

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica
Corso di Laurea in Biologia indirizzo Agro-Alimentare

PROVA FINALE

**DETERMINAZIONE DEI RESIDUI DI
PRODOTTI FITOSANITARI DISPERSI IN VINO,
MEDIANTE L'UTILIZZO DEL GC-MS.**

CANDIDATA: Valentina Bormida

RELATORE: Prof.ssa Maria Cavaletto

TUTOR AZIENDALE: Enol. Paola Manera
Dr.ssa Ana Moar Grobas

Anno Accademico: 2011-2012

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 La difesa della vite	5
1.2 I prodotti fitosanitari e la loro classificazione	10
1.3 Modalità d'azione dei prodotti fitosanitari	15
1.4 Legislazione in Italia	18
1.5 Sicurezza Alimentare	22
1.6 Scopo del lavoro	25

2. MATERIALI E METODI

2.1 Metodo	27
2.2 Materiali utilizzati	29
2.3 Gas cromatografia-spettrometria di massa	31
2.4 Strumentazione GC-MS	35
2.5 Il cromatogramma di massa	40
2.6 Analisi qualitativa e quantitativa tramite GC-MS	46

3. SOSTANZE ATTIVE

3.1 Anticrittogamici:	52
-----------------------------	----

- Benalaxyl
- Cyproconazol
- Dichlofluanid

- Dimethomorph
- Fenarimol
- Folpet
- Kresoxim methyl
- Myclobutanil
- Oxadixyl
- Penconazole
- Procymidone
- Quinoxifen
- Tebuconazole
- Triadimenol
- Trifloxystrobin
- Vinclozolin

3.2 Antiperonosporici:59

- Azoxystrobyn
- Cymoxanil
- Fenamidone
- Iprovalicarb
- Methalaxyl
- Pyraclostrobin

3.3 Antibotritici:62

- Boscalid
- Cyprodinil
- Fenhexamid
- Fludioxonil
- Iprodione
- Pyrimethanil

3.4 Insetticidi:65

- Chlorpyrifos
- Chlorpyrifos metal
- Ethofenprox
- Fenitrothion
- Flufenoxuron
- Pyridaben
- Tebufenpyrad
- Thiamethoxam

4. SPETTRI DI MASSA DI SOSTANZE ATTIVE	
4.1 Anticrittogamici	69
4.2 Antiperonosporici	76
4.3 Antibotritici	78
4.4 Insetticidi	80
5. CONCLUSIONI	84
6. BIBLIOGRAFIA	86

1. INTRODUZIONE

1.1 LA DIFESA DELLA VITE

La vite da vino (*Vitis vinifera* L. ssp. *Sativa*) è una pianta arbustiva rampicante appartenente alla famiglia delle *Vitaceae*.

In principio era la *Vitis silvestris*, specie selvatica presente sulla Terra da almeno 60 milioni di anni, mentre la *Vitis vinifera* aspetta a comparire fino a un milione di anni fa.

In Italia le prime viti, coltivate per lo più ad alberello, arrivarono nel 2000a.C., mentre oggi coprono quasi un milione di ettari.



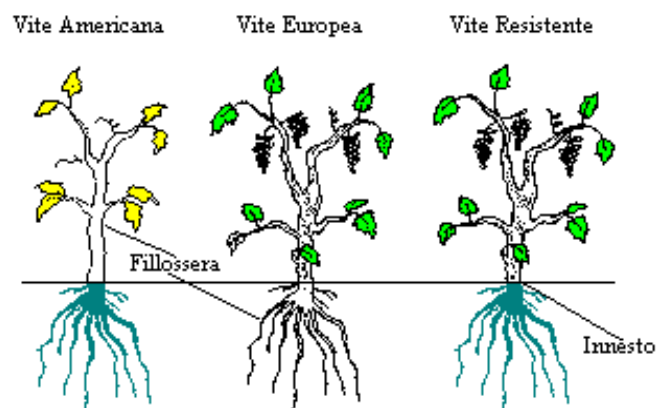
Figura: colline e vigneti della provincia di Alessandria, settembre 2012.

Fino al 1850, la vite ha potuto crescere e prosperare sull'intero continente europeo, senza necessità di applicare alcuna strategia di difesa, grazie all'assenza di patogeni in grado di pregiudicarne l'esistenza.

Questo quadro cambiò radicalmente a partire dalla seconda metà del '800, con l'intensificazione degli scambi commerciali tra Europa e America, infatti in questo periodo inizia la diffusione di un afide radicoloso galligeno, la *Fillossera* (*Phylloxera castratrix*).

Questo afide è in grado di causare ingenti danni all'apparato radicale delle viti europee fino al punto di comprometterne completamente la funzionalità e pregiudicare perciò l'intera produzione.

Solo il ricorso all'innesto con la più resistente vite americana, pratica che dura tutt'oggi, permise di salvaguardare l'intero patrimonio viticolo europeo.



Purtroppo però l'enorme movimento di materiale di propagazione tra i due continenti, attuato nel tentativo di proteggere le produzioni vitivinicole europee, pur mitigando i problemi legati alla Fillossera, favorì la diffusione di alcune temibili crittogame alloctone.

La prima a comparire in ordine cronologico fu l'*Oidio* (*Mal Bianco*), dopo qualche decennio fece la sua comparsa in Europa la *Peronospora* (*Plasmopara viticola*).

Questi due agenti patogeni, importati sempre dal continente americano, rappresentano ancora oggi i principali destinatari degli interventi di difesa chimica attuati nella moderna viticoltura.



Figura: vitigni e uva nella provincia di Alessandria, Settembre 2012.

L'industria iniziò presto a cercare soluzioni alternative all'uso del rame e dello zolfo nella lotta alle crittogame.

Nel 1948 vide la luce il primo fungicida di sintesi, lo Zineb, il primo fungicida antiperonosporico ad azione sistemica, il furalaxyl, comparve però solo nella seconda metà degli anni '70, segnando di fatto il pieno ingresso della chimica nella fitoiatria.

Attualmente sono circa 1400 i pesticidi commercializzati nel mondo, attivi contro qualsiasi tipo di patogeno o malerba; di questi 130 sono attualmente autorizzati per la protezione del vigneto .

Fanno caso a se stante virus e batteri, per via dell'assoluto divieto di utilizzo di antibiotici e antivirali nelle pratiche agricole.

I trattamenti fitosanitari per la difesa del vigneto costituiscono una parte molto importante del costo di conduzione di un vigneto specializzato arrivando a circa il 24% dell'intera spesa.

Per quanto riguarda i fungicidi, i maggiormente utilizzati sono gli antiperonosporici (67%) seguiti dagli antioidici (22%) e dagli antibotritici (11%).



Figura: *Vitis vinifera* con peronospora.



Figura: Oidio sulla vite.



Figura: Botrite o muffa grigia su uva.

In particolare gli antiperonosporici più utilizzati e visionati durante il periodo di stage, sono Azoxystrobin, Cimoxanil, Fenamidone, Iprovalicarb, Metalaxyl, Pyraclostrobin e Rame.

Gli antioidici più usati appartengono alla famiglia chimica dei Triazoli e delle Strobiruline.

Gli insetticidi più usati sono rappresentati da: Chlorpyrifos, Chlorpyrifos- metyl, Thiamethoxam, mentre gli antibotritici sono rappresentati da Boscalid, Cyprodinil, Fludioxonil, Fenhexamid, Iprodione, Pyrimethanil e Pyraclostrobin.

Per quanto riguarda gli insetti, pur essendo una causa di preoccupazione nettamente inferiore delle avversità fungine su uva da vino, vale la pena ricordare la *tignoletta della vite* (*Lobesia botrana*) e alcune *cocciniglie* (*Planococcus spp.*) che possono essere oggetto di qualche trattamento per tutelare le produzioni, spesso esclusivamente a scopo preventivo.



Figura: Tignoletta della vite.



Figura: Cocciniglia del corniolo.

La difesa della vite è una pratica indispensabile se si vuole produrre una materia prima sana, essa presuppone una conoscenza approfondita delle avversità da combattere, del ciclo biologico della malattia o di quello del fitofago e delle condizioni predisponenti, nonché dei prodotti da utilizzare e del giusto momento di intervento.

1.2 I PRODOTTI FITOSANITARI E LA LORO CLASSIFICAZIONE.

Il decreto del Presidente della Repubblica n. 290/01, a conferma di quanto stabilito dal decreto legislativo n° 194/95, precisa che il termine “**prodotti fitosanitari**” sostituisce i termini “presidi sanitari”, “fitofarmaci”, “antiparassitari”, utilizzati nella normativa precedente, o altri di uso comune anche se impropri, come ad esempio “pesticidi”.

Per “prodotti fitosanitari” si devono intendere le sostanze attive ed i preparati (contenenti una o più sostanze attive) nella forma in cui vengono forniti all'utilizzatore destinati a:

1. proteggere i vegetali o i prodotti vegetali da tutti gli organismi nocivi o a prevenirne gli effetti (anti parassitari);
2. favorire o regolare i processi vitali dei vegetali, con esclusione dei fertilizzanti (fitoregolatori);
3. conservare i prodotti vegetali, con l'esclusione dei conservanti disciplinati da particolari disposizioni;
4. eliminare le piante indesiderate (diserbanti).

Un prodotto fitosanitario è composto normalmente da tre elementi: Principio attivo, Coadiuvante e Coformulante.

Il *principio attivo* o sostanza attiva è la frazione più importante di un prodotto fitosanitario, che agisce nei confronti del parassita che si vuole controllare.

I *coadiuvanti* sono sostanze che influiscono positivamente sull'efficacia delle sostanze attive e ne migliorano la distribuzione. Si tratta di solventi, sospensivanti, emulsionanti, bagnanti, adesivanti, antideriva, antievaporanti e antischiuma.

I *coformulanti*, infine, servono a ridurre la concentrazione della sostanza attiva (sostanze inerti e diluenti).



Figura: dispersione di prodotti fitosanitari in vigneto.

I prodotti fitosanitari si suddividono, in base all'attività svolta, in: antiparassitari, diserbanti, fitoregolatori, fisiofarmaci, repellenti, biotecnologici.

- **Antiparassitari**

Secondo la loro specializzazione si suddividono in:

- Insetticidi: prodotti impiegati per la lotta contro gli insetti dannosi (mosche, tignole, afidi, cocciniglie, ecc.).
- Acaricidi: prodotti impiegati per la lotta contro gli acari (ragnetto rosso, giallo, ecc.).
- Fungicidi o anticrittogamici: prodotti idonei per combattere le malattie delle piante causate da funghi o crittogame (peronospora, oidio, botrite, ecc.).
- Nematocidi: prodotti impiegati per combattere i nematodi.
- Limacidi o molluschi: prodotti idonei per la lotta contro le limacce (senza guscio) e le chioccioline (con guscio).
- Rodenticidi: prodotti impiegati per la lotta contro i roditori (topi, ratti).

- **Diserbanti o Erbicidi** : comprendono i preparati idonei al contenimento delle erbe infestanti.
- **Fitoregolatori** : sono prodotti di sintesi, non nutritivi, che promuovono, inibiscono o comunque modificano determinati processi naturali delle piante. Si suddividono in:
 - alleganti, che favoriscono l'allegagione dei frutti;
 - nanizzanti, che limitano la crescita della pianta;
 - anticascola, che impediscono la caduta dei frutti;
 - diradanti, che favoriscono il diradamento dei frutti.
- **Fisiofarmaci** : sono prodotti in grado di prevenire o curare le fisiopatie (carenza o eccessiva disponibilità di elementi nutritivi, ristagni idrici ecc.).
- **Repellenti** : sono prodotti che per le loro caratteristiche (odore, colore e sapore) sono in grado di tenere lontani i parassiti dalle piante da proteggere.
- **Biotechonologici** : sono prodotti derivanti dall'utilizzazione integrata di biochimica, microbiologia e ingegneria (bioinsetticidi, bioacaricidi, biofungicidi, feromoni, regolatori di sviluppo).

I prodotti per la difesa delle piante sono commercializzati in diversi tipi di formulazioni: per trattamenti a secco, per trattamenti liquidi, per trattamenti gassosi, per esche.

I trattamenti a secco vengono effettuati con prodotti fitosanitari che non hanno bisogno di acqua per essere trasportati sulla vegetazione da proteggere.

I formulati utilizzabili si distinguono in:

- *Granulari*: si presentano sotto forma di granuli e vengono utilizzati per la disinfezione del terreno.
- *Polveri secche*: se impiegate su colture, necessitano di attrezzature specifiche per la loro distribuzione (es. impolveratrici per la distribuzione dello zolfo) o di recipienti rotanti se sono utilizzate per conciare le sementi.

I trattamenti liquidi vengono effettuati con prodotti fitosanitari diluiti in acqua al momento dell'applicazione in campo. Le principali formulazioni per questo tipo di trattamenti si distinguono in:

- *Polveri bagnabili (PB; WP)*: la sostanza attiva è finemente macinata in presenza di bagnanti, disperdenti, inerti, ecc..., in modo da ottenere un prodotto che mescolato in acqua formi una sospensione.

- *Polveri solubili (PS; WS)*: formulazione polverulenta come la precedente che, mescolata in acqua, forma una soluzione diluita stabile.

Le formulazioni in polvere presentano inconvenienti per l'operatore legati alla difficoltà di calcolare esattamente il dosaggio ed al rischio di una loro inalazione durante le operazioni di preparazione della miscela. Tali svantaggi possono essere ridotti con l'uso di sacchetti idrosolubili.

- *Emulsioni in acqua (EW)*: la sostanza attiva viene emulsionata in acqua in presenza di tensioattivi, disperdenti o altri stabilizzanti in modo da formare una emulsione stabile per almeno due anni.
- *Granuli disperdibili*: queste formulazioni microgranulari sono facilmente dosabili, non generano polvere, non impregnano gli indumenti, si disperdono facilmente e rapidamente nell'acqua e non formano residui sul fondo del serbatoio.
- *Sospensioni di microcapsule (CS)*: la sostanza attiva viene emulsionata finemente in acqua e ricoperta di un sottile film polimerico (microcapsule). Questa formulazione possiede ottima stabilità, libera la sostanza attiva gradualmente e consente di ottenere una notevole diminuzione della tossicità acuta.

I trattamenti gassosi, detti anche fumigazioni, agiscono sui parassiti delle piante sotto forma di gas o di vapore e sono utilizzati prevalentemente per disinfettare o disinfezzare i terreni e le derrate alimentari nei magazzini.

Le formulazioni impiegate per questi trattamenti possono essere solide, liquide o gassose. I prodotti utilizzati per le fumigazioni sono i classici formulati a largo spettro d'azione che agiscono nei confronti di insetti, nematodi, funghi, batteri e semi di piante infestanti.

Formulazioni per esche

Sono caratterizzate dal fatto che la sostanza attiva è mescolata ad una sostanza appetita dalla specie da combattere.

Le esche possono essere commercializzate pronte all'uso oppure possono essere preparate utilizzando materiale alimentare (crusca, risina, melasso, zucchero) aggiunto di insetticida.

Rappresentano un efficace mezzo di lotta contro insetti terricoli masticatori, lumache, roditori, ecc.

Altri tipi di Formulazioni:

Formulazioni per iniezioni ai tronchi (endoterapia)

Per la difesa fitosanitaria, possono anche essere impiegati antiparassitari (fungicidi ed insetticidi) e coadiuvanti appositamente formulati per essere iniettati lungo i vasi in cui scorre la linfa e quindi diffondersi agevolmente in tutte le parti della pianta.

Ovviamente, i trattamenti endoterapici non possono essere effettuati con gli stessi preparati utilizzati per i trattamenti alla chioma, perché occorrono prodotti appositamente formulati e registrati per questo specifico campo di impiego.

I principali vantaggi offerti da questa metodologia di applicazione consistono in:

- una maggiore efficacia rispetto ai tradizionali trattamenti per irrorazione, legata anche al fatto che l'antiparassitario non subisce l'azione dilavante degli agenti atmosferici (piogge in particolare);
- una prolungata persistenza d'azione, che in molti casi permette di effettuare i trattamenti ad anni alterni;
- una riduzione delle dosi di applicazione;
- una minore dispersione nell'ambiente, quindi un minore impatto sugli ecosistemi.

E' tuttavia un metodo poco pratico.

Formulazioni per trattamenti con mezzo aereo

Questi trattamenti possono essere effettuati solo con prodotti appositamente autorizzati che oltre al principio attivo, contengono sostanze dette "antideriva" allo scopo di impedire che la soluzione distribuita si disperda in ambienti diversi da quelli interessati al trattamento.

1.3 MODALITA' D'AZIONE DEI PRODOTTI FITOSANITARI

I prodotti fitosanitari, in relazione ai rapporti che si stabiliscono con la pianta e il prodotto fitosanitario, si classificano in:

- di copertura: il prodotto si deposita sulla superficie del vegetale e non è in grado di penetrare al suo interno, pertanto non è in grado di proteggere la vegetazione sviluppatasi dopo l'esecuzione del trattamento;
- citotropici: penetrano superficialmente nei tessuti vegetali con i quali vengono in contatto;
- translaminari: penetrano più profondamente nei tessuti e nelle foglie riuscendo a raggiungere la lamina fogliare opposta a quella di penetrazione;
- sistemici: assorbiti dalla pianta si muovono in essa attraverso il sistema linfatico ascendente e/o discendente.

▪ FUNGICIDI E BATTERICIDI

Questi prodotti possono avere diverse modalità d'azione:

- azione preventiva: essi prevengono l'attacco parassitario (fungino e/o batterico) impedendo la germinazione di spore e conidi; in generale questo tipo di attività è caratteristica soprattutto dei prodotti di copertura;
- azione curativa: consente di combattere la malattia durante il periodo di incubazione della stessa (essenzialmente nei primi giorni), arrestandone il processo di sviluppo ed evitando la comparsa dei sintomi. Possiedono prevalentemente questa caratteristica i prodotti citotropici e i prodotti sistemici.
- azione eradicante: blocca la malattia fungina in uno stadio anche avanzato. In questo caso il prodotto deve possedere una certa capacità di penetrazione nella pianta.

Le sostanze attive utilizzate contro i funghi svolgono la loro azione interferendo sui processi vitali per lo sviluppo del parassita. In particolare, a secondo del processo vitale interessato, i fungicidi possono essere così classificati:

- 1) sostanze che interferiscono sulla respirazione,
- 2) sostanze che interferiscono sull'attività enzimatica,
- 3) sostanze che interferiscono a livello della struttura delle cellule,
- 4) sostanze che interferiscono a livello della sintesi delle proteine.

▪ **INSETTICIDI, ACARICIDI, MOLLUSCHICIDI, RODENTICIDI**

Questi prodotti possono agire in diversi modi:

- azione per contatto: si esplica sia per contatto diretto sui fitofagi (parassiti animali delle piante) al momento del trattamento, sia per contatto fra la superficie vegetale trattata e il corpo dei medesimi. I prodotti che agiscono in questo modo sono relativamente selettivi nei confronti degli organismi utili.
- azione per ingestione: causa la morte dei fitofagi per ingestione di parti di vegetali contenenti una sufficiente quantità di prodotto distribuito con il trattamento. Nella maggior parte dei casi sono selettivi nei confronti degli organismi utili.
- azione per asfissia: provoca la morte dei fitofagi che assumono attraverso le vie respiratorie una quantità sufficiente di prodotto fitosanitario allo stato gassoso. Non sono selettivi nei confronti degli organismi utili.

Le sostanze classificate in questo gruppo di prodotti possono essere suddivise in diversi gruppi a seconda della particolare attività nei confronti dei parassiti:

- 1) Azione caustica e asfittica:
 - Occlusione delle aperture tracheali,
 - Azione sulla consistenza della chitina dello scheletro
- 2) Azione neurotossica (sul sistema nervoso)
- 3) Azione ormonale:
 - induzione di infertilità nelle femmine,
 - sterilità dei maschi,
 - attrazione sessuale,
 - interferenze sulla metamorfosi e sullo sviluppo,
 - inibizione della sintesi della chitina.
- 4) Azione fagodeterrente (inibitrice della nutrizione)

5) Azione repellente

6) Induzione di malattie

▪ **DISERBANTI**

In base alla loro azione, possono essere così suddivisi:

- di contatto, quando agiscono prevalentemente disseccando le parti verdi delle piante infestanti irrorate;

- di traslocazione, quando svolgono la loro azione all'interno della pianta entrando nel circolo linfatico.

L'assorbimento può avvenire attraverso le foglie o le radici.

- residuale o antigerminello, quando applicati al terreno (solitamente in pre-semina o pretrapianto) si distribuiscono nello strato superficiale dove persistono per un tempo più o meno lungo. L'azione diserbante viene svolta per assorbimento della sostanza chimica da parte dei semi in germinazione e dalle radici delle giovani plantule. Per il loro più o meno lungo effetto "residuale" possono causare danni alle colture successive.

1.4 LEGISLAZIONE IN ITALIA RIGUARDO I FITOFARMACI

In Italia il piano di controllo ufficiale sui prodotti fitosanitari è disciplinato dall'*articolo 17 del Decreto legislativo 194 del 17 marzo 1995* recante "Attuazione della direttiva 91/414/CEE in materia di immissione in commercio di prodotti fitosanitari".

Tale articolo stabilisce che il Ministro della Salute di concerto con il Ministro delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, e il Ministro dell' Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, adotti piani nazionali annuali per il controllo ufficiale di prodotti fitosanitari per la verifica sia dei requisiti richiesti dalla *direttiva 91/414/CEE* per i prodotti fitosanitari immessi sul mercato sia delle condizioni d'uso e del rispetto delle indicazioni riportate in etichetta presso gli utilizzatori.

Con il *decreto ministeriale 9 agosto 2002* il Ministero ha dato attuazione a tale obbligo. Il decreto infatti delinea il piano per il controllo ufficiale su commercio ed impiego dei prodotti fitosanitari e predispone le misure generali e le modalità di trasmissione dei risultati dei controlli.

Le ulteriori disposizioni di indirizzo sui controlli ufficiali sono riportate nel *Regolamento (CE) 882/2004*.

Il *Regolamento 882/2004* fissa invece criteri generali per l'effettuazione dei controlli ufficiali per la verifica della conformità alla normativa, stabilendo le caratteristiche che devono possedere i Laboratori per il controllo ufficiale, le procedure, le attività, i metodi e le tecniche per effettuare i controlli. Le analisi per la ricerca di residui di prodotti fitosanitari vengono effettuate dai Laboratori (Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente/Presidi Multizonali di Prevenzione e Istituti Zooprofilattici Sperimentali).

Ai sensi del Regolamento 882/2004 i Laboratori devono essere accreditati e i metodi di analisi da loro utilizzati devono essere validati. Inoltre questi provvedono a trasmettere i risultati delle analisi al Ministero. I dati del controllo ufficiale sono utilizzati anche dall'Istituto Superiore di Sanità per ricavare una stima dell'assunzione giornaliera dei residui di prodotti fitosanitari con la dieta in Italia.

Il *decreto del Ministro della Sanità del 23 dicembre 1992*, che recepisce la Direttiva 90/642/CEE, relativa ai limiti massimi di residui di sostanze attive nei presidi sanitari tollerate su e nei prodotti, stabilisce che il Ministero della Salute riceva i risultati dei controlli di residui di prodotti fitosanitari ogni anno tramite via telematica dai Laboratori del controllo ufficiale.

Il D.M. del 23 dicembre 1992 prevede un programma dettagliato di attuazione dei controlli in ambito regionale e delle Province autonome, con l'indicazione tra l'altro del numero minimo e del tipo di campioni da analizzare. La ripartizione dei campioni per ogni Regione e Provincia autonoma è calcolata in base ai dati sul consumo e sulla produzione degli alimenti interessati.

Con l'entrata in vigore del **Regolamento 396/2005** in materia di armonizzazione dei limiti massimi di residui nei prodotti alimentari, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha introdotto nuove modalità per la raccolta dei dati.

