aggiunto un surfattante, il polyoxyethylene amine (POEA), che ne favorisce la penetrazione attraverso la superficie delle piante. Altri additivi inclusi sono l'acido solforico e l'acido fosforico. [20]

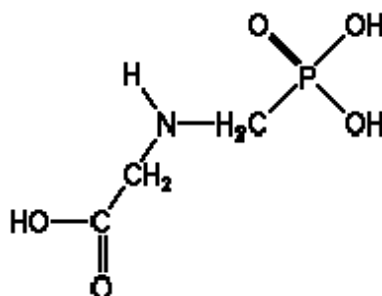
Il suo principale metabolita è l'aminomethyl phosphonic acid (AMPA).

Di seguito vengono riportate schematicamente alcune caratteristiche del glyphosate.

Glyphosate

Nome chimico: N-(phosphonomethyl) glicine.

Formula di struttura:



Formula bruta: C₃H₈NO₅P.

Proprietà chimiche e fisiche: a temperatura ambiente è un solido cristallino incolore; completamente solubile in acqua e assolutamente insolubile nei comuni solventi organici. Molecola non volatile e fotoresistente, possiede quattro valori di costante di dissociazione (pK_a): 2,0 - 2,6 - 5,6 e 10,6 che rendono la molecola altamente polare e anfotera. [21]

Utilizzo: è un'erbicida sistemico, non selettivo, che trova indicazioni d'impiego per diversi diserbanti di:

- colture che non evidenziano sensibilità se la deriva colpisce solamente il tronco ben lignificato: agrumi, melo, pero, noci, olivo e vite.
 - colture che possono evidenziare sensibilità se la deriva colpisce anche il tronco ben lignificato: drupacee (albicocco, mandorlo, ciliegio e altri alberi da frutta).
 - colture per le quali va assolutamente evitato ogni contatto, con possibilità di intervenire solo con attrezzature selettive (umettanti, lambenti ed a goccia): mais, soia, barbabietola da zucchero, foraggere (prati di leguminose e graminacee, erba medica), orticole, floricole e forestali.
 - colture ove l'intervento va effettuato prima della loro emergenza, per esempio l'asparago.
 - terreni agrari in assenza della coltura: fragola, orticole, barbabietola da zucchero, frumento, orzo, segale, avena, mais, riso, soia, prati e vivai.
 - aree non destinate alle colture agrarie: piazzali, aree industriali, banchine stradali, argini di canali, fossi e scoline, parchi e giardini.
- Si applica in post-emergenza alle malerbe e risulta efficace sulle diverse infestanti mono-dicotiledoni, sia perennanti che annuali. [14]

Degradazione: nei mammiferi, in seguito alla somministrazione orale, il glyphosate viene rapidamente escreto tal quale; si lega fortemente al suolo da dove viene rilasciato solo tramite una degradazione microbica con la liberazione del carbon dioxide e il rilascio del suo principale metabolita rappresentato dall'AMPA.

A tal proposito, la multinazionale Zeneca afferma che il suo prodotto Touchdown, contenente glyphosate, viene rapidamente inattivato e degradato nel suolo. [22]

La società Monsanto ha determinato il tempo di emivita del glyphosate stimandolo in un intervallo compreso tra 3 e 141 giorni. [20]

Nei campi la sua lunga persistenza è stata evidenziata in numerosi studi. È stata dimostrata la maggiore resistenza dell'AMPA nel suolo, rispetto al pesticida stesso, ed è stato quantificato il suo tempo di emivita tra 119 e 958 giorni. [23]

Classe di tossicità: EPA III. [16]

1.2.2 Meccanismo d'azione

Viene assorbito dalle foglie delle malerbe, ben sviluppate ed in fase di attiva crescita, e traslocato per via sistemica nelle varie parti della pianta, radici ed organi sotterranei (rizomi, tuberi, stoloni, etc.) che vengono devitalizzati.

I sintomi dell'azione del glyphosate si manifestano solitamente da 7 a 14 giorni dal trattamento, mentre il completo disseccamento delle piante si raggiunge nell'arco di un mese. Gli effetti visivi consistono in un graduale ingiallimento ed avvizzimento delle infestanti, fino ad arrivare al completo imbrunimento e disgregazione dei tessuti vegetali. [14]

Relativamente al meccanismo d'azione questo è specifico nei confronti dei vegetali superiori e si attua tramite l'inibizione competitiva dell'enzima 3-enolpiruvil shikimat 5-fosfato sintetasi (EPSPS), andando ad interferire con la biosintesi delle proteine e particolarmente con la biosintesi dell'acido scichimico, presente solo nelle piante. [20]

Una condizione importante per la migliore riuscita dell'intervento di disinfestazione, è che al momento del trattamento lo sviluppo fogliare delle malerbe sia tale da consentire un adeguato assorbimento dell'erbicida, con successiva traslocazione sino agli organi sotterranei delle piante. Mentre le dicotiledoni perenni sono più sensibili in fioritura, le graminacee perenni, invece, risultano sensibili per un lungo periodo sia in pre che in post-fioritura. Le infestanti annuali vengono distrutte purchè al trattamento si trovino in fase di attiva crescita. Condizioni ambientali con alte temperature, forte intensità luminosa ed un'elevata umidità dell'aria, favoriscono la rapidità d'azione dell'erbicida; la pioggia, invece, può ridurre l'efficacia del trattamento. [14]

Per preservare le colture dall'effetto del glyphosate sono state create varietà transgeniche resistenti. Quasi tutte le piante di soia transgeniche sono resistenti a questo erbicida come anche una gran varietà di cotone e di mais.

Studi effettuati sul grano hanno dimostrato che il glyphosate non viene rimosso con il lavaggio, la macinazione, la cottura o la fermentazione; questo dato viene confermato dalla sua persistenza nei prodotti alimentari per più di due anni. [24]

1.2.3 Il glyphosate nell'ambiente

La società Monsanto dichiara che il glyphosate è essenzialmente immobile nel suolo [20]; questa caratteristica di legarsi permanentemente alle particelle del terreno e di restare sulla superficie ne ha favorito il largo utilizzo.

In realtà sono poche le informazioni circa il comportamento dell'erbicida nel suolo, si pensa che i metalli complessi possano essere le sostanze a cui principalmente si lega. Alcuni studi hanno dimostrato che il glyphosate può essere rapidamente liberato dalle particelle del suolo e, in alcuni particolari terreni come quelli contenenti bassi livelli di ossido di ferro, essere altamente mobile nell'ambiente. [25]

Elevati tenori di argille adsorbono più glyphosate, ma essendo il legame molto labile, l'erbicida viene facilmente rilasciato nell'ambiente.

È stato osservato, inoltre, che la presenza di fosforo inorganico inibisce la degradazione del glyphosate da parte di alcuni batteri; in merito a questo la World Health Organization (WHO) ha disposto degli studi che accertino gli effetti dei fertilizzanti a base di fosfati sulla persistenza del glyphosate nel suolo. [20]

Effetti sui microrganismi

Ricerche sperimentali evidenziano che alcuni importanti batteri e funghi del suolo, tra i quali anche quelli in grado di fissare l'azoto o di degradare sostanze organiche, sono influenzati dal glyphosate anche per diversi mesi. Questo suggerisce la possibilità che l'erbicida possa rimanere attivo e possa essere rilasciato dal suolo e assunto dai microrganismi. [20]

Effetti sugli organismi acquatici

Il glyphosate può contaminare la superficie dell'acqua sia direttamente se usato per il controllo di piante acquatiche, sia indirettamente legato a sostanze del suolo che vengono dilavate e raggiungono così fiumi e laghi. Le formulazioni commerciali che contengono il POEA, additivo circa trenta volte più tossico del glyphosate, risultano dannose nei confronti di pesci ed alcuni invertebrati acquatici. La tossicità del pesticida varia in funzione delle specie e dell'età dei pesci, delle condizioni ambientali e della durezza, del pH e della temperatura dell'acqua.

Attualmente sono ancora pochi gli studi sugli effetti tossici del glyphosate a dosi subletali sugli organismi marini, in caso di esposizioni a lungo termine. [20]

Effetti sugli organismi terrestri

Vari sono gli effetti del glyphosate, e delle formulazioni che lo contengono, sulle diverse specie animali e sulle piante terrestri. Il danno può derivare da un effetto tossico diretto, da un danneggiamento delle scorte alimentari o dalla distruzione di un habitat.

Invertebrati: alcuni studi hanno dimostrato che il glyphosate può avere sia un effetto tossico diretto sia un impatto indiretto dovuto al cambiamento dell'habitat. In ambiente agricolo l'uso dell'erbicida è stato associato a numerosi effetti dannosi verso diverse specie d'insetti predatori dei parassiti dei raccolti. [26]

Mammiferi e uccelli: la tossicità diretta verso questi animali è generalmente bassa; queste popolazioni risentono soprattutto delle mutazioni indotte dall'erbicida ai loro habitat e alle loro risorse alimentari. Alcuni studi sono stati condotti nell'evidenziare gli effetti del glyphosate verso gruppi di piccoli mammiferi selvatici che vivono nelle foreste del Nord America dove l'erbicida è stato utilizzato per limitare la proliferazione di piante che competono per luce e risorse con le conifere. Gli animali, contaminati per contatto diretto o attraverso la loro dieta, hanno mostrato un cambiamento del comportamento. [27] Altri studi hanno messo in correlazione la riduzione di densità di gruppi di uccelli con i cambiamenti ambientali causati dall'uso dell'erbicida; sono risultate più sensibili le specie insettivore. [28]

Effetti sull'uomo

Molti dei dati pubblicati prima del 1995 sugli effetti tossici del glyphosate sono stati rivisti dal Northwest Coalition for Alternative to Pesticides (NCAP). La maggior parte di queste ricerche ha individuato il surfattante POEA come la causa maggiore di tossicità acuta e cronica. Inoltre è stato dimostrato che l'associazione di glyphosate con POEA sia più pericolosa del surfattante da solo.

Tossicità acuta: il glyphosate è scarsamente assorbito per via orale o cutanea; in seguito all'ingestione circa il 30-36% della dose riesce a superare la barriera intestinale degli animali testati. La quota assorbita viene escreta per la maggior parte con le urine. La tossicità acuta è relativamente bassa e per tale motivo è stato classificato negli Stati Uniti in "Toxicity Category III".

Nonostante i test sugli animali abbiano mostrato una bassa tossicità, significanti effetti tossici sono stati osservati in seguito all'avvelenamento accidentale o intenzionale nell'uomo. L'avvelenamento è caratterizzato da diversi sintomi prevalentemente a carattere neurologico, come convulsioni generalizzate, e in misura minore da irritazione della pelle e degli occhi, dermatiti da contatto, eczema, problemi cardiaci e respiratori, nonché reazioni allergiche. [29]

Tossicità cronica: in letteratura alcuni lavori sostengono che il glyphosate non provochi effetti cronici sulla salute degli animali da laboratorio. Studi sull'assunzione per via orale di glyphosate hanno mostrato una riduzione dell'incremento ponderale, alterazioni al fegato e ai reni e degenerazione del cristallino. Questi effetti sono evidenziabili però solo ad elevate concentrazioni; a basse dosi si è osservato una infiammazione della mucosa dello stomaco. [20]

Inoltre sono stati studiati gli effetti sulla riproduzione, la cancerogenicità e la mutagenicità di tale sostanza. Nonostante la società Monsanto dichiari che

l'erbicida non causa problemi riproduttivi, test effettuati sui ratti hanno dimostrato alcuni effetti dose-dipendenti sulla qualità dello sperma degli animali testati. [30]

Per quanto riguarda la cancerogenicità, l'EPA classifica il glyphosate nel "gruppo E" cioè non cancerogeno per l'uomo. La classificazione è stata basata sui dati ottenuti da studi, condotti tra gli anni ottanta e novanta, su animali da laboratorio alimentati con diverse concentrazioni del pesticida. Sono stati osservati un aumento del tumore alle cellule interstiziali testicolari, alla tiroide, ai reni, al pancreas e al fegato, ma tutti, per vari motivi, non sono stati correlati all'assunzione del glyphosate.

Sono ancora poche le informazioni sulla cancerogenicità riportate in letteratura, ma un dato riportato di estrema importanza è l'aumento del linfoma non-Hodgkin associato all'esposizione al glyphosate. [31]

Per ultimo, diversi studi suggeriscono che il glyphosate non sia genotossico da solo ma può esserlo, solo debolmente, sottoforma di preparazioni commerciali. [32]

Effetti sull'agricoltura

L'utilizzo dell'erbicida glyphosate è di notevole impatto per l'agricoltura. Esso può inibire la crescita di batteri e funghi vantaggiosi per le piante, e aumentare la suscettibilità di alcune colture alle malattie. In alcuni casi può persino favorire gli attacchi da parte degli insetti. Dopo lunghi periodi di continuo utilizzo, le erbe infestanti possono diventare tolleranti all'erbicida, e una delle possibili conseguenze di tale effetto è l'aumento dell'utilizzo di altri fitofarmaci sostitutivi. L'immissione sul mercato di piante glyphosate-tolleranti permette un largo uso del glyphosate rendendo ancora più evidenti gli effetti indesiderati appena descritti. I nuovi rischi specifici legati all'uso di piante transgeniche includono: il diffondersi dei geni modificati tolleranti al glyphosate sia alle erbacce sia alle coltivazioni vicine al campo trattato; l'aumento del numero delle piante infestanti che naturalmente sviluppano una resistenza all'erbicida; cambio nell'utilizzo dell'erbicida; potenziale perdita della bio-diversità del terreno coltivabile. [20]

1.2.4 Metodi analitici per la determinazione del glyphosate

L'elevata polarità del composto, la completa solubilità in acqua (12g/L) e l'insolubilità nei solventi organici, l'estrema anfotericità data dai valori delle costanti di dissociazione (pK_a) di 2,0 - 2,6 - 5,6 e 10,6 sono tutte caratteristiche che rendono difficile la messa a punto di metodi analitici semplici e rapidi per l'estrazione e la determinazione del glyphosate da varie matrici.

Stalikas e Konidari riportano nel loro lavoro esaustivo tutti i possibili metodi di analisi recenti ed emergenti nella determinazione di pesticidi contenenti gruppi fosforici e aminoacidi di cui fa parte anche il glyphosate. [21]

I primi metodi prevedevano l'utilizzo della cromatografia su strato sottile (thin-layer chromatography, TLC), dell'analizzatore per aminoacidi, della

cromatografia ionica, dei saggi immunoenzimatici (ELISA), dell'elettroforesi capillare e dei metodi colorimetrici.

Non essendo ritenuti dei metodi ufficiali possono essere usati in una fase di screening o come ulteriore conferma del dato.

Successivamente sono state messe a punto metodiche che impiegano tecniche cromatografiche strumentali quali la gascromatografia (gas-liquid chromatography, GLC) e la cromatografia liquida ad alta prestazione (high performance liquid chromatography, HPLC). Entrambe le tecniche richiedono la derivatizzazione dell'analita, necessaria per rendere meno polare e sufficientemente volatile il composto per poterlo separare in gascromatografia, e per migliorarne la rilevazione con i normali rivelatori spettrofotometrici UV o fluorimetrici in cromatografia liquida. [21]

Gascromatografia

Come detto precedentemente è necessario derivatizzare il glyphosate per poterlo analizzare in gascromatografia, quindi scegliere una reazione di derivatizzazione semplice, robusta ed efficiente è il primo e più critico passaggio da mettere a punto.

In bibliografia vengono riportati diversi tipi di derivatizzazione [21]:

- acetilazione con anidride trifluoroacetica seguita da alchilazione con diazometano
- simultanea O- e N- sililazione con N-metil-N-(tert.-butildimetilsilil)trifluoroacetamide (MTBSTFA)
- simultanea N-acilazione e O-esterificazione con miscele di anidridi perfluorate e alcol alogenati e/o con AcOH-trimetil ortoacetato (TMOA)

L'unico modo, quindi, per ottenere una separazione accettabile in GCL è mediante la derivatizzazione. I benefici ottenuti dall'uso di colonne cromatografiche non polari o moderatamente polari vanno ritrovati nel guadagno in sensibilità e selettività. Come rivelatori possono essere usati il detector a fotometria di fiamma (FDP), detector a cattura d'elettroni (ECD), detector per azoto e fosforo (NPD) e lo spettrometro di massa (MS).

Cromatografia liquida

Le caratteristiche fisico-chimiche del glyphosate lo rendono affine alla separazione in HPLC.

Per la rilevazione del glyphosate con i normali sistemi di rivelazione, come lo spettrofotometro UV - visibile o il fluorimetro, è necessario derivatizzarlo per renderlo visibile, mancando nella propria struttura gruppi cromofori o fluorofori.

Buoni valori di sensibilità e selettività vengono raggiunti con la derivatizzazione, possibile sia attraverso la modalità pre-colonna sia post-colonna.

La derivatizzazione post-colonna si ottiene con l'o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol (OPA-ME). Questa modalità di derivatizzazione, riportata in diversi lavori riguardanti l'analisi del glyphosate nell'acqua, è il metodo raccomandato dall'EPA.

Il reattivo OPA reagisce solo con le ammine primarie; il glyphosate, essendo un'ammina secondaria necessita di essere idrolizzato ad ammina primaria prima della reazione. Questi passaggi rendono la derivatizzazione post-colonna laboriosa e complessa. [33]

La derivatizzazione pre-colonna avviene principalmente mediante l'utilizzo del derivatizzante 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl). Al contrario dell'OPA il FMOC-Cl reagisce sia con le ammine primarie che secondarie, la reazione risulta così più semplice e facilmente controllabile, ma meno selettiva. [34]

Oltre a questi due principali reattivi in bibliografia se ne trovano altri come per esempio la ninidrina usata per la derivatizzazione post-colonna, o l'1-fluoro-2,4-dinitrobenzene e il *p*-toluenesulfonilcloruro per quella pre-colonna. [21]

Per la separazione cromatografica le fasi stazionarie più appropriate sono quelle a scambio anionico o cationico (ad es. amminiche), date le caratteristiche ioniche del glyphosate. Mediante derivatizzazione pre-colonna si possono usare colonne cromatografiche con fasi stazionarie più apolari come le C₁₈. [21]

In diversi lavori viene riportato l'utilizzo di due colonne da HPLC per la separazione del composto; nella prima avviene una pre-separazione, concentrazione e pulizia del campione iniettato, e nella seconda la vera e propria separazione con l'identificazione dell'analita. [34] [35]

I principali rivelatori utilizzati sono rappresentati dallo spettrofotometro UV-visibile, il fluorimetro e lo spettrometro di massa (MS).

1.3 Legislazione

1.3.1 Generalità

L'impiego di prodotti fitosanitari è uno dei metodi più comuni di protezione dei vegetali e dei prodotti vegetali dall'azione di organismi nocivi. Questo uso può essere tuttavia responsabile della presenza di residui nei prodotti trattati e negli animali nutriti con tali prodotti. Occorre quindi fare in modo che i livelli di questi residui non presentino rischi inaccettabili per gli esseri umani ed eventualmente per gli animali.

La legislazione che si occupa di questo argomento ha subito notevoli revisioni negli ultimi anni. Superato il concetto di "residuo zero" con lo sviluppo di tecniche di maggiore sensibilità nella ricerca di molecole, si è cercato di limitare la concentrazione di pesticidi a quantità che non implicassero un rischio per la salute dei consumatori. [36]

A questo proposito è fondamentale la determinazione di una dose senza effetto nocivo o NOEL (No Observed Effect Level), ossia la quantità massima di un residuo che non dà luogo ad alcun effetto negativo se somministrata nella dieta ad animali da laboratorio per lunghi periodi. Si calcola sulla specie animale più sensibile e viene espressa in mg/kg o parti per milione (ppm).

Dal NOEL viene ricavata la dose giornaliera accettabile o ADI (Acceptable Daily Intake) che rappresenta la quantità di xenobiotico che può essere assunta da un uomo ogni giorno, per tutta la vita e senza apprezzabili rischi per la salute. Nel calcolo dell'ADI viene considerato un fattore di sicurezza (SF) che tiene conto di una possibile diversa sensibilità inter- e intra-specifica. [37]

L'ADI risulta in questo modo fondamentale per determinare il limite massimo residuale o MRL (Maximum Residue Limit) ovvero la concentrazione massima di residuo di un principio attivo ammessa in un alimento. Tale concentrazione assume valore di legge ed è il limite di riferimento dei controlli svolti in sanità pubblica per giudicare la regolarità di una matrice alimentare. [38]

1.3.2 Residui di pesticidi negli alimenti di origine animale

I limiti massimi di residui di sostanze fitosanitarie tollerati nei prodotti destinati all'alimentazione, sono riportati in modo organico nel Decreto Ministeriale del 19 Maggio 2000, integrato ed aggiornato successivamente da altri provvedimenti:

- D.M. 10 luglio 2000 (pubblicato nella G.U. n. 217 del 16/9/ 2000)
- D.M. 3 gennaio 2001 (pubblicato nella G.U. n. 24 del 10/2/2001)
- D.M. 2 maggio 2001 (pubblicato nella G.U. n. 177 del 1/8/2001)
- D.M. 8 giugno 2001 (pubblicato nella G.U. n. 223 del 1/9/2001)
- D.M. 6 agosto 2001 (pubblicato nella G.U. n. 239 del 13/10/2001)
- D.M. 20 novembre 2001 (pubblicato nella G.U. n. 25 del 30/1/2002)
- D.M. 29 marzo 2002 (pubblicato nella G.U. n. 87 del 13/4/2002)
- D.M. 9 maggio 2002 (pubblicato nella G.U. n. 160 del 10/7/2002)
- D.M. 18 giugno 2002 (pubblicato nella G.U. n. 179 del 1/8/2002)

I valori di MRL e di ADI di ciascuna sostanza considerata in questo lavoro, e la normativa per l'autorizzazione all'uso, sono riportati rispettivamente nelle Tabelle 1.2 e 1.3.

| PESTICIDA | MRL ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) | ADI ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Acephate | 20 | 10 |
| Azinphos-ethyl | 50 | - |
| Chlorpyriphos | 10 | 10 |
| Chlorpyriphos-methyl | 10 | 10 |
| Diazinon | 10 | 2 |
| Disulfoton | 20 | 0,3 |
| Glyphosate | 100 | 0,3 |
| Methacrifos | 10 | 6 |
| Methamidophos | 10 | 4 |
| Methidation | 20 | 1 |
| Oxidemethon-methyl | 20 | 0,3 |
| Parathion-ethyl | 50 | 0,6 |
| Phorate | 20 | 0,5 |
| Pirimiphos-methyl | 50 | 30 |
| Pyrazophos | 20 | 4 |
| Triazophos | 20 | 1 |

Tabella 1.2: Valori degli MRL e degli ADI dei pesticidi analizzati. In rosso sono le sostanze vietate e in nero quelle oggetto di studio da parte della Commissione Europea. [11] [39]

| Pesticida | Termine autorizzazione | Legge |
|--------------------|------------------------|-----------------------------|
| Azinphos-ethyl | Gennaio 1996 | n. 276 del 13/7/1995 [37] |
| Pyrazophos | Settembre 2001 | n. 233 del 9/3/2000 [38] |
| Parathion-ethyl | Gennaio 2003 | n. 520 del 9/7/2001 [39] |
| Oxidemethon-methyl | Luglio 2003 | n. 2076 del 20/11/2002 [40] |
| Disulfoton | Luglio 2003 | n. 2076 del 20/11/2002 [40] |
| Methacrifos | Luglio 2003 | n. 2076 del 20/11/2002 [40] |
| Phorate | Luglio 2003 | n. 2076 del 20/11/2002 [40] |
| Triazophos | Luglio 2003 | n. 2076 del 20/11/2002 [40] |
| Acephate | Settembre 2003 | n. 219 del 25/3/2003 [41] |
| Methidation | Dicembre 2004 | n. 233 del 9/3/2000 [38] |

Tabella 1.3: Pesticidi la cui autorizzazione è revocata e rispettiva legge che ne vieta l'uso.

