

RESIDUI DI PESTICIDI NELLA CERA

Dr.ssa Mila Nocentini

IZS Lazio e Toscana

Sezione di Firenze

Corso di aggiornamento

“Riconoscere e gestire le patologie delle api nel rispetto della sicurezza dei prodotti dell'alveare”

Roma 9-16 X 2013 - Firenze 11-14 X 2013



LA MORTALITA' DELLE API

Pesticidi usati in agricoltura

La maggioranza delle morti delle api dal 1966-1979 è stata attribuita a pesticidi Organoclorurati (OC), Organofosforati (OP), Piretroidi (PY) e Carbammati (CB) *

Successivamente negli Stati Uniti il controllo dei parassiti delle piante è stato modificato seguendo due diversi approcci.

- ingegneria genetica sulle colture***
- introduzione di due nuove classi di pesticidi sistemici:***

Neonicotinoidi e fenilpirazoici

*E. L. Atkins., "Injury to honey bees by poisoning" . *The hive and the honey bee* J.M Graham ed (1992) 1324



LA MORTALITA' DELLE API

Un comportamento molto più cauto rispetto a queste nuove pratiche agricole si è avuto nell'Unione Europea

La recente conoscenza della sequenza del genoma delle api dà una possibile spiegazione per l'alta sensibilità che queste mostrano per le varie classi di pesticidi. In confronto al genoma di altri insetti, quello delle api è marcatamente deficiente nel numero dei geni che codificano gli enzimi di detossificazione, incluso il citocromo P450 monooxygenase, il glutathione s-transferase ed il carboxyl esterase.*

***C. Claudianos et al., "A deficit of toxification enzyme: pesticides sensitivity and environmental response in honey bee" *Insect Mol. Biol.* (2006) 15, 615-636**



I Pesticidi Neonicotinoidi e Fenilpirazoici

Questi possono essere utilizzati nel trattamento delle sementi, del suolo e direttamente sulle piante

I neonicotinoidi, tra i quali l'imidaclopride, causano una persistente attivazione dei recettori colinergici che porta ad una ipereccitazione e morte.*

I fenilpirazoli, tra cui il fipronil, agisce inibendo il GABA (γ -ammino butirric acid).

***P. Jeschke et al., "Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry" *Pest. Manage. Sci.* (2008) 64, 1084-1098**



I Pesticidi Neonicotinoidi e Fenilpirazoici

Queste due classi di pesticidi differiscono dalle altre in quanto diventano sistemici.*

In questa maniera le api hanno una esposizione cronica a questi pesticidi.

• G.C. Cluter et al., "Explosure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact to honey bee"
J. Econ. Entomol. (2007) 100, 765-772



LA MORTALITA' DELLE API

I Pesticidi usati in apicoltura

L'infestazione da acari, tra cui la Varroa Jacobson, costringe gli apicoltori a trattare gli alveari con acaricidi.

I pesticidi contro la varroa possono essere suddivisi in tre categorie:

- derivanti da sintesi organica;**
- derivanti da acidi organici**
- derivanti da prodotti naturali**



I Pesticidi usati in apicoltura

Pesticidi derivanti da sintesi organica:

Fluvalinate, Amitraz, Flumetrina, Acrinatrina, Cimiazolo, Cumafos, etc.

Pesticidi derivanti da acidi organici:

Acido formico, Acido lattico, Acido ossalico.

Pesticidi derivanti da prodotti naturali:

Timolo, Majoram oil, wintergreen oil

Caratteristiche chimiche di alcuni pesticidi contro la Varroa (*sostanze che sono presenti naturalmente nel miele)

	Volatile o instabile	Non Volatile
Liposolubili	Amitraz	Acrinathrine
	Thymol	Bromopropylate
	Majoram oil	Coumaphos
	Wintergreen oil	Chlorfenvinphos
		Chlordimefon
		Fluvalinate
		Flumethrine
		Tetradifon
Idrosolubili	Acido formico*	Acido Lattico*
		Acido Ossalico*
		Cymiazolo



Aspetti Legislativi

Regulation (EC) No 396/2005

**on maximum residue levels of pesticides in or on *food and feed* of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC *GU CE L70 del 16/03/2005*
*EU PESTICIDE DATABASE***

Regulation (EC) No 37/2010

on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin *GU CE L15 del 20/01/2010*

Limiti dei residui di sostanze utilizzate contro la Varroa nel miele

PESTICIDA	CLASSE DI APPARTENENZA	MRL (µg/kg)
Cumafos	Organofosforati	100
Amitraz	Formamidine	200
Fluvalinate	Piretroidi	NO MRL
Flumetrine	Piretroide	NO MRL
Cimiazolo	Acaricidi	NO MRL
Bromopropilate	Acaricidi	NO MRL
Tetradifon	Organofosforati	50
Timolo		NO MRL
Acido Lattico		NO MRL
Acido Ossalico		NO MRL
Acido Formico		NO MRL

Presenza di pesticidi contro la Varroa in apiari: valori massimi trovati in campioni di cera, polline api e miele*

PESTICIDA	CERA (µg/kg)	POLLINE (µg/kg)	API (µg/kg)	MIELE (µg/kg)
Cumafos	94131	5828	2777	2020
Amitraz	46060	1117	13780	555
Fluvalinate	204000	2670	5860	750
Flumetrine	50	-	-	15
Cimiazolo	-	-	-	17
Bromopropilate	135000	11	2245	245
Tetradifon	580	-	-	19

** Johnson R. M., K., “ Pesticides and honey bee toxicity- USA” Apidologie (2010) 41, 312-331*



PROGETTO APENET TOSCANA

**CAMPIONI DI CERA ANALIZZATI
PRESSO LABORATORIO CHIMICO
SEZIONE DI FIRENZE - IZS LAZIO TOSCANA**

70 CAMPIONI DI CERA

RACCOLTI DAI FAVI DI 20 APIARI
DISTRIBUITI NELLE PROVINCE DI
FIRENZE, AREZZO, LUCCA, SIENA
NEL PERIODO TRA MARZO 2010 E
APRILE 2011

39 CAMPIONI DI FOGLI CEREI

PRODOTTI IN DIVERSE
CERERIE TOSCANE NEL 2012



Metodo Utilizzato POS SIF 035 INT

Metodo di Riferimento:

