

PAOLO CABRAS*, MARCO MELONI, FILIPPO M. PIRISI

*Centro Regionale Agrario Sperimentale - Cagliari

Istituto di Tecnica e Tecnologie Farmaceutiche - Università di Cagliari

PERSISTENZA DEL VINCLOZOLIN SU VITE : ESPERIENZA CONDOTTA IN SARDEGNA

Il vinclozolin è un fungicida dicarbossimidico usato in viticoltura per il controllo della Botrytis cinerea.

La legislazione italiana fissa per questo antiparassitario un residuo massimo nell'uva di 1,5 ppm ed un intervallo di sicurezza di 21 giorni. Numerosi autori in Italia ne hanno determinato i residui sull'uva (Barbina et al., 1978; Barbero e Gaia, 1979; Brandolini et al., 1979; Cabras et al., 1982; Conti e Leone, 1982; Flori et al., 1980 e 1982; Molinari et al., 1980 e 1981) ed in alcuni casi si sono trovati valori superiori ai limiti legali anche quando venivano rispettati i tempi di sicurezza previsti. I fattori che hanno determinato questi valori elevati dei residui sono probabilmente legati al concorso contemporaneo di diversi effetti, quali: andamento climatico, trattamento localizzato preferibilmente sul grappolo quando la operazione si effettua con irroratrici a spalla, effetto di accumulo dovuto a trattamenti ripetuti, rapporto superficie/peso del grappolo elevato, per cui, a parità di concentrazione di p.a. irrorato per unità di superficie, se il peso dell'uva è minore la concentrazione del residuo sarà maggiore.

Al fine di minimizzare i fattori che possono portare all'ottenimento di dati anomali e poter così valutare più uniformemente possibile la persistenza del vinclozolin su vite (uva e foglie), in condizioni operative reali, si è quindi predisposta, nell'ambito del GRIFA, una ricerca collabora-

tiva, cui hanno aderito, oltre alla nostra Unità di Ricerca operante in Sardegna, anche altre del Lazio, Piemonte, Emilia e Romagna, Lombardia e Friuli.

La ricerca prevede lo studio delle curve di degradazione, in base al quale sarà possibile determinare il tempo di sicurezza reale in condizioni ambientali diverse e chiarire i fattori che incidono sulla sua velocità di degradazione, impiegando modi di trattamento e campionature standardizzate.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta in un vigneto di uva bianca, cv "Nuragus", sito in agro di Monastir (CA), di 14 anni, allevato a tendone con sesto di impianto 3 x 3 m.

Su parcelle di 1/2 ha sono state irrorate dosi consigliate dalla Ditta (100 g di p.a./ha) e dosi doppie (2000 g/ha) utilizzando un atomizzatore a medio volume (600 l x ha) mod. AMICA ATIM 140 P 3.

Sono stati effettuati due trattamenti a calendario fenologico : uno all'invasiatura (11 Agosto) e l'altro a maturazione incipiente (5 Settembre).

I prelievi sono stati replicati 4 volte sul medesimo filare da parcelle di 15 x 3 m (10 ceppi) distanti fra loro 30 m.

I campioni sono stati prelevati il giorno del trattamento (prima del trattamento e 1 - 2 ore dopo) e a distanza di 1,2,5,12 (14),21 giorni dallo stesso. Sono stati prelevati campioni di foglie scegliendole, con tabelle dei numeri casuali, due per ciascuno dei dieci ceppi che costituivano la parcella, tra quelle completamente distese e all'altezza dei grappoli.

Dopo l'ultimo trattamento, contemporaneamente alle foglie, sono stati prelevati campioni d'uva, scegliendo casualmente un grappolo da ogni ceppo.

I campioni così ottenuti sono stati analizzati un'ora circa dopo il prelievo. Le analisi sono state effettuate utilizzando una metodica HPLC (Cabras et al., 1982). Questa consente la determinazione contemporanea del vinclozolin, della 3,5-dicloroanilina e del metabolita (II). Le condizioni meteorologiche sono state rilevate nel vigneto con un piranografo SO 2800 termoigrografo MT 1500, pluviografo UM 8100 (tutti dell' SIAP, Bologna).