Attualmente il regolamento n. 396/2005 del Parlamento Europeo rappresenta il documento di riferimento concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei prodotti alimentari. [45]

Questo regolamento, che modifica la Direttiva 91/414/CEE, è rilevante ai fini del funzionamento del mercato interno e riguarda direttamente la sanità pubblica.

La disparità tra gli MRL di residui di pesticidi fissati a livello nazionale possono costituire un ostacolo agli scambi; questo documento si propone, nell'interesse della libera circolazione delle merci e delle pari condizioni di concorrenza degli Stati Membri, di fissare su scala comunitaria gli MRL per i prodotti di origine vegetale ed animale, tenendo conto della buona pratica agricola.

1.3.3 Autorità competenti nel controllo dei pesticidi

A livello Europeo l'organismo che fornisce consulenza scientifica obiettiva su tutte le questioni che abbiano un impatto diretto o indiretto sulla sicurezza alimentare e dei mangimi è l'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), istituita il 28 gennaio 2002. [46] [47] [48]

In Italia, invece, lo stesso incarico è ricoperto dal Ministero della Salute, che si avvale per risolvere i problemi di natura tecnica e scientifica, dell'Istituto Sanitario Nazionale e altri Istituti di diritto pubblico di specifica competenza. Questa convenzione, resa operativa con il D.P.R. 290 del 23 Aprile 2001, va a sostituire la precedente Commissione Consultiva dei Prodotti Fitosanitari (CCPF) che fu istituita nel 1926.[49]

Al fine di svelare i casi di somministrazione illecita di sostanze vietate e di somministrazione abusiva di sostanze autorizzate e di verificare la conformità dei residui di medicinali veterinari con i limiti massimi residuali e delle quantità massime di antiparassitari e di contaminanti ambientali fissate dalla normativa nazionale e comunitaria, viene programmato un piano di campionamento (Piano Nazionale dei residui, PNR) a livello del processo di allevamento degli animali e di prima trasformazione dei prodotti di origine animali.

Esso definisce le specie, le categorie, i punti di campionamento, le sostanze da cercare, le modalità di ricerca, secondo il dettato della normativa in vigore e le indicazioni della Commissione Europea, ed è elaborato annualmente dal Ministero della Salute. [50]

I campioni prelevati devono essere esaminati in laboratori autorizzati per la ricerca dei residui, gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali o in altri laboratori pubblici individuati dal Ministero della Salute. [51]

Per quanto riguarda il latte, deve essere prelevato esclusivamente latte crudo in allevamento o a livello di cisterna e ogni aliquota deve essere costituita da 200 mL. Per le modalità di campionamento si fa riferimento al D.M. 26 Marzo 1992 (Decisione 91/180/CEE).

Nel PNR 2006 vengono considerati, in maniera specifica, anche gli organofosforati. Tra i metodi di screening, per rilevarne la presenza nel latte, compare la GLC-NPD (gas liquido cromatografia accoppiata a rivelatore

azoto fosforo) e come metodo di conferma la GLC-MS (gascromatografia accoppiata ad uno spettrometro di massa).

1.4 Scopo del lavoro

Come evidenziato nei Paragrafi precedenti, i pesticidi organofosforati trovano un largo utilizzo nel settore agricolo, per il loro vasto spettro d'azione e per la loro rapida degradazione nell'ambiente.

Durante la loro breve permanenza nell'ambiente possono comunque contaminare il suolo, le acque ma soprattutto le piante. È possibile, pertanto, ritrovare residui di tali composti sia nei prodotti di origine vegetale, sia nei prodotti di origine animale, tra cui il latte, come conseguenza dei vari passaggi nella catena alimentare.

Il presente lavoro di ricerca è stato articolato in due fasi, entrambi aventi come scopo ultimo quello di verificare la salubrità di campioni di latte, provenienti da differenti aree geografiche, in relazione al contenuto in pesticidi organofosforati.

Nella prima fase del lavoro è stata messa a punto e validata una metodica analitica in gascromatografia per la determinazione contemporanea dei seguenti pesticidi organofosforati: acephate, azinphos-ethyl, chlorpyrifos-ethyl, chlorpyrifos-methyl, diazinon, disulfoton, methacrifos, methamidophos, methidation, oxidemethon-methyl, parathion-ethyl, phorate, pirimiphos-methyl, pyrazophos e triazophos.

I pesticidi sopra citati sono tutte sostanze che hanno un limite massimo residuale (MRL) nel latte fissato dalla Commissione Europea.

L'analisi è stata condotta con un gascromatografo fornito di rivelatore NPD (Nitrogen-Phosphorus Detector) in grado di evidenziare composti contenenti fosforo. Il gascromatografo è stato inoltre dotato di due colonne capillari a differente polarità; questo particolare sistema permette di acquisire una doppia risposta analitica che porta ad una ulteriore conferma nell'identificazione degli analiti ricercati.

Dopo aver sviluppato e validata la metodica si è proceduto con l'applicazione della stessa a 298 campioni di latte crudo destinato alla produzione di latte alimentare.

I campioni di latte analizzati, provenienti da Piemonte, Lombardia, Emilia Romagna, Lazio, Campania e Puglia, sono stati prelevati da Ottobre 2004 a Maggio 2005. Il campionamento è stato effettuato in maniera tale da poter osservare l'eventuale andamento della contaminazione da organofosforati nei campioni analizzati in rapporto sia al periodo di raccolta sia alla zona di prelievo.

Nella seconda fase di ricerca si è cercato di mettere a punto una metodica analitica mediante cromatografia liquida accoppiata a detector fluorimetrico (HPLC-FL) per la determinazione del glyphosate sempre in latte crudo. In letteratura vengono riportati diversi lavori sulla determinazione del glyphosate in matrici quali l'acqua e i prodotti ortofrutticoli, non vengono invece riportati lavori su matrici di origine animale. [31] [34] [35]

Le sue particolari caratteristiche chimico-fisiche (molecola molto polare, solubilissima in acqua ed insolubile nei solventi organici, mancanza di gruppi cromofori e fluorofori) hanno fatto sì che la messa a punto della metodica analitica risultasse piuttosto critica e complessa. La mancanza di gruppi cromofori o fluorofori, come detto precedentemente, ha reso indispensabile derivatizzare il pesticida, per renderlo visibile al fluorimetro. Le condizioni di derivatizzazione e di analisi HPLC sono stati i primi passaggi ad essere stati presi in considerazione. Successivamente vari tentativi sono stati fatti al fine di estrarre il glyphosate dalla matrice latte e di purificare al meglio il campione.

Verranno presentate le condizioni analitiche preliminari che una volta confermate porteranno alla validazione del metodo.

Il presente lavoro è stato effettuato in accordo al corrispondente “Piano della Qualità” e “Piano di Progettazione” presso il servizio di prova di Igiene e Tecnologia Alimentare del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, certificato secondo le norme UNI EN ISO 9001:2000 n.3516

Capitolo 2

Presentazione del metodo sperimentale

Dal momento che il lavoro ha riguardato la messa a punto di due differenti metodiche analitiche, per comodità, il Capitolo verrà suddiviso in due paragrafi principali chiamati “OPPs” e “Glyphosate” in cui verranno riportati i materiali, la strumentazione e le condizioni analitiche rispettivamente degli organofosforati analizzati in GLC e del glyphosate in HPLC.

I campioni di latte, riportati nel Paragrafo 2.1, costituiscono materiale comune alle due metodiche.

2.1 I campioni di latte

Nel presente lavoro sono stati analizzati 298 campioni di latte crudo, di cui 262 “Alta Qualità” (AQ) e 36 “Biologico” (BIO).

Tali campioni provenienti da diverse regioni d’Italia, quali Emilia Romagna, Puglia, Lazio, Piemonte, Lombardia e Campania, sono stati raccolti in diversi periodi dell’anno, come mostrato in Tabella 2.1.

| Regione | Periodo | Campioni di latte | Totale |
|----------------|--------------|-------------------|--------|
| Emilia Romagna | Ottobre 2004 | 40 AQ e 11 BIO | 151 |
| | Gennaio 2005 | 41 AQ e 11 BIO | |
| | Maggio 2005 | 36 AQ e 12 BIO | |
| Puglia | Ottobre 2004 | 20 AQ | 63 |
| | Gennaio 2005 | 22 AQ | |
| | Maggio 2005 | 21 AQ | |
| Lombardia | Ottobre 2004 | 10 AQ | 29 |
| | Gennaio 2005 | 9 AQ | |
| | Maggio 2005 | 10 AQ | |
| Lazio | Ottobre 2004 | 15 AQ | 36 |
| | Gennaio 2005 | 11 AQ | |
| | Maggio 2005 | 10 AQ | |
| Piemonte | Ottobre 2004 | 2 AQ | 8 |
| | Gennaio 2005 | 3 AQ e 1 BIO | |
| | Maggio 2005 | 1 AQ e 1 BIO | |
| Campania | Ottobre 2004 | 3 AQ | 11 |
| | Gennaio 2005 | 3 AQ | |
| | Maggio 2005 | 5 AQ | |
| Totale | Ottobre 2004 | 101 | 298 |
| | Gennaio 2005 | 101 | |
| | Maggio 2005 | 96 | |

Tabella 2.1: *Campioni di latte crudo analizzati.*

Il campionamento è stato effettuato al momento dei controlli di accettazione da parte degli stabilimenti sopra menzionati. I campioni raccolti possono essere considerati rappresentativi dell'intera massa di latte entrante durante l'anno nello stabilimento in quanto sono stati ripetuti, nella maggior parte dei casi, sei volte nei tre periodi (Ottobre 2004, Gennaio 2005 e Maggio 2005). Il campionamento così effettuato ha permesso di prelevare 39743 quintali di latte.

Dopo un'accurata agitazione dell'intera massa, sono stati raccolti 800 mL di latte con l'apposito lattoprelevatore presente presso la banchina di scarico o, in caso di momentanea indisponibilità di quest'ultima, manualmente. In seguito ad un ulteriore rimescolamento sono state allestite otto aliquote da 100 mL in contenitori di polipropilene. Le aliquote sono state etichettate esprimendo la data di prelievo, il codice della raccolta o codice mittente, la tipologia di latte e la quantità di latte scaricato, e successivamente congelate alla temperatura di $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Poi, una volta inviate in laboratorio, sono state stoccate in congelatore fino al momento delle analisi.

Il campionamento e la gestione del campione sono stati condotti secondo la procedura standard "Campionamento e gestione del campione latte" interna al servizio di prova di Igiene e Tecnologia Alimentare del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale.

2.2 OPPs

2.2.1 I prodotti chimici

Per l'identificazione dei pesticidi organofosforati, nei campioni analizzati, sono stati utilizzati gli standard dei quindici pesticidi ricercati e, per la quantificazione, il parathion-methyl come standard interno; tutti gli standard sono della ditta Dr.Ehrenstorfer (Ausburg, Germany):

- Acephate (percentuale di purezza 98,5%)
- Azinphos-ethyl (99,0%)
- Chlorpyrifos (99,5%)
- Chlorpyrifos-methyl (99,5%)
- Diazinon (97,6%)
- Disulfoton (92,0%)
- Methacrifos (94,3%)
- Methamidophos (99,0%)
- Methidation (97,5%)
- Oxidemethon-methyl (83,0%)
- Parathion-ethyl (99,0%)
- Parathion-methyl (98,5%)
- Phorate (94,5%)
- Pirimiphos-methyl (99,0%)
- Pyrazophos (97,0%)
- Triazophos (70,0%)

Per l'estrazione dei pesticidi dai campioni di latte sono stati utilizzati:

- Acetone (grado analitico, Merck Darmstadt, Germany)
- 2-Propanolo (grado analitico, Merck Darmstadt, Germany)
- Sodio solfato anidro (grado analitico, Merck Darmstadt, Germany)
- Diclorometano (per pesticidi, BDH Dorset, UK)
- Acetonitrile (per pesticidi, BDH Dorset, UK)

Per l'estrazione in fase solida sono state utilizzate le cartucce C₁₈ Mono-Functional 500 mg/ 3mL (Phenomenex, Torrance, USA).

2.2.2 Strumentazione

Gas Cromatografo con rivelatore per il fosforo (NPD)

L'analisi è stata condotta su un gascromatografo HRGC Mega2 8560, munito di due detector NPD (Nitrogen-Phosphorus Detection) collegati a due colonne capillari di diversa polarità, vedi Figura 2.1:

1. Zebron ZB-5, 30 m x 0,32 mm i.d., 0,25 µm d.f. (Phenomenex)
2. Zebron ZB-50, 30 m x 0,32 mm i.d., 0,25 µm d.f. (Phenomenex)

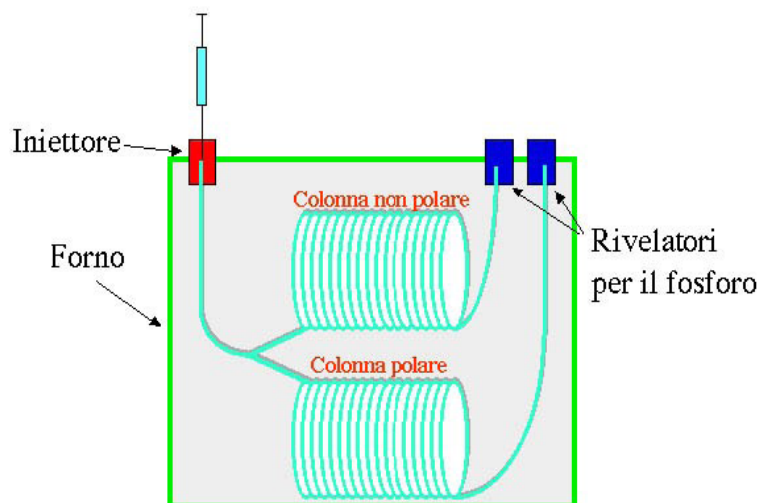


Figura 2.1: Rappresentazione schematica del GLC-NPD.

Le due colonne sono state connesse da un raccordo ad Y subito dopo l'iniettore.

Come carrier è stato utilizzato l'idrogeno (1,5 cc/min sulla colonna Zebron ZB-5, 1,4 cc/min sulla colonna Zebron ZB-50) mentre per i detector NPD sono stati impiegati idrogeno (90 kPa), aria (100 kPa) ed azoto (50 kPa). Il gascromatografo è corredato di autocampionatore per liquidi AS 2000 Thermo Finnigan.

Estrattore multiplo per SPE

Per l'estrazione in fase solida (SPE) è stato utilizzato un estrattore multiplo (Waters), che permette di utilizzare fino a 20 cartucce contemporaneamente; tale strumento è dotato di un manometro ed una valvola per la regolazione della pressione interna.

Centrifuga

I campioni di latte sono stati centrifugati con una centrifuga ALC 4239R, dotata di rotore 6346 RPM Max 12000.

2.2.3 Condizioni analitiche

Analisi gascromatografica

L'analisi GLC dei campioni di latte è stata condotta alle seguenti temperature:

- Rivelatori: 320 °C
- Iniettore: 260 °C, modalità splitless 30 secondi
- Forno: da 80 °C con una rampa di 2 °C/min sono stati raggiunti i 100 °C. Da qui segue un'altra rampa di 4 °C/min fino alla temperatura di 300 °C. Infine è stata mantenuta un'isoterma per 5 minuti, vedi Figura 2.2.

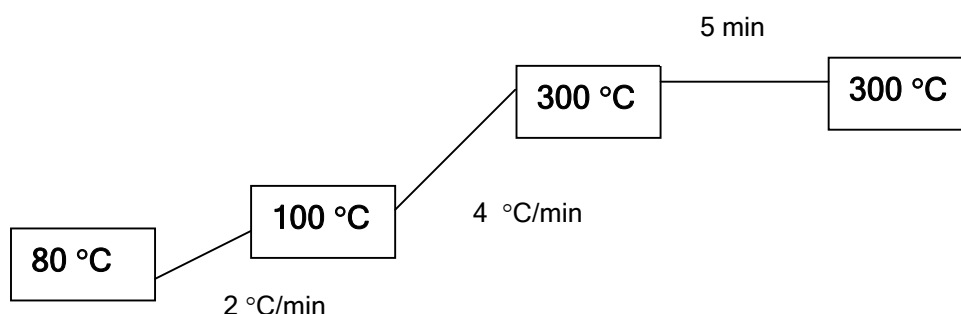


Figura 2.2: Programma delle temperature del GLC-NPD per il latte.

2.2.4 Estrazione dei pesticidi dal latte

A 20 g di latte portato a temperatura ambiente sono stati aggiunti 200 µL di parathion-methyl 0,05 ppm, utilizzato come standard interno. Successivamente sono stati aggiunti 25 mL di una miscela 1:4 acetone-acetonitrile ed è stato lasciato riposare senza mescolare per 20 minuti. Il campione è stato agitato per 30 secondi e centrifugato a 4000 r.p.m. per 5 minuti a 20 °C.

Il surnatante è stato raccolto in una beuta, mentre alla parte solida, ripresa con 2 mL di acqua distillata, sono stati aggiunti nuovamente 20 mL di miscela.

La soluzione è stata centrifugata una seconda volta per 5 minuti a 4000 r.p.m. e la fase liquida così ottenuta è stata unita a quella precedente.

L'intera operazione è stata ripetuta una terza volta.

Le fasi liquide riunite sono state versate in un imbuto separatore con 50 mL di diclorometano. Dopo la separazione delle fasi (30 minuti circa) l'estrazione è stata ripetuta altre 2 volte.

Gli estratti di diclorometano ottenuti sono stati disidratati su sodio solfato anidro e, dopo 30 minuti, filtrati su carta e desolvatati per mezzo di un evaporatore rotante.

Il campione è stato poi ripreso con 1 mL di acetonitrile e caricato su cartuccia SPE C₁₈ Monofunctional precedentemente condizionata con 5 mL di acetonitrile. Il campione è stato poi eluito con 2 mL di acetonitrile e 1 mL di 2-propanolo.

I 4 mL ottenuti sono stati desolvatati sotto azoto e risolubilizzati in 200 µL di acetone. Infine 2 µL di miscela sono stati iniettati in GLC.

L'intera procedura di analisi è schematizzata in Figura 2.3.

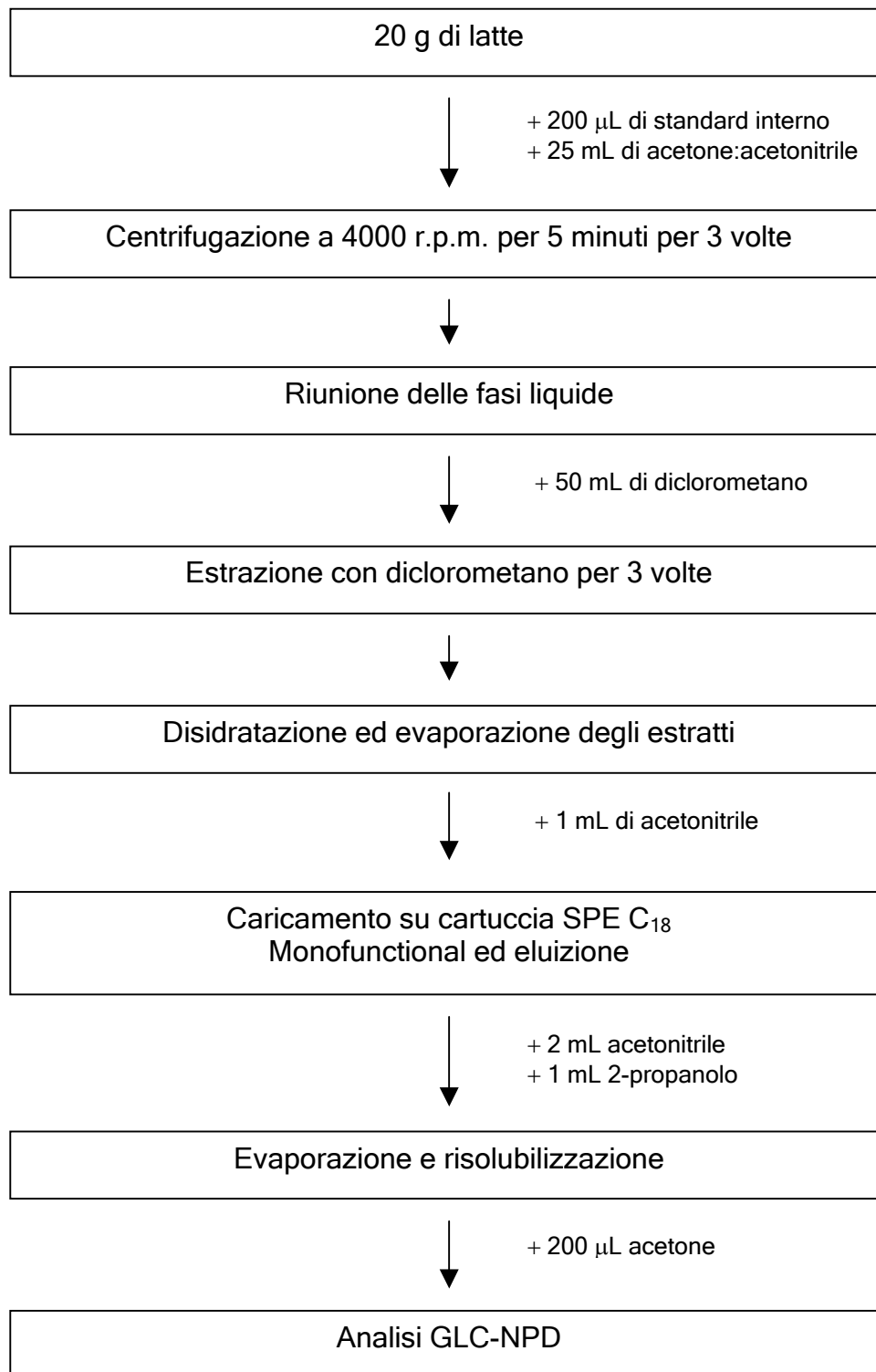


Figura 2.3: Schema dell'estrazione dei pesticidi organofosforati dal latte.

2.2.5 Validazione del metodo

Per la validazione del metodo è stata adottata la Decisione della Commissione Europea 2002/657/EC, in cui è previsto di valutare linearità, precisione e accuratezza a tre livelli di concentrazione pari a 0,5 MRL, 1 MRL e 1,5 MRL. [52]

Per ciascun livello sono stati preparati sei campioni di latte opportunamente fortificati.

Le soluzioni standard utilizzate per validare il metodo sono state ottenute dall'unione delle 2 soluzioni madre dei pesticidi, rispettivamente solidi e liquidi a temperatura ambiente.

La soluzione madre di tutti i pesticidi standard liquidi è stata preparata prelevando esattamente da ogni singolo standard quantità differenti a seconda del loro rispettivo MRL (vedi Figura 2.4): 5 μ L diazinon, 5 μ L methacrifos, 10 μ L phorate, 10 μ L triazophos, 10 μ L disulfoton, 25 μ L parathion-ethyl, 25 μ L pirimiphos-methyl solubilizzati in 50 mL di acetone.

