

35. Maria E. ALESSANDRINI e A. SAMPAOLO. — **Metabolismo del rogor (dimethoate) nelle olive e negli olii di oliva. (*)**

Riassunto. — Sono state effettuate ricerche sul metabolismo del rogor nelle piante di olivo, allo scopo di accertare se nelle olive e negli olii da esse ricavati fossero presenti residui tossici.

Le ricerche sono state effettuate sia con l'impiego di rogor marcato con P^{32} , sia con metodi chimici e cromatografici su carta.

Da tali ricerche è stato possibile concludere quanto segue:

1) Nella pianta il rogor subisce un rapido ma graduale processo di ossidazione e di idrolisi, dando origine a prodotti che, per la maggior parte, hanno una tossicità trascurabile. Per la sua elevata idrosolubilità, il rogor passa per la maggior parte nelle acque di vegetazione.

2) L'analogo ossigenato del rogor è il solo metabolita che presenta un interesse da un punto di vista tossicologico, ma esso si forma nelle olive in piccola quantità ed a sua volta si decompone in prodotti non tossici. Per la sua elevatissima idrosolubilità esso passa completamente nelle acque di vegetazione e l'olio ricavato dalle olive che contengono tale prodotto, anche in quantità volutamente elevate, ne è assolutamente esente.

Summary. — Research has been undertaken in the field of the metabolism of rogor in olive plants, in order to investigate the presence of some toxic residues in the olives and in the oils obtained therefrom. The research has been conducted both by the use of rogor marked with P^{32} tracer and by chemical and paper chromatography methods.

The research has led to the following:

1) In the plant, rogor undergoes a rapid but gradual process of oxydation and hydrolysis, giving origin to products which for the most part have a negligible toxicity. Because of its high solubility in water, rogor passes mostly into the vegetation waters.

2) The oxygen analogue of rogor is the only metabolite of interest from the toxicologic standpoint, but it is formed in the olives in small quantities and, in its turn, it decomposes into non-toxic products. Because of its very high solubility in water it passes completely into the

(*) Lavoro presentato in inglese al XVIII Congresso Internazionale di Chimica Pura ed Applicata (Montreal - Canada 6-12 agosto 1964).

vegetation waters, and the oil obtained from olives containing it, even in deliberately high quantities, is absolutely free from it.

Scopo del presente lavoro è stato quello di studiare il metabolismo del rogor (= dimethoate = N-monometilammide dell'acido O,O-dimetiltiofosforilacetico), sia nelle olive con esso trattate, sia negli olii da dette olive ricavati, e di accertare se in detti prodotti fossero presenti, ed in quale misura, eventuali residui di suoi metaboliti più o meno tossici. E ciò anche in seguito alle riserve e raccomandazioni espressamente formulate dalla « III Riunione della FAO sulla lotta contro la mosca dell'olivo », tenutasi a Firenze in data 25-30 novembre 1957 ⁽¹⁾. In tale Riunione infatti furono resi noti i brillanti risultati raggiunti nella lotta contro la mosca dell'olivo con l'impiego di tale prodotto e fu inoltre comunicato che in tutti i campioni di olii, provenienti da oliveti trattati con rogor, i residui di detto principio attivo erano sempre risultati assenti o presenti in quantità inferiore al limite di sensibilità del metodo chimico allora a disposizione, e cioè a 0,5 ppm ⁽²⁾.

Ovviamente, nel procedere alle ricerche esposte nel presente lavoro, sono stati tenuti presenti gli studi effettuati e pubblicati sul metabolismo del rogor, ed esattamente:

1) nel gennaio 1959 da SANTI e DE PIETRI-TONELLI ^(3, 4), *in vivo* su tessuti vegetali (piante di fave e di ciliege), ed *in vitro* su tessuti animali (fegato di topo);

2) nel marzo 1959 da DAUTERMAN, CASIDA ed altri dell'Università del Wisconsin nell'organismo bovino ⁽⁵⁾;

3) nel marzo 1960 da DAUTERMAN, VIADO, CASIDA e O'BRIEN in piante di grano, cotone, piselli e patate ⁽⁶⁾.

