

ANALISI RESIDUI DI AGROFARMACI SU ORTOFRUTTA FRESCA: CONFRONTO FRA DUE METODI DI CAMPIONAMENTO IN CAMPO

D.BENZI¹, T.DEMAESTRI², L.RINALDI², R. CAPURRO¹

¹ SATA srl - Via Alessandria, 13, 15044 Quargnento (AL)

² CADIR LAB srl – Via Alessandria 13, 15044 Quargnento (AL)

d.benzi@satasrl.it

RIASSUNTO

In due aree geografiche distinte (Piemonte e Sicilia) tra la fine della campagna 2010 e nel corso della campagna 2011 sono stati messi a confronto due metodi di campionamento in pre-raccolta allo scopo di valutare la ripetibilità dei risultati ottenuti con l'analisi sui residui di agrofarmaci. Le colture di riferimento sono state una orticola ed una frutticola : pomodoro da mensa e pesco. Il primo metodo di campionamento prevedeva il prelievo di almeno 15 frutti raccolti in modo casuale in 3 punti del campo ; il secondo seguiva invece il criterio consigliato dal Codex (CAC/GL 33-1999) : si è scelto di raccogliere 6 sub-campioni di 10 singoli frutti ciascuno procedendo nel campo a X, questi venivano miscelati in campo ed infine si prelevava dalla miscela il campione di laboratorio (campionamento codex). Da ogni campionamento si ottenevano 3 aliquote da analizzare. Complessivamente sono stati analizzati 36 campioni per coltura : 18 prelevati con il "metodo base" e 18 con il "metodo codex". I risultati confermano che la fase del campionamento può influenzare in maniera apprezzabile le risultanze di analisi e tra i due metodi testati al "metodo codex" si associa una maggiore affidabilità del dato analitico.

Parole chiave: campionamento, residui, agrofarmaci

SUMMARY

PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FRESH FRUITS AND VEGETABLES: COMPARISON BETWEEN TWO METHODS OF PRE-HARVEST SAMPLING

During the years 2010 and 2011 we have compared two methods of pre-harvest sampling to investigate their influence on concentration of pesticides detected by our analytical laboratory; the tests were performed using the sampled material coming from two different regions of Italy: Piedmont and Sicily. The crops used for the study were peaches and tomatoes. The first method provide to sampling at least 15 unit (tomatoes or peaches) in 3 point of the field, the second method follows the criteria suggested by the Codex (CAC / GL 33-1999). We sampled 6 sub-samples each with 10 unit by drawing an X in the field. The sampled tomatoes or peaches were mixed in the field and then we have make the laboratory sample (Codex method); from each sample were obtained 3 aliquots for analysis. In total we analyzed 36 crop samples: 18 sampling by the "base method" and 18 sampling by the "codex method." The results confirm that the sampling can affect the results of analysis and the "codex method" ensures a higher reliability of analytical data.

Keywords: sampling, residues, pesticides

INTRODUZIONE

Il campionamento è riconosciuta una fase cruciale e determinate per l'attendibilità del dato analitico (Branca *et al.*, 1994). Anche per il settore ortofrutticolo (prodotto fresco) sulle analisi per la ricerca di residui di agrofarmaci sono state ufficializzate delle metodiche di campionamento anche se non esasperate come in altri ambiti (es. ricerca di micotossine, ecc.).

Queste dovrebbero rappresentare l'approccio corretto per il "buon campionamento" (campioni elementari, campione globale, campione per il laboratorio suddiviso in aliquote) ma spesso per fretta o superficialità sono disattese saltando la fase della costituzione del campione globale.

Obiettivo del lavoro era, nell'ambito dei controlli sui residui di prodotti fitosanitari effettuati in autocontrollo dal produttore, quello di confrontare due metodi di campionamento applicati in pre-raccolta: il primo non prevede la costituzione di un campione globale in quanto le aliquote di campione elementare prelevate in zone diverse del campo sono esse stesse già campioni di laboratorio mentre il secondo segue la procedura di prelievo raccomandata dal Codex Alimentarius nel documento CAC/GL 33-1999 e dalla legge con il DM 23 luglio 2003 prevedendo quindi la costituzione di un campione globale da cui si ricava il campione di laboratorio.

