



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# «RESIDUI DI PRODOTTI FITOSANITARI NELLA CERA»

Dr Claudia Focardi Sezione di Firenze

Montefiascone, 17 novembre 2018





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## CERA D'API



La cera d'api (*Apis mellifera* L.) è l'elemento portante nell'architettura dell'alveare.

E' il materiale di costruzione che viene prodotto dalle api giovani e che quindi serve a costruire i favi dove si svolgono tutte le attività che permettono alle api di sopravvivere: deposizione uova, immagazzinamento miele e polline

Il nettare che le api prendono dai fiori è ricco di carboidrati che utilizzano anche per la formazione della cera.





La cera d'api è costituita da una miscela complessa di composti lipofilici di cui circa 80% sono idrocarburi e lipidi

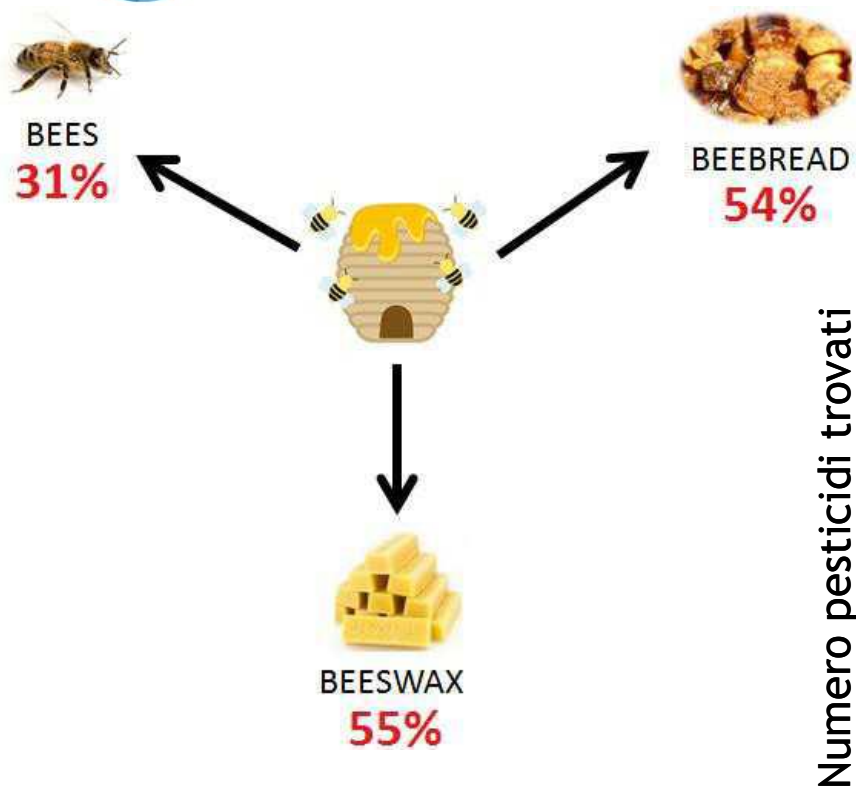
<i>Componenti</i>	<i>Quantita</i>
Esteri di acidi grassi	~ 67 %
Idrocarburi	~ 14 %
Acidi liberi	~ 12 %
Alcoli	~ 1 %
Altri componenti	~ 6 %





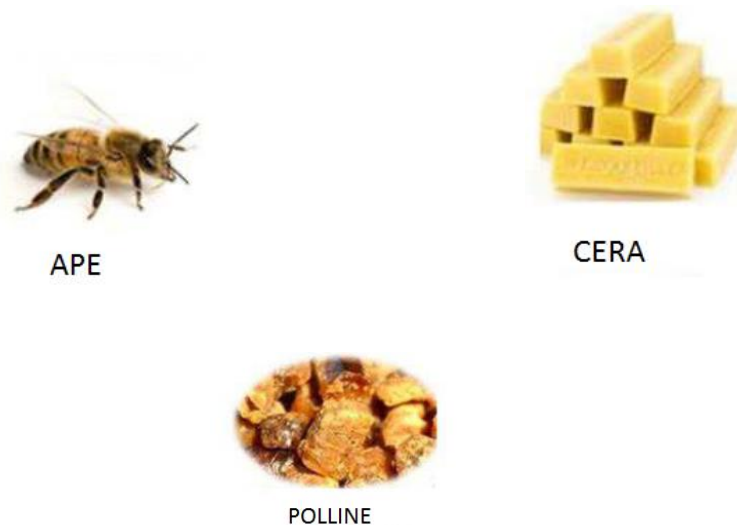
Di tutti i prodotti dell'alveare, la cera è quella che permane di più nell'alveare. Per questo è una delle matrici più fortemente contaminate, che può essere usata come bioindicatore dell'inquinamento ambientale. Soprattutto per le molecole lipofiliche, a lei più affini.