I risultati ottenuti da detti ricercatori avevano dimostrato che, sia nell'organismo animale che in quello vegetale delle specie considerate, l'unico metabolita che presenta una tossicità superiore a quella del rogor è il suo analogo ossigenato, cioè l'N-monometilammide dell'acido O,O-dimetiltiofosforilacetico, che per brevità chiameremo « analogo P=O » (rogor: LD₅₀ acuta orale nel ratto 320-380 mg/Kg; analogo P=O: LD₅₀ acuta orale nel ratto 30 mg/Kg), mentre gli altri metaboliti, derivati da un processo idrolitico sia del rogor che del suo analogo ossigenato (acidi fosforici, tio e ditiofosforici e rispettivi derivati mono e dimetilici) presentano una bassissima tossicità.

Il nostro compito consisteva, quindi, nell'applicare, con gli opportuni adattamenti, alle olive ed all'olio di oliva da esse ricavato, il piano di ricerche seguito dai sopra citati sperimentatori su altri prodotti, per accertare se anche nelle olive si formasse, ed in quale misura, l'« analogo $P=O$ » e se rimanesse o meno disciolto nell'olio.

A tale scopo abbiamo dovuto stabilire anzitutto in qual modo svelarlo e determinarlo.

Per la ricerca qualitativa, non disponendo ancora dell'attrezzatura dei traccianti radioattivi, adottata dai ricercatori citati, abbiamo cercato di utilizzare la cromatografia su carta, stabilendo anzitutto i differenti R_f dei principi attivi puri.

Tali R_f , ottenuti mediante cromatografia monodimensionale discendente, impiegando una miscela di eluizione costituita da alcool isopropilico-acqua in proporzioni 75:25, e sviluppando il cromatogramma con il reattivo del fosforo (bleu di molibdeno) (⁷, ⁸) sono risultati di 0,89 per il rogor e di 0,82 per l'« analogo $P=O$ ».

Successivamente, abbiamo addizionato quantità note dei due prodotti a vari campioni di olio e, dopo notevoli difficoltà, dovute alle interferenze prodotte dall'olio, abbiamo potuto accertare che con il metodo cromatografico suddetto è possibile differenziare nell'olio il rogor accanto al suo analogo ossigenato.

Per quanto riguarda la sua determinazione, abbiamo prima dovuto accertare se il metodo di BAZZI (⁹, ¹⁰), messo a punto per la determinazione dei residui di rogor, consentiva di determinare anche eventuali residui dell'« analogo $P=O$ ».

Le prove eseguite hanno dimostrato che detto prodotto viene dosato insieme al rogor con un recupero di ca. il 90%.

Detto metodo consiste essenzialmente nell'estrazione del principio attivo dall'olio con una miscela di alcool etilico-acqua nel rapporto 1:1, evaporazione del solvente, purificazione del principio attivo estratto, distruzione della sostanza organica con acido perclorico secondo KING (¹¹) e determinazione colorimetrica del fosforo presente secondo BEREMBLUM e CHAIN (¹²).

Con una modifica nella fase estrattiva, sostituendo cioè alla soluzione idroalcoolica proposta da BAZZI (⁹, ¹⁰), la soluzione di acetone acquoso proposta da VASSILIOU ed altri (¹³), abbiamo ottenuto un recupero ancora leggermente più elevato, e cioè di ca. il 95%.

Per la determinazione differenziata dei due composti, in presenza l'uno dell'altro, si è adottata la tecnica di ripartizione cromatografica su colonna di gel di silice, con un gradiente di eluizione crescente di esano-cloroformio, proposta da DAUTERMAN ed altri (⁶).

Una volta accertato di avere metodi validi a disposizione, abbiamo

ricercato l'« analogo $P=O$ » anzitutto nelle olive provenienti da oliveti trattati con rogor.

Particolari difficoltà si sono incontrate nella purificazione dell'estratto, in quanto insieme al prodotto si sciolgono nel solvente anche forti quantità di sostanze oleose e coloranti che possono interferire sia nella ricerca cromatografica, generando macchie brune ed alterando gli R_f , sia nella determinazione quantitativa, per l'eccessivo residuo carbonioso che si forma nell'ossidazione con acido perclorico.

