GIAN PIETRO MOLINARI
ATTILIO DEL RE

PAOLO DALLATORRE
GIORGIO CORTI

EMANUELA RONDELLI

Istituto di Chimica, sezione di Chimica Agraria Vegetale - Facoltà
di Agraria - Piacenza

PERSISTENZA DEL CYMOXANIL IN PRODOTTI ORTICOLI

Il controllo delle infezioni parassitarie di origine fungina è senza dubbio uno dei maggiori problemi relativi alle colture orticole destinate all'industria di trasformazione.

Tra i principi attivi (p.a.) commercializzati recentemente e destinati a colture intensivo-industriali come pomodoro, cipolla, pisello, spinacio, aslio etc., è da ricordare, per la sua efficace azione preventiva e curativa (1), per la sua scarsa persistenza (2) e per la facile degradazione ad un metabolita non tossico quale la glicina (3), il cymoxanil (sia D.P.X. 3217 o Curzate). Le quantità di p.a. distribuite sono modeste, 80-200 g/ettaro e non è facile valutare quantitativamente il livello di residui nelle derrate alimentari trattate.

Scopo della presente ricerca è la misura del cymoxanil residuo, a diversi tempi dall'ultimo trattamento, in alcune delle colture più importanti: pisello (Pisum sativum), spinacio (Spinacia oleracea) e cipolla (Allium cepa). Da questo tipo di ricerca è possibile ricavare indicazioni sul valore del tempo di carenza più opportuno per garantire tanto l'efficacia fitoiatrica quanto la sanità della produzione. A tale fine sono state condotte prove agronomiche "ad hoc" sulle tre colture, secondo i criteri elaborati dal GIFAP (International Group of National Associations of Manufactures of Agrochemical Products) in ambito FAO/WHO (4).

Lavoro eseguito con un contributo del C.N.R. nell'ambito del P.F. I.P.R.A. sottoprogetto 3. Pubblicazione n. 115.

Materiali e metodi.

In ogni prova, per ogni coltura, sono state messe a confronto 4 tesi, in un disegno sperimentale a quadrato latino: A) non trattato; B) trattato alla dose minima normalmente consigliata; C) trattato alla dose massima normalmente consigliata; D) alla dose doppia della massima.

I) Spinaci. In collaborazione con la società Ravit, terreno a medio impasto tendente a sciolto, in località Alfonsine (Ravenna), e' stato seminato con spinaci varietà 'melody'. Parcelle di 5 m x 5 m sono state trattate il 7/05 ed il 17/05/82 alle dosi indicate in tab.1 con motorompa munita di barra da 5 m di larghezza, impiegando 800 e 1000 L/ettaro di miscela, rispettivamente per il primo ed il secondo trattamento. I campioni analitici sono stati raccolti il 7/05 a 2 ore dal trattamento ed il 25/05/82.

II) Piselli. In collaborazione con la società Schering, a Gossolengo (Piacenza) su terreno a medio impasto seminato a pisello, varietà 'mini', e diserbato in pre-emergenza con methabenzthiazuron alla dose di 1,96 kg/ettaro, parcelle di 5 m x 10 m sono state trattate il 7/05, il 17/05 ed il 27/05/82, con motorompa a spalla con barra da 2 m, distribuendo 600 L/ettaro di miscela, alle dosi indicate in tab.2. I campioni analitici sono stati raccolti il 27/05 a 2 ore dal trattamento, il 7/06 ed il 16/06/82.

III) Cipolle. In collaborazione con la società Schering, a Monticelli d'Ondina (Piacenza), su terreno a medio impasto tendente allo sciolto seminato a cipolla, varietà 'dorata di Parma', e diserbato in pre-emergenza con pendimethalin + propachlor a 1,65 + 2,6 kg/ettaro ed in post-emergenza con dinoseb acetate a 0,9 kg/ettaro, parcelle di 5 m x 10 m sono state trattate il 7/06, il 18/06, il 30/06 ed il 12/07/82 con la stessa attrezzatura utilizzata per il pisello ed alle dosi indicate in tab.3. I campioni analitici sono stati prelevati il 12/07 due ore dopo il trattamento, il 22/07 ed il 30/07/82.

I campionamenti sono stati eseguiti in accordo con le norme BIFAP (4), rispettando criteri di completa randomizzazione e casualità per garantire l'attendibilità statistica.