MATERIALI E METODI

Attività di campionamento

L'attività di campionamento su pomodoro da mensa (tipologia grappolo e cuore di bue in coltura protetta) e su pesche polpa gialla ha coinvolto nel complesso 6 aziende agricole in Piemonte e 3 in Sicilia; un dettaglio dei campionamenti effettuati è sintetizzato nella tabella che segue.

Tabella 1. distribuzione dei campionamenti per zona

Coltura	Regione	Provincia	N.ro campionamenti	Periodo (mese/anno)
Pomodoro	Piemonte	Asti	1	8/11
	Piemonte	Cuneo	2	9/11
	Sicilia	Caltanissetta	3	4/11
Pesche	Piemonte	Alessandria	1	7/11
	Piemonte	Cuneo	2	7/11
	Sicilia	Agrigento	2	8/11
	Sicilia	Catania	1	9/11

Ogni coltura è stata trattata nel rispetto dei principi della produzione integrata e dei rispettivi disciplinari di produzione regionali. I trattamenti sono stati sempre eseguiti da personale esperto e con attrezzature controllate e sottoposte a regolare manutenzione.

Il prelievo in campo è stato eseguito nel rispetto dei tempi di carenza per rendere il campione verosimile alle condizioni reali di raccolta.

Il campionamento è stato eseguito dai tecnici di Sata srl previo accordo con le aziende agricole ospitanti.

Le due metodiche di campionamento messe a confronto simulano un campionamento eseguito seguendo la metodica ufficiale (documento CODEX CAC/GL 33-1999) ed un campionamento più sbrigativo come spesso accade di eseguire in campo alle aziende agricole o ai loro tecnici: la prima è stata nominata "campionamento codex" e la seconda "campionamento base".

Il "campionamento codex" è stato eseguito percorrendo una X nel campo e prelevando in 6 zone per diagonale 10 frutti da ciascuna zona (campioni elementari) che costituivano, miscelati insieme su telo di nylon pulito, un campione globale (60 frutti) da cui si prelevavano

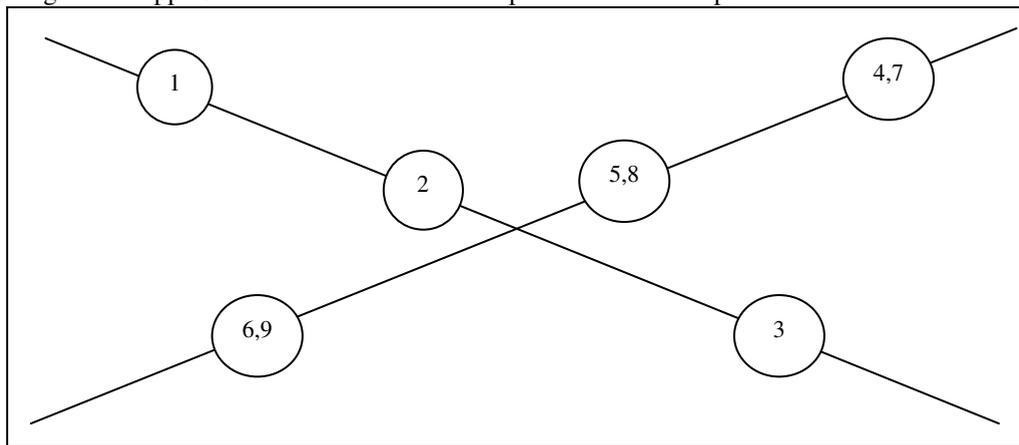
3 aliquote da almeno 10 frutti ciascuna per un peso minimo di 1,5 kg. Ogni zona di prelievo era rappresentata da almeno 4 piante.

Il “campionamento base” prevedeva la raccolta in 3 zone del campo di un campione costituito da almeno 15 frutti per un peso minimo di 1,5 kg: ciascun campione costituiva di per sé l’aliquota da inviare al laboratorio. Anche in questo caso ogni zona di prelievo era rappresentata da almeno 4 piante.

