



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

**FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE**

TESI DI LAUREA IN CHIMICA

**CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DI API DA INSETTICIDI
NEONICOTINOIDI. APPRONTAMENTO DI UNA METODOLOGIA
ANALITICA PER LA SUA VALUTAZIONE SU SINGOLO INSETTO**

RELATORE: Prof. Daniele Marton

CORRELATORE: Prof. Vincenzo Girolami

CONTRORELATORE: Prof. Maurizio Vidali

**LAUREANDO: Alessandro Zanella
N° MATRICOLA: 550452-CH**

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

PREMESSA	I
1 INTRODUZIONE	1
1.1 Api: Utilità e problematiche per la loro sopravvivenza	1
1.1.1 Utilità e valore economico associato	1
1.1.2 Colony Collapse Disorder (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari (SSA)	2
1.2 Neonicotinoidi e pesticidi	6
1.2.1 Cenni storici sui pesticidi e sui neonicotinoidi	6
1.2.2 Sintesi dei neonicotinoidi	7
1.2.3 Caratteristiche generali dei neonicotinoidi e degli altri principi attivi insetticidi	8
1.2.4 Modalità d'azione ed effetti sulle api	10
1.2.4.1 Modalità d'azione dei principi attivi neonicotinoidi	10
1.2.4.2 Effetti sulle api	12
1.3 Legislazioni riguardanti i neonicotinoidi e altri insetticidi	14
1.4 Dispersione nell'ambiente dei p.a. insetticidi	17
1.4.1 Dove si usano e valore economico	17
1.4.2 La concia delle sementi	18
1.4.3 Destino ambientale	18
1.4.3.1 Semina e polveri	18
1.4.3.2 La guttazione fogliare e la distribuzione nelle piante	21
1.4.3.3 Persistenza, degradazione e destino ambientale	22
1.5 Metodi di estrazione ed analisi in letteratura	25
1.5.1 Metodi di estrazione dei neonicotinoidi dalle api	25
1.5.2 Metodi di analisi dei principi attivi neonicotinoidi	27
2 MATERIALI E METODI	31
2.1 Materiali	31
2.2 Procedure Sperimentali	34
2.2.1 Preparazione di soluzioni standard ad elevata concentrazione dei diversi p.a.	34
2.2.2 Preparazione di soluzioni standard per la calibrazione strumentale	34

2.2.3	Analisi del contenuto di p.a. in diverse matrici ambientali mediante HPLC	35
2.2.4	Preparazione di diverse matrici all'analisi dei p.a. insetticidi	36
2.2.5	Verifica qualitativa della metodica di preparazione da campioni di 20 api (Paragrafo 2.2.4 - f)	38
2.2.6	Campionamento del particolato durante simulazioni di semina di mais conciato	39
3	OTTIMIZZAZIONE DEI METODI	43
3.1	Ottimizzazione del metodo cromatografico	43
3.2	Ottimizzazione del metodo estrattivo dei principi attivi dalle api	46
3.2.1	Valutazione del trattamento termico delle api sul processo estrattivo	46
3.2.2	Valutazione della capacità estrattiva di alcuni solventi	48
3.2.3	Valutazione dell'efficacia di tre diversi trattamenti sull'ape prima del processo estrattivo con tre diversi solventi	51
3.2.4	Valutazione della centrifugazione per la purificazione degli estratti da ape	54
3.3	Validazione del metodo	56
3.3.1	Verifica della linearità della risposta strumentale e funzioni di calibrazione	56
3.3.2	Limiti di rivelabilità	58
3.3.3	Precisione del metodo su campioni reali	60
3.3.4	Valutazione del parametro recupero sull'intero metodo estrattivo ottimizzato	61
4	APPLICAZIONI, RISULTATI E DISCUSSIONE	65
4.1	Applicazione del metodo a sementi e polveri di concia	65
4.1.1	Determinazione del contenuto nei sei p.a. sulle sementi	65
4.1.2	Determinazione del contenuto nei sei p.a. sulle concie dei semi	66
4.2	Applicazione del metodo all'analisi della dispersione di p.a. insetticidi durante la semina di mais conciato	67
4.2.1	Misura della concentrazione di principio attivo in corrispondenza dello scarico dell'aspiratore centrifugo della seminatrice	68
4.2.2	Misura della concentrazione di principio attivo nelle polveri aerodisperse a 5 e 10 metri di distanza dalla seminatrice	71

4.2.3	Distribuzione dimensionale del particolato atmosferico generato dalle seminatrici	73
4.3	Applicazione del metodo all'analisi di gocce di guttazione fogliare raccolte da plantule di <i>Zea mays</i> ottenute a partire da semi concianti	77
4.4	Applicazione del metodo su api contaminate da principi attivi insetticidi	83
4.4.1	Analisi delle api campionate dopo o durante le simulazioni di semina	83
4.4.2	Test di degradazione dei principi attivi nelle e sulle api	87
5	CONCLUSIONI	93
6	BIBLIOGRAFIA	95
7	APPENDICE A	105
8	RINGRAZIAMENTI	109

PREMESSA

Le api sono degli insetti molto importanti per l'uomo. Essi infatti, oltre a produrre il miele ed altre materie prime, hanno un ruolo fondamentale nell'impollinazione dei fiori di molte piante da frutto e verdure delle quali quotidianamente ci nutriamo. Oltre alle piante ad uso "commerciale" esse impollinano anche quelle che spontaneamente nascono e crescono in natura, provvedendo così alla sopravvivenza di molti habitat naturali.

Il loro valore a livello economico è ingente sia come produttrici dirette di materie prime che, indirettamente, aumentando e migliorando la qualità e la quantità dei prodotti ortofrutticoli nella cui produzione vengono impiegate.

Per questi motivi, le anormali morie verificatesi nel mondo negli ultimi anni, in particolare fra il 2005 e il 2008, hanno creato un certo allarme e hanno spinto molti ricercatori a intraprendere vari studi per comprenderne le cause scatenanti. A questo fenomeno è stato dato il nome di Colony Collapse Disorder (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari (SSA). Questa sindrome, i cui sintomi sono ormai noti, non ha però un'unica origine e vi sono ancora moltissime e varieguate ipotesi sulle sue cause. Una delle ipotesi chiama in causa l'utilizzo in agricoltura di agrofarmaci di nuova generazione come i neonicotinoidi. Queste molecole hanno avuto un grosso successo grazie alla loro elevata selettività per gli insetti rispetto ai mammiferi a livello dei recettori neurali dell'acetilcolina. Questi principi attivi vengono comunemente utilizzati soprattutto come concianti per i semi di mais e di altre colture e vengono così dispersi nell'ambiente e nell'aria al momento della semina essendo la pellicola che li lega ai semi stessi molto delicata e facilmente disgregabile per attrito meccanico. Una seconda via di distribuzione di questi principi attivi nell'ambiente è quella dovuta alla guttazione fogliare delle giovani piante di mais. Essendo questi fitofarmaci sistemici la loro presenza è ubiquitaria nella pianta e nella linfa che, se viene espulsa come durante il fenomeno guttativo, può rendersi disponibile come fonte di acqua contaminata per organismi non target.

Una volta assunte queste sostanze tramite le polveri o le acque di guttazione le api subiscono, oltre a dei danni a livello neuronale e intestinale, delle modificazioni comportamentali. Esse infatti non riescono più a riconoscere le fonti di cibo, perdono l'orientamento e, se ne assumono quantità sufficienti, dopo una fase di iperattività motoria muoiono paralizzate.

Questo lavoro di tesi, effettuato in collaborazione con il Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova, ha avuto quindi come obiettivo

primario, per questi principi attivi, lo sviluppo di una metodica di estrazione di relativamente semplice realizzazione per una matrice biologica complessa come le api e, a differenza di tutte le metodiche riportate in letteratura, di poter operare questa estrazione su una singola ape. Per questo motivo un ulteriore obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un metodo cromatografico in grado di avere dei limiti di rivelabilità sufficientemente bassi da consentire l'individuazione di concentrazioni inferiori a quelle degli LD₅₀ per le api esposte a questi principi attivi, cercando comunque di mantenere contenuti i tempi di analisi. I risultati ottenuti in questo ambito consentono di poter dare una valutazione della contaminazione delle api utilizzandone solo un piccolissimo numero e permettendo così di effettuare diversi tipi di test senza la necessità di spopolare interi alveari.

Contestualmente, per verificare le fonti di intossicazione per le api, si è continuato e sviluppato il lavoro iniziato in una precedente tesi concernente la determinazione della presenza di questi pesticidi all'interno delle polveri emesse dalle seminatrici durante la semina e nelle gocce di guttazione fogliare delle giovani piante di mais nate da semi concitati. Sempre in questo ambito si sono inserite le analisi sui semi e sulla loro confettatura.

Ulteriori esperimenti sono stati poi intrapresi per verificare la differente influenza di variabili come il dilavamento effettuato dalle piogge e il tipo di terreno per quanto riguarda la formazione e il contenuto di principi attivi all'interno delle guttazioni fogliari e per determinare la presenza dei principi attivi insetticidi sulle api dopo le semine e la loro possibile degradazione sulle e nelle api nel tempo e in diverse condizioni atmosferiche e di conservazione dei campioni.