Dopo la raccolta, i campioni sono stati surselati e conservati a -25 C fino al momento dell'analisi. Il cymoxanil residuo e' stato determinato mediante gascromatografia degli estratti organici purificati (5). Il metodo

gascromatografico non da' risultati soddisfacenti per campioni di cipolla; anche l'analisi per HPLC (6) ci ha dato scarsi risultati.

Per valutare gli effetti del tempo e della dose sul livello di residuo di Curzate, i dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA), eseguita considerando il quadrato latino come un blocco completamente randomizzato. L'analisi dei componenti attesi della varianza e' stata eseguita in modello II' ed in modello misto ponendo sempre il fattore RACCOLTA come fattore 'random' per stimare l'applicabilita' dei risultati alla generalita' dei casi possibili.

L'ANOVA e' stata ripetuta dopo trasformazione logaritmica dei dati, per stabilizzare la varianza, che e' spesso proporzionale alla media per i livelli di residui; i risultati non sono stati sostanzialmente diversi e non vengono qui riportati.

Tutti i dati sono stati inoltre utilizzati per una regressione multipla in cui il livello dei residui e' stato correlato, come variabile dipendente, con: 1) il tempo intercorso fra ultimo trattamento e prelievo; 2) la dose di applicazione; 3-5) le variabili dicotomiche che differenziano le tre colture (dati non riportati). Nell'ipotesi che la scomparsa dei residui segua un andamento almeno approssimativamente logaritmico (secondo una cinetica del 1o ordine), la regressione e' stata anche calcolata usando in luogo della variabile 1 il suo esponenziale (tab.5).

Risultati e discussione.

Spinaci

Il metodo di analisi adottato ha permesso l'identificazione e la determinazione quantitativa del p. a. contenuto nei campioni in modo soddisfacente. I risultati delle determinazioni sono esposti in tab.1.

Piselli

Anche per i campioni di pisello la tecnica di estrazione e di determinazione gascromatografica si e' dimostrata efficiente; i risultati delle analisi sono esposti in tab.2.

Tabella No 1 - Residui (ppm= mg/kg di peso fresco) di cumoxanil, a due tempi successivi al trattamento, in spinaci trattati con "R6 Stop R" (4,20% di cumoxanil + 79,5% di ossicloruro di rame al 50% di rame elementare). Medie $\pm$ deviazioni standard delle medie con 3 gradi di liberta' (GdL).

Tesi	Dose di cumoxanil (g/hL)	Residui (ppm)	
		I campionamento (2 ore)	II campionamento (8 giorni)
A	0,0	0,124 $\pm$ 0,048 a	0,238 $\pm$ 0,076 a
B	10,5	0,490 $\pm$ 0,225 a	0,178 $\pm$ 0,048 a
C	12,6	0,246 $\pm$ 0,040 a	0,125 $\pm$ 0,059 a
D	25,2	1,538 $\pm$ 0,320 b	0,180 $\pm$ 0,141 a

Nota: medie seguite da lettere usuali non sono significativamente diverse al test di Duncan a 95% di probabilita' (varianza d'errore = 0,09455; D = 0,60).

Tabella No 2 - Residui (ppm) di cumoxanil, a tre tempi successivi all'ultimo trattamento, in piselli trattati con il formulato "Efficax S" (5% di cumoxanil + 23% di folpet + 15,7% di Cu(II) come ossicloruro). Medie $\pm$ deviazioni standard delle medie con 3 GdL.

Tesi	Dose di cumoxanil (g/hL)	Residui (ppm)		
		I campionamento (2 ore)	II campionamento (10 giorni)	III campionamento (17 giorni)
A	0,0	0,184 $\pm$ 0,015 a	0,073 $\pm$ 0,004 a	0,101 $\pm$ 0,011 a
B	10,0	0,356 $\pm$ 0,096 a	0,128 $\pm$ 0,061 a	0,036 $\pm$ 0,003 a
C	12,5	0,535 $\pm$ 0,298 a	0,157 $\pm$ 0,024 a	0,064 $\pm$ 0,008 a
D	25,0	1,229 $\pm$ 0,174 b	0,158 $\pm$ 0,026 a	0,087 $\pm$ 0,025 a

Nota: medie seguite da lettere usuali non sono diverse al test di Duncan con 95% di probabilita' (varianza d'errore = 0,04512; D = 0,53).