Abbiamo dovuto, perciò, apportare alcune modifiche ai metodi proposti ancora da BAZZI in altra recente pubblicazione ⁽¹²⁾. Precisamente, le olive, private dei noccioli, ed omogeneizzate fino a formare una pasta semifluida, sono state estratte con cloroformio. L'estratto, filtrato, è stato evaporato fino ad ottenere un residuo oleoso, che è stato sottoposto ad estrazione con la coppia combinata esano-acetonitrile. La fase acetonic-trilica, contenente i principi attivi, dopo concentrazione a piccolo volume (5 cm³ ca.), è stata ripresa con soluzione acquosa satura di cloruro di sodio. La soluzione acquosa, filtrata, è stata estratta nuovamente con cloroformio, che è stato quindi evaporato a secco. Il residuo è stato ripreso con poco etere etilico e sottoposto a microdistillazione secondo OTTER ⁽¹⁵⁾, con le modifiche già studiate da BAZZI ⁽¹⁴⁾.

Tale procedimento ci ha consentito una sufficiente purificazione dei due prodotti (rogor e « analogo $P=O$ »), per poter procedere sia alla cromatografia su carta, sia alla determinazione quantitativa, senza incontrare gli inconvenienti già citati.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'« analogo $P=O$ » si forma effettivamente nelle olive, sia pure in piccole quantità, che diminuiscono però col tempo. Precisamente, i valori trovati raggiungono generalmente punte massime nelle olive a distanza di 10-15 giorni dal trattamento, anche in condizioni molto più severe di quelle normalmente seguite, e solo in qualche caso hanno superato di poco 1 ppm.

Accertata la presenza dell'« analogo $P=O$ » nelle olive, sia pure in piccole quantità, abbiamo studiato il suo coefficiente di ripartizione tra olio ed acqua, addizionando all'olio quantità note di principio attivo.

Sia mediante cromatografia su carta, sia mediante determinazione quantitativa dello stesso prodotto nell'acqua, è stato trovato che l'« analogo $P=O$ » passa completamente nell'acqua.

Abbiamo allora voluto controllare mediante cromatografia su carta e mediante determinazione quantitativa se tale metabolita era presente sia nell'olio, sia nelle rispettive acque di vegetazione ricavate da olive in cui esso risultava presente. Nell'olio, come era prevedibile, esso è risultato assente, mentre nelle acque di vegetazione è risultato presente con un recupero praticamente totale.

I risultati da noi ottenuti sono stati esattamente confermati da prove effettuate, indipendentemente dalle nostre, presso il Laboratorio Sperimentale Agrario della Soc. Montecatini a Signa (Firenze), mediante l'impiego di isotopi radioattivi.

Tali ricerche, che sono in corso di pubblicazione, per cortese concessione della Soc. Montecatini, possono essere riassunte come segue:

1) Purificazione del principio attivo da impiegare, marcato con P^{32} , fino ad ottenere una purezza del 100%.

2) Preparazione di una formulazione liquida al 20% di principio attivo.

3) Trattamento degli olivi in diverse epoche, nei limiti del più ampio periodo entro il quale si effettua la lotta antidacica. La tecnica del trattamento è stata la più severa possibile, utilizzando uno spruzzatore del tipo De Vilbiss, ottenendo quindi il massimo possibile di depositi iniziali, ed anche con dosi superiori a quelle generalmente impiegate ed in epoche più tardive.

4) Prelievo delle olive a diversi intervalli di tempo dall'applicazione del prodotto e successiva ricerca dei residui del principio attivo tal quale e dei suoi metaboliti, in maniera analoga a quanto effettuato da DAUTERMAN ed altri (⁵, ⁶).

L'impiego di un prodotto marcato con P^{32} ha permesso non soltanto di seguire, con autoradiografia, la migrazione sistemica del principio attivo (¹⁶), ma anche l'identificazione e la determinazione quantitativa di molti dei metaboliti del rogor.