1 INTRODUZIONE

1.1 Api: Utilità e problematiche per la loro sopravvivenza

1.1.1 Utilità e valore economico associato

Le api, oltre ad essere importanti per la produzione di miele, cera, propoli, polline, pappa reale, veleno e loro derivati [1], hanno un ruolo fondamentale nell'impollinazione dei fiori di molte piante da frutto. In particolare a loro è dovuta una grossa fetta della produzione di mandorle (per la quale solo in Florida vengono impiegati 1,3 milioni di colonie di api sui 2,4 milioni di colonie totali degli Stati Uniti [2, 3]), piccoli frutti, frutta ed ortaggi. Il giro d'affari a loro legato solo come impollinatrici negli USA è dell'ordine dei 15 miliardi di dollari annui [2, 4 - 6]. Se si tiene conto che il miele negli Stati Uniti ha un valore alla produzione attorno a 1,20 \$/libbra e che mediamente una colonia produce 75 libbre di miele è facile calcolare che il solo miele muove un giro d'affari di 216 milioni di dollari negli USA. Considerando poi che il prezzo per noleggiare una colonia per l'impollinazione delle mandorle è di 150 dollari o più per colonia, si devono aggiungere altri 195 milioni di dollari per la sola impollinazione delle mandorle, senza contare gli altri tipi di piante da frutto e vegetali [3].

Oltre al valore direttamente ottenuto dalla vendita del miele e di altri derivati e dal noleggio delle colonie per l'impollinazione c'è da tener conto del valore economico aggiunto generato dalla loro azione impollinatrice; nel 2000 negli USA la produzione di frutta ed ortaggi dipendeva in maniera non trascurabile e talvolta quasi totalitaria dall'utilizzo delle api [7].

Nel nostro paese il valore derivato dall'attività apistica, sia in maniera diretta che come impollinatrici, è dell'ordine di 1.600 milioni di euro l'anno, pari a 1.240 euro annui per singolo alveare [2].

Si stima che il valore economico dell'impollinazione nel mondo si attesti tra i 40 e i 100 miliardi di euro l'anno [4], mentre altre fonti azzardano valori che toccano i 215 miliardi di dollari annui [5].

Per quanto concerne il miele nel 2005 la produzione mondiale ha raggiunto un valore di 1.381.000 tonnellate [1] che, se scambiate tutte con i prezzi al produttore nord americani, genererebbero un movimento finanziario superiore a 3,5 miliardi di dollari all'anno.

Oltre al loro elevato valore economico è di fondamentale importanza sottolineare anche il loro valore ecologico. Senza le api molti frutti, semi e verdure non sarebbero più disponibili in quantità sufficienti per il consumo umano e anche molti degli habitat naturali oggi esistenti sarebbero irrimediabilmente compromessi e vi sarebbe quindi una conseguente diminuzione anche della disponibilità di cibo per gli animali selvatici [8]. Circa i tre quarti delle piante con fiore, infatti, necessitano dell'impollinazione animale e direttamente o indirettamente circa un terzo di tutto ciò che mangiamo ha a che fare con l'impollinazione delle sole api [5].

Questi dati sono suffragati da rapporti della FAO che stimano in poco più di 100 le specie di colture che provvedono al 90% della produzione totale del cibo nel mondo, 71 delle quali vengono impollinate per mezzo di api (selvatiche e non). In Europa l'84% delle 264 colture più importanti sono impollinate da animali e 4000 specie di vegetali sopravvivono solo grazie all'impollinazione effettuata dalle api [4].

La capacità impollinatrice delle api è molto elevata se si pensa che ogni singola ape visita mediamente 700 fiori al giorno e, se si tiene conto che in un alveare ci sono all'incirca 20.000 api bottinatrici, si può facilmente vedere che ogni giorno per un raggio di circa tre km dall'arnia le api di un alveare sono in grado di impollinare circa 14 milioni di fiori [9].

A differenza di quanto sosteneva Einstein (o chi per lui, visto che nella realtà tale frase non fu mai da egli pronunciata) ossia che “se un giorno le api dovessero scomparire, all'uomo resterebbero soltanto quattro anni di vita”, l'esistenza dell'uomo e delle piante non è così fortemente dipendente dalle api, visto che non tutte le piante si riproducono tramite il trasporto del polline e data l'azione impollinatrice naturalmente effettuata dal vento, da uccelli e da altri animali. Nonostante ciò questi insetti sono comunque molto importanti e va salvaguardata la loro salute e la loro permanenza nell'ambiente per garantire l'esistenza di molte altre specie vegetali che altrimenti subirebbero un progressivo ma inesorabile declino.

1.1.2 Colony Collapse Disorder (CCD) o Sindrome da Spopolamento degli Alveari (SSA)

Nell'ultimo decennio si è osservata, a livello internazionale, una diffusa e progressiva crisi nel settore dell'apicoltura dovuta ad estese morie di api che portavano sovente allo spopolamento completo dei relativi alveari. Questo fenomeno è stato per la prima volta descritto alle autorità nell'autunno del 2006 da parte di Hackenberg, un apicoltore che attraversava gli Stati Uniti con le sue arnie per l'impollinazione dei frutteti. Delle sue 3.000 colonie egli ne ritrovò ben 2.200 completamente sterminate e osservò che i sintomi di quelle sopravvissute non corrispondevano a quelli a cui era abituato, come nel caso delle infestazioni

di Varroa (un acaro). Autopsie sugli insetti deceduti mostrarono la presenza di tessuto cicatriziale negli organi interni e furono altresì trovate infestazioni di alcuni dei normali patogeni delle api come le spore di Nosema (un patogeno che causa la dissenteria) nell'intestino. Analisi più approfondite indicavano un livello molto alto di infezioni virali di vario genere, ma nessuno a livelli letali e sufficienti a causare una tale ecatombe. In pratica tutte le colonie risultavano infette ma da diverse combinazioni di malattie e patogeni [10].

Il caso del signor Hackenberg non fu però isolato. Nel corso dell'inverno 2006 - 2007 molti apicoltori degli USA segnalavano una rilevante mortalità di colonie di api con perdite comprese fra il 30 ed il 90% e tra il settembre 2006 e il marzo 2007 l'Apiary Inspectors of America (AIA) condusse un programma di sorveglianza su un gran numero di apicoltori sparsi in quindici stati americani per verificare l'entità di queste morie. La perdita delle api tra tutti gli apicoltori contattati da questa organizzazione corrispondeva mediamente a circa il 38%. Se questa perdita fosse stata rappresentativa per tutta la loro nazione avrebbe significato che nell'inverno tra il 2006 e il 2007 sarebbero state perse tra le 651.000 e le 875.000 colonie di api dei 2,4 milioni di colonie totali stimate negli USA. Sebbene la maggior parte di queste perdite fosse riconducibile a cause note, circa il 25% presentava i tipici sintomi della CCD. Dai dati raccolti si evinceva inoltre che tra tutti gli apicoltori interpellati il 50% aveva subito delle morie eccezionalmente elevate all'interno delle loro colonie e di queste il 55% era stato completamente sterminato. Comparando questi dati con quelli delle normali perdite invernali che si attestano attorno al 16% si osserva un evidente e notevole divario [7].

Episodi di morie di intere colonie si erano però già verificati negli USA anche fra il 2002 e il 2005 seppur in maniera meno diffusa. Anche in Europa furono osservate perdite di intere colonie con una sintomatologia simile a quella descritta negli Stati Uniti. Perdite estremamente elevate furono registrate nell'inverno 2002 - 2003, stimate nell'ordine del 20% in Francia, del 38% in Svezia, del 32% in Germania e del 30% circa in Italia. In tale occasione molti apicoltori persero l'intero patrimonio di api. Il fenomeno fu riscontrato per la prima volta in Francia circa 15 anni fa, dove la maggior parte delle colonie collassava nel periodo del raccolto [11]. Questa sindrome però ha assunto intensità particolarmente preoccupante fra il 2005 ed il 2008, con perdite fino al 40% del totale degli alveari produttivi in alcuni stati europei e fino al 35% del totale negli USA [12].

I sintomi più comuni che sembrano caratterizzare gli alveari colpiti da CCD sono: (i) la scomparsa improvvisa delle api adulte e presenza delle poche api rimaste nei pressi della colonia; (ii) la presenza di molti favi con covata integra e opercolata con bassi livelli di infestazione di Varroa; (iii) la presenza di abbondanti scorte di cibo non oggetto di saccheggio

da parte di colonie sane vicine, quasi che queste vogliano evitare le colonie morte per questa sindrome; (iv) la bassa presenza rispetto alla norma di *Aethina Thumida* (una tarma della cera)¹; (v) la presenza della regina che depone le uova circondata da un ristretto gruppo di giovani nutrici. [2, 4, 6 - 8, 11, 13 - 18,]

Nonostante le caratteristiche di questa sindrome siano, se pur con minime variazioni, universalmente riconosciute, non vi è una visione univoca e certa nella comunità scientifica per quanto riguarda le cause scatenanti. Si ipotizza sia dovuta principalmente a quattro tipi di fattore: a) infezioni batteriche, fungine o virali; b) attacchi da parte di parassiti; c) stress di tipo ambientale, causato dall'avvelenamento dovuto a pesticidi agricoli o ai trattamenti antiparassitari delle arnie; d) stress di tipo gestionale causato dal metodo di utilizzo delle api come impollinatrici [2 - 4, 6 - 8, 10, 11, 13 - 16, 19, 20]. Ulteriori cause addotte per spiegare queste morie sono state le pratiche apistiche sempre più "spinte" con una forte selezione genetica delle api regine e la presenza di campi magnetici sempre più intensi, sebbene non vi siano dati consistenti a suffragio di quest'ultima affermazione.

