

UNIVERSITÀ DE GLI STUDI DI CAGLIARI



Scuola di Dottorato in Tossicologia
Tossicologia degli Alimenti e dell'Ambiente
XXII ciclo

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/10

Sostanze Naturali e di Sintesi ad Attività
Antiparassitaria per il Controllo della Mosca
dell' Olivo (*Bactrocera Oleae*)

Coordinatore
Prof .Amedeo Columbano

Candidata
Dott.ssa Saida Ouhtit

Tutor
Prof. Paolo Cabras

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

*Ai miei genitori
A Sara e Ermanno*

Ringraziamenti

Al Professor Paolo Cabras, dott. Pierluigi Caboni, dott. Carlo Tuberoso , e alle mie colleghe:
Francesca Manconi, Sissi Bifulco e Simona Vargiu..

INDICE

Introduzione	1
1. Registrazione dei pesticidi	2
2. Quadro normativo	6
3. Coltura dell'olivo	10
4. Trasformazione delle olive	13
4.1. Olive da mensa	13
4.1.1. Metodo Sivigliano	14
4.1.2. Metodo Greco	16
4.2. Olio d'oliva	18
5. Parassiti animali dell'olivo	20
I. Spinosad	24
I.1. Struttura chimica e proprietà	26
I.2. Tossicità dello Spinosad	28
I.3. Modalità d'azione dello Spinosad	28
II. Determinazione e quantificazione dei residui di Spinosad nelle olive e prodotti di trasformazione	30
II.1. Materiali e metodi	31
II.1.1. Trattamenti in campo	31

II.1.2. I campioni -----	32
II.1.3. I prodotti chimici -----	33
II.1.4. Soluzioni standard -----	33
II.1.5. Metodica di estrazione di Spinosad -----	34
II.1.5.1. Estrazione dalle olive (olive a doppia attitudine e olive da tavola) -----	34
II.1.5.1.a. Estrazione dalla soluzione NaOH -----	34
II.1.5.1.b. Estrazione dalla soluzione NaCl -----	34
II.1.5.2. Estrazione dall'olio d'oliva -----	35
II.1.6. Prove di recupero -----	35
II.2. Analisi-----	35
II.3. Risultati e discussione -----	37
II.3.1. Cromatografia -----	37
II.3.2. Percentuale di recupero di Spinosad -----	38
II.3.3. Selettività analitica -----	38
II.3.4. Limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) -----	39
II.3.5. Il <i>range</i> dinamico ed intervallo di linearità -----	40
II.3.6. Residui e degradazione di Spinosad -----	41
II.3.7. Residuo nelle olive a doppia attitudine -----	42
II.3.8. Degradazione dello Spinosad in Soluzione NaOH al 2% e NaCl al 7% -----	43
II.3.9. Residui di Spinosad nelle olive da Tavola fatte con il metodo Sevigliano e con il metodo Greco -----	44
II.3.10. Ripartizione di Spinosad nel olio di oliva -----	45

III. L'Imidacloprid -----46

III.1. Struttura chimica e proprietà -----	46
III.2. Selettività dell'Imidacloprid -----	49
III.3. Modalità di azione dell'Imidacloprid -----	50
III.4. Tossicità dell'Imidacloprid -----	51

IV. Determinazione e quantificazione dell'Imidacloprid nelle olive e i prodotti di trasformazione -----52

IV.1. Materiali e metodi -----	52
IV.1.1. Trattamenti in campo -----	52
IV.1.2. I campioni -----	53
IV.1.3. I prodotti chimici -----	53
IV.1.4. Soluzioni standard -----	53
IV.1.5. Strumentazione e condizioni LC-MS/MS -----	54
IV.1.6. Metodica di estrazione dell'Imidacloprid -----	55
IV.1.6.1. Estrazione dalle olive -----	55
IV.1.6.3. Estrazione dall'olio d'oliva -----	56
IV.1.6.2. Estrazione dalla soluzione NaOH e NaCl -----	57
IV.1.7. Prove di recupero -----	58
IV.2. Risultati discussione -----	58
IV.2.1. Cromatografia -----	58
IV.2.2. Percentuale di recupero dell'Imidacloprid -----	59
IV.2.3. Selettività analitica -----	59
IV.2.4. Limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) -----	59
IV.2.5. il <i>range</i> dinamico ed intervallo di linearità -----	60

IV.2.6. Residui dell'Imidacloprid nelle olive a doppia attitudine -----	61
IV.2.7. Degradazione dell'Imidacloprid in Soluzione NaOH al 2% e NaCl al 7% -----	62
IV.2.8. Residui dell'Imidacloprid nelle olive da Tavola fatte con il metodo Sevigliano e con il metodo Greco-----	63
IV.2.9. Ripartizione dell'Imidacloprid nel olio di oliva -----	64
IV.2.10. Conclusione -----	65

V. La degradazione dello Spinosad ed Imidacloprid in presenza e non di cere epicuticolari -----67

V.1. Introduzione -----	67
V.2. Anatomia Fogliare -----	68
V.3. Estrazione delle cere dalle olive -----	72
V.4. Silanizzazione vetreria -----	72
V.5. Materiali e metodi -----	74
V.5.1. Prodotti Chimici -----	74
V.5.2. Strumentazione e analisi -----	74
V.5.3. Condizioni cromatografiche -----	74
V.6. Risultati e discussioni -----	75
V.6.1. Tempo di semivita($T_{1/2}$) dello Spinosad in presenza e non di cere epicuticolari -----	75
V.6.2. Tempo di semivita($T_{1/2}$) dell'Imidacloprid in presenza e non di cere epicuticolari -----	76
V.7. Conclusione -----	77

Bibliografia -----78

Introduzione

Fin da quando l'uomo è diventato agricoltore ha avuto la necessità di controllare i parassiti delle colture agrarie. Le sostanze che vengono utilizzate per il controllo dei parassiti vengono comunemente chiamate pesticidi. Questo termine è una traduzione giornalistica del termine inglese *pesticides*, parola composta di *pest* e *cide*. La traduzione corretta in italiano sarebbe dovuta essere antiparassitario.

Il termine pesticida non esiste né a livello tecnico, né legale; in questi ambiti si usa il termine **agrofarmaci** per le sostanze utilizzate in campo agrario e il termine **presidi medico chirurgici** per le stesse sostanze utilizzate in campo civile.

Il primo pesticida organico di sintesi immesso nel mercato fu il DDT (dicloro difenil tricloroetano) nel 1939 dalla Geigy, frutto delle ricerche sistematiche sulla sua attività insetticida ad opera dell'entomologo svizzero Paul Müller. Fino ad allora le sostanze disponibili per combattere i parassiti delle colture agrarie erano molto limitate e quasi tutte di natura inorganica, come lo zolfo (riportato da Omero nel 1000 a.C), l'arsenico

(raccomandato da Plinio nel 50 a.C per uccidere gli insetti) o alcune sostanze naturali ad azione insetticida, come piretro, rotenone e nicotina. Alcuni episodi catastrofici, quali la distruzione del raccolto delle patate ad opera della *Phytophthora infestans* in Irlanda nel 1845, che causò un milione di morti e un milione e mezzo di emigranti, e la distruzione dei vigneti francesi ad opera della fillossera, importata dall'America nel 1878, stimolarono un notevole sviluppo della ricerca della chimica minerale nella protezione delle piante. La scoperta dell'azione fungitossica del rame nel 1882 fu casuale e si deve a Millardet. Questo osservò che i filari di vite lungo le strade, trattati con solfato di rame e calce per scoraggiare i passanti dal raccogliere i grappoli, erano protetti dalla *Plasmopora viticola* e sulla base di questa osservazione preparò la poltiglia bordolese (Bordeaux mixture), miscela di calcio idrossido e rame solfato, con la quale si riuscì a controllare questo patogeno.

Il DDT invece è il risultato di ricerche sistematiche che aprirono una nuova metodologia nella ricerca dei pesticidi. Questo insetticida, prima di essere usato in agricoltura, fu estensivamente usato contro gli insetti vettori di malattie durante e dopo la seconda guerra mondiale. Malattie, come malaria e tifo, furono eradiccate in molte aree in cui erano endemiche. Per questa scoperta, che salvò milioni di persone, nel 1948 a Paul Müller fu assegnato il premio Nobel per la medicina.

Lo spettacolare successo che incontrò il DDT, contro una moltitudine di insetti nocivi sia per l'agricoltura che per la salute umana, stimolò la ricerca di altri prodotti di sintesi ed attualmente sono circa 1300 i composti commercializzati nel mondo come pesticidi (The Pesticide Manual, 1997).

1. Registrazione dei pesticidi

Una Ditta che intende commercializzare in una Nazione un pesticida, prima di immetterlo nel mercato deve richiedere alle autorità competenti la registrazione del prodotto. L'autorità che rilascia l'autorizzazione alla commercializzazione dei pesticidi generalmente è il Ministero dell'Agricoltura, più raramente il Ministero della Sanità ed in qualche nazione un'Agenzia statale come l'EPA negli USA e la BCE in Germania. Per poter registrare il prodotto la Ditta deve presentare una serie di studi che dimostrino come l'uso del pesticida sia efficace contro il parassita bersaglio e non determini effetti nocivi sulla salute dell'uomo e degli animali ed effetti inaccettabili sull'ambiente. La documentazione che ogni Ditta deve presentare è fissata per legge e deve essere condotta secondo i criteri di buona pratica di laboratorio. L'adozione di linee guida e dei principi di buona pratica di laboratorio ha consentito la standardizzazione delle procedure e ha garantito la qualità di dati prodotti. Attualmente le normative dei paesi sviluppati sono molto simili; in ambito europeo la Comunità Europea sta armonizzando le regolamentazioni nazionali in un unico sistema. Anche nei paesi in via di sviluppo sono state emanate leggi simili, ma queste

restano spesso inapplicate per mancanza delle competenze necessarie, inoltre in questi Paesi esiste ancora il commercio di alcuni prodotti banditi nelle Nazioni più ricche. Gli studi che devono essere presentati dalle Ditte possono essere suddivisi in: tossicologici, agronomici ed ambientali.

Gli studi tossicologici comprendono: a) la tossicità acuta, b) la tossicità a breve termine (almeno 90 giorni), c) tossicità a lungo termine (2 anni), d) tossicità sulla riproduzione, e) neurotossicità tardiva. Gli studi vengono effettuati per tutte le possibili forme di contaminazione con la sostanza attiva: assunzione orale, cutanea, inalatoria. Sulla base dei dati tossicologici si determina la dose senza effetto, NOEL (no observed effect level), ovvero la dose alla quale non si osservano effetti tossici negli studi su animali. La NOEL viene estrapolata da studi a lungo termine delle specie più sensibili e simili all'uomo, relativamente agli effetti tossici. Dalla NOEL si ricava l'ADI (acceptable daily intake), dose giornaliera accettabile, dividendolo per un fattore di sicurezza compreso tra 10 e 1000. Generalmente si utilizza il fattore 100. Lo scopo di questo fattore è quello di fornire un margine di sicurezza sufficiente per il consumatore, supponendo che l'essere umano sia 10 volte più sensibile dell'animale da laboratorio e che le differenze di sensibilità all'interno della popolazione umana siano comprese nell'intervallo da 1 a 10. NOEL e ADI si esprimono in mg / Kg di peso corporeo / giorno. Per mantenere nell'alimento la concentrazione del pesticida ai livelli di esposizione dell'ADI, si calcola il Tolerance level (TL) secondo la formula :

$$TL = \frac{ADI}{FDI}$$

FDI = food daily intake (assunzione giornaliera dell'alimento in kg/giorno)

Il TL sarà condizionato dall'assunzione giornaliera dell'alimento per cui varierà in funzione della dieta presente in ogni Paese. Il TL rappresenta il residuo massimo consentito nell'alimento e serve

come base per fissare il MRL legale (residuo massimo). Questo viene deciso sulla base dei residui effettivamente trovati nell'alimento a seguito delle prove di utilizzazione pratica del pesticida in condizioni reali di impiego . Se in queste il residuo riscontrato è minore del TL sarà questo il limite che verrà scelto ai fini legali, se è superiore il prodotto non viene registrato. Pertanto il MRL è la risultante di studi tossicologici e agronomici. Poiché l'entità del residuo presente nell'alimento, a seguito di un corretto uso, è fortemente condizionato dal numero dei trattamenti e dalle condizioni ambientali, l'entità del residuo del pesticida nell'alimento può essere diverso a seconda delle condizioni ambientali della Nazioni in cui si utilizza. Questo spiega il fatto che per lo stesso principio attivo possano essere fissati MRL diversi in diverse nazioni (tab. 1).

Tabella 1. Limite Massimo del Residuo (MRL) di **Azoxystrobin** in differenti Nazioni

Paese	MRL, mg/kg					
	Agrumi	Pesche	Uva	Lattuga	Fragola	Pomodoro
USA	10	1,5	1	30	10	0,2
Brasile	NR	0,5	0,5	1	5	0,5
Cile	15	2	2	3	10	3
Israele	0,3	0,1	0,6	3	10	0,5
UE	15	2	2	3	10	3
Italia	15	2	2	3	10	3
Grecia	15	2	2	3	10	3

NR = non registrato

All'atto della registrazione vengono indicate per ogni principio attivo: coltura per la quale è autorizzato, la dose di utilizzo, l'intervallo di sicurezza (giorni che devono intercorrere tra l'ultimo trattamento e la raccolta), il MRL e la classe tossicologica. Quando un pesticida non è autorizzato su una coltura il residuo deve essere inferiore a 0.01 mg/kg, che rappresenta lo zero legale. Questo limite è anche fissato per le produzioni alimentari per l'infanzia.

Come si può osservare dall'esempio riportato in tabella 1 ci sono differenze tra il MRL più e più alto per la stessa coltura anche di un fattore 50. Questo sta ad indicare come spesso i MRL siano lontani dal TL, per cui il superamento del MRL non significa rischio per l'uomo, ma semplicemente non rispetto delle condizioni di utilizzo previste ed indicate nell'etichetta del prodotto : colture ammesse, dose, intervallo di sicurezza. Il rispetto di queste pratiche è noto come buona pratica agricola.

Per indicare il livello di pericolo per l'utilizzatore i pesticidi sono stati suddivisi in base alla tossicità acuta. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)) ha utilizzato una ripartizione molto articolata con suddivisione dei principi attivi in quattro classi (tab. 2), mentre l'Unione Europea (UE) ha utilizzato una suddivisione più semplice riferita ai formulati (tab.3)

Tabella 2. Classificazione di tossicità secondo l'OMS

	Classe	LD ₅₀ su ratto (mg/kg p.c.)			
		orale		Dermale	
		solidi	liquidi	solidi	liquidi
Molto tossico	Ia	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
tossico	Ib	5-50	20-200	10-100	40-400
Moderatamente tossico	II	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Poco tossico	III	≥ 501	≥ 2001	≥ 1001	≥ 4001

Tabella 3. Classificazione di tossicità secondo l'UE

	LD ₅₀ orale su ratto (mg/kg p.c.)	
	Liquidi	solidi
Molto tossico	≤ 25	≤ 5
tossico	25-200	5-50
nocivo	200-2000	50-500

Il TL, e di conseguenza l'ADI e il MRL, non sono immutabili, ma possono essere modificati sulla base di ulteriori dati disponibili sia di ordine tossicologico che di livello di residui.

In passato la registrazione aveva una durata illimitata; recentemente si è deciso di limitare la durata della registrazione nel tempo (10 anni in EU) e alla scadenza ogni molecola dovrà essere rivalutata fornendo studi tossicologici ed ambientali aggiornati. Questo nuovo indirizzo, nel limitare il tempo di validità delle registrazioni, determinerà un'uscita dal mercato di numerosi pesticidi, soprattutto di quelli più tossici ed a maggior impatto ambientale. Nell'UE a partire dal 2005 sono stati sottoposti a revisione moltissimi principi attivi.

2. Quadro normativo

Nell'Unione europea (UE), a partire dal 1 settembre 2008, nella materia dei residui di antiparassitari, è stato applicato un nuovo quadro normativo del Parlamento Europeo: Reg(CE) n. 396/2005. Il presente regolamento completa l'armonizzazione e la semplificazione delle quantità massime di residui di antiparassitari, assicurando nel contempo una migliore tutela dei consumatori in tutta l'UE. Con le nuove norme, gli LMR sono sottoposti a una valutazione

comune dell'UE per assicurarsi che tutte le classi di consumatori, compresi quelli più vulnerabili, come neonati e bambini, sono sufficientemente protette (396/2005/EEC).

Fino al primo settembre 2008, la normativa di riferimento in materia di residui di antiparassitari era una responsabilità condivisa della Commissione Europea e degli Stati membri. Dal 1976, oltre 45.000 LMR comunitari sono stati fissati per diversi prodotti per 245 antiparassitari nei cereali (direttiva 86/362/CEE), prodotti alimentari di origine animale (direttiva 86/363/CEE), frutta e verdura e altri prodotti vegetali (direttiva direttiva 76/895/CEE e 90/642/CEE). Per le decine di migliaia di combinazioni pesticida /prodotto per le quali non esistevano livelli LMR comunitari, gli Stati membri potevano fissare a livello nazionale dei livelli LMR per agevolare gli scambi e per tutelare la salute dei propri consumatori.

Tuttavia, la sicurezza dei consumatori in un paese non significa necessariamente che tutti i consumatori della UE siano tutelati, perché i modelli di consumo alimentare differiscono da uno Stato membro all'altro. Oggi gli alimenti e i mangimi circolano liberamente nel mercato interno dell'UE, e quindi è indispensabile assicurare che tutti i consumatori dell'UE siano ugualmente protetti dall'esposizione a livelli inaccettabili di pesticidi negli alimenti.

Regolamento (CE) 91/414

La valutazione, la commercializzazione e l'uso dei pesticidi (erbicidi, insetticidi, fungicidi, ecc) per la protezione delle piante all'interno della Comunità Europea, sono disciplinati dalla direttiva 91/414/CEE del Consiglio. La presente direttiva stabilisce una valutazione globale del rischio e una procedura di autorizzazione per le sostanze attive e i prodotti contenenti tali sostanze. Ciascuna sostanza attiva deve dimostrare una sicurezza in termini di salute umana, compresi i residui nella catena alimentare, salute degli animali e dell'ambiente, al fine di poter essere commercializzata.

Il primo passo nel processo di valutazione coinvolge un Stato membro relatore, che trasmette le sue conclusioni preliminari sulla sostanza all'**Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA)**. Una valutazione scientifica del rischio che coinvolge l'EFSA viene poi fatta, seguita da fasi di gestione dei rischi effettuata dalla Commissione con l'assistenza degli Stati membri nell'ambito del Comitato Permanente per la catena alimentare e la salute degli animali. Se la valutazione dimostra che la sostanza non ha effetti nocivi sulla salute umana o animale e che non ha nessun influsso inaccettabile sull'ambiente, la sostanza può essere approvata. La CE ha stabilito un elenco delle sostanze attive approvate (allegato I della Direttiva 91/414/CEE), e gli Stati membri possono autorizzare soltanto i prodotti fitosanitari contenenti sostanze attive incluse in questo elenco.

Il Regolamento (CE) n. 396/2005

Il Regolamento (CE) n. 396/2005 prevede una piena armonizzazione di tutti i livelli LMR degli antiparassitari e sostituisce la precedente normativa in materia di LMR. Sulla base di questa legislazione, la Commissione Europea sta portando avanti un programma alimentare standard che punta a realizzare l'armonizzazione dei pesticidi esistenti sul mercato, che potrebbero essere potenzialmente presenti come residui negli alimenti.

La Commissione Europea ha creato un elenco degli LMR nazionali relativi alle sostanze non armonizzate a livello della stessa. Come molti di questi pesticidi, con la revisione delle sostanze attive, sono stati eliminati, e quindi non sono più utilizzati in agricoltura sia all'interno che all'esterno dell'UE, la Commissione ha ritenuto opportuno fissare gli LMR di questi composti o al livello più basso possibile. perciò circa 660 pesticidi obsoleti avranno come livello LMR il limite di quantificazione (LOQ), che è il livello più basso che i laboratori di sorveglianza possono ottenere in analisi di monitoraggio.

Per i rimanenti circa 240 composti, che sono ancora in uso sia all'interno che all'esterno dell'UE, gli Stati membri hanno istituito degli specifici LMR nazionali. Questi sono stati oggetto del programma di armonizzazione a livello europeo, che in prima istanza comprende la definizione di LMR temporanei a livello europeo per tali sostanze. Gli LMR temporanei saranno soggetti a una valutazione scientifica dettagliata, che conduce alla creazione di finale di LMR comunitari a seguito di una valutazione complessiva delle sostanze attive.

Dal primo settembre 2008, il Regolamento (CE) 396/2005 del Parlamento Europeo e del Consiglio relativo ai livelli massimi di residui (LMR) di antiparassitari nei prodotti di origine vegetale e animale, definisce una serie di norme pienamente armonizzate per i residui di antiparassitari. Il presente regolamento semplifica la legislazione esistente, armonizzando i livelli LMR rendendole direttamente applicabili.

Il Regolamento (CE) 396/2005 è costituito dal testo principale, dove sono presenti le definizioni e l'ambito di applicazione delle sostanze attive, e di quattro allegati tecnici per specificarne i livelli massimi di residui (LMR), ed i prodotti a cui si applicano.

L'allegato I è l'elenco dei prodotti a cui si applicano i livelli LMR definiti, è stato istituito dal Regolamento (CE.178/2006). Esso contiene 315 prodotti, tra cui frutta, verdura, spezie, cereali, prodotti di origine animale .

L'allegato II, è la lista dei LMR dell'UE definitiva, questa ultima, consolida la legislazione comunitaria in vigore prima del 1 ° settembre 2008, e specifica quantità massime di residui per 245 pesticidi.

