

4° Convegno Nazionale “Fitofarmaci e ambiente”

Napoli, 14–15 maggio 2003

Prodotti di degradazione dei fitofarmaci
e metodi per la determinazione nelle acque



Paola Bottoni – ISS – Laboratorio di Igiene Ambientale
Reparto di Medicina Ambientale
pbottoni@iss.it

Introduzione alla problematica

A partire dagli anni '60, l'impiego diffuso dei fitofarmaci in agricoltura in quantità sempre maggiori ha provocato la comparsa di tali composti *nei sistemi idrologici di molti Paesi* dando luogo a diversi casi di contaminazione con conseguenze negative sulla fauna e la flora acquatiche e terrestri e con compromissione delle risorse idriche disponibili per l'uomo.

Ciò ha comportato un rapido incremento delle attività di ricerca su tali composti mirate alla definizione del loro impatto sull'ambiente e sulla salute umana.

Tematiche di ricerca sui fitofarmaci

- ✓ Studi sugli effetti tossici ed ecotossicologici
- ✓ Indagini sulla presenza nei diversi comparti ambientali e negli alimenti e definizione dei livelli di esposizione
- ✓ Studi sul comportamento e sul destino ambientale, protocolli ufficiali, sviluppo di modelli di screening, ripartizione, previsionali, ecc.
- ✓ Sviluppo e affinamento dei metodi analitici, avvio di grandi campagne di monitoraggio (indagini USA-Multistato)
- ✓ *Ultimi 20 anni:* definizione di linee guida, di standard di qualità, di limiti di legge con evoluzione della Normativa estendendo la protezione *dall'uomo, alla risorsa, all'intero ecosistema acquatico.*

In questo periodo comincia a manifestarsi l'importanza dei metaboliti dei fitofarmaci come contaminanti delle acque

I metaboliti – origine

I fitofarmaci, una volta giunti nel suolo, nell'acqua e nell'aria, possono essere soggetti a processi di degradazione biotica (*microrganismi, piante, reazioni chimiche e biochimiche mediate da enzimi*) e/o abiotica (*fenomeni chimico-fisici di dissipazione, reazioni chimiche e fotochimiche*) fino alla loro mineralizzazione a CO₂ ed acqua, e/o alla formazione di intermedi di degradazione comunemente detti **metaboliti**, a prescindere dai meccanismi di formazione, le cui **proprietà intrinseche, chemiodinamiche (DT50, Koc ecc.), tossicologiche ed ecotossicologiche sono in gran parte ignote.**

I metaboliti – proprietà

In alcuni casi è stato dimostrato che le reazioni di trasformazione a cui vanno incontro i metaboliti possono:

- incrementarne la mobilità e la persistenza rispetto ai loro composti parentali consentendone la diffusione nei corpi idrici

ALCUNI ESEMPI

- *composti etansulfonati* *dalle cloroacetanilidi*
- *DET, DEA* *dalla terbutilazina*
- *a. aminometilfosfonico* *dal glifosate*
- *2,6-diclorobenzammide* *dal diclobenil*
- *clorallilalcol* *dai tiocarbammati*
- *aldicarb sulfone e sulfossido* *dall'aldicarb*

I metaboliti – proprietà

- modificarne le proprietà fitotossiche o eco-/tossicologiche in modo da:
 - eguagliare (es.: *DET, DEA*) o superare quelle dei composti parentali (es.: *a. amminometilfosfonico dal glifosate, aldicarb sulfone e sulfossido*)
 - produrre nuovi effetti citotossici, genotossici, mutageni, rispetto al parentale (es.: *ETU, TCAB, 4-cloroanilina*)

➤ *CONCLUSIONE: i fitofarmaci, in determinate condizioni ambientali e di impiego, possono produrre un pool di contaminanti mobili e biologicamente rilevanti che sfuggono ai normali controlli per la valutazione della qualità delle acque*

I metaboliti – presenze in acque sotterranee

Da tempo si segnalano ritrovamenti di metaboliti in acque superficiali e sotterranee, a volte utilizzate a scopo potabile, tanto che alcuni Paesi (*es. USA, Olanda, Germania*) li hanno inseriti nei piani di monitoraggio nazionali.