Allo stesso modo, per la preparazione della soluzione madre di tutti i pesticidi standard solidi, sono stati pesati esattamente da ogni singolo standard quantità differenti in base al loro MRL: 11,2 mg acephate, 4,9 mg chlorpyrifos, 5,2 mg chlorpyrifos-methyl, 5,3 mg methamidophos, 10,8 mg methidation, 25,1 azinphos-ethyl, 10,1 mg pyrazophos solubilizzati in 50 mL di acetone.

Prelevando determinati quantitativi da ciascuna soluzione madre e diluendoli in modo opportuno, sono state ottenute le tre soluzioni standard di lavoro, come illustrato nella Figura 2.4:

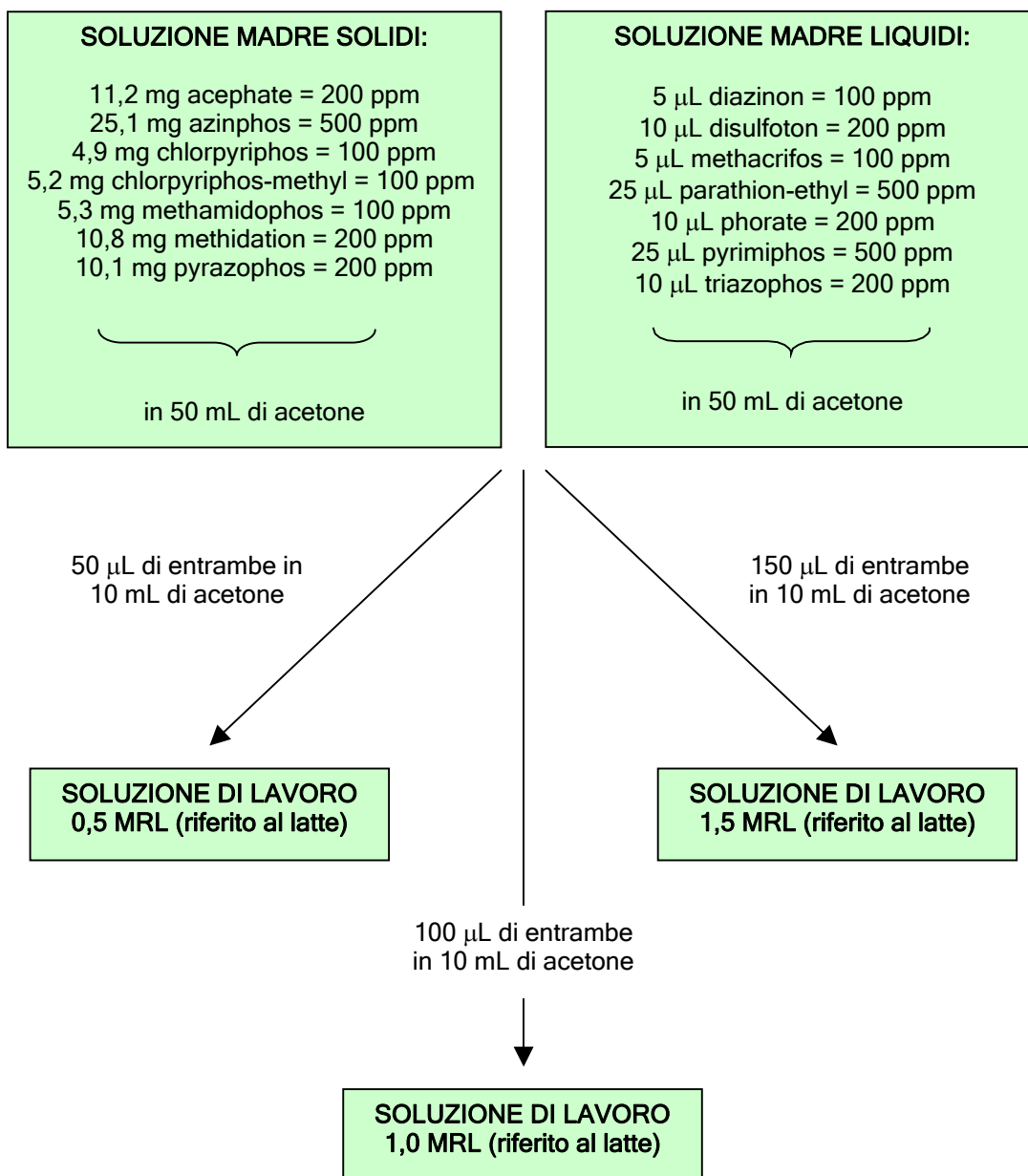


Figura 2.4: Schema delle soluzioni di lavoro ottenute dalla diluizione delle soluzioni madre solidi e liquidi.

Occorre precisare che la concentrazione effettiva di queste tre soluzioni di lavoro è maggiore di quella con la quale si è deciso di denominarle. Questo perché si è preferito considerare la concentrazione che si raggiunge nella matrice a seguito della loro aggiunta. Le soluzioni così ottenute sono state iniettate 6 volte nel gascromatografo.

Il parathion-methyl è stato scelto come standard interno per quantificare i quindici composti analizzati. Per la preparazione della soluzione madre sono stati pesati esattamente 25,3 mg del suo standard e solubilizzati in 50 mL di acetone. Dalla soluzione madre sono state ottenute le tre soluzioni di lavoro a

concentrazioni, riferite al latte, pari a 0,5 MRL, 1 MRL e 1,5 MRL, vedi Figura 2.5.

Le soluzioni di lavoro sono state iniettate 6 volte nel gascromatografo.

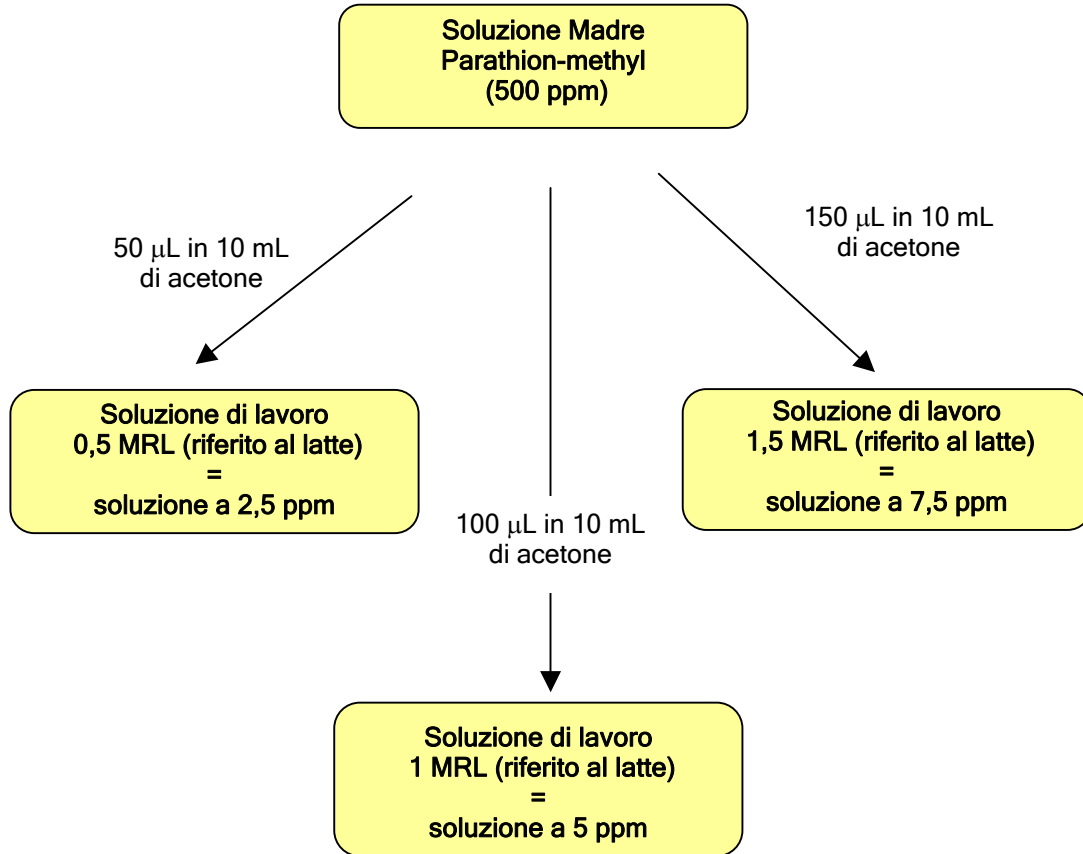


Figura 2.5: Schema di preparazione delle soluzioni di lavoro dello standard interno.

Come si può notare dallo schema riportato in Figura 2.4, non è stato possibile includere il pesticida oxidemethon-methyl nelle miscele complete di lavoro a causa della bassa purezza dello standard (83%). Per questo motivo la sua validazione è stata condotta separatamente da tutti gli altri pesticidi. La soluzione madre a 200 ppm è stata preparata prelevando esattamente 2 µL dello standard puro liquido e solubilizzati in 10 mL di acetone. Prendendo da questa rispettivamente 75 µL, 50 µL e 25 µL e solubilizzandoli tutti in 5 mL di acetone, sono state ottenute le tre soluzioni di lavoro a concentrazioni pari a 0,5 MRL, 1 MRL e 1,5 MRL rapportate al latte (Figura 2.6). Le soluzioni di lavoro sono state iniettate 6 volte nel gascromatografo.

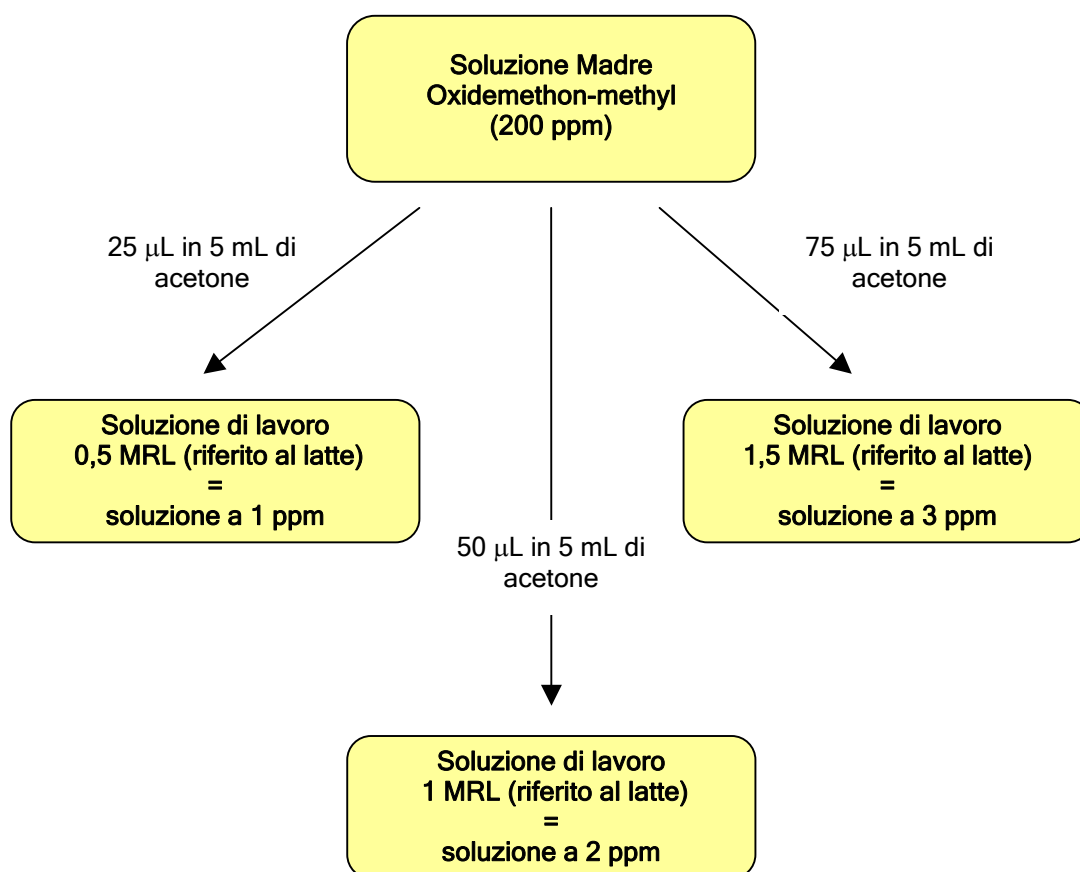


Figura 2.6: Schema di preparazione delle soluzioni di lavoro dell'oxidemethon-methyl.

Precisione

La precisione del metodo è stata valutata analizzando 18 campioni di latte biologico, in cui era stata accertata l'assenza dei pesticidi oggetto della ricerca.

Questi campioni sono stati suddivisi in 3 gruppi, da 6 aliquote ciascuno, fortificati usando le soluzioni riportate in Figura 2.4, come riportato di seguito:

- 6 campioni sono stati fortificati con 200 µL della soluzione standard di lavoro a 0,5 MRL
- 6 campioni sono stati fortificati con 200 µL della soluzione standard di lavoro a 1 MRL
- 6 campioni sono stati fortificati con 200 µL della soluzione standard di lavoro a 1,5 MRL

Dopo aver proceduto all'estrazione dei campioni seguendo la metodica descritta nel Paragrafo 2.2.4, i campioni sono stati iniettati nel gascromatografo.

In maniera del tutto analoga si è proceduto a fortificare ed analizzare 18 campioni di latte biologico per la validazione del parathion-methyl e 18 per l'oxidemethon-methyl.

Accuratezza

Per valutare l'accuratezza sono stati utilizzati i dati ottenuti dalle prove fatte sulle matrici fortificate messi a confronto con i dati ottenuti dalla risposta delle soluzioni standard di lavoro.

Inoltre poiché i detectors NPD hanno una durata limitata durante la quale diminuiscono gradatamente di sensibilità verso gli analiti, per ottenere dati attendibili è stata sempre iniettata, insieme ai campioni, anche la miscela standard di lavoro dei pesticidi con la quale è stato fortificato il latte.

2.2.6 Controllo della purezza dei solventi

Al fine di valutare la purezza dei solventi impiegati per l'estrazione, la purificazione e l'analisi cromatografica, è stata condotta un'estrazione "in bianco". Questa estrazione ripropone gli stessi passaggi e le stesse condizioni del metodo indicato nel Paragrafo 2.2.4 impiegando al posto dei 20 g di latte 20 g di acqua distillata.

2.3 Glyphosate

2.3.1 I prodotti chimici

Per la messa a punto della metodica per la determinazione del glyphosate nel latte è stato utilizzato uno standard con percentuale di purezza del 98,5% della ditta Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Germany).

Per la preparazione della soluzione madre sono stati pesati esattamente 10 mg del suo standard e solubilizzati in 50 mL di acqua distillata, ottenendo così una concentrazione di 200 $\mu\text{g/mL}$. Da questa deriva la soluzione intermedia alla concentrazione di 2 $\mu\text{g/mL}$, dalla quale sono state preparate le 2 soluzioni di lavoro una a 0,05 $\mu\text{g/mL}$ e l'altra a 0,02 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 2.7).

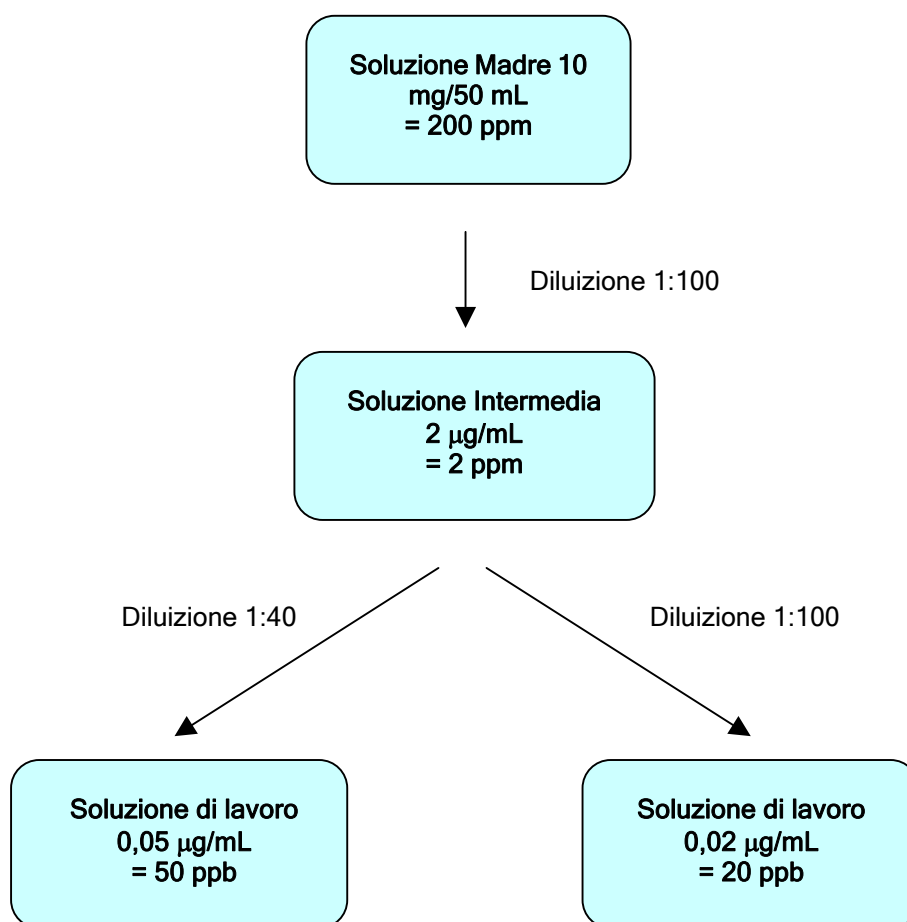


Figura 2.7: Schema di preparazione delle soluzioni di lavoro del glyphosate.

Per l'analisi sono stati, inoltre, utilizzati:

- Acetonitrile (grado HPLC, Merck Darmstadt, Germany)
- Acqua (grado HPLC, Merck Darmstadt, Germany)
- Metanolo (grado HPLC, Merck Darmstadt, Germany)
- Acetato d'ammonio (grado analitico, Sigma-Aldrich, Serbia/Montenegro)
- Idrossido di potassio (grado analitico, Carlo Erba Milano, Italia)
- Acido cloridrico (grado analitico, Carlo Erba, Milano, Italia)
- Ammoniaca soluzione 25% (grado analitico, Carlo Erba, Milano, Italia)
- Acido acetico 96% (grado analitico, Carlo Erba, Milano, Italia)
- Acido nitrico 65% (suprapur, Merck Darmstadt, Germany)

Per l'estrazione in fase solida sono state utilizzate le cartucce:

- SAX 500 mg/3mL (Isolute, Hengood, UK)
- Oasis[®] HLB 6 mg/3cc (Waters, Los Angeles, California, USA)

Per la derivatizzazione del glyphosate sono stati impiegati:

- Etile acetato (grado analitico, Merck Darmstadt, Germany)
- Fmoc-Cl (9-fluorenylmethyl chloroformate) (grado HPLC, Fluka, Switzerland)
- Sodio borato decaidrato (grado analitico, Sigma St. Louis, USA)

2.3.2 Strumentazione

Cromatografia liquida accoppiata a detector fluorimetrico

L'analisi è stata condotta in HPLC con pompa binaria Thermo P100 dotato di iniettore con loop da 10 µL.

La separazione cromatografica è stata ottenuta usando una colonna Luna C₁₈ 150 x 4,6 mm x 3 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), dotata di precolonna C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Per rilevare il glyphosate è stato utilizzato un rivelatore a fluorescenza FL 3000 Spectra System della Thermo Separation Products con lunghezza d'onda d'eccitazione fissata a 266 nm e lunghezza d'onda d'emissione fissata a 316 nm.

Estrattore multiplo per SPE

Per l'estrazione in fase solida (SPE) è stato utilizzato un estrattore multiplo (Waters), che permette di utilizzare fino a 20 cartucce contemporaneamente; tale strumento è dotato di un manometro ed una valvola per la regolazione della pressione interna.

Centrifuga

I campioni di latte sono stati centrifugati con una centrifuga ALC 4239R, dotata di rotore 6346 RPM Max 12000.

2.3.3 Condizioni analitiche

Le condizioni di eluizione in HPLC utilizzano un gradiente binario in cui i due solventi sono:

Solvente A: Acetonitrile (CH₃CN)

Solvente B: Tampone ammonio acetato 5mM a pH di 6,4 circa

Il gradiente della fase mobile partendo dal 20% di A e dall'80% di B arriva in 30 minuti al 40% di A e al 60% di B. Da queste condizioni in 10 minuti raggiunge il 90% di A e il 10% di B. Si ritorna alle condizioni di partenza in 10 minuti.

Le analisi sono state condotte ad un flusso di 1 mL/min.

| Tempo | CH ₃ CN (A) | Tampone (B) |
|-------|------------------------|-------------|
| 0' | 20% | 80% |
| 30' | 40% | 60% |
| 40' | 90% | 10% |
| 50' | 20% | 80% |

Tabella 2.2: Programma di analisi HPLC utilizzato.

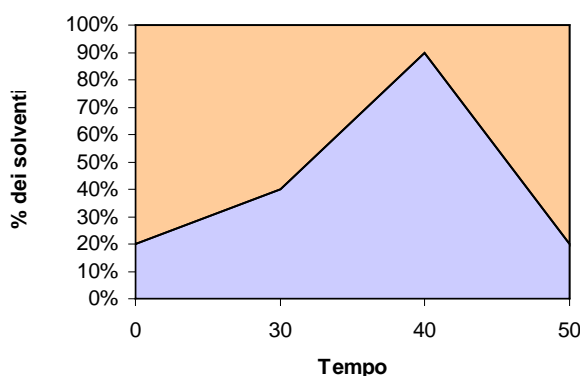


Figura 2.8: Rappresentazione del gradiente della fase mobile.

2.3.4 Derivatizzazione

Il derivatizzante è stato preparato sciogliendo 6,5 mg di FMOC-Cl in 50 mL di acetonitrile, ottenendo così una soluzione 0,5 mM. Inoltre è stata preparata una soluzione di tampone borato 0,125 M a pH 9.

La derivatizzazione è stata effettuata mettendo insieme in una provetta:

- 1,7 mL di glyphosate in soluzione acquosa
- 0,3 mL di di tampone borato 0,125 M (pH 9)
- 2 mL di FMOC-Cl 0,5 mM

La soluzione così ottenuta è stata miscelata mediante agitatore magnetico per 30 minuti a temperatura ambiente. L'eccesso di FMOC-Cl è stato eliminato attraverso estrazioni liquido-liquido con 2 mL di etile acetato ripetute 4 volte.