Il regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 febbraio 2005, entrato in vigore il 1° settembre 2008, stabilisce disposizioni comunitarie armonizzate in materia di **livelli massimi di residui (LMR)**.

Gli allegati II e III di detto regolamento riportano per le singole sostanze attive contenute nei prodotti fitosanitari i valori di livelli massimi di residui fissati a livello comunitario nelle/sulle diverse matrici alimentari elencate nell'allegato I dello stesso regolamento.

L'allegato IV del regolamento (CE) n. 396/2005 riporta l'elenco delle sostanze attive per le quali non è necessario fissare valori di LMR.

I LMR riportati negli allegati II e III del regolamento (CE) n. 396/2005, nonché l'elenco delle sostanze attive riportato nell'allegato IV dello stesso regolamento, sono stabiliti a livello comunitario anche a seguito di valutazione scientifica svolta dall'EFSA, sulla base della documentazione presentata da soggetti interessati al settore (imprese, importatori, organizzazioni, ecc.).

I valori di LMR possono essere anche modificati a seguito di revisione comunitaria.

La fissazione e la modifica dei valori di LMR vengono attuati con l'emissione di regolamenti comunitari che vanno a modificare gli allegati II, III e IV del regolamento (CE) n. 396/2005.

**TABELLA LMR FITOFARMACI IN UVE E UVE DA VINIFICAZIONE,
E IN MOSTI E VINI (CE n. 396/2005)**

SOSTANZA ATTIVA	LMR (mg/kg)	LMR (mg/kg)ppm VINO
AZOXYSTROBIN	2	0,5
BENALAXYL	0,2	0,2
BOSCALID	5	1
CHLORPYRIFOS	0,5	0,01
CHLORPYRIFOS- METHYL	0,2	0,01
CYPROCONAZOL	0,2	0,02
CYMOXANIL	0,1	0,01
CYPRODINIL	5	0,5
DICHLLOFLUANID	10	0,01
DIMETHOMORPH	3	0,01
ETHOFENPROX	1	0,1
FENAMIDONE	0,5	0,5
FENARIMOL	0,3	0,01
FENHEXAMID	5	1,5
FENITROTHION	0,01	0,01
FLUDIOXONIL	2	0,5
FLUFENOXURON	0,1	0,01
FOLPET	5	0,01
IPRODIONE	10	2
IPROVALICARB	2	1
KRESOXIM-METHYL	1	0,01
METHALAXYL	1	0,2
MYCLOBUTANIL	1	0,1
OXADIXYL	0,01	0,01
PENCONAZOLE	0,2	0,01
PYRACLOSTROBIN	2	0,05

PYRIDABEN	0,1	0,01
PROCYMIDONE	5	0,5
PYRIMETHANIL	3	2
QUYNOXIFFEN	0,5	0,01
TEBUCONAZOLE	1	0,5
TEBUFENPYRAD	0,3	0,1
THIAMETHOXAM	0,5	0,5
TRIADIMENOL	2	0,01
TRIFLOXYSTROBIN	5	0,3
VINCLOZOLIN	5	0,01

1.5 SICUREZZA ALIMENTARE

Per garantire la sicurezza degli alimenti occorre considerare tutti gli aspetti della catena di produzione alimentare come un unico processo, a partire dalla produzione primaria, fino alla vendita o erogazione di alimenti al consumatore.

Nell'ambito della produzione primaria, particolare attenzione assumono le pratiche e i mezzi di produzione agricola (ad es. i trattamenti antiparassitari) per i loro effetti potenziali sulla sicurezza generale degli alimenti (ad es. problema dei residui).

Il *Regolamento comunitario 178/2002* stabilisce i principi e i requisiti della legislazione alimentare e istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare.

Per raggiungere gli obiettivi previsti dalla legislazione alimentare, strumento essenziale è l'analisi del rischio, processo costituito da tre componenti interconnesse: valutazione, gestione e comunicazione.

Al fine di procedere a ritiri mirati e precisi e a fornire informazioni ai consumatori o ai funzionari responsabili dei controlli, evitando così disagi più estesi e ingiustificati quando la sicurezza degli alimenti sia in pericolo, il regolamento prevede un sistema che consenta di ricostruire il "percorso" compiuto da alimenti e mangimi attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione.

Vengono quindi introdotti i concetti di:

Tracciabilità:

Processo che segue il prodotto da monte a valle della filiera in modo che, ad ogni stadio attraverso cui passa, vengano lasciate opportune tracce (informazioni).

Rintracciabilità :

Processo inverso che deve essere in grado di raccogliere le informazioni precedentemente rilasciate.

Tracciabilità interna:

È la tracciabilità lungo tutto il processo o la trasformazione svolta all'interno dell'azienda; si concretizza in una serie di procedure interne specifiche di ciascuna azienda, che consentono di risalire alla provenienza dei materiali, al loro utilizzo e alla destinazione dei prodotti.

Tracciabilità di filiera:

Processo interaziendale che risulta dalla combinazione dei processi interni di ciascun operatore della filiera, uniti da efficienti flussi di comunicazione.

Il regolamento 178/2002 rende obbligatoria la rintracciabilità a partire dal 1° gennaio 2005.

A livello europeo l'obiettivo principale in materia di sicurezza alimentare è garantire un alto livello di protezione della salute dei consumatori coprendo tutti i settori della catena alimentare "dalla fattoria alla tavola". In materia di prodotti fitosanitari la salute umana, degli animali e dell'ambiente sono al centro della politica della Commissione europea.

La consistente legislazione comunitaria in materia di prodotti fitosanitari disciplina sia la commercializzazione che l'impiego di prodotti fitosanitari nei vegetali, nonché i residui di prodotti fitosanitari sugli e negli alimenti.

La normativa comunitaria disciplina inoltre il commercio dei prodotti di origine vegetale ma anche il commercio di prodotti fitosanitari all'interno dell'UE nonché con i paesi Terzi.

L'Italia, così come gli altri Stati membri, partecipa ai lavori nel vasto settore di prodotti fitosanitari della Commissione europea.

A livello nazionale il Ministero della Salute implementa sul proprio territorio gli indirizzi della Commissione europea recependo le Direttive ed applicando i Regolamenti comunitari in materia di prodotti fitosanitari.

In particolare, attraverso l'iter procedurale che porta all'autorizzazione per l'immissione in commercio di prodotti fitosanitari, vengono garantiti aspetti fondamentali come la sicurezza dell'operatore, degli alimenti, degli animali e dell'ambiente.

Inoltre, la Commissione Consultiva per i Prodotti Fitosanitari, presieduta dal Ministro o dal un suo delegato, fornendo pareri tecnico-scientifici sugli aspetti relativi all'efficacia agronomica, alle proprietà chimico-fisiche, alla tossicologia (mutagenesi, cancerogenesi e teratogenesi), all'esposizione dell'operatore, alla ecotossicologia e al destino ambientale per la registrazione di prodotti fitosanitari, costituisce per il Ministero un qualificato organismo tecnico-scientifico per assolvimento dei compiti previsti dal D.Lgs 194/1995.

A livello regionale, gli Assessorati alla Sanità e le A.S.L. attuano i piani di controllo ufficiale nel settore di prodotti fitosanitari.

Tali controlli riguardano sia i prodotti alimentari di origine vegetale, per monitorare livelli di residui di prodotti fitosanitari negli alimenti, sia i controlli sull'impiego e commercio di tali prodotti.

I dati dei controlli vengono ogni anno comunicati al Ministero che li elabora, dispone le relazioni nazionali e comunica i risultati alla Commissione Europea. Il Servizio Sanitario Nazionale (S.S.N.) si avvale di numerosi organismi sia a livello centrale che territoriale per l'espletamento delle attività di vigilanza e controllo in materia di prodotti fitosanitari.

Alle Amministrazioni centrali ed a quelle regionali sono affidate prevalentemente, oltre ai compiti normativi nell'ambito delle diverse competenze, le funzioni di programmazione, indirizzo e coordinamento, mentre le funzioni di controllo vengono esercitate dalle Aziende Sanitarie Locali.

1.6 SCOPO DEL LAVORO

L'Unione Europea si è data come obiettivo fondamentale la libera circolazione di alimenti sicuri e sani nel proprio mercato interno, volendo così contribuire in maniera significativa alla salute e al benessere dei cittadini, nonché ai loro interessi sociali ed economici.

Il parametro legale che definisce se un prodotto può essere immesso nel mercato o no è definito dal massimo residuo ammesso o **LMR** (Limite Massimo Residuo). Questo dato non rappresenta però un dato tossicologico diretto, bensì una sintesi fra il dato tossicologico sull'uomo, l'efficacia contro i parassiti e i valori di residuo osservati dai trattamenti in campo sulla specifica coltura e sullo specifico patogeno da controllare. Il suo valore, infatti, è calcolato a partire da dati puramente tossicologici come la dose giornaliera accettabile (Acceptable Daily Intake ADI, espressa in mg/kg/giorno), la stima delle quantità di un determinato alimento introdotte giornalmente in una determinata popolazione (Food Daily intake -FDI espressa in kg/giorno) e i dati agronomici quali dose attiva e curve di degradazione in campo.

Per questa ragione uno stesso agrofarmaco può avere differenti valori di LMR in differenti paesi con climi e abitudini alimentari differenti.

Tra i paesi europei l'Italia è uno fra i più attenti nel controllo della presenza di residui di pesticidi nei propri alimenti.

La risoluzione analitica delle strumentazioni attuali permette di indagare ben al di sotto del valore imposto come MRL, arrivando in molti casi a valori in ppb o ppt.

Per questo motivo oggi è possibile valutare la presenza di pesticidi sugli alimenti anche in tracce minime.

Per quanto il nostro organismo possa ricevere dei danni anche venendo in contatto con quantità molto basse di pesticidi o di sostanze ad attività ormonosimile, mantenere livelli di residui molto bassi è il principale obiettivo che si pongono tutte le strategie legate alla sicurezza degli alimenti.

Tale risultato può essere raggiunto o diminuendo il numero di trattamenti, utilizzando perciò pesticidi più efficaci, o utilizzando molecole con una maggiore velocità di scomparsa o, come nel caso del vino, che vengano adsorbiti dalle fecce e dalle vinacce e quindi non si ritrovino più nel vino.

Il lavoro eseguito presso il Laboratorio Sinergo soc. coop., durante il periodo di stage formativo, ha come scopo quello di determinare e quantificare residui di fitofarmaci all'interno del vino e confrontare il risultato ottenuto con il valore LMR specifico (allegato II Reg. 396/2005) per la sostanza attiva analizzata.

Questo è un controllo necessario per la sicurezza alimentare, in quanto i valori delle sostanze attive dei fitofarmaci presenti nel vino analizzato, devono sottostare al limite massimo residuo, pena la non commercializzazione del prodotto.

Per raggiungere tale obiettivo sono stati utilizzati sistemi analitici ad alta prestazione in grado di determinare i residui presenti, mediante i tempi di ritenzione specifici per ogni sostanza attiva e i loro picchi caratteristici nello spettro di massa.

Per la quantificazione sono state utilizzate rette di tarature specifiche per ogni sostanza attiva, create nella fase di validazione del metodo, utilizzando campioni in acetonitrile, ovvero soluzioni standard, campioni nella matrice vino e standard interno.

2.MATERIALI E METODI

2.1 METODO

Il metodo utilizzato durante il periodo di stage formativo presso il Laboratorio Sinergo per la determinazione e quantificazione dei prodotti fitosanitari in vino è dato dalla norma europea UNI EN 15662.

La norma descrive un metodo per l'analisi dei residui di pesticidi negli alimenti di origine vegetale quali frutta, verdure, cereali e loro derivati.

Il campione viene estratto mediante acetonitrile seguito dalla separazione liquido-liquido attraverso aggiunta di solfato di magnesio, di cloruro di sodio e di un tampone di sali di citrato. L'estratto viene quindi purificato con l'aiuto d'amino-assorbente (SPE dispersivo con APS e solfato di magnesio).

Gli estratti vengono acidificati mediante aggiunta di una piccola quantità di acido formico, al fine di migliorare la loro stabilità durante lo stoccaggio. L'estratto finale può essere utilizzato direttamente per le analisi di determinazione mediante GC-MS.

I pesticidi sono potenzialmente tossici e, di conseguenza, devono essere manipolati in condizioni di sicurezza suscettibili di proteggere gli analisti in particolar modo durante la preparazione di soluzioni madri a partire da sostanze attive commerciali.

E' necessario adottare qualsiasi precauzione necessaria al fine di evitare una potenziale contaminazione dell'acqua, solventi e altri prodotti.

I residui vengono identificati secondo diversi parametri, quali il loro tempo di ritenzione e il loro spettro di massa; la concentrazione in mg/kg (o mg/l) per ogni sostanza identificata, si ottiene direttamente a partire dalla retta di taratura.

A partire dalle soluzioni standard, viene preparata una retta di taratura a più punti al fine di verificare la linearità per ciascuna materia attiva.

Il rendimento dell'estrazione può essere verificato mediante aggiunta, all'interno dei campioni, di un campione standard per controllo qualità, ad esempio in questo metodo viene utilizzato il TrifenilFosfato.

Oltre questo metodo utile alla determinazione dei residui di prodotti fitosanitari in matrice vino, all'interno del Laboratorio, ne viene impiegato un secondo, che utilizza come standard interno il Dieldrin e l'attuazione di due estrazioni consecutive con dietiletere con conseguente identificazione e quantificazione di residui sempre tramite GC-MS.

PROCEDURA:

- 1) Pesare 10 ml di campione (vino) in un tubo da centrifuga da 50 ml.
- 2) Aggiungere 10 ml di acetonitrile e 100 μ l di ISTD Trifenilfosfato []=20 g/l.
- 3) Agitare vigorosamente per 1 minuto \rightarrow **1[^] ESTRAZIONE.**
- 4) Aggiungere:
 - 4g solfato di magnesio,
 - 1g cloruro di sodio,
 - 1g citrato trisodico diidratato,
 - 0,5g citrato d'idrogeno disodico sesquidrato.
- 5) Agitare vigorosamente per 1 minuto \rightarrow **2[^] ESTRAZIONE.**
- 6) Centrifugare per 5 minuti a 3000 giri.
- 7) Trasferire 6ml del surnatante ottenuto, in una provetta monouso contenente: 150mg PSA, 900 mg solfato di magnesio.
- 8) Agitare per 30 secondi e centrifugare per 5 minuti a 3000 giri.
- 9) Trasferire 4 ml del surnatante nuovamente ottenuto, in un vial, ed aggiungere 40 ml di acido formico in acetonitrile 5%.
- 10) Inserire il vial in un becker contenente acqua calda a 40°C .
- 11) Inserire all'interno del vial un puntale collegato alla bombola di azoto, portare cosÌ a secco la soluzione contenuta nel vial.
- 12) Aggiungere nel vial 100 μ l di miscela dei protettori.
- 13) Iniettare 2 μ l della soluzione ottenuta all'interno del GC-MS.

2.2 MATERIALI

REAGENTI E PRODOTTI

- Campioni di Vino
- Acetonitrile, HPLC quality
- Solfato di magnesio - Sigma Aldrich
- Cloruro di sodio - Sigma Aldrich
- Citrato trisodico diidratato - Sigma Aldrich
- Citrato d'idrogeno disodico sesquidrato - Supelco
- Acqua, HPLC quality
- ISTD = Trifenilfosfato [I]= 20 mg/l - Sigma Aldrich
- Bondesil-PSA
- Acido formico in acetonitrile 5%
- Azoto gassoso
- Miscela dei protettori: 15 mg sorbitolo, 30 mg gluconolattone, 15mg acido scichimico, 5ml acqua, portare a volume in un matraccio da 100 ml.
- Acqua calda a 40°C
- Sostanze attive in polvere-Sigma Aldrich

VETRERIA E MATERIALI VOLUMETRICI DA LABORATORIO:

- Bilancia analitica
- Centrifuga
- Sistema GC-MS - Agilent 5975 mds
- Vial in diverse misure e loro tappi per chiusura
- Provette usa e getta in diverse misure con tappi da avvitare
- Tubi da centrifuga da 50 ml
- Pipette automatiche e puntali in diverse misure
- Flaconi con tappo in diverse misure
- Siringhe usa e getta per prelievi
- Pipette in vetro e plastica di diverse misure
- Siringa iniettore GC-MS
- Becker in diverse misure
- Matracci in diverse misure

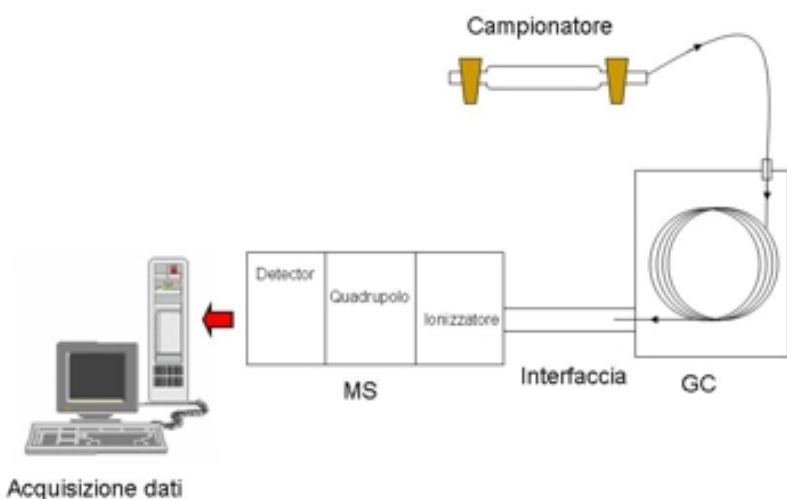
2.3 GAS CROMATOGRAFIA-SPETTROMETRIA DI MASSA

La gas cromatografia-spettrometria di massa, indicata con la sigla GC-MS o GC/MS ovvero la tecnica analitica basata sull'utilizzo di un gascromatografo accoppiato a uno spettrometro di massa.

Il gascromatografo separa i composti presenti nel campione mentre lo spettrometro di massa funziona da rivelatore.

Tale tecnica insieme alla LC-MS costituisce uno dei metodi analitici più avanzati e consente l'identificazione e la quantificazione di sostanze organiche in una varietà di matrici.

L'implementazione delle tecniche GC e MS richiede un adattamento delle caratteristiche della strumentazione cromatografica e spettrometrica per raggiungere un sufficiente grado di compatibilità.



Una rappresentazione schematica di un moderno GC/MS comprende: un cromatografo, uno spettrometro di massa e un sistema di raccolta ed analisi dei dati (DataSystem) che costituisce il sistema per l'analisi e la separazione (qualitativa e quantitativa) di miscele complesse.

Il cromatografo consiste di un iniettore, un sistema per il controllo della temperatura della colonna e una linea di trasferimento che consente all'effluente della colonna di entrare nello spettrometro di massa.

Lo Spettrometro di massa, consiste di una camera di ionizzazione (sorgente di ioni), di un analizzatore di masse (analizzatore a quadrupolo) e di un rivelatore di ioni; il tutto tenuto sotto alto vuoto mediante pompe a diffusione supportate da pompe molecolari.

Da notare che il vuoto (che si aggira intorno ai 10^{-6} – 10^{-5} torr) è necessario per impedire una perdita di ionizzazione per urto con i gas atmosferici.

• LA GAS CROMATOGRAFIA

La gas cromatografia, nota anche come GC, è una tecnica di chimica analitica piuttosto diffusa che si basa sulla ripartizione della miscela da analizzare tra una fase stazionaria ed una fase mobile, in funzione della diversa affinità di ogni sostanza della miscela con le fasi.

Malgrado l'uso di un gas come fase mobile fosse la naturale estensione della cromatografia liquido-solido e liquido-liquido, la gas-cromatografia fu realizzata solamente nel 1941 dai premi Nobel Martin e Synge e soltanto dopo dieci anni cominciò ad entrare nel comune uso di laboratorio.

Questo metodo, che ha conosciuto un grande sviluppo a partire dagli anni '60, conserva tuttora una posizione di primo piano come tecnica analitica. L'unica limitazione della gas cromatografia è la necessità di rendere volatili i campioni da analizzare, per cui in alcuni casi essa è soppiantata dall' HPLC (cromatografia liquida ad alto potere risolutivo).

Le caratteristiche che hanno fatto della gas cromatografia una tecnica di larghissimo uso possono essere così riassunte:

- tempi di analisi molto ridotti
- possibilità di separare, operando nelle opportune condizioni, qualsiasi miscela di sostanze
- possibilità di effettuare analisi in serie, in quanto la stessa colonna può essere rigenerata di continuo dal gas di trasporto
- alta sensibilità (quantità di sostanza analizzabile 10^{-5} - 10^{-12} g)

Nella tecnica gas cromatografica la fase mobile è un gas che fluisce attraverso una colonna in cui si trova la fase stazionaria, la quale può essere un solido granulare poroso oppure un liquido.

Secondo lo stato fisico della fase stazionaria, la gas cromatografia si può suddividere in cromatografia gas solido (GSC) e in cromatografia gas liquido (GLC).

I meccanismi di separazione relativi alla GC sono sostanzialmente due: ripartizione e adsorbimento, di cui si il primo nel caso che la fase stazionaria sia liquida, il secondo quando è solida.

Ogni sostanza in uscita dalla colonna genera un segnale che verrà registrato sotto forma di 'picco'.

La successione dei vari picchi, corrispondenti alle varie sostanze in uscita dalla colonna, costituisce il 'cromatogramma'.

• LA SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni di diverso rapporto massa / carica (M/z).

A differenza delle tecniche spettroscopiche, però, questo è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

Il principio su cui si basa è il seguente: una molecola è ionizzata per espulsione di un elettrone; il catione radicalico che si forma (ione molecolare) in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che lo strumento non rileva), in parte generando cationi e/o radicali cationi (ioni frammento).

Lo ione molecolare e i vari ioni che si originano per frammentazione (cationi e radicali cationi) vengono discriminati sulla base del loro rapporto massa/carica e rivelati da un detector.

L'esperimento di spettrometria di massa consiste dunque nella ionizzazione di molecole in fase gassosa, nella separazione dei diversi ioni prodotti e nella loro rivelazione.

Il risultato dell'esperimento è lo spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (ricordiamo che per ottenere uno spettro di massa, dunque, il requisito essenziale è di produrre degli ioni in fase gassosa).

Questa tecnica consente di misurare le masse molecolari (sia nominali che esatte) e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi un'impronta digitale.

Si può così individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

L'interpretazione dello spettro di massa consiste nello studio dei segnali dovuti agli ioni generati nell'esperimento, dai quali si può ricostruire a ritroso la struttura molecolare originale.

Le prestazioni analitiche della spettrometria di massa possono essere esaltate associando questa tecnica alla gascromatografia liquida di tipo normale (colonne impaccate) o capillare ad alta efficienza. Infatti uno dei problemi presentati dalla spettrometria di massa è quello di possibili interferenze derivanti da alcune sostanze presenti in una miscela; qualche componente della miscela può dare origine infatti a righe che si sovrappongono a quelle delle sostanze in esame .

Se invece si fa precedere la spettrometria di massa da una GLC si ottiene in pratica una nuova tecnica analitica, più potente perchè unisce le ottime caratteristiche di risoluzione della GC con quelle della MS che è una tecnica ottima per il riconoscimento di sostanze incognite.

Per introdurre però in continuo, i componenti di una miscela che fuoriescono separati da una colonna gascromatografica, nella camera di ionizzazione di uno spettrometro di massa,occorrono dei dispositivi particolari.

Se si sono impiegate colonne impaccate, bisogna allontanare la maggior parte del gas carrier, arricchendo così il componente da esaminare.