La maggior parte dei prodotti chimici usati in agricoltura ed in apicoltura sono lipofilici, non volatili e persistenti nell'ambiente anche molto tempo dopo che il trattamento è concluso .

Numero pesticidi trovati



I pesticidi erano rinvenuti in quantità più elevata, sia come concentrazione che come numero, nella cera rispetto ad altre matrici (es. api e polline)

\*Claire JABOT et al. XXXXIII International Apicultural Congress – APIMONDIA 2013 - KYIV





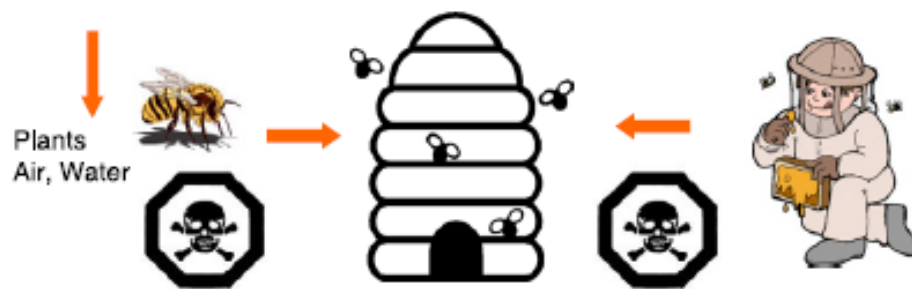
## Sorgenti di contaminazione

### Environment

- Pesticides
- Heavy metals
- Bacteria
- GMO
- Radioactivity

### Beekeeping

- Acaricides for Varroa control
- Antibiotics against AFB, EFB
- Pesticides for wax moth control
- Pesticides against SHB
- Bee repellents at honey harvest



GMO Gene modified organisms; AFB: peste americana (*Paenibacillus larvae*); EFB: peste europea (*Melissococcus plutonius*), SHB: small hive beetle (*Aethina tumida* ).





In Europa l' **EMA**

(European Medicines Agency)

è l'agenzia comunitaria

per la valutazione

dei farmaci e fornisce la

lista delle sostanze attive

e dei prodotti commerciali

autorizzati nei vari stati membri

### Beekeeping

- Acaricides for Varroa control
- Antibiotics against AFB, EFB
- Pesticides for wax moth control
- Pesticides against SHB
- Bee repellents at honey harvest





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Varroicidi maggiormente utilizzati

Proprietà chimico fisiche	Pesticidi		
	Volatile o instabile	Non Volatile	®
<b>Liposolubili</b>		Acrinatrina	<u>Gabon</u>
(fat/wax soluble)	Thymol	Bromopropylate	Folbex
		Coumaphos	Asuntol/Checkmite
		<del>Chlorfenvinphos</del>	<u>Birlane</u>
		Fluvalinate	Apistan
		Flumethrine	Bayvarol
	Amitraz		ApiVar/Apitraz
<b>Idrosolubili</b>	Acido formico*	Acido Lattico*	
		Acido Ossalico*	
		Cymiazolo	Apitol

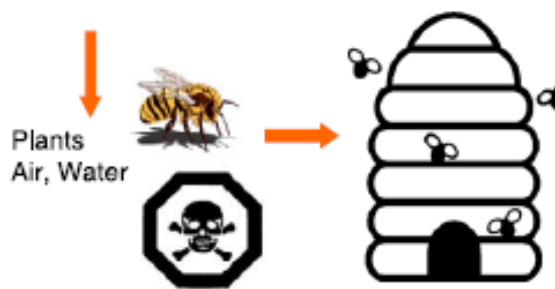
Wallner, Apidologie 1999, 30, 235–248.