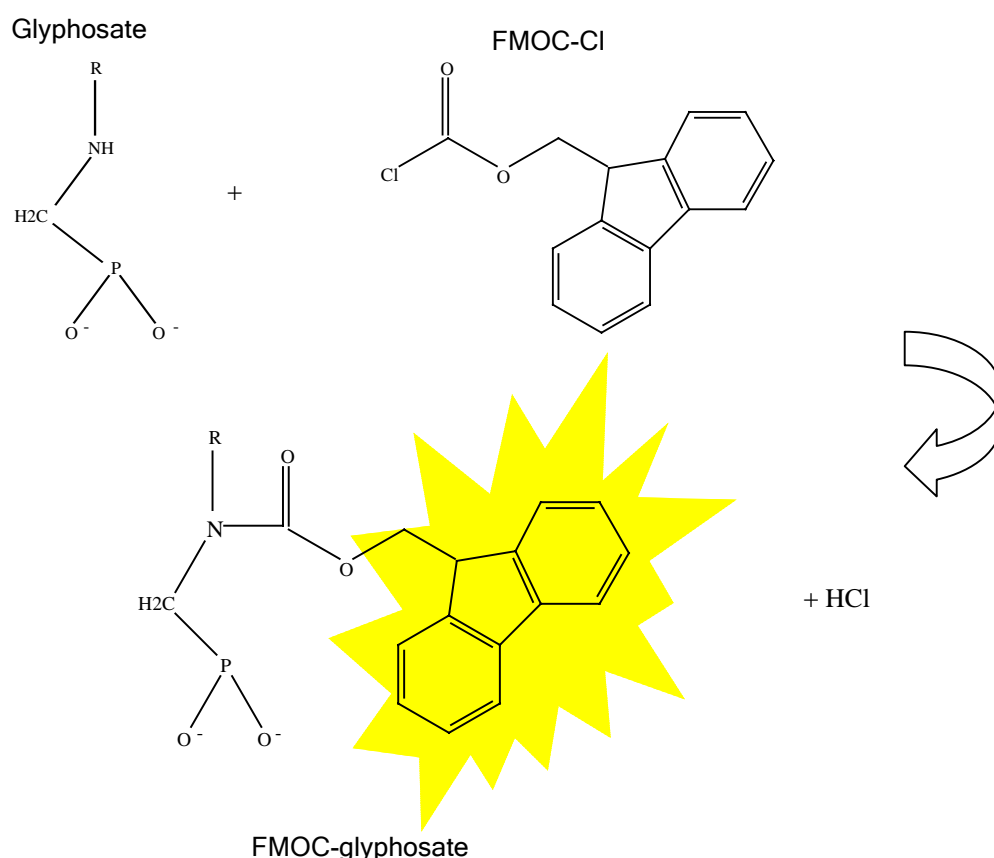


Figura 2.9: Reazione tra il glyphosate e l'agente derivatizzante FMOC-Cl.

2.3.5 Estrazione del glyphosate dal latte

Il metodo di estrazione del glyphosate, descritto qui di seguito, riporta le varie fasi analitiche di estrazione, purificazione e derivatizzazione del campione, sviluppate finora. Rappresenta il risultato di varie prove e studi effettuati che verranno ampiamente descritti e discussi nel terzo Capitolo.

I dati riportati costituiscono una fase preliminare del lavoro di messa a punto della metodica che, una volta risolti i punti rimasti critici, verrà validata.

A 10 mL di latte sono stati aggiunti 500 μ L della soluzione intermedia glyphosate a 2 ppm, in maniera tale da ottenere una contaminazione del latte pari a 1 MRL (0,1 ppm). Successivamente il latte è stato acidificato con l'aggiunta di HCl 0,1 N fino a raggiungere un pH di 4,6 circa.

Il campione è stato poi agitato e centrifugato a temperatura ambiente ad una velocità di 4000 rpm per 5 minuti.

Dal surnatante, filtrato su filtri a farfalla, sono stati prelevati 5 mL più la metà del volume di HCl impiegato per l'acidificazione. In seguito sono state eseguite 3 estrazioni liquido-liquido mediante imbuto separatore con diclorometano (1:1).

L'estratto acquoso è stato diluito con 5 mL di acqua deionizzata e ne è stato regolato il pH attorno a 8,5 con KOH 2 M. Il campione è stato così caricato

su una cartuccia a scambio anionico SAX, precedentemente condizionata con 10 mL di acqua distillata. Il lavaggio è stato effettuato sempre con 10 mL di acqua distillata e l'eluizione con 3 mL di HNO₃ 0,01 M. L'eluato è stato reso basico (pH intorno a 7,5) mediante l'aggiunta di KOH 2 M ed è stato completamente evaporato al rotavapor e successivamente risolubilizzato in 1,7 mL di acqua deionizzata. Il campione così ottenuto è stato derivatizzato aggiungendo 300 µL di tampone borato pH 9 (0,125 M) e 2 mL di agente derivatizzante FMOC-Cl (0,5 mM). La reazione di derivatizzazione è stata mantenuta per 30 minuti a temperatura ambiente su un agitatore magnetico. L'eccesso di FMOC-Cl è stato eliminato attraverso quattro estrazioni con 2 mL di etile acetato ciascuna. Successivamente è stata effettuata una seconda purificazione del campione per mezzo di una cartuccia Oasis[®] HLB.

Il campione, acidificato con HCl 0,1 N fino a pH 1,8, è stato caricato su tale cartuccia, precedentemente condizionata con 1 mL di metanolo ed equilibrata con 1 mL di acqua deionizzata. Il lavaggio della cartuccia è stato fatto con 1 mL di una soluzione al 5% di metanolo in acqua e l'eluizione con 1 mL di una soluzione al 2% di NH₄OH in metanolo/acqua (50:50).

10 µL della soluzione sono stati iniettati in HPLC.

La procedura di estrazione viene schematizzata nelle sue fasi principali in Figura 2.10.

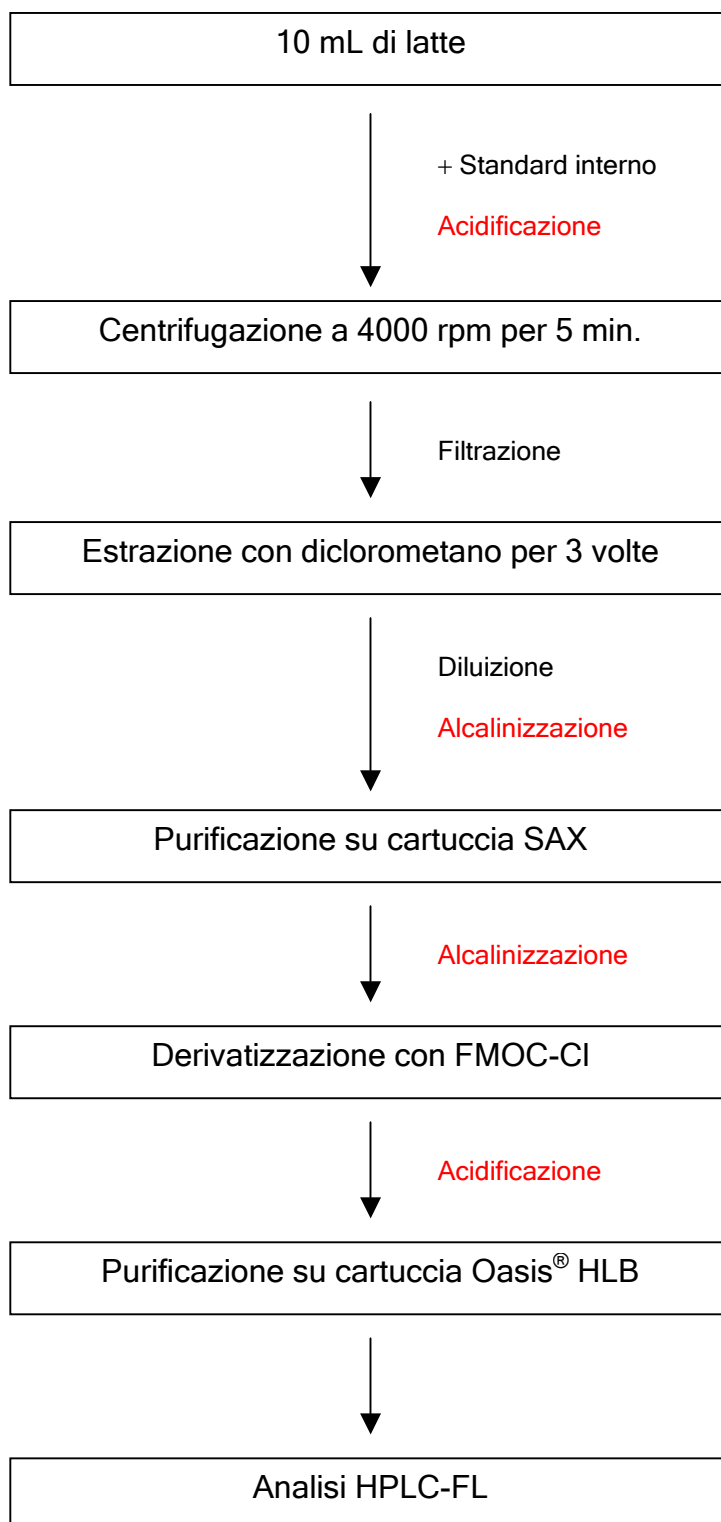


Figura 2.10: Schema dell'estrazione del glyphosate dal latte.

Capitolo 3

Risultati e discussione

In questo Capitolo saranno presentati e discussi, nei primi due Paragrafi, i dati ottenuti dalla validazione della metodica per la determinazione degli OPPs nel latte e i risultati delle analisi dei campioni.

Nel terzo Paragrafo verrà illustrato il lavoro preliminare svolto al fine di sviluppare la metodica analitica, mediante HPLC, per la determinazione del glyphosate sempre nella matrice latte.

Verranno discusse le varie fasi in cui si è articolato il lavoro, ossia lo studio delle condizioni cromatografiche, la derivatizzazione, l'estrazione del glyphosate dalla matrice e la purificazione del campione mediante estrazione in fase solida.

3.1 Messa a punto della metodica per la determinazione degli OPPs

È stato messo a punto un metodo di estrazione, purificazione ed analisi gascromatografica per identificare e quantificare contemporaneamente quindici pesticidi organofosforati nel latte. La metodica è stata applicata all'analisi di 298 campioni di latte crudo destinato alla produzione di latte alimentare.

Per lo sviluppo del metodo è stato preso come punto di partenza la metodica, precedentemente sviluppata nello stesso laboratorio di ricerca, in cui si determinavano otto dei quindici pesticidi organofosforati considerati nel presente lavoro (acephate, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, diazinon, methamidophos, methidation, phorate e pirimiphos-methyl). [53]

È stato valutato se tale metodica fosse idonea, nelle stesse condizioni analitiche, a determinare contemporaneamente tutti e quindici i pesticidi organofosforati. Il primo passaggio è stato quello dell'analisi strumentale in cui è emersa la necessità di modificare le condizioni gascromatografiche, al fine di identificare al meglio ciascun pesticida. Successivamente sono state valutate le condizioni di estrazione dei pesticidi dal latte e di purificazione del campione.

3.1.1 Condizioni gascromatografiche

Per arrivare a stabilire una metodica valida a determinare quantitativamente gli organofosforati, è stato necessario studiare le condizioni gascromatografiche ottimali che permettessero di evidenziare

contemporaneamente e chiaramente tutti e quindici i pesticidi presi in considerazione.

Per le prime prove sono state scelte le condizioni di lavoro riportate da Pagliuca *et al.* [53] che prevedevano l'uso in parallelo di due colonne a differente polarità collegate a due rivelatori NPD, specifici per il fosforo, e l'utilizzo dell'elio come gas-carrier.

Il processo di messa a punto è cominciato con l'analisi qualitativa di ogni singolo standard, su entrambe le colonne, determinandone il tempo di ritenzione T_r , caratteristico per ciascuna sostanza.

Per la determinazione dei pesticidi triazophos, pyrazophos e azinphos-ethyl, analiti a maggior peso molecolare, è stato fondamentale aumentare il tempo di analisi e la temperatura finale, portando la corsa cromatografica da 50 minuti a 65.

Sono state quindi iniettate le soluzioni standard solidi e liquidi (vedi Figura 2.4) e le soluzioni standard complete di lavoro.

Il programma d'analisi utilizzato non è risultato soddisfacente nella separazione di ciascun analita, osservando nei cromatogrammi delle sovrapposizioni di picchi. Questo aspetto ha assunto importanza soprattutto nell'evidenziazione della sovrapposizione dello standard interno con altri picchi, come verrà discusso in seguito. Sono state apportate delle modifiche alle condizioni programmate eliminando le isocratiche, aumentando la temperatura finale e utilizzando delle rampe più lunghe ma con un gradiente meno accentuato.

Dalle Figure 3.1 e 3.2 è possibile fare un confronto tra il nuovo programma d'analisi e il vecchio, utilizzato come punto di partenza. Tali condizioni sono risultate buone sia per la colonna ZB50 (più polare) che per la ZB5 (meno polare). Buone risposte si sono avute anche nel momento in cui si è passati alle prove in matrice, dove si è visto che gli interferenti presentavano dei tempi di ritenzione diversi da quelli dei pesticidi ricercati, rendendo così possibile la determinazione analitica.

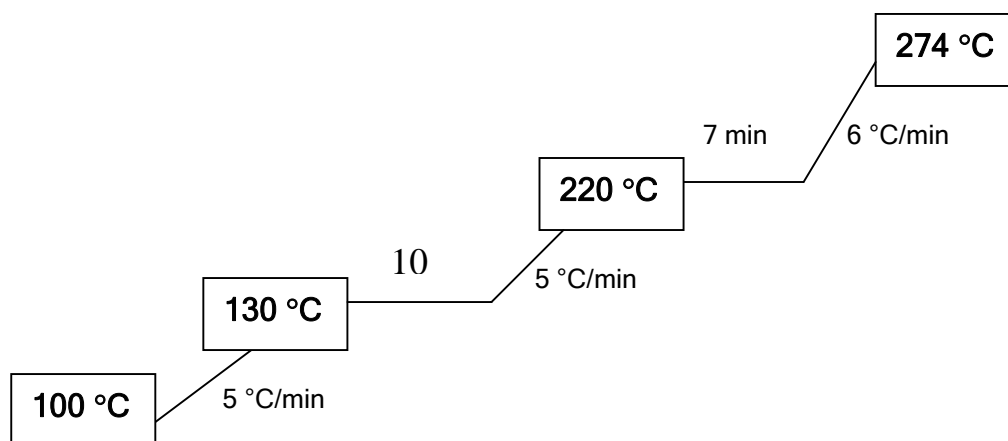


Figura 3.1: Vecchio programma di analisi gascromatografico.

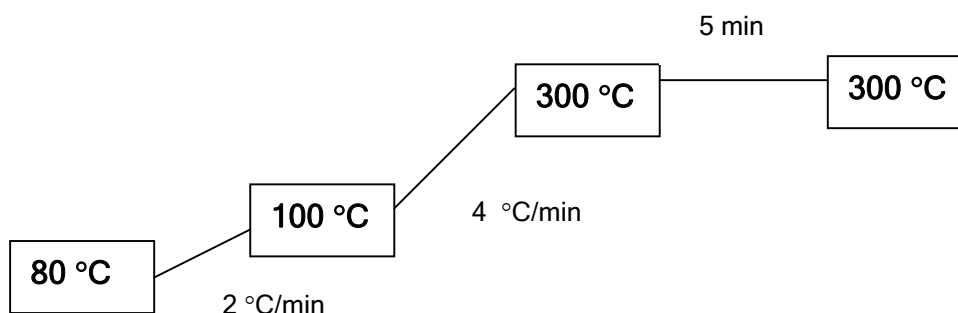


Figura 3.2: Nuovo programma di analisi gascromatografico.

Il nuovo programma, con soli 15 minuti in più rispetto al vecchio, è in grado di rilevare e determinare quindici pesticidi, quasi il doppio come numero rispetto al vecchio.

Nella Figura 3.3 vengono riportati i cromatogrammi, (in rosso) della colonna ZB50 e (in nero) della colonna ZB5, della soluzione standard di lavoro a 1 MRL; si può notare la completa separazione dei composti.

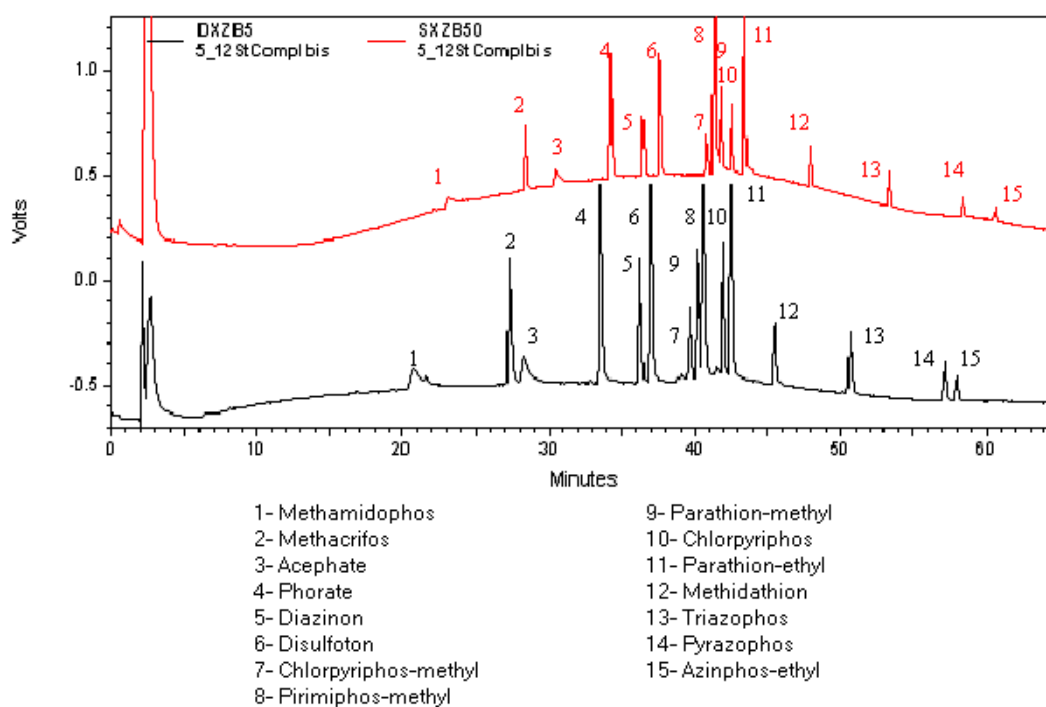


Figura 3.3: Cromatogramma della soluzione standard di lavoro 1 MRL, in rosso la ZB50 e in nero la ZB5.

Come anticipato nel secondo Capitolo, non è stato possibile inserire il pesticida oxidemethon-methyl nella miscela di lavoro completa. Questo non per sovrapposizione del picco di tale analita con altri, ma per le caratteristiche intrinseche dello standard stesso. La problematicità del composto è legata alla bassa purezza dello standard (83%) e alla notevole sensibilità della molecola alla luce, al calore e all'ossigeno. Per tali motivi il cromatogramma dello standard non è particolarmente pulito, ma presenta

una serie di picchi che vanno ad interferire nella determinazione di tutti gli altri (Figura 3.4). È stato deciso così di validare la metodica per l'oxidemethon-methyl separatamente dagli altri organofosforati.

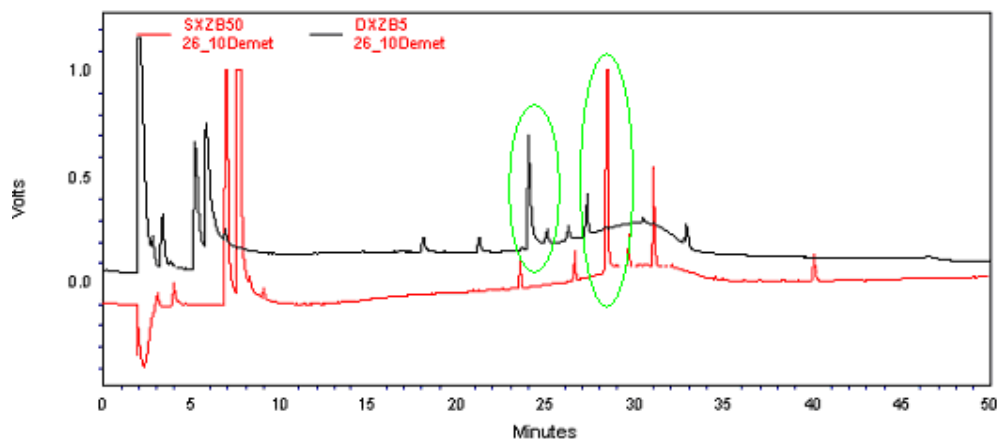


Figura 3.4: Cromatogramma dello standard di oxidemethon-methyl, in rosso la ZB50 e in nero la ZB5.

3.1.2 Scelta dello standard interno

Per la determinazione quantitativa degli analiti in un primo tempo è stato scelto come standard interno il parathion-methyl. La scelta è nata dal fatto che l'utilizzo di tale pesticida è ormai vietato da qualche anno, inoltre dal punto di vista chimico è un composto simile agli altri, stabile e con buone risposte al rivelatore NPD.

Nel momento in cui sono state iniettate le soluzioni standard complete, comprensive del parathion-methyl, nel cromatogramma di entrambe le colonne è stata osservata la sovrapposizione dello standard interno, con il pirimiphos-methyl per la ZB50 e il chlorpyriphos-methyl per la ZB5, vedi Figura 3.5.e 3.6.

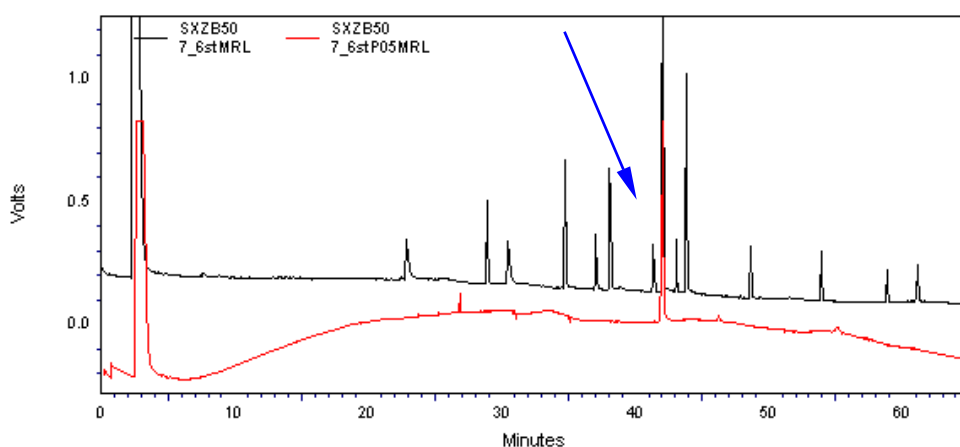


Figura 3.5: Sovrapposizione del picco del parathion-methyl con il picco del pirimiphos-methyl, colonna ZB50.

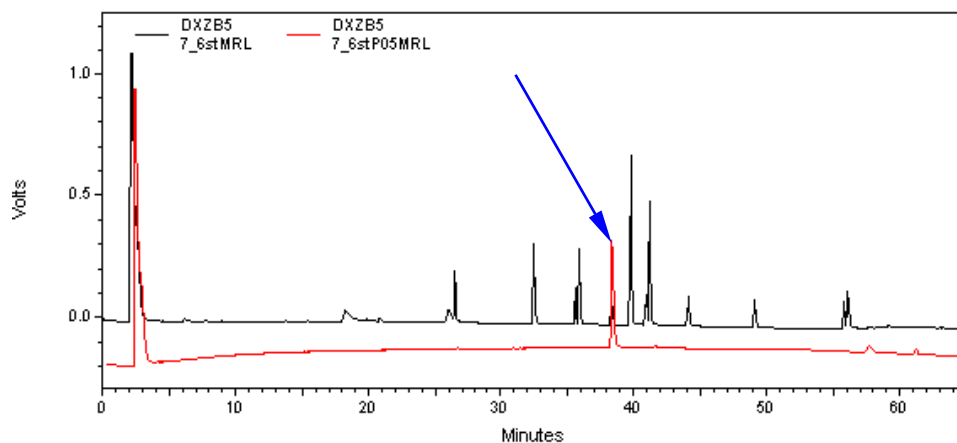


Figura 3.6: Sovrapposizione del picco del parathion-methyl con il picco del chlorpyrifos-methyl, colonna ZB5.