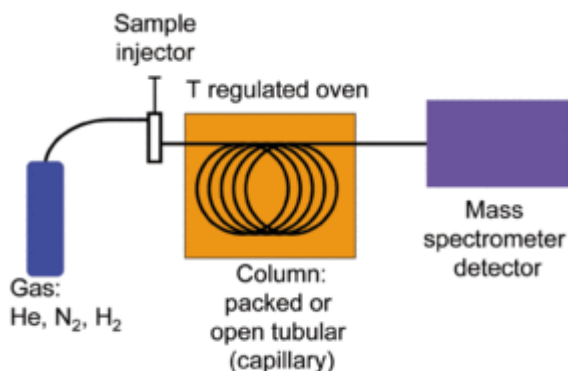
Questo si può fare con separatori molecolari è necessario però utilizzare elio o H₂ come gas carrier, nel gascromatografo.

Applicando un'aspirazione con una pompa da vuoto, le molecole di H₂ o He, di piccole dimensioni diffondono più agevolmente attraverso i pori della membrana allontanandosi nella pompa mentre le molecole della sostanza che hanno dimensioni maggiori, entrano nello spettrometro di massa. Per colonne capillari, poichè i flussi del gas carrier sono ridotti, si può avere un collegamento diretto tra la colonna del gascromatografo e la camera di ionizzazione dello spettrometro.

Si può, in alternativa usare il sistema "open-split" che fa uso di un flusso di elio che impedisce l'ingresso dell'aria nella camera di ionizzazione dello spettrometro.

In ogni caso, considerando che l'uscita di un picco dalla colonna gascromatografica dura pochi secondi,lo spettrometro di massa deve essere dotato di un analizzatore di massa del tipo a scansione molto rapida.

2.4 STRUMENTAZIONE GC-MS:



1) Sistema di alimentazione gas di trasporto (carrier)

Si tratta di bombole di gas inerte, nel nostro caso idrogeno. Lo scopo principale è quello di trascinare i componenti della miscela in analisi lungo la colonna cromatografica.

2) Iniettore o camera di iniezione

Il suo compito è assicurare l'istantanea vaporizzazione del campione.

Poiché con l'uso di colonne capillari, la quantità di campione da iniettare è dell'ordine dei nanolitri, e misurare queste quantità con siringhe è praticamente impossibile (con apposite siringhe si arriva ai μL), sono state messe a punto particolari tecniche di iniezione.

Spesso si utilizzano quindi opportune tecniche (split, ...) che consentono di far entrare effettivamente in colonna solo una parte (ad esempio ca. 1/100) del liquido iniettato.

La camera di iniezione è corredata da un sistema di resistenze variabili attraverso le quali è possibile fissare la temperatura ritenuta più adatta per la vaporizzazione della miscela.

L'introduzione del campione viene effettuata con una iniezione su un apposito disco di gomma al silicone, posto tra una ghiera metallica e il dispositivo di attacco alla colonna.

3) Colonna

La colonna può essere di due tipi: impaccata o capillare:

L'impaccata (diametro interno 2-4 mm, lunghezza 1-4 m), usata nella gascromatografia classica, comporta una separazione in colonna di acciaio o di vetro (due metri circa) riempita di materiale inerte (supporto per la fase stazionaria) sul quale è distribuita una pellicola sottile di liquido (fase stazionaria) continuamente attraversata da un gas (fase mobile) detto gas di trasporto. Il processo di separazione è limitato dalla lentezza di eluizione della molecole del campione lungo la colonna.

La capillare (diametro interno 0,1-0,8 mm, lunghezza 10-100 m), ormai di uso comune, rappresenta un'importante innovazione per la sua rapidità di eluizione e per una migliore risoluzione (il numero di picchi risolti, in metà tempo, è superiore di oltre quattro volte quello della colonna impaccata).

Essa è molto più lunga dell'impaccata (anche cento metri), di diametro molto minore e quindi contiene una quantità molto minore di fase stazionaria, per cui la quantità di campione da iniettare è molto più piccola e viene eluita prima.

4) sistema di controllo della temperatura della colonna

Le colonne sono alloggiare in una camera termostatica, in genere a circolazione di aria calda, con questo sistema viene assicurata una buona stabilità di temperatura. Un dispositivo permette all'operatore di fissare la temperatura, la quale può essere mantenuta costante per tutta la durata dell'analisi (isoterma) oppure fatta variare (programmata).

5) linea di trasferimento

Consente all'effluente della colonna di entrare nello spettrometro di massa

6) Spettrometro di massa

Composto da:

1. Introduzione del campione (Sample Inlet System)

L'introduzione del campione nella camera di ionizzazione può essere fatta sia allo stato solido, usando una sonda, che allo stato liquido o gassoso, usando un sistema di valvole che permettono di accedere alla camera di ionizzazione senza che questa venga a contatto con l'esterno.

La quantità di prodotto necessario per registrare uno spettro è dell'ordine dei microgrammi/nanogrammi.

E' possibile utilizzare l'uscita di un sistema GC o HPLC come ingresso dello spettrometro di massa.

Queste tecniche, note come GC-MS e HPLC-MS, sono estremamente utili nell'analisi di miscele di prodotti.

2.Camera di ionizzazione

Se una molecola è investita in fase vapore da un fascio di elettroni di notevole energia cinetica si può avere per urto la sua ionizzazione a ione positivo o negativo.

In genere gli strumenti sono regolati per lavorare unicamente con ioni positivi, i quali possono spontaneamente o per urto decomporsi in una serie di frammenti di massa inferiore e questi a loro volta in altri.

Ogni molecola avrà quindi una sua frammentazione caratteristica e specifica che dipenderà sia dalla natura delle molecole sia dalle condizioni operative di ionizzazione.

Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione, in cui il fascio di elettroni viene prodotto da una sorgente ionica che varia a seconda della tecnica utilizzata.

In genere gli elettroni sono emessi da un filamento caldo di tungsteno o renio, e passano attraverso un condotto, che crea il raggio, nella parte centrale della camera che contiene il campione gassoso.

La frazione di elettroni che non urta contro le molecole è raccolta da una trappola per gli elettroni, le molecole che non sono ionizzate sono allontanate dalla pompa ad alto vuoto, mentre quelle ionizzate sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore.

Il sistema di ionizzazione svolge un ruolo essenziale nella spettrometria di massa, perché da esso dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa. Per questo motivo le tecniche utilizzate sono numerose e alcune di esse danno origine a particolari varianti nella spettrometria di massa.

Tra i vari dispositivi alcuni consentono di analizzare solo frammenti positivi, altri invece, permettono la rivelazione anche di ioni negativi.

Inoltre alcune tecniche di ionizzazione sono decisamente potenti, operano cioè ad alta energia e portano ad una frammentazione spinta, altre invece operano a bassa energia producendo un numero inferiore di ioni.

In base al tipo di sorgente utilizzata la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo; le tecniche più utilizzate sono:

- 1) impatto elettronico (E.I.)
- 2) ionizzazione chimica (C.I.)
- 3) electrospray (E.S.I.)

3. Analizzatore

L'analizzatore consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica.

I più comuni sono:

L'Analizzatore Magnetico

L'Analizzatore a doppia focalizzazione

L'Analizzatore a quadruplo

L'Analizzatore a trappola ionica

L'analizzatore più usato, è quello Magnetico, perchè consente di ottenere le risoluzioni migliori.

E' costituito da un tubo lungo circa 1 metro, piegato con un raggio di curvatura r' ed immerso in un campo magnetico H .

Gli ioni che escono dalla camera di ionizzazione entrano nel tubo analizzatore e, per effetto del campo magnetico, subiscono una deviazione dalla loro traiettoria rettilinea (deflessione). La nuova traiettoria curvilinea ha un raggio di curvatura r che è direttamente proporzionale alla quantità di moto dello ione (mv) e inversamente proporzionale al campo magnetico H .

Di conseguenza per un certo valore della coppia H e V esisterà un solo valore di massa m per cui il raggio di deflessione r coincide con il raggio di curvatura del tubo r' .

Gli ioni che hanno questo valore di massa escono dal tubo, gli altri no.

Operando a potenziale V costante e facendo una scansione di campo H è possibile fare uscire dal tubo gli ioni a diversa massa in tempi diversi.

Gli ioni che escono dal tubo vengono raccolti da un fotomoltiplicatore, che traduce l'intensità degli ioni in corrente elettrica (Rivelatore). Gli strumenti sono tarati (si usano dei perfluorocheroseni) in modo che a ciascun valore di campo corrisponda un certo valore di massa. In questo modo la corrente ionica è registrata in funzione non del campo B , ma della massa m . Si ottiene così lo spettro di massa, che è un istogramma che riporta in ascisse i valori di massa crescente (gli strumenti sono tarati in genere da 30 a 1000 uma) e in ordinate la corrente ionica.

4. Rivelatore

Come collettore e rivelatore degli ioni si usa comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata.

Quando uno ione arriva sul primo elettrodo questo emette un fascio di elettroni che vanno a colpire il secondo elettrodo, il quale a sua volta emette una quantità maggiore di elettroni e così via.

Il risultato è una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.

7) Registratore e integratore (Sistema di raccolta dei dati)

Il segnale in uscita dal rivelatore passa ad un registratore che ha il compito di realizzare il tracciato cromatografico.

2.5 IL CROMATOGRAMMA DI MASSA

Un cromatogramma di massa (*mass chromatogram*) è un cromatogramma costruito avendo come rivelatore uno spettrometro di massa. L'asse x rappresenta il tempo di ritenzione e l'asse y l'intensità,

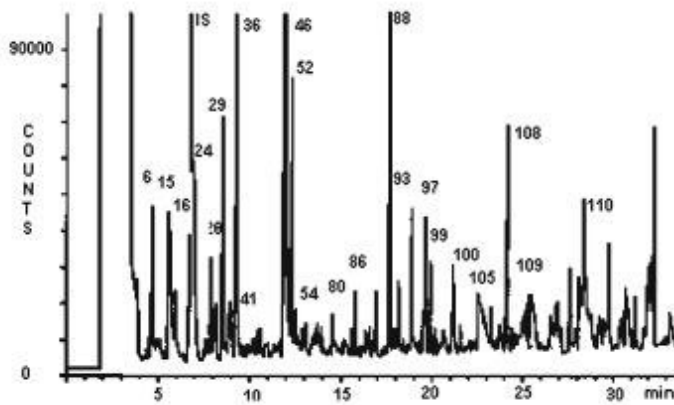


Figura: cromatogramma a spettro di massa

Esistono diversi tipi di cromatogramma di massa:

- ***Total Ion Current (TIC)***

Il cromatogramma *total ion current* (TIC), corrente ionica, rappresenta la somma delle intensità dell'intero intervallo di masse che è stato rilevato a ogni punto dell'analisi.

- ***Base peak***

Il cromatogramma *base peak*, picco base, è simile a un cromatogramma TIC, tuttavia riporta solo il picco più intenso di ogni spettro.

Cioè in un cromatogramma base peak è riportata l'intensità del picco più intenso per ogni punto dell'analisi.

- ***Extracted Ions (XIC)***

Un cromatogramma *extracted ions* (XIC or EIC), ioni estratti, anche chiamato cromatogramma *reconstructed ions* (RIC), ioni ricostruiti, rappresenta solamente uno o più ioni che sono stati estratti (ricercati) dal data set, dopo l'acquisizione.

- ***Selected Ion Monitoring (SIM)***

Un cromatogramma *selected ions monitoring* (SIM), monitoraggio di ioni selezionati, è simile a un cromatogramma XIC, ma a differenza di quest'ultimo, dove i segnali vengono estratti da una scansione completa, nel SIM vengono direttamente acquisiti solo i segnali di interesse.

- ***Selected reaction monitoring***

Un cromatogramma *selected reaction monitoring* (SRM), monitoraggio di reazione selezionata, è un tipo di cromatogramma che si ottiene con spettrometri di massa tandem come rilevatori. Il cromatogramma riporta i segnali degli ioni prodotti da specifici ioni genitori.

Il *cromatogramma ricostruito dal calcolatore o corrente ionica ricostruita* (RGC = *reconstructed gas chromatogram* o RIC = *reconstructed ion current*) è generato (durante l'analisi) sommando le intensità di tutti gli ioni in ciascuno spettro di massa acquisito in scansione ripetuta e ponendo in grafico i valori così ottenuti come funzione nel numero di spettro (=scansione); conoscendo la durata della scansione, la scala data dal numero progressivo di spettro può essere convertita direttamente in scala dei tempi (di ritenzione).

Il suo tracciato è analogo al TIC (anzi a volte è così indicato o anche come ioni totali TI=total ions) ma mentre quest'ultimo è registrato prima di separare il fascio ionico, il RIC è dato dalla somma (l'integrale) delle intensità degli ioni dopo la loro separazione.

Questo genere di cromatogramma assomiglia ad un *cromatogramma di corrente ionica totale* (TIC) od a un *cromatogramma di rivelatore a ionizzazione di fiamma* (FID), sebbene l'aspetto dei picchi possa risultare distorto se le scansioni non sono state acquisite abbastanza frequentemente.

Meno scansioni si registrano durante l'eluizione di un picco GC, meno accurata sarà la sua riproduzione.

E' implicito che si possa passare in qualsiasi momento dalla corrente ionica totale (RIC, RGC, ...) allo spettro desiderato, localizzandolo con cursore o con numerazione mostrata all'apice del picco; il calcolatore fornirà lo spettro già normalizzato sia sotto forma grafica (istogramma) sia, a richiesta, sotto forma numerica (tabella, matrice).

Il *cromatogramma* (RIC) serve come utile istogramma dei dati dal momento che correla gli spettri registrati con i componenti del campione; inoltre, poiché ciascun punto del grafico corrisponde ad uno spettro di massa memorizzato dal calcolatore come valori di m/z e abbondanza relativa %, l'operatore può usare il sistema per classificare diverse centinaia (migliaia) di spettri.

La GC/MS genera quindi segnali tridimensionali caratterizzati da m/z , abbondanza % relativa, n° scansione cioè tempo di ritenzione gascromatografico

Con tutte le scansioni ripetute immagazzinate nel calcolatore, l'intensità di qualsiasi ione può essere estratta da ciascuna scansione e posta in grafico in funzione del tempo; questo grafico, detto appunto cromatogramma di massa o profilo ionico (ion profile), può essere ottenuto anche in tempo reale e ricorda quello della rivelazione selettiva degli ioni (SID) ma nei suoi confronti è meno sensibile, a causa del tempo di campionamento molto più breve usato nella scansione ripetuta.

Il vantaggio di questo segnale è che, tramite una oculata scelta del valore m/z posto in grafico, ottiene la selettività dell'analisi per specifici composti (es. utilizzando lo ione molecolare) o per particolari classi.

I cromatogrammi di massa sono specialmente utili per un rapido esame di complessi dati GC/MS onde determinare la presenza ed i tempi di ritenzione di composti contenenti un determinato ione.

Sebbene l'altezza del picco gascromatografico diminuisca col porre in grafico soltanto uno ione, anche il rumore di fondo verrà ridotto con conseguente "pulizia" dei tracciati.

Se sono conservati tutti gli spettri di massa registrati durante l'analisi, si può generare un cromatogramma di massa per ciascun valore di m/z entro i limiti di scansione dello spettrometro.

Ovviamente si possono sommare le intensità degli ioni per un (limitato) intervallo di masse come funzione del tempo; questa variante ha dato prova di utilità specialmente nell'analisi di idrocarburi policlorurati.

• ESEMPI DI CROMATOGRAMMA DI MASSA

Ottenuti presso il Laboratorio Sinergo soc.Coop. di Nizza Monferrato.



Figura 1: campione di vino tal quale con standard interno Dieldrin utilizzato per la determinazione dei fitofarmaci.

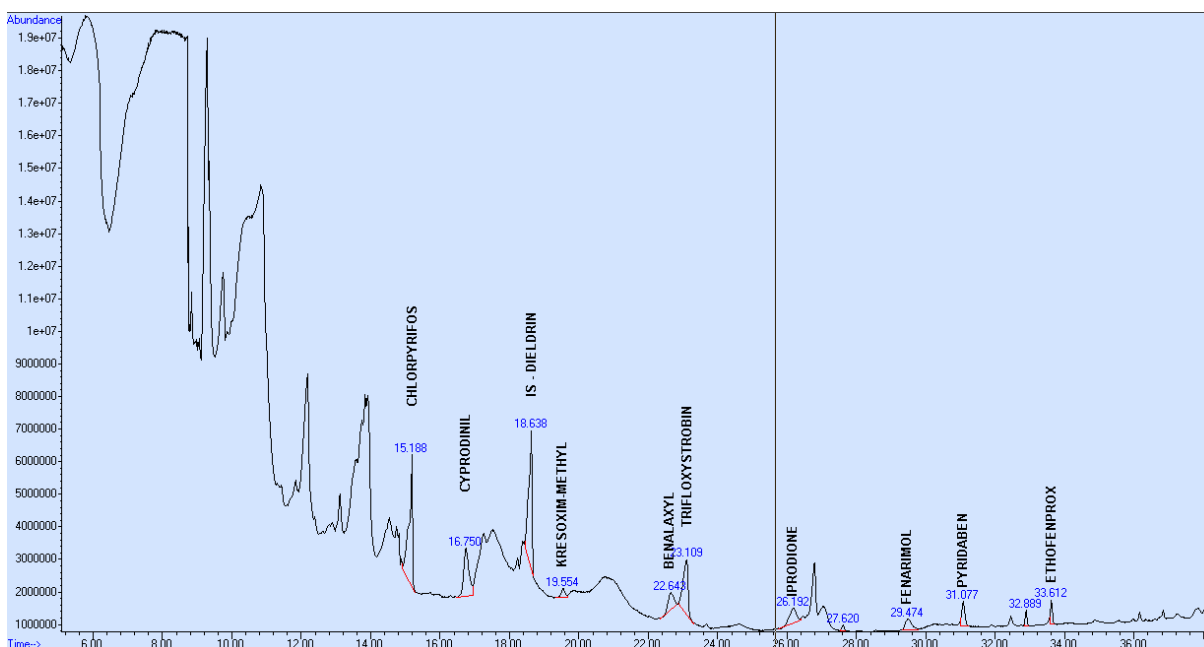


Figura 2: campione di vino contenente: chlorpyrifos, cyprodinil, kresoxim-methyl, benalaxyl, trifloxystrobin, procimidone, fenarimol, pyridaben, ethofenprox, e standard interno Dieldrin.

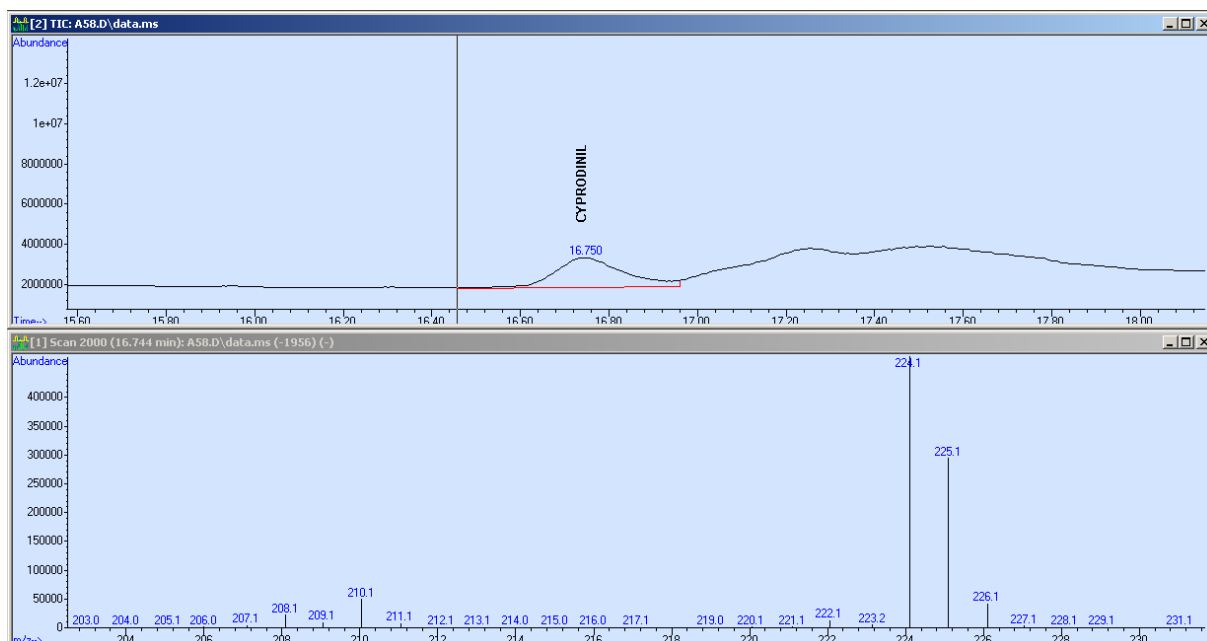


Figura 3: campione di vino contenente cyprodinil con tempo di ritenzione ed integrazione dell'area (nella parte superiore), suo distinto spettro di massa con ioni caratteristici (parte inferiore).

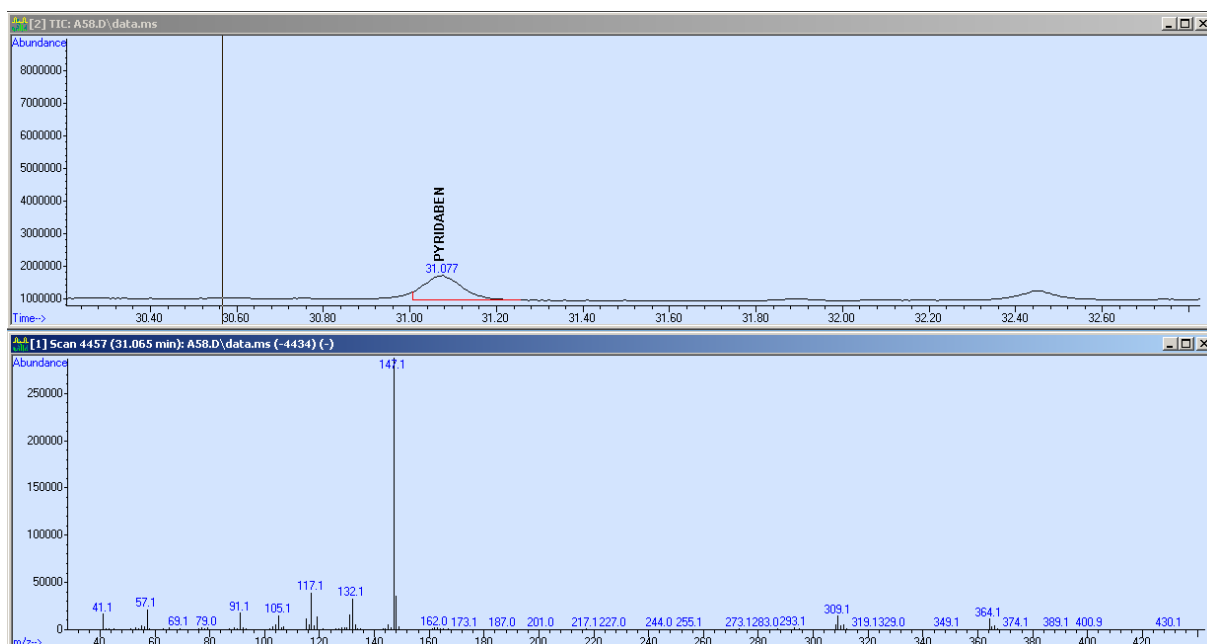


Figura 4: campione di vino contenente pyridaben con tempo di ritenzione ed integrazione dell'area (nella parte superiore), suo distinto spettro di massa con ioni caratteristici (parte inferiore).