Le file di bordo non sono state oggetto di campionamento.

Lo schema di campionamento è rappresentato in figura 1.

Figura 1. Rappresentazione delle zone di campionamento in campo



Zone 1-6 = campionamento codex

Zone 7-8-9 = campionamento base

Ognuna delle 3 aliquote spedita al laboratorio era messa in sacchetti di PE puliti forniti dal laboratorio stesso, chiusi con un laccetto plastico e accompagnati da un verbale che indicava il prodotto, il lotto (aliquota 1, 2 o 3) e la tesi (A=campionamento codex e B=campionamento base), per non rendere esplicita al laboratorio la metodologia di campionamento eseguita, oltre ovviamente alla data e all’azienda di prelievo.

Le aliquote infine sono state consegnate al laboratorio il più velocemente possibile : circa fra le 6 e le 48 ore (Sicilia) dal campionamento.

Non è stato effettuato un trasporto refrigerato ma i campioni sono arrivati in condizioni idonee per l’analisi.

Attività di analisi

In totale sono stati analizzati 36 campioni : 18 aliquote rappresentative del “campionamento codex” e altrettante del “campionamento base”.

Le analisi sono state effettuate presso il laboratorio CADIR LAB srl (accreditato ACCREDIA n.0221) secondo i principi e le specifiche del metodo di prova ufficiale per la determinazione di residui di fitofarmaci su alimenti (EN 15662:2008 “Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE - QuEChERS-method”).

Al campione, estratto con acetonitrile, viene aggiunto solfato di magnesio, cloruro di sodio e sali di tampone citrato, la miscela è agitata intensamente e centrifugata per una separazione di fase. Successivamente viene eseguita una purificazione con ammino assorbenti sugli estratti

che vengono a loro volta acidificati con una piccola quantità di acido formico per aumentare la stabilità di alcuni pesticidi sensibili al pH.

L'estratto finale è stato impiegato sia per l'analisi in Gas Cromatografia (GC MSMS) che per quella in Cromatografia Liquida (LC MSMS) a cui è seguita la successiva quantificazione dei residui di fitofarmaci : l'analisi multiresiduale applicata (GC MSMS + LC MSMS) prevede la ricerca di 337 principi attivi con un limite di quantificazione analitico (LQ) per ogni molecola pari a 0,005 mg/kg.

Elaborazione statistica dei dati

Sono stati presi in considerazione per l'elaborazione solo quei casi in cui tutte le repliche presentano un valore di concentrazione di principio attivo uguale o superiore al limite di quantificazione di 0,005 mg/kg per entrambe i metodi di campionamento. Questa scelta, seppur molto restrittiva, è stata effettuata per ottenere una maggiore affidabilità nel confronto statistico dei dati; si è difatti convenuto di non confrontare tra di loro coppie di concentrazioni medie in cui uno dei due valori deriva da determinazioni affette da una forte incertezza strumentale. Ciascuna serie di repliche è stata successivamente analizzata mediante test di Shapiro-Wilk (verifica della normalità) e Dixon (presenza di dati anomali) per verificare la presenza di distribuzioni non normali e di outliers (Ellison *et al.*, 2009). Nella quasi totalità dei casi l'ipotesi di normalità dei dati è stata confermata; solo in alcuni casi il test di Shapiro-Wilk ha evidenziato una possibile non-normalità a causa della presenza di dati anomali poi confermati dal test di Dixon. Questi dati sono stati ricontrollati e in alcuni casi rimossi dal dataset. Per ogni campione sono state successivamente calcolate la media delle misure (indicatore di centralità) , la varianza e la deviazione standard (indicatori di dispersione) associate a ciascun metodo di campionamento. Un confronto dei metodi è stato effettuato con un test tra le medie (*t*-test) ed un test tra le varianze (*F*-test).