Seguendo alcune indicazioni bibliografiche [54] è stato deciso quindi di provare ad assumere come standard interno il tributyl-phosphate. Questo composto trova largo impiego nell'industria chimica come solvente, plastificante e come agente antischiuma nei detersivi. Presentando un gruppo fosforico la risposta cromatografica dello standard di tale composto è risultata soddisfacente, ma le prove condotte in matrice hanno messo in evidenza la presenza nel cromatogramma di un interferente avente lo stesso tempo di ritenzione del tributyl-phosphate, vedi Figura 3.7.

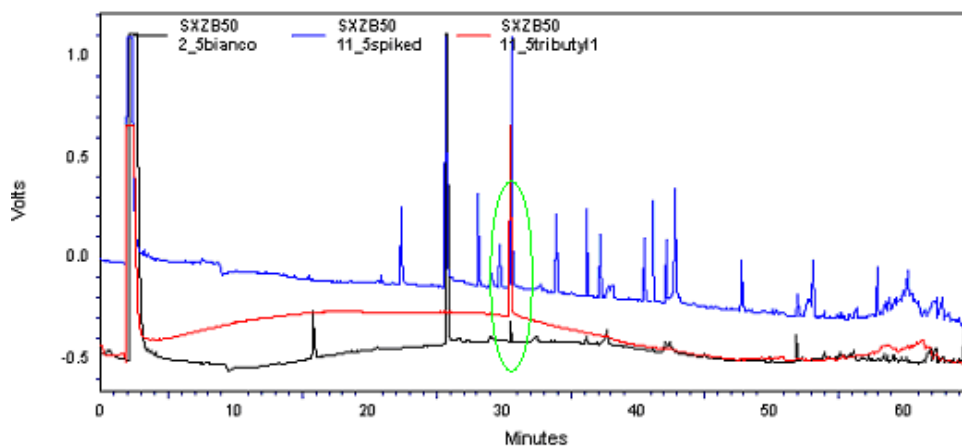


Figura 3.7: Cromatogramma dello standard del tributyl-phosphate (in rosso), di un latte fortificato (in blu) e di una latte "bianco" (in nero).

Diverse analisi sono state fatte per identificare la natura e l'origine dell'interferente, in seguito alle quali è stato ipotizzato che potesse derivare o da impurità presenti nei solventi o da un contaminante rilasciato dalla vetreria impiegata durante l'analisi.

Non essendo stata identificata con certezza la natura e l'origine dell'interferente, è stato preso nuovamente come standard interno il

parathion-methyl. Va ricordato che tale standard si sovrappone nelle due colonne a due analiti differenti, non comportando problemi nell'interpretazione degli eventuali pesticidi presenti in matrice.

A causa dei problemi di sovrapposizione, riportati precedentemente, la messa a punto è proseguita separando la validazione del parathion-methyl da quella degli altri analiti.

3.1.3 Estrazione dei pesticidi dal latte

Gli studi condotti in matrice, seguendo la procedura riportata in Figura 2.3, hanno dato fin da subito degli ottimi risultati; è stato possibile ottenere un'estrazione completa di tutti i quindici pesticidi.

3.1.4 Validazione della metodica

Per la validazione della metodica è stata scelta come colonna di riferimento la ZB50 (a maggiore polarità), poiché presenta una migliore linearità della risposta sia nella separazione, sia nei recuperi dei pesticidi ricercati rispetto alla colonna ZB5 che quindi è stata impiegata per la conferma degli analiti.

Precisione

La precisione di un metodo è stata valutata analizzando ripetutamente campioni di latte, privi dei pesticidi ricercati, addizionati di una quantità nota delle soluzioni standard di lavoro a diverse concentrazioni.

In questo caso 18 campioni di latte, suddivisi in 3 gruppi da 6 aliquote ciascuno, sono stati fortificati a tre differenti concentrazioni pari a 0,5, 1 e 1,5 volte il limite massimo residuale per ciascun composto (vedi Paragrafo 2.2.5). Le concentrazioni utilizzate per la validazione sono quelle stabilite dalla Decisione della Commissione Europea 2002/657/EC. [52]

Dopo aver proceduto all'estrazione dei campioni, seguendo la metodica precedentemente descritta, sono stati iniettati nel gascromatografo.

Dai valori dei punti area dei picchi generati da ciascun composto, sono stati calcolati i rapporti percentuali tra la deviazione standard e la media aritmetica ottenendo i coefficienti di variazione (CV) riportati nella Tabella 3.1.

| Composti | 0,5 MRL | 1 MRL | 1,5 MRL | Media |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Acephate | 22,3 | 11,5 | 18,5 | 17,4 |
| Azinphos-ethyl | 13,0 | 21,8 | 12,1 | 15,6 |
| Chlorpyriphos | 12,1 | 11,5 | 28,4 | 17,3 |
| Chlorpyriphos-methyl | ..6,7 | 20,1 | 12,1 | 13,0 |
| Diazinon | 16,2 | 14,0 | 15,4 | 15,2 |
| Disulfoton | 12,7 | 35,5 | 39,7 | 29,3 |
| Methacrifos | 14,7 | 15,5 | 12,2 | 14,1 |
| Methamidophos | 19,5 | 14,6 | 11,4 | 15,2 |
| Methidation | ..9,3 | 20,3 | 11,9 | 13,8 |
| Oxidemethon-methyl | 18,8 | 28,3 | 19,0 | 22,0 |
| Parathion-ethyl | ..8,2 | 11,4 | 11,2 | 10,3 |
| Parathion-methyl | 18,8 | 22,6 | 11,8 | 17,7 |
| Phorate | 17,4 | 21,5 | 20,6 | 19,8 |
| Pirimiphos-methyl | 13,1 | 14,1 | 10,7 | 12,6 |
| Pyrazophos | ..6,7 | 17,8 | 18,1 | 14,2 |
| Triazophos | 10,0 | 26,6 | 15,0 | 17,2 |
| Media | 13,7 | 19,2 | 16,8 | 16,5 |

Tabella 3.1: Valori dei coefficienti di variazione.

Il range delle medie dei valori percentuali dei coefficienti di variazione relativi a ciascun analita variano dal 10,3 al 19,8, fatta eccezione per il disulfoton che ha riportato un valore di 29,3, ben al di sopra della media. Osservando invece le medie dei valori percentuali dei coefficienti di variazione relative ai tre livelli di concentrazione si nota una buona precisione anche al livello più basso di fortificazione.

Accuratezza

Per valutare il recupero medio sono stati utilizzati i dati ottenuti dagli studi per determinare la precisione.

Confrontando i valori dei punti area ottenuti dall'analisi dei campioni fortificati, con quelli delle relative soluzioni standard di lavoro iniettate nello stesso giorno, si sono ottenute le percentuali di recupero per i sedici composti, come mostrato in Tabella 3.2.

| Composti | 0,5 MRL | 1 MRL | 1,5 MRL | Media |
|---------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| Acephate | 109,1 | 110,6 | 90,1 | 103,3 |
| Azinphos-ethyl | 190,0 | 149,8 | 161,2 | 167,0 |
| Chlorpyrifos | 122,3 | 86,5 | 78,8 | 95,9 |
| Chlorpyrifos-methyl | 98,9 | 92,6 | 86,5 | 92,7 |
| Diazinon | 118,1 | 92,1 | 89,8 | 100,0 |
| Disulfoton | 73,3 | 57,2 | 48,8 | 59,8 |
| Methacrifos | 86,8 | 83,6 | 77,6 | 82,7 |
| Methamidophos | 98,3 | 98,4 | 73,4 | 90,0 |
| Methidation | 133,9 | 119,0 | 113,6 | 122,2 |
| Oxidemethon-methyl | 68,2 | 99,2 | 72,4 | 79,9 |
| Parathion-ethyl | 110,3 | 94,4 | 99,0 | 101,2 |
| Parathion-methyl | 105,3 | 106,2 | 116,3 | 109,3 |
| Phorate | 95,4 | 89,0 | 79,8 | 88,1 |
| Pirimiphos-methyl | 94,3 | 91,2 | 92,7 | 92,7 |
| Pyrazophos | 153,7 | 138,5 | 140,1 | 144,1 |
| Triazophos | 160,9 | 135,7 | 122,4 | 139,7 |
| Media | 113,7 | 102,8 | 96,4 | 104,3 |

Tabella 3.2: Valori dei recuperi percentuale dei pesticidi nella colonna ZB50.

Le medie dei valori di recupero percentuale relativi a ciascun pesticida risultano superiori all'80%, ad eccezione del disulfoton che presenta una media attorno al 60%. Come già riportato in letteratura i valori di recupero al di sopra del 100% sono attribuibili "all'effetto matrice". [55]

Limiti di quantificazione e di rivelazione

Per ciascun pesticida il limite di quantificazione (LOQ) del metodo è stato considerato uguale alla metà del suo MRL riportato al latte, mentre il limite di rivelazione (LOD) è stato stimato come quella concentrazione di analita il cui segnale è pari a tre volte quello del rumore di fondo (S/N Signal to noise=3).

In Tabella 3.3 per ciascun pesticida sono indicati i rispettivi valori di MRL, LOQ e LOD.

| Composti | MRL ($\mu\text{g/Kg}$) | LOQ ($\mu\text{g/Kg}$) | LOD ($\mu\text{g/Kg}$) |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Acephate | 20 | 10 | 1 |
| Azinphos-ethyl | 50 | 25 | 5 |
| Chlorpyrifos | 10 | 5 | 1 |
| Chlorpyrifos-methyl | 10 | 5 | 1 |
| Diazinon | 10 | 5 | 1 |
| Disulfoton | 20 | 10 | 1 |
| Methacrifos | 10 | 5 | 1 |
| Methamidophos | 10 | 5 | 1 |
| Methidation | 20 | 10 | 1 |
| Oxidemethon-methyl | 20 | 10 | 5 |
| Parathion-ethyl | 50 | 25 | 1 |
| Parathion-methyl | - | 25 | 1 |
| Phorate | 20 | 10 | 1 |
| Pirimiphos-methyl | 50 | 25 | 1 |
| Pyrazophos | 20 | 10 | 1 |
| Triazophos | 20 | 10 | 1 |

Tabella 3.3: Valori di MRL, LOQ e LOD di ciascun pesticida.

Controllo della purezza dei solventi impiegati

Il cromatogramma ottenuto dalle prove effettuate per valutare la purezza dei solventi, descritto nel Paragrafo 2.2.6, ha mostrato la presenza di due picchi interferenti generati dall'acetonitrile, nonostante siano stati utilizzati solventi di grado "per pesticidi". I due picchi interferenti, non sovrapponendosi ai picchi dei pesticidi, non hanno compromesso la determinazione dei composti ricercati.

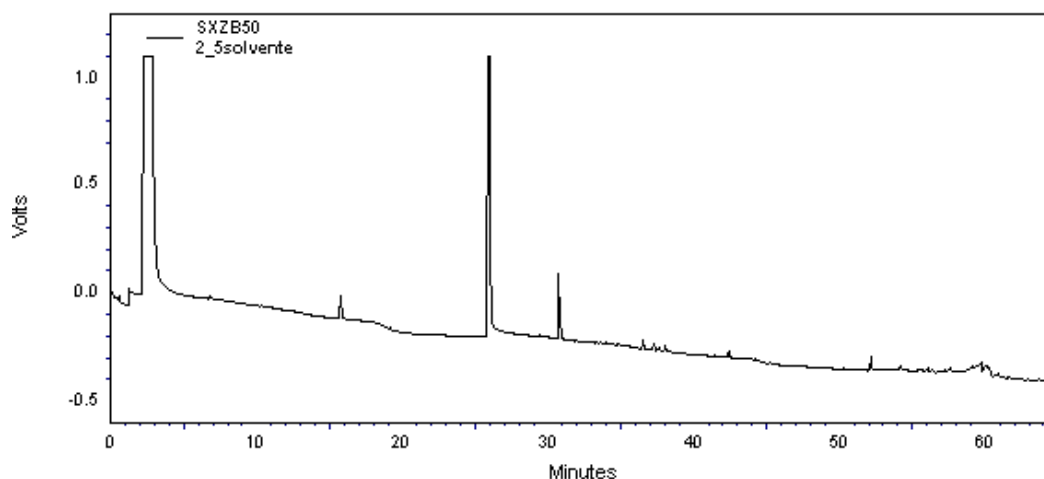


Figura 3.8: Cromatogramma ottenuto dal controllo della purezza dei solventi (Colonna ZB50).

3.2 Analisi dei campioni

L'identificazione dei pesticidi è stata fatta confrontando i cromatogrammi dei campioni di latte con la rispettiva miscela standard di pesticidi iniettata nello stesso giorno, della soluzione standard dell'oxidemethon-methyl e del parathion-methyl; il confronto è stato eseguito sia sulla colonna ZB50 (più polare) che sulla colonna ZB5 (meno polare).

L'analisi condotta in parallelo sulle due colonne a differente polarità ha permesso di ottenere una doppia conferma sulla presenza dei pesticidi.

La Figura 3.9 mostra come sia stata fatta l'identificazione degli analiti con il sistema GLC bicanale:

- in arancione sono rappresentati i tempi di ritenzione della miscela standard
- in blu sono rappresentati gli analiti identificati in alcuni campioni come pesticidi ed i cui tempi di ritenzione corrispondono a quelli della miscela standard, sia sulla colonna ZB50, che sulla colonna ZB5
- in verde sono rappresentati gli analiti i cui tempi di ritenzione corrispondono alla miscela standard solo su una colonna, e di conseguenza non sono stati identificati come pesticidi

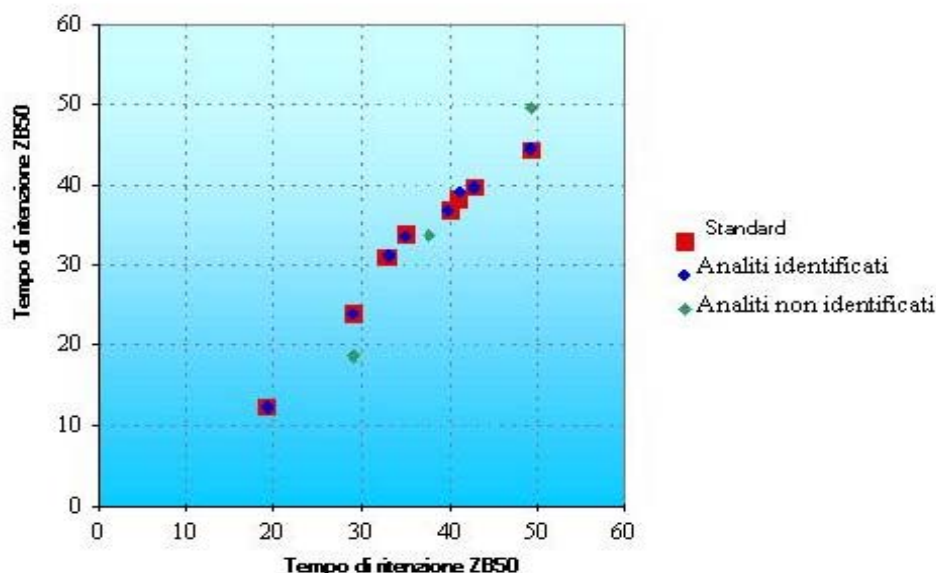


Figura 3.9: Grafico dell'identificazione degli analiti con sistema GLC a doppia colonna (dual column).

Per la determinazione quantitativa sono stati aggiunti al latte, prima di effettuare l'estrazione, 200 μL di parathion-methyl standard a concentrazione pari a 0,05 ppm. Lo standard interno, addizionato prima di qualsiasi estrazione, permette di effettuare una corretta valutazione quantitativa, rapportando l'area dei picchi degli eventuali pesticidi presenti con quella dello standard interno a concentrazione nota.

3.2.1 Risultati

Su 298 campioni di latte analizzati 13 hanno evidenziato la presenza di residui di OPPs, tutti in tracce non quantificabili quindi in concentrazioni comprese tra il valore di LOD e LOQ (vedi Tabella 3.4).

Nei campioni positivi, l'organofosforato che è stato rilevato con più frequenza è il chlorpyrifos, 9 campioni positivi, seguito dal parathion-ethyl, 2, e dal disulfoton e dall'acephate con 1 campione positivo per entrambi. Nessun campione ha evidenziato la presenza di più di un residuo.

| Pesticida organofosforato | Numero di campioni contaminati | % di campioni positivi | Quantità ritrovate | Limite normativo MRL ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) |
|---------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------|--|
| Chlorpyrifos | 9 | 3,0 | tracce | 10 |
| Parathion-ethyl | 2 | 0,7 | tracce | 50 |
| Disulfoton | 1 | 0,3 | tracce | 20 |
| Acephate | 1 | 0,3 | tracce | 20 |
| Totale | 13 | 4,3 | tracce | |

Tabella 3.4: *Distribuzione dei residui nei campioni esaminati.*

Nelle Figure 3.10 e 3.11 sono rispettivamente riportati i cromatogrammi (in nero) della colonna ZB50 e della colonna ZB5 di un campione di latte risultato positivo in tracce al chlorpyrifos; i cromatogrammi sono sovrapposti alla soluzione standard di lavoro (concentrazione di 1 MRL riferito al latte) iniettata nello stesso giorno (in blu).

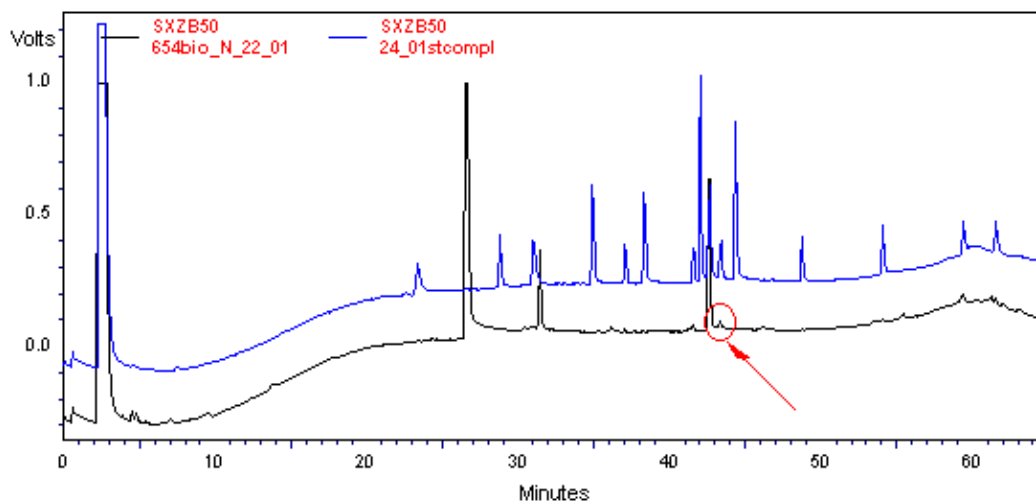


Figura 3.10: Cromatogramma di un campione di latte positivo al chlorpyrifos in tracce (Colonna ZB50).

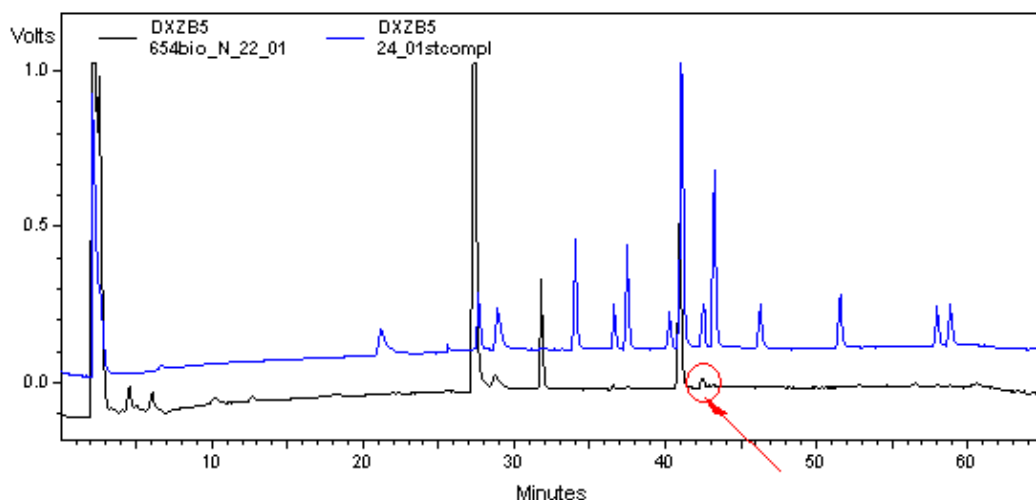


Figura 3.11: Cromatogramma di un campione di latte positivo al chlorpyrifos in tracce (Colonna ZB5).

Per quanto riguarda il latte BIO, 3 campioni su 36 analizzati sono risultati positivi in tracce, evidenziando tracce di chlorpyrifos.

3.2.2 Discussione dei risultati delle analisi dei campioni

I dati ottenuti dall'analisi dei 298 campioni hanno messo in evidenza un contenuto estremamente modesto di OPPs nel latte crudo; in nessun campione è stata rinvenuta la presenza di pesticidi in quantità dosabili.

Il chlorpyrifos è stato il residuo rilevato più frequentemente.

Tale risultato è spiegabile considerando che il chlorpyrifos viene largamente impiegato come insetticida su varie colture e come ectoparassiticida su diverse specie animali tra cui i bovini; tuttavia anche quest'ultimo è presente solamente in tracce.

La relazione tra la presenza di OPPs e la zona di provenienza dei campioni di latte ha messo in evidenza una contaminazione estremamente bassa in tutto il territorio italiano; tali dati dimostrano che il latte non rappresenta una fonte significativa di rischio per il consumatore.

Molto più interessante risulta il confronto dei risultati ottenuti con quelli conseguiti in un analogo studio condotto nel biennio 2001-2002, al fine di osservare l'andamento di questo tipo di contaminazione nel corso degli anni.[56]

Nella ricerca sopra citata, su 138 campioni provenienti da quattro delle regioni analizzate nella presente (Emilia Romagna, Lombardia, Lazio e Puglia), il 27% era risultato contaminato in tracce ed il 7% in quantità dosabili tra 5 e 18 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Il contaminante principale era l'acephate, mentre il secondo residuo più presente era il chlorpyrifos. Nel marzo 2003 la Commissione della Comunità Europea ha vietato l'utilizzo dell'acephate a causa dei suoi possibili impatti ambientali sugli organismi non-bersaglio. [44]

Ciò ha portato alla quasi totale scomparsa dei residui di questo principio attivo nel latte, come dimostrato dai dati ottenuti in cui l'acephate è stato ritrovato in tracce in un solo campione.

I risultati possono essere ulteriormente analizzati in base alla stagione di raccolta dei campioni del latte.