I livelli osservati sono risultati a volte:

- superiori rispetto ai livelli dei composti parentali
- superiori alle CMA dei composti parentali per le acque potabili (limiti EU – USEPA)
- presenti anche in assenza dei composti parentali

REVIEW DATI ACQUE SOTTERRANEE 1987–1993

(Funari et al., 1995)

Nome metabolita e composto parentale	N° data set (freq. pos.)	Mean ($\mu\text{g/L}$)	Max ($\mu\text{g/L}$)
aldicarb sulfone (<i>aldicarb</i>)	1		61
isopropilamide a. antranilico (<i>bentazone</i>)	2		<0.1–0.2
DEA (<i>atrazina/simazina</i>)	11 (46%)	0.09–0.54	0.1–7.6
DET (<i>terbutilazina</i>)	1	0.5	0.7
DIA (<i>atrazina/simazina</i>)	7 (44%)	0.01–0.68	0.06–3.54
3,4-DCA (<i>propanil</i>)	1		0.3
2,6-diclorobenzamide (<i>diclobenil</i>)	2	0.3–180	
idrossialaclor (<i>alaclor</i>)	1 (0.2%)	0.91	
3-idrossicarbofuran (<i>carbofuran</i>)	1 (0.4%)	0.98	
3-chetocarbofuran (<i>carbofuran</i>)	1 (0.4%)	0.03	
MITC (<i>metam sodium</i>)	4	0.05–0.6	

ACQUE SOTTERRANEE OLANDA (prof. 0-10 m) (RIVM rep. 601506 002)

Nome metabolita e composto parentale	N° osserv.	Mediana casi positivi ($\mu\text{g/L}$)	95° perc. casi pos./max ($\mu\text{g/L}$)	uso suolo
aldicarb sulfone	95	1.8	59 / 74	patate
aldicarb sulfossido	88	1.6	19 / 26	patate
aldicarb	98	0.2	0.3 / 0.3	patate
DEA	126	0.09	0.83 / 1.5	mais
DIA	130	0.07	0.41 / 0.98	mais
atrazina	153	0.04	0.17 / 0.3	mais
2,6-diclorobenzammide	16	13	26 / 34	non agr.
diclobenil	14	0.05	0.48 / 0.83	non agr
ETU*	174	0.15	13 / 30	patate/rape
ETU*	26	5.2	34 / 42	bulbi

*) probabili sovrastime

IOWA, USA – 131 POZZI – CLOROACETANILIDI

Nome metabolita e composto parentale	Freq. rilevam. (%)	Max ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)
acetoclor etansulfonato	11.4	<u>11.5</u>	0.2
acetoclor acido ossanilico	3.8	<u>0.8</u>	0.2
acetoclor*	0.8	<u>0.77</u>	0.05
alaclor etansulfonato	48.1	<u>8.5</u>	0.2
alaclor acido ossanilico	19.1	<u>33.4</u>	0.2
alaclor	6.9	<u>0.63</u>	0.05
metolaclor etansulfonato	51.9	<u>8.6</u>	0.2
metolaclor acido ossanilico	25.2	<u>15.3</u>	0.2
metolaclor	18.3	<u>11.3</u>	0.05

* non in uso in Italia

CMA dei metaboliti per le acque potabili

Alcuni Paesi hanno avvertito la necessità di definire standard o linee guida per le acque potabili:

USA – MCLs per l'aldicarb e i suoi metaboliti* ($\mu\text{g/L}$):

aldicarb.....	3
aldicarb sulfone.....	3
aldicarb sulfossido.....	4
totale aldicarb e suoi metaboliti ...	≤ 7 *(analogo modo di azione)

Canada – IMAC per atrazina e suoi metaboliti 5 $\mu\text{g/L}$

MCL = Maximum Contaminant Level; IMAC = Interim Maximum Allowable Concentration

Le Direttive U.E. sui metaboliti

➤ La Direttiva 98/83/CE per le acque destinate al consumo umano, recepita in Italia con il DLGs 2001/31 e succ., ha recentemente confermato le CMA di 0.1 e 0.5 $\mu\text{g/L}$ per i fitofarmaci, inclusi i metaboliti, rispettivamente come singoli e in totale.