Le teorie che fanno risalire questi spopolamenti ad uno stress immunodepressivo affermano che esso sia causato da una combinazione di più fattori tra cui: 1) una non adeguata nutrizione a causa della presenza di monoculture su larga scala con pollini dal basso valore nutritivo e l'assenza di prati incolti; 2) uno stress da migrazione visti i lunghi viaggi fatti compiere alle arnie per raggiungere i frutteti da impollinare; 3) un affollamento eccessivo delle arnie. [2, 6, 7, 19]

Si è visto inoltre che la combinazione di pesticidi neonicotinoidi con un comune parassita delle api quale la *Nosema Apis* (un fungo che attacca l'intestino delle api) ha un effetto sinergico sulla "immunità sociale" dell'arnia inibendo la produzione di sostanze sterilizzanti per il cibo e rendendo così la colonia meno resistente all'attacco di altri agenti patogeni nel lungo periodo [21]; un effetto simile si è riscontrato anche nel caso di combinazioni tra neonicotinoidi ed alcuni fungicidi [22] che ne possono aumentare la tossicità per le api fino a 1000 volte [23].

Tra le cause di tipo infettivo si è posta molta attenzione per il sospetto legame tra la IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus) e la CCD. Test di infezione in serra, infatti, hanno fatto sorgere sintomi analoghi a quelli della SSA. C'è da dire però che questo virus è assai diffuso e non tutte le colonie che ne sono affette presentano gli stessi deleteri effetti della CCD ed alcune di esse sono anche in grado di sbarazzarsi autonomamente di questo virus [10, 14]. Si è tuttavia

¹ Riscontrato principalmente negli USA

verificato, dall'analisi metagenomica delle api, un ricorrente ritrovamento di frammenti non usuali di RNA ribosomiale nell'intestino delle api colpite da CCD compatibile con l'azione di alcuni virus tra cui il più probabile è proprio lo IAPV [15].

Per quanto riguarda i parassiti, il più diffuso e pericoloso è la *Varroa Jacobsoni*. Questo acaro infesta normalmente le arnie provocando autonomamente un certo numero di decessi tra le api. Si è però verificato che questo acaro è anche un importante vettore per altri virus e patogeni, nonché un attivatore di virus latenti [14]. Esso infatti non dovrebbe teoricamente causare la morte del suo ospite perché è il suo vettore di infestazione (figura 1.1 [24]).

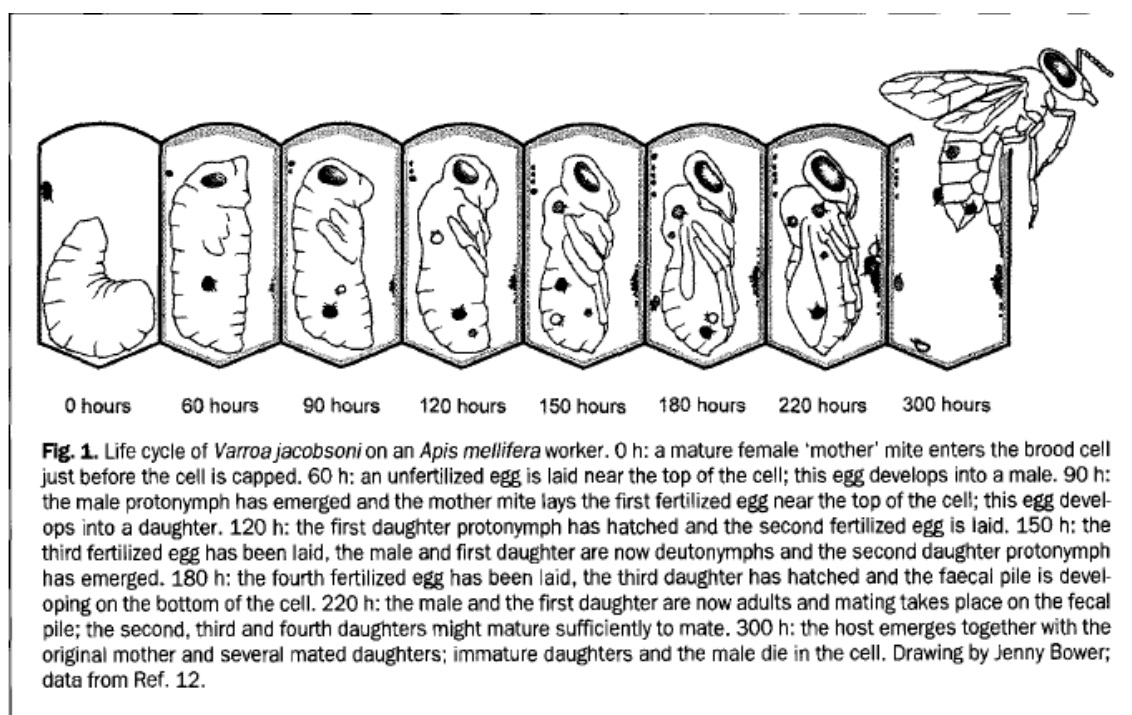


Figura 1.1: Ciclo di vita della *Varroa Jacobsoni* su un'ape operaia

Nel tentativo di porre rimedio a queste inspiegabili morie negli ultimi anni sono stati compiuti particolari sforzi nel determinare il ruolo che può aver avuto la presenza di determinati agrofarmaci nell'ambiente, soprattutto per la loro tossicità verso le api e altri organismi non-target. Evidenti sono state inoltre le correlazioni, segnalate frequentemente in diversi stati europei, fra le semine primaverili di mais impieganti sementi "conciate" con principi attivi insetticidi e le repentine morie negli alveari situati nei dintorni.

Negli ultimi anni sono stati compiuti grossi sforzi a livello nazionale per trovare soluzioni al problema, creando un coordinamento fra i vari Istituti di Ricerca presenti sul territorio con l'istituzione del progetto "APENET", coordinato dal Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-API) di Bologna. All'interno di tale progetto sono state analizzate tutte le principali ipotesi sulle cause e sui meccanismi che possono provocare la moria delle api, dividendo programmi e conoscenze fra i vari istituti partecipanti.

1.2 Neonicotinoidi e pesticidi

1.2.1 Cenni storici sui pesticidi e sui neonicotinoidi

L'uomo ha da sempre cercato di controllare la diffusione degli insetti infestanti sia per questioni di salute pubblica che per la protezione dei raccolti. A questo scopo i solfuri sono stati i primi insetticidi ad essere usati per il controllo dei parassiti e sono tuttora utilizzati in vaste regioni della California e in altre aree del mondo.

Negli ultimi vent'anni il mercato degli insetticidi è stato dominato da tre classi chimiche principali; la prima è quella degli Organofosfati che agiscono analogamente ad una neurotossina, la seconda classe chimica è costituita dai Carbammati che causano un avvelenamento degli inibitori della colinesterasi e l'ultima classe è formata dai Piretroidi che agiscono come inibitori di un enzima del fegato dei parassiti. La loro abilità nel controllare gli insetti infestanti è andata però scemando nel tempo poiché questi ultimi hanno sviluppato una resistenza verso queste tre classi di insetticidi costringendo quindi l'uomo a sviluppare nuovi composti adatti allo scopo prefissato.

Anche la sicurezza dell'ambiente è diventata una prerogativa sempre più importante. I consumatori con il passare del tempo richiedevano un insetticida sempre meno aggressivo con l'ambiente ma sempre più efficace nel combattere i parassiti. Molti insetticidi sono stati sviluppati cercando di soddisfare queste due richieste ma quelli che hanno avuto più successo sono stati i neonicotinoidi grazie alla loro eccellente efficacia e alla loro relativamente bassa tossicità nei confronti dell'ambiente e dei mammiferi. Il loro maggior pregio, rispetto ai pesticidi di vecchia concezione, è la selettività poiché mentre sono fortemente attivi nei confronti degli insetti essi lo sono in maniera quasi trascurabile nei confronti dei mammiferi.

Il primo passo per la scoperta del primo neonicotinoide, l'Imidacloprid, è stato fatto all'interno dell'università dell'Indiana. Nel 1970, infatti, il professor Henry Feuer della Purdue University inviò alla Shell della 2-dibromonitrometil-3-metilpiridina. Durante i test iniziali questo composto mostrò una debole attività insetticida contro i comuni parassiti, ma l'esplorazione chimica e biologica di questo composto portarono alla scoperta degli eterocicli nitrometilene. Il miglior composto che la Shell scoprì durante il programma di ottimizzazione di questa molecola fu la "Nithiazine 7", che non diventò però mai un prodotto commerciale a causa della sua eccessiva velocità e facilità di degradazione nell'ambiente.