Precisamente, le olive omogeneizzate sono state estratte con cloroformio ed acqua, ottenendo in tal modo le tre seguenti frazioni:

a) *Frazione estraibile con cloroformio*, comprendente il prodotto originario ed il suo analogo ossigenato. La ripartizione su colonna di gel di silice, con un gradiente di eluizione crescente di esano-cloroformio, ha permesso di isolare il prodotto originario dal suo analogo ossigenato.

b) *Frazione estraibile con acqua*, comprendente 8 possibili metaboliti appartenenti al gruppo degli acidi fosforici e loro derivati mono e dimetilici. La ripartizione su colonna di resina a scambio anionico, con un gradiente di eluizione ad acidità crescente, ha permesso di isolare 4 frazioni comprendenti i metaboliti suddetti.

c) *Frazione insolubile in cloroformio e in acqua*, rimasta nelle sanse, comprendente probabilmente una parte di fosforo assimilata e organicata dalla pianta.

Le determinazioni quantitative sulle singole frazioni sono state effettuate sia mediante la misurazione della radioattività proveniente dal P^{32} , sia mediante la determinazione del fosforo totale, mentre l'identificazione qualitativa dei singoli metaboliti è stata effettuata per cromatografia su carta e successiva autoradiografia.

CONCLUSIONI

Dalle ricerche sopraesposte è stato possibile accertare quanto segue:

1) Il rogor subisce nella pianta di olivo un rapido ma graduale processo di ossidazione e di idrolisi, in seguito al quale dopo circa 10 giorni dal trattamento, operando nelle condizioni più severe possibili (quantità molto superiori a quelle normalmente impiegate, applicazioni dell'insetticida in epoche molto più vicine alla raccolta di quanto normalmente richiesto, ecc.), esso è presente nelle olive in quantità oscillanti tra 2 e 3 ppm, mentre dopo 20 giorni tale quantità è ridotta in media a valori molto bassi ed, al massimo, a circa 1 ppm. Per la sua notevole idrosolubilità il rogor passa per la maggior parte nelle acque di vegetazione e si può calcolare che, in media, i suoi residui restino nell'olio in ragione di $1/3 - 1/4$ della rispettiva concentrazione nelle olive con le quali è stato prodotto.

2) L'analogo ossigenato del rogor si forma nelle olive, in seguito al processo di ossidazione del rogor stesso, già a breve distanza di tempo dal trattamento, raggiungendo un massimo di concentrazione tra il 10° ed il 15° giorno, per poi decrescere in seguito a formazione di prodotti di idrolisi del tipo degli acidi fosforici e loro derivati mono e dimetilici. Nelle prove effettuate, che, come si è detto, rappresentano casi limite per tutte le condizioni prescelte, le concentrazioni massime dei suoi residui hanno raggiunto valori di poco superiori a 1 ppm.

3) Per la sua elevatissima idrosolubilità l'« analogo $P=O$ » passa completamente nelle acque di vegetazione e l'olio ricavato da olive che lo contengono, anche in quantità volutamente elevate, ne è assolutamente esente.

In generale, per quanto riguarda l'olio ricavato da olive provenienti da trattamenti con rogor, all'epoca ed alle dosi normali, si può concludere che le concentrazioni dei suoi residui nelle olive al momento della raccolta raggiungono, al massimo, valori di 0,1-0,2 ppm.

Appare, pertanto, del tutto logico e spiegabile, anche in via teorica, che nelle analisi finora da noi eseguite su numerosissimi campioni di olii

sia stata sistematicamente accertata la pratica assenza di residui sia di rogor che dei suoi metaboliti. E ciò non soltanto sui campioni di olii provenienti dalle varie zone olivicole italiane, ma anche in quelli provenienti da vari Paesi del Bacino Mediterraneo (Grecia, Libia, Spagna, Portogallo, ecc.), pervenuti al nostro Istituto o direttamente da parte dei Governi interessati, o tramite la F.A.O. (17, 18, 19).

La larga esperienza acquisita in base ai risultati ottenuti ed alla rigorosa documentazione oggi a disposizione sono tali da fare concludere che sarebbe addirittura superflua la ricerca di residui di rogor o di suoi metaboliti negli olii ricavati da olive provenienti da trattamenti con rogor, alle dosi normali di impiego e quando sia stato osservato un intervallo minimo di 15 giorni tra l'ultimo trattamento e la raccolta delle olive.

OLIVE DA TAVOLA.