➤ La Direttiva 91/414/EEC, relativa all'immissione in commercio dei fitofarmaci, fa riferimento ai "metaboliti rilevanti" nell'Allegato VI (par. C 2.5.1.2) stabilendo un processo di valutazione del tutto analogo a quello dei parent compounds.

➤ La Linea Guida UE "*Guidance document on the assessment of the relevance of metabolites in groundwater of substances regulated under Council Directive 91/414/EEC*" definirà i criteri per identificare i metaboliti "rilevanti" per i corpi idrici sotterranei nell'ambito dei processi di autorizzazione alla vendita dei prodotti fitosanitari.

ISS – Metaboliti prioritari per i corpi idrici

Le indagini, a cui possibilmente si dovrà fare fronte, sulla presenza di metaboliti dei fitofarmaci nelle acque potrebbero presupporre *l'analisi di centinaia di molecole, inclusi gli oltre 400 principi attivi in uso in Italia.*

In questo ambito, presso l'ISS ed in collaborazione con l'IRSA, è stato condotto un Progetto triennale mirato *all'Identificazione dei metaboliti più significativi per il loro comportamento ambientale e per le loro proprietà biologiche* su cui avviare indagini-pilota in *acquiferi selezionati*

- *per la loro vulnerabilità*
- *per l'elevato uso di fitofarmaci, contenenti i parent compounds nelle zone sovrastanti e limitrofe,*
- *per dati pregressi di presenze dei parent compounds*

ISS – Metodi di identificazione dei metaboliti prioritari

❖ Individuazione di tutti i possibili metaboliti reperibili nelle banche di dati e in letteratura internazionali ed elaborazione di schede monografiche per oltre 50 metaboliti, contenenti i dati disponibili al 2002 per la valutazione del loro impatto ambientale e sanitario (Rapp. ISTISAN n. 02/37 in: www.iss.it)

❖ Conduzione di test di degradazione su suolo, di adsorbimento, di lisciviazione su colonne invecchiate per la definizione del potenziale di contaminazione di oltre 40 metaboliti selezionati, con applicazione di metodi ufficiali (OCSE – SETAC)

❖ Conduzione di prove di percolazione di campo ed indagini preliminari in acque sotterranee per alcuni metaboliti risultati di interesse.

ISS – schede monografiche: esempi di metaboliti di rilevanza ambientale ed (eco-)tossicologica

alaclor ESA (GW)	da	alaclor
3,5,6-tricloro-2-piridinolo (GW)	da	clorpirifos
2-ammino-N-isopropil-benzammide (GW)	da	bentazone
ETU (GW)	da	maneb, zineb
MITC (GW/MOB)	da	metam sodium
metolaclor ESA (GW)	da	metolaclor
molinate sulf-one/-ossido (MOB)	da	molinate
fenamifos sulf-one/-ossido (MOB/TOX)	da	fenamifos
diazoxo-/oxi-pirimidina (TOX)	da	diazinon
disulfoton sulf-one/-ossido (TOX/SW)	da	disulfoton
a. aminometilfosfonico (PERS/TOX/SW)	da	glifosate
metiocarb sulf-one/-ossido (TOX/GW)	da	metiocarb
2,6-diclorobenzammide (GW/TOX)	da	diclobenil
carbendazim (GW/TOX/PERS)	da	benomil
monuron (PERS /MOB/TOX)	da	diuron
metaboliti s-triazinici (PERS /MOB/TOX)	da	s-triazine

GW-SW: presenza in acquiferi o acque superficiali; MOB: mobili; PERS: persistenti;
TOX: proprietà biologiche rilevanti

ISS – prove LAB – esempi di individuazione
di metaboliti rilevanti
(DT50, Koc, GUS transient e leachers)

<i>aldicarb sulfone, aldicarb sulfossido</i>	da	aldicarb
<i>carbofuran</i>	da	benfuracarb
<i>acido 2,6-diclorobenzoico</i>	da	diclobenil
<i>monuron</i>	da	diuron
<i>CPU</i>	da	diuron e monolinuron
<i>endosulfan solfato</i>	da	endosulfan
<i>acido amminometilfosfonico</i>	da	glifosate
<i>DCPMU</i>	da	linuron
<i>DIA, DEA, DET</i>	da	simazina e terbutilazina