Nel 1983, la Nihon Bayer introdusse come sostituito un gruppo eteroarilmetile contenente azoto e questo fece aumentare notevolmente l'attività insetticida di questo

prodotto durante i loro esperimenti. Questo composto, grazie ad ulteriori studi, portò alla scoperta dell'Imidacloprid, seguito poi dal Nitenpyram nel 1987, dall'Acetamiprid nel 1989 e dal Thiamethoxam scoperto in Giappone dal gruppo Ciba nel 1992. Successivamente molte altre molecole neonicotinoidi furono sintetizzate fra cui le più importanti sono state il Thiacloprid da parte della Bayer, il Clothianidin da parte della Takeda e il Dinotefuran dalla Mitshui Chemicals [25].

1.2.2 Sintesi dei neonicotinoidi

Per la sintesi di questa categoria di composti consideriamo l'esempio del Thiamethoxam.

La sintesi del Thiamethoxam, schematizzata in figura 1.2, prevede 3 stadi. Il primo stadio contempla la reazione tra un composto facilmente reperibile come la S-metil-N-nitroisotiourea e la metilammina in etanolo a 50 °C per formare la nitroguanidina mono sostituita con il 94% di resa. Per riscaldamento di questo composto a 90 °C per alcune ore in una miscela 1:1 di acido formico e di soluzione acquosa di formaldeide si ottiene, con una resa del 71%, la 4-nitroimino-1,3,5-oxadinazinane (II stadio). L'alchilazione di questo secondo prodotto con 2-chlorothiazol-5-ylmethyl chloride in N,N-dimetilformammide (DMF) in presenza di carbonato di potassio porta infine all'ottenimento del Thiamethoxam [25].

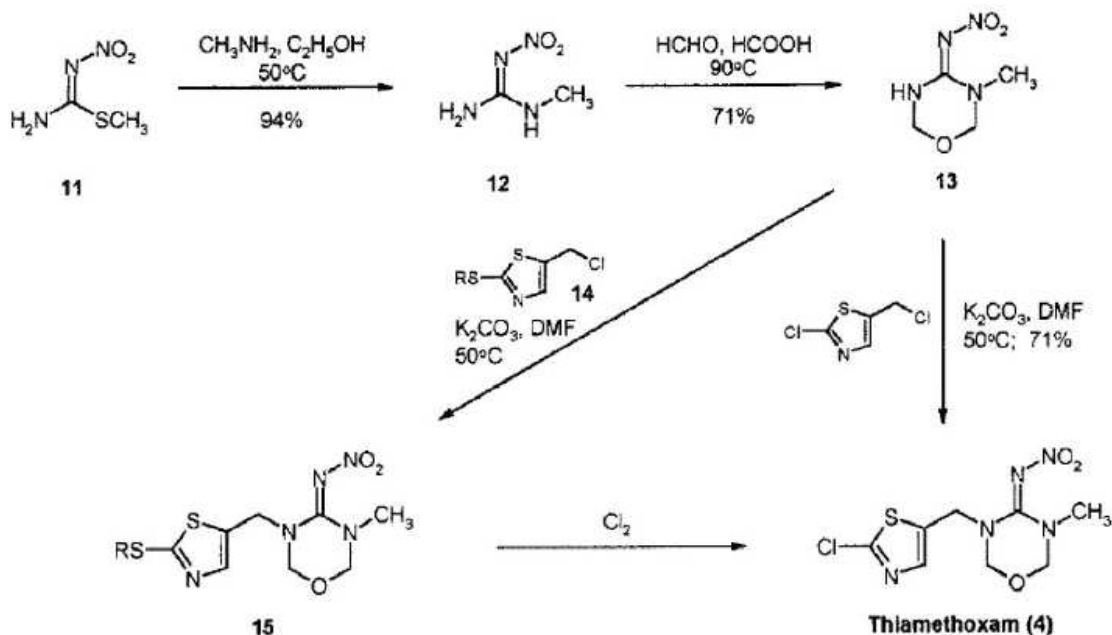


Figura 1.2: Schema di sintesi del Thiamethoxam

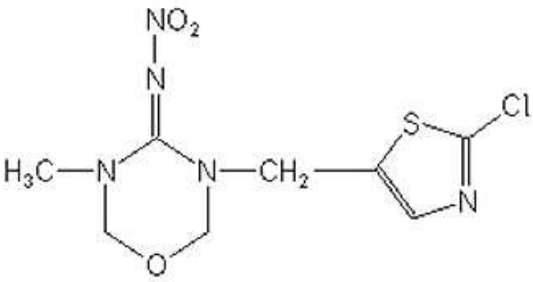
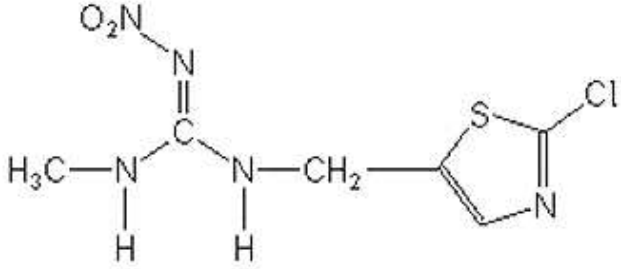
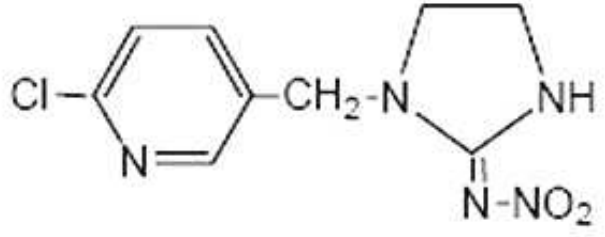
Gli altri neonicotinoidi si sintetizzano in maniera fundamentalmente molto simile.

1.2.3 Caratteristiche generali dei neonicotinoidi e degli altri principi attivi insetticidi

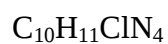
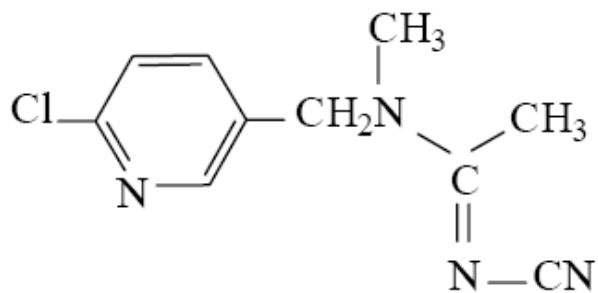
Sono di seguito riportate, nelle tabelle 1.1 – 1.3, alcune informazioni riguardanti i principi attivi insetticidi studiati in questo lavoro di tesi [26].

Cinque dei sei principi attivi insetticidi indagati fanno parte della famiglia dei Neonicotinoidi mentre il sesto, il Fipronil, fa parte di quella dei Fenilpirazoli e i loro spettri di assorbimento UV sono riportati nell'Appendice A (figure 7.1 – 7.6).

Tabella 1.1: Formula di struttura, formula chimica e nome IUPAC dei p.a. indagati

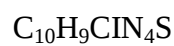
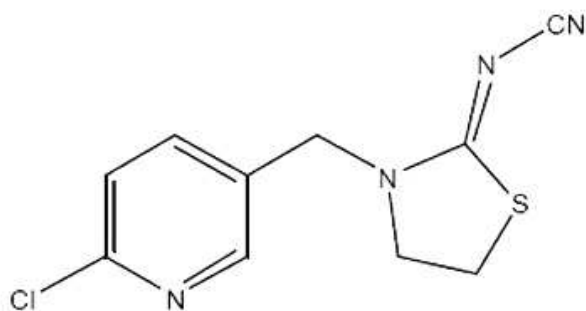
Principio Attivo	Formula di struttura, formula chimica e nome IUPAC
Thiamethoxam	 $C_8H_{10}ClN_5O_3S$ (<i>EZ</i>)-3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene(nitro)amine
Clothianidin	 $C_6H_8ClN_5O_2S$ (<i>E</i>)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine
Imidacloprid	 $C_9H_{10}ClN_5O_2$ (<i>E</i>)-1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)- <i>N</i> -nitroimidazolidin-2-ylideneamine

Acetamiprid



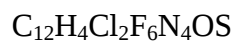
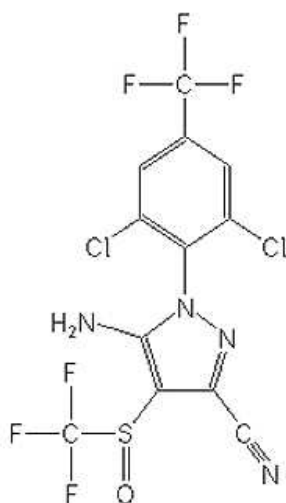
(*E*)-*N*1-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-*N*2-cyano-*N*1-methylacetamidine