CiPolle

La determinazione gascromatografica del p.a. residuo nei campioni e' difficile, a causa di una interferenza della matrice vegetale: tracce di p.a. si trovano anche nelle tesi non trattate. La presenza della sostanza interferente e' stata confermata anche da analisi di campioni in nostro possesso provenienti da altri campi, sicuramente non trattati ne' inguinati. In nessun caso e' stato possibile, nonostante ripetute purificazioni, eliminare tale interferenza. Il valore apparente del residuo nei campioni non trattati, a differenza di quanto si fa normalmente, non e' stato sottratto dai risultati, esposti in tab.3.

Analisi dei dati

L'analisi statistica dei dati relativi ai residui di cymoxanil contenuti nei campioni di spinacio (tab. 4) e' stata realizzata con un'ANOVA fattoriale a blocchi completamente randomizzati, tanto in modello misto (fattore DOSE: 'fixed'; fattore RACCOLTA: 'random'), quanto in modello

Tabella No 3 - Residui (ppm) di cymoxanil, a tre tempi successivi all'ultimo trattamento, in cipolle trattate con il formulato 'Efficax S' (5% di cymoxanil + 23% di folpet + 15,7% di Cu(II) come ossicloruro). Medie $\pm$ deviazioni standard delle medie, con 3 GdL.

Tesi	Dose di cymoxanil (g/hL)	Residui (ppm)		
		I campionamento (2 ore)	II campionamento (10 giorni)	III campionamento (17 giorni)
A	0,0	0,23 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,03
B	10,5	0,15 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,17
C	12,5	0,42 $\pm$ 0,16	0,56 $\pm$ 0,21	0,52 $\pm$ 0,35
D	25,0	0,62 $\pm$ 0,27	0,36 $\pm$ 0,17	0,25 $\pm$ 0,04

Nota: le medie non sono significativamente diverse al test di Duncan al 95% di probabilita' (varianza d'errore = 0,11264; D = 0,91).

II (fattore DOSE: 'random'; fattore RACCOLTA: 'random'). I due modelli non hanno messo in evidenza alcuna dipendenza dei livelli di residui dalle dosi di trattamento. L'ANOVA in modello misto ha indicato invece una dipendenza della quantità di cumoxanil residuo dai tempi di prelievo: la quantità di p.a. presente nei campioni si riduce non meno aumenta il periodo di tempo tra l'ultimo trattamento e la raccolta. L'interazione DOSE x RACCOLTA è risultata significativa sia in modello II sia in modello misto.

L'ANOVA (sommario non riportato) dei livelli di cumoxanil residuo nei campioni di pisello ha dato le medesime indicazioni; nessuna dipendenza dei residui dalle dosi di p.a. utilizzate nei trattamenti; riduzione della quantità di residuo per campioni raccolti a tempi successivi dall'ultimo trattamento; significatività dell'interazione DOSE x RACCOLTA in entrambi i modelli.

Per i campioni di cipolle, l'ANOVA (sommario non riportato) non ha messo in evidenza nessuna relazione tra quantità di residui nei campioni, dosi dei trattamenti e tempi di raccolta. È possibile che ciò sia dovuto a due fattori: 1) l'interferenza della matrice vegetale; 2) la imperfetta distribuzione delle parcelle nel quadrato latino, che rende problematica l'assunzione di completa randomizzazione.

Tabella No 4 - Sommario dell'ANOVA in modello misto e in modello II per i residui di cumoxanil in spinaci. Confronto fra dosi (D) e tempi di campionamento (R).

Causa di variazione					Errore		
sisla	GdL	Varianza	F	P	sisla	GdL	Varianza
D "fixed" e R "random"							
D	3	0,82391	0,98		DR	3	0,84365
R	1	1,40751	14,89	<0,01	E	24	0,09455
DR	3	0,84365	8,92	<0,01	E	24	0,09455
D "random" e R "random"							
D	3	0,82391	0,98		DR	3	0,84365
R	1	1,40751	1,67		DR	3	0,84365
DR	3	0,84365	8,92	<0,01	E	24	0,09455

Nell'analisi di regressione multipla, le variabili dicotomiche che dovevano differenziare le 3 colture sono risultate insignificanti, con $|t| < 1$; i dati riportati (tab.5) sono riferiti alla regressione multipla da cui le variabili dicotomiche sono state escluse. Il modello di regressione multipla e' ben applicabile a questi dati in quanto le due variabili indipendenti non sono risultate correlate ($r = -0,0043$). Il livello del cymoxanil residuo appare quindi sostanzialmente indipendente dal tipo di coltura trattata ma discretamente correlato con le dosi di applicazione e con il tempo trascorso dall'ultimo trattamento.