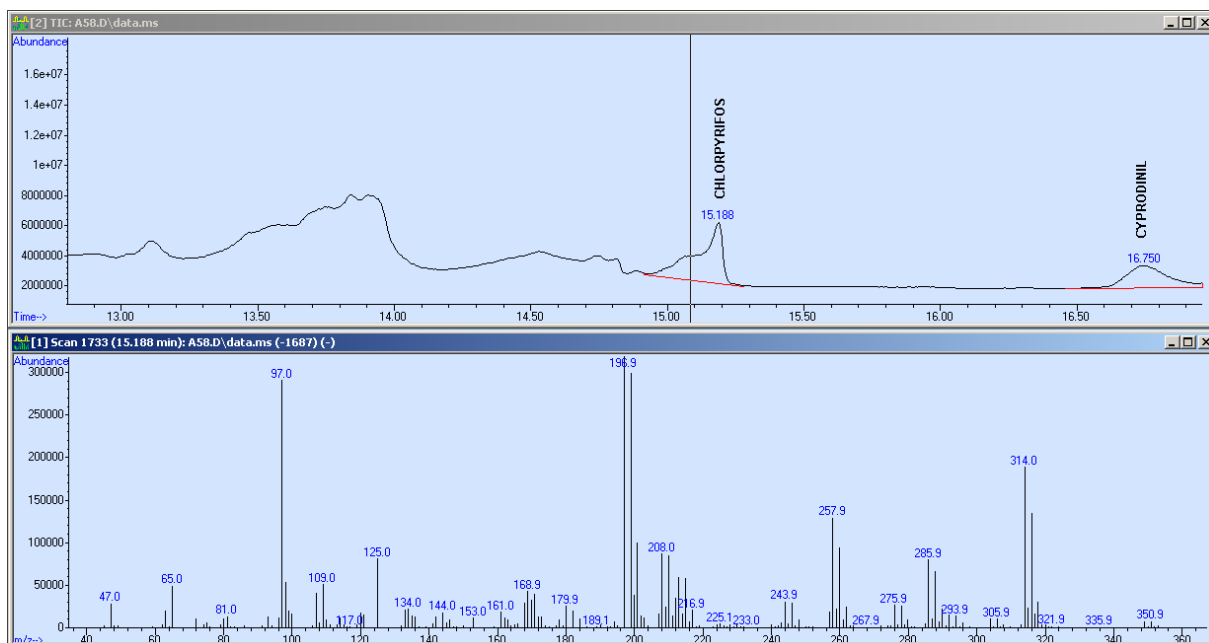


Figura 5: campione di vino contenente chlorphiryfos e cyprodinil con loro tempo di ritenzione e integrazione dell'area (parte superiore), spettro di massa contenente ioni caratteristici di entrambe le sostanze (parte inferiore).

2.6 ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA TRAMITE GC-MS.

• ANALISI QUALITATIVA

Essenziali ad una analisi seria in GC-MS sono una buona pianificazione e preparazione.

L'origine dei contaminanti ed artefatti può essere la vetreria, i solventi, i reagenti, l'iniettore del GC, la colonna GC o l'aria stessa del laboratorio.

Quantità in tracce di sostanze organiche provenienti da una di queste sorgenti possono assumere un grande significato dopo l'operazione di concentrazione. Di conseguenza è molto importante comprendere anche l'analisi di opportuni bianchi e di campioni di controllo persino quando si sono prese tutte le precauzioni per evitare la contaminazione. Più operazioni sono coinvolte prima della analisi GC-MS (cioè più il campione viene "maneggiato") e più importante è il ruolo del bianco nello schema analitico. Prima di un'analisi GC-MS è necessario un adeguato procedimento di controllo per assicurare il corretto funzionamento dello strumento. Dopo aver acquisito i dati GC-MS ed aver raccolto un insieme di spettri sottratti dal rumore di fondo dei componenti di interesse, il procedimento di identificazione può essere migliorato rispetto alle risposte della ricerca automatica.

Quando la ricerca in biblioteca sembra aver avuto successo e ha fornito una o più risposte, l'operatore -analista deve paragonare visivamente lo spettro di massa incognito con quelli proposti dalla biblioteca e prendere la decisione finale. L'occhio umano è un ottimo sistema per il riconoscimento e l'accoppiamento di forme. Un paragone tra spettri deve essere seguito per completare l'identificazione da un accettabile paragone tra (i tempi) gli indici di ritenzione sulla stessa colonna GC.

Gli indici di ritenzione (RI) possono essere determinati tramite iniezione contemporanea di una miscela di composti. Purtroppo questi indici di ritenzione non sono aggiunti alle banche dati commerciali perché non c'è e non può esserci accordo sull'insieme di condizioni o sulla colonna GC di riferimento. Di conseguenza molti laboratori si costruiscono la propria banca dati di spettri e di tempi di ritenzione (o indici).

Il punto debole di una analisi automatica GC-MS tramite calcolatore è il procedimento di ricerca in banca dati "biblioteca" per l'identificazione dei componenti; questo procedimento paragona un insieme complesso ma incompleto di dati con un altro usando un algoritmo che si basa su approssimazioni e che utilizza dati semplificati.

Il risultato ha un elevato potenziale di errori; possono verificarsi con frequenza imprevedibile "identificazioni" false positive (come pure false negative).

Nonostante tutti i suoi limiti, la ricerca in biblioteca è un utilissimo aiuto all'interpretazione ma deve essere considerata soltanto un punto di un rigoroso procedimento di identificazione.

• ANALISI QUANTITATIVA

L'utilizzo della gascromatografia spettrometria di massa (GC-MS) nell'analisi quantitativa è collegato all'introduzione negli anni '60 della tecnica di rivelazione selettiva di ioni "Selected Ion Monitoring" (SIM).

Questa tecnica consiste nel focalizzare lo spettrometro di massa su uno o più ioni, l'applicazione analitica quantitativa comporta il confronto dell'intensità della corrente ionica generata dagli ioni della sostanza in esame rispetto a quella prodotta dagli ioni di una sostanza presa come standard di riferimento e aggiunta in concentrazione nota al campione. Si ha quindi il controllo specifico di uno o più ioni di massa m/z caratteristici delle sostanze in esame mentre molecole che non producono ioni a questi valori non vengono rivelate (lo spettrometro in questo caso è utilizzato come rivelatore selettivo del gascromatografo). Rispetto alle tradizionali tecniche gascromatografiche la GC-MS-SIM costituisce un aumento di specificità (in quanto il campione in esame viene identificato sia dal tempo di ritenzione gascromatografico che da uno o più ioni specifici selezionati) e di sensibilità (infatti è possibile dosare quantità dell'ordine dei 10^{-9} – 10^{-14} g).

Il seguente schema riassume il protocollo per l'applicazione della GC/MS come tecnica di saggio analitico

Punti fondamentali preliminari alla quantitativa:

1. analizzare il campione qualitativamente
2. preparare un elenco di composti da determinare quantitativamente (analiti)
3. selezionare un appropriato standard interno per ciascun analita
4. escogitare un'accettabile "matrice di controllo" per la calibrazione/convalida

Le procedure per l'analisi quantitativa devono tener conto degli effetti di matrice, delle perdite di analita durante l'estrazione e la concentrazione, delle variazioni del comportamento nell'iniettore e nella colonna GC. Il caso inoltre di analisi di più componenti nella stessa matrice poi non è di facile esecuzione. La risposta del rivelatore, di solito l'area del profilo della corrente di uno ione caratteristico, è direttamente correlata alla quantità ma non è necessario e soprattutto non è opportuno calibrare questa risposta mediante standardizzazione esterna.

Di conseguenza viene usato uno standard interno (SI) e viene determinato un rapporto di risposte che ovviamente è correlato alla quantità di analita.

Viene eseguita la calibrazione del rapporto delle risposte analizzando soluzioni contenenti diverse quantità note di analita insieme con una quantità costante di standard interno.

Da queste misure si ricava la "curva standard", un grafico dei rapporti delle risposte rispetto alla quantità o concentrazione dell'analita. Lo scopo di questo procedimento è di eliminare o rendere minimi gli errori associati alle variazioni nell'iniettore, colonna, rivelatore.

Se lo standard interno viene aggiunto all'estratto appena prima della GC-MS, allora l'analisi quantitativa si riferisce soltanto all'estratto concentrato.

Se lo scopo è quantificare la sostanza nella nostra matrice originale sarà necessario determinare il recupero dell'analita dalla matrice; questa operazione è tediosa, difficile e non priva di errori; è meglio evitarla quando è possibile. La soluzione più semplice al problema è di aggiungere (ed equilibrare) lo standard interno direttamente al campione (matrice) originale; purtroppo questo non è sempre possibile.

Affinché il procedimento rimanga valido è necessario soltanto dimostrare che il rapporto analita/standard interno rimanga inalterato.

Poche strategie di analisi quantitativa sono superiori alla GC-MS con standard interno, naturalmente la scelta dello standard interno è il fattore cruciale di questa procedura.

Una volta estratte e purificate le sostanze da analizzare, generalmente devono essere convertite in molecole meno polari e più volatili (e quindi più adatte all'analisi GC) tramite manipolazioni chimiche cioè reazioni di formazione di derivati (es. eteri, esteri ecc.).

L'analisi quantitativa vera e propria inoltre dipende da un numero di variabili strumentali difficili da mantenere costanti anche tra misure effettuate nella stessa giornata.

Quindi la strategia che viene seguita in GC-MS per superare sia il problema della resa durante la purificazione e preparazione del campione, sia le variabili strumentali è l'aggiunta al campione in esame di uno standard di riferimento (standard interno, S.I.) in quantità nota prima di tutti i passaggi preparativi.

Tenendo presente che lo scopo dello standard interno (S.I.) è di stabilire un rapporto di concentrazioni con l'analita nella matrice campione che sia accuratamente riflesso dal rapporto di risposta di ioni preselezionati misurati nel passaggio analitico della GC-MS, i seguenti fattori sono determinati per le scelte:

1. non deve essere un componente della matrice campione,
2. deve avere proprietà fisiche e chimiche molto simili a quelle dell'analita,
3. l'indice (tempo) di ritenzione gascromatografico deve essere molto simile a quello dell'analita,
4. lo ione caratteristico dovrebbe avere un valore di m/z simile a quello dell'analita.

L'analita e il suo standard interno dovrebbero equilibrarsi in modo eguale tra i vari siti leganti potenziali nella matrice campione. Tali siti possono includere sostanze disciolte o sospese ma anche le pareti del contenitore del campione. Se si è nel caso di una estrazione liquido - liquido, il coefficiente di ripartizione tra le fasi acquosa e organica deve essere eguale o, se si è nel caso di adsorbimento su una fase solida, le proprietà di adsorbimento e di recupero devono essere le stesse.

Esistono in potenza possibilità di errori grossolani se non vengono rispettate queste condizioni.

La scelta degli ioni da selezionare può influenzare sia la sensibilità che l'accuratezza del metodo.

Bisogna infatti scegliere uno ione che venga prodotto in quantità abbondante durante il processo di ionizzazione e che sia specifico del composto in esame. Generalmente si sceglie lo ione molecolare se abbastanza intenso oppure uno ione di frammentazione con la massa più alta possibile: più alta è la massa, minore è la probabilità di trovare un altro composto che produca esattamente lo stesso ione m/z .

Il processo di formazione dei derivati può essere sfruttato per aumentare il peso molecolare del composto tramite la formazione di composti adatti .

Un'altra possibilità per aumentare la specificità dell'analisi è quella di focalizzare lo strumento contemporaneamente su due ioni della sostanza in esame e di controllare che il loro rapporto rimanga costante ed uguale a quello di uno standard iniettato puro.

Nel caso in cui questo rapporto vari, si ha la certezza della presenza di un inquinante che va ad interferire con l'analisi.

Estendendo il ragionamento si potrebbe pensare di aumentare ancora il numero di ioni da seguire per composto dosato.

La determinazione quantitativa di un composto in un campione incognito viene comunemente effettuata tramite il metodo della predizione inversa utilizzando un'opportuna curva di calibrazione costruita aggiungendo quantità note e scalari del composto in esame ed una quantità di S.I. a campioni bianchi.

Un'identica quantità di S.I. deve essere aggiunta ai campioni incogniti.

I campioni della curva di calibrazione devono passare attraverso tutto il metodo di estrazione, purificazione e derivazione come i campioni incogniti.

Dopo l'analisi viene costruita una curva di regressione (lineare o non lineare) che mette in correlazione i rapporti delle intensità ioniche del composto in esame rispetto allo S.I. con le concentrazioni degli standard di calibrazione.

Utilizzando questa curva è quindi possibile risalire alla concentrazione di un campione incognito dal suo rapporto con lo S.I.

Una corretta interpretazione delle curve di calibrazione è l'unico modo per ottenere dei buoni risultati, ed in particolare l'uso accurato di esse richiede l'esatta conoscenza della loro forma.

Se non esistono interferenze reciproche tra l'analita e lo S.I., allora la curva di calibrazione è una linea retta passante per l'origine e si può applicare il metodo della regressione lineare.

In tutti gli altri casi l'assunzione dell'esistenza di una relazione lineare introduce errori sistematici nel calcolo delle concentrazioni, con notevole diminuzione della accuratezza delle analisi.

E' però quasi sempre possibile approssimare la curva di calibrazione ad una retta, passante o meno dall'origine, utilizzando un intervallo di concentrazioni sufficientemente ristretto ed una opportuna quantità di S.I. (intermedia tra il punto più basso e quello più alto della curva): in questo caso è ancora applicabile la regressione lineare.

Nel nostro caso, per la determinazione dei fitosanitari si è utilizzato il Trifenilfosfato come standard interno, ma comunemente viene anche usato il Dieldrin per questa determinazione con una metodica di preparazione e estrazione del campione differente.

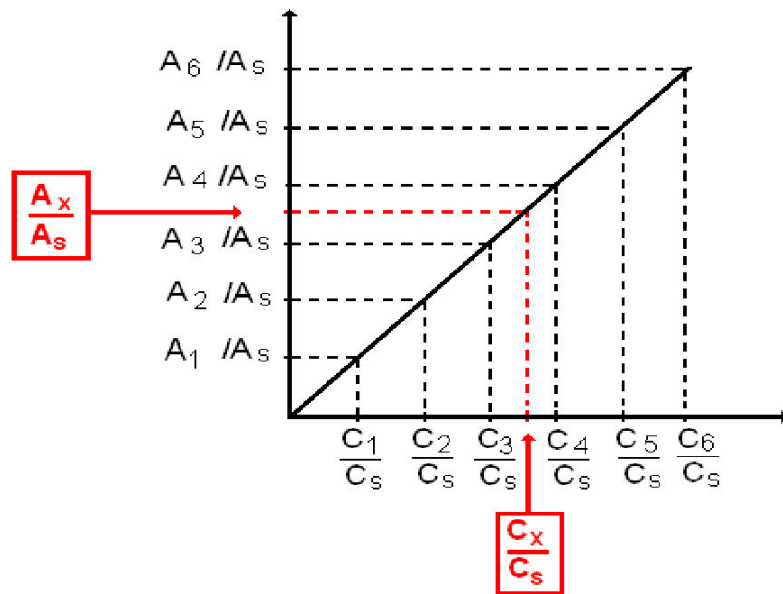


Figura: curva di taratura col metodo dello standard interno

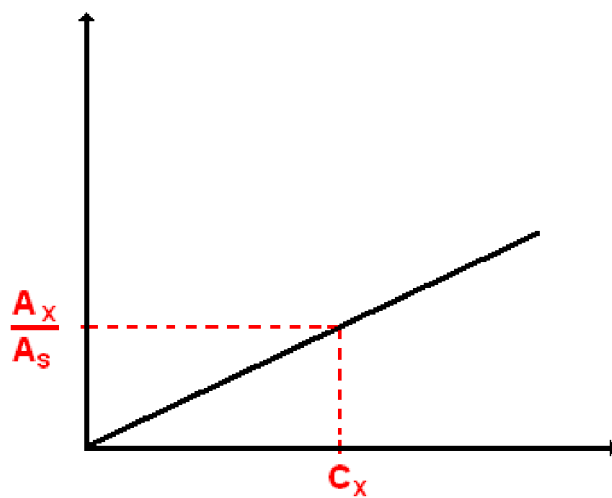
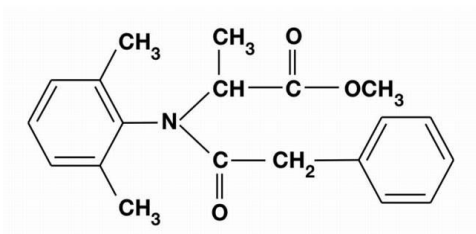


Figura: curva di taratura semplificata

3. SOSTANZE ATTIVE

3.1 ANTICRITTOGAMICI

- **BENALAXYL**

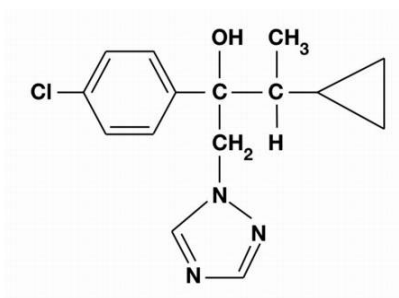


Fungicida sistemico che viene assorbito rapidamente sia per via radicale che per via fogliare prevalentemente con traslocazione per ascendenza.

Nei trattamenti per via radicale è difficilmente dilavabile.

Grazie alle sue proprietà lipofile ed alla scarsa solubilità in acqua, penetra rapidamente nei tessuti ma non è trasportato con eccessiva velocità nella corrente linfatica ascendente e non tende quindi ad accumularsi nelle parti apicali permettendo una buona protezione delle zone mediane.

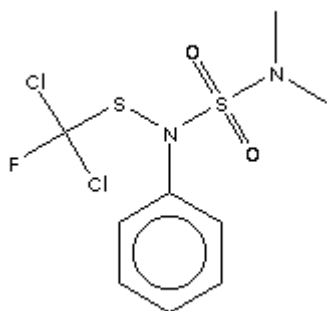
- **CYPROCONAZOL**



Fungicida sistemico che può essere impiegato sia preventivamente che curativamente; infatti agisce all'interno della pianta inibendo la formazione degli austeri del fungo.

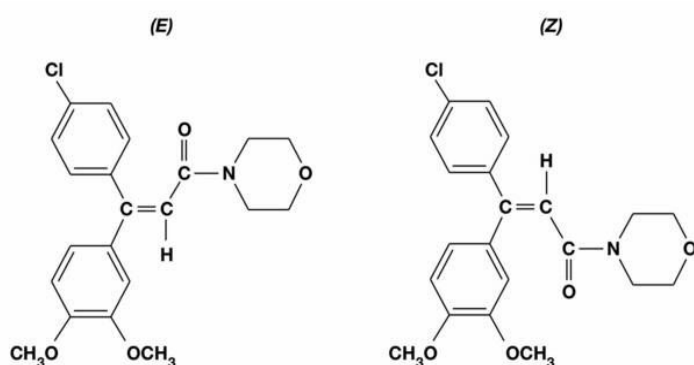
L'assorbimento del prodotto da parte degli organi verdi è molto rapido e termina in circa 30 minuti.

- **DICHLORFLUANID**



Fungicida organico attivo per contatto fogliare contro alcune crittogame. Oltre all'azione anticrittogamica è in grado di stimolare la vegetazione rafforzando i tessuti dell'apparato fogliare. Svolge una buona azione collaterale contro acari e oidio.

- **DIMETHOMORPH**



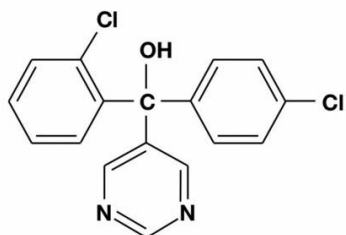
È un derivato dell'acido cinnamico che manifesta un'azione citotropica e translaminare a sistemicità locale.

La sua attività è particolarmente elevata all'inizio dell'infezione, durante ed alla fine del periodo di incubazione, quando avviene la sporulazione.

Viene assorbito rapidamente (1, 2 ore) per via fogliare, dove si sposta translaminarmente dalla pagina superiore a quella inferiore e dal centro verso i margini fogliari.

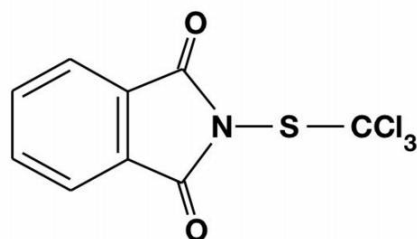
Dal momento che la sua diffusione prosegue anche nei giorni successivi al trattamento, la sua protezione segue la crescita della foglia.

- **FENARIMOL**



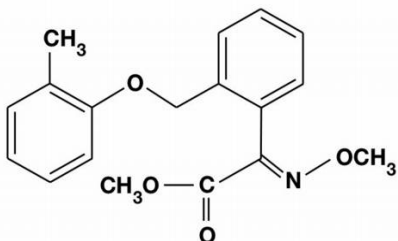
Fungicida citotropico translaminare che viene assorbito rapidamente dall'apparato fogliare e si diffonde nei tessuti. L'azione è quindi svolta sia all'esterno che all'interno dei tessuti e non risente delle diverse condizioni climatiche.

- **FOLPET**



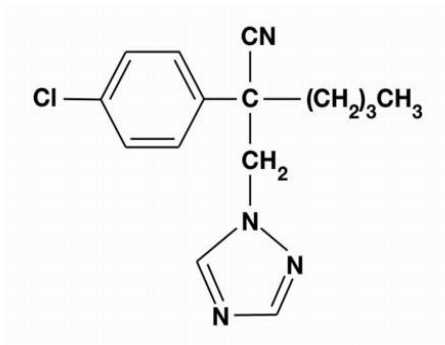
Fungicida che esplica una azione protettiva per contatto. Può essere utilizzato anche durante il periodo di fioritura in quanto non danneggia gli organi floreali.

- **KRESOXIM-METHIL**



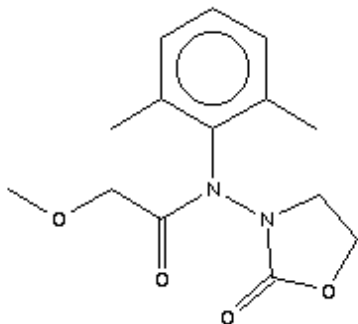
Fungicida di copertura ad attività preventiva ed antisporulante, appartenente alla famiglia degli analoghi delle strobilurine. È dotato di un meccanismo di azione ed evidenzia una protezione di lunga durata. È selettivo per api ed artropodi utili e non determina rugginosità sui frutti.

- **MYCLOBUTANIL**



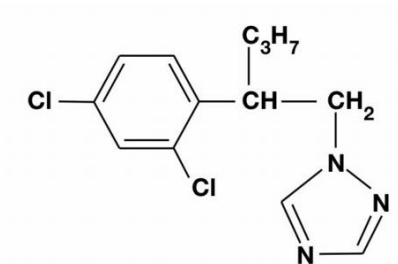
Fungicida endoterapico ad attività preventiva, curativa ed eradicante.
È caratterizzato da un rapido assorbimento e traslocazione nei tessuti (sistemia).
Può essere inoltre associato con diversi principi attivi ad azione di contatto.

- **OXADIXYL**



Fungicida ad azione sistemica il cui spettro di azione è mirato alla lotta alle peronosporacee.
Penetra rapidamente nei tessuti e viene poi traslocato in tutta la pianta in senso acropeto, basipeto e translaminare.
Manifesta una lunga persistenza ed una elevata azione preventiva curativa ed eradicante.
Viene formulato unitamente a fungicidi di contatto con i quali esplica una attività sinergica e quindi una azione più completa.

- **PENCONAZOLE**



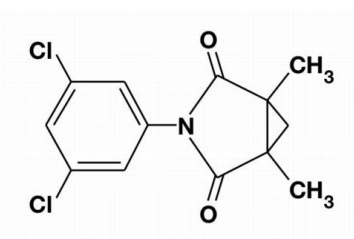
Fungicida sistemico ad ampio spettro d'azione che svolge attività preventiva e curativa.