L'allegato III, è la lista dei LMR cosiddetta temporanea dell'UE. E' il risultato del processo di armonizzazione in quanto elenca antiparassitari per i quali, anteriormente al primo settembre 2008, gli LMR erano stati fissati solo a livello nazionale.

L'allegato IV è la lista degli antiparassitari per i quali non sono necessari limiti (LMR) a causa del loro basso rischio.

Allegato V conterrà l'elenco di antiparassitari per i quali sarà stabilito un limite predefinito diverso da 0,01 mg/kg.

L'allegato VI conterrà l'elenco dei fattori di conversione degli LMR per prodotti trasformati. L'allegato non è stato ancora pubblicato.

L'allegato VII contiene un elenco di pesticidi utilizzati come fumiganti per i quali è consentito agli Stati membri di applicare deroghe speciali prima che i prodotti siano immessi sul mercato.

A tutti i principi attivi non inclusi negli allegati sopra elencati, viene applicato un livello LMR predefinito di 0.01 mg/Kg. Come indicato nell'articolo 18(1b) del Regolamento CE 396/2005.

3. Coltura dell'olivo

“L'olivo, pianta millenaria del paesaggio agricolo Mediterraneo, è stato sempre apprezzato per i suoi frutti e per l'olio che da essi si ricava per semplice pressione. Simbolo di pace e longevità, l'olivo inizia il suo percorso di specie coltivata nella regione compresa tra i rilievi a sud del Caucaso e ad ovest dell'altopiano iraniano, dove, circa 6.000 anni fa, alla sua coltivazione si dedicarono i popoli semitico-camiti. L'abbondanza dei reperti e le testimonianze degli antichi ci parlano dunque della storia millenaria dell'*Olea europaea sativa* che, dall'Oriente, presto raggiunse quello che Braudel chiamò, non a caso, il “mare degli oliveti”, il Mediterraneo, giungendo prima in Grecia, quindi sulle coste africane e, infine, nella penisola iberica e italiana. A partire dall'VIII secolo a.C., con la colonizzazione greca dell'Italia meridionale, la coltivazione

dell'olivo venne introdotta in quella che verrà chiamata la Magna Grecia. Si narra che Romolo e Remo, discendenti degli Dei e fondatori di Roma, videro la luce sotto i rami di un olivo, anche se a dar retta a Fenestrella, storico annalista citato da Plinio nella *Naturalis historia*, sembrerebbe che fin no al VI secolo a.C., nella città eterna, la coltivazione dell'olivo fosse ancora sconosciuta. In questo affascinante e lungo viaggio la storia e il mito dell'olivo e dell'olio si intrecciano ripetutamente e se per il popolo ebraico fu Dio a donare ad Adamo, ormai prossimo alla morte, i tre semi che il figlio Seth pose tra le sue labbra prima di seppellirlo e dai quali germogliarono il cedro, il cipresso e l'olivo, è alla Dea Iside, moglie di Osiride, che gli antichi egizi rendevano omaggio per aver dato loro la capacità di coltivare il sacro albero. È l'olio il prodotto principe dell'olivo, *ab initio* apprezzato per il suo legno. L'olio, fonte di luce e alimento con elevata conversione energetica, elemento simbolico delle grandi religioni monoteiste, unguento prezioso degli atleti olimpici. L'olio, al centro della dieta mediterranea cui si riconosce da ogni parte il primato alimentare per la salute umana, è la ragione della straordinaria espansione che la coltivazione dell'olivo sta vivendo in tutti i continenti. L'olivicoltura italiana, giunta a noi nel terzo millennio come un modello di agricoltura multiproductiva, vive una fase di transizione destinata a cambiare la fisionomia del paesaggio olivicolo italiano. Se non della stessa economia agricola del nostro Paese. Da un lato, i sistemi tradizionali, del cui ruolo storico, sociale e paesaggistico è difficile fare a meno, dall'altra l'urgenza per una nuova olivicoltura che dovrà essere capace di creare nuovi legami tra qualità, economicità ed eccellenza alimentare, disegnando un nuovo modello olivicolo italiano, competitivo nel mondo.

Si stima che il patrimonio olivicolo mondiale racchiuda più di 2000 cultivar, solo in Italia si contano più di 600 varietà. L'ambiente, l'evoluzione dei sistemi culturali, il mutare delle esigenze agronomiche e delle consuetudini alimentari hanno determinato la selezione delle cultivar attuali.

Il frutto dell'albero dell'olivo (*Olea europaea*) è una drupa carnosa la cui dimensione, forma, colore e contenuto di olio dipendono dal tipo di cultivar. La destinazione dei frutti è differente a seconda della loro attitudine a essere trasformati in olio e/o a essere consumati a tavola come olive da mensa verdi, cangianti o nere. Le olive da tavola e l'olio di oliva hanno sempre occupato un posto importante nell'alimentazione tradizionale in tutte le zone rurali del bacino del Mediterraneo. Il primo riferimento scritto sulle diverse tipologie di olive da tavola è attribuito a Columella in un suo libro intitolato *De re rustica* scritto nel 42 a.C. Attualmente la produzione mondiale di olive da mensa è di circa 1.000.000 di tonnellate annue (pari al 3,5% della produzione olivicola), di cui il 40% viene prodotto in Europa. L'Italia produce poco meno del 10% della produzione internazionale. Negli ultimi anni l'interesse del mondo scientifico per le olive, così come per l'olio extravergine di oliva, è notevolmente aumentato, soprattutto per la presenza di composti minori, i cosiddetti *phytochemicals*, che svolgono importanti attività all'interno dell'organismo umano e contribuiscono a salvaguardare la salute delle popolazioni che consumano abitualmente questi prodotti. Dall'interazione delle sostanze fenoliche con altri componenti alimentari (per esempio gli zuccheri, le proteine, la fibra) dipende il loro assorbimento e il tempo di permanenza nel plasma. In ogni caso la porzione di fenoli che non viene assorbita arriva al grande intestino dove viene metabolizzata dalla flora batterica intestinale. In questa sede i composti fenolici semplici possono essere riassorbiti e arrivare alla circolazione sanguigna, oppure essere trasformati in altre molecole dal metabolismo batterico. In entrambe i casi continuano a esercitare la loro funzione proteggendo la mucosa intestinale dallo stress ossidativo e dall'azione di molecole cancerogene.”(R. Angelini et al, *L'ulivo e l'olio*, Coltura & Cultura, Bayer CropScience- Milano, 2009).

4. Trasformazione delle olive

Nel corso dei secoli sono state selezionate una serie di *cultivar*, alcune delle quali presentavano delle drupe più idonee alla trasformazione in olive da tavola, altre alla trasformazione in olio d'oliva.

4.1. Olive da mensa

“La produzione mondiale di olive da mensa, pari oggi a circa il 15% del totale delle produzioni olivicole, ha fatto registrare negli anni una tendenza all'aumento, passando da una media annuale di 746.000 t del periodo 1980/85 alle 969.000 t del 1990/95, quindi a 1.603.000 t del periodo 2000/05. Negli ultimi anni (2004/05-2006/07) la produzione si è assestata su valori di circa 1.800.000 t per anno. Parallelamente si è assistito a un aumento dei consumi mondiali che si localizzano per il 29% circa a livello dei Paesi Ue e per il 12% negli USA. I Paesi dell'Ue detengono il 44% della produzione mondiale e, tra questi, l'Italia mantiene la posizione di terzo Paese produttore dopo Spagna e Grecia. La quota di mercato detenuta dall'Italia è passata da circa il 10% del periodo 1980/85 all'attuale 3-4% della produzione totale, segnando dunque un regresso almeno in termini di peso relativo.”Le olive appena raccolte non sono commestibili, per la presenza di glucosidi di natura polifenolica, che conferiscono alla polpa il caratteristico gusto amaro. In seguito a questa ultima proprietà, ai fini della messa in commercio di alimenti appetibili, risulta indispensabile sottoporre le olive a processi di rimozione dei polifenoli responsabili dell'amaro del frutto (Servili et al., 2006). Tutti i tessuti dell'olivo sono ricchi di polifenoli, soprattutto la polpa dell'oliva in cui essi sono responsabili del sapore amaro e aspro. Il polifenolo più importante è l'oleuropeina; è una sostanza che si trova esclusivamente nella drupa ed in altri tessuti dell'olivo, ma in nessun altro frutto del regno vegetale.

Esistono numerose tecniche di produzione delle olive da tavola, ma fondamentalmente sono riconducibili a due metodi: metodo Sivigliano e quello Greco, **Figura 1**



Figura.1. processo di produzione delle olive da tavola con il metodo Greco e Sivigliano

4.1.1. Metodo Sivigliano

Questo metodo di trasformazione è quello più diffuso per la produzione di olive con pigmentazione verde-giallo paglierino. Esso consiste essenzialmente in una fase di deamarizzazione del frutto mediante una soluzione alcalina (NaOH) la cui concentrazione può variare dall' 1.5 al 3%. La concentrazione di soda, il periodo d'immersione delle olive nella soluzione alcalina è il grado di penetrazione raggiunto dipendono dalla varietà, dallo stato di maturazione e dal calibro del frutto. Il trattamento di norma viene interrotto quando la soda è penetrata per i 2/3 dello spessore della polpa. Ciò avviene nel giro di alcune ore. In questo metodo la deamarizzazione è un processo chimico che consiste nella degradazione dell'

oleuropeina mediante idrolisi alcalina. **Figura 2.** I prodotti ottenuti sono: glucosio , acido elenolico e idrossitirosolo, tutti composti non amari. Questo trattamento comporta anche la rimozione dell'effetto antimicrobico dell' oleuropeina, e nell'incremento della permeabilità della cuticola con rilascio di nutrienti. Per allontanare la soda che residua nel frutto, viene eseguita una serie di lavaggi con acqua per 3 o 4 giorni, fino ad ottenere un'acqua quasi limpida. I lavaggi eliminano non solo i composti fenolici, ma anche i carboidrati essenziali per la crescita dei microrganismi. Dopo i lavaggi, le olive vengono poste in salamoia (8-10%) dove si svolgerà l'intero processo fermentativo spontaneo. Nella prima fase il processo di fermentazione dura in genere 2-3 giorni, il pH della salamoia scende da valori alcalini fino a pH intorno a 6 per azione dei batteri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Nella seconda fase che dura 10-15 giorni, si sviluppano lieviti e batteri che utilizzando i carboidrati fermentescibili residui, determinano un'abbassamento del pH a circa 4.5 per la produzione soprattutto di acido lattico. Nella terza fase che dura fino a due mesi, abbiamo l'esaurimento dei composti fermentescibili e un ulteriore abbassamento del pH a circa 3,8-4.

Le olive così prodotte, presentano un colore verde tendente al giallo paglierino , un gusto decisamente acidulo e possono essere conservate in salamoia e immesse in commercio.

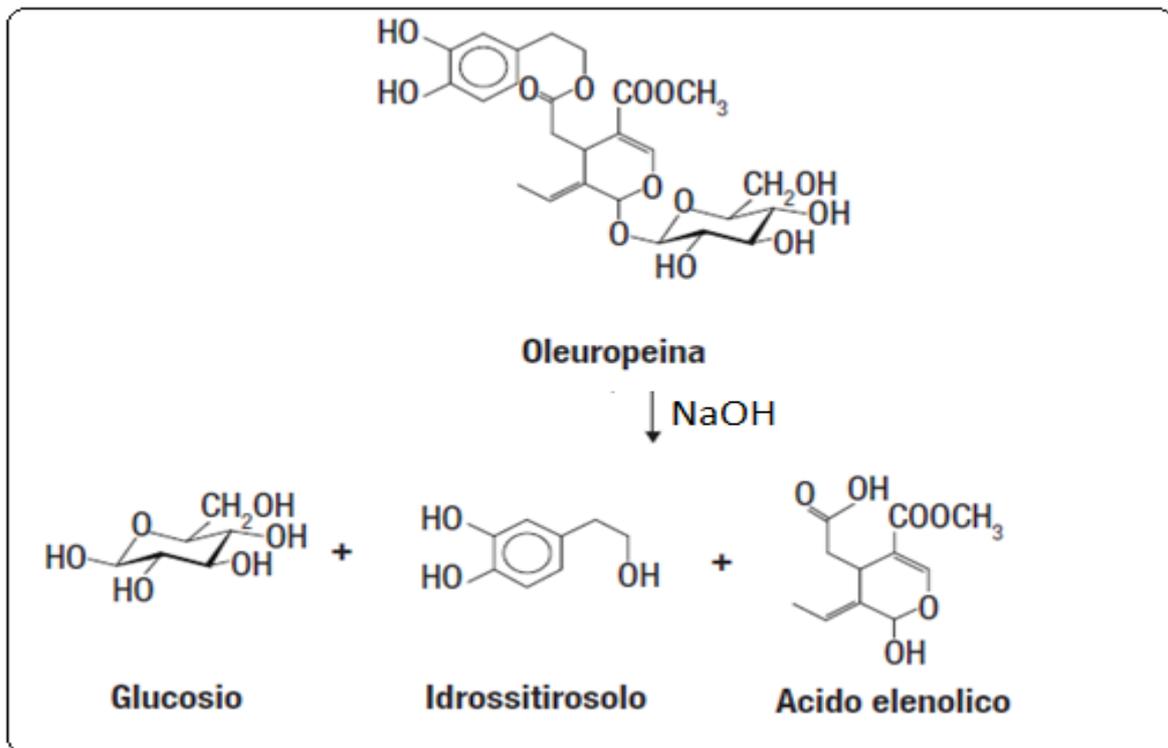


Figura 2. La deamarizzazione chimica dell'oliva

4.1.2. Metodo Greco

Con questo metodo la deamarizzazione avviene in modo naturale o biologico e pertanto viene definito anche naturale. Le olive vengono raccolte al completo stato di maturazione o quando il mesocarpo ha raggiunto per i 3/4 la colorazione nera. Esso non comporta trattamenti di tipo chimico, per cui il processo di deamarizzazione avviene con la semplice immersione dei frutti in salamoia (6-10%). Essendo il processo completamente biologico è più lungo (8-9 mesi) rispetto al precedente poiché il rilascio delle sostanze fermentescibili attraverso la cuticola è sensibilmente più lento. Il processo fermentativo avviene con una complessa microflora di batteri e lieviti. Nella prima fase della fermentazione (3-4 giorni) si sviluppano batteri Gram negativi della famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Questi scompaiono entro 10-15 giorni in seguito alla diminuzione dell'pH dovuta allo sviluppo dei batteri lattici in particolare *Lactobacillus plantarum*. Durante il processo fermentativo si

sviluppano anche lieviti che raggiungono la massima densità in 10-25 giorni, insieme con i batteri lattici. Punto centrale di queste trasformazioni biologiche si estrinseca in due fasi): (1) scissione dell'oleuropeina grazie all'attività β -glucosidasi; (2) scissione del legame estereo dell'aglicone e formazione di idrossitirosolo e acido elenico per effetto dell'attività esterasica (**Figura 3**).

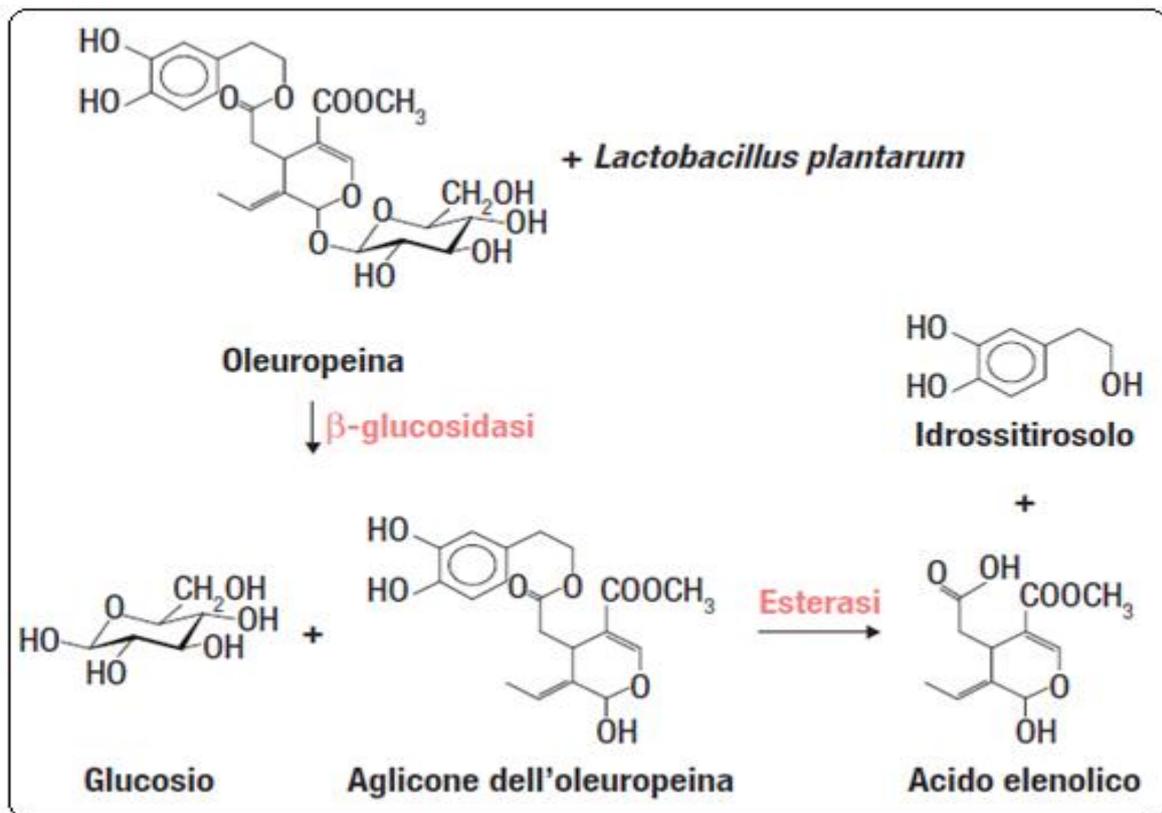


Figura 3. La deamarizzazione biologica della Drupa dell'olivo

4.2. Olio d'oliva

L'olio risulta presente sia nella polpa (16.5-23.5% del peso del fresco), sia nella mandorla della drupa (1-1.5% del peso del fresco). L'olio della polpa è più facilmente estraibile rispetto a quello contenuto nel seme. Questo significa che per ottenere un litro di olio sono necessari mediamente dai 4 ai 6 kg di olive.

L'olio vergine d'oliva si ottiene unicamente per estrazione meccanica, e può essere consumato direttamente senza ulteriori trattamenti. Per ottenere un olio di massima qualità, è consigliato evitare la conservazione delle olive, e di sottoporle alla frangitura al massimo nelle ventiquattro ore successive alla raccolta. Nelle operazioni di oleificazione sono ammessi solo processi meccanici e fisici atti a mantenere la qualità del prodotto. Il processo tecnologico di trasformazione in olio consiste in diverse operazioni: defogliatura e lavaggio delle olive, frangitura, gramolatura, estrazione dell'olio.

- ✓ Defogliatura e lavaggio delle olive. è un'operazione indispensabile specialmente quando la raccolta viene effettuata meccanicamente. La presenza di foglie possono influire negativamente sul gusto e l'aroma dell'olio.
- ✓ Frangitura. Questa operazione rappresenta la fase critica per la qualità dell'olio in quanto con la rottura del frutto sia l'attivazione del suo patrimonio enzimatico che catalizza una serie di reazioni che incidono notevolmente sulle caratteristiche organolettiche e salutistiche dell'olio vergine di oliva. Esistono due tipi di frangitura: una discontinua (molazze) e continua (frangitore a martelli).
- ✓ Gramolatura. Anche questa operazione rappresenta un punto critico del processo d'estrazione dell'olio. Il mescolamento della massa delle olive ottenuta dal frangitore provoca la rottura dell'emulsione acqua/olio consentendo alle goccioline oleose di riunirsi in gocce più grosse che si separano facilmente dalla fase acquosa. Durante

questo processo si verificano forti modificazioni della composizione dell'olio soprattutto a carico dei composti fenolici e volatili.

- ✓ Estrazione dell'olio. Esistono diverse tecniche per separare l'olio dalle paste gramolate. Il sistema tradizionale è basato sull'*estrazione per pressione*. In questo modo si ottiene un mosto oleoso che va sotto posto a centrifugazione, questo processo in linea teorica è quello che rispetta maggiormente la qualità dell'olio. Un'altra tecnica è basata sull'*estrazione per centrifugazione*. In questo caso si ricorre a decanter che consentono di separare in un'unica operazione acqua di vegetazione e olio.

5. Parassiti animali dell'olivo

“L'oliveto è un agroecosistema caratterizzato da una buona stabilità, in cui non si riscontrano introduzioni di nuovi fitofagi esotici e dove la maggioranza delle specie potenzialmente dannose raramente raggiunge densità preoccupanti. Delle circa 50 specie di insetti e acari più frequenti, solo la mosca delle olive, *Bactrocera oleae*, la tignola dell'olivo, *Prays oleae*, e la cocciniglia nera, *Saissetia oleae*, rappresentano una costante minaccia alle produzioni olivicole. Alcuni fitofagi secondari, come il rodilegno giallo, *Zeuzera pyrina*, cocciniglie e scolitidi, possono causare danni in particolari situazioni. I giovani impianti possono essere attaccati dalla tignola verde dell'olivo, *Palpita unionalis*, e dall'oziorrinco, *Otiorrhynchus cribricollis*. Tutti gli altri insetti e acari sono invece normalmente ben controllati da un notevole numero di predatori (Antocoridi, Crisopidi, Coccinellidi, formiche e ragni) e da un complesso di 300-400 specie di Imenotteri parassitoidi. La maggior parte delle cultivar italiane, inoltre, ben si adatta alle diverse condizioni pedoclimatiche ed è dotata di una grande tolleranza e in qualche caso di resistenza ai principali insetti dannosi.” (R. Angelini et al, L'ulivo e l'olio, Coltura & Cultura, Bayer CropScience- Milano, 2009, pg 454).