### Environment

- Pesticides
- Heavy metals
- Bacteria
- GMO
- Radioactivity



REG UE 1107/2009 e s.m  
relativo all'immissione sul mercato  
dei prodotti fitosanitari

### Par 3.8 Ecotossicologia"

Una sostanza attiva, un antidoto agronomico o  
un synergizzante sono approvati soltanto se, .....

L'impiego dei prodotti fitosanitari  
contenenti la sostanza attiva, l'antidoto agronomico o i  
I synergizzante in questione:

- comporta un'esposizione trascurabile per le api,
- non ha alcun effetto inaccettabile acuto o cronico  
per la sopravvivenza e lo sviluppo della colonia,  
tenendo conto degli effetti sulle larve di api e  
sul comportamento delle api.

Molta cera viene importata, in quanto non siamo autosufficienti.

Spesso viene usata per l'alveare cera commerciale proveniente da paesi terzi che purtroppo  
spesso non possiedono regolamenti stringenti in materia di prodotti fitosanitari





La cera viene riciclata, dopo essere stata usata viene recuperata mediante rifusione e sterilizzazione

*Temperatura di  
fusione  $T = 62-64^{\circ}\text{C}$*

*Cera grezza*



*Fusione*



*Sterilizzazione*



*Produzione fogli  
cerei*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

CERA D'API

## Riciclaggio della cera



*Due punti critici nel processo:*

- *Omogeneità della campione ottenuto*
- *Fenomeno del «carry over»*

Purtroppo la concentrazione di pesticida eventualmente presente non diminuisce durante un regolare processo di riciclaggio per ottenere una nuova cera combinazione di vecchie cere. Al contrario, il riciclaggio, nel tempo comporta un aumento della loro concentrazione nella cera. \*

\*Uludag Bee Journal May 2011, 11 (2): 47-50





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

CERA D'API



I consumatori possono essere esposti ai residui presenti nella cera attraverso il consumo diretto della cera tramite “comb honey” o “chunk honey” oppure attraverso l’additivo E901.

E901: agente di rivestimento

Usato nel trattamento superficiale di frutta (es. agrumi, pere, mele, pesche, mango, avocado e ananas), mantenendola lucida, rallentandone la disidratazione, ossidazione ed eventuale penetrazione di muffe







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CERA D'API

## Aspetti Normativi



Per la cera convenzionale non esiste ancora a livello europeo una normativa riguardante i limiti di residui di prodotti fitosanitari o di farmaci veterinari

## Documento Accredia RT 16 rev.4

**Prescrizioni per l'accreditamento degli Organismi che rilasciano dichiarazioni di conformità di processi e prodotti agricoli e derrate alimentari biologici ai sensi del Regolamento CE n. 834/2007 e sue successive integrazioni e modifiche**



## Allegato II- linee guida per la valutazione analitica dei prodotti biologici.

### Limiti di acaricidi e antibiotici in apicoltura

#### 4.2 LIMITI

L'uso degli **antibiotici** in apicoltura non è consentito, pertanto gli stessi devono risultare non rilevabili<sup>12</sup> nei prodotti dell'alveare.

Il metodo di produzione di apicoltura biologica, non prevede l'utilizzo di **acaricidi**; tuttavia, data l'elevata persistenza degli acaricidi nella cera, occorre definire una quantità massima di residui. La persistenza degli acaricidi nella cera è stata oggetto di studio da parte di un gruppo di lavoro coordinato dall'Istituto Nazionale di Apicoltura di Bologna, che ha portato alla definizione dei limiti temporanei riportati in tabella.