Viene assorbito molto rapidamente (da 1 a 6 ore) e viene traslocato in senso acropeto e translaminare. (Per la sua traslocazione la temperatura ottimale è di 20°C e la pianta deve trovarsi in fase di accrescimento).

La sua azione avviene all'interno della pianta e l'attività fungicida si esplica nel contatto tra fungo e organi vegetali inibendo la formazione degli austeri.

Possiede inoltre una scarsa efficacia sulla germinazione delle spore.

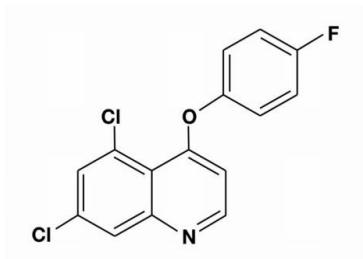
- **PROCYMIDONE**



Fungicida con moderata attività sistemica ad azione di tipo preventivo e curativo. Contro alcune crittogame possiede una elevata persistenza e non altera la fermentazione dei mosti e il gusto dei vini.

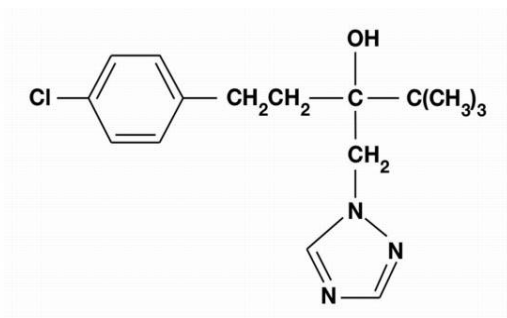
Nei trattamenti alle coltivazioni orto-floricole si consigliano saggi preliminari prima di procedere con il trattamento.

- **QUINOXYFEN**



Principio attivo ad azione antioidica con effetto preventivo.
Se impiegato alla presenza dei primi sintomi delle infezioni primarie è consigliabile utilizzare in miscela con antioidici ad azione endoterapica o curativa.

- **TEBUCONAZOLE**



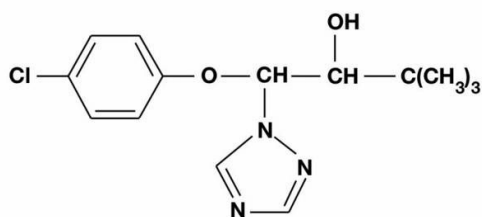
Fungicida triazolico sistemico la cui azione fungitossica si estrinseca a livello della biosintesi degli steroli ed altera la funzionalità della cellula fungina. Agisce in modo preventivo, curativo ed eradicante.

La rapida penetrazione del prodotto (3-6 ore in relazione alla temperatura esterna) e la sua traslocazione per via xilematica, sono due caratteristiche fondamentali di questo principio attivo: infatti sfugge al dilavamento ed è in grado di proteggere la vegetazione sviluppatasi dopo il trattamento.

Oltre ai patogeni tradizionalmente controllati dai triazoli, questo nuovo principio attivo è efficace anche contro parassiti di difficile controllo (monilia, botrite, maculatura o alternariosi del pero, etc.).

Nelle prove in pieno campo si è dimostrato selettivo verso gli artropodi utili in diversi stadi di sviluppo; inoltre non ha effetti sulle api e sulla loro discendenza.

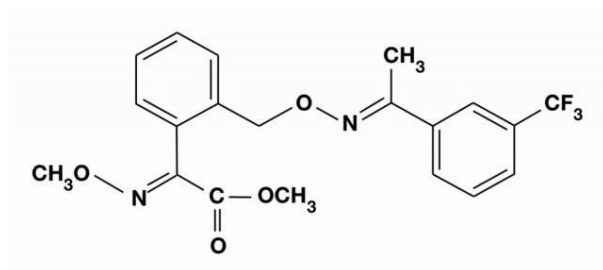
- **TRIADIMENOL**



Fungicida sistemico attivo contro le infezioni provenienti dal seme o dal terreno e diffuse dal vento.

Trattandosi di un principio attivo ad azione sistemica e ad ampio spettro d'azione è in grado di controllare anche le malattie del seme e delle piantine durante le prime fasi di sviluppo.

- **TRIFLOXYSTROBIN**

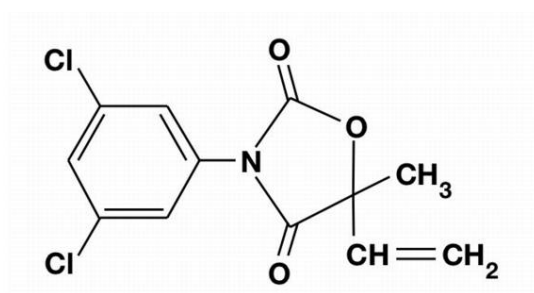


Principio attivo appartenente alla famiglia delle strobilurine, sostanze chimiche di sintesi derivanti da un metabolita prodotto dal fungo *Strobilurus tenacellus*.

Il meccanismo d'azione è mitocondriale, inibisce la catena respiratoria e di conseguenza blocca la produzione di ATP.

La molecola, altamente lipofila, si fissa allo strato ceroso della foglia e agisce mesostemicamente

- **VINCLOZOLIN**

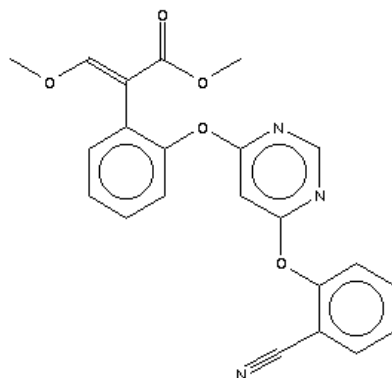


Fungicida di copertura che svolge una azione preventiva e bloccante contro la germinazione delle spore.

Non influisce sulla formazione dei mosti e sull'invecchiamento dei vini.

3.2 ANTIPERONOSPORICI:

- **AZOXYSTROBIN**

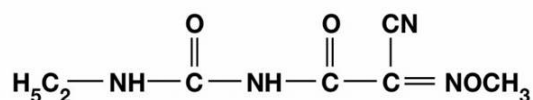


Fungicida ad ampio spettro di azione appartenente alla famiglia degli analoghi delle strobilurine.

Prodotto di copertura, in grado anche di ridistribuirsi uniformemente all'interno delle foglie, risultando così efficace sulle più importanti e dannose malattie della vite. Evidenzia un'azione protettiva di lunga durata.

Si caratterizza per un nuovo meccanismo di azione e per le basse dosi di impiego.

- **CYMOXANYL**

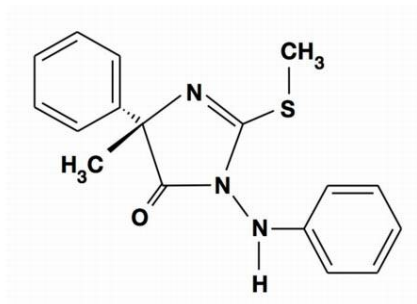


Fungicida ad azione preventiva e curativa che agisce contro le peronosspore sia per contatto sugli elementi di propagazione, sia all'interno della pianta, svolgendo una azione endoterapica e inibendo lo sviluppo del micelio.

Penetra nei tessuti entro 6 ore dal trattamento con azione citotropica e translaminare; il micelio viene attaccato dal momento della germinazione di zoospore o di conidi, sino a 3-5 giorni dopo.

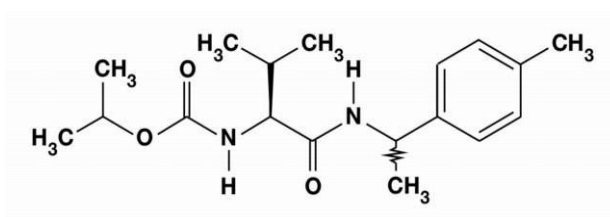
Mantiene l'attività fungicida anche a dosi molto basse e possiede un limitato effetto residuo (4-6 giorni).

- **FENAMIDONE**



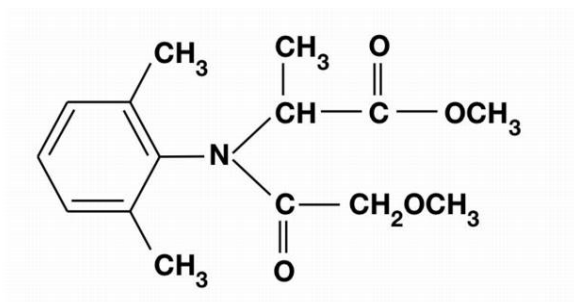
Principio attivo ad azione preventiva di contatto caratterizzato da ampio spettro di azione, per l'impiego nella difesa antiperonosporica della vite del pomodoro e della patata

- **IPROVALICARB**



Antiperonosporico sistemico valido per trattamenti in prossimità della fioritura. In questa fase infatti la coltura è in attiva crescita e la differenziazione delle strutture fiorali è molto rapida; in tale situazione la sostanza attiva garantisce una protezione sistemica anche della vegetazione in via di formazione. Se ne consiglia l'uso alle dosi indicate con turni fra i trattamenti di 7-12 giorni a seconda della pressione del patogeno.

- **METHALAXYL**

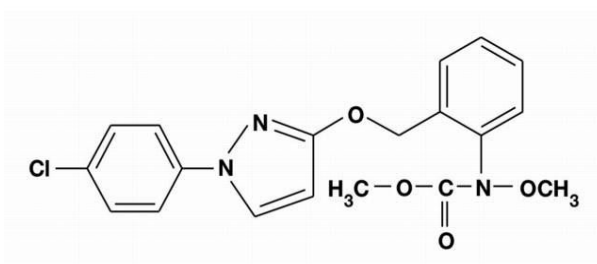


Fungicida sistemico indicato per il controllo e la prevenzione di alcune malattie causate da ficomiceti.

Viene assorbito dalle radici e traslocato per via linfatica molto rapidamente così non risente delle condizioni climatiche avverse (anche se si verifica una pioggia dopo 30 minuti dal trattamento la sua efficacia e persistenza non sono indebolite).

Agisce non solo contro le infezioni dell'apparato radicale ma anche nei riguardi di attacchi alle parti aeree.

- **PYRACLOSTROBIN**

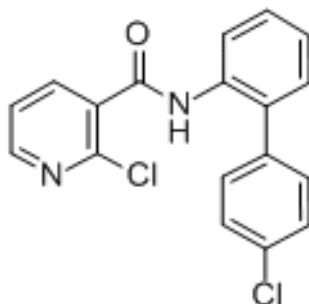


E' un fungicida di copertura, con attività preventiva, indicato per il controllo di numerose malattie della vite e del pomodoro.

E' inoltre indicato per la lotta contro l'oidio del melo, la ticchiolatura del melo e del pero, la maculatura bruna del pero e le malattie fungine da conservazione di mele e pere.

3.3 ANTIBOTRITICI

- **BOSCALID**



E' una sostanza attiva fungicida di contatto, con proprietà translaminari, molto attivo nei confronti di numerosi funghi patogeni.

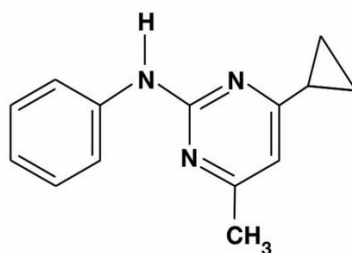
Il prodotto inibisce la germinazione delle spore, l'allungamento del tubulo germinativo, la crescita del micelio e la sporulazione.

Nella pianta viene assorbito dalle foglie e viene trasportato per via translinare attraverso i tessuti fino a raggiungere la lamina opposta.

Durante questo processo una parte della sostanza attiva penetra in profondità nel tessuto e raggiunge la circolazione linfatica seguendo un andamento acropeto fino a raggiungere l'apice ed i margini fogliari.

Le quantità di sostanza attiva traslocate sono sufficienti a garantire la protezione antifungina anche in zone delle foglie non trattate direttamente.

- **CYPRODINIL**



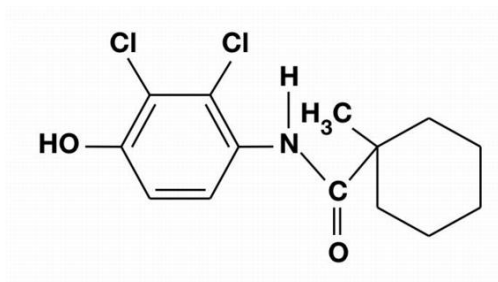
Fungicida appartenente alla famiglia chimica delle anilino pirimidine specifico per ticchiolatura e moniliosi.

È un fungicida parzialmente sistemico che agisce interferendo sulla biosintesi degli aminoacidi inibendo la penetrazione del fungo e la crescita sia sulla superficie, sia all'interno della foglia.

Il suo meccanismo di azione risulta pertanto diverso sia da quello dei prodotti dicarbosimidici, sia dai benzimidazolici e dai triazoli.

Risulta inoltre selettivo nei confronti dei più importanti insetti ed acari utili.

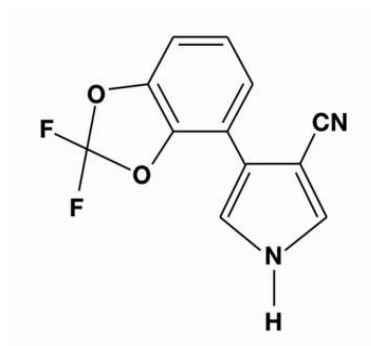
- **FENHEXAMID**



Fungicida non sistemico che agisce per contatto contro *Botrytis cinerea* e *Monilia spp.* che attaccano diverse colture.

Dotato di bassissima tossicità, su alcune colture può essere utilizzato fino ad un giorno dal raccolto, garantendo così una protezione anche nella fase di post-raccolta.

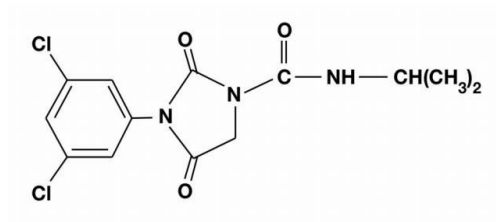
- **FLUDIOXONIL**



Fungicida non sistemico appartenente alla famiglia dei fenilpirroli, particolarmente indicato per la concia di sementi e bulbi.

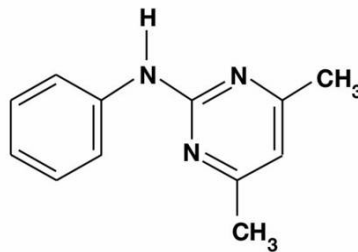
La sua formulazione all'interno dei preparati commerciali (sospensione) permette di garantire una buona distribuzione di prodotto sul seme, la completa assenza di polveri dall'ambiente ed una maggiore fluidità/scorrimento della granella durante il trattamento.

- **IPRODIONE**



Fungicida polivalente che agisce prevalentemente per contatto sia contro le spore che contro il micelio dei funghi parassiti.

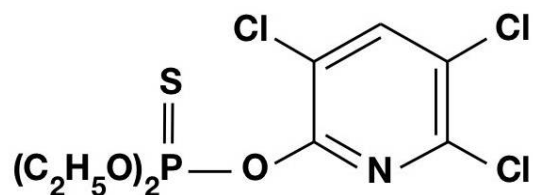
- **PYRIMETHANIL**



Fungicida di contatto con proprietà translaminari che esplica la sua attività biologica inibendo nei funghi patogeni sensibili la secrezione degli enzimi necessari al processo di infezione.

3.4 INSETTICIDI

- **CHLORPYRIFOS**



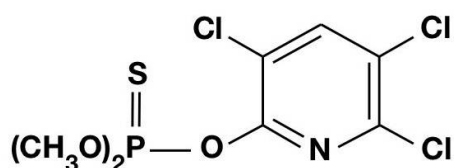
Insetticida che agisce per contatto per ingestione e per vapore.

È volatile e per questo presenta una scarsa persistenza sull'apparato aereo mentre tende a fissarsi nel suolo dove resiste bene al dilavamento.

Si consiglia di non ripetere il trattamento prima che siano trascorsi 12 mesi dall'ultimo intervento con lo stesso principio attivo.

Deve essere distribuito nei solchi preparati per la semina o per il trapianto

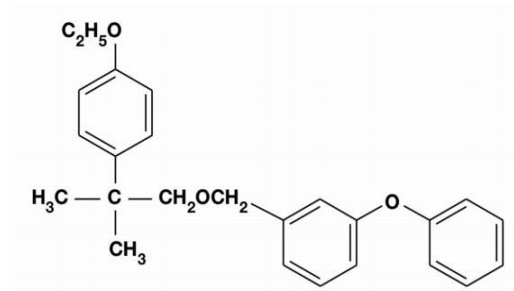
- **CHLORPYRIFOS-METHYL**



Insetticida larvicida ad ampio spettro d'azione e persistenza non elevata, che agisce per contatto, ingestione ed in parte per vapore.

Presenta un elevato potere abbattente anche nei confronti di larve presenti all'interno delle foglie. Possiede una blanda azione acaro frenante.

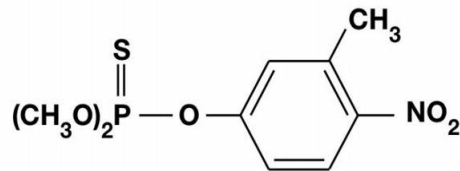
- **ETHOFENPROX**



Insetticida ottenuto partendo dalla struttura di base dei piretroidi dei quali ha mantenuto i punti di forza (rapido effetto abbattente, ampio spettro di azione, breve intervallo di sicurezza) ma migliorandone il profilo ecologico.

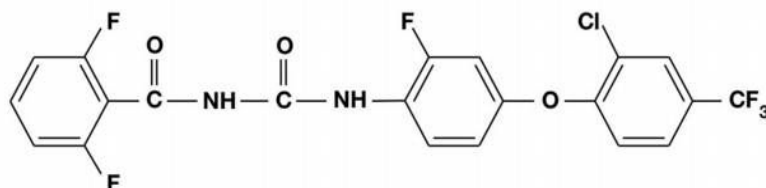
Agisce per contatto e per ingestione interferendo sul sistema nervoso degli insetti mediante l'inibizione del trasporto di sodio lungo le terminazioni nervose. Risulta efficace anche contro ceppi di fitofagi resistenti ai carbammati, ai piretroidi ed agli organofosfatici

- **FENITROTHION**



. Insetticida attivo per contatto e per ingestione dotato di una certa attività ovicida. Inoltre risulta essere citotropico e per questo penetra bene nei tessuti.

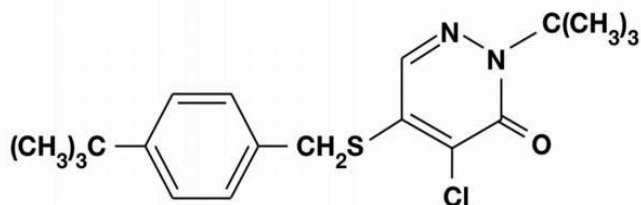
- **FLUFENOXURON**



Insetticida, acaricida chitino inibitore che agisce per ingestione (prevalentemente) e per contatto sui primi stadi larvali di insetti e acari; nei confronti di alcuni insetti esplica anche un'attività ovicida.

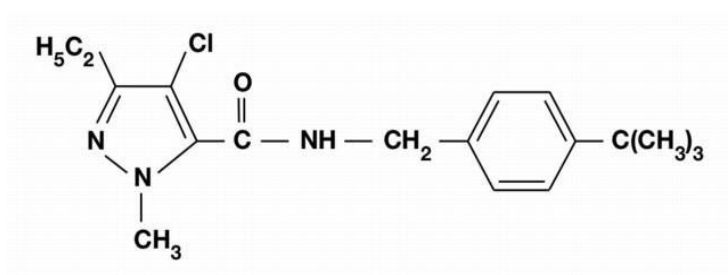
Il prodotto ha una distribuzione translaminare e questo favorisce l'assunzione per ingestione da parte delle larve di lepidotteri e delle forme mobili degli acari. L'azione di contatto si esplica in particolare nei confronti delle uova (queste devono essere deposte da meno di 3 giorni, in modo che il guscio sia ancora permeabile). Manifesta anche un'azione sterilizzante ed antifeeding (disappetente).

- **PYRIDABEN**



Acaricida caratterizzato dalla elevata attività abbattente nei confronti di larve e adulti dei principali acari fitofagi, con particolare riferimento a *Panonychus ulmi*, *Panonychus citri*, *Tetranychus urticae* e *Eoteranycus carpini*.

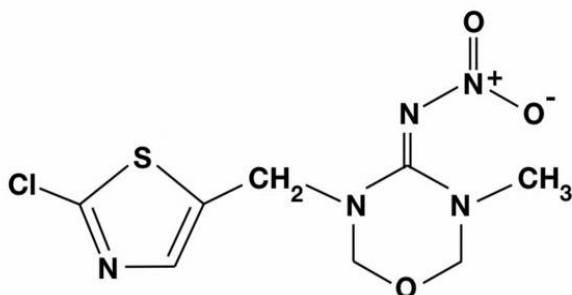
- **TEBUFENPYRAD**



Acaricida che agisce per ingestione e contatto nei confronti di tutte le forme mobili degli acari fitofagi e spiccando un immediato effetto abbattente ed una marcata persistenza di azione, tali da consentire, nella maggior parte dei casi, anche un unico trattamento risolutivo per l'intera stagione.

È dotato di attività translaminare e la sua azione non è influenzata dalla temperatura.

- **THIAMETHOXAM**



Nuova molecola ad attività insetticida appartenente alla famiglia dei neonicotinoidi. Differisce dagli altri principi attivi appartenenti a questa famiglia per le sue proprietà fisico-chimiche e biologiche.

Dimostra una notevole efficacia contro insetti ad apparato boccale pungente, succhiante e masticatorio come trattamento fogliare o al terreno.

Sugli insetti agisce per ingestione e per contatto in quanto, essendo potente antagonista dell'acetilcolina, blocca gli impulsi nervosi a livello dei recettori nicotinici.

I fitofagi colpiti cessano di alimentarsi quasi subito dopo l'applicazione.

Il principio attivo è altamente sistemico e, dopo il trattamento per aspersione, viene rapidamente assorbito dall'apparato fogliare.

Se applicato al terreno il prodotto viene assorbito dalle radici e trasportato attraverso lo xilema negli organi fotosinteticamente attivi della pianta.

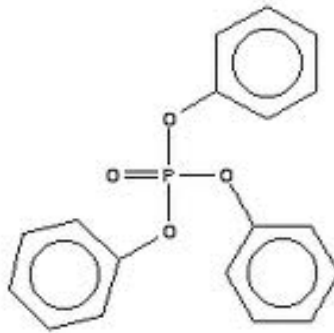
Nella foglia il prodotto si muove negli spazi intercellulari, dove rimane disponibile a lungo, ed è in grado di prevenire la scomparsa di nuove infestazioni.

Agisce indipendentemente dalla temperatura e, grazie alla rapida penetrazione all'interno della foglia, la sua efficacia non viene influenzata dalla pioggia caduta poche ore dopo il trattamento.

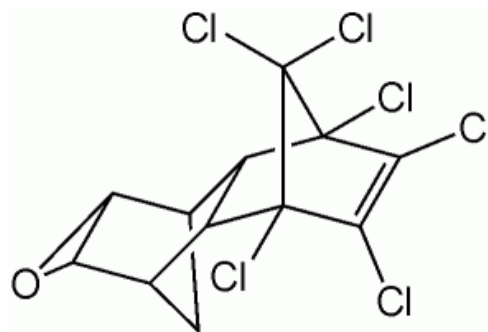
In base a specifiche ricerche, la sostanza attiva ha un limitato impatto sugli artropodi utili.