CPU = 1-(4-clorofenil)urea DCPMU = 1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea

ISS – prove LAB – formazione di metaboliti * in colonne di suolo in percentuali attorno al 10% della dose applicata

- aldicarb, *aldicarb sulfossido, carbofuran*
- atrazina, terbutilazina, *DEA, DIA, DET*
- monuron, *CPU, DCMPU*

ISS/IRSA – prove CAMPO – percolazione di metaboliti *

- terbutilazina, *DET, DIA, DEDIA, desetil-2-idrossi terbutilazina*
- alaclor, metolaclor, *metaboliti n.r.*
- linuron, *DCPU, DCPMU*; monolinuron, *CPU*

*) i metaboliti che si formano e percolano sono in corsivo

ISS/IRSA – prove CAMPO – presenze
in acquiferi selezionati

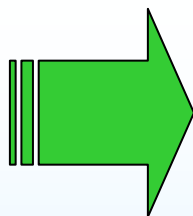
alaclor, metolaclor, terbutilazina	Pianura veneto-friulana (VI)
atrazina, terbutilazina, <i>DET, DEA</i>	Pianura Padana (Lodi)
atrazina, terbutilazina, <i>DET, DEA</i>	Pianura Padana (BG)
metobromuron, atrazina, terbutilazina, <i>DET, DEA, DIA, DEDIA, 3-(4-bromofenil)-1-metossi-1-metilurea</i>	Pianura Umbra

CONCLUSIONE – i metaboliti rilevanti

Sono stati individuati 27 fitofarmaci che danno origine a 32 metaboliti rilevanti, cioè con **proprietà biologiche** e/o **DT50**, *Koc*, *GUS*, percentuali di formazione nel percolato e/o presenza in acquiferi e che **potrebbero essere inseriti in attività di monitoraggio** :

alaclor, atrazina, aldicarb,
benfuracarb, carbendazim/benomil,
clorpirifos, diazinon, diclobenil,
disulfoton, diuron, monolinuron,
endosulfan, fenamifos, glifosate,
linuron, maneb/zineb, MCPB*,
metam sodium/dazomet, metiocarb,
metolaclor, molinate, monuron*,
simazina, terbutilazina

*composti
non in uso
in Italia



acido 2,6-diclorobenzoico; AMPA;
alaclor-ESA; aldicarb sulfone,
aldicarb sulfossido; AIBA;
benomil; 3-(4-bromofenil)-1-
metossi-1-metilurea; carbofuran;
CPU; DCPU; DCPMU; DIA; DEA;
DET; DEDIA; desetil-2-idrossi-
terbutilazina; diazoxo- ed oxi-
pirimidina; disulfoton sulfone;
disulfoton sulfossido; endosulfan
solfato; ETU; fenamifos sulfone;
fenamifos sulfossido; MITC;
metiocarb sulfone; metolaclor-
ESA; molinate sulfone, molinate
sulfossido; monuron; 3,5,6-TCP

SVILUPPI: metaboliti rilevanti ITALIA

(Progetto 1% ISS)

Tra questi 27 fitofarmaci, sono stati individuati quelli che possono essere di interesse per il nostro Paese attraverso un *esame delle vendite**: **21 sono inclusi tra i primi 90 più venduti:**

alaclor, bentazone, benfuracarb, carbaril, carbendazim/tiofanato metile, clorpirifos, clortoluron, 2,4-D, endosulfan, glifosate, linuron, maneb/zineb, MCPA, metam sodium/dazomet, metolaclor, molinate, propanil, simazina, terbutilazina.

* GdL ANPA-APPA-ARPA sui dati forniti dal SIAN, 1997

Sviluppi: metaboliti rilevanti ITALIA (Progetto 1% ISS)

Tra questi 21 composti parentali sono stati selezionati, in prima istanza, quelli che hanno *metaboliti potenzialmente liscivianti*

carbammati, cloroacetanilidi,
endosulfan, glifosate, feniluree,

Sui metaboliti di feniluree, triazine, carbammati, cloroacetanilidi (*metodiche analitiche disponibili o in corso di elaborazione*) stiamo conducendo una indagine in corpi idrici individuati in base a *presenze pregresse dei rispettivi principi attivi*. Le aree di provenienza dei campioni sono le **province di Firenze e di Perugia**.