PRODOTTI	Quantità di Residui di acaricidi [mg/kg]
Miele, Propoli e Pappa reale	$\leq 0,010$
Cera <sup>13</sup>	Somma dei residui totali dei 5 principi attivi <sup>14</sup> (coumaphos, fluvalinate, Clorfenvinphos, cimiazolo, amitraz): $\leq 0,30$ , con le seguenti limitazioni: Coumaphos: $\leq 0,20$ Fluvalinate: $\leq 0,10$ Clorfenvinphos $\leq 0,010$

<sup>11</sup> Residui inferiori al limite di rilevabilità del metodo analitico;

<sup>12</sup> Residui inferiori al limite di rilevabilità del metodo analitico.

<sup>13</sup> Tutta la cera (da nido e da melario) deve risultare conforme ai limiti critici su definiti.





## Preparazione

### Omogeneizzazione

- ✓ Congelamento del campione  
(T = -20°C—80°C)
- ✓ Macinazione con mulino a coltelli anche in presenza di ghiaccio secco

### Estrazione

- ✓ Etanolo
- ✓ Acetone Esano 1:1
- ✓ Acetonitrile
- ✓ ed altri....

### Purificazione

- ✓ Colonne SPE (C18- Florisil)
- ✓ QuEChERS

## Separazione Analisi

### Analisi Cromatografica

- ✓ GC MS
- ✓ GC MS/MS
- ✓ LC MS/MS





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## CERA D'API

### RISULTATI



Classe	Analita	Incidenza (%)
Organofosforato	Cumafos	46,7
Piretroide	Tau Fluvalinate	52,2
Piretroide	Cipermetrina	21,9
Organoclorurato	Endosulfan	23,4
Organofosforato	Clorpirifos	7,3
piretroide	Ciflutrina	12,2

**Francia** <sup>(a)</sup>: 93 campioni analizzati tra il  
2002-2007

In 44 si riscontra la presenza di uno o più  
principi attivi

(a) Chauzat, Faucon, Pest Manag Sci 2007 63:1100–1106

**Germania** <sup>(b)</sup>: 226 campioni analizzati  
nel 1997

Classe	Analita	Incidenza (%)
Organofosforato	Cumafos	61
Piretroide	Tau Fluvalinate	37
Piretroide	Bromopropilato	55

(b) Wallner, Apidologie 1999, 30, 235–248.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CERA D'API

## RISULTATI



Classe	Analita	Incidenza (%)
Organofosforato	Cumafos	35
Piretroide	Tau Fluvalinate	40
Piretroide	Bromopropilato	25
Organoclorurato	Boscalid	22
Organofosforato	Delta HCH	tracce

**Belgio** <sup>(c)</sup>: ~110 campioni analizzati tra il 2011-2012

In~ 50% si riscontra la presenza di uno o più principi attivi

(c) Wilmart et al, J Agric Food Chem 2016 A-J

**Svizzera** <sup>(d)</sup>: 226 campioni analizzati tra il 1991-2002

Classe	Analita
Organofosforato	Cumafos
Piretroide	Tau Fluvalinate
Benzilato	Bromopropilato

(d) S. Bogdanov Apidologie 37 (2006) 1–18





**Spagna : 35 campioni analizzati nel 2016**

Classe	Analita	Incidenza (%)
Organofosforato	Cumafos	95
Piretroide	Tau Fluvalinate	86
Amminide	Amitraz	83
Piretroide	Flumetrina	77
Piretroide	Acrinatrina	71
Organofosforato	Clorfenvinfos	51
Organofosforato	Clorpirofos	40
Organofosforato	Diclofention	29
Organofosforato	Malation	9
Organofosforato	Fention -sulfossido	6
	Azinfos metile, Carbendazim Etion Imazalil Exytiazox, piriproxifen	3





## Cera Uruguaiana

**Table 2**

Number of positive samples of xenobiotics found in recycled beeswax (RB) and honey cappings (HC), as well as the results of Fisher's tests.