Il principale parassita dell'olivo è rappresentato dalla mosca dell'olivo.

La mosca delle olive (*Bactrocera oleae*); è un dittero appartenente alla famiglia dei *Tephritidae* **infeudato** alle specie del genere *Bactrocera oleae* (Drew), descritta da Gmelin nel 1788 come *Musca oleae* ed è stata conosciuta fino a poco tempo come *Dacus oleae* (Gmelin). Nel 1989 Drew divide la maggior parte delle specie della tribù Dacini in due generi: *Bactrocera* Macquart e *Dacus* Fabricius basandosi sulle caratteristiche dei tergite addominali di ciascun gruppo, distinzione giustificata anche dalla differente biologia e distribuzione geografica.

Di conseguenza Drew, colloca la mosca nel genere *Bactrocera* (sottogenere *Polistomimetes Enderlein*).

Bactrocera oleae è l'unico Dacino dell'areale Mediterraneo strettamente legato all'olivo (*Olea europea* L.) sia coltivato sia selvatico, nei frutti del quale si sviluppano le stadi giovanili. La specie è diffusa in tutta la regione Mediterranea, Isole Canarie, Pakistan, Caucaso, Egitto, Eritrea e Sud Africa. Nelle altre regioni del mondo dove l'olivo è una coltura di recente introduzione come ad esempio negli Stati Uniti, America del Sud, Cina e Australia, la specie non è presente(1).

Il ciclo biologico di tale parassita, ha inizio con la deposizione di un uovo all'interno dell'oliva, da cui ha origine una larva che scava una galleria nella polpa fino a impuparsi all'interno dell'oliva stessa o nel terreno nel caso sia già avvenuta l'invasione del frutto. Il ciclo generazionale è chiaramente funzione sia dei parametri meteorologici sia delle condizioni del frutto e varia da circa 40 giorni d'estate fino a 4 mesi d'inverno e lo svernamento avviene principalmente nel terreno allo stadio di pupa. (**Figura 4**).



Mosca dell'olivo



Olive vermate



Pupario di *Bactrocera oleae*



Larva matura di *Bactrocera oleae*

Figura 4, Immagini della mosca dell'olivo nelle diverse fasi di sviluppo

La difesa dagli attacchi degli insetti nocivi è attualmente basata sulla lotta chimica, anche se l'impiego di insetticidi è molto limitato e non ha raggiunto livelli paragonabili a quelli delle altre colture arboree.

La revisione dei pesticidi da parte della Comunità Europea ha limitato fortemente il numero dei principi attivi con attività insetticida, da qui la necessità di incrementare il numero di sostanze idonei al controllo di questi parassiti (Tabella 4).

Tabella 4. Insetticidi attualmente registrati per le olive da olio(OO) e da tavola (OT).

Sostanza attiva	Bio	Gruppo chimico	Intervallo di sicurezza(gg)	MRL (mg/Kg)		Revisione EU
				OT	OO	
Azadiractina		Sost.naturale	3	0.5	0.5	
Clorpirifos		Fosfororganico	90	0.05*	0.05*	
Deltametrina		Piretroidi	3	1.00	1.00	
Dimetoato		Fosfororganico	28	2.00	2.00	
Fenoxicarb		Carbamato	60	1.00	1.00	
Fosmet		Fosfororganico	30	10	2.00	
Imidacloprid		Neonicotinoide	28	0.5	1.00	
Piretrine		Sost.naturale	2	1.00	1.00	
Spinosad		Sost.naturale	7	0.02*	0.02*	

* = LOQ;  = Autorizzato per il Bio  = in scadenza  = Revisionato

I. Spinosad

Durante gli anni 50, alcune società chimiche, tra le quale la Dow AgroSciences (allora Dow Chemical Company e la Eli Lilly) iniziarono alcuni programmi di ricerca con l'obiettivo di valorizzare le sostanze naturali dotate di potere antiparassitario. La ricerca fu sostenuta da una buona dose di fortuna poiché, nel 1982, in una distilleria di rum abbandonata dei Caraibi, furono raccolti alcuni campioni di terreno che contenevano un organismo in grado di produrre metaboliti di fermentazione dotati di notevole attività insetticida. Si trattava di una nuova specie di batterio Actinomicete che venne battezzato con il nome di *Saccharopolyspora spinosa*. I due metaboliti più attivi di *S. spinosa*, la Spinosina A e la Spinosina D, costituiscono infatti la miscela denominata "*Spinosad*".

Il nome "Spinos-a-d" deriva appunto dalla specie "*spinosa*" dell'organismo che lo produce, aggiunto a quello delle due *spinosine* "A" e "D".

Lo Spinosad (**Figura.5**) è quindi un biopesticida, ottenuto attraverso la fermentazione aerobica del batterio del suolo *Saccharopolyspora spinosa* (2). E' il primo principio attivo proposto per una nuova classe di agenti di controllo degli insetti denominati, negli Stati Uniti, "Naturalyte". Il termine "Naturalyte" deriva da una semplificazione di "Natural-metabolyte" e si riferisce ai metaboliti prodotti durante il processo naturale di fermentazione innescato di *S. spinosa*. Esso esibisce diversi vantaggi rispetto ai pesticidi di sintesi mostrando una scarsa tossicità verso gli organismi non bersaglio, tendenza a degradarsi facilmente, e con una ottima compatibilità con i programmi di gestione integrata delle specie nocive (IPM) (3).

In condizioni ottimali di crescita il batterio *Saccharopolyspora spinosa* produce una serie di metaboliti biologicamente attive chiamate Spinosine (4). Attraverso tale fermentazione il batterio produce circa 24 Spinosine con una percentuale del 90%, mentre il 10 % restante è costituito da materiale residuo proveniente dal brodo di fermentazione.

Tra tutte le Spinosine prodotte dal batterio *Saccharopolyspora Spinosa*, la Spinosina A e D rivestono il maggiore interesse tossicologico, in quanto queste ultime hanno mostrato attività antiparassitaria nei confronti di diverse classi d'insetti. Sono due molecole strutturalmente simili, la Spinosyn D ha un gruppo metilico in più della Spinosyn A **Fig 5** . Lo Spinosad è formato da cristalli bianchi, con un odore terroso, consiste nella miscela di Spinosina A al 85% e la Spinosina D al 15%(5).

Nel corso degli anni successivi, lo sviluppo del prodotto è avvenuto attraverso una serie di prove condotte su vasta scala, realizzate in varie parti del mondo, su un notevole numero di colture e contro un gran numero di parassiti.

Questo nuovo principio attivo di origine naturale ad attività antiparassitaria ha avuto un cammino registrativo particolarmente favorevole. Nel 1995, in base alla sua alla sua limitata tossicità nei confronti dei mammiferi, dei pesci, degli organismi selvatici e nei confronti degli insetti utili, nonché alla sua compatibilità con i programmi di lotta integrata IPM, Spinosad ha ottenuto il riconoscimento da parte dell'EPA Americana (Environmental Protection Agency) di "prodotto a rischio ridotto". Tale classificazione ha accordato un percorso di registrazione preferenziale ed estensione di etichetta più veloci.

Sulla base delle sue caratteristiche insetticide altamente specifiche e sulla sua compatibilità con gli aspetti ambientali, Spinosad ha ottenuto anche il riconoscimento prestigioso del "Presidential Green Chemistry Challenge Award".

Durante gli anni successivi, i formulati a base di Spinosad furono approvati e lanciati in diversi mercati e su diverse colture, fino ad arrivare alla sua introduzione nelle specifiche liste di prodotti per l'agricoltura biologica.

È stato registrato nell' 2007, attualmente i formulati a base di Spinosad vengono impiegati su oltre 150 colture in diversi paesi (6).

Inoltre, dal 2008 Con il Regolamento 404/2008 la Commissione Europea ha ammesso Spinosad e quindi tutti i formulati a base di Spinosad, nell'Allegato IIB del Regolamento 2092/91 relativo ai principi attivi ammessi in Agricoltura Biologica, fissando un livello di residuo massimo ammissibile nelle derrate alimentari (MRL) che va dal 0.02 fino a 10 mg/kg e con un intervallo di sicurezza (PHI) che va dai 3 a 7 giorni per i diverse tipi di coltura.

I.1. Struttura chimica e proprietà

Chimicamente le Spinosine sono lattoni macrociclici con due molecole di zuccheri posizionate una sull'anello lattonico mentre l'altra sul il complesso dei tre anelli **Fig 5**

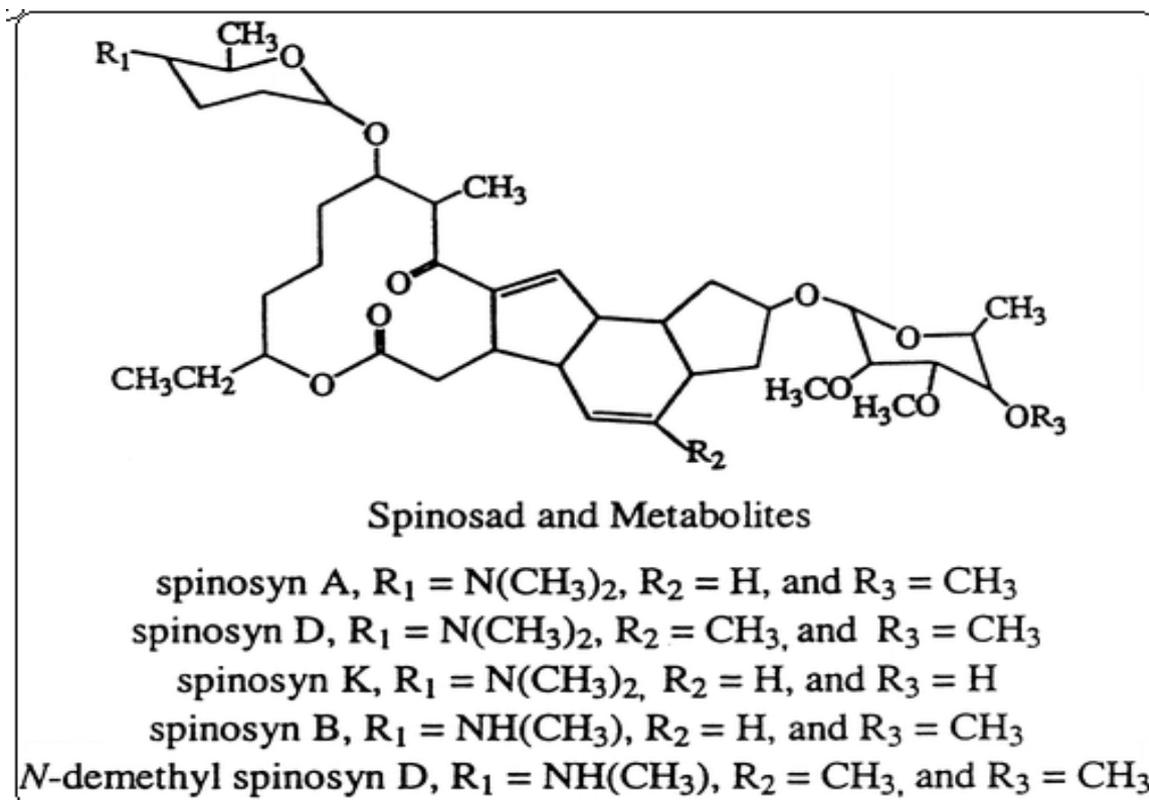


Figura 5. Struttura chimica delle diverse Spinosi

Tabella.5 Proprietà chimico fisiche delle Spinosine A e D

Proprietà chimico fisiche	Spinosina A	Spinosina D
Nome IUPAC	(2R,3aS,5aR,5bS,9S,13S,14R,16aS,16bR)-2-(6-deoxy-2,3,4-tri-O-methyl-R-L-annopyranosyloxy)-13-(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetra-deoxy-b-D-erythro-pyranosyloxy)-9-ethyl-2,3,3a,5a,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-hexadecahydro-14-methyl-1H-8-oxacyclododeca[b]as-indacene-7,15-dione	(2R,3aS,5aR,5bS,9S,13S,14R,16aS,16bR)-2-(6-deoxy-2,3,4-tri-O-methyl-R-L-annopyranosyloxy)-13-(4-dimethylamino-2,3,4,6-tetra-deoxy-b-D-erythro-pyranosyloxy)-9-ethyl-2,3,3a,5a,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16a,16b-hexadecahydro-4,14-dimethyl-1H-8-oxacyclododeca[b]as-indacene-7,15-dione
Formula empirica	C41H65NO10	C42H67NO10
Classe chimica	Spinosoidi	Spinosoidi
Peso molecolare	731.976 g/mol	745.988 g/mol
Odore	Terroso	Terroso
Punto di fusione	84-99,5° C	161,5-170° C
Solubilità nell'acqua a 20 °C a pH		
5	5,0 290 ppm	29 ppm
7	7,0 235 ppm	0,332 ppm
9	9,0 16 ppm	0,053 ppm
Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua come log Pow a pH:		
5	2,78	3.23
7	4.01	4.53
9	5.16	5.21
Acqua distillata	3,94	4.38
Costante di dissociazione pKa a 20°C	8.10	7,87

Fonte: World health organization food and agriculture organization of the united nations. Pesticide residues in food 2008 ,Evaluations Part I – Residues.

I.2. Tossicità dello Spinosad

Nel *pesticide factsheet* del 1997, l'EPA elencava lo Spinosad nella terza categoria tossicologica a causa della LD₅₀ dermica acuta > 2000 mg / kg sul il coniglio, per gli altri test di tossicologia acuta, lo Spinosad è stato classificato nella categoria tossicologica IV, una più recente scheda di sicurezza pubblicata dalla DOW AgroSciences, ha elencato lo Spinosad nella classe tossicologia IV anche per la tossicità cutanea acuta. Inoltre, grazie alla sua bassa tossicità ed il suo basso impatto ambientale, l'EPA ha registrato il sopracitato pesticida come materiale a rischio ridotto, definendo tolleranze residuali negli alimenti con valori che vanno da 0.02 mg/Kg a 10 mg/Kg (7)

I.3. Modalità d'azione dello Spinosad

Spinosad agisce sul sistema nervoso degli insetti, con un meccanismo del tutto esclusivo che non ha dimostrato resistenza incrociata con gli altri prodotti. E un agonista nicotinico che altera il funzionamento dei canali ionici dell'recettore nicotinico e GABA (8), depolarizzando i neuroni del insetto provocando di conseguenza un eccitazione del sistema nervoso. Questa modalità di azione è modulata in primo luogo attraverso i recettori acetilnicotinici (nACh) e secondariamente attraverso i recettori dell'acido gamma-amino-butirrico (GABA). Gli insetti colpiti cessano di nutrirsi, evitando di continuare il danno. Si manifesta quindi un tipico effetto "anti-feeding" del prodotto. Il meccanismo d'azione è completamente nuovo, totalmente differente da quello di tutti gli altri prodotti insetticidi conosciuti.

Le successive indagini hanno dimostrato che lo Spinosad presenta una attività neurotossica per le insetti ed innocua per il sistema nervoso dei mammiferi.

La conseguenza di un'esposizione di insetti allo Spinosad si manifesta come ipereccitazione del sistema nervoso dando luogo a contrazioni muscolari involontarie e tremori e conseguente prostrazione, la paralisi e la rapida morte di alcuni insetti(9). Pur presentando un profilo ambientale estremamente favorevole, lo spettro d'azione dello Spinosad è paragonabile a quello di un tradizionale prodotto fosfororganico (**Figura 6**), infatti ha dimostrato un'attività antiparassitaria nei confronti di un gran numero di parassiti ed include i membri di ordini di insetto: Coleopteri, Lepidotteri, Detti, gli Imenotteri ed alcuni Coleotteri e Thysanoptera.

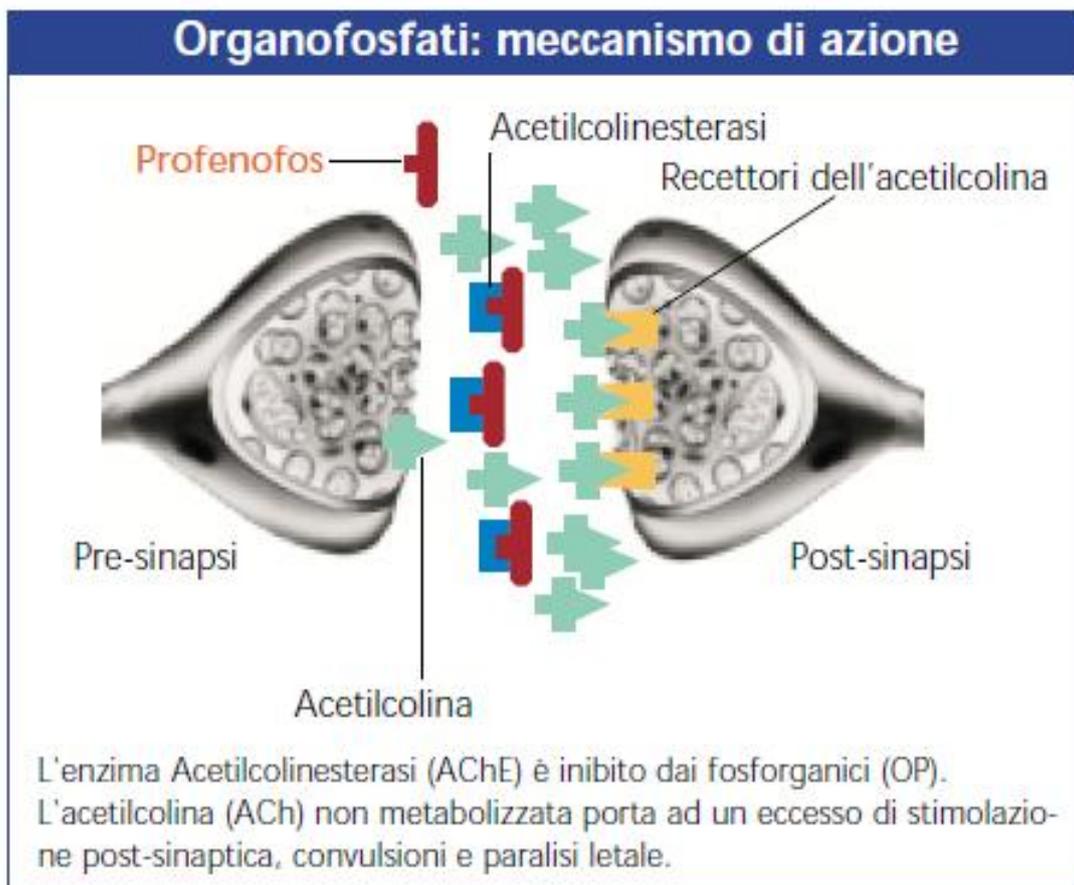


Figura 6. meccanismo d'azione di un fosfororganico

II. Determinazione e quantificazione dei residui di Spinosad nelle olive e prodotti di trasformazione

La tossicità di un qualunque composto è correlata alla sua struttura ma anche alla dose di assunzione, perciò la conoscenza del livello negli alimenti costituisce l'elemento principale per valutare la "reale" pericolosità ed esposizione di un pesticida, sia naturale che di sintesi.

L'obiettivo di questa parte della mia ricerca è stato quello di sviluppare una metodica analitica per la determinazione e quantificazione di Spinosad F (somma di Spinosina A e Spinosina D) nelle olive ed i prodotti di trasformazione.

Molti metodi sono presenti in letteratura sui residui dello Spinosad su varie matrici alimentari, la maggior parte utilizza sistemi LC-DAD-MS (10), HPLC-DAD (11) e LC-MS (12, 13), questi metodi sono stati, però, sviluppati sui residui presenti nell'acqua o su matrici acquose. Le olive e l'olio di oliva rappresentano una matrice difficile da analizzare a causa della loro natura lipofila. A nostra conoscenza non sono stati ritrovati dati sull'analisi dello Spinosad sulle olive e olio di oliva o su altre matrici lipofile.

In questa parte della mia tesi, è riportata e validata una metodica analitica, rapida, facile e poco costosa per l'analisi di Spinosad sulle olive e sui prodotti di trasformazione LC MS/MS.

A tale proposito, sono stati effettuati trattamenti in pieno campo con un formulato commerciale a base di Spinosad, successivamente sono stati monitorati i residui del principio attivo in questione nelle matrici sopracitate.

II.1. Materiali e metodi

II.1.1. Trattamenti in campo

La prova è stata realizzata su un oliveto appartenente alla cultivar Nera di Villacidro, di circa 14 anni, situato nel campidano di Villasor a 25 Km da Cagliari(CA), Il disegno sperimentale utilizzato era il blocco randomizzato con tre replicazioni. Le parcelle erano formate da tre piante ciascuna.

Il trattamento è stato fatto con un formulato commerciale a base di Spinosad (Success al 11.60 % 120 g/L) con la dose massima consigliata dall'etichetta. Nella **Tabella 7** sono riportate le dosi utilizzate. Il pesticida è stato applicato utilizzando una pompa a spalla con serbatoio da 10 litri, la miscela è stata distribuita in maniera omogenea su un quinto della pianta. I campionamenti per il monitoraggio dei residui sono stati effettuati a distanza di un ora dal trattamento, 1-3-5-7-9 e quattordici giorni dallo stesso. Le condizioni meteorologiche sono state monitorate con una stazione automatica AD-2 (Silimet, Modena, Italia). Ce da sottolineare che a distanza di due giorni dal trattamento si sono verificate deboli precipitazioni (12 millimetri in totale). La media delle temperature massime è stata di 26.5 °C, mentre quella delle minime è stata di 18.7 °C.