STANDARD INTERNO:

- **TRIPHENYL PHOSPHATE**



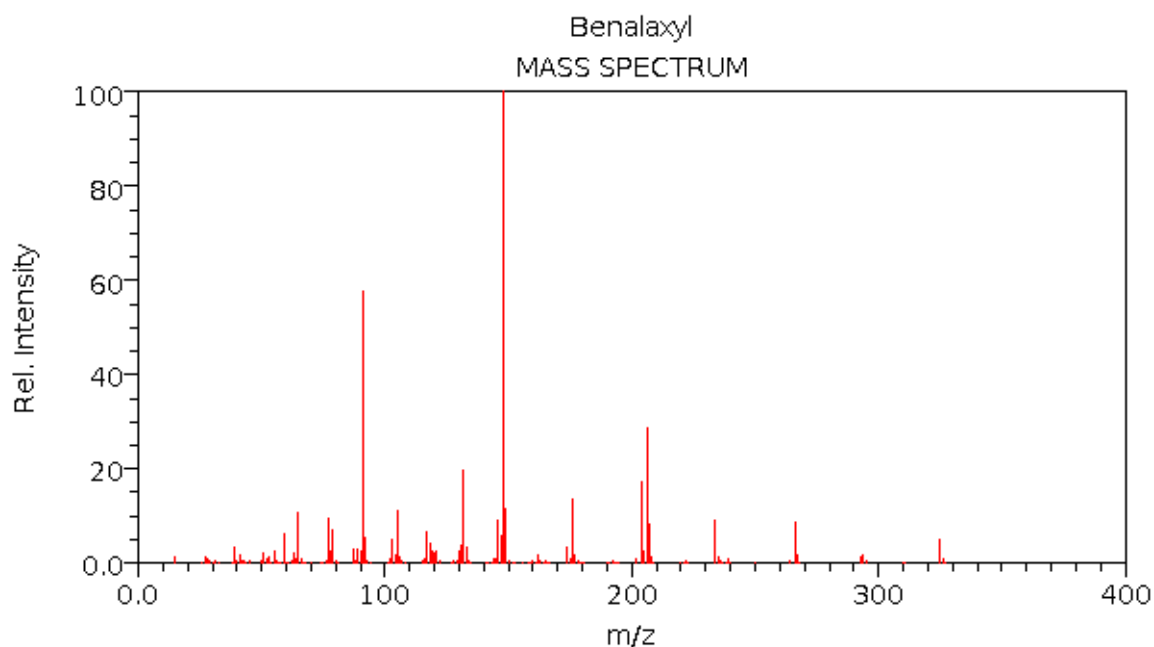
- **DIELDRIN**



4. SPETTRI DI MASSA DI SOSTANZE ATTIVE:

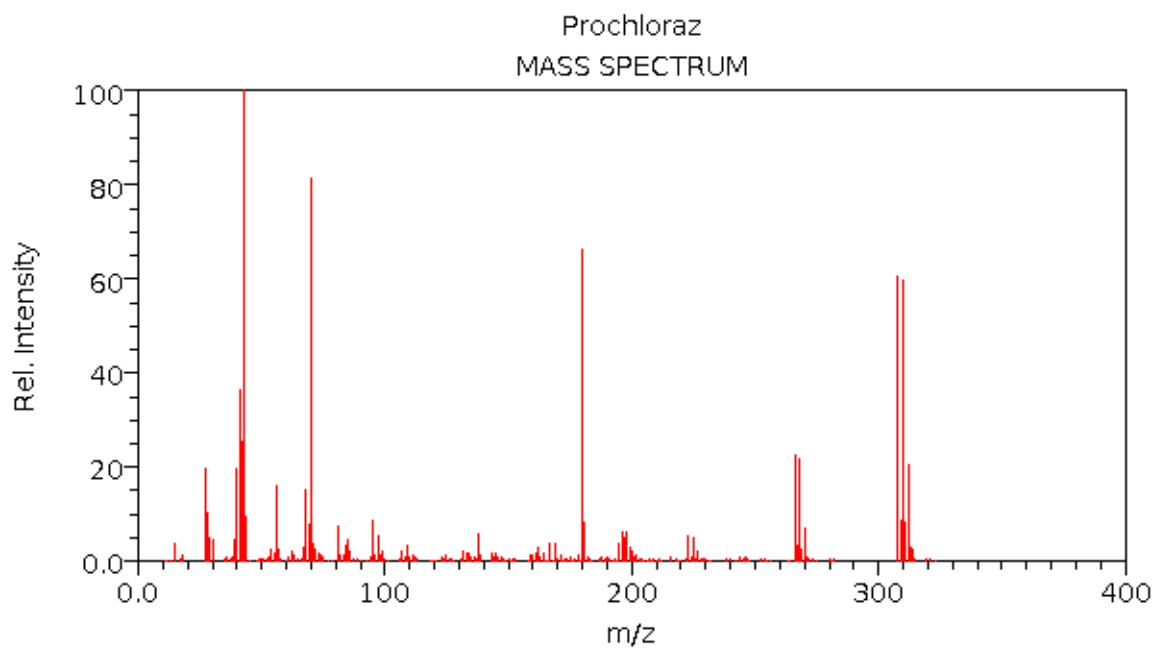
4.1 ANTICRITTOGAMICI:

- **BENALAXYL**



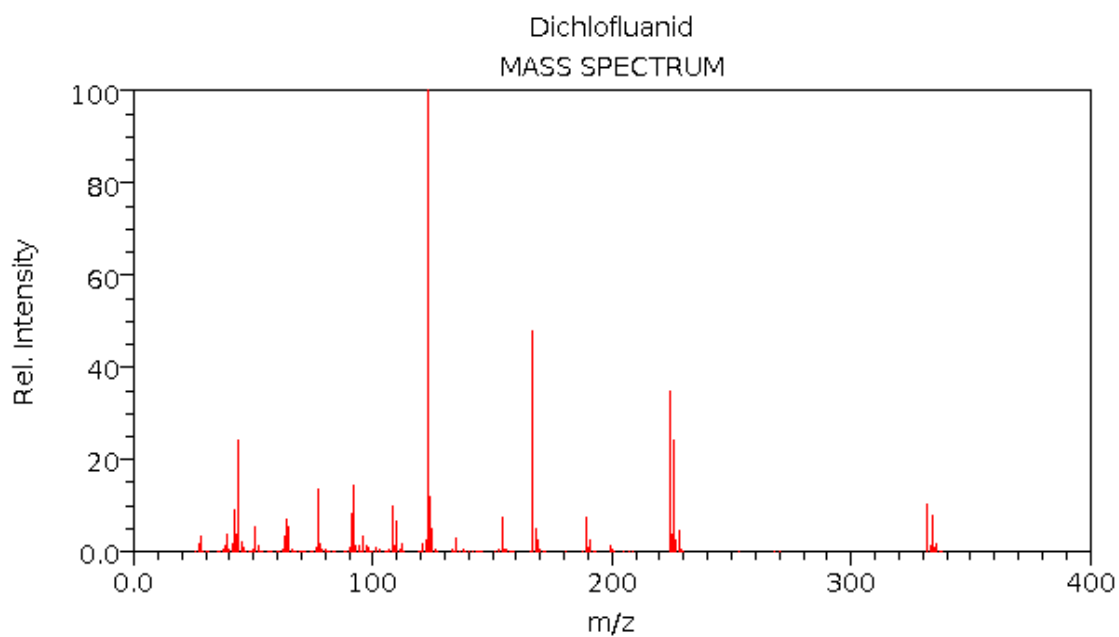
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **CYPROCONAZOL**



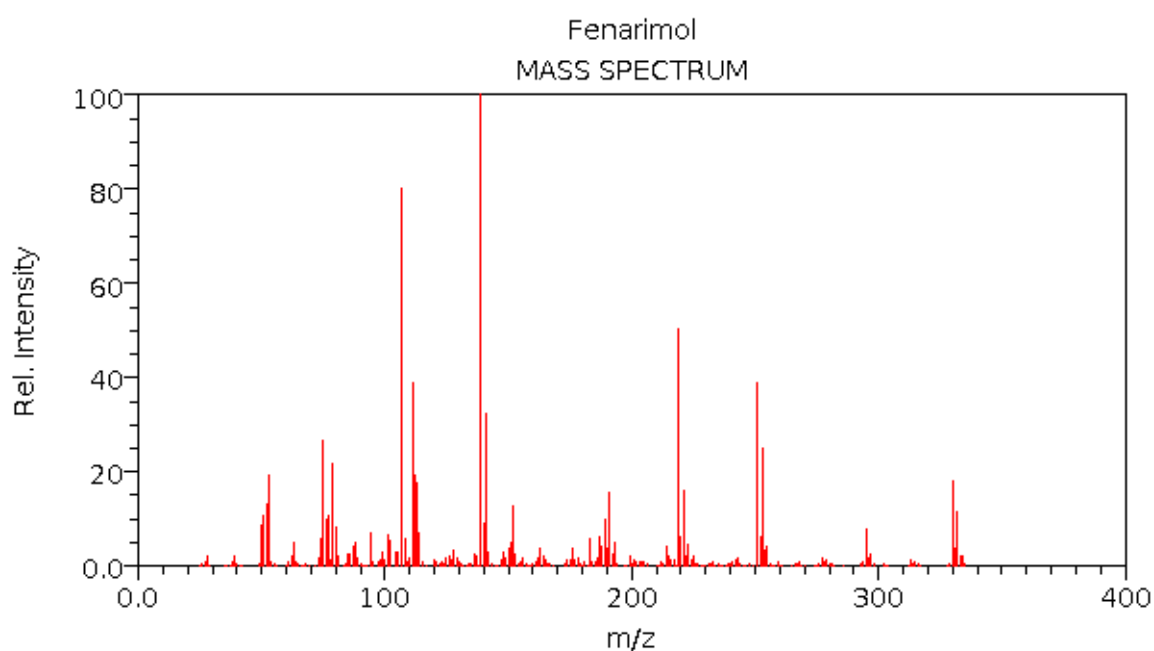
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **DICHLLOFLUANID**



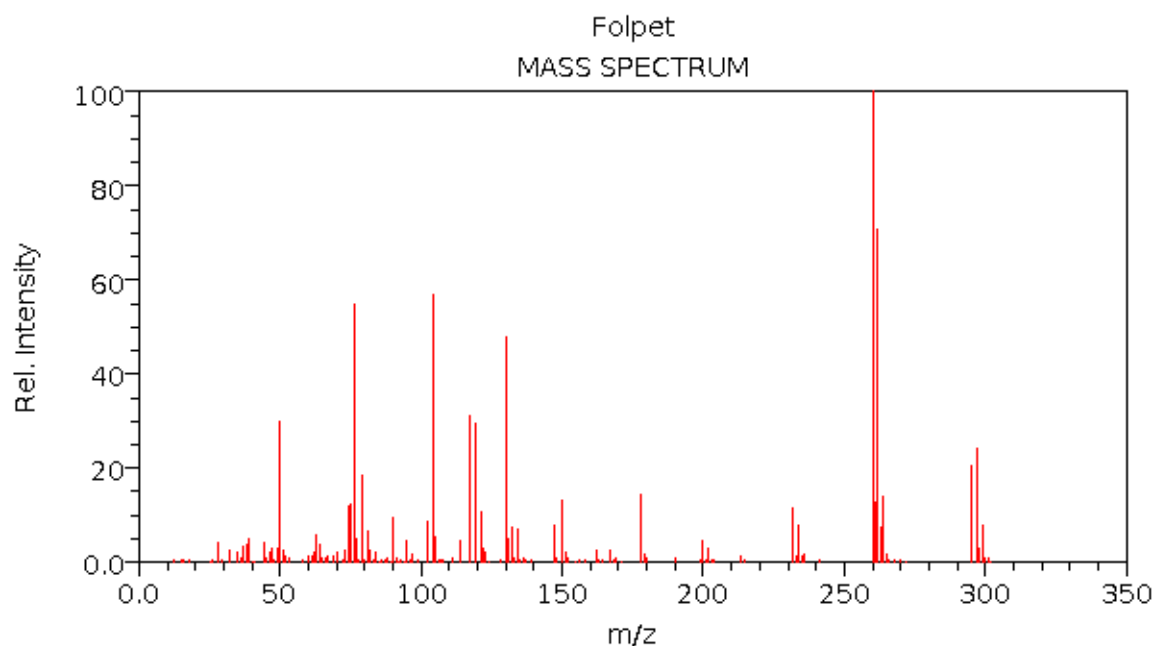
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **FENARIMOL**



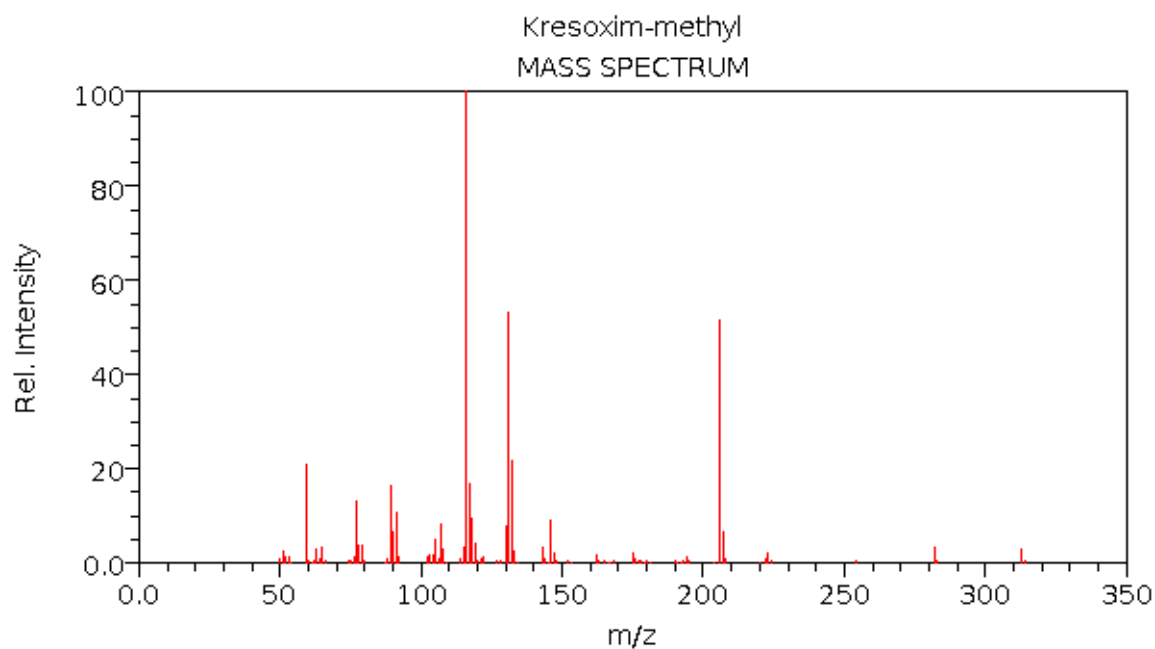
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **FOLPET**



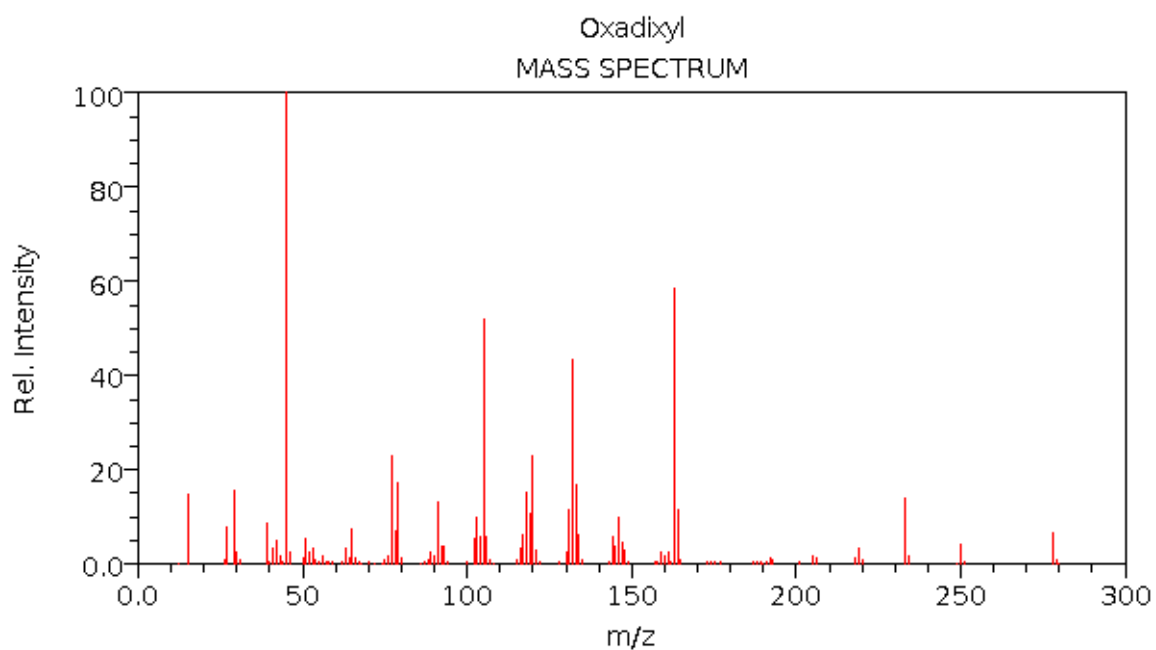
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **KRESOXIM-METHIL**



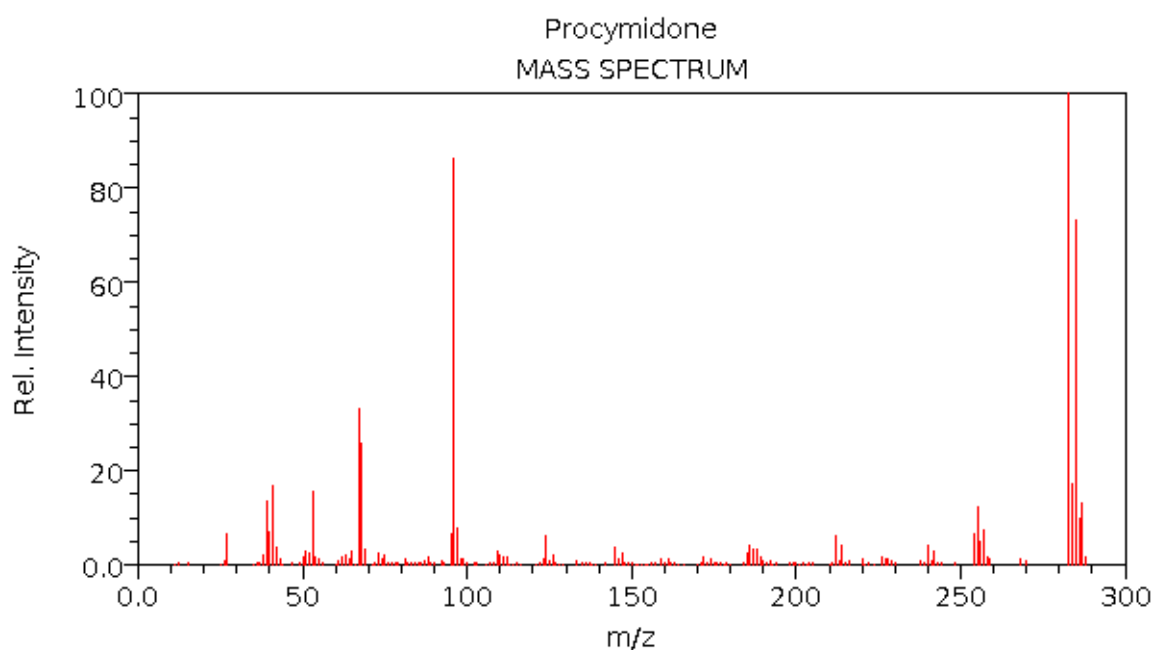
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **OXADIXYL**



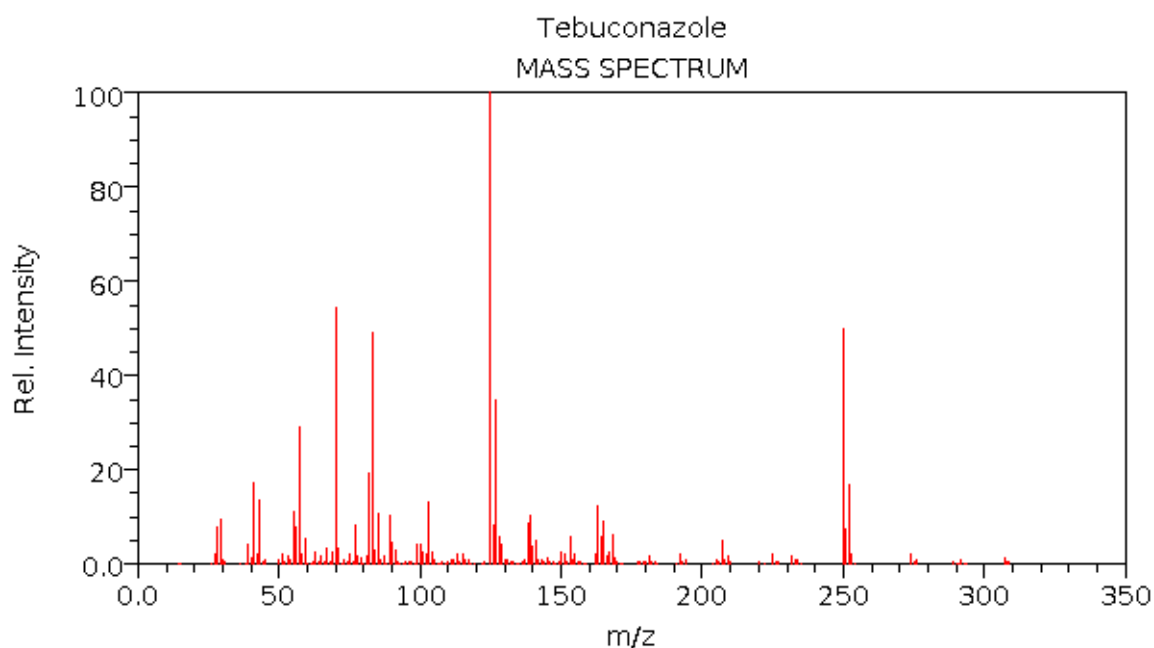
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **PROCYMIDONE**



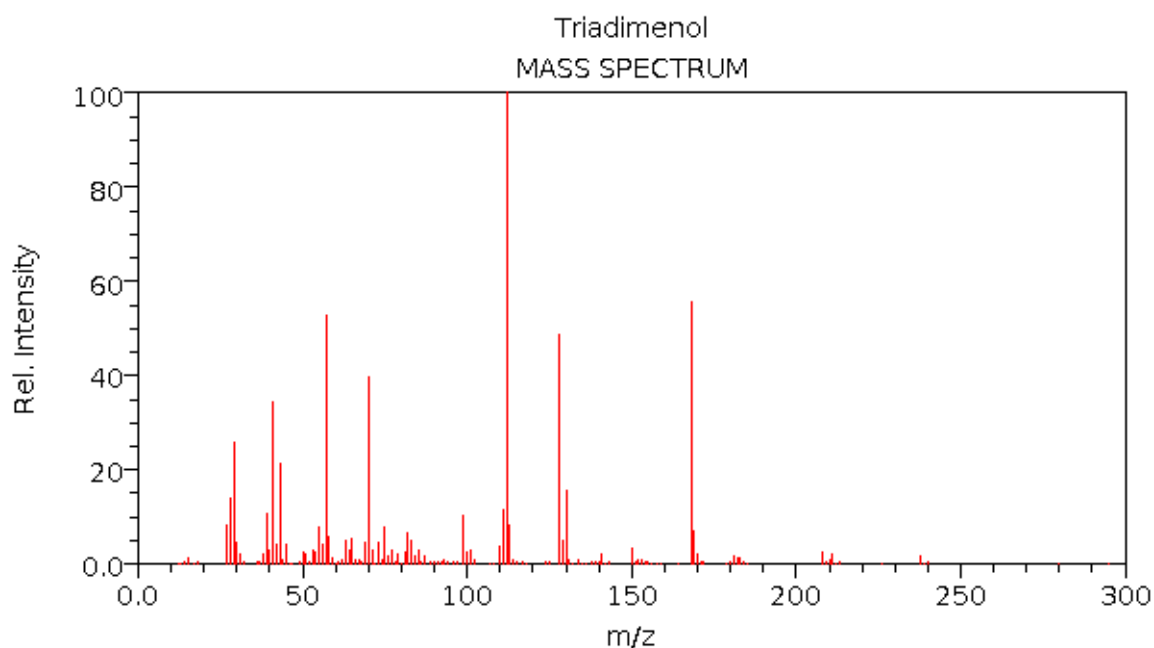
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **TEBUCONAZOLE**



