

## RESIDUI DI DIMETOATO E CLORPIRIFOS NELL'UVA E NEL VINO

P. Cabras, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, M. Cubeddu\*, F. Cabitza\*

Dipartimento di Tossicologia, viale Diaz 182, 09126 Cagliari  
\*Centro Regionale Agrario Sperimentale, Cagliari

### Riassunto

E' stata studiata l'evoluzione dei residui di due insetticidi, Dimetoato e Clorpirifos, dal trattamento sulla vite all'ottenimento del vino. Nell'uva il Dimetoato subisce una rapida degradazione nella prima settimana, per poi rimanere costante nelle tre settimane successive. Alla raccolta presenta un residuo (0,15 mg/kg) notevolmente inferiore al limite legale (1,0 mg/kg). I residui di Clorpirifos alla raccolta sono di 0,73 mg/kg. Durante il processo di vinificazione il Dimetoato si ripartisce in modo non preferenziale tra fase solida e fase liquida, per cui i residui nel mosto e nel vino sono sostanzialmente uguali a quelli presenti nell'uva. Il Clorpirifos invece presenta una spiccata preferenza per la fase solida, dove resta adsorbito, lasciando mosto e vino quasi privi di residui.

### Summary

#### Dimethoate and Chlorpyrifos residues on grapes and wine

The evolution of Dimethoate and Chlorpyrifos residues from treatment of the vine to the production of wine was studied. In the grapes Dimethoate was rapidly degraded during the first week and remained unchanged in the three following weeks. Dimethoate and Chlorpyrifos residues at the harvest time were 0,15 mg/kg (largely lower of maximum residue limit of 1,0 mg/kg) and 0,73 mg/kg respectively. During processing of grapes into wine the Dimethoate residues were the same in grapes, must and wine; the chlorpyrifos residues were adsorbed on the grape pomace and detected in very low amounts in must and wine.

### Introduzione

I maggiori pericoli per la vite sono dovuti principalmente ad attacchi di crittogame quali la peronospora (*Plasmopara viticola*), l'oidio (*Uncinula necator*) e la muffa grigia (*Botrytis cinerea*). Nei programmi di lotta chimica alle avversità della vite pertanto l'uso di fungicidi riveste un ruolo predominante. Il problema dei residui di fungicidi nell'uva e del loro destino nel processo di trasformazione in vino è stato affrontato da numerosi ricercatori. Esiste un'abbondante produzione scientifica che fornisce un quadro abbastanza chiaro sugli aspetti residuali dei principali fungicidi nell'uva e nel vino. In alcune recenti reviews (Cabras et al., 1988; Flori e Cabras, 1990; Zironi et al., 1991; Farris et al., 1992) sono stati descritti i risultati ottenuti dalla ricerca su questa tematica.

Meno importanti, ma non per questo meno dannosi, soprattutto se trascurati, sono gli attacchi di alcuni fitofagi quali le cocciniglie farinose (*Planococcus citri*) e la tignoletta (*Lobesia botrana*). Per combattere questi parassiti sono utilizzati numerosissimi insetticidi. In questo settore le conoscenze acquisite sui residui nell'uva e nel vino sono limitate e richiedono opportuni approfondimenti. Oggetto di questa nostra sperimentazione sono stati il Dimetoato

e il Clorpirifos utilizzati per combattere rispettivamente la tignoletta e la cocciniglia. Di questi principi attivi è stata valutata sia la cinetica degradativa nell'uva che l'evoluzione dei residui nel processo di vinificazione utilizzando la tecnologia di trasformazione più elementare.

## MATERIALI E METODI

### Prove di campo

La prova è stata effettuata in un vigneto sito in agro di Ussana (Ca) sulla varietà Malvasia di Bosa e Nuragus rispettivamente per il Dimetoato e per il Clorpirifos. I trattamenti sono stati effettuati su una superficie di 1000 m<sup>2</sup> suddivisa in quattro replicazioni per ciascuna prova. Rogor L 40 e e Lorsban 40 EC erano i formulati commerciali utilizzati alle dosi consigliate dalle ditte produttrici (150 g/hl e 100 ml/hl rispettivamente), distribuiti con una irroratrice motorizzata a spalla (Fox Motori F 320, Reggio Emilia). Il Dimetoato è stato irrorato il 5 Agosto e il 1 Settembre, mentre il Clorpirifos il 20 Agosto 1993. I campioni, circa 2 Kg per parcella, sono stati prelevati per il Dimetoato prima e dopo l'ultimo trattamento e successivamente con cadenza settimanale per un mese, per il Clorpirifos a 20 e 29 giorni dal trattamento.