SOLVENTI. Si è utilizzata acqua distillata filtrata attraverso un MilliQ (Millipore, Milano). Acetonitrile ed Etere di petrolio 40-60°C erano solventi per HPLC (Carlo Erba, Milano).

PRODOTTI. Il vigneto è stato irrorato utilizzato "Ronilan" al 50 % di principio attivo, gentilmente fornitoci dalla BASF Agritalia (Milano) insieme con lo standard analitico del vinclozolin (99.0 %).

La 3,5-dicloroanilina (3,5-DCA; 98.5 %) è un prodotto Fluka, mentre il metabolita del vinclozolin, N-(3,5-diclorofenil)-N-(2-metil-2-idrossi)-3-butenamide (II) è stato sintetizzato come riportato in letteratura (Del Re et al., 1980).

CROMATOGRAFIA. Si è utilizzato un cromatografo liquido Varian 5020 dotato di un detector UV/Vis a lunghezza d'onda variabile UV 50, un integratore HP 3390 A ed un iniettore Valco AH20 sul quale veniva montato un loop da 10 µL per concentrazioni di residui elevati ed uno da 50 µL per basse concentrazioni. La colonna utilizzata è una Hibar RP-8 (Merck) da 250x4,0 mm i.d. (10 µm) e le condizioni cromatografiche sono le seguenti: miscela eluente H_2O/CH_3CN (50 : 50, v/v), flusso 1.5 mL/min, temperatura 30°C, lunghezza d'onda del detector 200 nm.

ESTRAZIONE.

a) Foglie. Sul campione di 20 foglie sovrapposte, procedere ad una sottocampionatura per quartazione, indi da un quarto delle foglie, sempre sovrapposte, prelevarne 10 g tagliandone un tassello con le forbici. Sminuzzare il campione ottenuto in quadratini di circa 1 cm^2 , trasferire in una bevuta da 250 mL con tappo a vite, versare 50 mL di etere di petrolio, quindi agitare per 15 min. in agitatore a 150 r.p.m.

In un becker da 25 mL a forma alta versare 5 mL dell'estratto etero, precedentemente centrifugato, e portare a secco in stufa a 45°C e 600 mm Hg di depressione. Riprendere con 10,5 o 2 mL (a seconda della alta o bassa concentrazione di vinclozolin) della miscela eluente il residuo secco, raschiandolo con una bacchettina di vetro munita di un beccuccio di plastica, quindi centrifugare ed utilizzare per l'analisi.

b) Uva. Dal campione di 10 grappoli d'uva, procedere ad una sottocampionatura di circa 2 Kg., macinare il tutto in un frullatore. Pesare immediatamente in bevuta da 250 mL con tappo a vite 50 g di omogenato, aggiungere 50 mL di etere di petrolio e agitare vigorosamente per 5 minuti. Versare in un becker da 25 mL a forma alta 5 mL di estratto eterico centrifugato, portare a secco in stufa sotto vuoto a 45°C e 600 mm Hg di depressione. Riprendere con 5 o 2 mL (a seconda della alta o bassa concentrazione di vinclozolin presente) della miscela eluente e utilizzare per l'analisi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Prima di procedere allo studio del comportamento degradativo del vinclozolin abbiamo verificato se la procedura di estrazione utilizzata consentisse buoni recuperi anche su foglie. I risultati riportati in Tabella 1 confermano come i valori ottenuti su foglie ed uva siano quasi uguali, con recuperi quantitativi per il vinclozolin, ancora accettabili per il metabolita (II) e appena superiori al 50% per la 3,5-DCA. Pertanto la metodica si presta ottimamente a seguire la persistenza del vinclozolin, mentre per i metaboliti noti consente solo una determinazione qualitativa.

Tabella 1 . Recuperi * di vinclozolin e potenziali metaboliti su foglie ed uva con Etere di petrolio.