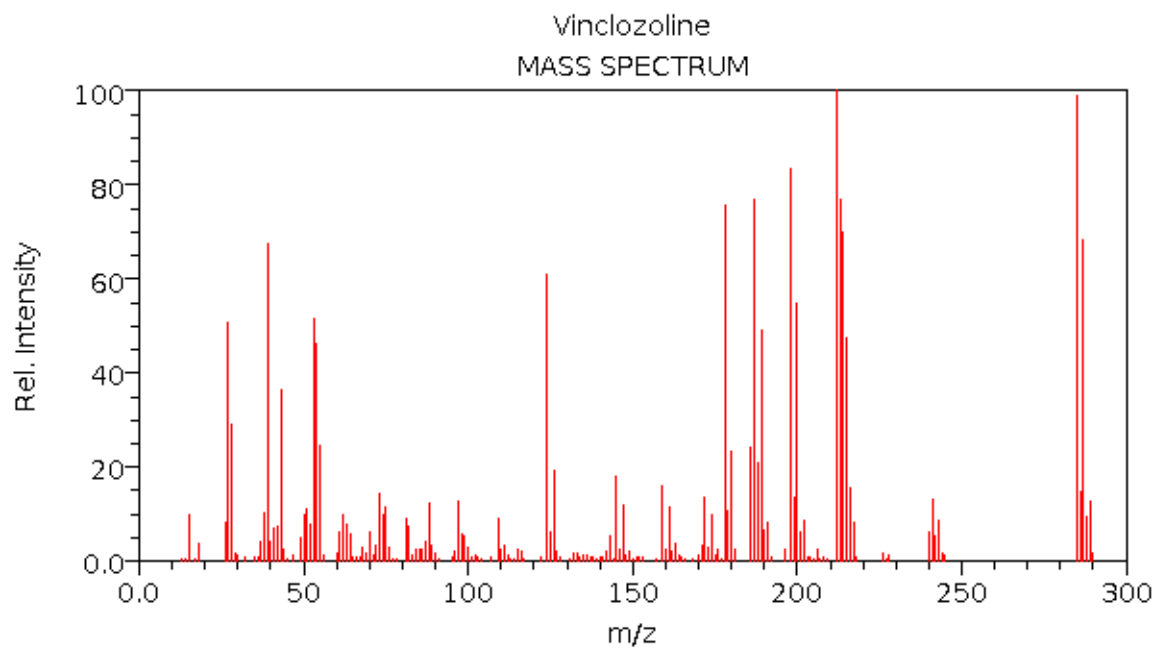
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **TRIADIMENOL**



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

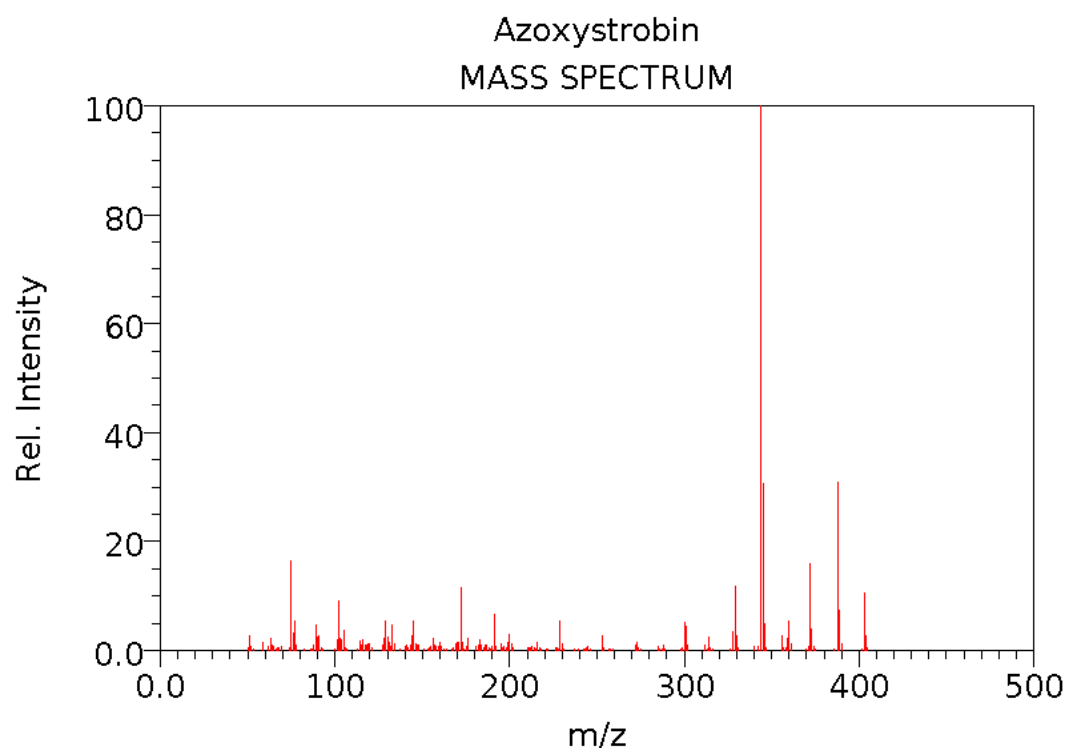
- **VINCLOZOLIN**



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

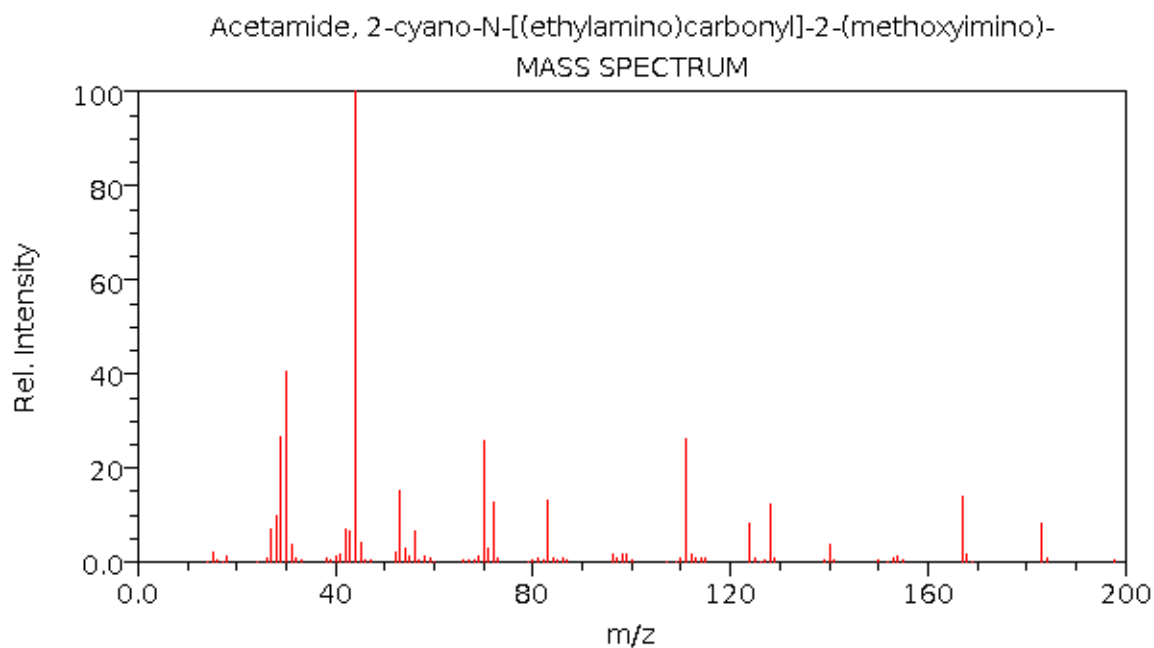
4.2 ANTIPERONOSPORICI:

- **AZOXYSTROBIN**



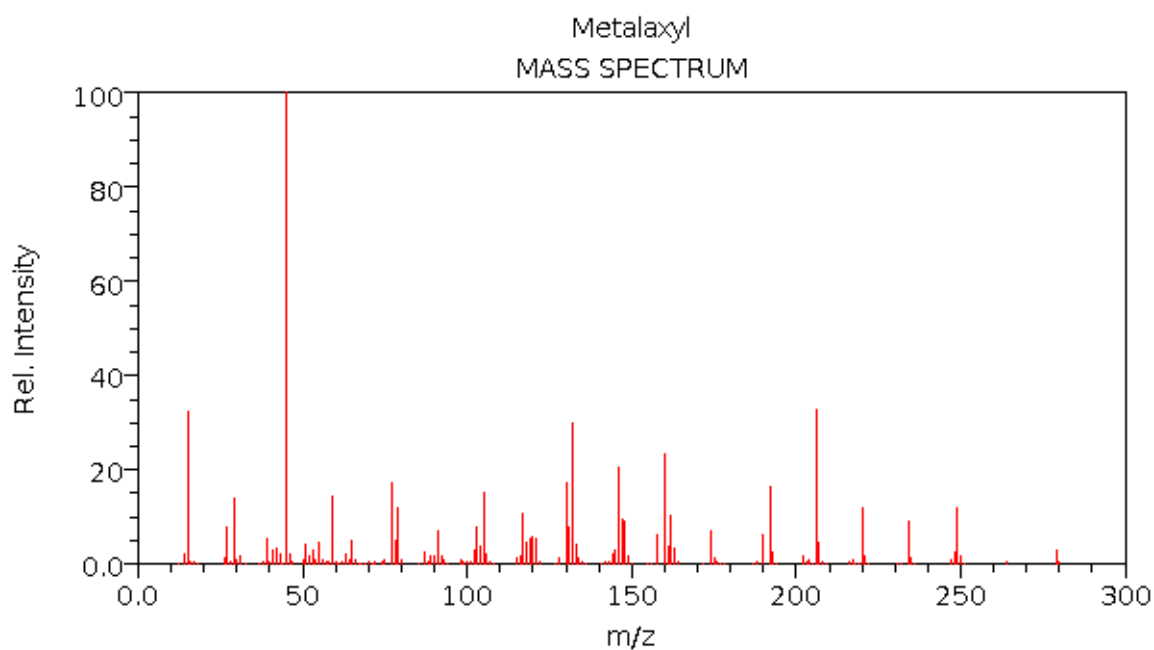
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **CYMOXANY**



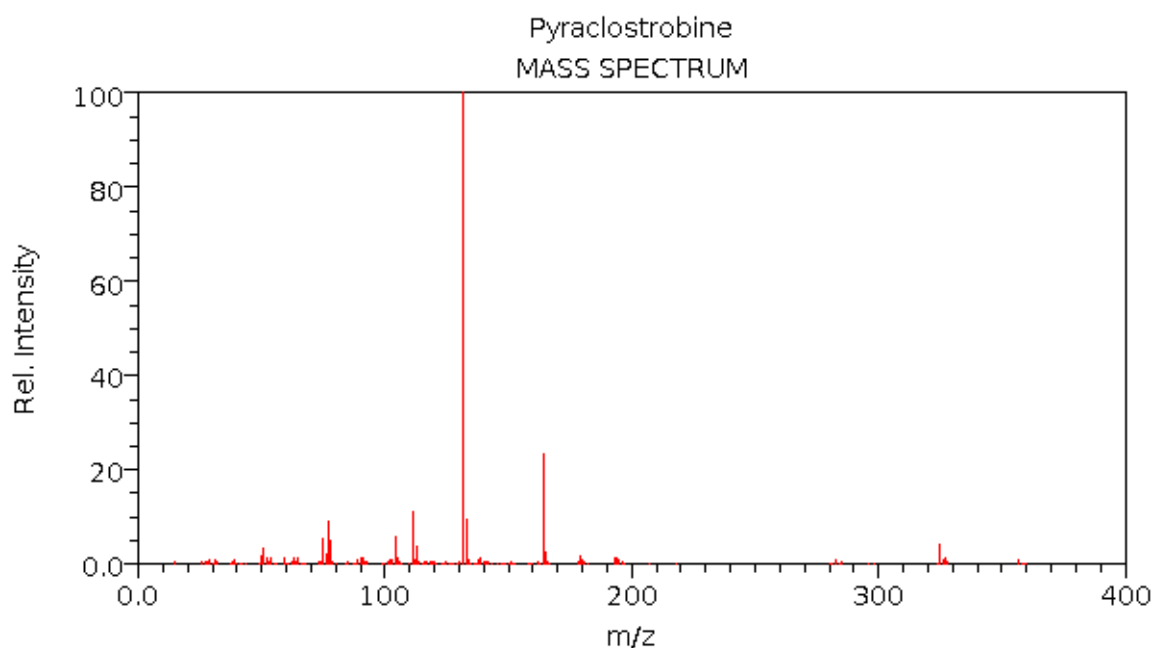
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **METHALAXYL**



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

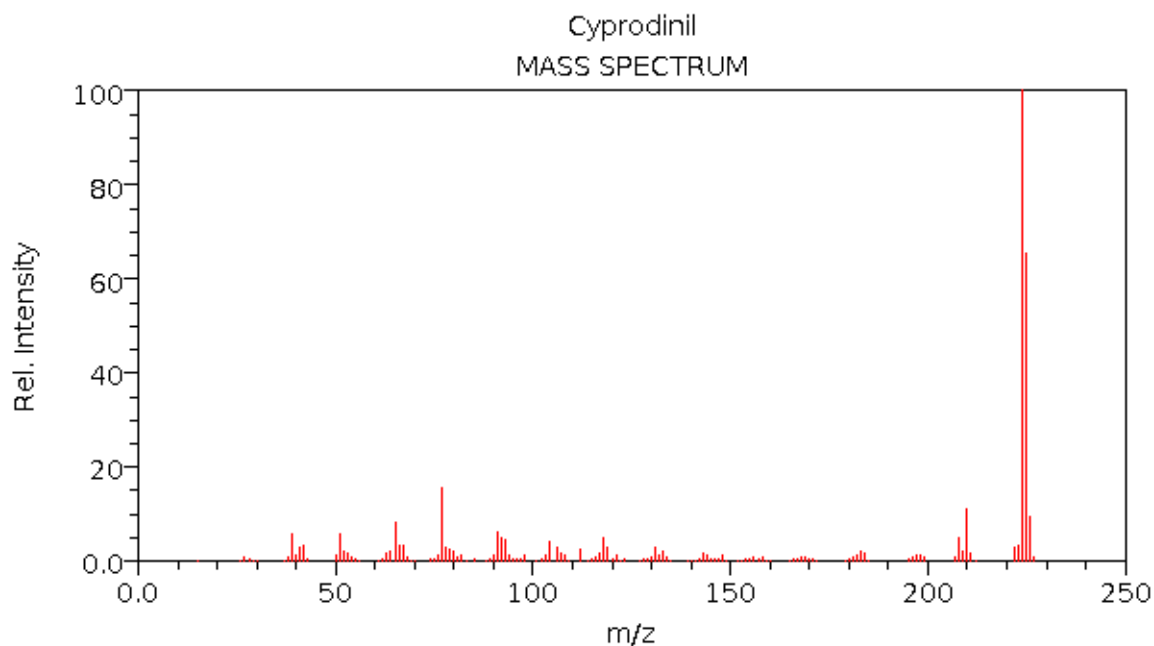
- **PYRACLOSTROBIN**



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

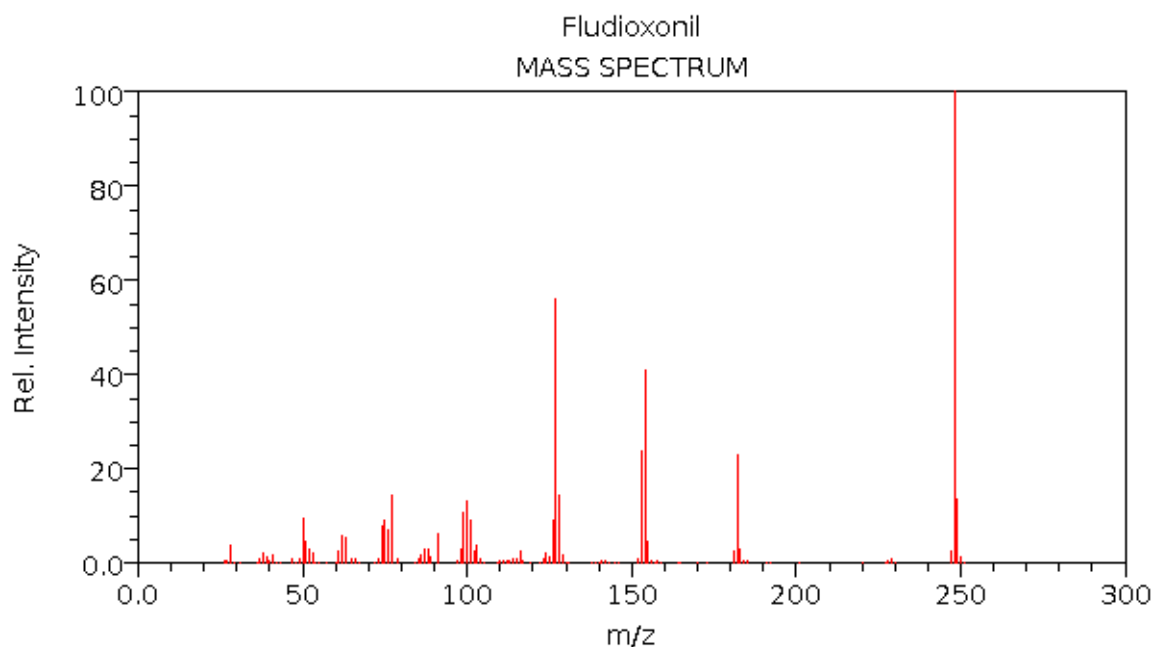
4.3 ANTIBIOTRITICI

- **CYPRODINIL**



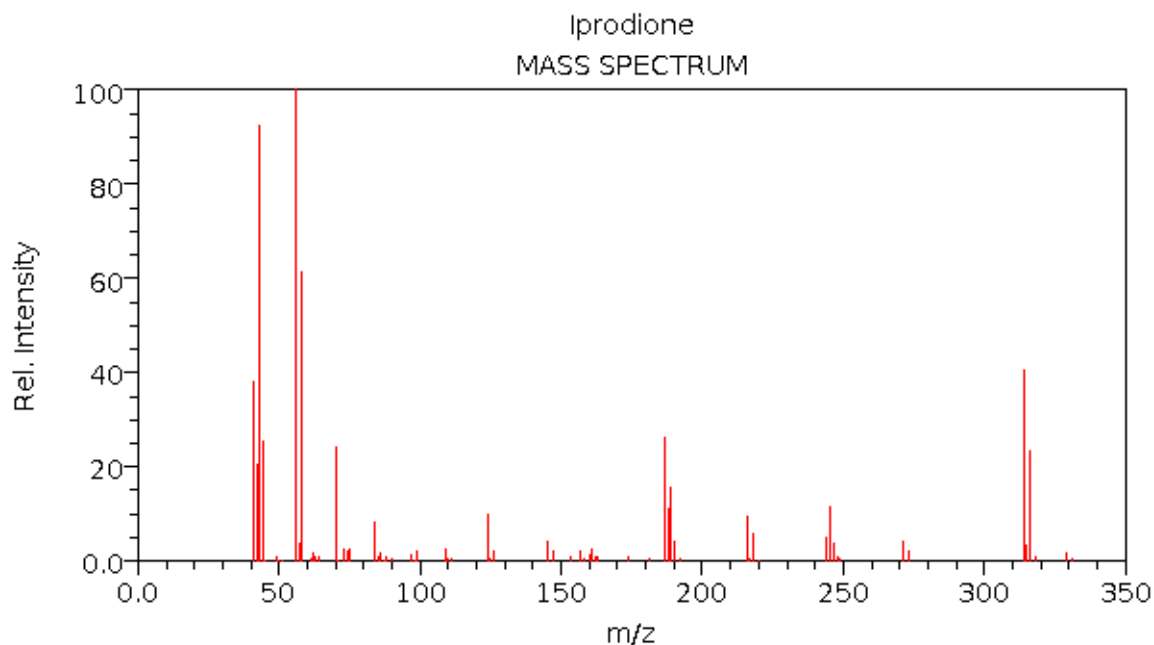
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **FLUDIOXONIL**



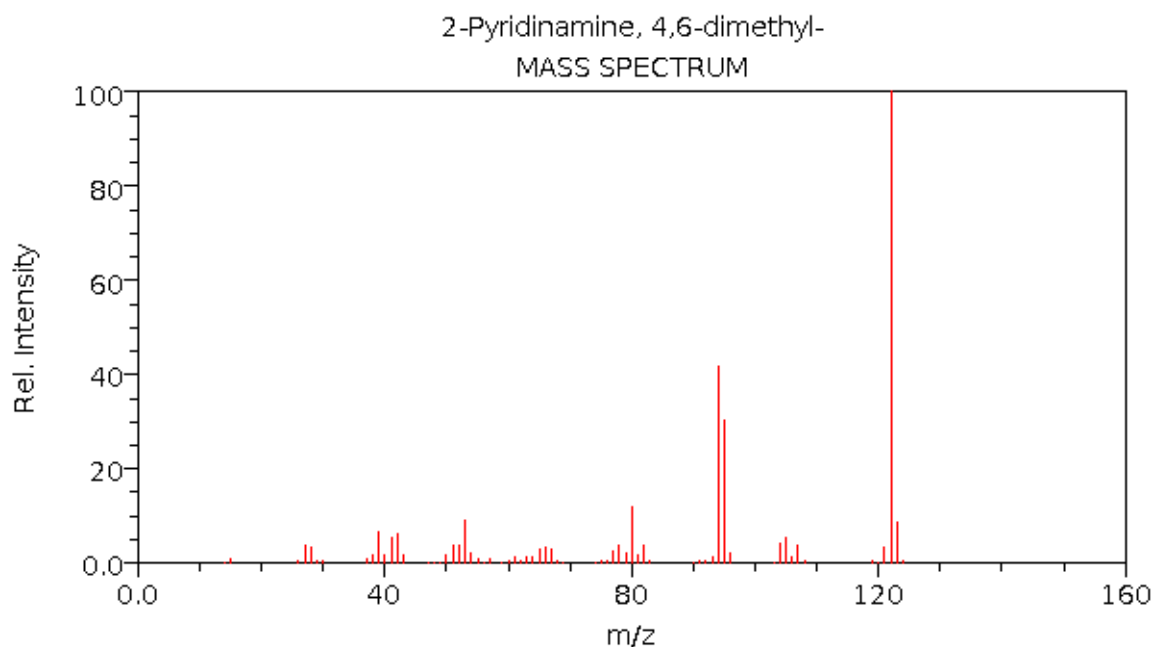
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **IPRODIONE**