Thiacloprid



(*Z*)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamide

Fipronil



5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile

Tabella 1.2: Proprietà chimico-fisiche dei p.a. studiati

Principio Attivo	PM (g/mol)	Punto di fusione (°C)	Densità (g/mL)	Solubilità in acqua a 20°C (mg/L)	Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua a pH 7, 20°C)		Pressione di vapore a 25°C (mPa)	Costante di Henry a 25°C (Pa m ³ mol ⁻¹)
					K _{ow}	log K _{ow}		
Thiamethoxam	291,71	139,1	1,57	4100	0,741	-0,13	6,60 x 10 ⁻⁰⁶	4,70 x 10 ⁻¹⁰
Clothianidin	249,70	176,8	1,61	340	8,04	0,905	2,8 x 10 ⁻⁰⁸	2,90 x 10 ⁻¹¹
Imidacloprid	255,66	144	1,54	610	3,72	0,57	4,0 x 10 ⁻⁰⁷	1,70 x 10 ⁻¹⁰
Acetamiprid	222,67	98,9	1,33	2950	6,31	0,8	1,73 x 10 ⁻⁰⁴	5,30 x 10 ⁻⁰⁸
Thiacloprid	252,72	136	1,33	184	18,2	1,26	3,00 x 10 ⁻⁰⁷	5,00 x 10 ⁻¹⁰
Fipronil	437,15	203	1,71	3,78	5620	3,75	0,002	2,31 x 10 ⁻⁰⁴

I punti di ebollizione non sono riportati tra le caratteristiche chimico-fisiche perché questi principi attivi degradano a temperature inferiori.

Tabella 1.3: Caratteriste tossicologiche ed eco tossicologiche dei p.a. indagati

Principio Attivo	Tossicità sulle api		Frase di rischio EC	Frase di sicurezza EC
	LD ₅₀ (48 h) orale (ng/ape)	LD ₅₀ (48 h) per contatto (ng/ape)		
Thiamethoxam	5,0 ^a	29,9 ^e	R22 R50/53	S2, S60, S61
Clothianidin	3,77 ^a	21,8 ^e	R22 R50/53	S2, S46, S60, S61
Imidacloprid	3,7 ^a	17,9 ^e	R22 R50, R53	S2, S22, S57, S60, S61
Acetamiprid	14530 ^b	8090 ^b	R22 R52/53	S2, S46, S61
Thiacloprid	1732 ^c	38830 ^c	R20 - R22 R52/53	S60
Fipronil	4,17 ^d	5,93 ^d	R23/24/25, R48/25, R50, R53	S1/2, S28, S36/37, S45, S60, S61

^aRiferimento [9]; ^bRiferimento [27]; ^cRiferimento [28]; ^dRiferimento [29]; ^eRiferimento [23].

1.2.4 Modalità d'azione ed effetti sulle api

1.2.4.1 Modalità d'azione dei principi attivi neonicotinoidi

I neonicotinoidi agiscono come agonisti sui recettori postsinaptici nicotinici dell'acetilcolina (nAChR) bloccando la normale azione di scambio di ioni attivata dall'acetilcolina.

L'acetilcolina (ACh) è infatti l'agonista endogeno e il neurotrasmettitore del sistema nervoso colinergico. Le neurotrasmissioni attraverso le sinapsi sono mediate in due passaggi

come descritto in figura 1.3; prima l'acetilcolina è rilasciata dalla membrana presinaptica tramite esocitosi e interagisce con il sito di legame localizzato nel dominio extracellulare del complesso costituito dal canale ionico del recettore nicoticonico dell'acetilcolina. Nel secondo passaggio una modificazione conformazionale della molecola del recettore porta all'apertura del canale, permettendo l'ingresso di cationi Na^+ extracellulare e l'uscita di cationi K^+ intracellulare per mantenere lo stato di equilibrio del potenziale di membrana. Negli insetti i recettori nicotinici dell'acetilcolina sono predominantemente distribuiti nella regione del neuropilo del sistema nervoso centrale (SNC) [30, 31].

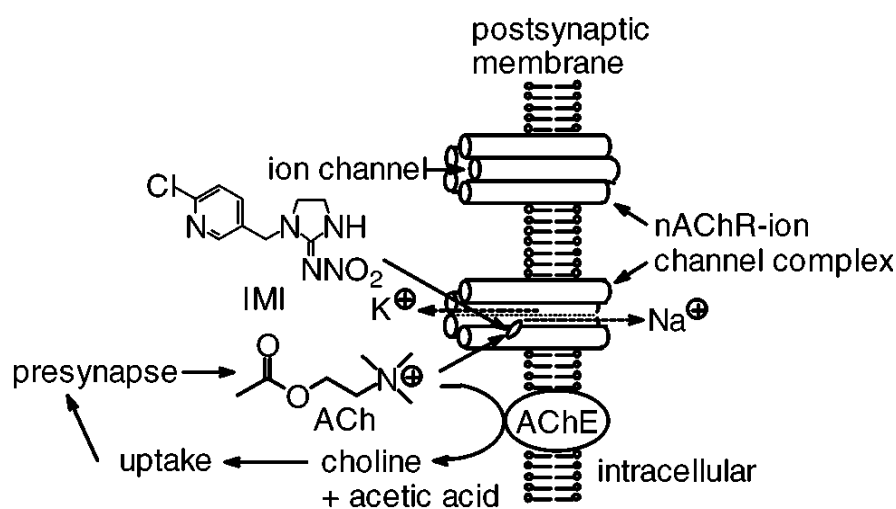


Figura 1.3: Neurotrasmissioni colinergiche mediate dal recettore nicotico dell'acetilcolina (nAChR) sulla membrana postsinaptica. Il neurotrasmettitore ACh rilasciato dalla presinapsi si lega al nAChR portando all'attivazione del canale ionico. L'acetilcolina è successivamente idrolizzata dall'enzima acetilcolinesterasi (AChE) [30]

Il grande vantaggio degli insetticidi neonicotinoidi è la selettività. La caratteristica decisiva per la selettività dei neonicotinoidi rispetto all'nAChR degli insetti sembra essere la zona carica negativamente del gruppo nitro o ciano presente nei neonicotinoidi stessi. Questa carica infatti è in grado di formare legami ad idrogeno o interazioni di tipo elettrostatico con i residui cationici degli amminoacidi presenti in quella zona quali la lisina, l'arginina o l'istidina.

Nei recettori nicotinici dell'acetilcolina dei mammiferi, invece, la zona dove si andrebbero a posizionare i gruppi carichi negativamente dei neonicotinoidi è anch'essa negativa e causerebbe quindi una repulsione dei neonicotinoidi stessi da quel sito che non viene quindi da loro occupato.

Diverso invece era ciò che accadeva con gli insetticidi nicotinici, utilizzati in precedenza, che potevano legarsi senza alcuna difficoltà anche ai siti attivi dei mammiferi oltre che a quelli degli insetti come esplicito in figura 1.4 [25, 30, 32, 33].

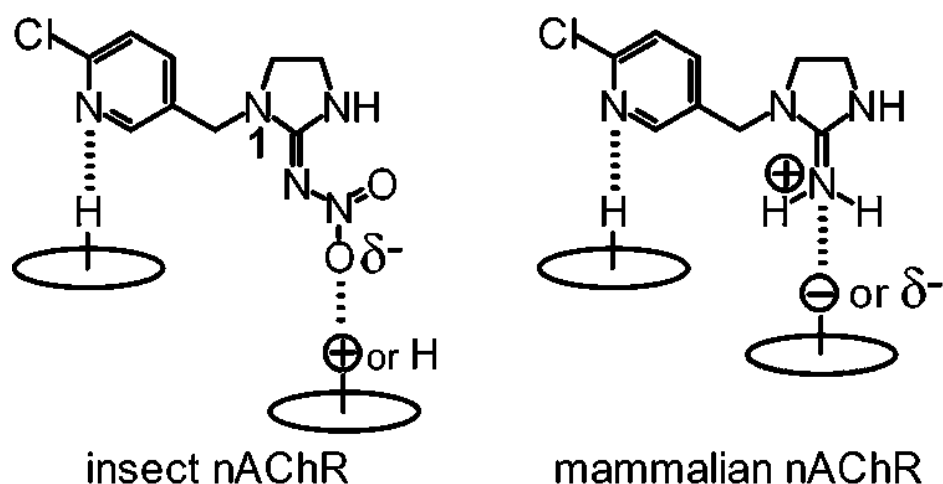


Figura 1.4: Caratteristiche molecolari dei neonicotinoidi rappresentati dall'Imidacloprid (a sinistra) e dei nicotinoidi rappresentati dal desnitro-imidacloprid (a destra) che evidenziano la selettività dei neonicotinoidi per l'nAChR degli insetti rispetto a quello dei mammiferi. Nei neonicotinoidi la punta carica negativamente può essere rappresentata anche da un gruppo ciano. [30]

1.2.4.2 Effetti sulle api

Gli effetti subletali dei neonicotinoidi sulle api si possono dividere in due categorie: quelli fisiologici e quelli comportamentali. Per quanto riguarda quelli fisiologici vi sono in primo luogo gli effetti a livello dei recettori nicotinici dell'acetilcolina descritti in precedenza e in secondo luogo un aumento dell'attività della Citocromo Ossidasi (CO) che controlla la respirazione e l'attività enzimatica celebrale. Inoltre, si osserva una perturbazione nello sviluppo neurale delle larve, una longevità delle api adulte decisamente ridotta [31] e un danneggiamento dei tessuti dell'intestino [34].