Composto	F O G L I E		U V A	
	Quantità aggiunta (mg/Kg)	Recuperi (%)	Quantità aggiunta (mg/Kg)	Recuperi (%)
vinclozolin	1	102.0 ± 11.6	0.5	105.3 ± 2.2
	10	98.8 ± 7.0	2.0	99.4 ± 1.6
	100	109.9 ± 2.6	---	-----
metabolita (II)	1	77.6 ± 2.7	0.5	81.3 ± 2.1
	5	80.7 ± 2.8	---	-----
	20	80.2 ± 5.7	---	-----
3,5 - DCA	1	68.0 ± 2.6	0.5	59.2 ± 3.7
	5	59.7 ± 4.9	---	-----
	20	54.3 ± 7.2	---	-----

* I risultati sono la media di quattro estrazioni.

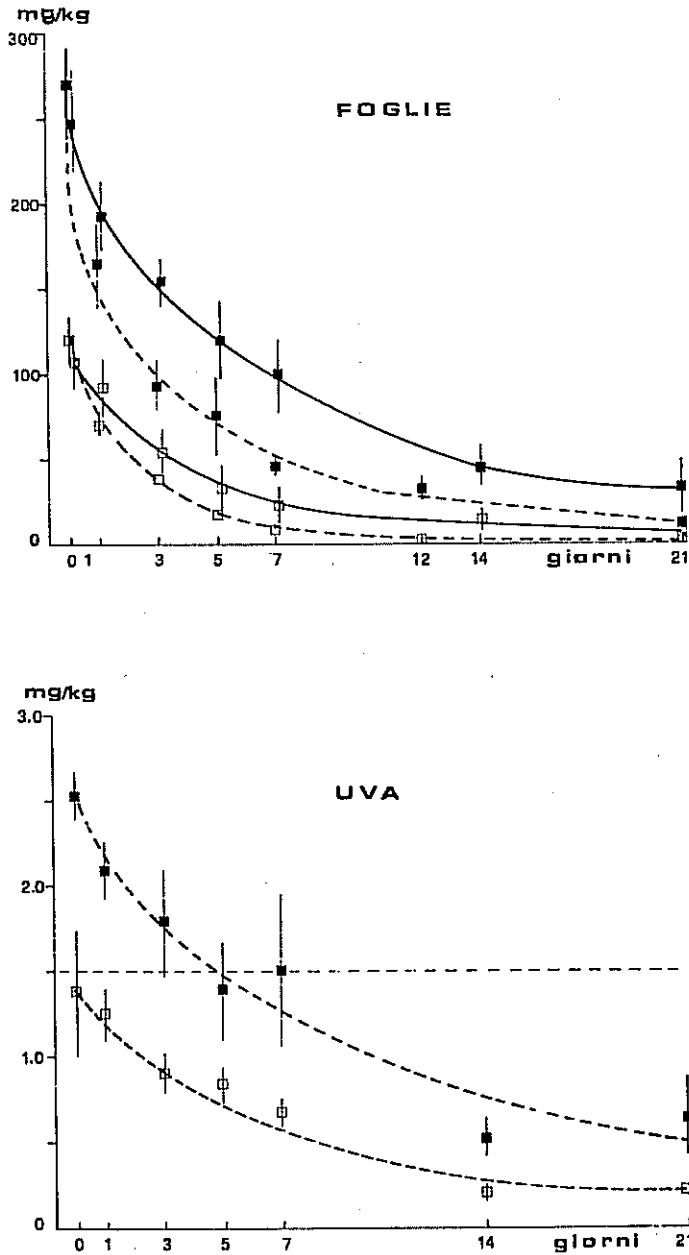


Fig. 2 - Evoluzione dei residui di Vinclozolin (mg/Kg) su foglie ed uva di "Nuragus" dopo il trattamento. (—) 1° trattamento, (----) 2° trattamento. (□) dose normale, (■) dose doppia

In Tab.2 e Fig.2 abbiamo riportato i valori dei residui ottenuti su foglie ed uva dopo i trattamenti effettuati a calendario fenologico.