**METODO
AOAC 2007.01**

***“Pesticide residues in foods by
acetonitrile extraction and partitioning
with magnesium sulfate”***

PESTICIDI RICERCATI

	ANALITA		ANALITA
1	Bifentrina	29	Clorobenzilato
2	Clorotalonil	30	4-4 DDT
3	Clorpirifos	31	Diazinone
4	Clorpirifos metile	32	Dieldrin
5	Clorfenvinfos	33	Fenvalerate 1
6	2-4'-DDD	34	Fenvalerate 2
7	Endosulfan solfato	35	Pirazofos
8	Etion	36	Triazofos
9	Cumafos	37	Azinfos Etile
10	Paration etile	38	Cis Clordano
11	Permetrina cis	39	Cyflutrin
12	Permetrina trans	40	4-4 DDE
13	Atrazina	41	2-4 DDT
14	Azoxistrobin	42	endosulfan alfa
15	Carbaril	43	endosulfan beta
16	Cialotrina lambda	44	Esaclorocicloesano gamma
17	Ciprodinil	45	Esaclorbenzene
18	Esaclorocicloesano alfa	46	Eptacloro
19	Imazalil	47	Esfenvalerate
20	Kresoxim metile	48	Pirimifos metile
21	Procimidone	49	Profenofos
22	Trifluralin	50	Resmetrina
23	Amitraz	51	Tecnazene
27	Esaclorocicloesano beta	52	4-4'-DDD
28	Cipermetrina		

METODO ANALITICO

Preparazione del campione

- Omogeneizzazione
del campione
- QuEChERS

Risoluzione Analiti (GC)

- Gas
Cromatografia

Analisi (MS)

- Spettrometria
di Massa

METODO INTERNO

VALIDATO



GUIDA EURACHEM

*“The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory
Guide to Method Validation and Related Topics.”*

Teddington LTD December 1998

SANCO/12495/2011

*“Method Validation and Quality Control Procedures for
Pesticide Residues Analysis in Food and Feed”*

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

OMOGENEIZZAZIONE E PRELIEVO

- 1.campione di cera disciolto a 65°C
- 2.prelievo del campione omogeneo (3g)
- 3.diluizione con H₂O fino a 15g

ESTRAZIONE

- 1.aggiunta di 15ml di 1%AcOH in MeCN + 75µm di IS (d10-paration)
- 2.aggiunta di 6g MgSO₄ + 1.5g NaOAc (miscela di estrazione QuEChERS)
- 3.omogeneizzazione al vortex e centrifugazione

PURIFICAZIONE

- 1.trasferimento di 8ml di estratto in falcon da 15ml contenente 0.4gPSA + 1.2gMgSO₄ + 0.4gC18 (dispersive-SPE)
- 3.omogeneizzazione al vortex e centrifugazione

CONCENTRAZIONE DELL'ESTRATTO

- 1.prelievo di 4ml di estratto e aggiunta di 0.4ml di TPP 2µg/ml
- 2.evaporazione del solvente in corrente di azoto a 50°C
- 3.ricostituzione dell'estratto in toluene (1ml)

PURIFICAZIONE FINALE

- 1.aggiunta di 0.2g di MgSO₄ + agitazione + centrifugazione
- 2.trasferimento in vial da autocampionatore per analisi GC-MS

***QuEChERS:
“Quick, Easy,
Cheap,
Effective,
Rugged and
Safe”***

ANALISI GC-MS

STRUMENTAZIONE Thermo Fischer Scientific
AUTOCAMPIONATORE: AS TRIPLUS
GAS CROMATOGRAFO: TRACE GC
SPETTROMETRO DI MASSA: TRACE DSQ (singolo quadrupolo)

Risoluzione Analiti (GC)

• Gas
Cromatografia

CONDIZIONI DI INIEZIONE

Temperatura - volume di iniezione: 250°C - 2ul
Modalita' di iniezione: splitless
Gas carrier - flusso: He - 1ml/min (costante)

CONDIZIONI GASCROMATOGRAFICHE

Colonna capillare: (5%fenil)metilpolisilossano 30mx0.25mmIDx0.25um spes.
Programma di temperatura: 80°C - 1.5min, a 180°C con 25°C/min,
a 230°C con 5°C/min, a 290°C con 25°C/min, 290°C - 10min

Analisi (MS)

• Spettrometria
di Massa

CONDIZIONI DEL RIVELATORE

Temperatura transfer line e sorgente: 250°C
Sorgente: EI a 70eV
Modalita' di acquisizione: Full scan (50 - 450 amu)/SIM



VALIDAZIONE DEL METODO INTERNO

ANALISI EFFETTUATE

BIANCHI CAMPIONE



**CURVE DI CALIBRAZIONE
IN MATRICE (0.02ug/ml - 4ug/ml)**



**CAMPIONI FORTIFICATI
(0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg)**



PARAMETRI VALUTATI

SPECIFICITA'