Si deve pero' osservare che la frazione della variabilita' totale giustificata dalla regressione, stimabile con R^2 , risulta pari a meno del 20 % ($R^2 = 0,17$). E' evidente che le cause di variabilita' non controllate in questa prova, ne' controllabili nel corso della produzione agricola hanno o possono avere effetti rilevanti sulle quantita' residue di cymoxanil.

Tabella No 5 - Sommario della regressione multipla con 2 variabili indipendenti (v.i.) e sua analisi della varianza. Variabile dipendente: livello di cymoxanil residuo (ppm).

v.i.	media	DS[media]	b	DS[b]	t	p
exp(tempo) (giorni)	4,66	4,09	-0,02535	0,00834	3,94	<0,001
dose di formulato						
al 5% di p.a. (g/hL)	247,15	175,71	0,00077	0,00019	-3,04	<0,001

coefficiente di correlazione multipla: $R = 0,41443$

- b: coefficiente di regressione.

- DS: deviazione standard.

Conclusioni

L'analisi statistica dei dati ha mostrato nel caso delle cipolle che nessun dato differisce significativamente dal bianco; allo stesso modo, sia

per spinaci che per piselli; un dato solo differisce dagli altri al test di Duncan: quello relativo alla tesi trattata con dose doppia della massima e campionata due ore dopo il trattamento.

L'analisi di regressione multipla ha confermato che il livello di cymoxanil residuo dipende, in condizioni di campagna, sia dalle dosi applicate sia dal tempo intercorso. Inoltre ha indicato che, nei limiti della variabilità riscontrata, la correlazione residuo/(tempo, dose) è indipendente dalla coltura trattata.

In condizioni di normale utilizzo del prodotto e rispettando i tempi carenza prescritti, si possono quindi ottenere livelli medi accettabili di cymoxanil residuo nelle derrate alimentari.

Riassunto

I residui di cymoxanil sono stati valutati su campioni di pisello, spinacio e cipolla provenienti da prove condotte secondo i criteri elaborati dal GIFAP. L'analisi della varianza dei dati ha mostrato che per piselli e spinaci il livello del cymoxanil residuo dipende dalle dosi impiegate e dal tempo fra trattamento e raccolta; per le cipolle non risultano differenze significative. L'analisi di regressione multipla ha confermato la dipendenza del residuo dalle dosi e dal tempo.

PERSISTENCE OF CYMOXANIL IN HORTICULTURAL PRODUCTS.

Summary

Cymoxanil residues have been determined in pea, spinach, and onion samples coming from trials planned according to the GIFAP standards. The analysis of variance of the data has shown that the level of residual cymoxanil depends upon both the applied quantity and the time elapsed between treatment and harvest of peas and of spinach; no significant dependence appeared for onion data. Multiple regression analysis confirmed the residue dependence on both quantity and time.

Bibliografia

- 1) GARIBALDI A., TAMIETTI G. (1980). Efficacia dei nuovi fungicidi sistemici nella lotta contro la peronospora del pomodoro. *Inf. Fitopatol.* 11, 41-44.
- 2) MOLINARI G.P., NATALI P., DEL RE A. (1982). Riduzione dei residui di anticrittosomici nel pomodoro impiegando miscele a base di Cymoxanil (Curzate). *Atti Giornate Fitopatologiche 1982 2*; CLUEB, Bologna, 49-56.
- 3) BELASCO I.J., HAN J.C-V., CHRZANOWSKI R.L., BAUDE F.J. (1981). Metabolism of [¹⁴C] Cymoxanil in grapes, potatoes and tomatoes. *Pest. Sci.* 12, 355-364.
- 4) FAO/WHO (1981). Joint FAO/WHO food standards programme "Guidelines on pesticide residue trials to provide data for the registration of pesticides and the establishment of maximum residue limits", *Monografia tecnica No 4*, GIFAP, Bruxelles.
- 5) MOLT R.F. (1979). Determination of residues of 1-(2-cyano-2-methoxyimino-acetyl)-3-ethylurea (DPX-3217) by gas-liquid chromatography. *Pest. Sci.* 10, 455-459.
- 6) MELONI M., FIRISI F.M., CABRAS P., CABITZA F. (1982). Residui di fungicidi su lattuga da serra. *Atti del convegno "Il controllo della contaminazione ambientale e del rischio tossicologico da fitofarmaci e fitoregolatori: esperienza di un gruppo di lavoro quinquennale"*, CNR, Roma, 179-190.

Lavoro eseguito col parziale contributo C.N.R. (I.P.R.A.); contratto No 83.01643.55.