Per quanto concerne invece gli aspetti comportamentali, molti di questi sono dipendenti dagli effetti neuronali precedentemente indicati. Si è osservato che per bassissimi dosaggi (fino ad 1,25 ng/ape di Imidacloprid) l'attività motoria delle api risulta aumentata mentre aumentando le dosi di pesticida fornito alle api (da 2,5 a 20 ng/ape) queste tendono a diminuire sempre più i loro movimenti.

Un secondo effetto comportamentale è quello legato alla navigazione e all'orientamento che dipendono dalle trasmissioni nervose e sono legati alla vista dell'ape; si è verificato che le api, una volta contaminate con questi principi attivi, acquisiscono in maniera sfalsata le immagini perdendo totalmente o in parte l'orientamento e ciò le porta a vagare senza riuscire più a ritornare all'arnia [31]. I molti esperimenti effettuati hanno infatti dimostrato come il recupero del cibo da parte delle api richiedesse da parte loro un tempo sempre maggiore all'aumentare del dosaggio di neonicotinoide, causando inoltre una variazione nei percorsi e

addirittura la perdita dell'ape o per alcune ore o per giorni o per il resto della sua esistenza [35, 36].

Un terzo aspetto di queste modificazioni è la difficoltà nell'approvvigionamento del cibo. Questa è causata da una ridotta capacità olfattiva che si spiega con delle alterazioni nei riflessi di estensione della proboscide (PER, Proboscis Extension Reflex) nonché dalla ridotta sensibilità delle antenne a percepire le fonti di saccarosio. Essendo il PER deputato alla memorizzazione di gusti ed odori, se esso non funziona correttamente le api non sono più in grado di riconoscere il cibo, di portarlo all'arnia e di sfamare le altre api e loro stesse [22, 31, 37 - 41]. Questa perdita di memoria è stata verificata in molti studi e si è osservato che la parte di memoria intaccata in dosi subletali per questo tipo di insetticidi è quella a breve e medio termine [31]. Altri studi hanno verificato una riduzione o una totale sparizione della comunicazione tra ape ed ape sui luoghi dove recuperare il cibo, effettuata, nel caso di api in salute, attraverso la cosiddetta "wagglings dance" [31, 42]. Questa danza consiste normalmente in un movimento ad "otto" effettuato con una determinata angolazione e con un preciso numero di vibrazioni dell'addome come si può vedere in figura 1.5. In particolare la direzione della parte vibratoria della wagglings dance dà informazioni rispetto all'angolazione con il sole della risorsa di cibo, mentre la sua durata fornisce informazioni rispetto alla distanza che si è stabilito corrispondere a circa 1 km per ogni secondo di vibrazione.

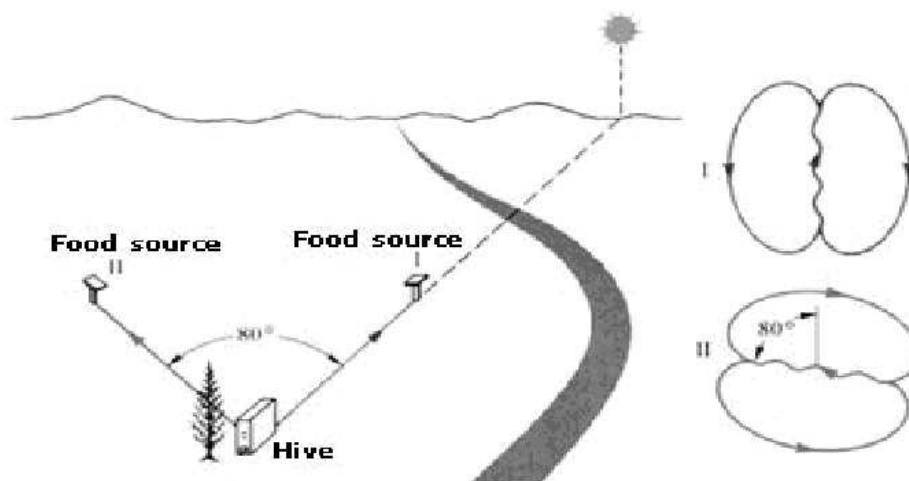


Figura 1.5: Diversa orientazione della direzione della wagglings dance a seconda della posizione della fonte di cibo rispetto all'asse sole – alveare.

Questa interruzione delle comunicazioni fa sì che un numero sempre maggiore di api sia costretto a lasciare l'arnia alla ricerca di cibo senza però conoscerne già l'ubicazione, portando così in breve tempo ad uno spopolamento dell'alveare e a un successivo drastico declino della colonia vista la penuria di cibo.

Altri effetti osservati e riportati in letteratura sono l'apatia, la respirazione affannosa, la perdita di coordinazione e le convulsioni [42, 43].

Dosi letali di questi principi attivi generano stati di eccitazione permanente che portano poi alla morte per paralisi [44].

1.3 Legislazioni riguardanti i neonicotinoidi e altri insetticidi

A livello italiano il primo provvedimento preso per affrontare il problema della moria delle api è stato il Decreto Ministeriale del 17 settembre 2008, che disponeva la sospensione all'autorizzazione alla vendita e d'impiego di sementi conciate con le sostanze attive insetticide, Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid e Fipronil, in virtù di un possibile nesso di causa - effetto tra l'utilizzo di sementi di mais, colza, girasole e barbabietola da zucchero conciate con tali principi e la moria delle api.

Successivamente, il D.M. del 26 gennaio 2009 del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali precisava i limiti temporali di questa sospensione, fissandoli al 20 settembre 2009.

In un secondo tempo, in considerazione delle particolari caratteristiche agronomiche e di confettatura del seme della barbabietola da zucchero, è stato emanato l'ulteriore Decreto Ministeriale 27 gennaio 2009 che revocava la sospensione dell'autorizzazione d'impiego per la concia di sementi di barbabietola da zucchero, dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive citate, da sole o in miscela con altre sostanze attive e riammetteva quindi l'impiego di sementi di barbabietola da zucchero conciate con prodotti contenenti tali principi.

Ad un anno circa dalla prima sospensiva, con il Decreto dirigenziale del 14 settembre 2009, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali ha prorogato fino al 20 settembre 2010 la sospensione d'impiego dei quattro principi attivi nella concia di sementi.

Infine, con un ulteriore provvedimento del 16 settembre 2010, lo stesso ministero ha prorogato il termine della sospensione al 30 giugno 2011, legando questa proroga alla necessità di attendere la conclusione del progetto APENET, finanziato per valutare l'efficacia e gli effetti del decreto di sospensione dei neonicotinoidi nella concia delle sementi di mais e fornire risposte alle problematiche legate ai fenomeni di mortalità e di spopolamento delle colonie di api.

A livello europeo la situazione dei blocchi cautelativi si presenta eterogenea e differisce per ognuno dei singoli stati membri. Questo avviene perché la direttiva EU 91/414 sui prodotti per la protezione delle piante presenta un procedimento approvativo che prevede una

autorizzazione autonoma da parte dei singoli stati per questi prodotti. Tale direttiva europea consta di due stadi: nel primo i principi attivi vengono accertati a livello europeo con un DAR (Draft Assessment Report), ossia una bozza di accertamento, per verificare la tossicità acuta e cronica e gli effetti sub letali su vari organismi. Tali studi ed accertamenti sono a carico dei produttori dei principi attivi stessi, senza alcuna supervisione da parte di un qualsivoglia ente di controllo. Una volta redatto il DAR, esso viene approvato dagli stati membri mediante un processo di revisione. Se la sostanza sottostà ai criteri di non avere un'inaccettabile influenza nell'ambiente, in particolare sugli organismi non target, essa viene inclusa nella lista positiva delle sostanze attive approvate che si trova nell'allegato I della direttiva 91/414.

Il secondo stadio di approvazione per questi fitofarmaci è quindi quello dell'approvazione della sostanza da parte dei singoli stati membri. L'approvazione di questi prodotti deve soddisfare i criteri di uniformità contenuti nell'allegato VI della direttiva tra cui spiccano nel caso dei neonicotinoidi i seguenti parametri:

- Gli Stati Membri devono assicurare che i dati riportati siano accettabili in termini di quantità, qualità, consistenza ed attendibilità.
- Gli Stati Membri devono considerare altre informazioni tecniche o scientifiche rilevanti che possono ragionevolmente possedere in considerazione delle prestazioni del Prodotto per la Protezione delle Piante o dei suoi effetti collaterali.
- Gli Stati Membri devono considerare possibili elementi di incertezza sulle informazioni ottenute durante la valutazione.
- Gli Stati Membri devono valutare la possibilità dell'esposizione degli organismi acquatici al Prodotto per la Protezione delle Piante.
- Gli Stati Membri devono valutare il rischio a breve e lungo periodo per le api (Api dell'Ovest o Europee (*Apis mellifera*)).