Test di normalità di Shapiro-Wilk

Il test di Shapiro-Wilk (Ellison *et al.*, 2009) è un test numerico che viene utilizzato per verificare l'ipotesi di normalità. Se l'ipotesi di normalità viene confermata attraverso il test di Shapiro-Wilk si può procedere all'individuazione di dati anomali utilizzando un opportuno test (es. test di Dixon) e successivamente calcolare gli indicatori di centralità e dispersione. Nel caso in cui la distribuzione risulti non-normale si ricorda che alcuni test di confronto, come ad esempio il *t*-test presentano una buona robustezza rispetto all'ipotesi di non-normalità (Box *et al.*, 2005).

Test di Dixon

Con questo test si vogliono identificare in una serie di repliche, i valori che a causa di possibili errori deviano dalla normalità. Questi valori sono indicati come outliers (individuati utilizzando un livello di confidenza del 99%) oppure stragglers (livello di confidenza pari al 95%). La presenza di outliers in una serie di dati è in grado di influenzare sensibilmente il valore degli indici di centralità e dispersione calcolati, perciò è molto importante l'individuazione, la valutazione e l'eventuale correzione o rimozione di questi dati anomali (Ellison *et al.*, 2009).

Test per il confronto delle medie : *t*-test

Con questo test si vogliono confrontare due insiemi di dati, rappresentati dai residui di agrofarmaci rilevati con il "campionamento codex" e con il "campionamento base", verificando se la differenza osservata tra i due gruppi di misure è significativa. Questo test si

effettua calcolando un rapporto tra la differenza delle medie osservate e la varianza dei due metodi pesata attraverso il numero di repliche effettuate (Box *et al.*, 2005).

Il risultato ottenuto (*t*-calc) viene confrontato con un valore critico ottenuto da una distribuzione *t*-Student (*t*-critico) con probabilità al 95%.

Test per il confronto tra varianze : *F*-test

Il test per il confronto delle varianze viene utilizzato per confrontare se le dispersioni dei dati intorno alle proprie medie possono essere considerate simili. Il test viene effettuato calcolando il rapporto delle varianze da testare e confrontando il valore ottenuto (*F*-calc) con il valore critico (*F*-critico) al 95% di probabilità (Box *et al.*, 2005).

RISULTATI

I risultati delle analisi multiresiduali hanno dato complessivamente 267 residui quantificabili e 69 residui in tracce non quantificabili. Nell'elaborazione sono state utilizzate solo le serie di valori tutti analiticamente quantificabili sia nel metodo "base" sia nel metodo "codex" e sono rappresentate da 216 dati.

Tabella 2. Molecole sui campioni analizzati : frequenza e classe di residuo (% sull'LMR)

Molecole	Pesca			Pomodoro			Totale
	< 30% LMR	30-100% LMR	> 100% LMR	< 30% LMR	30-100% LMR	> 100% LMR	
Azoxystrobin	-	-	-	1	-	-	1
Boscalid	-	-	-	2	-	-	2
Cyfluthrin	1	-	-	-	-	-	1
Chlorantraniliprole	-	-	-	1	-	-	1
Chlorpyrifos etile	-	-	1	-	-	-	1
Deltamethrin	1	-	-	-	-	-	1
Dimethomorph	-	-	-	1	-	-	1
Etofenprox	1	-	-	1	-	-	2
Hexythiazox	-	-	-	1	-	-	1
Fenamidone	-	-	-	1	-	-	1
Fenazaquin	1	-	-	1	-	-	2
Fenhexamid	-	-	-	1	-	-	1
Fonicamid	-	-	-	2	1	-	3
Imidacloprid	-	-	-	1	-	-	1
Indoxacarb	-	-	-	1	-	-	1
Iprovalicarb	-	-	-	1	-	-	1
Lambda-cyhalothrin	1	-	-	-	-	-	1
Myclobutanil	-	-	-	1	-	-	1
Pyraclostrobin	-	-	-	1	-	-	1
Spinosad	1	-	-	-	-	-	1
Tebuconazole	2	-	-	-	-	-	2
Tebufenpyrad	-	-	-	1	-	-	1
Thiacloprid	2	-	-	2	-	-	4
Thiamethoxam	-	-	-	1	-	-	1
Triadimenol	-	-	-	3	-	-	3
Totali	10	0	1	24	1	0	36

Medie con un t-test calcolato < 2,776 (stabilito come t critico) non differiscono fra di loro in modo significativo al 95% di probabilità.