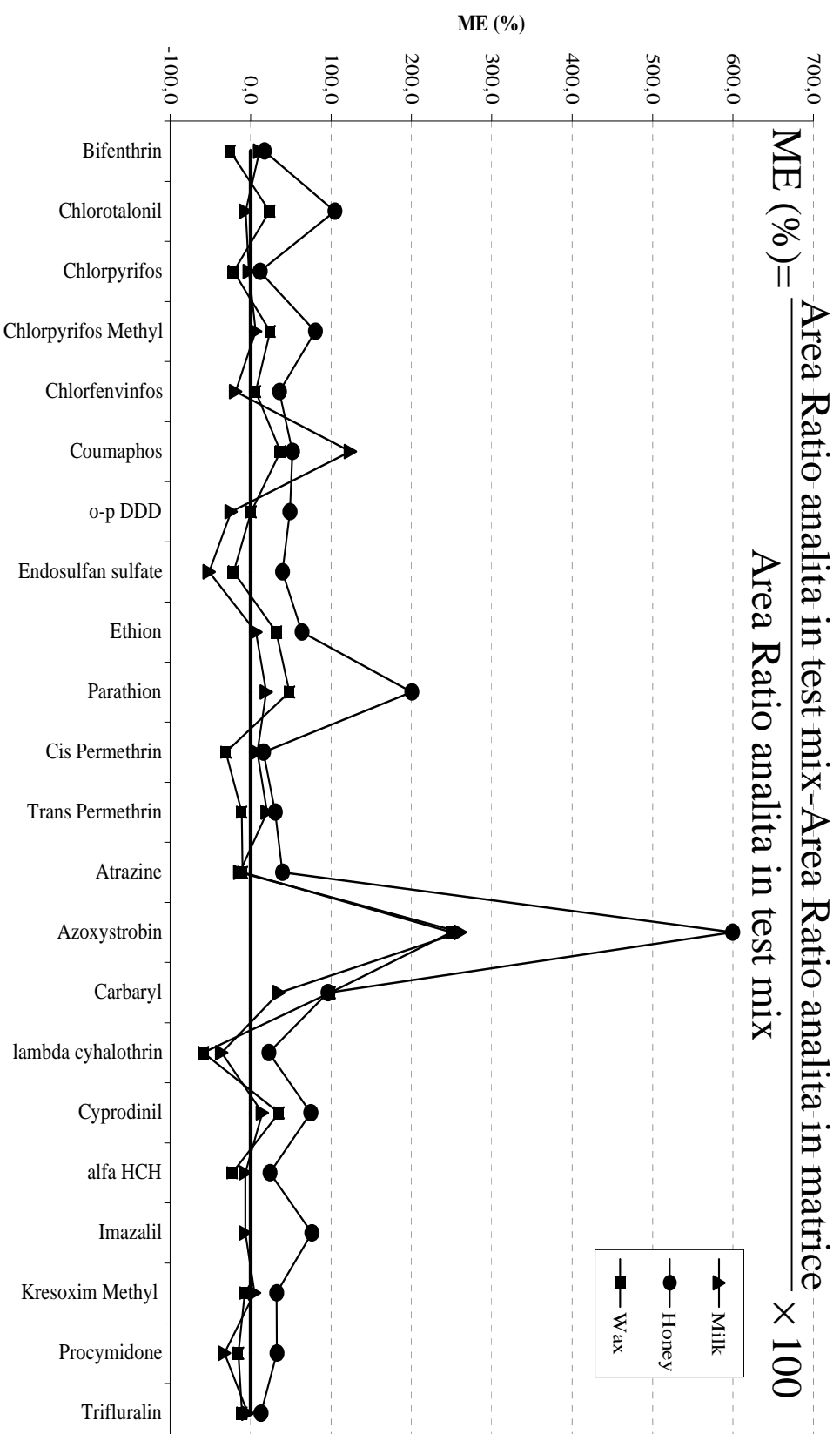
**LINEARITA'
(C_{LOD} , C_{LOQ})**

**ACCURATEZZA (R%)
PRECISIONE (RSD%, HORRAT)
INCERTEZZA DI MISURA ($\hat{u}(C)$)**



VALIDAZIONE DEL METODO

Specificità: Effetto Matrice



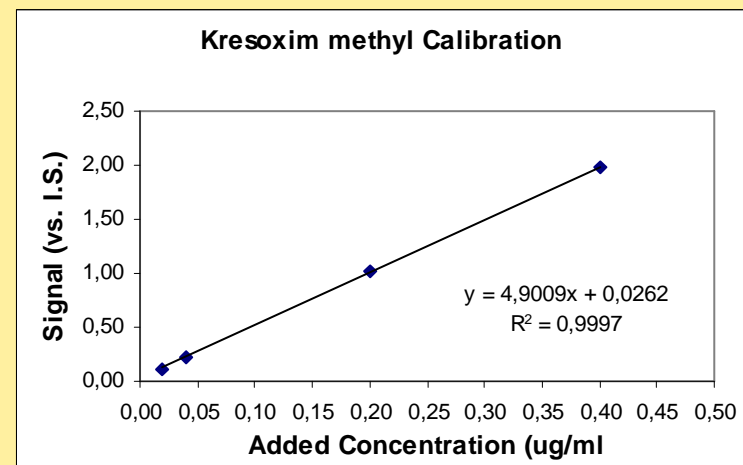
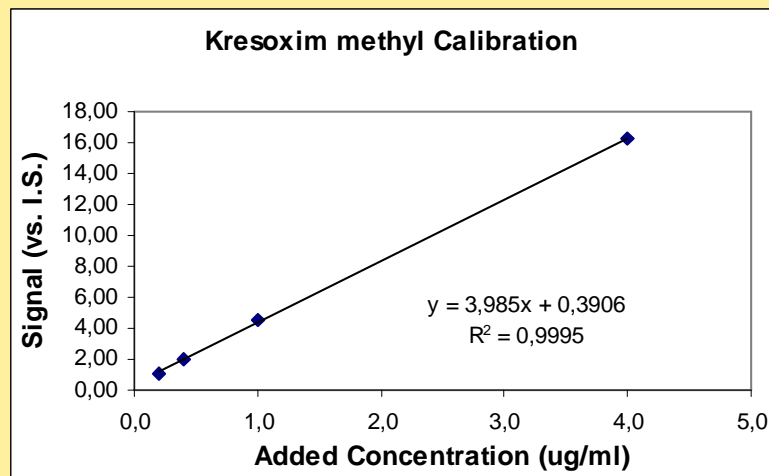
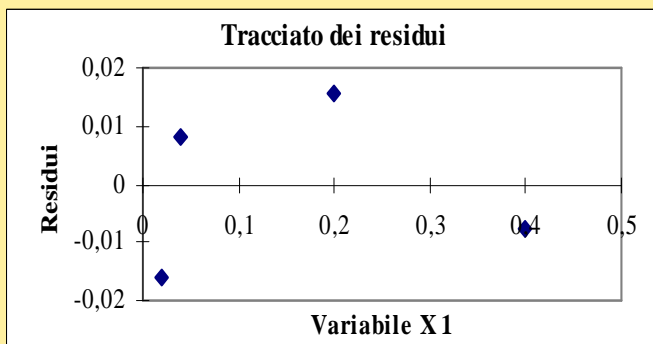


VALIDAZIONE DEL METODO

Linearità: Curva di calibrazione in matrice

Esempio Kresoxim Metile

Sample	Added Conc. (ug/ml)	Signal (vs. I.S.)	Calculated Conc. (ug/ml)	%Recovery
0-Std	0	0,000	0,00	
5 ng/g Std	0,02	0,108	0,02	84%
10 ng/g Std	0,04	0,230	0,04	104%
50 ng/g Std	0,2	1,022	0,20	102%
100 ng/g Std	0,4	1,979	0,40	100%
250 ng/g Std	1	4,592	1,05	105%
1000 ng/g Std	4	16,285	3,99	100%