Tesi	Nome commerciale	Principio Attivo	% o g/l p.a. & Formulazione	DOSAGGI		Momento di applicazione
				cc o g/hl di Prodotto	g/hl p. a.	
1	Testimone					
2	Sucess	Spinosad F	120g/l SC	70	7.7	S.I

Tabella 6. Formulato commerciale & dosaggi utilizzati per il trattamento con Spinosad S.I: raggiungimento soglia d'intervento (10-15% di drupe attaccate)

II.1.2. campioni

Per il monitoraggio dei residui di Spinosad nelle olive e nei prodotti di trasformazione (olive da tavola e olio), dopo il trattamento sono stati raccolti dei campioni a un ora, 2,4,7 e 10 giorni dallo stesso.

I campioni raccolti il primo giorno dopo il trattamento sono stati suddivisi in tre parti:

- 1- La prima parte è stata sottoposta alla procedura di estrazione e di analisi per determinarne il contenuto di pesticida nelle olive a doppia attitudine .
- 2- La seconda parte è stata trasformata in olive da tavola secondo i due metodi di produzione descritti nelle pagine 15 e 16 (il metodo Sivigliano e il metodo Greco), successivamente sono stati monitorati i residui dello Spinosad nei due tipi di olive.

Sotto la medesima ottica, è stato studiato il comportamento degradativo del principio attivo in questione in una soluzione d'idrossido di sodio NaOH al 2% (soluzione alcalina utilizzata nel metodo Sivigliano per la deamarizzazione delle olive da mensa), ed in una soluzione di cloruro di sodio (NaCl) al 7% (la salamoia utilizzata nel metodo Greco o Naturale per la l'elaborazione dell'olive da tavola).

Per ciò sono stati preparati due soluzioni, una di idrossido di sodio al 2%, e l'altra di cloruro di sodio al 7%, successivamente sono stati prelevati 50 mL di ciascuna soluzione e portati a una concentrazione di 1 mg/L di principio attivo aggiungendo un volume appropriato di standard, la soluzione così ottenuta è stata monitorata per 10 ore, analizzando in tempi prestabiliti aliquote della stessa.

- 3- Lo Spinosad essendo apolare in condizioni neutre(14), e quindi teoricamente tenderà a ripartirsi nell'olio,
abbiamo ritenuto interessante fare un indagine sulla sua ripartizione reale nell' olio di oliva.

A tale scopo, la terza parte del campione raccolto il primo giorno, è stata trasformata in olio utilizzando un apparato semi-industriale secondo la seguente procedura: le olive, ripulite dalle

foglie e da altre impurezze, sono state frante utilizzando un frangitore metallico (Oliomio, Produzione Kg/ora: 50 KW: 3, Renailoli srl, Milano, Italia) e la pasta è stata gramolata per 30 min; l'olio è stato quindi separato dalla pasta e dall'acqua di vegetazione utilizzando un sistema a centrifuga a due fasi.

II.1.3. I prodotti chimici

Sono stati utilizzati reattivi e solventi di grado analitico, l'acqua deionizzata è stata ottenuta utilizzando un sistema Milli-Q ((Milli-Q, M Millipore, Elix, Q PoD^R). L'acetonitrile era di grado cromatografico per analisi LC/MS ed è stato acquistato dalla Merck (Darmstadt, Germany). L'imidacloprid (1-((6-Cloro-3-piridinil)metil)-N-nitro-2-imidazolidinimmina) e Spinosad (miscela di C₄₁H₆₅NO₁₀ (spinosyn A) + C₄₂H₆₇NO₁₀ (spinosyn D al 85%:15%) eravano intrambi degli standard di grado analitico, purezza ≥ 99.9%) rispettivamente dalla Bayer e la Dow AgroSciences.

II.1.4. Soluzioni standard

La soluzioni standard di Spinosad (1000 mg/l) è stata preparata solubilizzando 10 mg di standard analitico in 10 mL di acetonitrile. Per l'analisi, le soluzioni standard di lavoro sono state preparate per diluizione delle soluzioni stock con il corrispondente estratto di matrice. Tutte le soluzioni standard sono state conservate in vial con tappo a vite a -20°C al buio fino al momento del loro utilizzo.

II.1.5. Metodica di estrazione di Spinosad

II.1.5.1. Estrazione dalle olive (olive a doppia attitudine e olive da tavola)

Lo Spinosad è un insetticida non sistemico e quindi non penetra all'interno del frutto per ciò l'estrazione dell'analita dalle olive (sia per le olive a doppia attitudine che per le olive da mensa) è stata condotta su olive intere. A tale proposito, sono state pesate 25 g di olive in una beuta munita da tappo a vite a cui sono stati aggiunti 25 mL di acetonitrile. La soluzione è stata agitata per 10 minuti, l'estratto così ottenuto è stato centrifugato per 5 minuti, e quindi 1 mL dell'estratto organico è stato iniettato per l'analisi HPLC-MS.

II.1.5.1.a. Estrazione dalla soluzione NaOH

Per monitorare la percentuale residua di Spinosad nelle soluzioni NaOH e NaCl, sono state prelevate e analizzate aliquote della stessa ad intervalli di tempo prestabiliti. Per salvaguardare l'efficienza e la stabilità del sistema HPLC, e della colonna analitica (Eclipse XDB-C18 (Agilent) 150 x 4.6 mm, 5 μ m), il pH del campione nella soluzione NaOH è stato aggiustato acidificato lo stesso con 40 μ L di acido cloridrico al 37% per fare rientrare i valori del pH nel *range* limite previsto dal produttore < 2-8>, la soluzione così ottenuta è stata iniettata direttamente in HPLC-DAD.

II.1.5.1.b. Estrazione dalla soluzione NaCl

Per quanto riguarda invece la soluzione di NaCl, prima delle analisi, i campioni sono stati purificati mediante una colonnina SPE C18 come descritto nella seguente procedura: dopo aver condizionato la colonnina con 5 mL di acqua + 5 mL metanolo, sono stati caricati 3 mL di campione, il lavaggio è stato effettuato con 5 mL+5 mL di acqua per la rimozione del sale, poi il pesticida è stato eluito con 5 mL di acetonitrile, successivamente la soluzione così ottenuta è stata portata a secco sotto un flusso di azoto e ripresa con un mL di miscela eluente e analizzata mediante un sistema HPLC-DAD.

la prova è stata realizzata in triplicato per ogni campione

II.1.5.2. Estrazione dall'olio d'oliva

L'estrazione delle Spinosine A e D dall'olio, è stata fatta pesando un grammo di olio di oliva in un provetta di 40 ml munito da tappo a cui sono stati aggiunti 5mL di acetonitrile. La soluzione così ottenuta è stata mescolata con un sistema Vortex per un minuto, successivamente le provette sono state poste ad agitare in un agitatore rotante(Falk, Milan, Italy) per 10 min. l'estratto così ottenuto è stato direttamente analizzato in HPLC-MS senza purificazione previa.

II.1.6. Prove di recupero

Campioni di olive e di olio d'oliva non trattati sono stati fortificati con quantità appropriate di standard di Spinosad a diverse concentrazioni inclusa la concentrazione LMR (limite del residuo massimo ammesso su olive e olio d'oliva previsto dalla normativa vigente CE/396/2005). I campioni fortificati, dopo circa 30 minuti dall'aggiunta dello standard, sono stati sottoposti alla procedura di estrazione sopra descritta. In seguito l'estratto fortificato è stato iniettato in LC-MS/MS per l'analisi. Sono stati effettuati tre replicati per ogni concentrazione.

II.2. Analisi

Per l'analisi cromatografica è stato utilizzato un sistema HPLC costituito da un auto campionatore ProStar 410, due pompe ProStar 210, accoppiate ad uno spettrometro di massa triplo quadrupolo Varian 1200 L (Palo Alto, USA), con un'interfaccia ESI. L'analisi è stata condotta in condizioni isocratiche con una colonna C18 (Zorbax Eclipse XDB 4.6mm × 150mm I.D., 3µm) utilizzando una fase mobile precedentemente degassata costituita da: (A) acetonitrile 88% e (B) una Soluzione al 2% di ammonio acetato in acetonitrile 67:33% (v/v). La fase mobile, precedentemente degassata, è stata pompata al flusso di 0,4 mL min⁻¹. Le condizioni operative adottate nelle analisi sono elencate nella **Tabella 7**

La determinazione delle due Spinosine A e D, è stata fatta in modalità SIM positiva mediante gli ioni precursori M+H e la conferma delle due molecole è stata fatta mediante l'adotto al sodio (M+Na⁺)

La Tabella 8 riporta le transizioni osservate per le due Spinosine A e D. Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stato usato il software Varian MS workstation versione 6.7.

Sorgente ESI	Modalità positiva
Capillare (V)	116
Needle	6000
Shield (V)	25
Drying gas (C°)	200
Housing (C°)	66
Detector Voltage (V)	1200
Ion width m/z Quadrupol I	-1.0
Scan time (s)	1

Tabella 7. Condizioni operative dell'interfaccia ESI-MS

	P. molecolare	Ione precursore	Conferma con (M+Na ⁺)
Spinosina A	731 g/mol	731→ 732	731→ 754
Spinosina D	745 g/mol	745→ 746	745→ 768

Tabella 8. SIM per le Spinosine A e D

II.3. Risultati e discussione

II.3.1. Cromatografia

La programmata acetonitrile/ soluzione al 2 % di ammonio acetato utilizzata in questo lavoro si è dimostrata adatta alla separazione cromatografica delle Spinosine A e D (**Figura 7**)

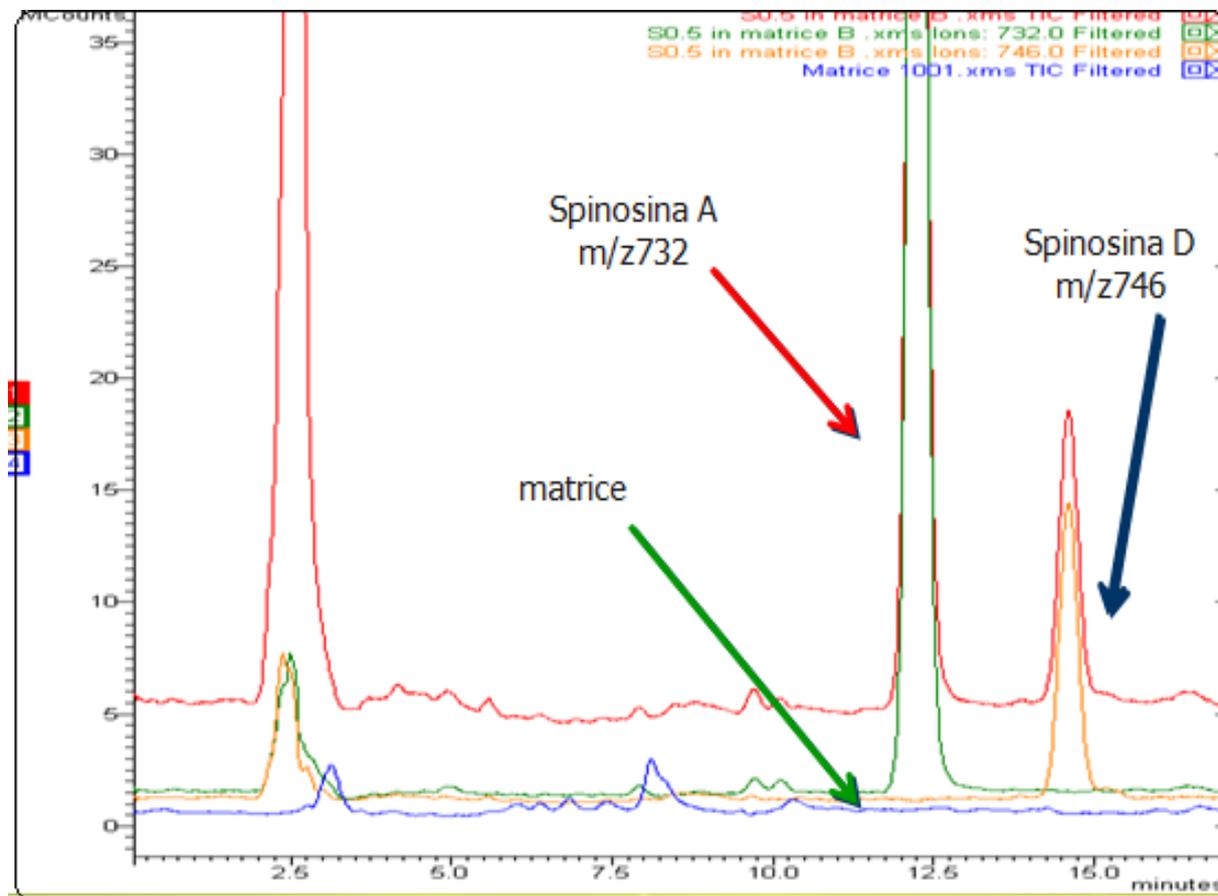


Figura 7. Cromatogramma di un matrice di olive fortificata con 0.02 mg/Kg di Spinosad.

II.3.2. Percentuale di recupero di Spinosad

La **Tabella 9I** recuperi sono riportati in la e variano dall'84 al 110 %. Grazie alla buona sensibilità del detector utilizzato si è raggiunto un limite di rilevabilità pari a 0.01 mg/kg e un limite di quantificazione pari a 0.02 mg/kg in conformità con la normativa europea vigente, chi fissa un LMR (livello massimo di residuo ammesso) per le olive e per l'olio di oliva, pari a 0.02* mg/Kg (15).

Fortificazione (mg/kg)	Percentuale recupero % \pm SD Su olive	Percentuale recupero % \pm SD Su olio d'oliva
0.01	93 \pm 2	92 \pm 8
0.02	99 \pm 4	98 \pm 4
0.05	102 \pm 5	100 \pm 3
0.5	100 \pm 6	112 \pm 10
1	101 \pm 3	103 \pm 5

Tabella 9. Percentuale di recupero di Spinosad dalle olive e dall'olio d'oliva .

II.3.3. Selettività analitica

La selettività di un metodo analitico, si riferisce alla capacità di quest'ultimo di determinare univocamente l'analita di interesse in presenza di interferenti.

La metodica LC-MS/MS proposta si è dimostrata selettiva per la determinazione delle due Spinosine A e D, in quanto la rivelazione in spettrometria di massa è stata condotta in modalità SIM dello ione molecolare (M+H) (m/z 732 per la Spinosina A e m/z 746 per la Spinosina D), e confermata in maniera univoca mediante l'addotto al sodio (M+Na⁺) m/z 754 per la Spinosina A e m/z 768 per la Spinosina D).

II.3.4. Limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ).

- Limite di rilevabilità (LOD) è la più bassa concentrazione dell'analita che può essere rilevata, ma non necessariamente determinata quantitativamente, nelle condizioni sperimentali del metodo.

$$\text{LOD} = 3 * \sigma \text{ bianco} / b$$

- Limite di rilevabilità (LOQ) è la più bassa concentrazione analitica che può essere determinata quantitativamente con accettabile precisione ed esattezza nelle condizioni sperimentali del metodo.

$$\text{LOD} = 3 * \sigma \text{ bianco} / b$$

σ bianco = deviazione standard del valore del bianco (per 5 campioni)

b = coefficiente angolare della curva di taratura .

Per lo Spinosad F (somma Spinosine A e D), la normativa europea in vigor ha fissato un LMR pari a 0.02 mg/Kg, definito dalla stessa come limite di determinazione analitica (LOQ),

II.3.5. il range dinamico ed intervallo di linearità

La curva di calibrazione per l'insetticida oggetto di studio è stata preparata a cinque livelli di concentrazione: 0.01, 0.02, 0.5, 1 e 3 mg/Kg l'analisi è stata condotta in triplicato. La curva di calibrazione è stata eseguita riportando la concentrazione del principio attivo in funzione dell'area del picco dello standard. L'analisi della regressione lineare è stata eseguita calcolando la pendenza della curva e l'intercetta. Inoltre, è stato determinato il coefficiente di correlazione (r) **Tabella 10**.

Come evidenzia la curva di calibrazione (**Figura 7**), Il metodo analitico sviluppato ha dimostrato una risposta lineare direttamente proporzionale alla concentrazione degli analiti nei campioni all'interno di un intervallo 0.01 mg/kg a 300 mg/kg. Tutte le concentrazioni attesi dai trattamenti dai noi effettuati erano comprese nell'intervallo di linearità del metodo.

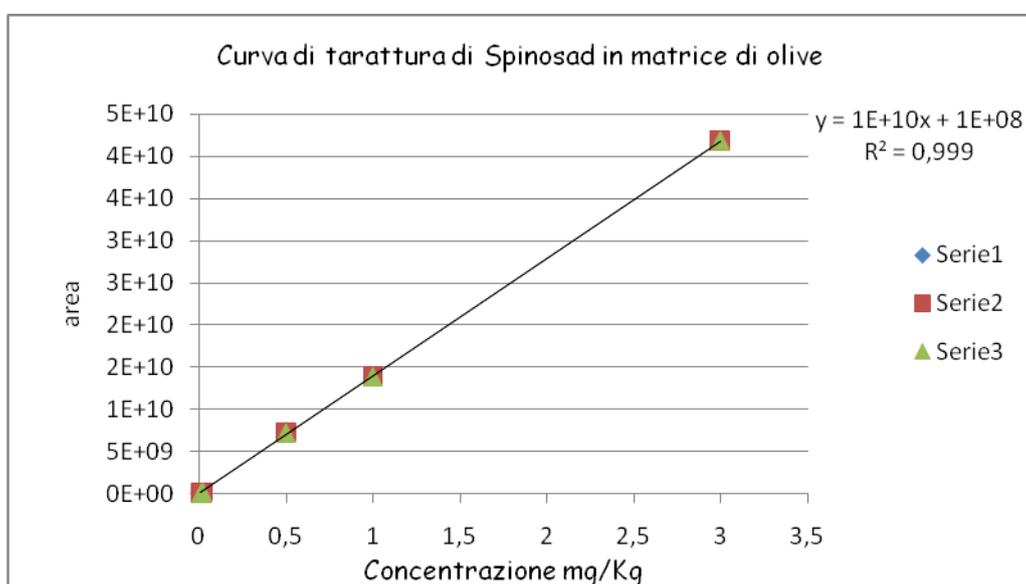


Figura 7. curva di calibrazione di Spinosad nella matrice di olive

Spinosad	Intervallo di linearità (mg/kg)	Media pendenza ($\times 10^3$)	RSD (%)	Media Intercetta ($\times 10^3$)	RSD (%)	Media R^2	RSD (%)
	0.01-3	2,99E+07	11.13	-1,34E+06	26.7	0.999	0.25

Tabella 10 I parametri di qualità della curva di taratura

II.3.6. Residui e degradazione di Spinosad

La degradazione del pesticida oggetto di studio è stata calcolata come cinetica di pseudo primo ordine. La costante di primo ordine “k” è stata calcolata dalla pendenza della retta calcolata a partire dal logaritmo naturale della concentrazione dell’insetticida a diversi giorni dal trattamento. L’ordine di reazione è stato calcolato mediante l’equazione:

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

C_t ; concentrazione al tempo t,

C_0 ; concentrazione iniziale

k ; costante di degradazione stimata

Il tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$), è stato calcolato mediante l’equazione:

$$t_{1/2} = 0,693/k.$$

Analisi Statistica L’analisi statistica è stata effettuata mediante analisi della varianza (ANOVA) ed il confronto di significatività tra valori medi è stato condotto utilizzando il test di Duncan a $P < 0.05$.

II.3.7. Residuo nelle olive a doppia attitudine

Il residuo dello Spinosad riscontrato nelle olive subito dopo il primo giorno dal trattamento la dose consigliata dal produttore è di 0.30 mg/kg **Tabella 10**, Dopo 2 giorni il residuo diminuisce di un fattore circa quindici, portandosi a 0.02 mg/kg. Al quarto giorno dal trattamento, come illustra la tabella III.2, il residuo presente non è quantificabile in quanto inferiore al limite LOQ 0.02 mg/Kg. Dopo il quarto giorno il residuo non è più determinabile.

C'è da sottolineare che la normativa europea vigente (CE) N.149/2008, fissa un limite MLR di Spinosad nelle olive da olio e nelle olive da tavola pari a 0.02 mg/Kg, valore definito dalla stessa come limite inferiore di determinazione analitica

La velocità di scomparsa del principio attivo, calcolata come cinetica del primo ordine, mostra per lo Spinosad un tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$) di 20 ore ($r = 0.94$).

Questa rapida degradabilità del principio attivo esclude che i trattamenti ripetuti possano determinare effetti di accumulo del residuo, inoltre è ovvio che nessun residuo potrà essere riscontrato nell'olio.

	Trattamento con una dose di etichetta
Giorni dal trattamento in campo	Residui Espressi come somma del residuo delle Spinosine A e D. (mg/kg) \pm SD
0	0.30 \pm 0,07
2	0.02 \pm 0,01
4	0.01 \pm 0,02
10	n.d.*

Tabella 11 - Evoluzione dei residui (mg/kg \pm DS) dello Spinosad nelle olive a doppia attitudine dopo il trattamento in pieno campo.

II.3.8. Degradazione dello Spinosad in Soluzione NaOH al 2% e NaCl al 7%.

la prova di degradazione del principio attivo in una soluzione de idrossido di sodio ha mostrato una cinetica degradativa piuttosto veloce, come evidenzia la **(Figura.8)** il contatto con la soluzione NaOH comporta un dimezzamento della percentuale residua dell' pesticida già nella prima ora, dopo tre ore di esposizione dell'principio attivo alla soluzione NaOH si ottiene percentuale residua pari all'20.65%, che diminuisce col tempo raggiungendo la percentuale di 7.50% dopo 5 ore in soluzione NaOH. In questo esperimento il tempo di emivita ossia il tempo di dimezzamento ($T_{1/2}$) dell'insetticida era pari a 1.5 ore.