Deviazioni con un F-test calcolato < 19 (stabilito come F critico) non differiscono fra di loro in modo significativo al 95% di probabilità

Sono state ritrovate sui campioni analizzati complessivamente 25 molecole : un dettaglio delle molecole trovate, della frequenza di ritrovamento e del livello di residualità riscontrata rispetto al limite di legge (% sull'LMR) è riportata in tabella 2.

In questo caso il residuo considerato è dato dalla media dei campioni analizzati indipendentemente dalla tipologia di campionamento.

Le molecole riscontrate sono decisamente più numerose sul pomodoro ; in generale il valore medio del residuo risulta inferiore al 30% del residuo massimo ammissibile (LMR) e spesso questo dato è molto vicino al limite di quantificazione analitico.

Le sostanze attive riscontrate con maggiore frequenza sono state thiacloprid, sia sul pomodoro sia sulle pesche, tebuconazole ed etofenprox.

Successivamente, per ogni metodo di campionamento, sono stati calcolati separatamente la concentrazione media del residuo e la deviazione standard delle tre repliche ; da questi dati si sono ottenuti i valori di *t* e di *F* da confrontare con i relativi valori critici come riportato nella tabella 3, per le pesche, e nella Tabella 4 per i pomodori.

Tabella 3. Residui su pesca (dato medio in mg/kg) con i due metodi di campionamento

Molecola	Campionamento "base"		Campionamento "codex"		F-calc	t-calc
	Residuo medio (mg/kg)	DEV.ST.	Residuo medio (mg/kg)	DEV.ST.		
Cyfluthrin	0,007	0,001	0,009	0,004	0,061	0,971
Chlorpyrifos etile	0,409	0,274	0,388	0,314	0,763	0,090
Deltamethrin	0,014	0,008	0,017	0,011	0,589	0,435
Etofenprox	0,033	0,006	0,032	0,015	0,164	0,143
Fenazaquin	0,030	0,004	0,027	0,013	0,096	0,287
Lambda-cyhalothrin	0,011	0,001	0,009	0,003	0,040	1,177
Spinosad	0,050	0,008	0,075	0,029	0,067	1,445
Tebuconazole	0,216	0,011	0,244	0,081	0,018	0,576
Tebuconazole	0,269	0,073	0,282	0,058	1,615	0,242
Thiacloprid	0,018	0,005	0,017	0,004	1,419	0,490
Thiacloprid	0,037	0,004	0,025	0,013	0,089	1,573

Medie con un t-test calcolato < 2,776 (stabilito come t critico) non differiscono fra di loro in modo significativo al 95% di probabilità.

Deviazioni con un F-test calcolato < 19 (stabilito come F critico) non differiscono fra di loro in modo significativo al 95% di probabilità

Tabella 4. Residui su pomodoro (dato medio in mg/kg) con i due metodi di campionamento