Le foglie presentano valori iniziali elevati, 121.0 e 269.5 mg/Kg e 105.9 e 248.7 mg/Kg rispettivamente, nel primo e nel secondo trattamento a dose normale e a dose doppia. Questi valori, ovviamente, dipendono principalmente dal rapporto superficie/peso della foglia, per cui possono variare in misura anche rilevante se per unità di superficie fogliare si hanno pesi molto differenziati.

Tabella 2. - Evoluzione dei residui di Vinclozolin (mg/Kg) su foglie ed uva di "Nuragus" dopo il trattamento.

		FOGLIE				UVA	
Data Trattam.		11/8		5/9		5/9	
Dose irrorata pa Kg/ha		1.000	2.000	1.000	2.000	1.000	2.000
Giorni dal trattamento							
P							
0	d	121.0 $\pm$ 11.4	269.5 $\pm$ 21.1	105.9 $\pm$ 18.9	248.7 $\pm$ 29.5	0.13 $\pm$ 0.02	0.38 $\pm$ 0.07
1		70.6 $\pm$ 6.5	168.5 $\pm$ 30.2	91.7 $\pm$ 18.4	189.3 $\pm$ 23.4	1.26 $\pm$ 0.15	2.09 $\pm$ 0.18
3		39.9 $\pm$ 1.5	93.4 $\pm$ 14.6	54.6 $\pm$ 12.7	153.6 $\pm$ 15.7	0.90 $\pm$ 0.13	1.79 $\pm$ 0.34
5		16.7 $\pm$ 2.2	75.4 $\pm$ 21.8	34.8 $\pm$ 11.9	121.4 $\pm$ 22.9	0.84 $\pm$ 0.10	1.40 $\pm$ 0.31
7		8.4 $\pm$ 1.0	45.9 $\pm$ 5.4	21.4 $\pm$ 11.1	100.4 $\pm$ 22.3	0.67 $\pm$ 0.07	1.52 $\pm$ 0.48
12		2.8 $\pm$ 0.4	33.5 $\pm$ 7.6				
14				15.1 $\pm$ 6.0	45.8 $\pm$ 12.4	0.21 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.10
21		1.9 $\pm$ 1.4	10.5 $\pm$ 5.7	5.9 $\pm$ 3.4	34.0 $\pm$ 18.7	0.21 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.24

P = prima del trattamento

d = 1-2 ore dopo il trattamento

L'andamento degradativo è estremamente rapido, con una riduzione superiore al 90% del principio attivo nel primo trattamento a dose normale dopo appena una settimana. La velocità di degradazione nel secondo trattamento è minore rispetto alla prima, come si evince dai tempi di dimezzamento, $t_{1/2}$, rispettivamente di 45 e 75 ore circa.

Molto probabilmente ciò è legato all'effetto termico, che in Agosto ha presentato temperatura e irraggiamento superiori a quelle di Settembre come si può rilevare dai dati climatici riportati in Figura 1.

Nessun effetto di dilavamento hanno comportato le piogge, che si sono verificate prima dei trattamenti e dopo l'intervallo di sicurezza.

L'uva, prima dell'ultimo trattamento, presentava un residuo medio di vinclozolin di 0.13 e 0.38 mg/kg rispettivamente per la dose normale e doppia; dopo il trattamento i corrispondenti valori riscontrati sono di 1.37 e 2.53 mg/kg. Quindi con un trattamento in dose normale l'entità del residuo iniziale è già al di sotto del valore massimo previsto per legge, mentre quello in dose doppia lo raggiunge dopo una settimana. I valori pressochè uguali dei residui che si riscontrano tra il 14° e il 21° giorno dal trattamento, probabilmente sono in parte dovuti al fatto che sull'acino, a un certo punto, vi è una diminuzione di peso durante la surmaturazione. I bassi valori di residuo presenti prima dell'ultimo trattamento indicano come, nelle normali condizioni climatiche in Sardegna, l'effetto di accumulo per trattamenti ripetuti sia insignificante. La cinetica degradativa del pseudo-1°-ordine ha un tempo di dimezzamento, $t_{1/2}$, di 6 giorni, minore rispetto a quella di 33 giorni a pH 4.0 determinata nel vino (5). Sull'uva, come pure sulle foglie, l'andamento degradativo del vinclozolin segue una via diversa da quella del vino (schema 1, Cabras et al. 1983); infatti non è mai stato trovato il metabolita (II), e i valori delle k di scomparsa sono più elevate di quelle trovate nel vino.