Lo stesso principio attivo ha dimostrato una cinetica di degradazione diversa in una soluzione NaCl al 7%, come è riportato nella **(Figura 8)**. con un tempo di dimezzamento superiore ;($T_{1/2}$) pari a 10 ore.

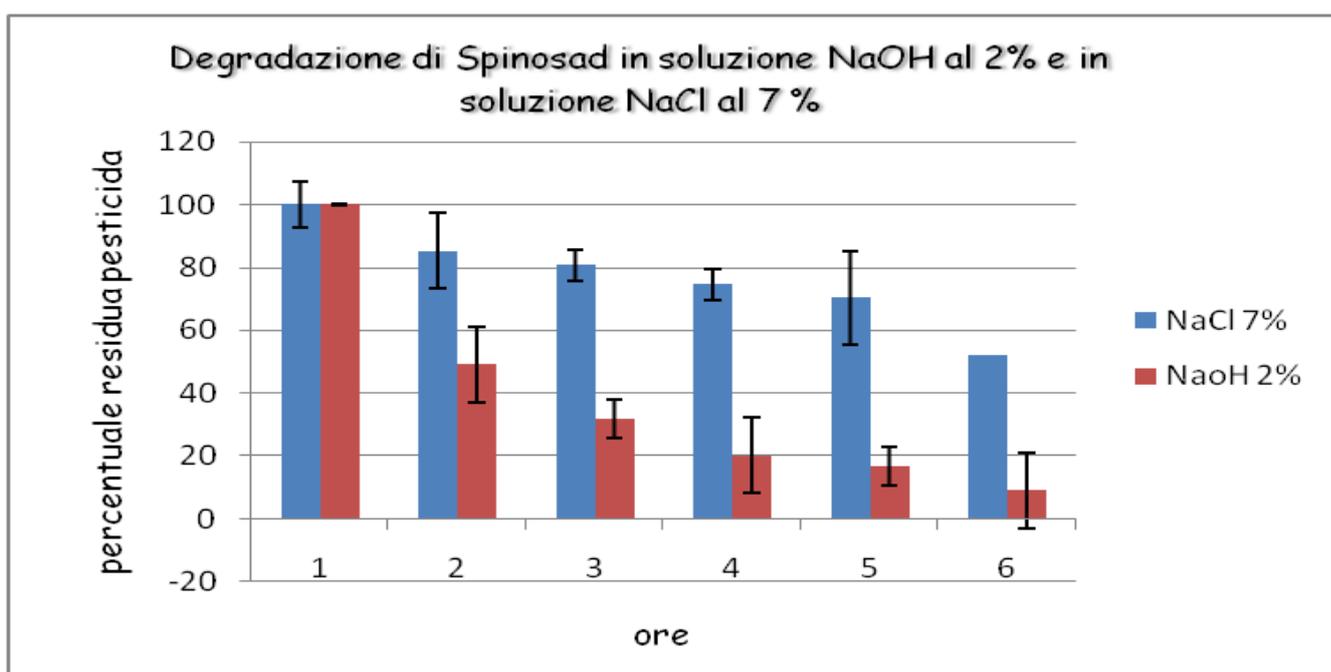


Figura 8 – Degradazione di Spinosad nelle soluzioni di Idrossido di sodio al 2% e Cloruro di sodio al 7%.

II.3.9. Residui di Spinosad nelle olive da Tavola fatte con il metodo Sevigliano e con il metodo Greco.

Nelle olive da tavola sia quelle fatte con il metodo Greco che prevede il trattamento delle olive con una soluzione NaCl al 7% , che quelle fatte con il metodo Sevigliano che prevede la deamarizzazione delle olive mediante una soluzione di NaOH al 2% e successivamente con la soluzione NaCl al 7%,(che per la semplificazione verranno chiamate rispettivamente S.Gr e S.Sv), come mostra la **(figura 9)**, la percentuale residua del principio attivo quantificata al secondo giorno è minore del 20% per entrambi i metodi, con una concentrazione pari a 0.02 mg/Kg nelle olive S.Sv, e 0.03 mg/Kg nelle olive S.Gr, la diminuzione del residuo procede nel tempo fino ad essere inquantificabile al quinto giorno e poi indeterminabile al ottavo.

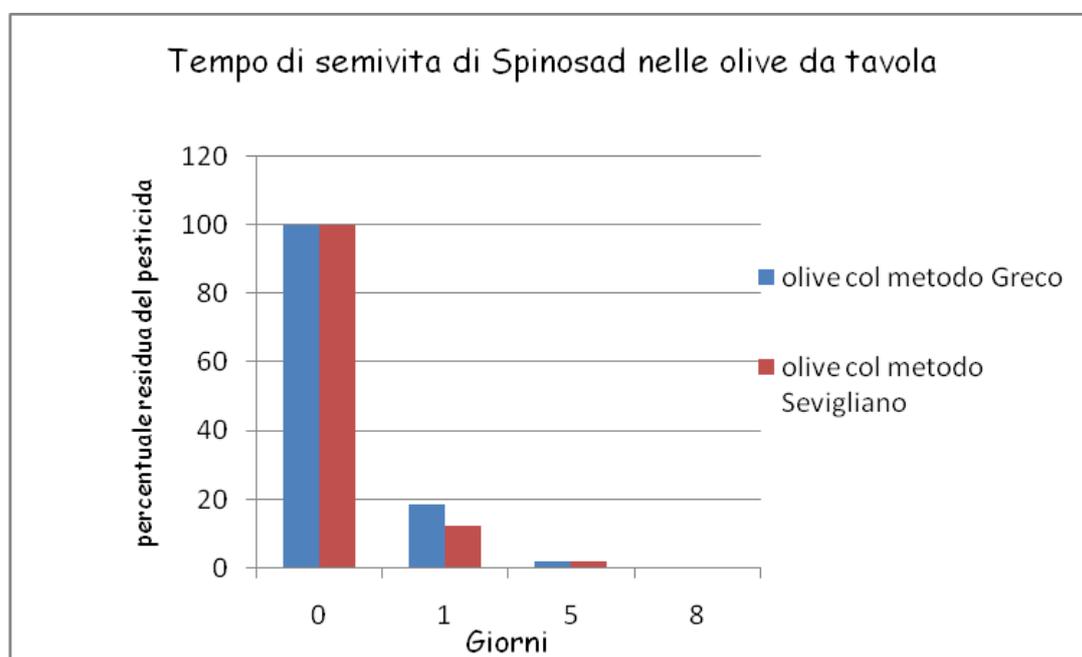


Figura 10. Residui di Spinosad F nelle olive da tavola

il tempo di semivita ($t_{1/2}$) del pesticida in questione è stato di circa 40 ore nelle olive S.Sv, e di circa 48 ore nelle olive S.Gr.

II.3.10. Ripartizione di Spinosad nel olio di oliva.

Una parte delle olive trattate con il pesticida è stata trasformata in olio d'oliva con l'obiettivo di verificare la ripartizione di Spinosad tra la fase oleosa e le acque di vegetazione durante il processo di trasformazione. La concentrazione di pesticida quantificata nelle olive prima della frangitura era pari a 0.11 mg/Kg, come evidenzia la figura III.5, il residuo presente nell'olio non era quantificabile in quanto inferiore al limite LOQ analitico 0.02 mg/Kg.

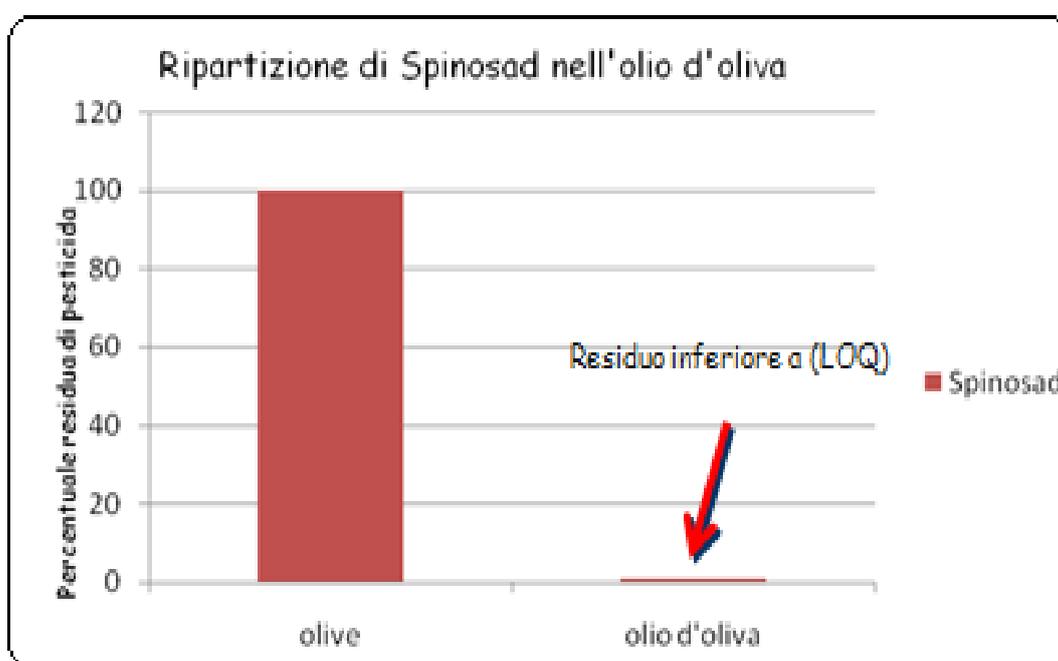


Figura 11. ripartizione di Spinosad nell'olio ottenuto dalle olive trattate con il medesimo principio attivo.

III. L'Imidacloprid

III.1. Struttura chimica e proprietà

L'Imidacloprid, (1-(6-chloro-3-pyridyl)methyl-2-nitroiminoimidazolidine) (**figura 12**) è un insetticida di recente introduzione, appartenente alla famiglia dei cloronicotinilnitroguanidine ossia neonicotinoidi, essi stanno sostituendo sempre di più gli inibitori organofosfati e metilcarbamati dell'acetilcolinesterasi che stanno perdendo la loro efficacia a causa dell'insorgenza dei fenomeni di resistenza nelle popolazioni dei parassiti.

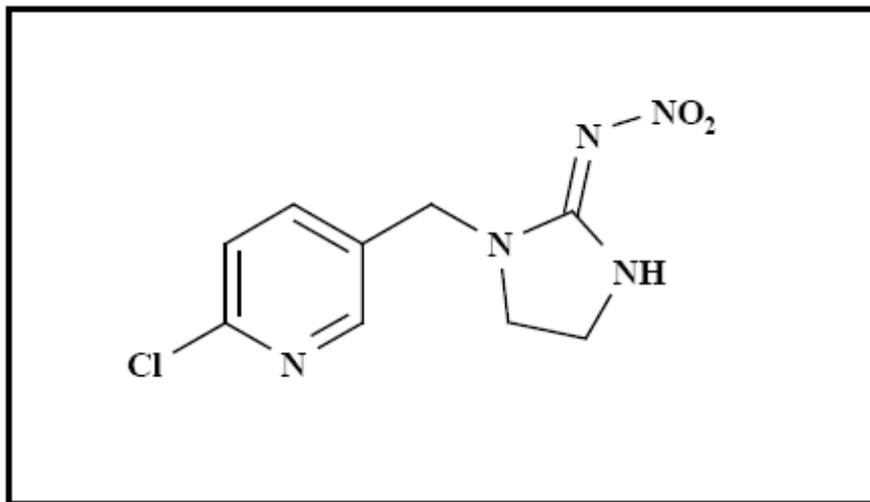


Figura 12. Struttura chimica dell'Imidacloprid

A partire dalla nicotina, le cui proprietà insetticide erano già note da secoli fa, e dalle relative molecole nicotinoidi, negli ultimi anni è stata sviluppata una nuova classe di composte denominati neonicotinoidi¹. Si tratta di principi attivi neurotossici che agiscono sul sito neuronale nicotinico dell'acetilcolina (nAChRs)*.

* Il recettore nicotinico dell'acetilcolina (nAChRs) è una proteina che fa parte integrante della membrana, nel sistema nervoso centrale e periferico formano canali ionici (selettivi per i cationi) dipendenti da neurotrasmettitori che partecipano alla trasmissione del segnale associato con il rilascio fisiologico dell'acetilcolina.

Tabella 12. Proprietà chimico fisiche dell'Imidacloprid

Proprietà chimico fisiche	Imidacloprid
Nome IUPAC	1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine
Formula empirica	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂
Classe chimica	cloronicotinici neonicotinoidi
Peso molecolare	255.7 g/mol
Odore	leggero, caratteristico
Punto di fusione	144°
Solubilità nell'acqua a 20 °C .	0.61 g/l , la solubilità non è influenzata dal pH nell'intervallo pH 4 a pH 9.
Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua come log Pow 21 °C	0.57
Solubilità in solventi organici a 20°C	
n-esano	<0.1 g/l
toluene	0.69 g/l
2-propanolo	2.3 g/l
acetato d'etile	6.7 g/l
acetonitrile	50 g/l
acetone	50 g/l
diclorometano	67 g/l
dimethylformamide	>200 g/l
dimethyl sulfoxide	>200 g/l

World health organization food and agriculture organization of the united nations. Pesticide residues in food 2008 Evaluations Part I – Residues

Con il termine *Neonicotinoidi* se intende distinguere queste sostanze chimiche dai nicotinoidi. I neonicotinoidi sono altamente più efficaci come insetticidi e meno tossici per i mammiferi (16). Rappresentanti di questo gruppo di pesticidi sono anche denominati "Cloronicotinili", per sottolineare l'importanza Dell' atomo di cloro per la potenza insetticida.

La molecola modello dei neonicotinoidi è l'Imidacloprid, che è stata scoperta e sintetizzata nel 1984 da chimici della affiliata Bayer Giapponese, *Nihon Bayer Agrochem K.K.* che stavano esaminando l'introduzione del gruppo 3-piridilmetile sulla struttura del Nitrometilene eterociclico². L'introduzione di questo gruppo ha dimostrato di aumentare notevolmente l'attività insetticida e di ridurre la tossicità per i mammiferi (17).

Dalla scoperta dell'Imidacloprid, diverse altre sostanze chimiche analoghe con il gruppo 6-cloro-3- Piridilmetile sono state sviluppate per l'uso commerciale. Una ulteriore sostituzione del gruppo Cloropiridinile con un gruppo Chlorothiazolyl ha portato allo sviluppo di una seconda generazione di insetticidi neonicotinoidi (Maienfisc et al 1999). I composti di questo gruppo che sono stati sviluppati per uso commerciale comprendono la Clotianidina ed il Tiametoxam.

L'Imidacloprid è il primo insetticida, nella sua categoria chimica, ad essere stato messo a punto per un uso commerciale. ed è stato introdotto per prima volta come pesticida negli Stati Uniti nel 1994, attualmente è registrato in diversi paesi con impieghi assai diversi: figura sia tra i prodotti per l'agricoltura, la cura del tappeto erboso e degli animali domestici, sia tra gli insetticidi domestici (18,19,20).

L'Imidacloprid è un insetticida caratterizzato con un elevata sistemicità, con azione, locale e trans laminare con un ampio spettro di azione in particolare nei confronti dei fitofagi ad apparato boccale pungente - succhiatore, quali afidi , aleuroni, cicaline, tripidi e di altri specie di parassiti compresi alcuni ceppi resistenti (22).

III.2. Selettività dell'Imidacloprid.

Appartenente alla stessa famiglia chimica della tossina del tabacco: la nicotina, l'Imidacloprid è una molecola neurotossica che agisce sul sistema nervoso con una peculiarità che le conferisce la sua selettività nei confronti degli insetti: I nicotinoidi (ad esempio la nicotina..) ed i neonicotinoidi (ad esempio l'imidacloprid, Thiacloprid..) sono due tipi di agonisti nicotinici strutturalmente simili ma con diverse proprietà biologiche e fisico-chimiche: i nicotinoidi sono molecole cationiche e hanno maggior affinità per il recettore nicotinico dell'acetilcolina (nAChR) dei mammiferi. Mentre i neonicotinoidi sono molecole non protonate con una maggior affinità e selettività per il recettore (nAChR) degli insetti (22,23) rispetto a quello dei mammiferi. Vi è un ampio database, che sottolinea le differenze di proprietà di "binding" dei vari sottotipi dei recettori nicotinici dei mammiferi e quelli degli insetti, queste differenze di "binding" contribuiscono notevolmente nel ridurre la tossicità dei neonicotinoidi nei confronti dei mammiferi.

La selettività dell'Imidacloprid è conferita in parte anche dalla distribuzione dei ricettori nicotinici dell'acetilcolina: Per gli insetti i ricettori (nAChR) si trovano esclusivamente nel sistema nervoso centrale, mentre nei mammiferi, hanno una distribuzione tissutale assai espansiva ed include i gangli autonomi, il muscolo scheletrico (giunzione neuromuscolare), il midollo spinale, e un certo numero di regioni cerebrali.

La tossicità dell'Imidacloprid sul sistema nervoso dei vertebrati è ulteriormente ridotta grazie alla sua scarsa penetrazione nella barriera emato-encefalica (25).

III.3. Modalità di azione dell'Imidacloprid

Come illustrato nella (Figura 13), l'Imidacloprid agisce come agonista permanente ed irreversibile del recettore nicotino (*nAChR*) del sistema nervoso centrale, mimando il rilascio massiccio dell'acetilcolina, questa sovrastimolazione provoca un malfunzionamento della trasmissione sinaptica del segnale che successivamente porta alla paralisi e morte dell'insetto.

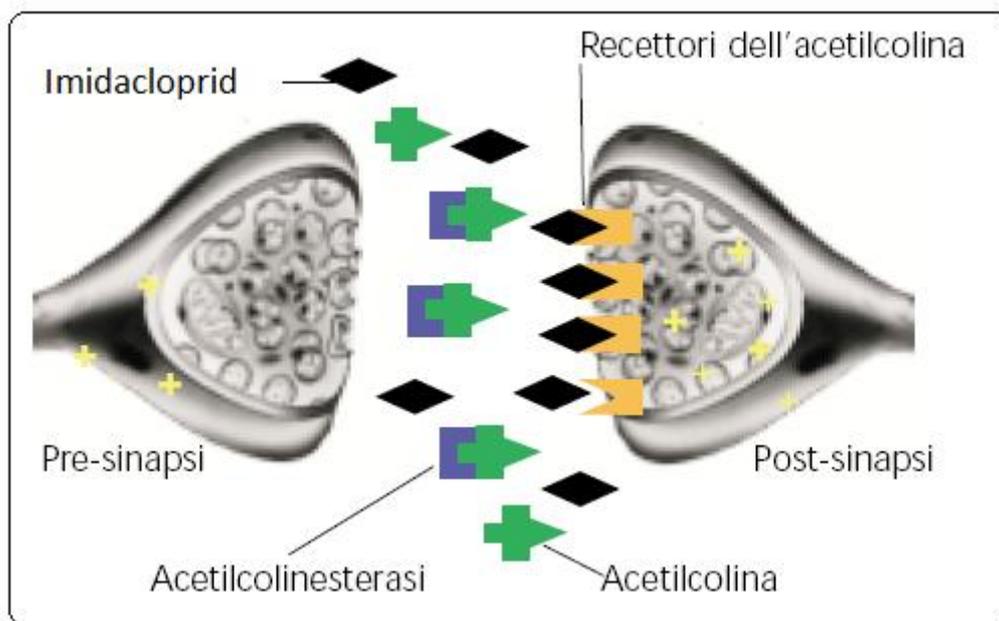


Figura 13: illustrazione del meccanismo di azione dell'Imidacloprid

Il trattamento di preparati neuronali di insetti con un neonicotinoidi produce una risposta bifasica, che consiste in un iniziale aumento della frequenza di scarica spontanea che è seguita da un blocco completo di propagazione dell'impulso nervoso (26).

III.4. Tossicità dell'Imidacloprid.

Classificato nel quarto gruppo tossicologico dalla Pest Management Regulatory Agency (DIR99-06, *Voluntary Pesticide Resistance-Management Labelling Based on Target Site/Mode of Action*), l'Imidacloprid è considerato un pesticida a basso rischio sulla salute umana con un profilo ecotossicologico favorevole.

Ultimamente è stato acceso un dibattito all'interno della comunità scientifica riguardante la tossicità dell'Imidacloprid nei confronti degli'api (*Apis mellifera*), dallo studio di Johansen e Mayer (1990), l'Imidacloprid è stato definito come "altamente tossico" per le api, e caratterizzato da DL50 < 2g/ape (27,28). Un'altra ricerca ha attribuito una maggiore tossicità ai metaboliti dell'Imidacloprid, sopra tutto i due principali metaboliti: 5-OH Imidacloprid e l'Olefin. Nei confronti di *Apis mellifera*, l'Olefin ha un valore di DL50 simile a quello della molecola madre, ma dopo 96 ore diviene maggiormente tossico dell'Imidacloprid³.

Altri indici, che tengono conto della dose di prodotto utilizzabile in campo, si pronunciano, invece, favorevolmente sull'uso del principio attivo (29).

IV. Determinazione e quantificazione dell'Imidacloprid nelle olive e i prodotti di trasformazione

Con l'obiettivo di monitorare la persistenza dell'Imidacloprid nelle olive ed i prodotti di trasformazione, è stata fatta una prova in condizioni ambientali reali, perciò è stato effettuato un trattamento delle olive in campo con un formulato commerciale a base di Imidacloprid. Inoltre è stata messa a punto una metodica LC-MS/MS per la determinazione e la quantificazione del sopracitato pesticida nelle matrici oggetto di studio.

IV.1. Materiali e metodi

IV.1.1. Trattamenti in campo

È stato fatto un trattamento delle olive in campo con il formulato commerciale a base di Imidacloprid (Warrant 17,1 % 200 g/l), il pesticida è stato applicato utilizzando una pompa a spalla con serbatoio da 10 litri, distribuendo la quantità di miscela necessaria per bagnare completamente la chioma di ciascuna pianta.