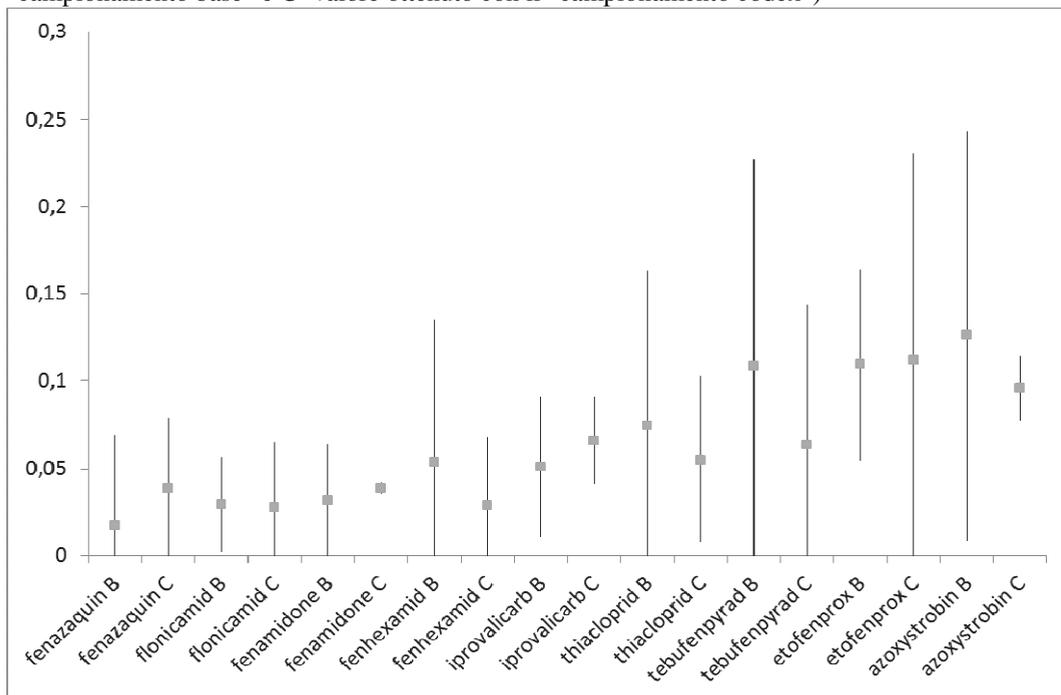
Molecola	Campionamento "base"		Campionamento "codex"		F-calc	t-calc
	Residuo medio (mg/kg)	DEV.ST.	Residuo medio (mg/kg)	DEV.ST.		
Azoxystrobin	0,126	0,039	0,096	0,006	42,194	1,318
Boscalid	0,063	0,031	0,086	0,007	19,918	1,244
Boscalid	0,256	0,078	0,169	0,019	17,744	1,872
Chlorantraniliprole	0,061	0,045	0,064	0,031	2,115	0,105
Dimethomorph	0,011	0,005	0,013	0,003	2,815	0,493
Etofenprox	0,109	0,018	0,112	0,040	0,211	0,093
Hexythiazox	0,008	0,003	0,012	0,004	0,521	1,287
Fenamidone	0,031	0,011	0,039	0,001	121,333	1,201
Fenazaquin	0,017	0,017	0,039	0,013	1,637	1,718
Fenhexamid	0,054	0,027	0,029	0,013	4,329	1,415
Flonicamid	0,024	0,009	0,029	0,014	0,409	0,514
Flonicamid	0,233	0,033	0,198	0,018	3,560	1,589
Flonicamid	0,029	0,009	0,028	0,013	0,520	0,186
Imidacloprid	0,008	0,003	0,006	0,002	4,000	0,676
Indoxacarb	0,016	0,001	0,015	0,000	20	1,000
Iprovalicarb	0,051	0,013	0,066	0,008	2,612	1,670
Myclobutanil	0,011	0,004	0,006	0,001	13,000	2,315
Pyraclostrobin	0,054	0,021	0,054	0,006	11,752	0,027
Tebufenpyrad	0,108	0,040	0,064	0,027	2,227	1,625
Thiacloprid	0,023	0,005	0,031	0,007	0,415	1,595
Thiacloprid	0,075	0,029	0,055	0,016	3,520	1,020
Thiamethoxam	0,009	0,001	0,007	0,001	0,333	2,500
Triadimenol	0,010	0,006	0,009	0,002	5,688	0,483
Triadimenol	0,015	0,009	0,012	0,003	8,143	0,500
Triadimenol	0,029	0,008	0,024	0,007	1,256	0,746

Medie con un t-test calcolato $< 2,776$ (stabilito come t critico) non differiscono fra di loro in modo significativo al 95% di probabilità

Deviazioni con un F-test calcolato < 19 (stabilito come F critico) non differiscono fra di loro in modo significativo al 95% di probabilità

Un dettaglio del risultato di un pomodoro su cui sono state riscontrate 9 molecole al di sopra del limite di quantificazione di 0,005 mg/kg è riportato nel grafico sottostante.