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

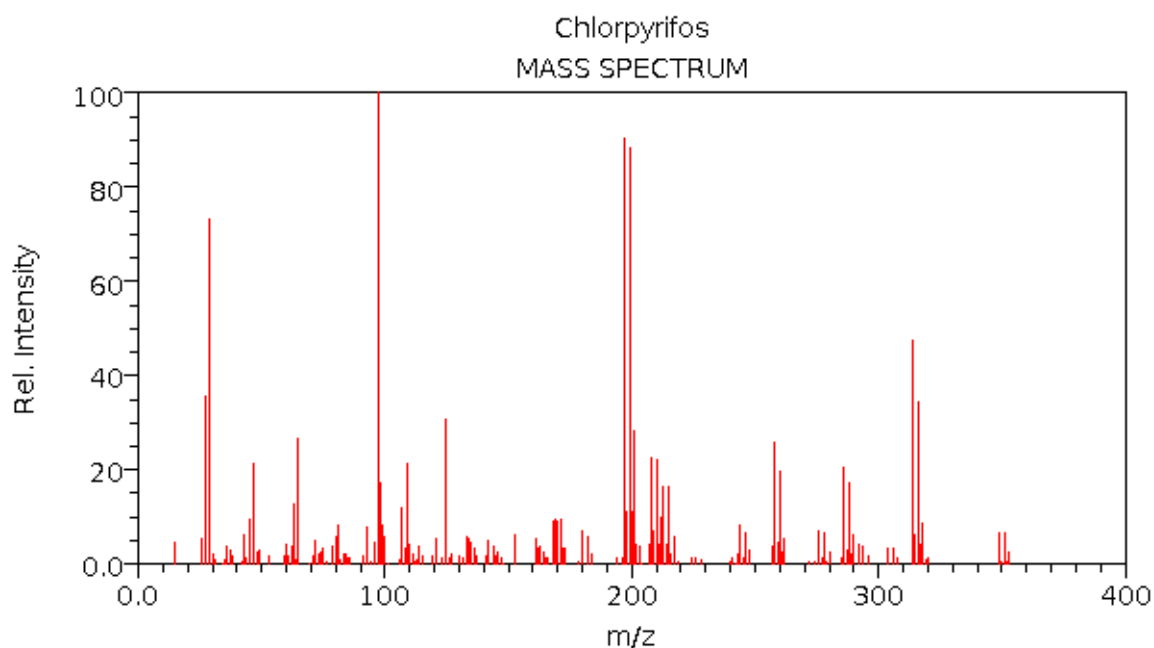
- **PYRIMETHANIL**



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

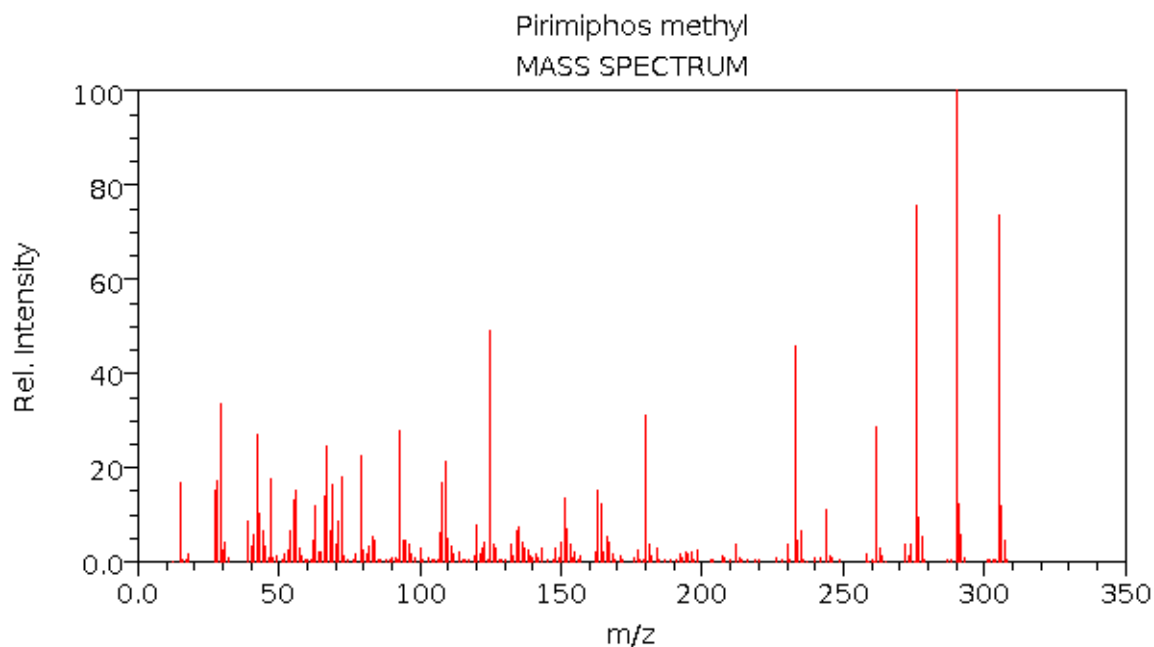
4.4 INSETTICIDI

- **CHLORPYRIFOS**



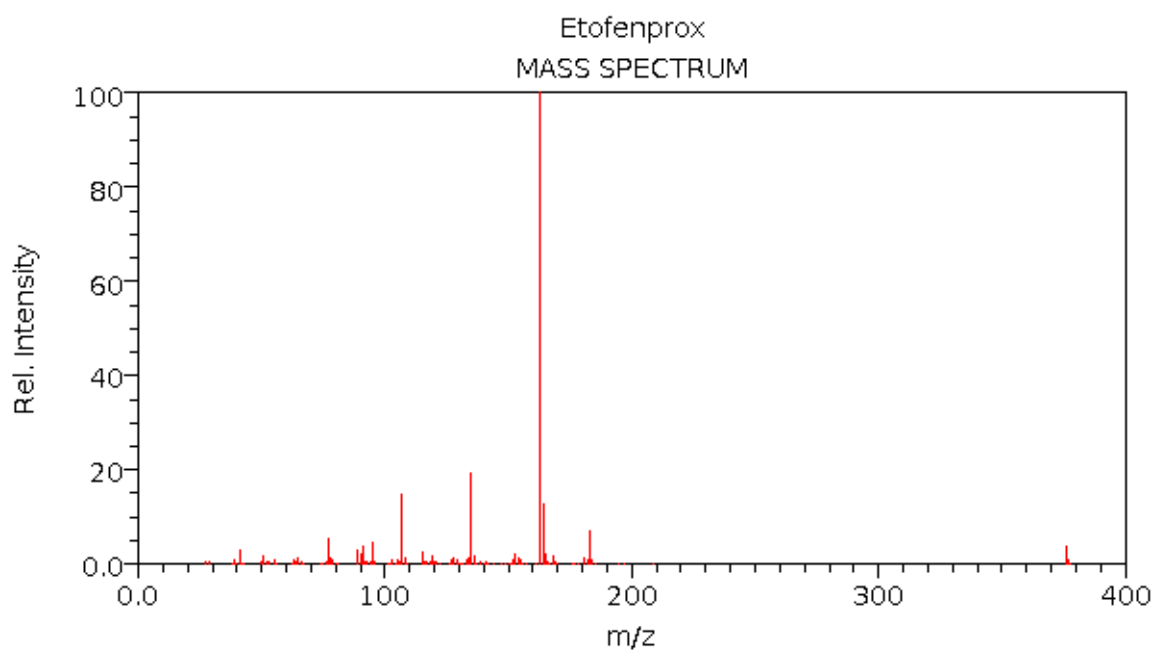
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **CHLORPYRIFOS-METHYL**



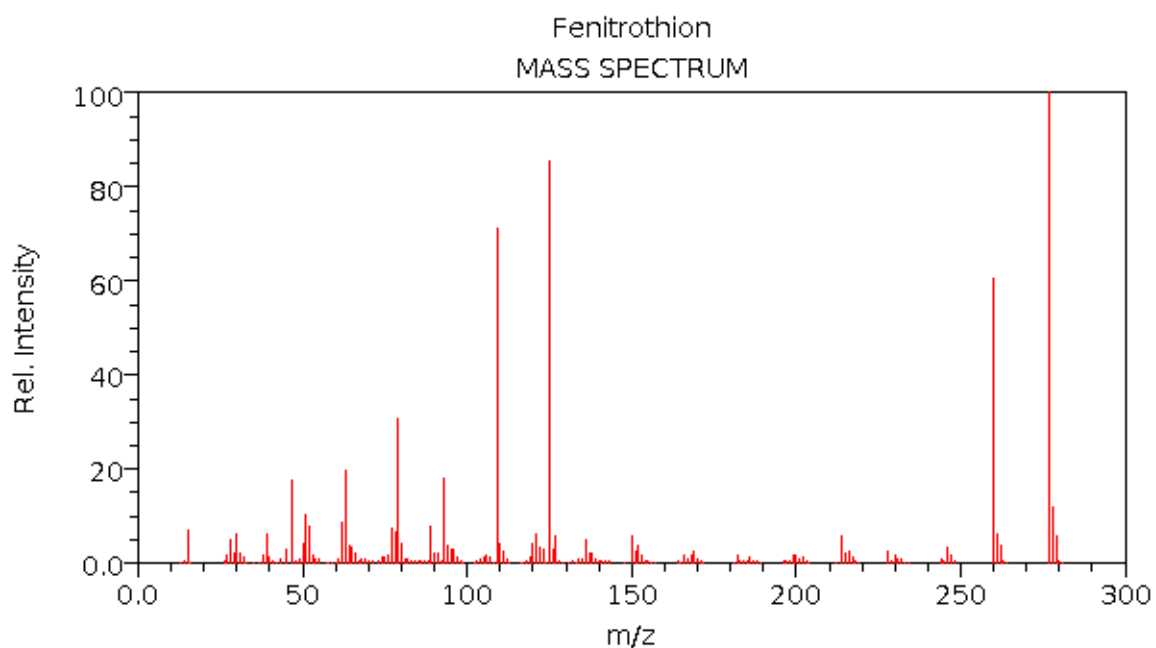
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **ETHOFENPROX**



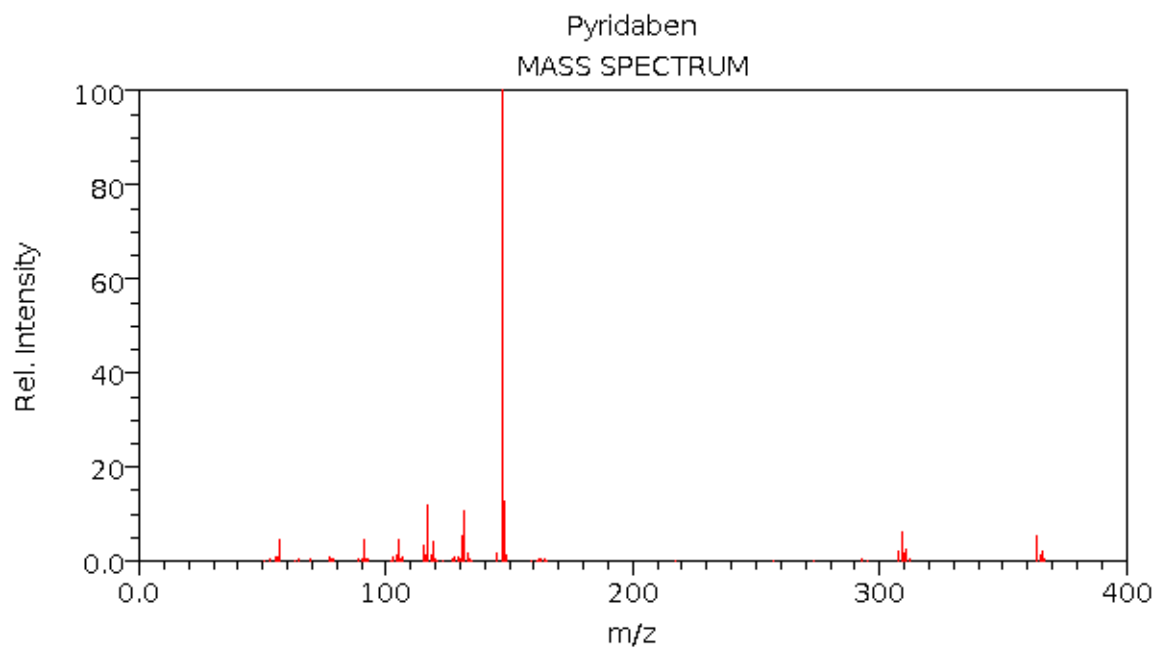
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **FENITROTHION**



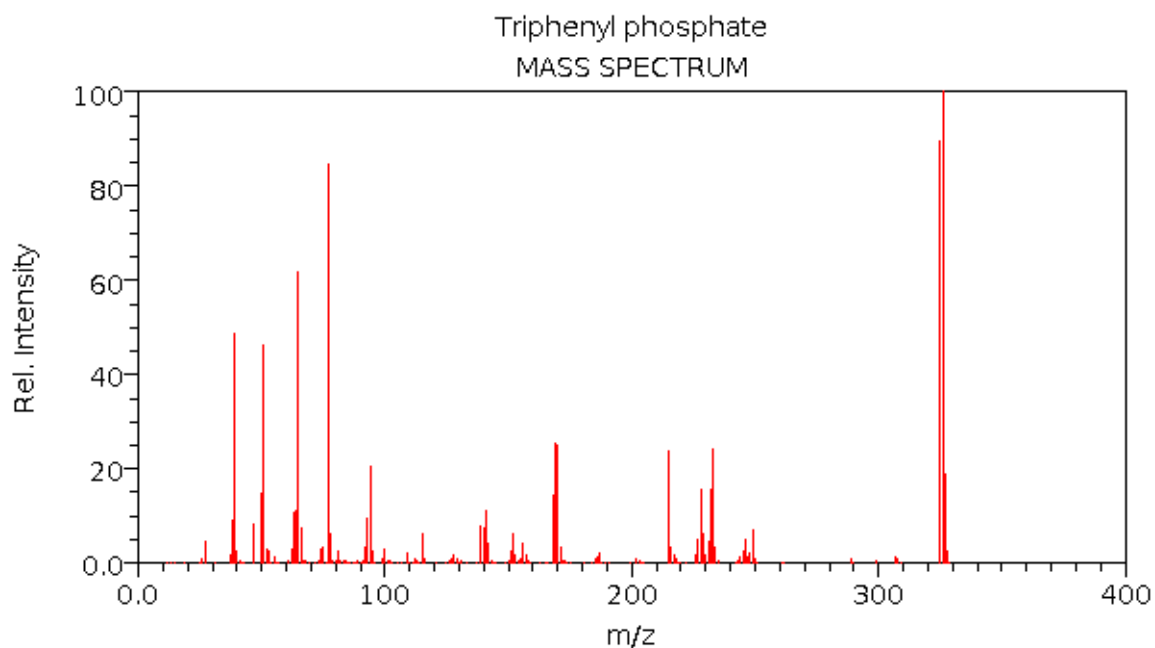
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **PYRIDABEN**



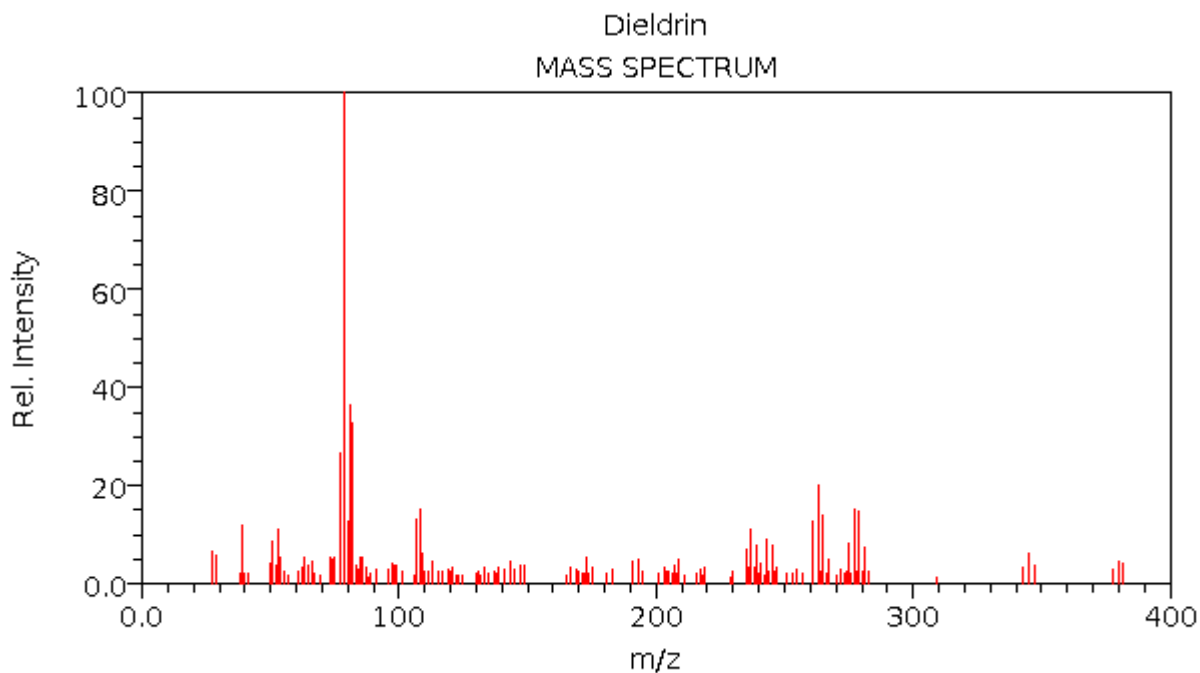
STANDARD INTERNO

- **TRIPHENYL PHOSPHATE**



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

- **DIELDRIN**



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

5. CONCLUSIONE

La difesa delle piante con prodotti fitosanitari ebbe inizio con la scoperta della proprietà fungicida del solfato di rame avvenuta oltre un secolo fa.

Per molto tempo il controllo delle avversità delle colture fu assicurato dall'uso di prodotti di origine minerale (zolfo, rame e suoi sali), o vegetale (quassine, solfato di nicotina).

Dagli anni '50, grazie alla disponibilità dei nuovi insetticidi e fungicidi di sintesi, si ritenne di avere trovato la soluzione definitiva ai problemi relativi alla difesa delle colture.

Questa fase fu caratterizzata dall'uso crescente di prodotti chimici, con la conseguente radicale trasformazione dei sistemi di coltivazione, accompagnata da considerevoli aumenti della produttività.

L'impiego dei prodotti di sintesi a largo spettro d'azione, efficaci su un vasto numero di avversità, mirava ad ottenere la totale distruzione degli organismi nocivi.

Più recentemente, l'ottimismo generato dai risultati dell'uso massiccio e indiscriminato di tali prodotti è stato ridimensionato a causa degli effetti indesiderati che si sono manifestati nell'ecosistema agrario.

L'eliminazione di organismi utili, con la comparsa di patologie finora contenute, e l'insorgenza di fenomeni di resistenza degli organismi dannosi ai principi attivi, in alcuni casi hanno indotto gli agricoltori ad aumentare il numero dei trattamenti o anche le dosi dei prodotti utilizzati, con il conseguente aumento, sia dei costi della difesa fitosanitaria, sia delle problematiche di natura ambientale e sanitaria.

Oggi, oltre ai sistemi di difesa convenzionali, si vanno affermando metodologie più rispettose dei delicati equilibri dell'ecosistema agrario, allo scopo di ridurre gli inconvenienti e rendere economicamente sostenibile l'applicazione della difesa delle piante.

L'agricoltura italiana in questi anni, nel quadro della scelta di "qualità" che è l'unica che può garantire la sopravvivenza stessa degli agricoltori, ha fatto importantissimi sforzi rivolti al raggiungimento dell'uso sostenibile dei pesticidi.

Ma i dati pervenuti anche quest'anno a Legambiente dagli enti preposti all'analisi dei prodotti alimentari che raggiungono le nostre tavole, sottolineano quanto ancora lavoro ci sia da fare rispetto ai rischi annessi all'azione combinata di più principi attivi, in particolare di quelli che più frequentemente vengono utilizzati in sincrono o che sono miscelati.

Per quanto riguarda la situazione dei residui di pesticidi dispersi in matrice vino in Piemonte, nel 2011 l'Arpa, su 32 campioni analizzati ha riscontrato: 11 campioni regolari senza residui (34,4%), 9 campioni regolari con un solo residuo (28,1%), 12 campioni regolari con più di un residuo (37,5%) e nessun campione irregolare.

Si evince rispetto gli anni passati un aumento in percentuale dei campioni mono residuo e multi residuo particolarmente accentuato.

Lo stage formativo presso il Laboratorio Sinergo soc.coop. di Nizza Monferrato mi ha dato la possibilità di visionare le modalità di lavoro in un laboratorio professionale, l'utilizzo delle strumentazioni e dei metodi specifici come quello menzionato per l'identificazione e quantificazione dei prodotti fitosanitari in vino, e anche altri, quali le analisi di routine che vengono effettuati giornalmente nei laboratori enologici.

E' stata un'esperienza molto utile e costruttiva attua a mettere in pratica le nozioni di chimica organica, biochimica e igiene degli alimenti apprese durante la carriera universitaria; grazie a questa esperienza ho acquisito manualità con le strumentazioni, con le metodiche di lavoro in uso nel laboratorio, e maggiore conoscenza per quanto riguarda il mondo del vino e della viticoltura.

Inoltre ho compreso l'importanza di un uso ristretto e controllato di prodotti quali i fitofarmaci, e della loro identificazione e quantificazione, per cercare di produrre alimenti più sicuri per la salute umana.

6. BIBLIOGRAFIA

- *Chimica analitica strumentale*, K.A. Rubinson, J.F. Rubinson - Zanichelli (2002)
- *Chimica analitica strumentale*, D.A. Skoog, J.J. Leary - EdiSes (1995)
- *EN 15662: 2008 – Alimenti di origine vegetale – Metodo polivalente di determinazione dei residui di pesticidi mediante CG-SM e SL/MS/MS con estrazione/partizione con acetonitrile e purificazione mediante SPE dispersive – Metodo QuEChERS*. (Gennaio 2009).
- *Fedeltà dei metodi analitici* (Risoluzione Oeno 5/99).
- *I segreti del vino* - Gribaudo (2006).
- *La vite e il vino*, Attilio Scienza, Osvaldo Failla, Stefano Raimondi - Script (2009).
- *Manuale operativo serie Agilent 5975 MSD* - Agilent technologies (2008).
- *Manuale per il corretto impiego dei prodotti fitosanitari* (2005).
- *Materiale fornito dal Laboratorio Sinergo soc.Coop. Nizza Monferrato*.
- *Pesticidi nel piatto 2011*-Legaambiente.
- *Protocollo per la pianificazione, la condotta e l'interpretazione degli studi di performance dei metodi di analisi* (Risoluzione 6/2000).
- *The pesticide manual*, C.d.s Tomlin - BCPC (2009).
- *“Analysis of pesticides residues using the Quick Easy Cheap Affective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectroscopy detection”* P. Paya, J. Oliva, A. Barba, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen - Anal Bioanal Chem (2007).
- *“Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticides residues in food matrixes”*, K. Mastovska, Steven J. Lehotay, and M. Anastassiades - Anal. Chem. (2005).

- http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/explanation_pesticide_residues_it.pdf
- http://ec.europa.eu/sanco_pesticides
- <http://eur-lexeuropa.eu>
- <http://fitogest.imagelinenetwork.com/>
- <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- <http://www.agrimag.com>
- <http://www.arpa.emr.it/documenti/arparivista>
- [http://www.desertart.enea.it/ProgettiStudenti/2003_04/Esercitazioni/A2/Troiani/progetto/Running/malattie_vite.](http://www.desertart.enea.it/ProgettiStudenti/2003_04/Esercitazioni/A2/Troiani/progetto/Running/malattie_vite)
- <http://www.efsa.europa.eu/it/pesticides>
- http://www.salute.gov.it/alimenti/resources/documenti/sicurezza/limitiAll_2.pdf
- <http://www.salute.gov.it/fitosanitari/fitosanitari.jsp>
- <http://www.sian.it/fitovis/> -Banca dei fitofarmaci 2011