La prova è stata condotta nello stesso oliveto e nelle stesse condizioni meteorologiche descritte nella pagina 32. Nella **Tabella 13** sono riportate le dosi impiegate.

Tesi	Nome commerciale	Principio Attivo	% o g/l p.a. & Formulazione	DOSAGGI		Momento Di Applicazione
				cc o g/hl di Prodotto	g/hl p. a.	
1	Testimone					
3	Warrant SL	Imidacloprid	200g/l CI	6	12	S.I

Tabella 13. Formulato commerciale & dosaggi utilizzati per il trattamento con l'Imidacloprid S.I: raggiungimento soglia d'intervento (10-15% di drupe attaccate)

IV.1.2. I campioni

I campionamenti per il monitoraggio dei residui sono stati effettuati a distanza di un ora dal trattamento, 2,4 e 10 giorni dallo stesso. Per verificare l'evoluzione del residuo dell'Imidacloprid nelle olive a doppia attitudine e in ciascun prodotto di trasformazione (olive da tavola e olio d'oliva) i campioni raccolti il primo giorno sono stati suddivisi in tre parti come descritto nella pagina 31: una prima parte è stata analizzata subito per verificarne il tenore in principio attivo, la seconda parte è stata trasformata in olive da tavola, la terza parte invece è stata soggetta al processo di trasformazione in olio d'oliva.

IV.1.3. I prodotti chimici

L'imidacloprid (1-((6-Cloro-3-piridinil)metil)-N-nitro-2-imidazolidinimmina) era uno standard di grado analitico, purezza $\geq 99.9\%$ acquistato dalla Bayer. Sono stati utilizzati reattivi e solventi di grado analitico, l'acqua deionizzata è stata ottenuta utilizzando un sistema Milli-Q (Milli-Q, M Millipore, Elix, Q PoD^R). L'acetonitrile era di grado cromatografico per analisi LC/MS ed è stato acquistato dalla Merck (Darmstadt, Germany).

IV.1.4. Soluzioni standard

La soluzione standard dell'Imidacloprid (1000 mg/l) è stata preparata solubilizzando 10 mg di standard analitico in 10 mL di acetonitrile. Per l'analisi, le soluzioni standard di lavoro sono state preparate per diluizione delle soluzioni stock con il corrispondente estratto di matrice. Tutte le soluzioni standard sono state conservate in vial con tappo a vite a -20°C al buio fino al momento del loro utilizzo.

IV.1.5. Strumentazione e condizioni LC-MS/MS.

Per l'analisi cromatografica è stato utilizzato un sistema HPLC costituito da un auto campionatore ProStar 410, due pompe ProStar 210, accoppiate ad uno spettrometro di massa triplo quadrupolo Varian 1200 L (Palo Alto, USA), con un'interfaccia ESI. L'analisi è stata condotta in condizioni isocratiche con una colonna C18 (Zorbax Eclipse XDB 4.6mm × 150mm I.D., 3µm) utilizzando una fase mobile precedentemente degassata costituita da: (A) acetonitrile 80% e (B) acqua deionizzata 20% (v/v) contenente lo 0,1% di acido formico. La fase mobile, precedentemente degassata, è stata pompata al flusso di 0,4 mL min⁻¹. Le condizioni operative adottate nelle analisi sono elencate nella **Tabella 14**:

Sorgente ESI	Modalità positiva
Capillare (V)	65
Needle	5940
Shield (V)	780
Drying gas (C°)	375
Housing (C°)	54
Detector Voltage (V)	1500
Ion width m/z Quadrupol I	1.2
Ion width m/z Quadrupol III	2.0
Scan time (s)	1

Tabella 14. Condizioni operative dell'interfaccia ESI-MS per la determinazione e quantificazione dell'Imidacloprid.

Gli ioni precursori sono stati soggetti a collisione con argon alla pressione di 3.80 mTorr in modalità MRM sia positiva che negativa. La **Tabella 15** riporta le transizioni osservate e la relativa energia di collisione usata per la quantificazione dell'Imidacloprid. Per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati è stato usato il software Varian MS workstation versione 6.7.

	Ione precursore		Transizione I		Transizione II	
	P.molecolare	Massa (m/z)	Massa (m/z)	CE (V)	Massa (m/z)	CE (V)
Imidacloprid	255 g/mol	256 (M+H) ⁺	256→209	-14	256→175	-14

Tabella 15. Transizione specifiche MRM per l'Imidacloprid

IV.1.6. Metodica di estrazione dell'Imidacloprid

IV.1.6.1. Estrazione dalle olive

L'estrazione dell'Imidacloprid dalle olive e dall'olio è stata fatta con il metodo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe: rapido, semplice, economico, efficace, robusto, e sicuro, "catchers"), a tale scopo sono stati raccolti campioni di olive, trattate con il formulato commerciale dell'Imidacloprid (Confidor), portati direttamente in laboratorio dove sono stati, ripulite dalle foglie e da altre impurezze, sono state frante ed omogeneizzate utilizzando un frangitore metallico semi-industriale (Malavasi, Bologna, Italia). Sono state pesate 10 grammi di campione e poste in un tubo per centrifuga in PTFE (fluoroetilenepropilene) da 50 mL, ai quali sono state aggiunte 10 mL di acetonitrile, la soluzione è stata agitata per 1 minuto fino a uniformità, per migliorare l'efficienza dell'estrazione, sono state aggiunte i sali 4.0g MgSO₄, 1.0g NaCl, l'insieme è stato agitato vigorosamente per un minuto e poi centrifugato a 4000 rpm per 5 minuti, successivamente, 5 mL di surnatante sono stati purificati mediante una

cartuccia SPE C18 Monofunctional precedentemente condizionata con 5 mL acqua deionizzata e 5 mL di acetonitrile. In seguito è stata effettuata una ulteriore purificazione mediante un purificatore dispersivo (dSPE) per rimuovere l'acqua in eccesso e i contaminanti indesiderati dal campione estratto, ossia 1mL di estratto ottenuto dal passaggio precedente è stato posto in vari tubi per centrifuga in polipropilene da 2mL, contenenti una miscela di adsorbenti: 150 mg di MgSO₄ anidro + 50 mg PSA + 50mg C18 + 50 mg GCB. I campioni sono stati agitati con gli adsorbenti per 30 secondi e poi centrifugati a 4000rpm per 5 minuti, il supernatante così ottenuto è stato analizzato mediante LC MS/MS.

IV.1.6.2. Estrazione dall'olio d'oliva.

In un tubo per centrifuga in PTFE (fluoroethylenepropylene) da 50 mL, sono state pesate 3 gm di olio di oliva +7 gm di acqua deionizzata, la soluzione così ottenuta è stata estratta e successivamente purificata seguendo le stesse tappe precedentemente descritte.

L'intera procedura di analisi è schematizzata nella **Figura 14**.

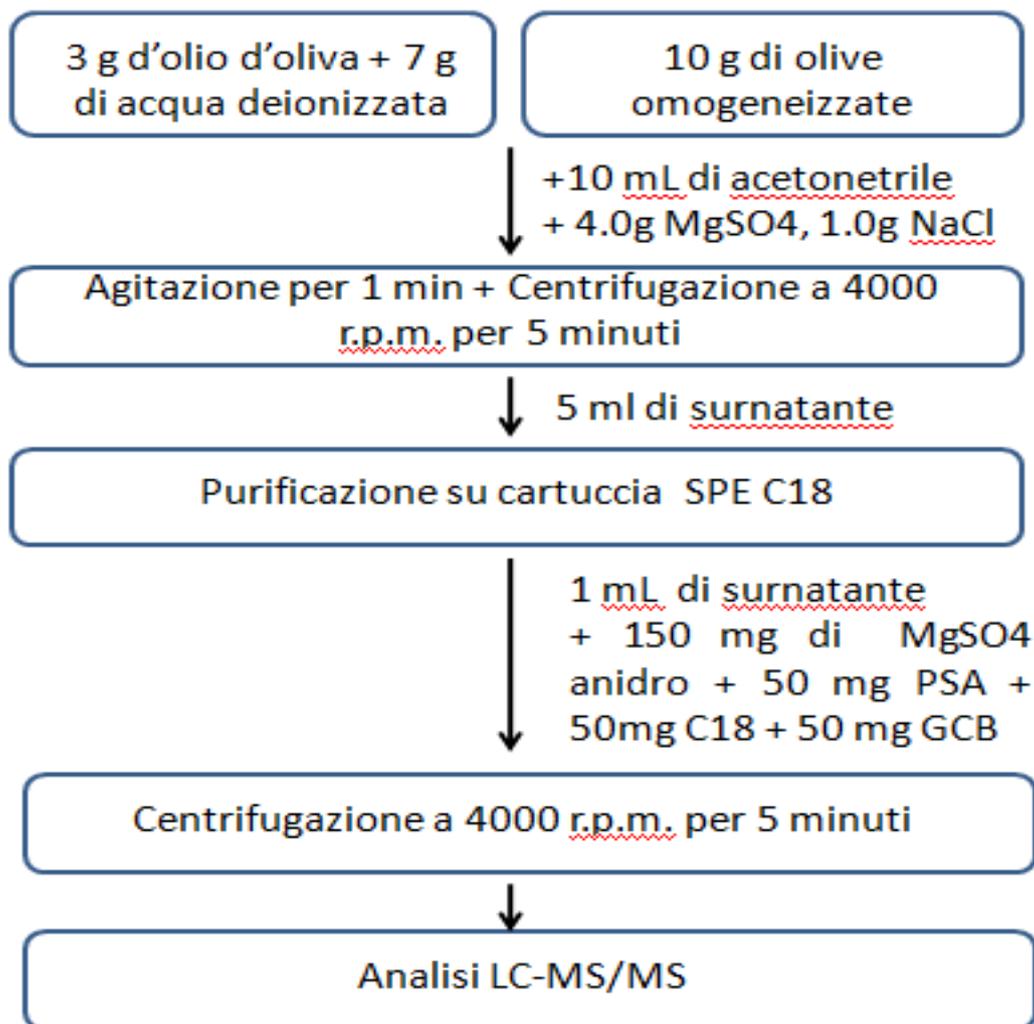


Figura 14: Schema dell'estrazione dell'Imidacloprid dalle olive e dall'olio d'oliva

IV.1.6.3. Estrazione dalla soluzione NaOH e NaCl

L'estrazione dell'Imidacloprid dalle soluzioni NaOH e NaCl è stato fatto come descritto precedentemente nei paragrafi : **II.1.5.1.a. e II.1.5.1.b.**

IV.1.7. Prove di recupero

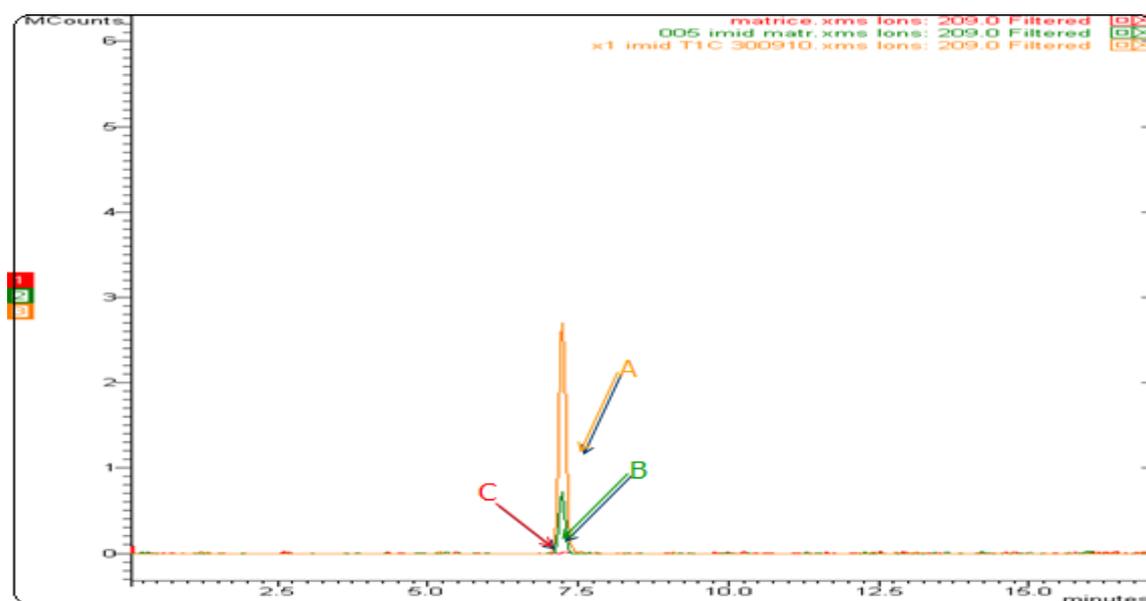
Campioni di olive e di olio d'oliva in cui era stata accertata l'assenza del pesticida oggetto della ricerca, sono stati fortificati con volume appropriati di standard di Imidacloprid alla concentrazione di 0.01, 0.05, 0.5, e 1 mg/Kg, i campioni così preparati sono stati lasciati 30 min al buio e a temperatura ambiente, successivamente sono stati estratti seguendo la metodica di estrazione sopra descritta .

IV.2. Risultati discussione

IV.2.1. Cromatografia

Per la separazione cromatografica dell'Imidacloprid è stato utilizzato un gradiente lineare che partiva dal 10% di acetonitrile per arrivare all'100 % in 10 minuti, le stesse condizioni venivano mantenute per 4 minuti per poi equilibrare il sistema per tre minuti con una miscela acetonitrile/acqua (10/90 v/v). La fase mobile è stata pompata al flusso di 0.4 mL min⁻¹.

L'Imidacloprid è stato separato dalla matrice con un tempo di ritenzione 7.2min (**Figura 15**).



(**Figura 15**). A; Campione, B; matrice di olive fortificata con 0.05 mg/Kg di Imidacloprid, C; matrice.

IV.2.2. Percentuale di recupero dell'Imidacloprid

Le percentuali di recupero dell'Imidacloprid dalle olive e dall'olio d'oliva sono riportati nella (Tabella 16), e variano dall'105 al 115 % sulle diverse concentrazioni. Come evidenzia la tabella, la procedura di estrazione precedentemente descritta ha permesso il recupero totale dell'analita d'interesse dalle due matrici oggetto di studio.

Fortificazione (mg/kg)	Percentuale recupero % \pm SD Su olive	Percentuale recupero % \pm SD Su olio d'oliva
0.01	105 \pm 13	110 \pm 1
0.05	115 \pm 4	109 \pm 5
0.5	119 \pm 4	110 \pm 5
1	107 \pm 3	110 \pm 3

Tabella 16. Percentuale di recupero di Imidacloprid dalle olive e dall'olio d'oliva .

IV.2.3. Selettività analitica

La rivelazione in spettrometria di massa dell'Imidacloprid è stata condotta in modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM), che permette di raggiungere la specificità e la selettività necessarie in maniera univoca per l'analita di interesse. A tale proposito sono state utilizzate due transizioni specifiche m/z 256 \rightarrow 209, e m/z 256 \rightarrow 175 per la determinazione e la conferma dell'Imidacloprid

IV.2.4. Limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ)

I limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati come riportato nella pagina 40, e sono risultati rispettivamente pari a 0.005 mg/Kg e 0.01 mg/Kg nell'olio d'oliva, e 0.008 mg/Kg e 0.02mg/Kg nelle olive.

IV.2.5. il *range* dinamico ed intervallo di linearità

Il metodo analitico sviluppato per la determinazione dell'Imidacloprid nelle olive e nell'olio d'oliva si è dimostrato lineare con una risposta direttamente proporzionale alla concentrazione del principio attivo in questione. Sono stati determinati i parametri di qualità della curva di taratura e sono riportati nella (tabella 17).

Imidacloprid	Intervallo di linearità (mg/kg)	Media pendenza ($\times 10^3$)	RSD (%)	Media Intercetta ($\times 10^3$)	RSD (%)	Media R^2	RSD (%)
	0.01-4	3.12E+09	11.13	-2,34E+08	15.3	1	0.12

Tabella 17 parametri di qualità della curva di calibrazione dell'Imidacloprid

IV.2.6. Residui dell'Imidacloprid nelle olive a doppia attitudine.

I campioni di olive analizzate subito dopo il trattamento in campo con l'Imidacloprid hanno dimostrato un tenore di residuo pari a 2.88 mg/Kg, questo ultimo diminuisce di 18 volte nel giro di due giorni. Al decimo giorno il residuo presente nei campioni era pari 0.044 mg/Kg.

È da rimarcare che per principio attivo sopraccitato il LMR previsto nelle olive è pari a 0.5 mg/Kg, e come è riportato nella (**tabella 18**), già dal'secondo giorno dopo il trattamento, il residuo di pesticida presente nelle olive è tre volte minore del LMR stabilito dalla normativa.

	Trattamento con una dosi di etichetta
Giorni dal trattamento in campo	Residui di Imidacloprid (mg/kg) \pm SD
0	2.88 \pm 2.23
2	0.16 \pm 0,03
4	0.12 \pm 0,08
10	0.044 \pm 0,01

Tabella 18- Evoluzione dei residui (mg/kg \pm DS) dell'Imidacloprid nelle olive a doppia attitudine dopo il trattamento in pieno campo.

IV.2.7.Degradazione dell'Imidacloprid in Soluzione NaOH al 2% e NaCl al 7%.

Con l'obiettivo di studiare il comportamento dell'Imidacloprid nelle soluzioni NaOH al 2% e NaCl al 7%, è stata monitorata la concentrazione del principio attivo nelle medesime per 10 ore, la (Figura 16) riporta la degradazione del pesticida in entrambi le soluzione nel tempo, come si può vedere, l'Imidacloprid nella soluzione di idrossido di sodio presenta una cinetica di degradazione veloce con un tempo di semivita pari a 2.5 ore, rispetto alla soluzione di cloruro di sodio dove il tempo di semivita calcolato era pari a 9.2 ore.

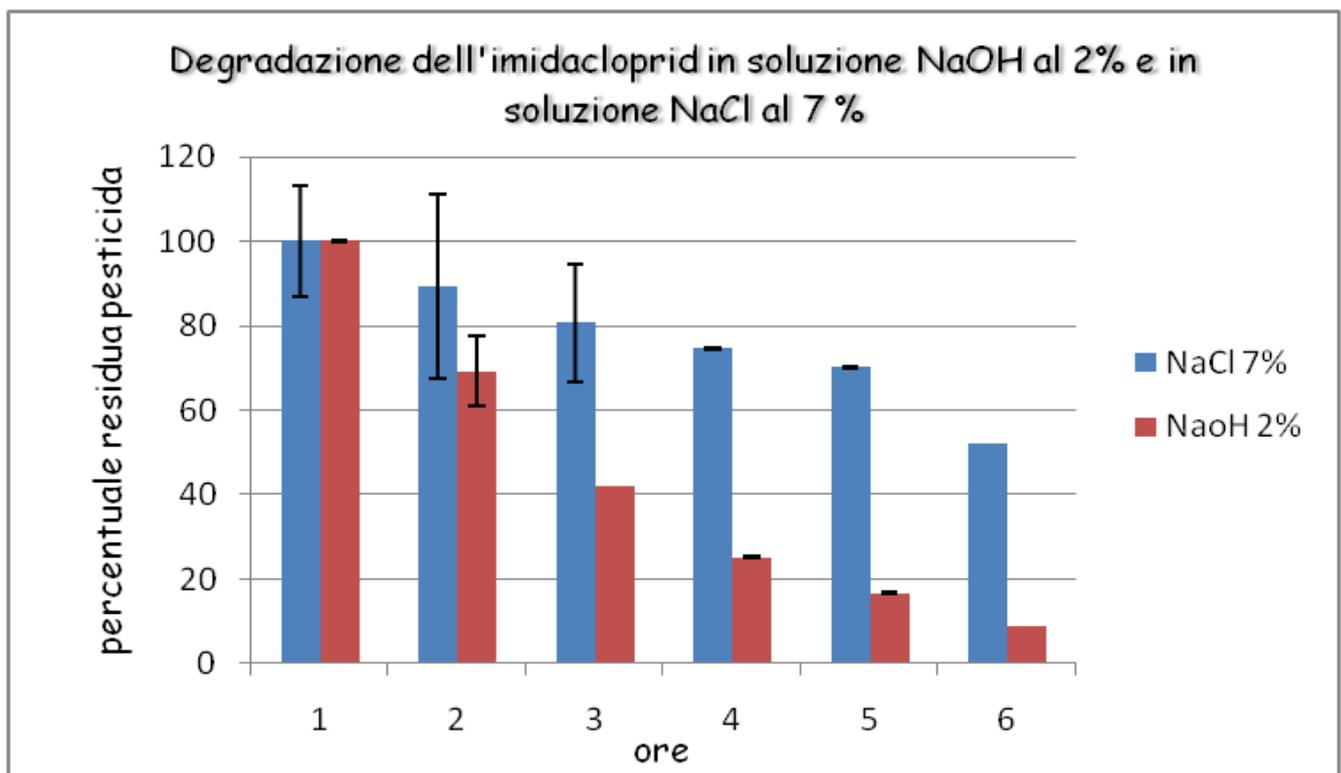


Figura 16 – Degradazione dell'Imidacloprid nelle soluzioni di Idrossido di sodio al 2% e Cloruro di sodio al 7%.

IV.2.8. Residui dell'Imidacloprid nelle olive da Tavola fatte con il metodo Sevigliano e con il metodo Greco.

La **figura 17**, illustra la degradazione dell'Imidacloprid nelle olive da tavola, il principio attivo in entrambi i tipi si è ridotto a meno del 40% nel secondo giorno, con una concentrazione pari a 0.03 mg/Kg nelle olive fatte con il metodo Sevigliano, e 0.05 mg/Kg nelle olive fatte con il metodo Greco. Questi valori di residuo sono inferiori al LMR fissato per l'Imidacloprid sulle olive da tavola dalla normativa in vigore (0.5 mg/Kg).