Poichè non è mai stata trovata negli estratti 3,5-dicloroanilina, è da escludere un meccanismo degradativo che porti alla sua formazione.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti indicano come i valori elevati oltre il limite legale riscontrati da altri autori sull'uva quasi sicuramente dipendevano da trattamenti localizzati principalmente sul grappolo, mentre in condizioni normali l'entità del residuo che si deposita sul grappolo è modesta.

Per quanto le condizioni climatiche sfavorevoli possano ridurre la velocità di degradazione, aumentando così l'effetto di accumulo per trattamenti ripetuti, l'intervallo di sicurezza di 21 giorni appare eccessivo. Infatti anche con dosi doppie il residuo con due settimane di tempo di carenza è abbondan-

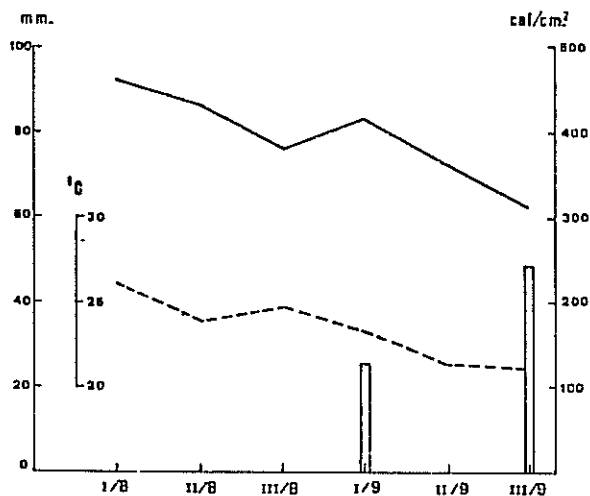
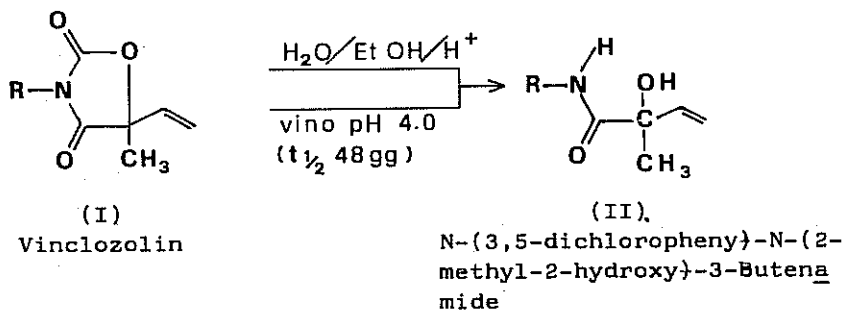


Fig. 1 - Andamento della piovosità (istogramma), della radiazione globale media (linea continua) e della temperatura media (linea tratteggiata) per decadi relative ai mesi di Agosto e Settembre 1983.



Schema degradativo del vinclozolin in vino e sol. idroalcolica acida

temente sotto il livello di guardia tossicologico.

RIASSUNTO Sono state determinate su vite (foglie ed uva) le curve di degradazione del vinclozolin irrorato a calendario fenologico con dosi normali e doppie. I dati ottenuti indicano come, nelle normali condizioni climatiche presenti in Sardegna, l'effetto di accumulo per trattamenti ripetuti sia trascurabile e l'entità dei residui dopo trattamento con dosi normali sia inferiore al limite legale al tempo zero. Tenendo conto, inoltre, che anche con dosi doppie il residuo è abbondantemente al di sotto del limite legale dopo due settimane, l'intervallo di sicurezza di 21 giorni appare eccessivo. Si è accertato inoltre che la via degradativa su foglie e uva è diversa che su vino.