La piovosità, rilevata nel corso degli esperimenti con una stazione agrometeorologica SILIMET AD-2 ubicata nei pressi del vigneto, è stata di 48,2 mm totali e si riferisce principalmente ai giorni 14, 23 e 24 Settembre, nei quali sono stati registrati rispettivamente 16,4, 16,0 e 15,2 mm di pioggia. La media delle temperature massima e minima è stata di 32,1 e 17,8°C in Agosto e 28,3 e 15,6°C in Settembre.

### Vinificazione

I quattro campioni provenienti da ogni campionamento, dopo l'analisi dei residui sull'uva, venivano omogenizzati, addizionati di 200 mg/kg di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 0,2 g/kg di lieviti secchi selezionati e separati in due parti uguali. Una parte veniva lasciata fermentare in presenza delle vinacce (vinificazione con macerazione), mentre nell'altra, mediante sgrondatura, veniva separato il mosto fiore, che veniva lasciato fermentare (vinificazione in bianco). Una piccola frazione del mosto torbido (100 g) veniva centrifugata (4000 gpm x 5 min) per determinare il deposito feccioso e i residui sul mosto limpido. In tutti i campioni il processo fermentativo ha avuto un decorso regolare e dopo 15 giorni i vini ottenuti, previa filtrazione, sono stati analizzati.

### Reattivi

Dimetoato, Clorpirifos e Paration erano standard di grado analitico acquistati dalla Ditta Ehrenstorfer (Augsburg, Germania)

Benzene era solvente per HPLC (Carlo Erba, Milano, Italia), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> erano reattivi di grado analitico (Carlo Erba).

Le soluzioni madre (circa 100 mg/kg) erano preparate in benzene, mentre le soluzioni di lavoro erano preparate per diluizione con benzene contenente Parathion come standard interno (s.i.) alla concentrazione di 0,4 mg/kg.

### Determinazione cromatografica.

È stato utilizzato un gascromatografo Carlo Erba HRGC 5160 serie Mega (Milano, Italia), munito di un detector azoto fosforo (NPD-40), di un iniettore split-splitless, di un

campionatore automatico AS 550 e collegato ad un integratore HP 3396 A (Hewlett Packard, Avondale, PA, USA). La colonna capillare era una DB 210 (50% di trifluoropropil e 50% di metil silicone, 30 m x 0,32 mm, film 0,25 $\mu$ m, J & W Scientific, Folsom, CA). L'iniettore ed il detector erano a 210 e 250°C rispettivamente. Il campione (2 $\mu$ l) era iniettato in splitless (60 sec) e la temperatura del forno era programmata come segue: 100°C per 1 min, incremento di 10°C x min fino a 240°C, mantenuta costante x 6 min. L'elio era il gas di trasporto e del make-up a 60 e 130 KPa rispettivamente, mentre la fiamma era alimentata da idrogeno (90 KPa) e aria (100 KPa). In queste condizioni i tempi di ritenzione erano 15,6, 16,4 e 19,2 min rispettivamente per il Clorpirifos, Dimetoato e Paration. Le rette di taratura per i due principi attivi sono state determinate tra altezze dei picchi e concentrazioni col metodo dello standard interno. Buona linearità è stata ottenuta nel range 0-1,5 mg/kg con un coefficiente di correlazione di 0,9996 e 0,9999 rispettivamente per Dimetoato e Clorpirifos.

#### **Procedura di estrazione**

In una beuta con tappo a vite da 100 ml pesare 25g di uva frullata, aggiungere 25 ml di benzene contenente lo s.i. ed agitare per 15 min in agitatore vibratore. Lasciare sedimentare e travasare la fase organica in una beuta contenente 5 g di sodio solfato anidro. L'estrazione dei principi attivi da mosto e vino (5 ml) veniva effettuata in provette da 20 ml con tappo a vite, sempre con benzene (5ml), dopo agitazione in agitatore rotante. L'estratto organico disidratato veniva iniettato per l'analisi.