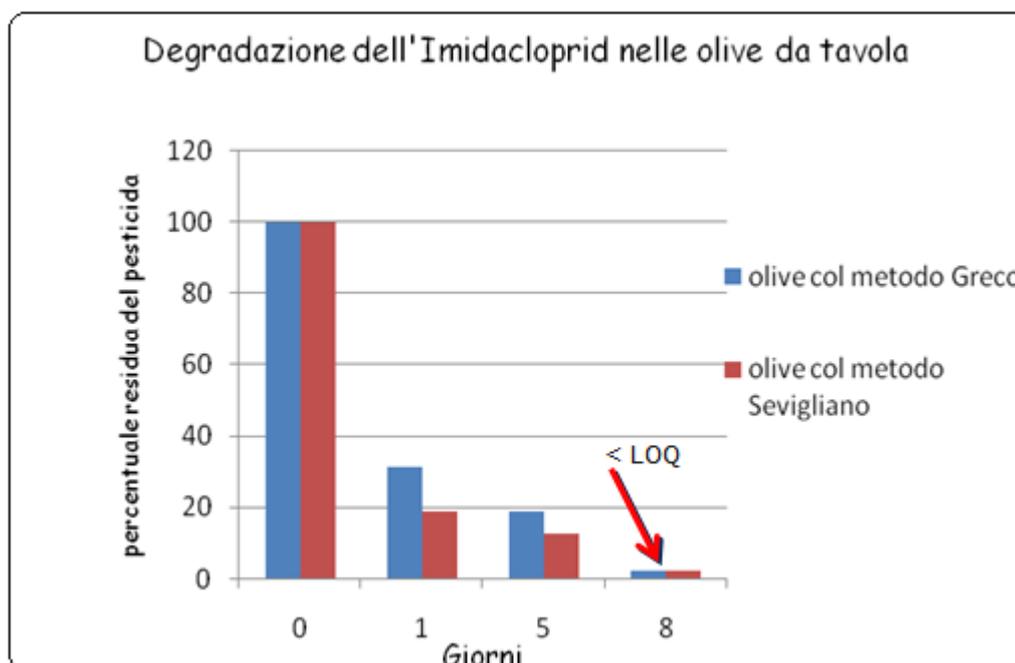


Figura 17. Residui dell'Imidacloprid nelle olive da tavola

IV.2.9. Ripartizione dell'Imidacloprid nel olio di oliva.

Prima della frangitura è stato analizzato un campione di olive, questo ultimo aveva un tenore di pesticida pari a 0.04 mg/Kg, dopo il processo di trasformazione, la percentuale di pesticida trasferita nell'olio era pari al 25%, con un coefficiente di ripartizione pari a 0,4 (**Figura 18**).

Il residuo riscontrato nell'olio d'oliva era pari a 0.01mg/Kg, ben al di sotto del LMR previsto dalla normativa attuale che è pari a 1 mg/Kg.

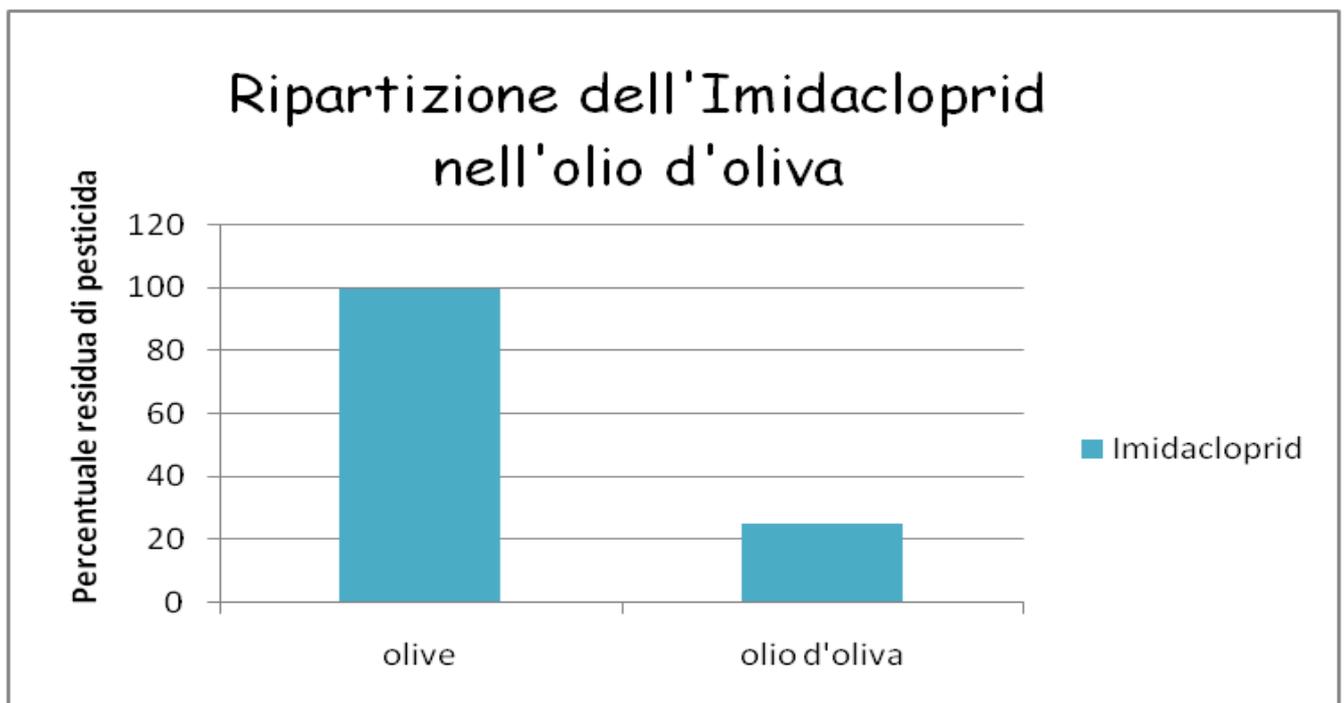


Figura 18. ripartizione dell'Imidacloprid nell'olio dopo la frangitura delle olive

IV.2.10. Conclusione

Per la determinazione dell'Imidacloprid e Spinosad sono state provate le due tecniche di ionizzazione ;ESI (Electrospray Ionisation) e APCI(Atmospheric Pressure Chemical Ionization) sia in modalità positiva che negativa, ed è stata scelta la tecnica ESI in modalità positiva per la determinazione di entrambi i principi attivi, visto che questa combinazione ha mostrato la risposta più intensa del rivelatore. L'identificazione e quantificazione dell'Imidacloprid nelle olive e nell'olio d'oliva è stata fatta in modalità MRM con due transizioni specifiche. La prima transizione, la transizione più intensa, è stata scelta per fornire una determinazione selettiva del pesticida, mentre la seconda transizione è stata utilizzata per conferma.

Per quanto riguarda in vece l'identificazione e la quantificazione dello Spinosad, è stata utilizzata la modalità SIM (selected ion monitoring), il picchi corrispondenti alle Spinosine A e D sono stati determinati in maniera selettiva mediante l'ione (M+H), e confermati mediante l'adotto al sodio (M+Na⁺).

Le metodiche analitiche sono facilmente applicabili per la determinazione e quantificazione dell'Imidacloprid e Spinosad in Tracia nelle olive e nei prodotti di trasformazione quali l'olio d'oliva e le olive da tavola, le metodiche sono risultati sensibili, efficaci, veloci, precisi, accurati e poco costosi.

Spinosad è stato registrato nel 2007, attualmente è autorizzato su numerose colture incluso sulle olive dal 2008, lo studio effettuato, ha dimostrato che questo principio attivo, in condizioni operative reali non lascia residui nei frutti e di conseguenza nei prodotti di trasformazione ossia, le olive da mensa e l'olio d'oliva.

Spinosad ha un coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua pari a 4.5, per cui la molecola si riparte preferibilmente nella fase oleosa durante il processo tecnologico di trasformazione delle olive i

olio d'oliva, l'olio ottenuto dalle olive trattate non conteneva residui di Spinosad, e questo è spiegabile con la totale degradazione del pesticida in campo sotto i diversi fattori ambientali.

L'Imidacloprid invece è stato registrato nel 2009, nel presente studio, il principio attivo si è dimostrato sicuro e applicabile con una scarsa persistenza sulla sopracitata coltura, in quanto lo stesso non lascia residui nei frutti dopo l'intervallo di sicurezza (28 giorni) dopo il trattamento. In questo esperimento, il residuo dell'Imidacloprid sulle olive in campo era pari a 0.16 ± 0.03 mg/Kg nel secondo giorno dopo il trattamento, ben al di sotto del limite massimo del residuo ammesso (LMR= 0.5 mg/Kg) fissato dalla normativa europea in vigore. Ugualmente per le olive da tavola, che al secondo giorno di immersione in salamoia presentavano un tenore in residuo di Imidacloprid pari a 0.05mg/kg per le olive fatte con il metodo Greco, e 0.03mg/Kg per le olive da mensa fatte con il metodo Sivigliano.

L'Imidacloprid è caratterizzato con un coefficiente Log Pow= 0.4, e quindi durante il processo di trasformazione delle'olive, il principio attivo si ripartisce preferibilmente nelle acque di vegetazione. il residuo da noi rilevato nelle olive ancora non trasformate in olio era pari a 0.04 ± 0.019 mg/Kg, dopo la trasformazione in 'olio è stato trovato un residuo pari a 0.01 ± 0.004 mg/Kg, valori sempre al di sotto del LMR, l'Imidacloprid è passato nell'olio con un fattore di ripartizione pari a 0.4.

Oltre a questo aspetto, la Normativa Europea di riferimento in materia dei LMR (Reg (CE) 396/2005), ha fissato limiti legali per i pesticidi sulle olive a doppia attitudine e sulle olive da tavola ma non sull'olio d'oliva.

Un pesticida presente nelle olive, a seconda delle sue proprietà fisico-chimiche può passare nell'olio con fattori di ripartizione peculiari, portando a volte a una concentrazione del residuo nell'olio poiché per l'ottenimento di un litro di olio ci vogliono una media di 5-6 kg di olive.

V. La degradazione dello Spinosad ed Imidacloprid in presenza e non di cere epicuticolari

V.1. Introduzione

Nelle condizioni tipiche di applicazione in campo, solo una piccola parte del pesticida applicato raggiunge la sua destinazione finale per esercitare la sua attività insetticida sul bersaglio biologico, la maggior parte invece viene dispersa nell'ambiente dove andrà incontro a processi di degradazione biotica, abiotica e fotochimica, quest'ultimi forzeranno la trasformazione chimica (riarrangiamenti strutturali, ionizzazione, isomerizzazione frammentazione) della molecola madre portano nel tempo alla riduzione del carico ambientale dei contaminanti, e di solito alla formazione di prodotti meno tossici della molecola di partenza, ma in alcuni casi anche alla formazione di prodotti con tossicità maggiore rispetto alla molecola madre (30). Alcune molecole di antiparassitari, per la loro struttura e proprietà fisico chimica, sono resistenti alla degradazione, e quindi rimangono invariati nelle ecosistemi per lunghi periodi di tempo con tutti i rischi connessi.

La velocità di degradazione di un dato composto è determinata dalla sua struttura molecolare di base, solubilità, polarità, ionizzazione e il tipo di formulazione commerciale nonché dalla irradiazione solare, tipo e quantità di microrganismi contenuti nel terreno, umidità e temperatura del terreno.

In ambiente acquoso e nel suolo, i pesticidi reagiscono chimicamente; in presenza dell'acqua o di ossigeno essi sono soggetti ad ossidazione, idrolisi, isomerizzazione. Nelle acque di superficie e nelle strati superiori del terreno e sulla superficie delle piante, la degradazione può essere accelerata dalla fotolisi. Questa ultima si verifica quando la molecola possiede una banda o almeno una coda d'assorbimento nella zona d'emissione della radiazione solare al suolo (principalmente UV-A con quantità variabili di UV-B, $\lambda > 300\text{nm}$), quindi se sono presenti gruppi funzionali quali doppi legami o sistemi aromatici o eteroaromatici, nitro gruppi, ecc. L'irradiazione diretta promuove la molecola di un xenobiotico nel suo stato eccitato che poi decade secondo una serie di processi di disattivazione fisici e/o chimici.

La fototrasformazione degli xenobiotici può essere di tipo diretto attraverso uno stato eccitato o indiretta "foto sensibilizzazione o quenching".

Nell'ambiente naturale esiste un'ampia varietà di composti che possono agire da sensibilizzatori e promuovere la trasformazione di numerosi inquinanti mediante un processo di fotolisi indiretta, ad esempio gli acidi umici del suolo, alcuni componenti delle cere epicutcolari delle piante (flavonoidi, chetoni ed alchili a catena lunga) e la sostanza organica disciolta (30,31).

Alcuni studi hanno dimostrato che alcuni componenti delle cere epicutcolari possono agire da *Quenchers* ossia donatori di protoni conducendo ad una fotodegradazione indiretta (32).

Le superficie delle piante, particolarmente quelle fogliari, costituiscono l'ambiente delle prime reazioni di una molecola di antiparassitari dopo l'applicazione. La fotolisi su la superficie del suolo invece, diventa importante quando un pesticida è applicato direttamente sul terreno (non ombreggiato con la copertura fogliare dai raggi solari) o non in modo significativo intercettato dalle piante. L'intercettazione fogliare dei pesticidi dipende dalla specie di piante e di solito aumenta con la loro fase di crescita (34).

Sulla superficie delle piante , i pesticidi si muovono attraverso i tessuti vegetali per assorbimento nel caso degli antiparassitari sistemici, o diffusione nel caso dei pesticidi non sistemici.

La fotolisi sulla superficie vegetale è controllata da una serie di fattori, tali i fattori ambientali, il tipo di formulazione del pesticida, condizioni di illuminazione, temperatura, pH, ed il contenuto in cere epicuticolari delle piante.

V.2. Anatomia Fogliare.

Sulla superficie delle foglie e frutta sono presenti diverse molecole apolari (idrocarburi, chetoni, alcoli, aldeidi, esteri, acidi grassi ecc) (35) che formando una cuticola comunemente chiamata “cere epicuticolari” (**figura18**), è una struttura molto complessa costituita da uno strato di pectina che lega la cutina internamente alle pareti delle cellule epidermiche ed esternamente ad uno strato di cere epicuticolari.

Le cere epicuticolari rappresentano un'interfaccia multifunzionale tra la pianta e l'esterno, svolgendo importanti ruoli funzionali e fisiologiche come la resistenza al congelamento, il mantenimento del bilancio idrico, la protezione contro patogeni, radiazioni UV e inquinanti (36).

La composizione e la quantità delle cere varia al variare delle specie vegetali, e anche nella stessa specie i depositi di cera variano in funzione del grado di maturazione, stadio di crescita, condizioni atmosferiche(37).

Le cere, oltre a rappresentare una importante barriera alla penetrazione di pesticidi, hanno, anche, la caratteristica di influenzare la loro velocità di fotodegradazione³, e quindi la persistenza di un pesticida. Dato che maggior è la persistenza del pesticida su un alimento maggiore è il rischio potenziale del consumatore, la conoscenza dell'effetto delle cere epicuticolari sulla persistenza del pesticida può fornire importanti informazioni su come mitigare la presenza di residui e salvaguardare la salute dei consumatori.

Negli studi riportati nel *Pesticide Fact Sheet* dell' EPA e nel report FAO *Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides* della Food and Agriculture Organization (FAO), evidenziano che la fotodegradazione rappresenta il processo di scomparsa predominante sia per l'Imidacloprid che per lo Spinosad.

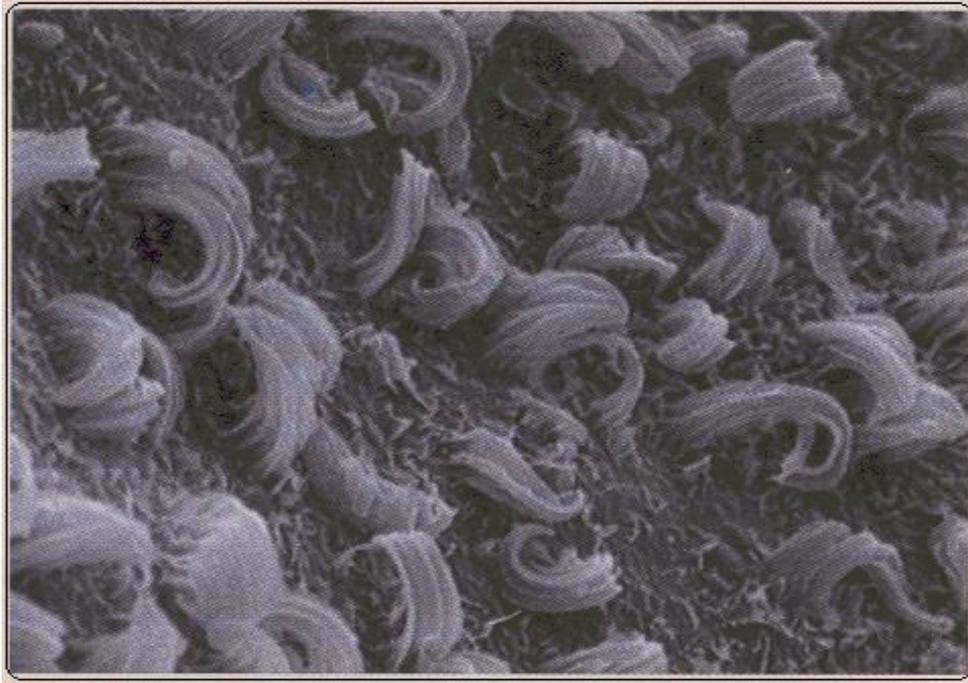


Figura 19. Struttura delle cere epicuticolari

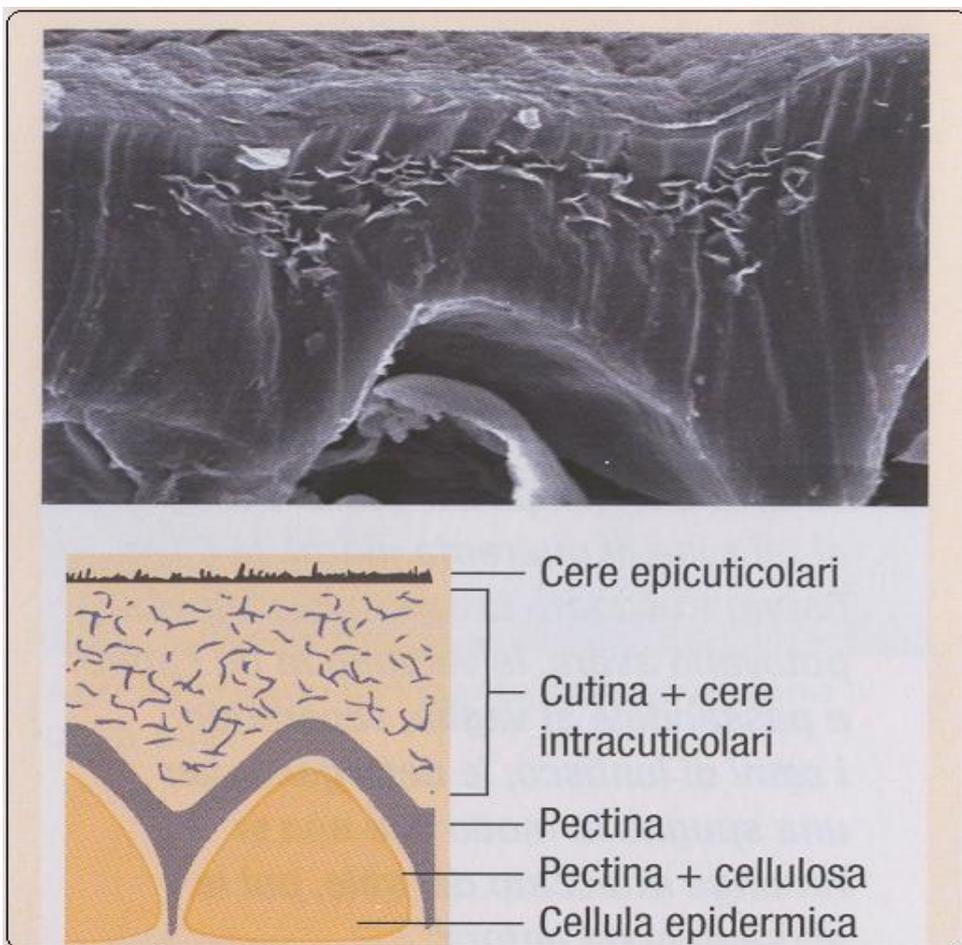


Figura 20. Struttura dell'epicarpo o Cuticola

Questo esperimento aveva come obiettivo la verifica della contribuzione delle cere epicuticolari delle olive sul processo fotodegradativo dei due pesticidi in condizioni ambientali simulate, a tale proposito, è stato posto in capsule petri uno strato sottile di standard a cui è stato aggiunto l'estratto di cere alla stessa concentrazione presente sulle olive ($72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Le capsule petri dopo aver fatto evaporare il solvente al buio e a temperatura ambiente, sono state irradiate al sole per 8 ore, e ad intervalli di tempo predeterminati, i campioni sono stati prelevati, estratti ed analizzati. Un campione di riferimento è stato conservato al buio ed a temperatura ambiente. Ogni esperimento è stato replicato 3 volte.

V.3. Estrazione delle cere dalle olive.