DEGRADATIVE BEHAVIOR OF VINCLOZOLIN IN VINE : A SARDINIAN EXPERIENCE

SUMMARY The degradative rate of vinclozolin sprayed on vine (leaves and grapes) at fixed times with normal and double doses has been determined. Data obtained show that, in the Sardinian environmental conditions, the accumulative effect, following repeated treatments, is not significant; and residues found were lower than the legal limits immediately after treatments with normal doses. Furthermore, considering that after double dose treatments the vinclozolin residue is lower than the legal limits within two weeks, the 21 days safety time seems to be too high. Finally, authors found that the degradative pathway of vinclozolin in leaves and grapes is different from the wine one.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barbero L., Gaia P. (1979) Conseguenze enologiche dell'impiego del Ronolan in viticoltura. Vini d'Italia, XXI, 95-100
- 2) Barbina Taccheo M., Baruzzini L., Spessotto C. (1978) Determinazione del residuo di vinclozolin in campioni d'uva e vino. Atti Giorn. Fitopatol. 1, 31-37
- 3) Brandolini V., Flori P., Musacci P. (1979) Residui di antibotritici sull'uva e nel vino: esperienze condotte in Emilia Romagna. Vitivinicoltura, 11, 29-32
- 4) Cabras P., Diana P., Meloni M., Pirisi F.M. (1982) Residue determination of

- some insecticides and fungicides on grapes by RPLC. J.Agric.Food Chem.30,569
- 5) Cabras P., Meloni M., Pirisi F.M., Pirisi R. (1982) Degradazione di fungicidi dicarbossimidici nel vino. Atti Conv.P.F."Fitofarmaci e Fitoregolatori" Sub.8, Cagliari, 7-8 Ottobre, 75-88
 - 6) Cabras P., Meloni M., Pirisi F.M., Pirisi R. (1983) Degradazione di fungicidi dicarbossimidici in sistemi modello e in vino bianco. Atti IV° Conv.Naz. Div.Chimica Farmaceutica S.C.I. -Palermo, 18-22 Ottobre, 42
 - 7) Conti G.G., Leone G. (1982) Ricerca di residui di fungicidi in uva da vino e da tavola. Atti Conv.P.F."Fitofarmaci e Fitoregolatori" Sub.8, Cagliari, 7-8 Ottobre, 37-58
 - 8) Del Re A., Molinari G.P., Natali P., Fontana G. (1980) Destino degli antiparassitari nell'ambiente: aspetti quantitativi. Atti 2° Simp.Chim.Antiparas. Piacenza, 21-22 Febbraio, 139-150
 - 9) Flori P., Brandolini V., Stanziani R., Musacci P. (1980) Determinazione di residui di preparati fungicidi vinclozolin, procymidone e iprodione su campioni di fragola, uva e vino. Atti Giorn.Fitopatol.1, 19-26
 - 10) Flori P., Stanziani R., Musacci P., Zironi R. (1982) Residui di vinclozolin, iprodione, procymidone e serinal su uva mosto e vino. Atti Giorn.Fitop.2, 13
 - 11) Flori P., Zironi R., Brandolini V., Musacci P. (1982) Residui di vinclozolin, iprodione, procymidone e dichlozolate su uva mosto e vino. Nota II°. Atti Conv.P.F."Fitofarmaci e Fitoregolatori" Sub.8, Cagliari, 7-8 Ottobre, 89-98
 - 12) Molinari G.P., Stringavi G., Flori P. (1980) Prove comparative di determinazione di residui di antibiotritici in uve. Atti Giorn.Fitop.suppl.1, 97-100
 - 13) Molinari G.P., Del Re A., Natali P., Battini G. (1981) Determinazione dei residui di antibiotritici in uve e mosti. La difesa delle piante, 3, 135-142