Xenobiotic	Beeswax	Number of positive samples	Specific frequency (%)
Atrazine	RB	16	100
	HC	12	100
Azoxystrobin	RB	10	63
	HC	5	42
Chlorpyrifos-ethyl	RB	12	75
	HC	3	25
Coumaphos	RB	16	100
	HC	11	92
Ethion	RB	2	13
	HC	3	25
Tau-fluvalinate	RB	1	6
	HC	1	8
Tebuconazole	RB	16	100
	HC	8	67
Thiacloprid	RB	2	13
	HC	1	8





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

In Italia...

CERA D'API



1319 campioni di cera  
analizzati nel periodo 2005-  
2014  
Per residui di Acaricidi

**Table 4.** Proportion of samples positive to at least one active ingredient

Year	Positive samples (%)	Number of total samples
2005	69	217
2006	70	217
2007	55	186
2008	56	162
2009	32	59
2010	47	139
2011	54	97
2012	37	87
2013	56	50
2014	91	105
Total	64	1319

Classe	Analita	Incidenza (%)
Organofosforato	Cumafos	49
Piretroide	Tau Fluvalinate	38
Organofosforato	Clorfenviifos	25
Formamidine	Amitraz	6
	Cimiazolo	2

Boi et, al Pest Manag Sci 2016; 72: 1366–1372





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# CERA D'API

## In Italia...



campioni di cera analizzati nel periodo 2013-2015  
Per residui di prodotti fitosanitari

178 campioni analizzati

73,6% presenza di uno o più principi  
attivi di quelli analizzati (248 in totale)

Classe	Analita	Incidenza (%)
Organofosforato	Cumafos	60,7
Piretroide	Tau Fluvalinate	50
Formamidine	Amitraz	15,2
	Cimiazolo	0,6
Organofosforato	Clorfenviifos	35,4
(sinergizzante)	Piperonil butossido	20,8
isoflavonr	Rotenone	13,5
Organoclorurato	p-p DDT	9
piretroide	Flumetrina	4,5
aloidrocarburi-benzilato	Bromopropilato	3,4
Piretroide	Acrinatrina	2,8

Perugini et, al Sci of Tot Env 2018; 625: 470–476





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CERA D'API



# 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 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”





## 70 CAMPIONI DI CERA

Pesticida		Numero di campioni positivi	Frequenza (%)	Intervallo di concentrazione (mg/kg)		Concentrazione media (mg/Kg)
				Minima	Massima	
Kresoxim metile	Autorizzato	7	10	0.07	2	0.82
Clorfenvinfos*	Non autorizzato	3	5	0.03	0.07	0.05
Endosulfan solfato	Non autorizzato	1	1.5			0.05
Cumafos*	Autorizzato	3	5	0.16	0.5	0.37
Bifentrina	Autorizzato	1	1.5			0.03
Procimidone	Autorizzato	1	1.5			0.08