L'approvazione del prodotto per la protezione delle piante può essere rivisto nel caso vi sia un'indicazione che uno qualsiasi dei requisiti rilevanti presenti nell'allegato VI non sia più soddisfatto. L'approvazione viene revocata se la successiva revisione conclude che i requisiti rilevanti contenuti all'interno della direttiva non sono più soddisfatti o le informazioni date con gli incartamenti originali per l'approvazione, presenti nel DAR, erano false o presentavano omissioni.

Questo modello di approvazione ha però acconsentito che il primo agosto del 2009 l'Imidacloprid entrasse a far parte della lista delle sostanze consentite presenti nell'allegato I della direttiva nonostante le evidenti prove della sua tossicità sulle api e su altri organismi non

target [42]. Successivamente anche gli altri principi attivi neonicotinoidi (e non) indagati in questo lavoro di tesi sono entrati a far parte di quelli presenti nell'allegato I della direttiva 91/414/CEE.

In Francia, dopo i primi provvedimenti del '99 contro l'utilizzo del p.a. Imidacloprid per la concia dei semi di girasole, è stata sospesa nel febbraio 2004 l'autorizzazione d'utilizzo anche per sei insetticidi a base di Fipronil (uno dei quali utilizzato per la concia del mais) da parte del Ministero dell'Agricoltura e ad oggi il divieto d'impiego di prodotti concianti a base di Imidacloprid risulta esteso anche per il mais e la colza [9]. Nel 2008 è stata invece concessa l'autorizzazione d'impiego per un anno di prodotti concianti a base di Thiamethoxam utilizzati per il mais mantenendo però il loro utilizzo sotto stretta osservazione scientifica.

In Germania dopo le intense morie registrate in particolare nella regione sud del paese durante la primavera 2008, frequentemente concomitanti con semine di mais conciato, il Governo nazionale di concerto con il competente organismo federale (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, BVL) aveva inizialmente bloccato l'utilizzo di alcune sostanze attive insetticide (fra le quali anche diversi neonicotinoidi) per la concia di diverse sementi, ripristinandone in seguito la possibilità d'utilizzo solo per le sementi di colza. A suffragare il primo blocco normativo aveva anche influito la sentenza di un giudice che aveva condannato la Bayer a risarcire circa 700 apicoltori della regione del Baden-Württemberg per una moria di 11.500 colonie di api avvenuta durante il periodo di semina del mais conciato con Clothianidin [45].

Anche in Slovenia, come in Germania, all'iniziale sospensione d'utilizzo per i neonicotinoidi Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam, per la concia di tutte le tipologie di sementi, è seguito il ripristino d'utilizzo di tali p.a. solo per sementi di colza.

Negli Stati Uniti la direttiva che regola l'introduzione di nuovi insetticidi in agricoltura è il FIFRA (Federal Insecticide Fungicide and Rodenticide Act) che, come la direttiva EU 91 / 414 si basa su dati di LD₅₀ e di LC₅₀ [31] unitamente al Quoziente di Rischio (Hazard Quotient, HQ) che non è altro che il rapporto tra livello di esposizione e la tossicità, calcolato come dose d'impiego in grammi di principio attivo per ettaro diviso per l'LD₅₀ orale o per contatto in µg di principio attivo per animale (o per ape nel nostro specifico caso d'interesse). Se questo quoziente risulta essere inferiore al valore di 50 il rischio viene considerato basso, mentre se è maggiore o uguale a 50 significa che vi è un probabile rischio e sono necessari degli studi approfonditi per stabilirlo [2, 42, 46]. Essendo però i produttori stessi a effettuare questo tipo di valutazioni non stupisce che per molti degli insetticidi neonicotinoidi il quoziente di rischio calcolato nei DAR sia risultato inferiore a 50.

A causa di questo tipo di problematiche in California nel marzo 2009 è stata decisa una rivalutazione di Imidacloprid, Thiamethoxam e Clothianidin per verificarne la presenza e persistenza nell'ambiente e la loro tossicità sulle api e su altri insetti impollinatori [47].

1.4 Dispersione nell'ambiente dei p.a. insetticidi

1.4.1 Uso e valore economico

I principi attivi neonicotinoidi sono comunemente utilizzati su semi (come concianti), sui suoli coltivati e sui prati (sparsi in formulazione granulare o tramite spray), su strutture (per la loro disinfestazione dalle termiti), nei frutteti tramite l'uso di spray ed infine come trattamento topico sugli animali domestici per l'eliminazione delle pulci. Per quanto riguarda uno di questi principi attivi come l'Imidacloprid sono stati registrati nel solo Connecticut 247 prodotti a base di questo principio attivo e ciò può dare un'idea, seppur parziale, della loro estrema diffusione [22, 48 - 50]. Il loro massiccio utilizzo in agricoltura è effettuato per la protezione delle colture da parassiti quali la diabrotica e le larve di scarafaggio ma anche per le locuste e altri insetti succhiatori, come gli afidi, e masticatori come le cavallette e gli scarafaggi [48]. Nonostante questa loro utilità nella salvaguardia delle colture sia messa in dubbio da alcuni studi [51] il giro d'affari per il 2008 della Bayer solo per quanto riguarda il Clothianidin è dell'ordine dei 240 milioni di euro all'anno [45], mentre il suo reparto sementi ha avuto globalmente nel 2007 un giro d'affari pari a 5,8 miliardi di euro [52].

Per quanto concerne il mercato internazionale dei prodotti concianti si è passati dagli iniziali 155 milioni di euro registrati nel 1990, ai 535 milioni di euro registrati nel 2005, di cui il 77% del totale dovuti all'utilizzo di principi attivi neonicotinoidi [53].

E' facile quindi intuire che gli interessi su questi principi attivi sono notevoli.

1.4.2 La concia delle sementi

L'operazione di concia delle sementi è una pratica sviluppata da più di una decina d'anni che consiste nell'avvolgere il seme da piantare in una pellicola contenente una certa dose di fitofarmaco. Tale composto, se agisce in modo sistemico come nel caso dei neonicotinoidi, viene portato all'interno dei tessuti della pianta una volta che questa inizia il suo processo di sviluppo proteggendola quindi su gran parte dei tessuti ed assicurando una buona persistenza della protezione sia dai principali fitofagi radicali, sia dai principali insetti fitofagi e fitomizi che attaccano i tessuti aerei della pianta. Questa modalità di impiego degli agrofarmaci ha portato ad una forte riduzione delle quantità di questi prodotti necessarie per un'adeguata protezione delle colture nei campi rispetto alle precedenti tecniche agronomiche utilizzate. Queste prevedevano infatti l'uso massiccio di geodisinfestanti o di prodotti irrorati con spray. Con questa modalità di somministrazione si sono così ridotte drasticamente le quantità di p.a. disperse nell'ambiente con relativi vantaggi sia economici che ambientali [44].

L'uso dei concianti, nel tempo, è stato esteso oltre che al mais anche a molte altre colture quali il cotone, la colza, il girasole e la barbabietola da zucchero.

1.4.3 Destino Ambientale

1.4.3.1 Semina e polveri

Anche se la pratica della concia delle sementi sembrava ridurre i problemi di dispersione dovuti all'impiego di prodotti di sintesi, prendeva consistenza l'ipotesi che tali principi attivi utilizzati nelle conce fossero la causa dello spopolamento degli alveari.

In particolare, studi effettuati in Italia fra il 2004 ed il 2006 e coordinati dal Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA-API) ed alcune Università italiane verificarono come la semina con seminatrici pneumatiche di sementi di mais contenenti fitofarmaci fosse la causa del rilascio nell'ambiente di una notevole percentuale in massa di tali prodotti sotto forma di polveri create con l'abrasione meccanica dei semi che avviene all'interno del macchinario.

Ulteriori studi a livello regionale o di istituti privati hanno confermato come le semine di mais conciato con principi attivi insetticidi potessero essere responsabili della morte di molte api ritrovando, in campioni di api morte fornite da singoli apicoltori o raccolti da istituti

veterinari regionali, dosi rilevanti di diversi principi attivi insetticidi utilizzati nella concia del mais [54].

Seppur esistano studi effettuati dalla Bayer che cercano di negare che la morte delle api possa in qualche modo essere riconducibile all'abrasione delle sementi conciate e alla successiva dispersione di queste nell'aria [55], numerose ricerche scientifiche ben documentate hanno comprovato come invece questo rapporto esista e sia particolarmente forte. In particolare, da tali ricerche si è evidenziato che vi possono essere due tipi di interazione tra le api e le polveri prodotte dalle seminatrici: una diretta, causata dal passaggio delle api nei campi durante i periodi di semina e una indiretta dovuta alla deposizione di queste polveri sulla flora circostante i campi in questione con cui le api possono venire a contatto nei giorni successivi alla semina.