Sviluppi: i metodi analitici

(Progetto 1% ISS)

Sono in corso di definizione le metodiche analitiche per la ricerca di:

CLASSE CHIMICA	COMPOSTI PARENTALI	METABOLITI
Carbammati	aldicarb	aldicarb sulfone aldicarb sulfossido
	benfuracarb	carbofuran 3-chetocarbofuran 3-idrossicarbofuran
Cloroacetanilidi	alaclor	2,6-dietilanilina 2-cloro-2',6'-dietilacetanilide 2-idrossi-2',6'-dietilacetanilide
	metolaclor	2-etil-6-metilanilina
Clorotriazine	atrazina, terbutilazina	desetilatrazina (DEA)
	atrazina, simazina, cianazina, terbutilazina	deisopropilatrazina (DIA);
	terbutilazina	desilterbutilazina (DET)
Feniluree	diuron	monuron
	diuron, linuron	1-(3,4-diclorofenil)urea (DCPU) 3,4-dicloroanilina (DCA)
	linuron	1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea (DCPMU)
	diuron, monolinuron	4-clorofenilurea (CPU)
	monolinuron	4-cloroanilina
	metobromuron	4-bromoanilina

CLOROACETANILIDI

– CARBAMMATI

METODO HPLC/DAD PROVVISORIO

- Colonna: Supelcosil LC-18 (Supelco) 5 μm , 250x4.6
- Fase mobile: gradiente da 20% Acetonitrile, 80% H_2O a 80% Acetonitrile, 20% H_2O in 20 min
- Flusso: 1ml/min
- Volume iniezione: 50 μl
- Durata corsa: 20 min
- Temperatura colonna: 30 $^\circ\text{C}$
- Lunghezza d'onda: 210 nm
- LOD: 0.1 – 0.2 ppm

ESTRAZIONE E CONC. SPE

- Cartucce: Lichrolut EN (Merck)
- Concentrazione: 1:2500
- Recuperi: 85–94%

METODO HPLC/DAD PROVVISORIO

- Colonna: Supelcosil ABZ+Plus (Supelco) 5 μm , 250x4.6
- Fase mobile: gradiente da 20% Acetonitrile, 80% H_2O a 80% Acetonitrile, 20% H_2O in 25 min
- Flusso: 1ml/min
- Volume iniezione: 50 μl
- Durata corsa: 25 min
- Temperatura colonna: 30 $^\circ\text{C}$
- Lunghezza d'onda: 205/285 nm
- LOD: 0.05 – 0.1 ppm

ESTRAZIONE E CONC. SPE

- Cartucce: Lichrolut EN (Merck)
- Concentrazione: 1:2000
- Recuperi: 78 – 92%

FENILUREE

–

TRIAZINE

METODO HPLC/DAD PROVVISORIO

- Colonna: Discovery RP-Amide C16 5 μm , 250x4.6
- Fase mobile: 40% Acetonitrile, 60% H_2O
- Flusso: 1ml/min
- Volume iniezione: 20 μl
- Durata corsa: 25 min
- Lunghezza d'onda: 240 nm
- LOD: 0.005 – 0.010 ppm

ESTRAZIONE E CONC. SPE

- Cartucce: Lichrolut EN (Merck)
- Concentrazione: 1:2500
- Recuperi: 85–94%

METODO HPLC/MS

- Colonna: LUNA C18 5 μm , 150x4.6
- Fase mobile: 60% Metanolo, 40% H_2O – $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 5mM
- Flusso: 1ml/min
- Volume iniezione: 20 μl
- Durata corsa: 18 min
- Ionizzazione: Elettrospray
- Modo di acquisizione: ioni positivi
- LOD: 0.01 – 0.02 ppm

ESTRAZIONE E CONC. SPE

- Cartucce: Discovery DSC-18L (Supelco)
- Concentrazione: 1:1000
- Recuperi: 88%–97%



G d L I S S

- *Paola Bottoni, biologa*
- Angela Crobe, biologa
- Luca Fava, chimico
- Enzo Funari*, biologo
- Maria A. Orrù, chimica
- Simona Scardala, chimica

*) Direttore del Reparto di Medicina Ambientale

Fine della
presentazione