\*usati come acaricida nella lotta alla varroa



## 70 CAMPIONI DI CERA

### LEGENDA

B = bifentrina

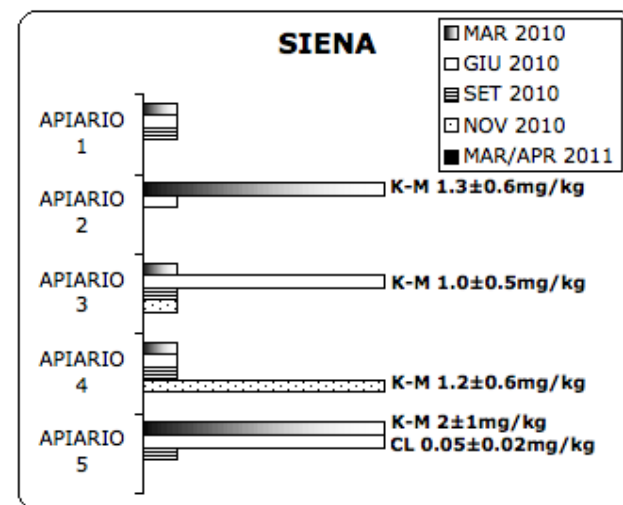
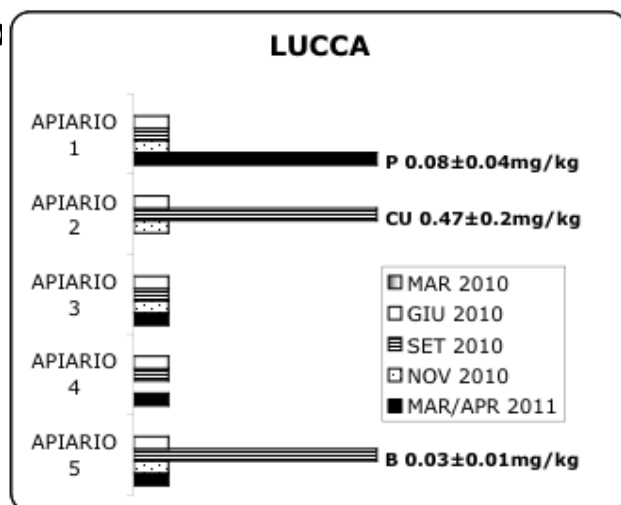
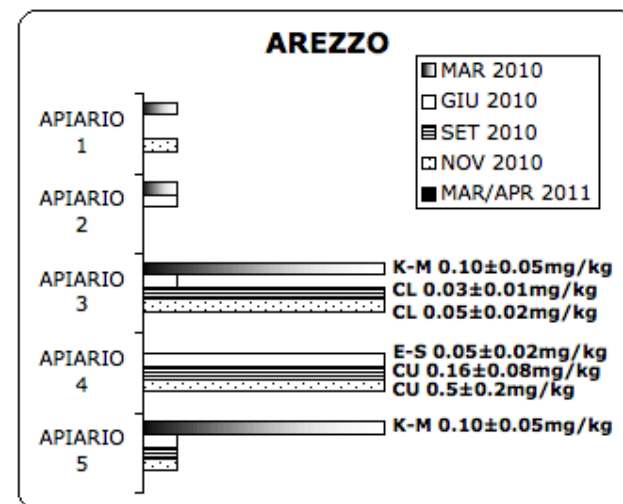
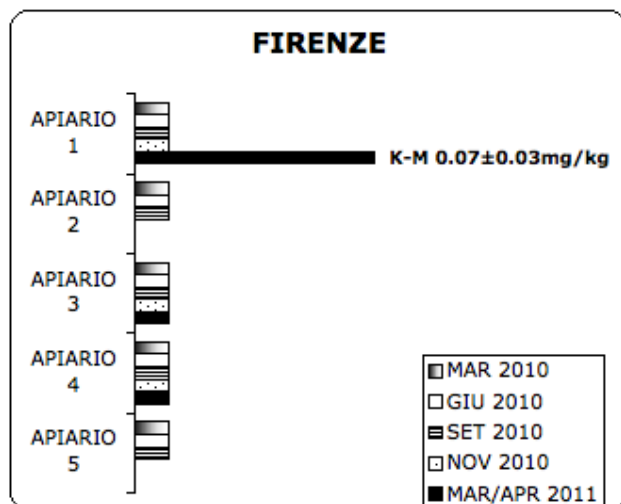
CL = clorfenvinfos