#### **Prove di recupero**

Campioni non trattati di uva, mosto e vino fortificati con 0,01, 0,50 e 2,00 mg/kg di Dimetoato e Clorpirifos sono stati sottoposti a processo di estrazione come sopra descritto. I recuperi ottenuti da quattro replicati erano compresi tra il 93 e 101% con coefficiente di variazione (CV) massimo di 5.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### **Degradazione sull'uva.**

I residui di Dimetoato presenti sull'uva dopo l'ultimo trattamento erano mediamente di 1,13 mg/kg e derivavano in parte (0,08 mg/kg) anche dal residuo del trattamento precedente, non ancora completamente degradato. Dopo una settimana si erano ridotti di circa l'80%, portandosi a 0,21 mg/kg, per poi restare pressochè costanti nelle tre settimane successive. Il fatto che in quest'ultimo intervallo vi siano state tre piogge abbondanti, indica come sui residui non vi sia stato alcun effetto dilavante. All'intervallo di sicurezza (20 giorni) pertanto il residuo presente (0,28 mg/kg) era abbondantemente sotto il limite legale fissato in Italia di 1 ppm. Questi risultati non si discostano significativamente da quelli ottenuti da altri autori anche con dosi e numero di trattamenti differenti (Steller e Pasarella, 1972; Steller e Brand, 1974; Gonzales e Dennett, 1989).

Alcuni di questi autori (Steller e Brand, 1974) hanno studiato una via metabolica del Dimetoato nell'uva che prevedeva la formazione del N-desmetil, N-idrossimetil dimetoato e relativi derivati ossigenati. Essi hanno trovato che solo una piccola parte del deposito iniziale del Dimetoato (10,1 mg/kg) si converte rapidamente in Ometoato, la cui concentrazione (0,2 mg/kg) rimane quasi costante per il resto della prova (35 gg). Nessun altro metabolita è stato individuato nell'uva dagli autori. La presenza di Ometoato nell'uva

è stata riscontrata su campioni italiani, a livello di 0,11 mg/kg, in analisi di controllo effettuate in Danimarca dagli organismi governativi (FAO, 1985). Tenuto conto che in Italia il residuo massimo consentito di Ometoato su uva è di 0,1 mg/kg, per le considerazioni sopra svolte, sarebbe opportuno approfondire le conoscenze, invero scarse, sui residui di questo metabolita.

Il Clorpirifos presentava un residuo elevato (1,43 mg/kg) anche a tre settimane dal trattamento e alla raccolta erano ancora presenti 0,73 mg/kg. Dati riportati in letteratura (FAO, 1973) mostrano allo stesso tempo (29 giorni) residui decisamente più bassi (0,10 e 0,22 mg/kg). In Italia il Clorpirifos non è registrato su vite, mentre lo è il Clorpirifos metile con un limite di 0,3 mg/kg nell'uva.

**Tabella 1.-** Residui (mg/kg  $\pm$  d.s.) di Dimetoato e Clorpirifos in uva, mosto e vino nel processo di vinificazione

giorni dal trattamento	uva	mosto fiore (mosto centrif.)	vino (vi. bco)	vino (vin. mac)
<b>DIMETOATO</b>				
-0*	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 (0,08)	0,08	0,08
0	1,13 $\pm$ 0,36	0,90 (0,91)	0,92	0,90
7	0,21 $\pm$ 0,08	0,23 (0,22)	0,23	0,26
14	0,26 $\pm$ 0,06	0,20 (0,20)	0,21	0,23
21	0,28 $\pm$ 0,07	0,26 (0,23)	0,17	0,20
28	0,28 $\pm$ 0,07	0,15 (0,15)	0,14	0,14
<b>CLORPIRIFOS</b>				
20	1,43 $\pm$ 0,23	0,08 (0,02)	0,04	0,06
29	0,73 $\pm$ 0,21	0,02 (0,01)	0,03	0,04

-0\* = prima del trattamento  
 vin. bco = vinificazione in bianco  
 vin. mac. = vinificazione con macerazione

Tenuto conto che le due molecole differiscono solo per la presenza nella molecola di un etile al posto del metile, ipotizzare un comportamento simile potrebbe essere ragionevole.