L'estrazione delle cere epicuticolari dalle olive è stata effettuata secondo il metodo di McDonald (38). Una quantità nota di olive non trattate con pesticidi è stata immersa in cloroformio per 1 minuto; successivamente 10 mL di estratto così ottenuto sono stati portati a secco sotto un flusso d'azoto, permettendo di ottenere per pesata la quantità totale di cere nell'estratto. Dopo aver calcolato la superficie delle olive, si è proceduto a determinare la quantità di cera presente per unità di superficie ($72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

V.4. Silanizzazione vetreria

Per tutti gli esperimenti di fotochimica, sono state utilizzate piastre petri in vetro silanizzate o rese idrofobiche mediante il processo di silanizzazione. Tale processo permette di rendere idrofobiche alcune superfici come quarzo, silicio e vetro. Le piastre di vetro sono state immerse in una soluzione al 5% di dimetilclorosilano in toluene

Praticamente il cloro presente nella molecola del DMCS, si unisce all'idrogeno direttamente legato al silicio, attraverso un legame covalente, staccandosi dalla molecola e lasciando l'ossigeno direttamente legato al silicio presente nel dimetilclorosilano, che a sua volta risulta legato al gruppo metile, rendendo in questo modo idrofobica la faccia esterna. Figura IV.2.

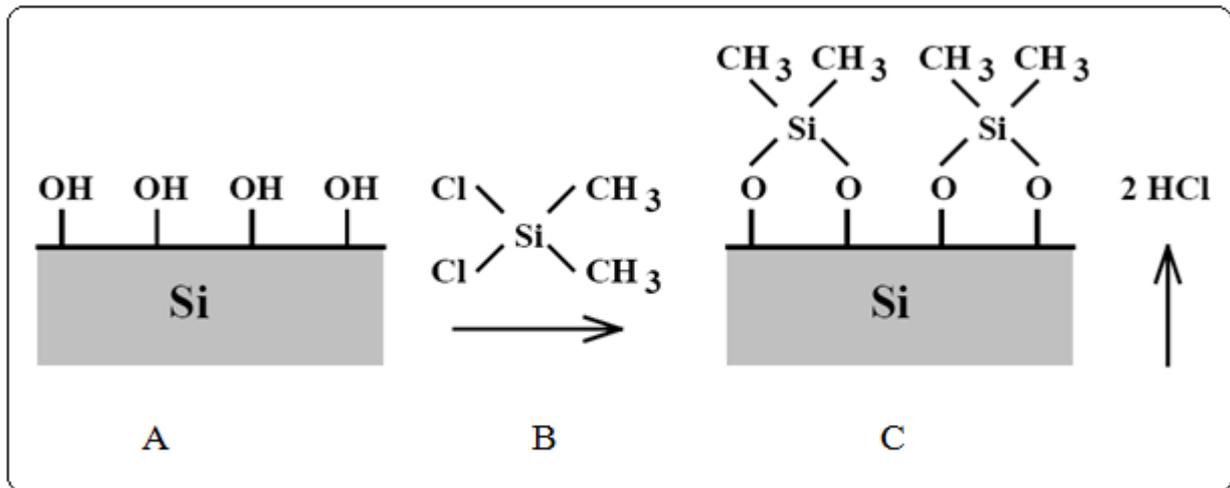


Figura 21. Procedura di silanizzazione : A – il substrato prima di essere silanizzato, B-la molecola introdotta del DMCS, C- il substrato silanizzato con la liberazione dell'acido cloridrico

Le piastre sono state successivamente immerse in esano, acetone e ancora esano per 15 minuti, per eliminare le molecole assorbite in eccesso.

V.5. Materiali e metodi

V.5. 1. Prodotti Chimici

Gli standard di Spinosad (miscela di $C_{41}H_{65}NO_{10}$ (spinosyn A) + $C_{42}H_{67}NO_{10}$ (spinosyn D al 85%:15%), e Imidacloprid (1-((6-Cloro-3-piridinil) metil)-N-nitro-2-imidazolidinimmina), erano di grado analitico, acquistati rispettivamente dalla Dow AgroSciences e dalla Bayer.

L'acqua deionizzata è stata ottenuta utilizzando un sistema Milli-Q ((Milli-Q, M Millipore, Elix, Q PoD^R). Tutti i solventi utilizzati erano di grado analitico HPLC, acquistati dalla Merck (Darmstadt, Germany), L'acetone, l'acido formico sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milan, Italy). L'ammonio acetato era di grado analitico acquistato dalla Merck.

V.5. 2. Strumentazione e analisi

Le analisi sono state fatte con un sistema HPLC Agilent serie 1100 munito di una pompa quaternaria, degassatore, auto campionatore e porta colonna termostatati, rivelatore UV 6000 della Thermo Finnigan e software ChemStation per la gestione del sistema HPLC, l'integrazione, il calcolo e la quantificazione del residuo dei pesticidi.

Per la separazione cromatografica di entrambi i pesticidi, è stata utilizzando una colonna Eclipse XDB-C18 (Agilent) 150 x 4.6 mm , 5 μ m.

V.5. 3. Condizioni cromatografiche

Per la separazione delle Spinosine A e D, la fase mobile era costituita da: (A) acetonitrile 88%(v/v) e 12% (v/v) (B) una Soluzione al 2% di ammonio acetato in acetonitrile 67:33% (v/v), a un flusso pari a 0,5 mL min⁻¹. Il volume di campione iniettato era di 50 μ L. l'intera analisi cromatografica e' stata condotta alla lunghezza d'onda di 250 nm.

Per la separazione cromatografica dell'Imidacloprid, la fase mobile era costituita da una miscela acetonitrile/acqua 10/90 (v/v). il volume di iniezione era 10 μ L, tutta l'analisi è stata condotta alla lunghezza d'onda di 270 nm.

V.6. Risultati e discussioni

V.6.1. Tempo di semivita($T_{1/2}$) dello Spinosad in presenza e non di cere epicuticolari

La velocità di degradazione di Spinosad è stata calcolata come cinetica di pseudo-primo ordine. La (**Figura 22**) mostra la degradazione e i tempi di semivita del principio attivo in presenza e non di cere.

Il tempo di emivita dello Spinosad irradiato senza cere è di 57 min. Le cere epicuticolari delle olive aumentano la velocità di degradazione dello Spinosad ($t_{1/2}$ =38 min). E' stato ipotizzato che alcuni composti presenti nelle cere assorbano le radiazioni solari agendo da foto sensibilizzatori o *Quencher* in grado di aumentare la velocità di fotodegradazione.

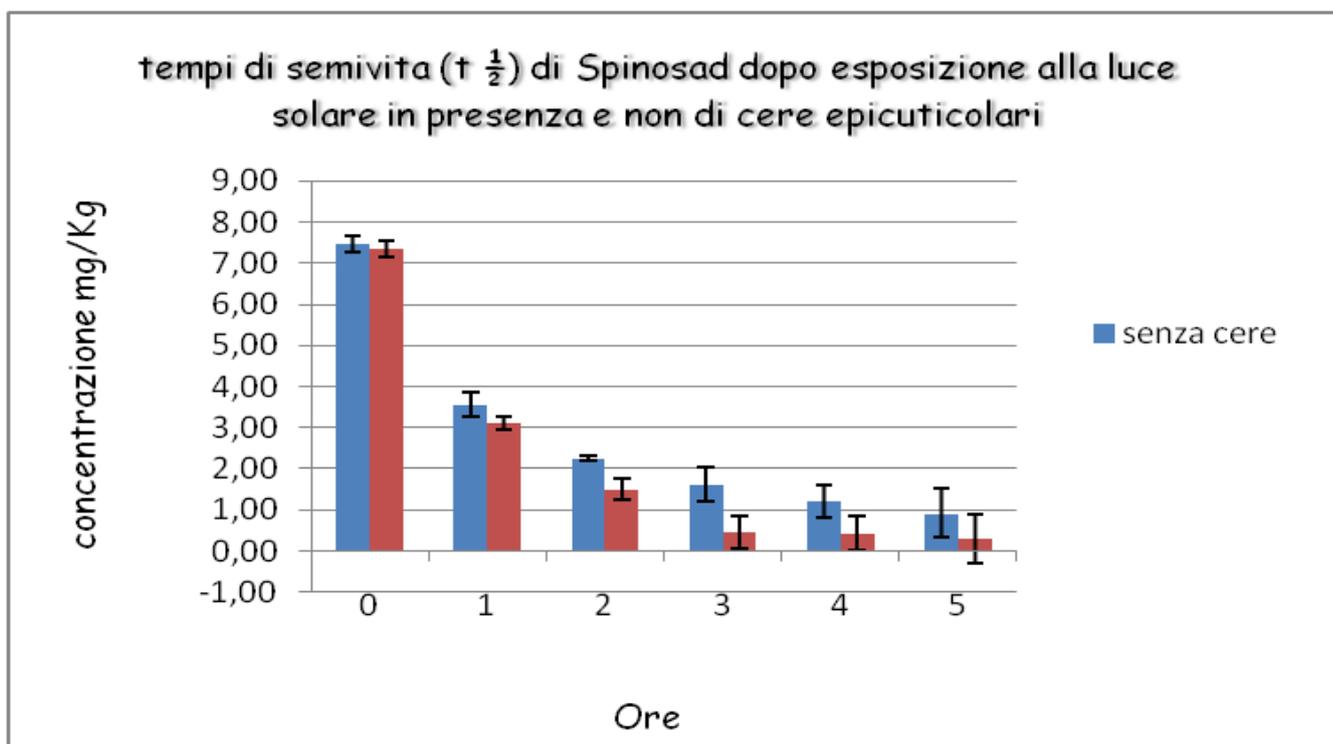


Figura 22 . Fotodegradazione di Spinosad in presenza e non di cere epicuticolari delle olive

V.6.2. Tempo di semivita($T_{1/2}$) dell'Imidacloprid in presenza e non di cere epicuticolari

L'Imidacloprid, come evidenzia la (**figura 23**), ha dimostrato un tempo di dimezzamento pari a 15 ore, questo ultimo è stato diminuito in presenza delle cere epicuticolari delle olive ($T_{1/2} = 4$ ore).

Questo aumento nella velocità di degradazione è dovuto probabilmente, al fatto che alcune componenti delle cere delle olive, agiscono da fotosensibilizzatore, trasferendo l'energia solare assorbita, alle molecole del principio attivo catalizzandone così la fotodegradazione.

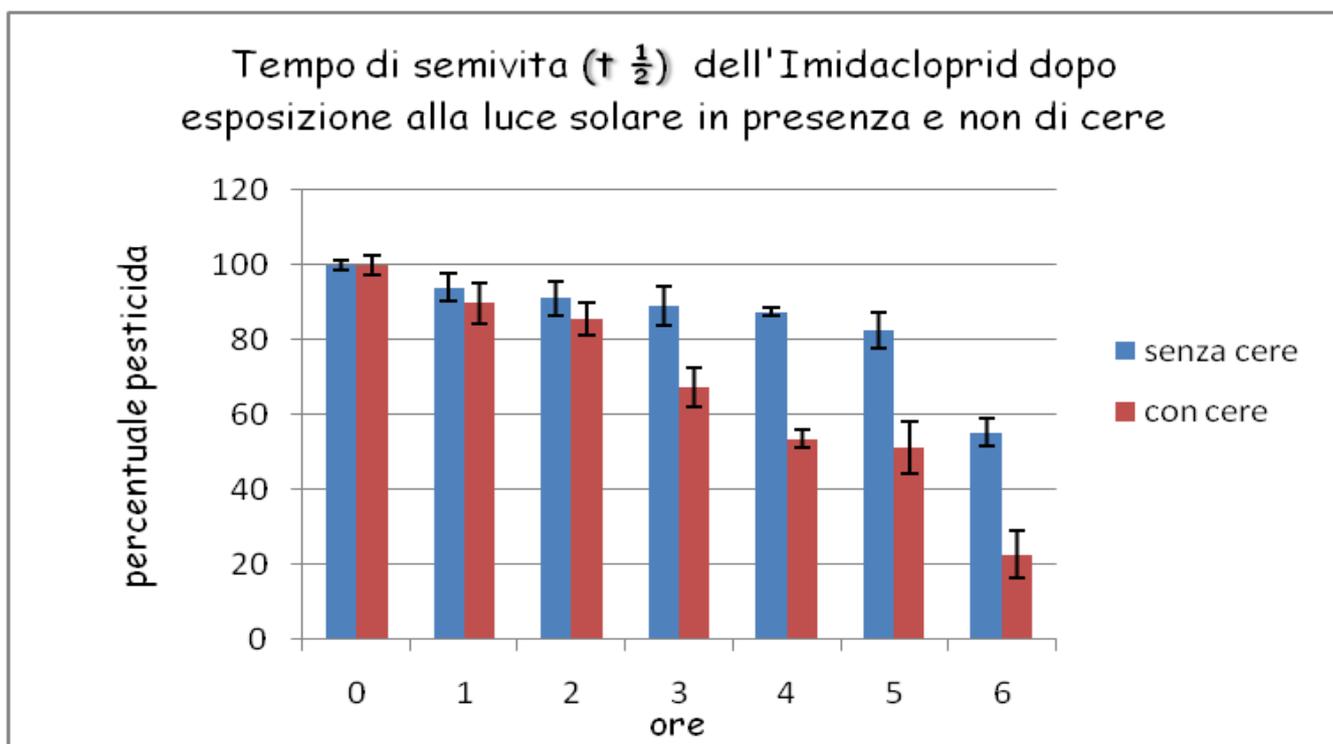


Figura 23 . Fotodegradazione dell'Imidacloprid in presenza e non di cere epicuticolari delle olive

V.7. Conclusione

Lo studio effettuato dimostra che le cere epicuticolari presenti sulla superficie delle olive influenzano lievemente la fotodegradazione e quindi il tempo di semivita dello Spinosad. Però incidono notevolmente sulla degradazione del secondo principio attivo studiato, infatti il tempo di dimezzamento dell'Imidacloprid è stato ridotto di 11 ore in presenza di cere. In condizioni ambientali reali, questi meccanismi giustificano in parte la scomparsa dei principi attivi dopo l'applicazione sull'olivo.

Bibliografia

1. G. Bacci del bene, E. Cairra, B Ferrari. *Prova di lotta contro la mosca delle olive (Dacus oleae Gmel) con esche proteiche avvelenate* .Ann.Ist.Sperim.Zool.Agr.1975
2. H. A. Kirst, K. H. Michel, J. S. Mynderse, E. H. Chao, R. C. Yao, W. M. Nakatsukasa, L. D. Boeck, J. Occlowitz, J. W. Paschel, J. B. Deeter, and G. D. Thompson: *Discovery, isolation and structure elucidation of a family of structurally unique fermentation-derived tetracyclic macrolides, in "Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III"* .Am. Chem. Soc., , 1992 pp. 214–225.
3. EPA. 1997. *Spinosad Pesticide Fact Sheet No. HJ 501C*. EPA, Office of Pesticides and Toxic Substances..
4. C. V. De Amicis, J. E. Dripps, C. J. Hatton, e L. L. Karr. *Physical and biological properties of the spinosyns: novel macrolide pest-control agents from fermentation, in "Phytochemicals for Pest Contro* .Am. Chem. Soc., 1997 pp. 144–154.
5. C. B. Cleveland, G. A. Bormett, D. G. Saunders, F.L. Powers, A. S. Mcgibbon, G. L. Reeves. *Environmental Fate of Spinosad;Dissipation and Degradation in Aqueous Systems*.J. Agric. Food Chem. 2002, 50,pp 3244-3256.
6. S. D. West, L.T. Yeh, D.A. Shwedler, L.G.Turner, A.D.Thomas, e D.O. Duebelbeis. *Determination of spinosad and its metabolite in food and environmental matrices. I. Highperformance liquid chromatography with ultraviolet detection*. J. Agric. Food Chem. 200048, pp 5131-5137.
7. EPA. 1997. *Spinosad Pesticide Fact Sheet No. HJ 501C*. EPA, Office of Pesticides and Toxic Substances. www.epa.gov.

8. G. B. Watson. *Actions of Insecticidal Spinosyns on γ -Aminobutyric Acid Responses from Small-Diameter Cockroach Neurons*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (2001)71, pp 20–28
9. L. V. Salgado, J. J. Sheets, G. B. Watson, e A. L. Schmidt: *Studies on the Mode of Action of Spinosad: The Internal Effective Concentration and the Concentration Dependence of Neural Excitation*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (1998) 60, pp 103–110.
10. A. Sannino. *Determination of three natural pesticides in processed fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007; 21: pp 2079–2086.
11. Anjali. S; Srivastava. A; Ram. B. Srivastava. P.C. *Dessipation behavior of Spinosad insecticides in soil, cabbage and cauliflower under sub-tropical conditions*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food and Chemistry*. ISSN: 1579-4377.
12. Bayer Method 00200. *Method for the Determination of Total Residues of Imidacloprid in Plant Materials and Beverages*, Reformatted, Miles Report Number 102624-R1, February 23, 1994.
13. K. W. Dorschner,. *Imidacloprid: Magnitude of residues on cranberry*, Center for Minor Crop Pest Management Technology Centre of New Jersey IR-4 PR No. 2000
14. C.D.S.Tomlin, *The Pesticide*, 13th Ed., British Crop Protection Council, Surrey, UK, 2003pp 898-900.
15. EuPesticidesdatabase:http://ec.europa.es/food/plant/protection/pesticides/database_pesticides_en.htm
16. M.Tomizawa, and I.Yamamoto. *Structure-activity relationships of nicotinoids and Imidacloprid analogus*. *J.Pesticide Sci.* 1993. 18, pp 91-98.

17. K. Shiokawa, S. Tsuboi, S. Kagabu, and K. Moriya. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* (1986) 61-267575.

18. S. Kagabu, K. Moriya, K. Shibuya, Y. Hattori, S. Tsuboi and K. Shiokawa. *1-(6-Halonicotinyl)2-nitromethylene-imidazolidines as potential new insecticides*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992. 56(2), pp 362-363.

19. R. Zwart, M. Oortgiesen, and H.P.M. Vijverberg. *Nitromethylene heterocycles: Selective agonists of nicotinic receptors in locust neurons compared to mouse N1E and BC3H1 cells*. *Pestic. Biochem. Physiol.* (1994) 48, pp 202-213

20. JMPR. *Pesticide residues in food – 2000*. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. FAO Plant Production and Protection Paper 167.

21. I. Marko, R. Sreten, K. Natalija, E. Ljubisav, I. Sinisa. *Application of Imidacloprid through the leaf and potato tuber in the control of the Leptinotarsa Decemineata Say*. *ISHS Acta Horticulturae* 462.1996.

22. Altmann, R.; Elbert, A. *Imidacloprid Ein neues Insektizid für die Saatgutbehandlung in Zuckerrüben, Getreide und Mais*. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 1992, 8, 212-221.

23. Elbert, A.; Overbeck, H. *Imidacloprid, a novel systemic nitromethylene analogue insecticide for crop protection*. *Brighton Crop Prot. Conf.sPests Dis.* **1990**, 2, 21-36.

24. Tomizawa, M. ; Todd, T. T; Maltby, D.; Durkin, A.K.; Medzihradszky, F.K.; Burlingame, A.L.; Taylor, P. and Casida, J.E: *Mapping the elusive e neonicotinoid binding site*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*2007.

25. Sheets, L. P. Imidacloprid: A Neonicotinid Insecticide. *Handbook of Pesticide Toxicology*, 2nd ed.; Krieger, R. I., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2001; Vol. 2, Chapter 54, pp 1123-1130.
26. Larry P. Sheets Imidacloprid: a Neonicotinoid Insecticide. *Handbook of pesticide toxicology*. 2001 (2)
27. C. A. Johansen e D. F. Mayer. *Pollinator protection handbook* 1990.
28. R. Schmuck, R. Schoning, A. Stork, e O. Schramel. *Risk posed to honeybees (Apis mellifera: Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers*. *Pest Manag. Sci.* 2001(57). pp 225–238.
29. D. Guez, S. Suchail, M. Gauthier, R. Maleszka, L.P. Belzunces. *Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day- old honeybees (Apis mellifera)*. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2001 76: 183- 191.
30. N. Aharonson. *Potential contamination of groundwater by pesticides*. *Pure Appl. Chem.* 1987 (59) pp 1419-1446.
31. N.K. Verma, R.L. Pitliya, V.K. Vaidya, S.C. Ameta. *Photo-sensitized oxidation of O,O-dimethyl O-4-nitro-m-tolyl hosphorothioate by singlet oxygen*. *Asian J Chem* 1991 3 pp 260–263.
32. M. Fukushima e T. Katagi. *Photodegradation of Fenitrothion and Parathion in Tomato Epicuticular Waxes* . *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 pp 474-479.
33. F.M. Pirisi, A. Angioni, M. Cabizza, P. Cabras e C. Falqui. *Photolysis of pesticides: influence of epicuticular waxes from Persica laevis DC on the photodegradation in the solid phase of aminocarb, methiocarb and fenthion* .*Pest Manag Sci* 2001 57 pp 522-526

34. J. Linders, H. Mensink, G. Stephenson, D. WauchopeJ: *Folira Interception and Retention Values After Pesticides Application a Proposal for Standardized Values For Environmental Risk Assissement*. Pure Appl. Chem.. 2000 (72) 11 pp. 2199–2218.
35. P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, E.V. Minelli. *Effect of the epicuticular waxes of fruits on the photodegradation of fenthion..* J Agric Food Chem. 1997, 45 pp 3681-3683.
36. J.C. McFarlane. *Anatomy and physiology of plant conductive systems*. In: Trapp S, McFarlane JC (eds) *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Lewis, Boca Raton, FL, (1995) pp 13–34.
37. G. Bianchi. *Plant waxes. Waxes: Chemistry, Molecular Biology and Functions*, vol 6. The Oily Press, Dundee, 1995 pp 175–222.
38. R.E. McDonald, H. E. Nordby, G. McCollum. *The epicuticular wax morphology and composition are related to grapefruit chilling injury*. HortScience 1993, 28, pp 311-312.