CU = cumafos

E-S = endosulfan-solfato

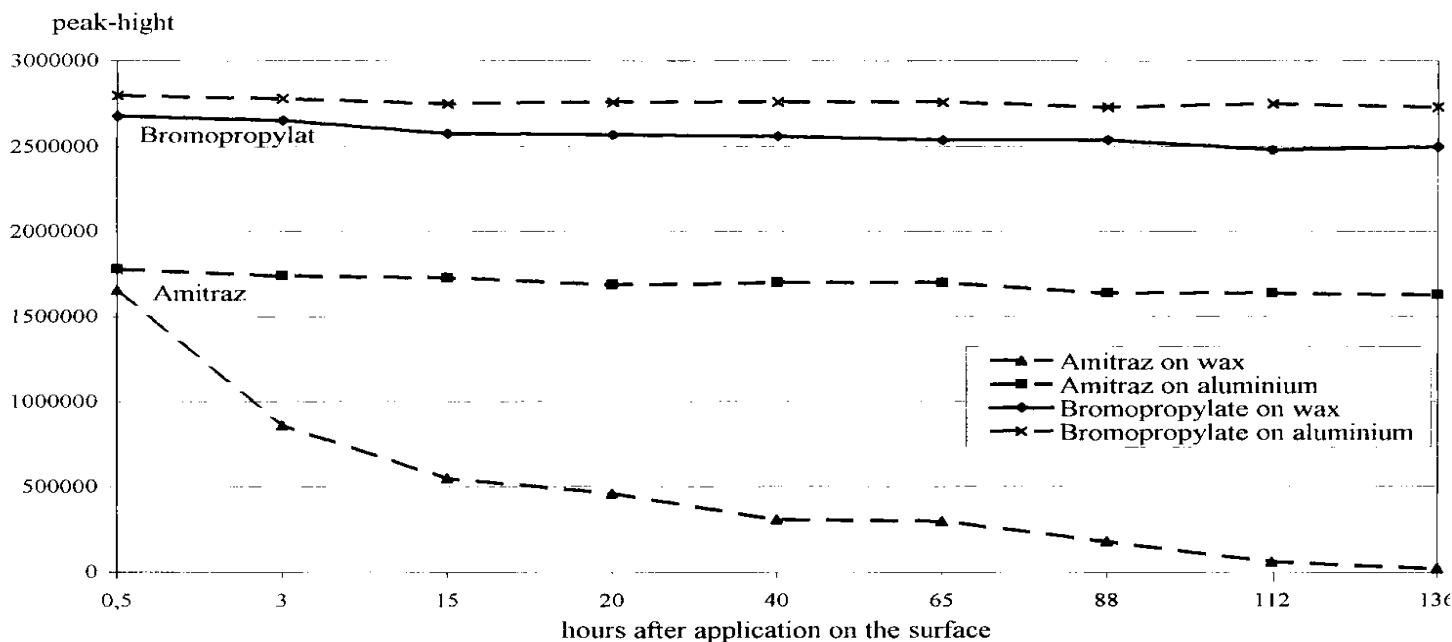
K-M = kresoxim-metile

P = procimidone





La maggior parte delle sostanze usate come acaricidi in apicoltura si ritrovano come residui nella cera ad eccezione dell'AMITRAZ



**Figure 1.** Stability of amitraz and bromopropylate on aluminium foil and on beeswax.



## Considerazioni.....



Residui di **Coumafos** sono quelli con maggior incidenza nella cera

Questo può essere dovuto a diversi fattori fra cui

- Uso di fogli cerei contaminati
- Uso di cera riciclata già contenente residui di cumafos (il cumafos non si degrada per trattamenti a caldo)
- Trattamento frequente con cumafos
- Uso di cumafos per il trattamento di altre specie in prossimità di un alveare.

Dai dati di letteratura\* emerge che il cumafos non rappresenta un pericolo per il miele finché la concentrazione che è presente nella cera non raggiunge un valore critico di migrazione ancora esattamente da definire (min 1000 ppm)

\*Bajuk et al, Apidologie 2017, 48, 588–598.

Calatayud- vernich et al, Sci tot Env 2017 605/606, 745-754





## Considerazioni.....



Il tau-**Fluvalinate** viene riscontrato con alta frequenza nella cera di varie origini

REG UE 396/2005 fissa un MRL di 0,05 mg/kg nel miele e altri prodotti dell'apicoltura

E' un prodotto tossico per l'uomo (ADI 0,0005mg/kg Bw/day)

Grazie alla sua natura lipofilica L'agenzia EMA indica che il trasferimento di residui di fluvalinate dalla cera al miele sia trascurabile





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CERA D'API

Considerazioni.....



Si riscontrano residui di **Clorfenvinfos**, e talvolta anche di **acrinatrina** nelle cera

Le autorizzazioni alla commercializzazione dei prodotti aventi come principio attivo il clorfenvinfos sono state ritirate alla fine del 2003 (Reg. (CE) 2076/2002).