#### **Vinificazione in bianco.**

Nella fase tecnologica di separazione del mosto fiore dalle vinacce (con rese in mosto comprese tra il 65 e 72%) il comportamento dei due principi attivi è totalmente differente. Mentre per il Dimetoato le concentrazioni dei residui nel mosto sono uguali a quelle dell'uva, per il Clorpirifos sono ridotte di oltre il 95%. Ciò indica che il Clorpirifos presenta una marcata affinità per la fase solida (vinacce), dove resta adsorbito, mentre il Dimetoato non dimostra alcuna distribuzione preferenziale. Questa caratteristica viene confermata dal processo di chiarificazione del mosto mediante centrifugazione, con separazione di un 6-9% di deposito feccioso. Infatti mentre la concentrazione dei residui di Dimetoato nel mosto limpido non varia, quella del Clorpirifos si riduce ulteriormente. I vini ottenuti dai mosti non centrifugati presentano residui sostanzialmente invariati per il Dimetoato e più prossimi a quelli dei mosti centrifugati per il Clorpirifos.

Risultati analoghi sono stati ottenuti per il Dimetoato da altri autori (Steller e Pasarella, 1972; Kavar et al., 1979).

#### **Vinificazione con macerazione**

In questo processo tecnologico mosto e vinacce fermentano insieme e solo a fine fermentazione si ha la separazione della fase liquida (vino) da quella solida. Le concentrazioni dei residui presenti nei vini ottenuti con questo processo tecnologico non si discostano da quelli ottenuti con la vinificazione in assenza di vinacce. Ciò indica che la presenza di alcool nella fase liquida non riduce i residui adsorbiti sulla fase solida.

### **Conclusioni**

Nel processo di vinificazione il Dimetoato dimostra di ripartirsi senza alcuna preferenza tra fase solida e fase liquida, nè di essere influenzato dalla tecnologia utilizzata, per cui il residuo presente sull'uva si ritroverà tal quale nel vino. La persistenza dei residui nel vino, secondo Kavar et al. (1979), è condizionata dalla temperatura di conservazione, con valori stabili a basse temperature. Per questi motivi il Dimetoato, se presente nell'uva, sarà riscontrabile anche nel vino dove potrà permanervi anche per lungo tempo. Questo comportamento differenzia il Dimetoato da quasi tutti gli altri antiparassitari, che, anche se presenti nell'uva, spesso non si ritrovano nel vino in quanto il processo di vinificazione ne determina una massiccia riduzione (Farris et al., 1992). Tenuto conto che nell'uva trattata con Dimetoato sono stati riscontrati residui di Ometoato dello stesso ordine di grandezza del principio attivo e che questo metabolita passa nel vino in modo analogo (Steller e Pasarella, 1972), sarebbe opportuno indagare a fondo anche questo composto.

Il Clorpirifos, pur presente nell'uva a valori apprezzabili, nel processo di vinificazione subisce un drastico abbattimento, per cui nel vino permangono residui trascurabili.

### Ringraziamenti

Questa ricerca è stata finanziata dal Ministero dell'Agricoltura e Foreste. P.F. "Lotta biologica ed integrata per la difesa delle piante agrarie e forestali". Gruppo Residui

### BIBLIOGRAFIA

Cabras P., Meloni M., Pirisi F.M. (1987) Pesticide fate from vine to wine. *Rev. Environm. Contam. Toxicol.*, 99, 83-117,

FAO/WHO. (1973) 1972 evaluations of some pesticide residues in food. Roma 1973, pg 182

FAO/WHO (1985) Pesticide residues in food -1984. Evaluations, paper n.67, Rome 1985, pg.282

Farris G.A., Cabras P., Spanedda L. (1992) Pesticide residues in food processing. *Ital. J. Food Sci.*, 3, 149-169,

Flori P., Cabras P. (1990) I residui di fitofarmaci nei vini. *Vignevini*, 17 (7-8), 31-37,

Gonzalez R.H., Dennett J. (1989) Degradacion de residuos de pesticidas en uva de mesa. *Rev. Fruticola*, 10,

Kawar N.S., Iwata Y., Dusch M.E., Gunther F.A. (1979) Behavior of Dialifor, Dimethoate, and Methidathion in artificial fortified grape juice processed into wine. *J. Environ. Sci. Health*, B 14, 505-513

Steller W.A., Brand W.W. (1974) Analysis of Dimethoate-treated grapes for N-hidroxymethyl and de-N-methyl metabolites and for their sugar adducts. *J.Agric. Food Chem.*, 22, 445-449

Steller W.A., Pasarella N.R. (1972) Gas-liquid chromatographic method for the determination of dimethoate and dimethoxon residues in plant and animal tissues, milk and eggs. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1280-1287

Zironi R., Farris G.A., Cabras P., Faticenti F.,(1991) I residui antiparassitari dall'uva al vino. *Atti Acc. Ital. Vite Vino*, vol. XLIII, 351-369