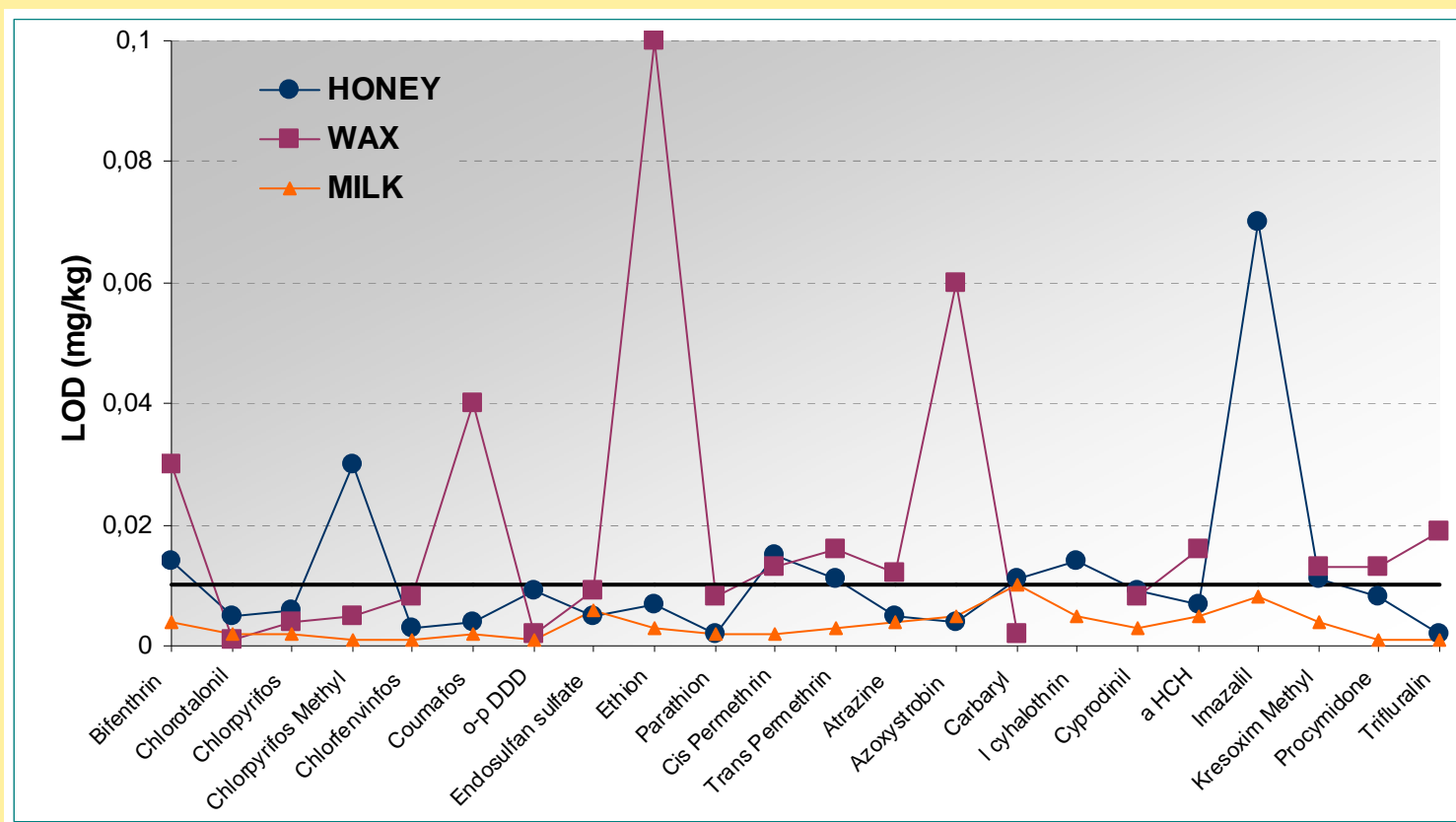




VALIDAZIONE DEL METODO

Linearità:

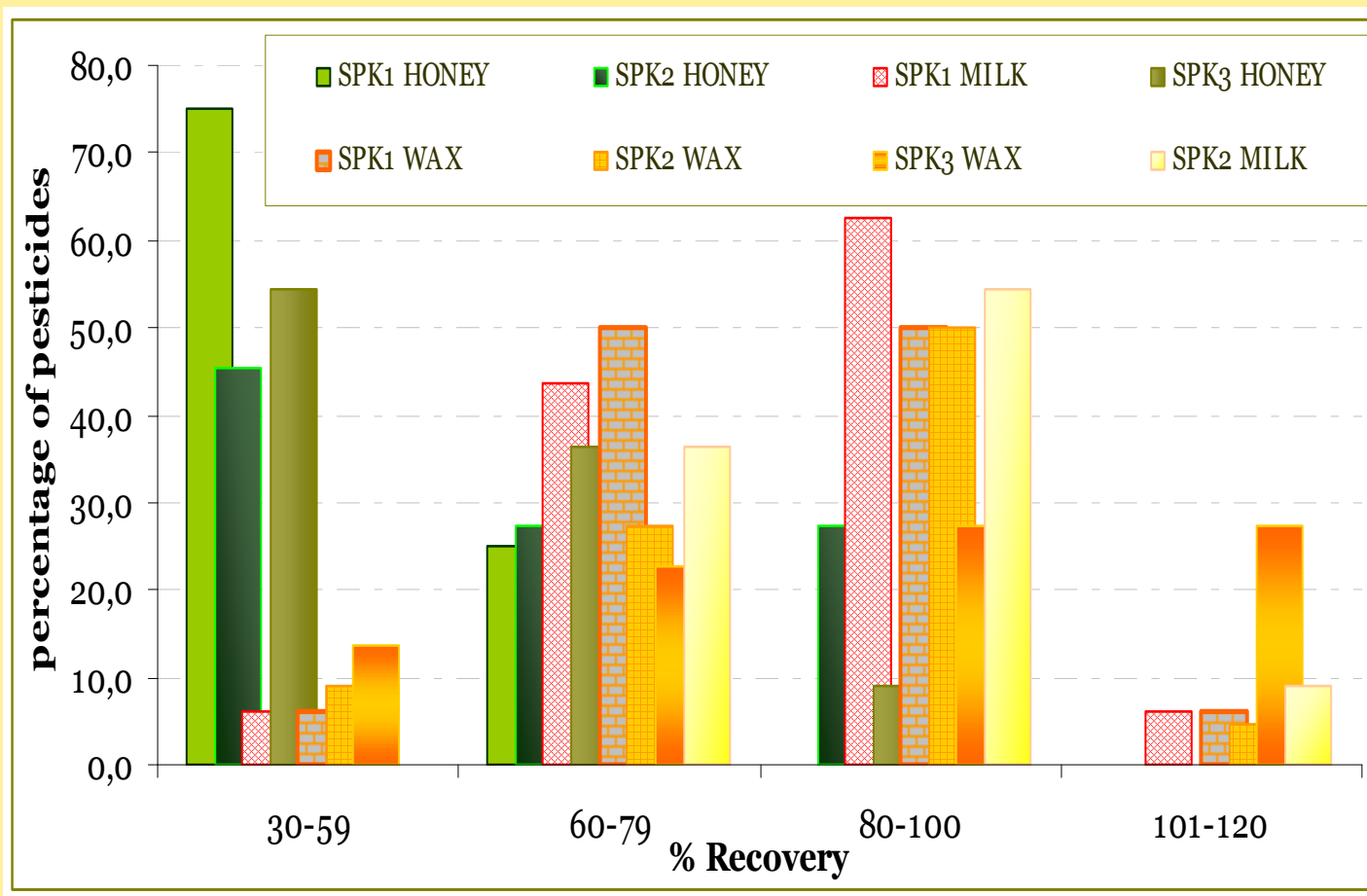
Limite di Rivelabilità e di Quantificazione