Il campionamento, come riportato nel Paragrafo 2.1, è stato effettuato in diversi periodi dell'anno, e precisamente ad Ottobre 2004, Gennaio 2005 e Maggio 2005. Dai dati ottenuti si è evidenziata una diminuzione progressiva del numero di campioni positivi dall'autunno alla primavera, vedi Tabella 3.5. Questa tendenza, già evidenziata nel precedente studio [56], può essere correlata ad un più elevato contenuto di materia grassa e di proteine presenti nel latte collezionato durante la stagione fredda. [57] [58]

Essendo gli organofosforati tendenzialmente liposolubili e capaci di legarsi in modo covalente alle proteine, è più facile rilevarli nei campioni di latte derivanti da una mungitura "invernale".

Inoltre, considerando che i trattamenti antiparassitari sulle granaglie vengono effettuati prima della raccolta (fine estate), aumentando il lasso di tempo che intercorre tra il trattamento e il consumo di tali alimenti da parte dei bovini, dovrebbe diminuire la concentrazione di tali sostanze nelle granaglie e di conseguenza nel latte.

La contaminazione in tracce di 3 campioni di latte BIO su 36 esaminati può essere spiegata con un mancato rispetto dei dettati del Reg. 2092/91 o più probabilmente a contaminazioni esterne all'allevamento dovute a pratiche agricole convenzionali nelle vicinanze dei terreni o degli allevamenti biologici, o a contaminazioni crociate durante la filiera del latte.

| Periodo | N. e (%) positivi | Acephate | Chlorpyriphos ethyl | Disulfoton | Parathion ethyl |
|---------------|----------------------|----------|------------------------|------------|--------------------|
| Ottobre 04 | 6 (5,9%) | - | 5 | 1 | - |
| Gennaio 04 | 5 (5,0%) | - | 4 | - | 1 |
| Maggio 05 | 2 (2,1%) | 1 | - | - | 1 |
| Totale | 13 (4,4%) | 1 | 9 | 1 | 2 |

Tabella 3.5: Campioni di latte positivi nei vari periodi del campionamento.

La bibliografia sulla contaminazione del latte da parte di OPPs presenta dati parzialmente contrastanti. Alcuni lavori, pubblicati fra gli anni settanta e novanta riportano l'assenza di residui organofosforati in campioni di latte crudo, latte pastorizzato e in campioni di formaggio. [59] [60]

Al contrario in Italia Baldi *et al.* [61], negli anni compresi tra il '74 e il '78, evidenziarono frequentemente la presenza di organofosforati (in particolare diazinon, parathion e methyl-parathion) in vari prodotti alimentari tra cui il latte a contaminazioni comprese tra 1 e 100 ppb.

Più recentemente altri Autori [62] rilevano, in campioni di latte in polvere per l'infanzia, la presenza in tracce di azinphos-methyl e di pirimiphos-methyl.

Per quanto riguarda la situazione attuale sul territorio italiano, Gallo *et al.* [63] in un'indagine svolta tra il 1990 e il 1994 su 349 campioni di vari alimenti di cui 265 campioni di latte hanno evidenziato la presenza di methyl-parathion in 1 solo campione e a livelli inferiori a quelli ammessi dalla normativa.

I nostri dati confermano le osservazioni di questi ultimi autori [63] evidenziando un contenuto estremamente modesto di OPPs nel latte crudo; tali dati dimostrano, per quanto riguarda la realtà osservata, che il latte non rappresenta una fonte significativa di rischio per il consumatore.

3.3 Messa a punto dell'analisi per la determinazione del glyphosate

È stato sviluppato un metodo di estrazione, purificazione ed analisi cromatografica per la determinazione del glyphosate nel latte.

La tecnica scelta è stata quella dell'analisi cromatografica mediante HPLC accoppiato ad un rivelatore fluorimetrico, detector dalla sensibilità molto elevata, in grado di evidenziare composti contenenti almeno un gruppo fluorescente.

Il glyphosate è stato reso fluorescente tramite derivatizzazione con 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC-Cl), derivatizzante che reagisce indifferentemente sia con le ammine primarie che secondarie, quale è il glyphosate.

In Figura 3.12 sono schematizzate le principali fasi analitiche sviluppate nel presente lavoro. Ognuna di esse verrà discussa dettagliatamente nei Paragrafi successivi.

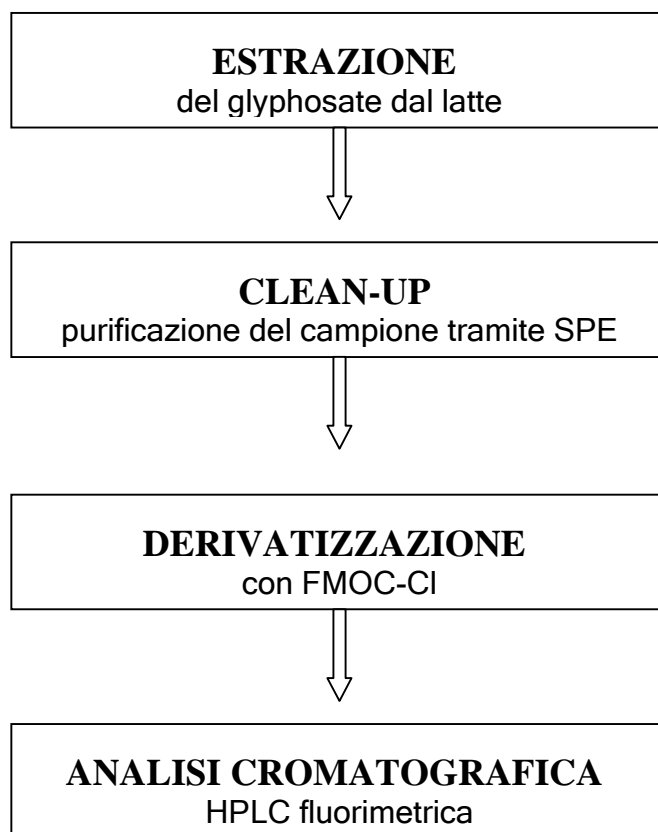


Figura 3.12: Schema riassuntivo delle principali fasi analitiche.

Le condizioni di derivatizzazione e di analisi cromatografica sono stati i primi passaggi presi in considerazione. In un secondo tempo sono stati fatti vari tentativi al fine di estrarre e purificare il glyphosate dalla matrice.

3.3.1 Derivatizzazione

La mancanza di gruppi cromofori e fluorofori nella molecola del glyphosate rende indispensabile la sua derivatizzazione perché possa essere rilevata con i comuni sistemi di rivelazione abbinati alla cromatografia liquida.

La letteratura riguardante la determinazione del glyphosate può essere suddivisa in due grandi gruppi: i lavori che utilizzano la derivatizzazione “pre-colonna” e quelli invece che impiegano la derivatizzazione “post-colonna”, come riportato nel Paragrafo 1.2.4.

Nel presente lavoro si è deciso di effettuare la derivatizzazione pre-colonna con FMOC-Cl, essendo una reazione immediata e semplice con l’unico svantaggio dato dall’estrema reattività del derivatizzante.

Le prime prove sono state fatte prendendo come riferimento i lavori di Nedelkoska e Low [34] e di Sancho *et al.* [35]

Nedelkoska e Low hanno riportato nel loro lavoro uno studio approfondito sull’ottimizzazione della reazione di derivatizzazione prendendo in considerazione l’effetto del rapporto molare tra derivatizzante e analita, la percentuale di acqua presente durante la reazione, la temperatura di derivatizzazione e la stabilità del prodotto finale.

In effetti uno dei maggiori inconvenienti nell'usare il FMOC-Cl è la sua estrema reattività con l'acqua, intesa come matrice o come solvente in cui è solubilizzato il glyphosate standard (il glyphosate, infatti, è solubile in acqua e insolubile nei solventi organici, mentre il FMOC-Cl è solubile in acetonitrile e insolubile in acqua). La reattività con l'acqua può portare alla formazione del prodotto FMOC-OH nella miscela derivatizzata, rappresentando un problema all'analisi strumentale. Il FMOC-OH genera infatti un largo picco cromatografico che si sovrappone a quello del glyphosate rendendone difficile la determinazione. Per tale motivo e per evitare la formazione di un precipitato dato dal glyphosate in acqua è stata valutata attentamente la giusta proporzione tra glyphosate e derivatizzante. Le proporzioni ottimali sono date da acetonitrile-acqua (50:50 v/v) e da concentrazioni di FMOC-Cl non superiori a 0,5 mM, che equivale ad un rapporto molare glyphosate: FMOC-Cl di $1:3 \times 10^3$.

Un eccesso di acetonitrile, con oltre il 65%, nella reazione di derivatizzazione, porta alla formazione di un precipitato dovuto all'insolubilità del glyphosate in tale solvente.

Alla luce di queste conoscenze, sono state riprodotte le condizioni proposte da Nedelkoska e Low, mettendo insieme in una provetta 2 mL di FMOC-Cl 0,5 mM, 0,3 mL di tampone borato 0,125 M e 1,7 mL di glyphosate standard.

La soluzione così ottenuta è stata miscelata mediante agitatore magnetico per 30 minuti a temperatura ambiente.

Nonostante le condizioni suddette abbiano dato subito dei buoni risultati, ne sono state sperimentate delle altre variando volumi e concentrazioni dei reagenti come riportato in Tabella 3.6.

| Bibliografia | Volume FMOC-Cl | Concentrazione FMOC-Cl | Volume glyphosate | Volume Tampone borato 0,125 M |
|----------------------------------|----------------|------------------------|-------------------|-------------------------------|
| <i>Nedelkoska e Low [34]</i> | 2 mL | 0,5 mM | 1,7 mL | 0,3 mL |
| <i>Sancho et al. [35]</i> | 1 mL | 4 mM | 1,5 mL | 0,2 mL |
| <i>Chemtek [64] (modificata)</i> | 1,5 mL | 4 mM | 1,0 mL | 0,5 mL |

Tabella 3.6: Condizioni di derivatizzazione sperimentate, in rosso quelle ritenute ottimali.

Le diverse condizioni di derivatizzazione non hanno messo in evidenza sostanziali differenze, si è deciso pertanto di mantenere quelle iniziali (riportate in rosso nella Tabella 3.6).

L'eccesso di FMOC-Cl, non utilizzato nella derivatizzazione, è stato eliminato a fine reazione per mezzo di estrazioni liquido-liquido con etile acetato.

Sono state valutate le condizioni di lavaggio migliori, partendo sempre da quelle riportate in letteratura, ossia 3 lavaggi con 1 mL di etile acetato ciascuno. I cromatogrammi acquisiti risultavano ancora ricchi di picchi

interferenti. Per questo motivo sono state studiate le condizioni migliori di lavaggio variando e il numero di estrazioni e il volume di etile acetato impiegato. Sono stati testati: 3 lavaggi con 2 mL di etile acetato, 3 lavaggi con 3 mL e infine 4 lavaggi con 2 mL.

Dal confronto dei diversi cromatogrammi ottenuti, Figura 3.13, è possibile osservare le condizioni migliori date da 4 estrazioni liquido-liquido con 2 mL di etile acetato ciascuna. Questo tipo di lavaggio ha consentito di ottenere cromatogrammi decisamente più puliti senza perdere considerevoli quantità di glyphosate.

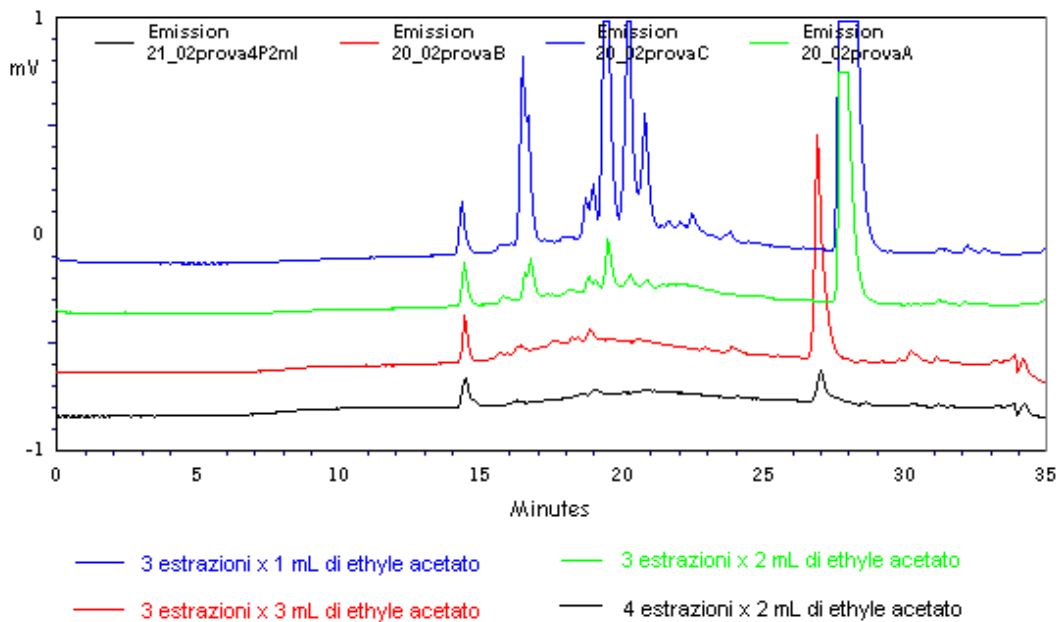


Figura 3.13: Cromatogrammi ottenuti con le differenti condizioni di lavaggio.

3.3.2 Condizioni cromatografiche

In accordo con gli Autori citati in precedenza la lunghezza d'onda d'eccitazione è stata fissata a 266 nm e quella di emissione a 316 nm

Il processo di messa a punto delle condizioni cromatografiche è cominciato con le analisi degli standard preparati come descritto nel Paragrafo 2.3.1.

Come punto di partenza si sono scelte le condizioni HPLC riportate da Nedelkoska e Low [34] e da Sancho *et al.* [35] leggermente modificate soprattutto per quanto riguarda la scelta della colonna cromatografica.

Entrambi gli Autori hanno utilizzato due colonne analitiche, messe in serie con un sistema di "switching", dove la prima colonna è stata usata soprattutto per purificare il campione e la seconda come colonna analitica vera e propria. In particolare nel lavoro di Nedelkoska e Low [34] sono state impiegate due colonne poliamminiche, mentre Sancho *et al.* [35] ha utilizzato in serie una C₁₈ e una colonna amminica.

Nel presente lavoro è stata usata una sola colonna cromatografica dal momento che si è deciso di effettuare la purificazione del campione mediante estrazione in fase solida.

Per iniziare sono state scelte delle condizioni analitiche che prevedevano l'uso di una colonna phenyl hexyl Luna 250 x 4,6 mm x 5 µm, colonna caratterizzata da una buona versatilità, e come fase mobile una soluzione di tampone fosfato: CH₃CN (65:35) ad un flusso di 1,0 mL/min.

Nella Figura 3.14 viene riportato uno dei primi cromatogrammi dello standard di glyphosate ottenuto in condizioni isocratiche.

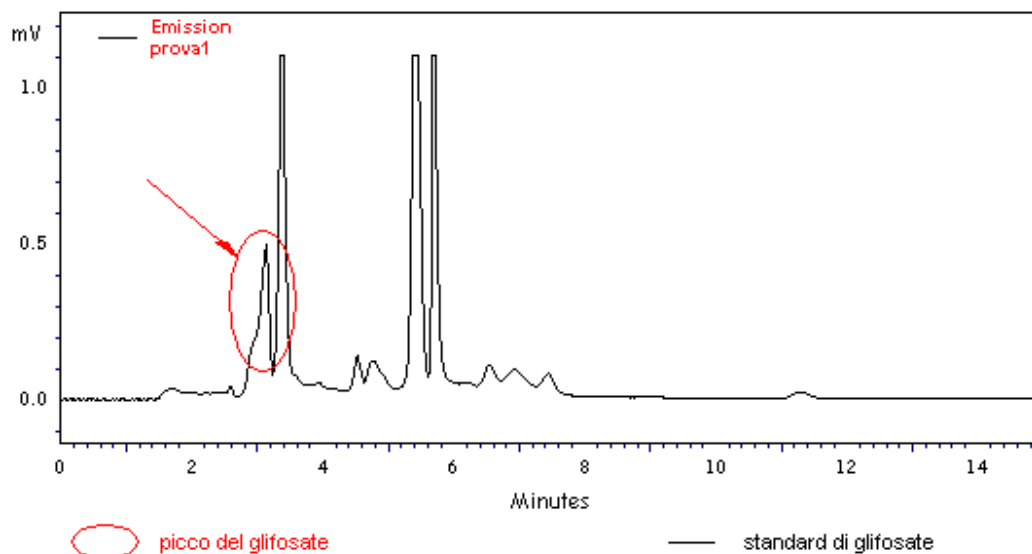


Figura 3.14: Cromatogramma ottenuto in condizioni isocratiche.

Come si evince dal cromatogramma, le condizioni isocratiche sono risultate decisamente inadatte a separare il picco del glyphosate da quelli degli interferenti derivanti dalla derivatizzazione, di conseguenza si è pensato di utilizzare gli stessi solventi come fase mobile ma di lavorare in condizioni programmate, aumentando progressivamente la fase organica, fino ad arrivare alle condizioni analitiche riportate nella seguente Tabella.

| Tempo (min.) | CH ₃ CN | Tampone fosfato |
|--------------|--------------------|-----------------|
| 0' | 20% | 80% |
| 5' | 20% | 80% |
| 25' | 50% | 50% |
| 30' | 50% | 50% |
| 35' | 80% | 20% |
| 50' | 20% | 80% |

Tabella 3.7: Condizioni di analisi HPLC in programmata.

Queste condizioni di analisi sono risultate soddisfacenti, come si osserva dal cromatogramma riportato in Figura 3.15, in cui il picco del glyphosate è ben distinto e separato da quello degli interferenti presenti.

A causa della presenza di diversi picchi nel cromatogramma dello standard, per identificare quello riferibile al glyphosate è stata condotta una prova "in bianco", ovvero una derivatizzazione come riportato nel Paragrafo 2.3.4 utilizzando una soluzione acquosa priva di glyphosate.

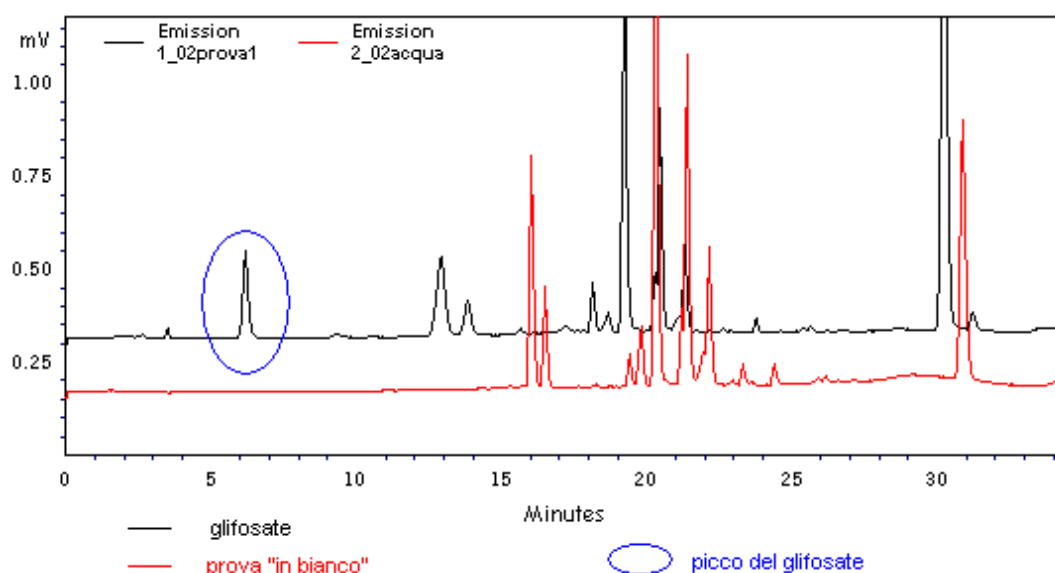


Figura 3.15: Confronto tra un cromatogramma dello standard e la prova "in bianco" in condizioni programmate.

Sovrapponendo i cromatogrammi del glyphosate standard e della prova "in bianco" è stato possibile individuare il picco originato dal glyphosate.

In seguito, a causa di problemi di mancata stabilità della colonna a tali condizioni di analisi, e quindi di separazione del picco del glyphosate dagli interferenti, sono state saggiate altre condizioni di analisi sempre in programmata.

Si è giunti infine alle condizioni riportate in Tabella 3.8 con cui sono stati ottenuti dei buoni cromatogrammi (Figura 3.16) in cui il picco del glyphosate è ben evidente e distanziato dagli interferenti.

| Tempo (min.) | CH ₃ CN | Tampone fosfato |
|--------------|--------------------|-----------------|
| 0' | 10% | 90% |
| 30' | 70% | 30% |
| 40' | 70% | 30% |
| 50' | 10% | 90% |

Tabella 3.8: Nuove condizioni di analisi HPLC.

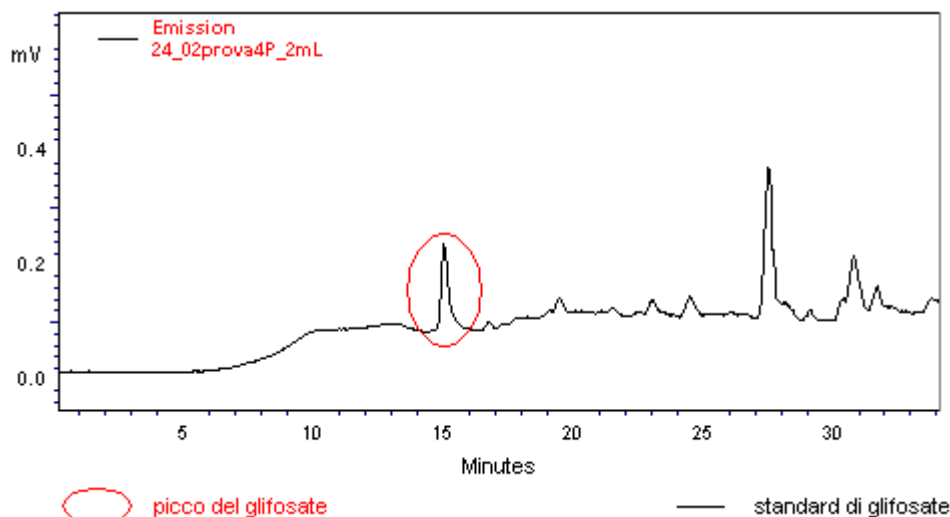


Figura 3.16: Cromatogramma del glyphosate standard con le nuove condizioni HPLC.

Con il passare del tempo in seguito alle numerose analisi fatte sono riemersi i problemi di instabilità della colonna con aumenti nella contro-pressione, fino a valori di oltre 400 bar.

Si è pensato così di cambiare il tipo di tampone utilizzato.

Seguendo le indicazioni riportate nel lavoro di Vreeken *et al.* [65] è stato sostituito il tampone fosfato con il tampone acetato d'ammonio ad una concentrazione di 5 mM.

L'uso del tampone acetato d'ammonio sulla colonna phenyl-hexyl non ha dato buoni risultati, la contro-pressione ha continuato a mantenersi su valori molto elevati.

Si è deciso pertanto di provare ad utilizzare una colonna analitica Luna C₁₈ 150 x 4,6 mm x 3 μm al posto della phenyl-hexyl, sempre con un flusso di 1 mL/min.