Il Reg UE 1164/2017 fissa dei nuovi limiti per l'acrinatrina come prodotto fitosanitario

L'uso di alcuni prodotti che contengono clorfenvinfos o acrinatrina nella lotta alla varroasi è quindi in contrasto con la legislazione nazionale e comunitaria

Non esistono farmaci registrati per l'apicoltura a base di questi principi attivi e quindi il loro utilizzo risulta del tutto illecito



# CONCLUSIONI

residue	substance authorized in the EU		MRL in honey		MRL or proposed action limit for honey and beeswax ( $\mu\text{g/kg}$ )
	in beekeeping <sup>b</sup>	as a plant protection product <sup>c</sup>	due to veterinary use <sup>d</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	due to plant protection product use <sup>e</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	
acetamiprid	no	yes		50 (= LLAD)	50
acrinathrin	no	yes		50 (= LLAD)	50
amitraz	yes	no	200	10 (= default MRL)	200
carbofuran	no	no		50 (= LLAD)	50
chlorfenvinphos	no	no		10 (= LLAD)	10
chlorpyrifos	no	yes		50 (= LLAD)	50
coumaphos	yes	no	100	10 (= default MRL)	100
cymiazole	no	no, because not listed <sup>f</sup>			lowest possible LOQ
cypermethrin	no	yes		50 (= LLAD)	50
DDT (sum of isomers)	no	no		50	50
deltamethrin	no	yes		30 (= LLAD)	30
dimethoate	no	yes		10 (= default MRL)	10
flumethrin	yes	no, because not listed <sup>f</sup>	no MRL required <sup>g</sup>		lowest possible LOQ <sup>h</sup>
$\tau$ -fluvalinate	yes	yes	no MRL required	50 (= LLAD)	50
hexachlorobenzene (HCB)	no	no		10 (= default MRL)	10
iodofenphos	no	no		10 (= default MRL)	10
mevinphos	no	no		10 (= default MRL)	10
parathion	no	no		10 (= default MRL)	10
permethrin (sum of isomers)	no	no		10 (= default MRL)	10
pirimicarb	no	yes		50 (= LLAD)	50
thiamethoxam	no	yes		50 (= LLAD)	50
thymol	yes	yes	no MRL required	no MRL required	na <sup>ii</sup>

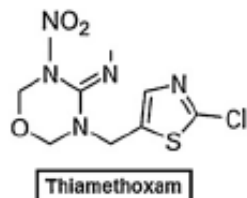
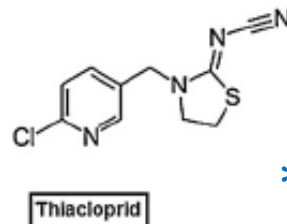
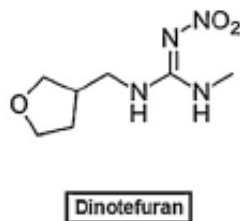
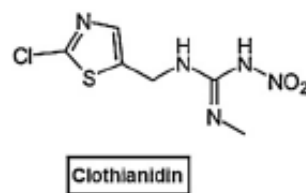
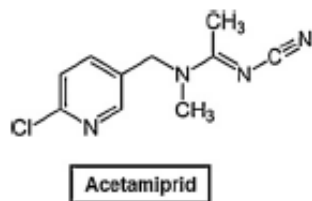
(c) Wilmart et al, J Agric Food Chem 2016 A-J





## NEONICOTINOIDI

acetamiprid, clothianidin\*, dinotefuran, imidacloprid\*,  
nitenpyram, thiacloprid and thiamethoxam\*



\*EFSA ha approvato il  
bando permanente  
all'utilizzo all'aperto.  
possono essere usati solo  
in serra, senza contatto  
con le api





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

CERA D'API



## NEONICOTINOIDI NELLA CERA

K.P. Yáñez et al. / J. Chromatogr. A 1285 (2013) 110– 117

Valverde et al Microchemical Journal 142 (2018) 70–77

L'analisi su campioni di cera provenienti da  
differenti apiari, anche vicini a frutteti non ha  
rilevato la presenza di residui di neonicotinoidi (solo  
in due casi è stato trovato imidaclopride sopra il  
LOQ)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Grazie dell'attenzione