VALIDAZIONE DEL METODO

Accuratezza: Recupero





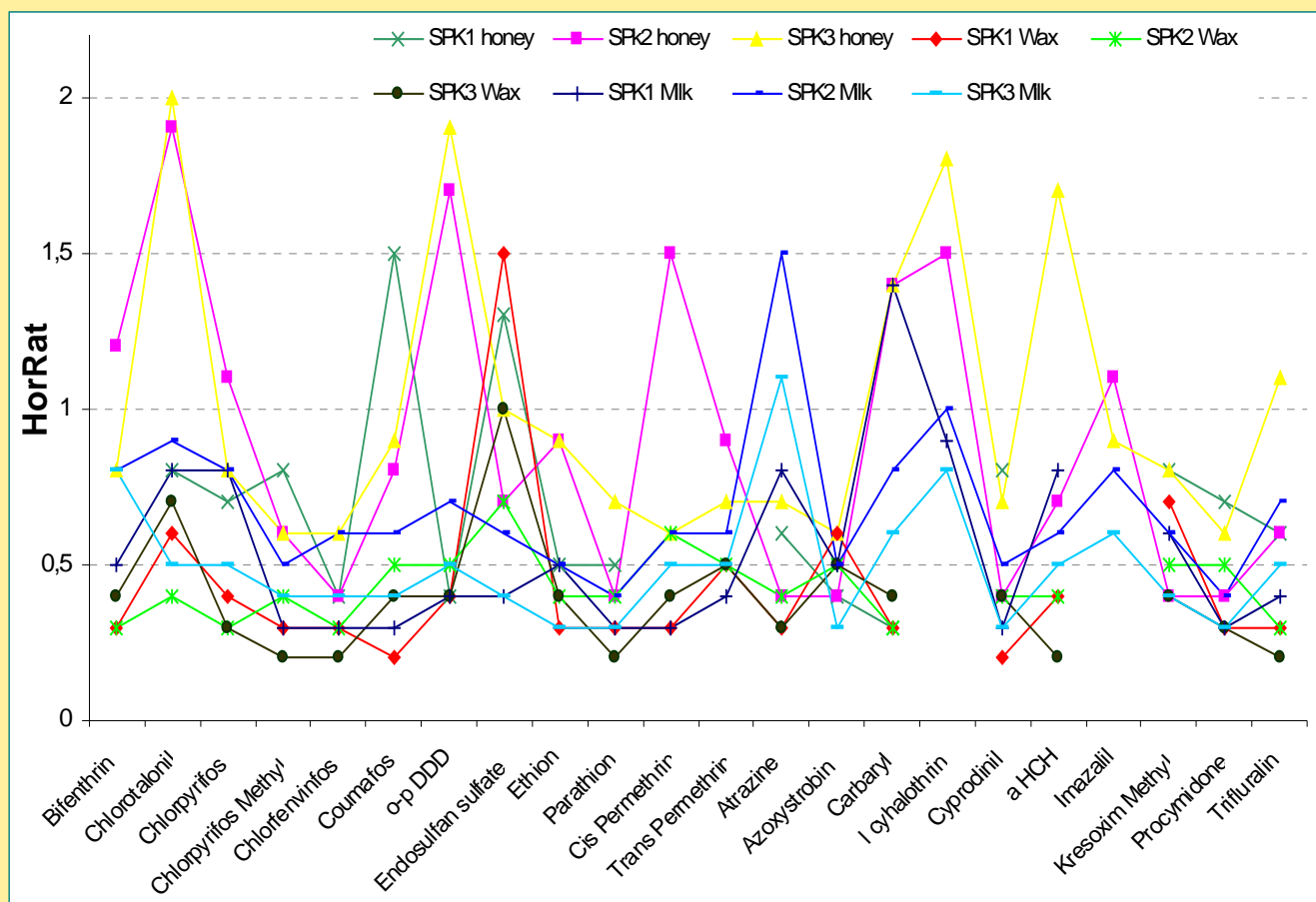
VALIDAZIONE DEL METODO

Accuratezza: Precisione

$$\text{HorRat} = \frac{\text{RSD}}{\text{RSD}_{\text{HOR}}}$$

$$\text{RSD}_{\text{HOR}} = 2^{(1-0.5\log C)}$$

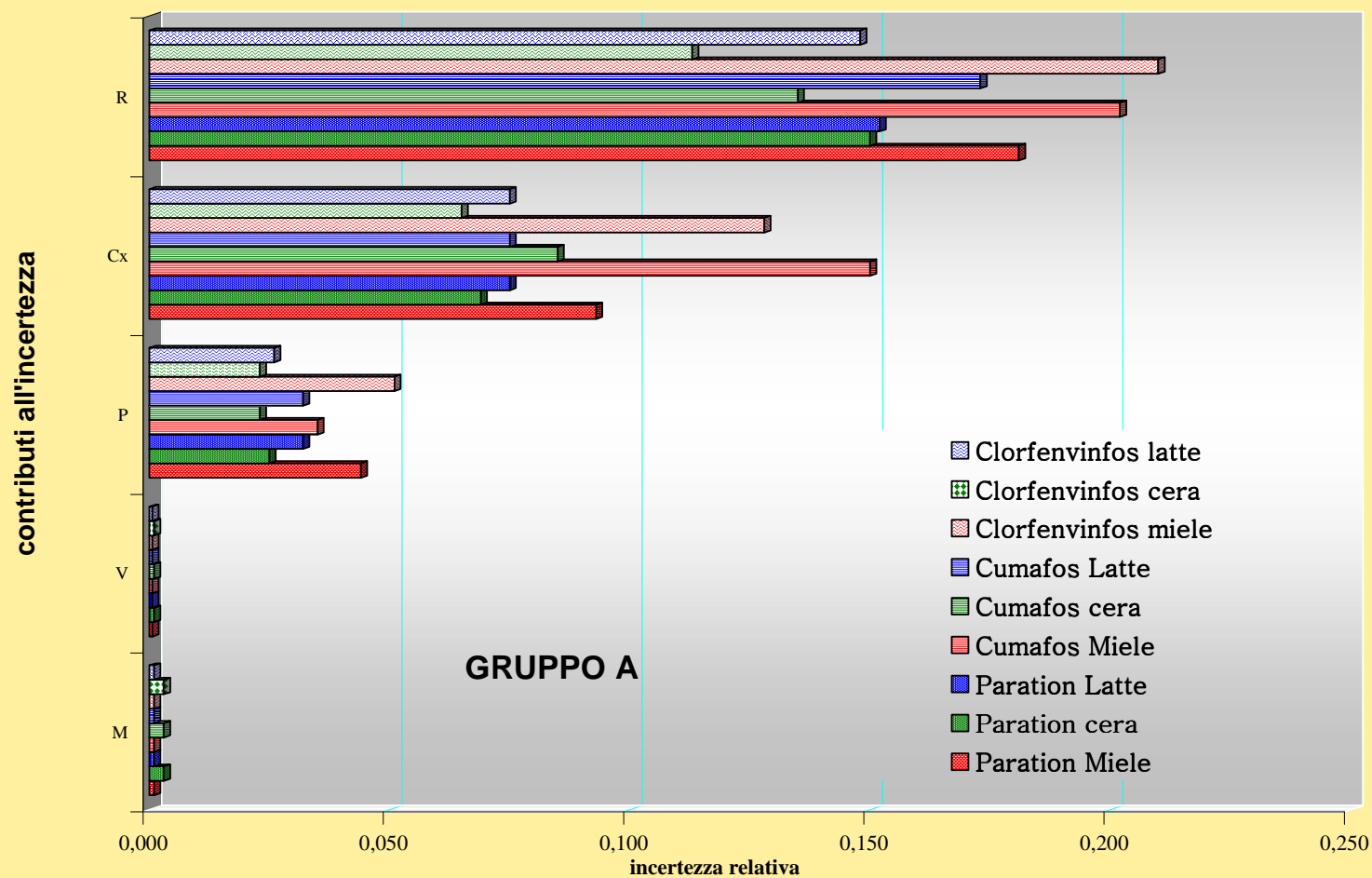
C è la concentrazione espressa come frazione di massa (ovvero g/g)





VALIDAZIONE DEL METODO