Vari programmi di analisi, sempre in programmata, sono stati sperimentati per giungere infine a delle condizioni che prevedono una breve isocratica iniziale di 5 minuti (vedi Tabella 3.9), in cui si è visto che il glyphosate viene eluito proprio nei primi minuti di analisi (vedi Figura 3.17).

| Tempo (min.) | CH ₃ CN | Tampone acetato d'ammonio |
|--------------|--------------------|---------------------------|
| 0' | 20% | 80% |
| 5' | 20% | 80% |
| 25' | 90% | 10% |
| 35' | 20% | 20% |
| 40' | 20% | 20% |

Tabella 3.9: Programma di analisi in seguito alla sostituzione del tampone e della colonna cromatografica.

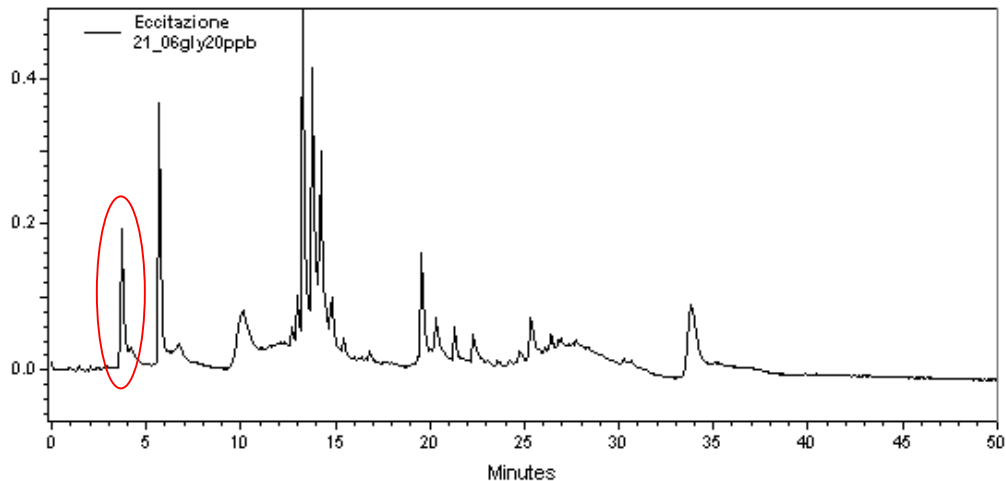


Figura 3.17: Cromatogramma del glyphosate standard su colonna C_{18} e con tampone ammonio acetato 5 mM.

Tale programma è stato utilizzato per tutte le prove di estrazione condotte sullo standard; passando alla matrice è stato necessario ricambiare le condizioni di analisi per separare meglio il picco del glyphosate dagli interferenti del latte. Dopo varie modifiche si è giunti alle condizioni riportate in Tabella 3.10, con cui in seguito si è proseguito nello studio del *clean up* del campione, fino a giungere allo sviluppo della metodica riportata nel Paragrafo 2.3.5.

| Tempo (min.) | CH ₃ CN | Tampone acetato d'ammonio |
|--------------|--------------------|---------------------------|
| 0' | 20% | 80% |
| 30' | 40% | 60% |
| 40' | 90% | 10% |
| 50' | 80% | 20% |

Tabella 3.10: Programma di analisi finale, utilizzato per le prove in matrice.

Visto che i problemi di contro-pressione elevata della colonna analitica non sono stati risolti, alla fine di ogni programma la colonna è stata ricondizionata per 10 minuti nelle condizioni iniziali.

3.3.3 Prime fasi estrattive dalla matrice

Per estrarre il glyphosate, composto molto simile agli amminoacidi presenti nel latte, è stato necessario prevedere una iniziale deproteinizzazione della matrice. La deproteinizzazione è stata ottenuta mediante aggiunta di acido cloridrico 0,1 M, e la precipitazione proteica è stata favorita da un passaggio estrattivo con centrifuga.

L'estratto acquoso così ottenuto è stato sottoposto a tre successive estrazioni liquido-liquido con diclorometano, al fine di eliminare le sostanze lipofile.

Prove sperimentali hanno permesso di capire che l'eliminazione dei grassi risulta più efficace utilizzando come solvente estrattivo il diclorometano rispetto al cloroformio. Tale dato, oltre ad essere stato confermato dai cromatogrammi, è stato rilevato anche visivamente nei campioni durante tale passaggio.

3.3.4 Purificazione del campione tramite SPE

Una fase determinante in tutta la messa a punto della metodica è stata quella della purificazione del campione mediante estrazione in fase solida (SPE).

È in questo passaggio infatti che si cerca di eliminare il più possibile gli interferenti che non sono stati eliminati nelle fasi estrattive precedenti.

Gli obiettivi principali sono due: pulire il campione quanto più possibile dagli interferenti e cercare di recuperare la maggior quantità dell'analita ricercato.

In generale, come riportato in letteratura, i metodi di purificazione di campioni di varia natura si basano su estrazione in fase solida mediante cartucce a scambio ionico; tale scelta è dovuta principalmente alla natura ionica del glyphosate. L'uso di una cartuccia a scambio ionico sembra essere molto efficace, la conferma è data da molti Autori che prevedono nei loro lavori l'utilizzo di cartucce o a scambio cationico o anionico o addirittura di entrambe. [21]

Oltre a questo tipo di cartuccia, in letteratura vengono riportati purificazioni del campione mediante cartucce quali la C₁₈ [66]

Nel presente studio, visto che il glyphosate non derivatizzato risulta essere insolubile in qualsiasi solvente organico, si è considerato di scegliere e studiare un tipo di cartuccia che potesse essere eseguita in seguito alla derivatizzazione e prima dell'iniezione del campione in HPLC.

È stata scelta una cartuccia Oasis[®] HLB (hydrophilic-lipophilic balance) per la sua estrema versatilità, dovuta alla capacità di ritenere un ampio spettro di composti, polari e non, alla semplicità e rapidità nell'utilizzo e all'ampio range di pH utilizzabile, da 1 a 14. Inoltre tale scelta è risultata in accordo con Ibanez *et al.* [67] che riportano l'utilizzo di tale fase estrattiva, in un sistema particolare in cui una particolare cartuccia contenente la fase HLB è stata incorporata direttamente allo strumento analitico rappresentato da un HPLC-MS/MS, subito dopo la derivatizzazione del campione, rappresentato da acqua e suolo, mediante FMOC-Cl.

La prima prova fatta per studiare il comportamento dello standard di glyphosate su queste cartucce è stata eseguita seguendo il metodo generico riportato dalla stessa ditta produttrice.

Un mL di glyphosate derivatizzato è stato acidificato (pH 2 circa) con HCl 0,1 N ed è stato caricato sulla suddetta cartuccia, precedentemente condizionata con 1 mL di CH₃OH ed 1 mL di H₂O. Il lavaggio è stato effettuato con 1 mL di una soluzione acquosa al 5% di CH₃OH, ed infine l'eluizione è stata fatta con 1 mL di CH₃OH.

All'analisi strumentale non è stato ritrovato il glyphosate nella frazione dell'eluizione. Sono state apportate delle modifiche variando i volumi e le percentuali di solvente utilizzati, senza ottenere dei risultati soddisfacenti.

Il metodo quindi è stato ottimizzato realizzando lo studio sperimentale bidimensionale "2-d wash elute", suggerito sempre dalla ditta produttrice.

L'ottimizzazione del metodo si ottiene semplicemente modificando o la concentrazione di solvente organico utilizzato, o variando il pH, o cambiando entrambi i parametri.

Questo è possibile perché nelle colonne a fase inversa, quale è l'Oasis[®] HLB, la ritenzione dell'analita è influenzata dalla concentrazione della fase organica e dal pH. In generale, essa decresce all'aumentare della concentrazione della soluzione organica, mentre al variare del pH essa dipende dalla natura ionica del composto. Le sostanze basiche vengono ritenute meglio a valori di pH basici, presentandosi in forma neutra, mentre le sostanze acide da pH acidi.

Il glyphosate standard dopo essere stato derivatizzato, è stato acidificato con acido cloridrico 0,1 N fino ad un pH di circa 1,6

Sono state condizionate contemporaneamente 10 cartucce Oasis[®] HLB con 1 mL di CH₃OH, ed equilibrate con 1 mL di H₂O. Su ciascuna cartuccia è stato caricato 1 mL di glyphosate standard e l'eluizione è stata fatta prendendo 1 mL di una delle soluzioni, a differente pH e concentrazione organica, riportate di seguito:

a) Soluzioni basiche (pH=10)

- 2% di NH₄OH in CH₃OH / H₂O (10% CH₃OH)
- 2% di NH₄OH in CH₃OH / H₂O (30% CH₃OH)
- 2% di NH₄OH in CH₃OH / H₂O (50% CH₃OH)
- 2% di NH₄OH in CH₃OH / H₂O (70% CH₃OH)
- 2% di NH₄OH in CH₃OH / H₂O (90% CH₃OH)

b)- Soluzioni acide (pH=3)

- 2% di CH₃COOH in CH₃OH / H₂O (10% CH₃OH)
- 2% di CH₃COOH in CH₃OH / H₂O (30% CH₃OH)
- 2% di CH₃COOH in CH₃OH / H₂O (50% CH₃OH)
- 2% di CH₃COOH in CH₃OH / H₂O (70% CH₃OH)
- 2% di CH₃COOH in CH₃OH / H₂O (90% CH₃OH)

Per la preparazione delle soluzioni sopra riportate sono stati trasferiti in un matraccio da 10 mL:

- 800 µL di NH₄OH 25% o 208 µL CH₃COOH 96%, 1 mL CH₃OH e portati a volume con H₂O (soluzione al 10% di CH₃OH)
- 800 µL di NH₄OH 25% o 208 µL CH₃COOH 96%, 3 mL CH₃OH e portati a volume con H₂O (soluzione al 30% di CH₃OH)
- 800 µL di NH₄OH 25% o 208 µL CH₃COOH 96%, 5 mL CH₃OH e portati a volume con H₂O (soluzione al 50% di CH₃OH)
- 800 µL di NH₄OH 25% o 208 µL CH₃COOH 96%, 7 mL CH₃OH e portati a volume con H₂O (soluzione al 70% di CH₃OH)

- 800 μL di NH_4OH 25% o 208 μL CH_3COOH 96%, 9 mL CH_3OH e portati a volume con H_2O (soluzione al 90% di CH_3OH)

Per ciascuna eluizione sono stati prelevati 10 μL e iniettati in HPLC. I risultati ottenuti dall'iniezione in HPLC delle diverse soluzioni di eluizione, riportati nei due grafici sottostanti (Figura 3.18), dimostrano che il glyphosate caricato ad un pH di 1,8 viene eluito bene in condizioni basiche (con il 50% di CH_3OH) mentre in condizioni acide viene ritenuto sulla cartuccia indipendentemente dalla percentuale di fase organica impiegata.

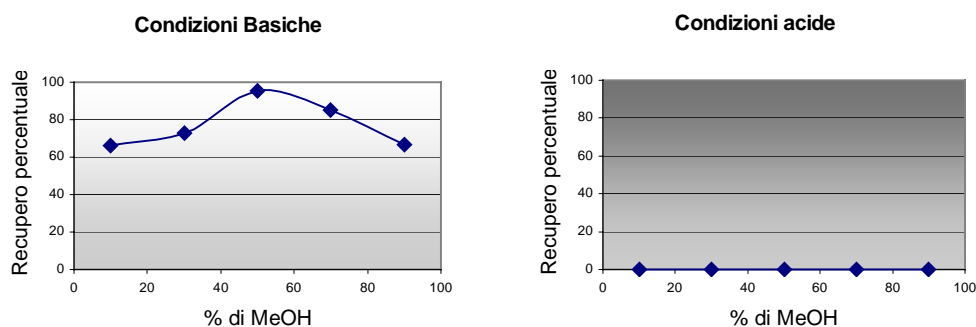


Figura 3.18: Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dallo studio "2-d wash elute".

Lo studio bidimensionale ha permesso di individuare le condizioni ideali di eluizione del glyphosate che sono state quindi applicate alla matrice.

Dopo aver fortificato con glyphosate standard 10 mL di latte in maniera tale da ottenere una contaminazione pari ad 1 MRL (0,1 ppm), esso è stato acidificato per aggiunta di HCl 0,1 N fino ad un pH di circa 4,6.

Il campione è stato centrifugato a temperatura ambiente a 4000 rpm per 5 minuti. Metà del volume del surnatante è stato prelevato ed estratto tre volte mediante estrazioni liquido-liquido con diclorometano in proporzione 1:1.

Dalla fase acquosa sono stati prelevati 1,7 mL e derivatizzati secondo le condizioni riportate nel Paragrafo 2.3.4. Successivamente, dopo aver acidificato il campione, è stata eseguita l'estrazione in fase solida mediante cartuccia Oasis[®] HLB.

La cartuccia è stata condizionata con 1 mL di CH_3OH ed equilibrata con 1 mL di H_2O . Il campione è stato caricato e lavato in condizioni acide con 1 mL della soluzione al 2% di CH_3COOH in $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ (90% CH_3OH). L'eluizione è stata fatta in condizioni basiche con 1 mL della soluzione al 2% di NH_4OH in $\text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ (50% CH_3OH).

Infine 10 μL del campione sono stati iniettati in HPLC.

Nel cromatogramma ottenuto non è stato possibile rilevare il picco del glyphosate a causa di interferenti del latte aventi lo stesso tempo di ritenzione dell'analita.

Per cercare di purificare ulteriormente il campione dagli interferenti della matrice è stato aggiunto un altro passaggio di purificazione mediante cartuccia SAX-Cl a scambio anionico, estrazione che precede il passaggio della derivatizzazione.

La scelta di questa cartuccia anionica è stata dettata dalla sua capacità di trattenere composti organici acidi anionici da matrici di natura acquosa e non.

Il principio su cui si basa questo tipo di cartuccia SPE è l'attrazione che si verifica tra molecole cariche di segno opposto. La resina scambiatrice di ioni, presente all'interno di queste SPE, possiede gruppi carichi positivamente ai quali si trovano legati dei controioni, solitamente rappresentati dal cloro. Grazie al distacco del controione, nel sito di scambio, analiti carichi negativamente si possono attaccare ai gruppi positivi della resina scambiatrice.

In breve, il meccanismo di scambio ionico si compone delle seguenti fasi:

- caricamento del campione contenente l'analita carico negativamente
- spiazzamento dello ione al sito di scambio: nelle Isolute SAX l'analita si sostituisce al controione Cl^-
- lavaggio della cartuccia con eliminazione del controione dalla resina
- distacco selettivo, grazie ad un eluente, dell'analita ricercato

Affinché nelle cartucce SAX avvenga lo scambio ionico è fondamentale studiare le migliori condizioni di caricamento variando il pH e la forza ionica del campione da purificare.

Per quanto riguarda la forza ionica essa deve essere il più bassa possibile ($< 0,05 \text{ M}$) e per questo motivo il campione viene diluito con acqua deionizzata. La diluizione minimizza la competizione tra l'analita e gli altri anioni interferenti presenti nel campione, facilitandone l'attacco ai siti di scambio. Inoltre l'aggiunta di acqua diminuisce la viscosità e facilita il flusso all'interno della cartuccia

Per assicurare la totale ionizzazione dell'analita occorre che il pH del campione sia portato di due unità al di sopra del valore di pK_a .

Possedendo il glyphosate 4 differenti valori di pK_a per trovare le migliori condizioni di pH sono state fatte diverse prove al fine di approfondire il meccanismo di queste cartucce.

Nel primo tentativo 2 mL di una soluzione di glyphosate, solubilizzato in tampone borato (pH 9,5), sono stati caricati su una cartuccia SAX preventivamente condizionata con 10 mL di acqua da HPLC. L'eluizione è stata effettuata con 2 mL di acido nitrico 0,01 M. In queste condizioni, all'analisi strumentale, il picco del glyphosate è stato osservato nella frazione del caricamento e non in quella dell'eluizione. Le possibili spiegazioni di tale risultato sono state identificate nella soluzione di caricamento, ritenuta non idonea, e nell'utilizzo di uno scarso volume di soluzione eluente.

Si è deciso pertanto di sostituire il tampone borato (soluzione di caricamento) con il tampone ammonio acetato e di eluire con 10 mL di acido nitrico. In questo caso il picco del glyphosate è stato osservato nella fase di eluizione.

Successivamente è stato fatto uno studio che simulasse le reali condizioni di purificazione del glyphosate in matrice.

Sapendo che il passaggio su SAX si colloca tra la prima fase di estrazione con centrifuga e la fase di derivatizzazione, una soluzione acquosa di glyphosate è stata trattata come se fosse l'estratto acquoso derivante dalla prima fase estrattiva del latte (acidificazione e centrifugazione). La

soluzione acquosa di glyphosate è stata quindi neutralizzata con KOH 2 M fino a un pH di circa 8,5 e caricata sulla SAX. Il lavaggio è stato fatto con 10 mL di acqua deionizzata e per l'eluizione è stato sufficiente far fluire 3 mL di acido nitrico per recuperare tutto il glyphosate (vedi Figura 3.19).

Da queste prove si è evidenziata l'importanza di controllare soprattutto i parametri della soluzione di caricamento.

Ritenuti buoni i risultati ottenuti su standard si è proseguito con le prove in matrice.

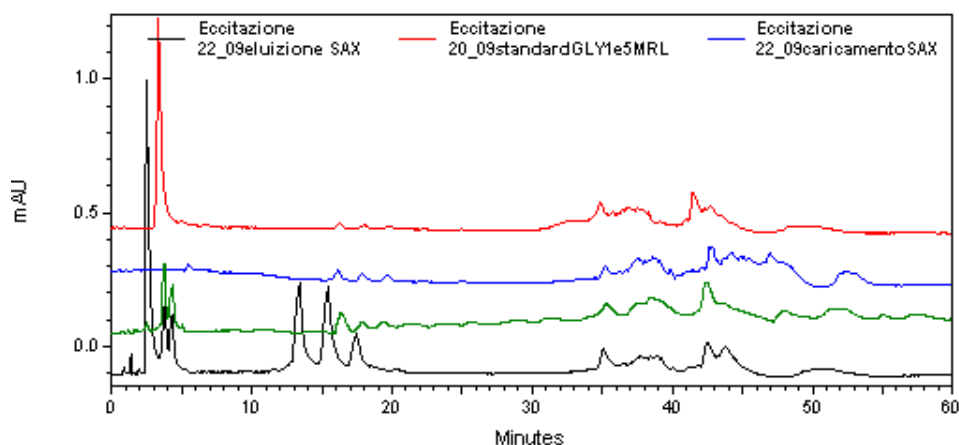


Figura 3.19: Cromatogrammi ottenuti dalla prova SAX.

3.3.5 Prove su matrice e metodica finale

Raggiunti dei buoni risultati dallo sviluppo su standard delle singole fasi di estrazione, purificazione e derivatizzazione, si è proceduto all'applicazione dell'intera metodica ad un campione di acqua in cui è stato aggiunto del glyphosate standard. Visto che l'intera procedura analitica (schematicamente riportata in Figura 2.10) è risultata buona sullo standard, si è proceduto alla sua applicazione al latte. Questa prima prova in matrice non ha dato risultati positivi, in quanto il glyphosate standard aggiunto all'inizio della metodica non è stato recuperato (vedi Figura 3.20).

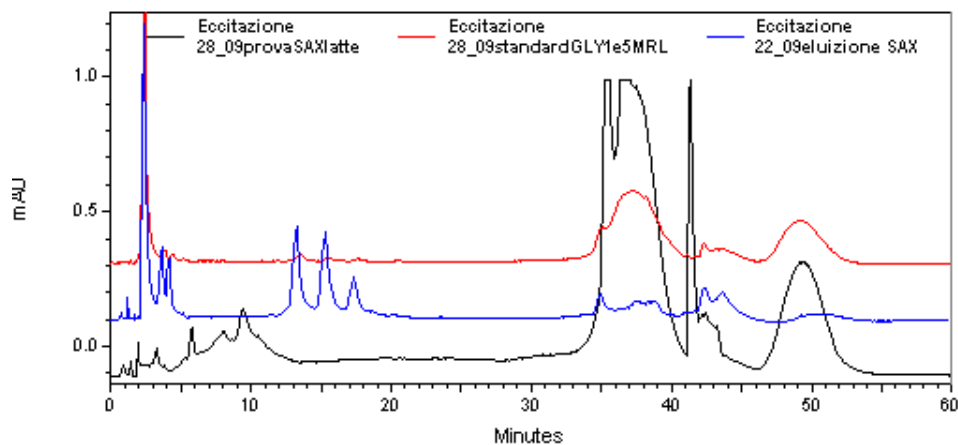


Figura 3.20: *Cromatogrammi ottenuti in seguito all'applicazione dell'intera metodica.*

Come si può osservare dai cromatogrammi sopra riportati, la metodica è risultata ottima per la prova fatta sul campione di acqua fortificato (cromatogramma in blu) in cui si nota nei primi minuti un picco in corrispondenza di quello dello standard iniettato tal quale (cromatogramma in rosso); mentre nel cromatogramma ottenuto dal latte (cromatogramma in nero) non è stato evidenziato nulla, a parte piccoli picchi interferenti dovuti alla matrice.

A questo punto è stato necessario rianalizzare le varie fasi per individuare il punto rimasto critico. Non sapendo se il mancato recupero fosse attribuibile ad una perdita dell'analita durante le fasi di estrazione e purificazione oppure ad un problema nella derivatizzazione, si è cercato di monitorare i vari passaggi, aggiungendo dello standard di glyphosate e facendo dei controlli mediante analisi strumentale, al termine di ciascuno di essi.

Dove possibile è stato aggiunto lo standard derivatizzato, proprio per controllare il recupero indipendentemente dall'incognita della derivatizzazione in matrice.

Il controllo è stato fatto a ritroso verificando dapprima le ultime fasi analitiche. Nella Figura 3.21 vengono riportati i punti della metodica in cui è stato aggiunto lo standard.