Figura 2. Residui su pomodoro : risultati medi e deviazione standard (B=valore ottenuto con il “campionamento base” e C=valore ottenuto con il “campionamento codex”)



In questo caso 6 risultati medi differiscono sensibilmente fra il “campionamento base” ed il “campionamento codex” mentre la deviazione standard risulta quasi sempre superiore nel “campionamento base” rispetto al “campionamento codex”.

DISCUSSIONE

I risultati quantificabili dal punto di vista analitico (limite di quantificazione > 0,005 mg/kg) sui residui di prodotti fitosanitari mettono in evidenza su pomodori e su pesche la presenza complessiva di 25 molecole quasi sempre presenti con residui inferiori al 30% del limite massimo ammissibile (LMR) secondo quanto atteso dall’applicazione di criteri di produzione integrata.

Sulle pesche l’analisi dei dati applicando il *t*-test per il confronto delle medie e l’ *F*-test per il confronto delle varianze non mette in evidenza alcuna differenza significativa tra i risultati ottenuti con il “campionamento codex” e con il “campionamento base”.

Anche sul pomodoro, facendo un confronto fra le medie, non è stato rilevato alcun caso in cui il risultato ottenuto con il “campionamento codex” sia risultato diverso da quello ottenuto con il “campionamento base”; invece una certa differenza la si osserva sulla dispersione dei valori delle singole repliche: nel 12% dei casi il valore di *F-calcolato* è superiore al valore *F-critico* e quindi si conferma una diversità al 95% di probabilità fra le due metodologie di campionamento evidenziando che con il “campionamento codex” si ottengono dei risultati meno dispersi attorno alla media ; inoltre – se si fosse tenuto anche conto dei dati esclusi dalla elaborazione in quanto non tutti i risultati erano superiori al limite di quantificazione del laboratorio – questa percentuale avrebbe raggiunto il 30%.

Inoltre, sempre sul pomodoro, in tutti i casi osservati la deviazione standard dei risultati ottenuti attraverso il “campionamento base” è maggiore di quella osservata sui risultati ottenuti con il “campionamento codex”.

CONCLUSIONI

Il confronto dei risultati analitici sulla presenza di agrofarmaci su pomodori e su pesche prelevate in campo in pre-raccolta utilizzando due metodiche di campionamento, la prima rispettosa dei criteri di campionamento consigliati dal Codex e avallati dalla normativa vigente (“campionamento codex”) e la seconda più sbrigativa e semplificata (“campionamento base”), confermano, anche se non in modo sempre apprezzabile dal punto di vista statistico, una maggiore affidabilità del primo metodo almeno per una minore variabilità del dato.

Questa osservazione è importante quando, come nella maggior parte dei casi di campionamento a scopo analitico in autocontrollo, il campionamento non viene ripetuto per conferma ma viene effettuato una sola volta; in questi casi, se si adotta il metodo “base”, la probabilità di raccogliere un campione non significativo della distribuzione di fitofarmaci presenti sulla coltura è presente.

L’aumento della dispersione dei possibili valori di concentrazione che si ottengono dall’analisi di campioni provenienti da campionamenti sbrigativi può pertanto portare, in caso di repliche genuine dell’intero processo analitico (dal campionamento al risultato di laboratorio) a valori di concentrazione affetti da scarsa esattezza e non in accordo tra di loro.

LAVORI CITATI

- Box G.E.P., Hunter G.S., Hunter W.G. , 2005. Statistics for Experimenters (second edition, Wiley series in probability and statistics). John Wiley and Sons, USA, 79-80 e 104-105.
- CAC/GL 33-1999 Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MLRS.
- Branca P., Quaglino P., Navone P., 1994. Il controllo degli antiparassitari : incidenza del campionamento sulla riproducibilità del dato analitico. *Bollettino dei chimici igienisti*, vol. 45, 179-194.
- Ellison S. L. R., Farrant V. B., Trevor J., 2009 Practical statistics for the analytical scientist: a bench guide, Royal Society of Chemistry.