Accuratezza: Incertezza di Misura



ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Documento SANCO/12495/2011

$$\text{RISULTATO} = X \pm U \text{ (mg/kg)}$$

**X = media ottenuta dalla misura effettuata
sul campione in doppio**

U = incertezza estesa

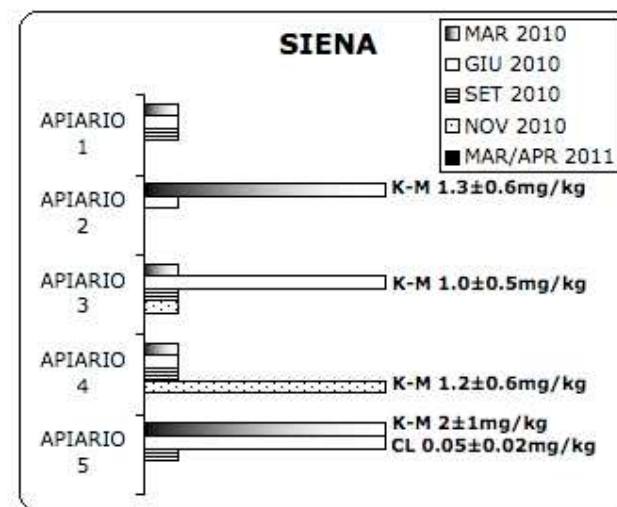
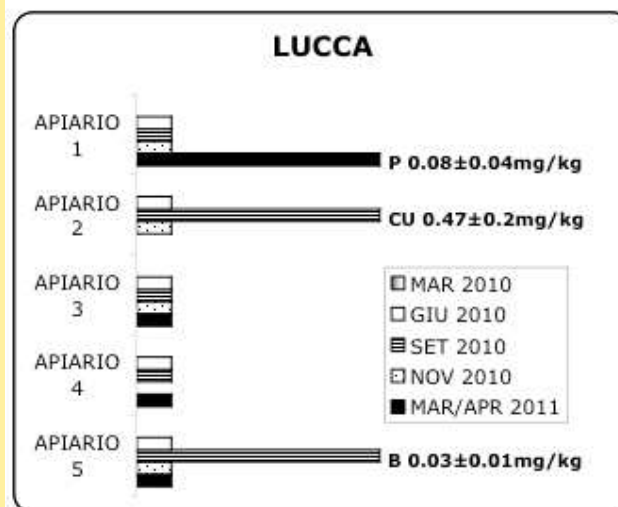
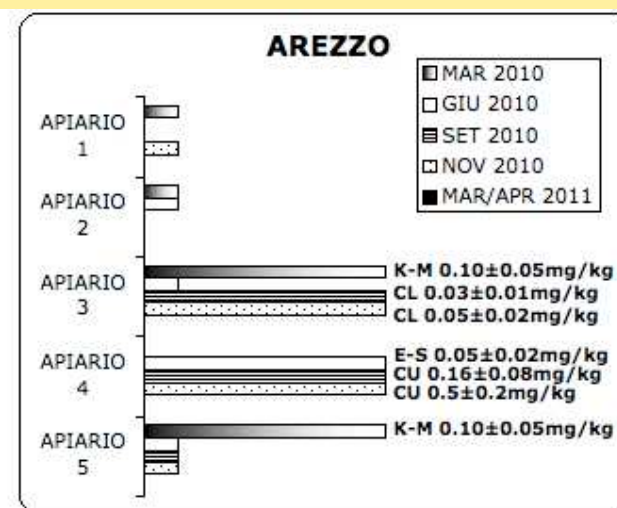
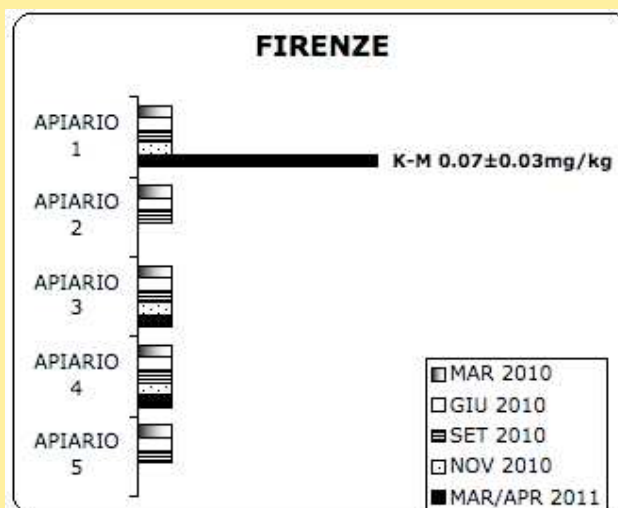