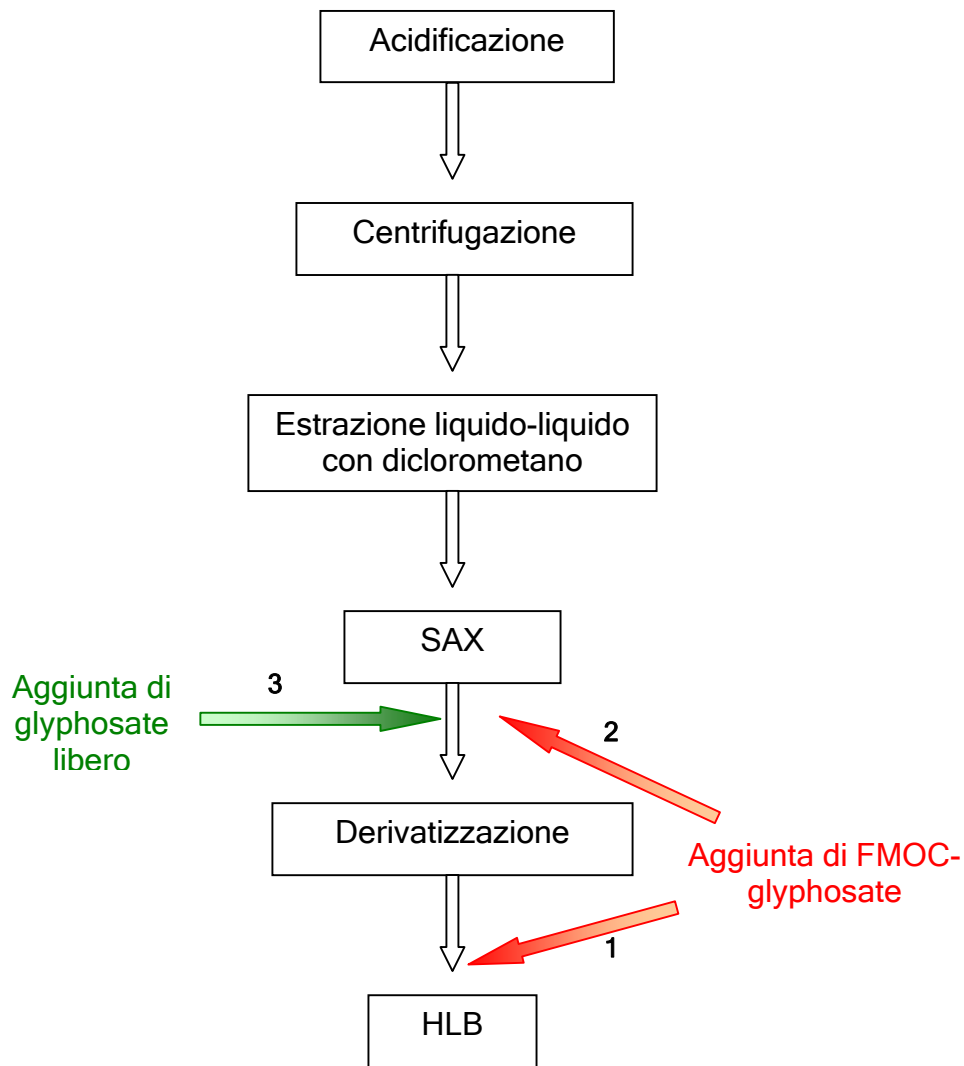


Figura 3.21: *Punti della metodica analitica in cui si è aggiunto lo standard di glyphosate.*

L'aggiunta del FMO-glyphosate prima del passaggio su HLB (punto 1 in Figura 3.21) ha consentito di valutare il buon funzionamento della stessa anche in matrice. Come si può vedere dal cromatogramma in rosso riportato in Figura 3.22 il glyphosate viene recuperato.

In seguito il FMO-glyphosate è stato aggiunto prima della fase di derivatizzazione (punto 2 in Figura 3.21). Anche in questo caso il glyphosate è stato recuperato (cromatogramma in blu, Figura 3.22) permettendo quindi di escludere eventuali perdite di analita durante la derivatizzazione e i successivi lavaggi con etile acetato.

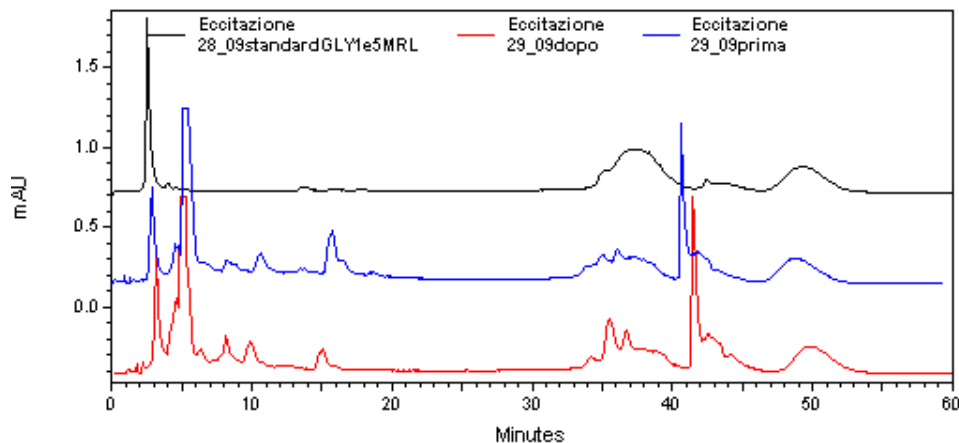


Figura 3.22: Cromatogrammi ottenuti dalla prova HLB su matrice.

Proseguendo l'indagine a ritroso, non è stato possibile aggiungere FMOC-glyphosate prima del passaggio su SAX, visto che la procedura estrattiva di tale cartuccia è stata studiata per trattenere il glyphosate libero.

Supponendo che la SAX funzioni in matrice è stato aggiunto glyphosate non derivatizzato subito dopo tale passaggio per monitorare ulteriormente la derivatizzazione e le fasi successive (punto 3 in Figura 3.21). In quest'ultima prova non è stato possibile recuperare il glyphosate.

Alla luce dei dati ottenuti si è ipotizzato che un punto critico sia proprio la derivatizzazione. Durante quest'ultima il derivatizzante, avendo la capacità di reagire con tutti i composti contenenti gruppi amminici, per la sua bassa selettività, potrebbe reagire con amminoacidi o proteine del latte presenti nel campione, non eliminati con la deproteinizzazione o con la prima purificazione su SAX. Tali amminoacidi potrebbero, quindi, sottrarre il derivatizzante alla reazione con il glyphosate.

Durante lo sviluppo della metodica, oltre ai problemi sopra citati legati al metodo vero e proprio, se ne sono avuti altri riconducibili allo strumento.

L'instabilità della contro-pressione all'interno della colonna cromatografica, con aumenti esagerati (vedi Paragrafo 3.3.2) è stata pressoché costante lungo tutto il periodo di ricerca. Tale inconveniente, probabilmente dovuto all'utilizzo di tampone (fosfato che è stato successivamente sostituito con l'ammonio acetato) come fase mobile, è stato descritto anche in letteratura. [34]

Per il contenimento di tale punto critico oltre all'attenzione prestata nei confronti della colonna con lavaggi fatti al termine di ogni corsa cromatografica, e ad un appropriato tempo di ricondizionamento della stessa, ogni venti giorni circa è stata sostituita la precolonna.

Al momento si sta cercando di migliorare la metodica, tentando di risolvere i punti rimasti critici al fine di ottenere un buon recupero dell'analita. L'acquisizione da parte del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale di uno spettrometro di massa risulterà determinante per il perfezionamento della metodica finora sviluppata. Sicuramente andranno esaminati nuovamente i vari passaggi e probabilmente il tutto verrà

semplificato, senza avere l'esigenza di ottenere una completa purificazione del campione, essendo lo spettrometro di massa un rivelatore estremamente sensibile e specifico.

3.4 Conclusioni

Vista l'elevata tossicità dei pesticidi organofosforati e considerando il fatto che queste sostanze possono facilmente giungere all'uomo, sia attraverso prodotti di origine vegetale che animale, appare evidente la necessità di disporre di metodiche analitiche idonee alla determinazione di questi composti pericolosi, al fine di valutare la salubrità degli alimenti.

Per quanto riguarda l'analisi dei pesticidi organofosforati, l'attenzione dei Ricercatori si è fino ad ora rivolta soprattutto alle matrici di origine vegetale, mentre sono attualmente molto scarse le informazioni relative alle matrici di origine animale.

Per tali motivi è stato ritenuto opportuno condurre il presente lavoro che ha consentito di mettere a punto e validare una metodica in gascromatografia per la contemporanea determinazione, nel latte bovino, di quindici organofosforati; pesticidi aventi tutti un limite massimo residuale (MRL) fissato dalla Commissione Europea. [11]

Il passaggio più importante della messa a punto, ha riguardato la scelta delle migliori condizioni cromatografiche che permettessero di evidenziare contemporaneamente e chiaramente tutti e quindici i pesticidi presi in considerazione.

In seguito all'individuazione delle condizioni ottimali, si è proceduto con la validazione della metodica che ha fornito ottimi valori in termini di precisione, accuratezza e sensibilità.

Il metodo è stato poi applicato all'analisi di 298 campioni di latte crudo destinato al consumo umano. L'analisi di un così elevato numero di campioni di latte, ha confermato la robustezza e il buon grado di sensibilità della metodica precedentemente messa a punto.

I risultati ottenuti evidenziano livelli di contaminazione estremamente bassi; infatti l'osservanza dei tempi di sospensione previsti per i fitofarmaci e i medicinali veterinari, l'applicazione delle buone pratiche agricole e di allevamento, insieme alle caratteristiche dei composti che presentano un tempo di emivita abbastanza breve, assicurano il contenimento entro i limiti fissati dalla normativa delle contaminazioni da OPPs.

Tuttavia considerato che il latte è un alimento largamente utilizzato, è indispensabile effettuare frequenti monitoraggi per assicurare un prodotto sano, a fronte anche dell'immissione sul mercato di nuovi pesticidi.

In questo ampio progetto riguardante il monitoraggio di organofosforati nel latte rientra anche la determinazione dell'erbicida glyphosate.

La mancanza in letteratura di metodiche per l'analisi di tale sostanza in matrici quali il latte e le sue particolari caratteristiche chimico-fisiche, hanno reso questa parte del lavoro piuttosto complessa.

A tal fine sono state condotte numerose prove per ottimizzare le condizioni di estrazione dalla matrice, di purificazione dell'estratto, di derivatizzazione dell'analita e di analisi cromatografica.

La metodica finora sviluppata non è stata validata a causa di alcuni punti rimasti ancora "critici", la cui risoluzione è in corso di studio.

I vari passaggi sviluppati sullo standard di glyphosate hanno dato degli ottimi risultati, passando però allo studio in matrice non si è riusciti a recuperare il glyphosate aggiunto prima di ogni passaggio analitico.

In futuro la metodica verrà migliorata attraverso l'utilizzo di un HPLC accoppiata alla spettrometria di massa di recente acquisizione da parte del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Probabilmente alcuni passaggi sviluppati verranno semplificati, se non addirittura eliminati, per l'estrema sensibilità e specificità dello strumento.

Bibliografia

[1] Cassaret & Doull's, *Tossicologia i fondamenti dell'azione delle sostanze tossiche*, EMSI, 2000, 847-865.

[2] Barr B. D., Needham L. L., *Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review*, Journal of Chromatography B, 2002, 778, 5-29.

[3] Dikshith T. S. S., *Toxicology of pesticides in animals*, CRC Press, 1991, 3-23.

[4] Tiecco G., *Ispezione degli alimenti di origine animale*, Edagricole, 2000, 259-310.

[5] Krieger R. I., Doull J., Ecobichon D., Gammon D., Hodgson E., Reiter L., Ross J., *Handbook of pesticide toxicology*, Academic Press, 2001, Vol. 1, 97-102; Vol. 2, 913-974, 1013-1025, 1043-1072.

[6] Lorenzini G., *Principi di fitoiatria*, Edagricole, 2001, 154.

[7] Beretta C., *Tossicologia Veterinaria*, Casa editrice Ambrosiana, 1998, 67-72.

[8] Deiana P., Fatichenti F., *Pesticide residues in milk processing*, Italian Journal of Food Science, 1992, 229-245.

[9] Juhler R. K., *Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices*, Journal of Chromatography A, 1997, 786, 145-153.

[10] Eskenazi B., Bradman A., Castorina R., *Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effect*, Environmental Health Perspectives, 1999, 107, 409-419.

[11] The European Commission, *Pesticide residues: Maximum Residue Levels (MRLs)*, 2004, http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm (ultimo accesso Marzo 2007).

[12] The Extension Toxicology Network, *Pesticide Information Profiles*, <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/pips.html> (ultimo accesso Novembre 2006).

- [13] Tomlin C., *The Pesticide Manual Incorporating The Agrochemicals Handbook*, Crop Protection Publication, 1994, 9-10, 59, 200-203, 296-297, 372-373, 542-545, 671-676, 762-763, 769-772, 797-798, 823-824, 871-872, 1007-1008.
- [14] Muccinelli M., *Prontuario dei fitofarmaci*, Edagricole, 2002, 238, 240, 242, 244, 249, 254, 258, 260, 266, 269, 275, 278.
- [15] Pasian C., Taylor R. A. J., McMahon R. W., Lindquist K., *New method of acephate application to potted plants for control of Aphis gossypii, Frankliniella occidentalis and Bemisia tabaci*, Crop Protection, 2000, 19 (4), 263-271.
- [16] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), *Reregistration Chemical Status*, <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/status.htm> (ultimo accesso Dicembre 2006).
- [17] International Programme on Chemical Safety (IPCS), *The WHO Recommended Classification of pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2000-2002*, <http://www.inchem.org/pages/pds.html> (ultimo accesso Dicembre 2006).
- [18] Craig C. R., Stitzel R. E., *Farmacologia moderna*, Editoriale Grasso, 1992, 187-193.
- [19] Bozza Marrubini M., Grezzi Laurenzi R., Uccelli P., *Intossicazioni acute*, OEMF International, 1998, 382-395.
- [20] Buffin D., Jewell T., *Health and environmental impacts of glyphosate: the implication of increased use of glyphosate in association with genetically modified crops*, 2001, 1-37.
- [21] Stalikas C. D., Konidari C. N., *Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides*, Journal of Chromatography A, 2001, 907, 1-19.
- [22] *Zeneca Seeks EPA Label for new Touchdown uses*, Ag Equipment Power Magazine, Settembre 1997, <http://www.agpowermag.com/articles/articles.php?articleid=134> (ultimo accesso Dicembre 2006).
- [23] World Health Organisation (WHO), International Programm on Chemical Safety (IPCS), *Glyphosate and AMPA in Drinking-water*, 1994, http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/glyposampasum.pdf (ultimo accesso Dicembre 2006).
- [24] *Chemical Watch Factsheet: Glyphosate*, Vol 21, n. 1, Marzo 2001, www.beyondpesticides.org/pesticides/factsheets/Glyphosate.pdf (ultimo accesso Dicembre 2006).

- [25] Piccolo A., Celano G., *Hydrogen-bonding interactions between the herbicide glyphosate and water-soluble humic substances*, Environmental Toxicology and Chemistry, 1994, 13 (11), 1737-1741.
- [26] Potts G. R., Vickerman G. P., *Studies of cereal ecosystem*, Advances in Ecological Research, 1994, 8, 107-197.
- [27] Thompson D. G., Pitt D. G., Buscarini T., Staznik B., Thomas D. R., *Initial deposit and persistence of forest herbicide residues in sugar maple foliage*, Canadian Journal Of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere, 1994, 24, 2251-2262.
- [28] Santillo D. J., Brown P. W., Leslie D. M., *Response of songbird to glyphosate-induced habitat changes on clearcuts*, Journal Of Wildlife Management, 1989, 53 (1), 64-71.
- [29] Hori Y., Fujisawa M., Shimada K., Hirose Y., *Determination of the herbicide glyphosate and its metabolite in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. A case of poisoning by Roundup herbicide*, Journal of Analytical Toxicology, 2003, 27, 162-166.
- [30] Yousef M. I., Salem M. H., Ibrahim H. Z., Helmi S., Seehy M. A., Bertheussen K., *Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits*, Journal Of Environmental Science And Health Part B-Pesticides Food Contaminants And Agricultural Wastes, 1995, 30(4) 513-534.
- [31] Garcia de Llasera M. P., Gomez-Almaraz L., Vera-Avila L. E., Pena-Alvarez A., *Matrix solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit*, 2005, 1093, 139-146.
- [32] Bolognesi C., Bonatti S., Degan P., Gallerani E., *Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup*, Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 1997, 45, 1957-1962.
- [33] Winfield T. W., Bashe W. J., Baker T. V., *Determination of Glyphosate in drinking water by Direct-Aqueous-Injection HPLC, Post column derivatization and fluorescence detection*, Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water, Supplement I, US Environmental Protection Agency, Method 547, EP/600/4-90/020, Luglio 1990, 63-80.
- [34] Nedelkoska T. V., Low G. K. C., *High performance liquid chromatographic determination of glyphosate in water and plant material after pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate*, Analytica Chimica Acta, 2004, 511, 145-153.

[35] Sancho J. V., Hernandez F., Lopez F. J., Hogendoorn E. A., Dijkman E., van Zoonen P., *Rapid determination of glufosinate glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and couplet-column liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 1996, 737, 75-83.

[36] Naccari F., *Valutazione del rischio tossicologico da residui negli alimenti di origine animale*, La farmacovigilanza in medicina veterinaria, <http://farmacovigilanza.org/corsi/naccari/corso6.htm> (ultimo accesso Gennaio 2007).

[37] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), *Laws, Regulating Pesticides*, <http://www.epa.gov/pesticides/regulating/laws.htm> (ultimo accesso Marzo 2007).

[38] *I residui di prodotti fitosanitari negli alimenti e il rischio per la popolazione generale*, <http://www.icps.it/italiano/databaseresidui/residui%20web.htm> (ultimo accesso Marzo 2007).

[39] The European Commission, *The status of active substances under EU review (doc. 3010)*, 2004, http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm (ultimo accesso Marzo 2007).

[40] Decisione della Commissione Europea, del 13 Luglio 1995, n. 276, relativa alla revoca di prodotti fitosanitari contenenti ferbam o azinfos etile come sostanze attive, G.U. n. L 170, 20 Luglio 1995, 22-23.

[41] Decisione della Commissione Europea, del 9 Marzo 2000, n. 233, concernente la non iscrizione del pirazofos nell'allegato I della Direttiva 91/414/CEE del Consiglio e la revoca delle autorizzazioni di prodotti fitosanitari contenenti detta sostanza attiva (Testo rilevante ai fini del SEE) [notifica con il numero C (2001) 655], G.U. n. L 073, 22 Marzo 2000, 16-17.

[42] Decisione della Commissione Europea, del 9 Luglio 2001, n. 520, concernente la non iscrizione del paration nell'allegato I della Direttiva 91/414/CEE del Consiglio e la revoca delle autorizzazioni di prodotti fitosanitari contenenti detta sostanza attiva (Testo rilevante ai fini del SEE) [notifica con il numero C (2001) 1772], G.U. n. L 187, 10 Luglio 2001, 47-48.

[43] Reg. (CE) n. 2076/2002 della Commissione Europea, del 20 Novembre 2002, che prolunga il periodo di tempo di cui all'articolo 8, Paragrafo 2, della Direttiva 91/414/CEE del consiglio concernente la non iscrizione di talune sostanze attive nell'allegato I della suddetta Direttiva e la revoca delle autorizzazioni di prodotti fitosanitari contenenti dette sostanze (testo rilevante ai fini del SEE), G.U. n. L 319, 23 Novembre 2002, 3-11.

- [44] Decisione della Commissione Europea, del 25 Marzo 2003, n. 219 concernente la non iscrizione dell'acefate nell'allegato I della Direttiva 91/414/CEE e la revoca dell'autorizzazione di prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva (Testo rilevante ai fini del SEE) [notifica con il numero C(2003) 868], G.U. n. L 082, 29 Marzo 2003, 40-41.
- [45] Reg. (CE) n. 396/2005 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 23 Febbraio 2005, concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la Direttiva 91/414/CEE del Consiglio (rilevante ai fini del SEE), G.U. n. L 70, 16 Marzo 2005, 1-16.
- [46] European Food Safety Authority, *Comunicato stampa: l'EFSA presenta un nuovo lavoro e chiarisce il suo ruolo nella valutazione dei pesticidi*, http://www.efsa.eu.int/press_room/press_release/897_it.html, aggiornato al 22 Aprile 2005 (ultimo accesso Aprile 2006).
- [47] Reg. del Parlamento Europeo e del Consiglio, 28 Gennaio 2002, n. 178/2002, *Principi e requisiti generali della legislazione alimentare*, istituisce l'Autorità Europea per la sicurezza alimentare e fissa le procedure nel campo della sicurezza alimentare, G. U. n. L 031, 1 Gennaio 2002, 1-24.
- [48] Unione Europea, *Sicurezza dei prodotti alimentari: Agenzia europea per la sicurezza alimentare*, 2002, http://europa.eu.int/comm/food/efsa_it.htm (ultimo accesso Febbraio 2007).
- [49] Ministero della Salute, www.ministerosalute.it/ (ultimo accesso 3 Marzo 2007).
- [50] Piano Nazionale Residui 2005, sito ufficiale della regione Veneto, <http://www.regione.veneto.it/Servizi+alla+Persona/Sanita/Prevenzione/Sanit%C3%A0+veterinaria/Piano+Nazionale+Residui.htm> (ultimo accesso 3 Marzo 2007).
- [51] Istituto Superiore di Sanità, *Laboratorio comunitario di riferimento per l'analisi di residui in animali vivi ed in prodotti di origine animale*, <http://www.iss.it/lcdr/> (ultimo accesso 3 Marzo 2007).
- [52] Decisione della Commissione Europea 2002/657/CE relativa al *rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati*, G.U. della Comunità Europea L 221/8, 17 Agosto 2002.
- [53] Pagliuca G., Gazzotti T., Zironi E., Sticca P., *Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*, Journal of Chromatography A, 2005, 1071, 67-70.

- [54] Restek advantage, *Risoluzione di miscele complesse di pesticidi organofosforati*, 2003, 2, 11.
- [55] Schenck F. J., Donoghue D. J., *Determination of organochlorine and organophosphorus pesticide residues in eggs using a solid phase extraction clean up*, Journal of Agricultural Food Chemistry, 2000, 48, 6412-6415.
- [56] Pagliuca G., Serraino A., Gazzotti T., Zironi E., Borsari A., Rosmini R., *Organophosphorus pesticides residues in Italian raw milk*, Journal of Dairy Research, 2006, 73, 1-5.
- [57] Mc Guire M.A., Barman D.E., *Milk biosynthesis and secretion*, in Milk biosynthesis and secretion, Encyclopedia of dairy sciences, Edizioni H Roginski JW Fuquay e PF Fox, London Academic Press, 2003, 3, 1828-1834.
- [58] Ng-Kwai-Hang K.F., *Heterogeneity, fractionation and isolation*, in Milk proteins, Encyclopedia of dairy sciences, Edizioni H Roginski JW Fuquay e PF Fox, London Academic Press, 2003, 3 1881-1894
- [59] Hegan H., *Trace contaminants in milk and dairy products*, Journal of Social Dairy Technology, 1970, 23 (4), 177-184.
- [60] Mallatou H., Pappas C. P., Kondyli E., Albanis T. A., *Pesticide residue in milk and cheeses from Greece*, Science of the Total Environment, 1997, 196 (2), 111-117.
- [61] Baldi M., Bovolenta A., Zanoni L., *Food contamination with chlorinated and phosphoric pesticides- 2 years research (1977-1978) on food produced in Province of Ferrara*, Industrie Alimentari, 1979, 18 (11), 806-810.
- [62] Cressey PJ., Vannoort RW., *Pesticide content of infant formulae and weaning foods available in New Zealand*, Food Additives and Contaminants, 2003, 20 (1), 57-64.
- [63] Gallo P., Castellano V., Serpe L., *Monitoraggio di residui di pesticidi organoclorurati ed organofosforati in alimenti di origine animale: risultati e considerazioni relativi agli anni 1990-1994*, Industrie Alimentari, 1996, 35 (346), 253-257.
- [64] Chemtek, *Glyphosate e glufosinate*, Notiziario, Archivio, 2005, 7.
<http://www.chemtek.it/newsletter/applicazioni/73.htm>
- [65] Vreeken R. J., Speksnijder P., Bobeldijk-Pastorova I., Noij Th. H. M., *Selective analysis of the herbicides glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1998, 187-199.

[66] Hogendoorn E. A., Ossendrijver F. M., Dijkman E., Baumann R. A., *Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection*, Journal of Chromatography A, 1999, 833, 67-73.

[67] Ibanez M., Pozo O. J., Rancho J. V., Lopez F. J., Hernandez F., *Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 2005, 1081, 145-155.