Per quanto riguarda le olive da tavola, il problema può apparire diverso, in quanto l'intera polpa della drupa è destinata all'alimentazione, ma in pratica intervengono alcuni fattori che rendono possibile una tranquilla considerazione del problema anche a questo riguardo. Infatti:

1) Dato che le olive da tavola devono essere protette per un periodo di tempo più breve di quello necessario per le olive da olio, le dosi di impiego consigliate sono inferiori e, di conseguenza, i depositi iniziali di principio attivo risultano in quantità più basse.

2) In ogni caso, quando le olive da tavola siano raccolte ad un intervallo minimo di tempo di un mese dall'ultimo trattamento con rogor, i residui presenti nelle olive sono tali da non destare alcuna preoccupazione di ordine tossicologico.

3) Il trattamento delle olive da tavola con soluzione alcalina, normalmente praticato, porta ad una eliminazione dell'85-90% dei residui di rogor ancora eventualmente presenti.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (1) « Rapport de la Troisième Réunion FAO sur la lutte contre la Mouche de l'olive ». Firenze (Italia), 25-30 novembre 1957. Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura.
- (2) ALESSANDRINI M. E., BONIFORTI L., DORETTI M., LANFORTI G. F., RAMELLI G. C. e SAMPAOLO A. - Rend. Ist. sup. Sanità, 20: 1152 (1957).

- (3) SANTI R. e DE PIETRI-TONELLI P. - « Ricerche sul meccanismo d'azione della N-monometilammide dell'acido O,O-dimetilditiofosforilacetico » - Ist. Ric. Agr. Soc. Montecatini, Signa (1959).
- (4) SANTI R. e DE PIETRI-TONELLI P. - *Nature*, 183: 398 (1959).
- (5) DAUTERMAN W. C., e al. - *J. Agr. Food Chem.*, 7: (3), 188 (1959).
- (6) DAUTERMAN W. C., e al. - *J. Agr. Food Chem.*, 8: (2), 115 (1960).
- (7) HANES C. S., e al. - *Nature*, 164: 1107 (1949).
- (8) METCALF R. L. e al. - *Science*, 117: 527 (1953).
- (9) BAZZI B., DE PIETRI-TONELLI P. e SANTI R. - « Metodi per il microdosaggio chimico e biologico dei residui della N-monometilammide dell'acido O,O-dimetilditiofosforilacetico nell'olio d'oliva » - Lab. Sper. Agr. Soc. Montecatini, Signa (1956).
- (10) BAZZI B. e SANTI R. - « Perfezionamenti al metodo di dosaggio chimico di residui di N-metilammide dell'acido O,O-dimetilditiofosforilacetico in olio di oliva » - *Olivicoltura*, 4: (1958) Roma.
- (11) KING E. J. - *Biochem. J.*, 26: 292 (1932).
- (12) BERENBLUM I. e CHAIN E. - *Biochem. J.*, 32: 295 (1938).
- (13) VASSILIOU A. A. e al. - *Ann. Inst. Phytopath. Benaki (Grecia)* Vol. 2, (1), 12 (1959).
- (14) BAZZI B. - « Dosaggio dei residui di N-monometilammide dell'acido O,O-dimetilditiofosforilacetico (Rogor) in olive e organi vegetali diversi » - Ist. Ric. Agr. Soc. Montecatini, Signa (1960).
- (15) OTTER I. - *Mikrochem.*, 1: 35 (1923).
- (16) DE PIETRI-TONELLI P. e BARONTINI A. - « Comportamento del rogor P³² applicato sulle piante » - Ist. Ric. Agr. Soc. Montecatini, Signa (1960).
- (17) ALESSANDRINI M. E., LANFORTI G. F., RAMELLI G. C. e SAMPAOLO A. - *Rend. Ist. sup. Sanità*, 21: 1097 (1958).
- (18) ALESSANDRINI M. E., LANFORTI G. F. e SAMPAOLO A. - « Résidus insecticides dans les huiles d'olive provenant de l'expérimentation antidiacique effectuée en 1958 », XVII Congresso Internazionale di Chimica Pura ed Applicata. Monaco (1959).
- (19) ALESSANDRINI M. E. - « Fourth FAO meeting on the control of olive pests » Tel Aviv, 5-12 dicembre 1960.
-