RISULTATI SPERIMENTALI PROGETTO APENET

**ANALISI SU
CAMPIONI DI
CERA DI DIVERSI
APIARI:
70 CAMPIONI
ANALIZZATI**

LEGENDA

B = bifentrina
CL = clorfenvinfos
CU = cumafos
E-S = endosulfan-solfato
K-M = kresoxim-metile
P = procimidone



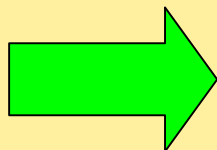
Corso di aggiornamento
“Riconoscere e gestire le patologie delle api nel rispetto della sicurezza dei prodotti dell’alveare”
Roma 9-16 X 2013 - Firenze 11-14 X 2013



RISULTATI SPERIMENTALI PROGETTO APENET

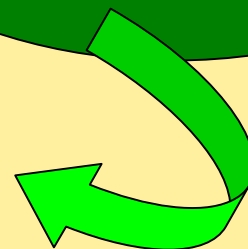
ANALISI CERA FUSA E FOGLI CEREI

**39 CAMPIONI
ANALIZZATI**



**RILEVATO
CLORTALONIL IN 3
CAMPIONI DELLO
STESSO LOTTO DI
FOGLI CEREI**

**POSSIBILE
CONTAMINAZIONE
DELL'APIARIO**



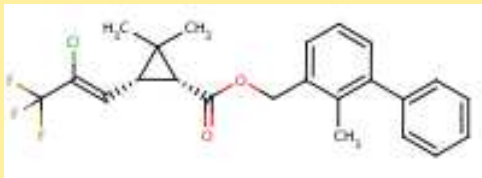


TOSSICITA' NELLE API **CONTAMINANTI RILEVATI**

LD50 is the lethal dose. This is an AMOUNT of poison that will kill 50% of people exposed to it.

LC50 is the lethal concentration. This is the AMOUNT PER UNIT WEIGHT of poison that will kill 50% of people exposed to it.

**BIFENTRINA
CUMAFOS
CLORFENVINFOS
CLORTALONIL
ENDOSULFAN-SOLFATO
KRESOXIM-METILE
PROCIMIDONE**



BIFENTHRINA

TOXNET – <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~0cDMKI:1>

/OTHER TERRESTRIAL SPECIES/ Based on available data, **bifenthrin** has been classified as slightly toxic on an acute basis to terrestrial-phase amphibians and reptiles. ... **Bifenthrin** is highly toxic to terrestrial invertebrates, including beneficial insects such as honeybees. [USEPA; Bifenthrin Summary Document Registration Review: Initial Docket. Docket No. EPA-HQ-OPP-2010-0384 (June 2010) www.regulations.gov]

/OTHER TERRESTRIAL SPECIES/ ...Effects of two pesticides at sublethal concentrations on fecundity, growth, and development of honeybees were examined with the feeding method for a three-year period (2006-2008). It was shown that both **bifenthrin** and deltamethrin significantly reduced bee fecundity, decreased the rate at which bees develop to adulthood, and increased their immature periods. The toxicity of **bifenthrin** and deltamethrin on workers of *Apis mellifera ligustica* was also assessed, and the results from the present study showed that the median lethal effects of **bifenthrin** and deltamethrin were 16.7 and 62.8 mg/L, respectively. [Dai PL et al; Environ Toxicol Chem 29 (3): 644-9 (2010)]

LD50; Species: *Apis mellifera* (Honey bee, worker) topical, general 0.0146 ug/bee
[USEPA/OPP, EFED; Pesticide Ecotoxicity Database (2000) as cited in the ECOTOX database. Available from, as of September 27, 2010: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>]

WHO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PUBLIC HEALTH PESTICIDES –

http://www.who.int/whopes/quality/Bifenthrin_WHO_specs_eval_Sep_2010.pdf

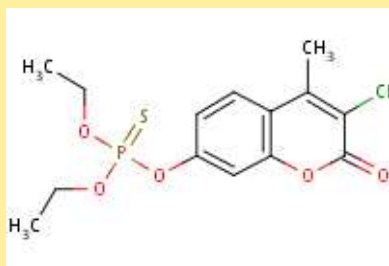
Ecotoxicology profile of technical bifenthrin

SPECIES: *Apis mellifera* (honey bee)

TEST: Acute contact & oral toxicity

DURATION AND CONDITIONS: Acute contact toxicity: sprayed 20 mL solution containing bifenthrin at 50 ppm on a lot of caged bees. Two lots were tested for the product and two lots served as control. Mortality was noted after 24 hrs. Acute oral toxicity: ingestion was tested by nourishment of lots of bees by means of a micropipette at a constant volume (20µL). The bees were presented a drop of sweet water containing fixed quantities of bifenthrin. One hr after treatment the bees received honey and pure water. Three doses (0.04 µg, 0.1 µg and 0.4 µg) and one control have been tested and mortality was noted after 24hrs.

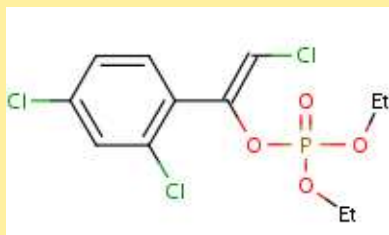
RESULTS: Acute contact toxicity: 100% mortality. Acute oral toxicity: LD50(24hrs)-0.1 µg/bee.



CUMAFOS

EXTOXNET – <http://extoxnet.orst.edu/pips/coumapho.htm>

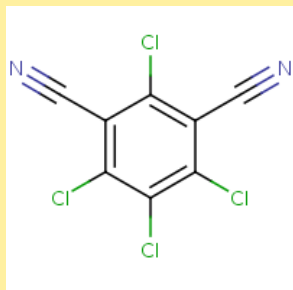
Coumaphos poses a moderate hazard to honeybees and a slight hazard to other beneficial insects



CLORFENVINFOS

Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses - Journal of Apicultural Research 48(1): 243-250 (2010)

“Stevenson (1978) tested the oral and contact toxicity of chlorfenvinphos to worker honey bees. The oral and contact LD50 values were 0.55 and 4.1 µg/bee classifying chlorfenvinphos as highly and moderately toxic, respectively.” [STEVENSON, J H (1978) The acute toxicity of unformulated pesticides to worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Plant Pathology 27:38-40.]



CLORTALONIL

TOXNET – <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~xgcbEt:1>

LD50 Apis mellifera (Honey bee, adult) topical 181.29 ug/bee

[USEPA, Office of Pesticide Programs; Pesticide Ecotoxicity Database (2000) on 2,4,5,6-Tetrachloro-1,3-benzenedicarbonitrile (1897-45-6). Available from, as of January 23, 2006:

http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm

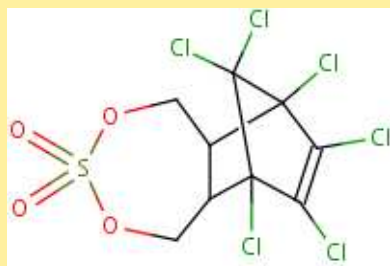
EXTOXNET – <http://extoxnet.orst.edu/pips/chloroth.htm>

Effects on other organisms: The compound is nontoxic to bees [Kidd, H. and James, D. R., Eds. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991 (as updated).6-10]

MSDS CHLOROTHALONIL The Active Ingredient in **BRAVO®** – SYNGENTA

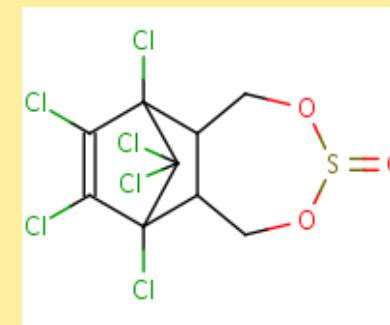
http://www.syngentacropprotection.com/Env_Stewardship/futuretopics/Bravo%20July17.pdf

Ecotoxicological Profile : Bees and other non-target arthropods: Non-toxic to bees. LD⁵⁰ > 133 µg ai/bee. Harmless to non-target arthropods



← **ENDOSULFAN-SOLFATO**

ENDOSULFAN



TOXNET – <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6180>

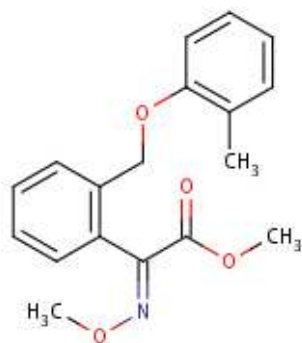
Metabolism of topical endosulfan in the Indian honey bee, *Apis cerana indica* was studied. The two endosulfan isomers were found to be inconvertible in bees. The products were endosulfan sulfate, diol, ether, hydroxyether, and lactone and two unknown compounds. Endosulfan diol, hydroxyether and lactone were found to be conjugated in the excreta of the treated bees.

[Nath A et al; Experientia 14 (11): 1411-12 (1985)] **PEER REVIEWED**

EXTOXNET – <http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm>

Breakdown in vegetation: In plants, endosulfan is rapidly broken down to the corresponding sulfate.

Ecological Effects: Effects on other organisms: It is moderately toxic to bees and is relatively nontoxic to beneficial insects such as parasitic wasps, lady bird beetles, and some mites.



KRESOXIM-METILE

European Commission Directorate General for Agriculture
Review report for the active substance kresoxim-methyl
Finalised in the Standing Committee on Plant Health at its meeting on 16 October 1998 in view of the inclusion of kresoxim-methyl in Annex I of Directive 91/414/EEC.

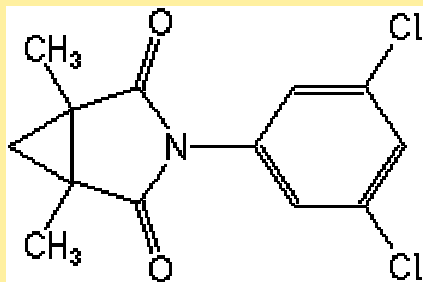
http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list2-02_en.pdf

ECOTOXICOLOGY: HONEYBEES - Acute oral toxicity: LD⁵⁰ = 14 µg as/bee Acute contact toxicity: LC⁵⁰ > 20 µg as/bee

MINISTRY OF AGRICULTURE – BRITISH COLUMBIA – CANADA

<http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides/infosheets/kresoxim.pdf>

Bees (contact)(acute) LD50 >25 g/bee Relatively non toxic



PROCIMIDONE

FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PLANT PROTECTION PRODUCTS: PROCYMIDONE

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/procymid.pdf

Ecotoxicology profile of the technical material:

SPECIES: Apis mellifera (honey bee)

TEST: acute oral toxicity

DURATION AND CONDITION: 48 hours, Working document No.13 of the UK Pesticide Safety

Precautions scheme

RESULT: LD₅₀ >100 µg/bee NOEC 100 µg/bee - No Observed Effect Concentration (NOEC)

Presenza di pesticidi in apiari: valori massimi trovati in campioni di cera, polline api e miele*

PESTICIDA	CERA (Toscana) Valor medio (µg/kg)	CERA (µg/kg)	POLLINE (µg/kg)	API (µg/kg)	MIELE (µg/kg)
Bifentrina	30	56	13	12	3
Cumafos	400	94131	5828	2777	2020
Clorfenvinfos	40	7620	11	-	0.2
Clortalonil	50	53700	98900	878	10
Endosulfan	50	800	2224	4440	24
Procimidone	80	28	-	-	-

** Johnson R. M., K., " Pesticides and honey bee toxicity- USA" Apidologie (2010) 41, 312-331*