Questa seconda modalità è stata ampiamente documentata in particolar modo dal professor Greatti dell'Università di Udine nei suoi studi sull'analisi dell'erba e dei fiori presenti ai lati dei campi seminati con i principi attivi neonicotinoidi [44, 56, 57]. In particolare, i suoi studi hanno appurato che la persistenza dei principi attivi su queste inflorescenze spontanee può perdurare fino ad 8 giorni dalla semina [58], aumentando così notevolmente i tempi per una possibile contaminazione delle api rispetto ad un evento di sostanziale breve durata come la semina.

Le moderne seminatrici sono per la quasi totalità di tipo pneumatico ad alta precisione e permettono di seminare a distanze regolabili un determinato numero di semi per metro quadrato. Il funzionamento della seminatrice è piuttosto semplice: una vasca contenente le sementi è collegata per mezzo di una tramoggia ad un secondo contenitore di semi molto più piccolo e chiuso da un lato con un disco con un determinato numero di fori posti a circa un centimetro dal suo bordo esterno. Sul lato opposto del disco, rispetto a quello dove sono presenti i semi, vi è un bocchettone collegato ad un aspiratore centrifugo che crea una depressione molto forte a livello dei fori del disco che vengono quindi riempiti da un seme ciascuno a mano a mano che il disco girando fa arrivare un foro non occupato nei pressi del serbatoio dei semi. I semi, una volta aspirati, rimangono attaccati al disco fino a che non si arriva in una zona della rotazione in cui non vi è più aspirazione; a questo punto i semi cadono per gravità all'interno dei solchi prodotti dalla macchina nel suolo e vengono poi ricoperti dalla terra da un successivo meccanismo. In figura 1.6 sono rappresentati uno spaccato della parte seminatrice e lo schema di funzionamento.

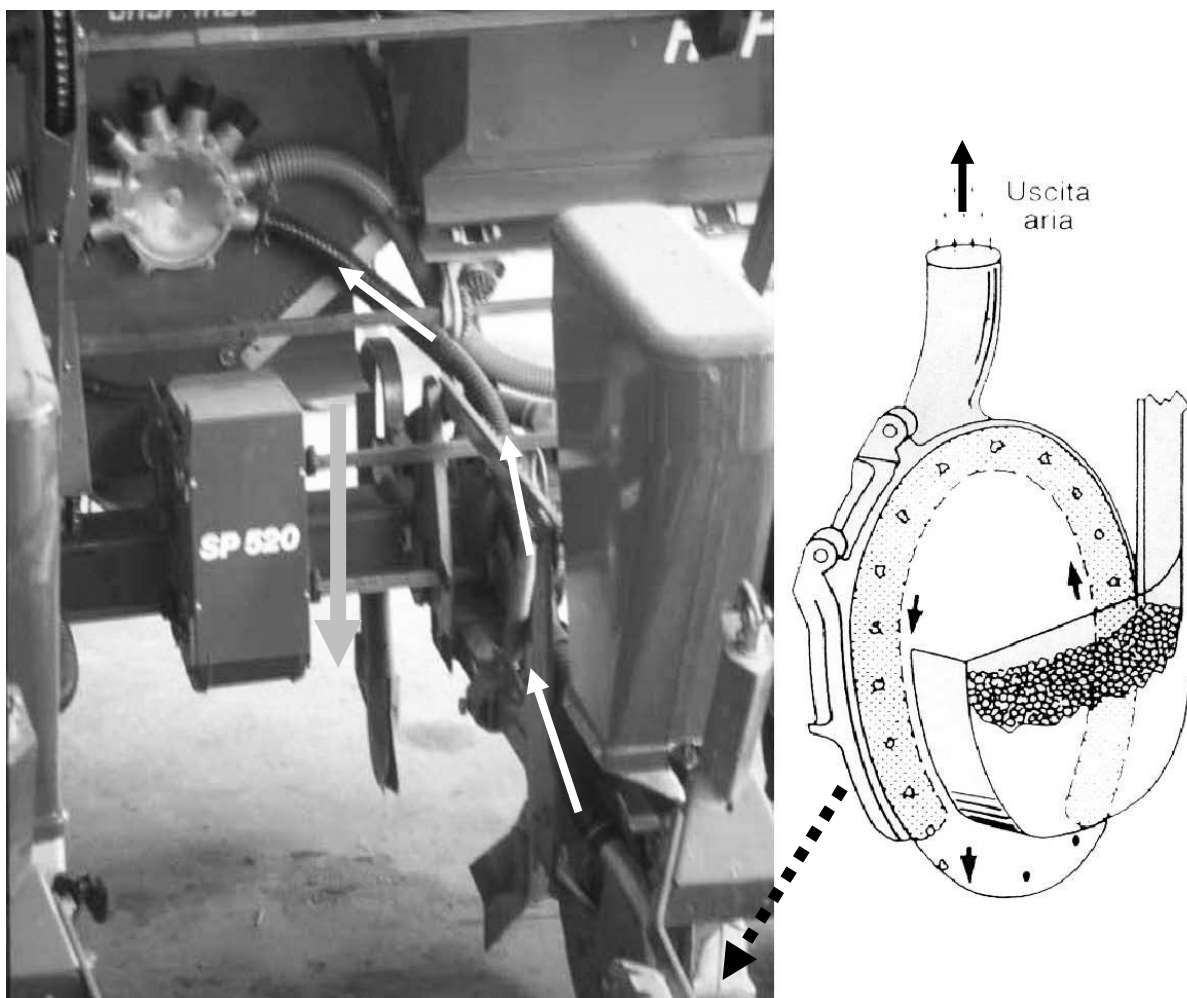


Figura 1.6: Una seminatrice pneumatica e il relativo schema illustrativo dell'apparato di rilascio del seme. Le frecce bianche indicano il percorso dell'aria fino all'aspiratore centrifugo mentre quella grigia l'uscita dell'aria dallo stesso.

Essendo la pellicola di rivestimento del seme in cui sono contenuti i principi attivi insetticidi abbastanza delicata, tutti i passaggi che ne causano un movimento o uno strisciamento con delle superfici o tra seme e seme stesso sono causa di abrasione e di formazione di polveri. In particolare il caricamento dei semi all'interno dei serbatoi con lo svuotamento dei sacchi di sementi (in cui sono già presenti delle polveri), i movimenti dei serbatoi dovuti agli scossoni e alle vibrazioni del trattore in movimento, il movimento della tramoggia di passaggio dei semi dal serbatoio principale a quello secondario più piccolo a contatto con il disco e la rotazione stessa del disco sono tutti causa di formazione di polveri per abrasione e sfregamento.

Le polveri, una volta prodotte, vengono aspirate attraverso il sistema pneumatico e vengono quindi espulse all'esterno generando un flusso pressoché costante di polveri di concia nel tempo con conseguente immissione nell'aria di ingenti quantità di principio attivo.

A seconda dell'intensità del vento e da altri fattori climatici le polveri possono rimanere in aria per più o meno tempo e disperdersi per poche centinaia di metri dai campi seminati fino a qualche km dagli stessi. Le emissioni di questo tipo di seminatrice misurate in alcuni lavori hanno rivelato una dispersione del principio attivo Clothianidin tra gli 1,2 g/ha per la confettatura del 2008 e di 0,9 g/ha per la confettatura 2009 [59].

1.4.3.2 La guttazione fogliare e la distribuzione nelle piante

Negli stadi giovanili di alcune specie di piante terrestri si osserva un particolare fenomeno di fuoriuscita di acqua, localizzato soprattutto alle estremità fogliari, chiamato “guttazione”. Tale processo fisiologico, da non confondere con la normale traspirazione fogliare, permette ad un'aliquota d'acqua di uscire attraverso specifici fori posizionati lungo i lembi fogliari, denominati idatodi.

La guttazione ha luogo quando l'elevata pressione radicale dell'acqua non riesce ad esser controbilanciata totalmente dalla traspirazione fogliare e perciò una frazione di quest'acqua viene dirottata all'esterno attraverso gli idatodi. Tale situazione si verifica quindi in piante con elevate disponibilità d'acqua nel terreno ed in situazioni di chiusura degli stomi fogliari con limitata traspirazione [60]. Per questo motivo il fenomeno della guttazione si manifesta soprattutto durante la notte quando gli stomi sono prevalentemente chiusi per la ridotta attività metabolica ed il livello d'umidità atmosferica risulta più elevato. Le gocce di guttazione (figura 1.7) sono quindi ben visibili sulle foglie il mattino ma questo processo si può osservare durante tutto l'arco della giornata seppur in misura inferiore.



Figura 1.7: Particolare di gocce di guttazione sull'estremità di una foglia di mais

La produzione di acqua di guttazione da parte delle piante di mais è un fenomeno che si verifica limitatamente alle prime tre settimane di vita. La produzione da ogni singola pianta si attesta su volumi che variano tra gli 0,1 mL e i 0,3 mL al giorno nei periodi iniziali di forte produzione, diminuendo a volumi inferiori agli 0,1 mL durante gli ultimi giorni in cui questo fenomeno ha luogo.

In campo, l'acqua di guttazione fogliare può fornire comunque volumi d'acqua non indifferenti, soprattutto se addizionata all'eventuale rugiada. Durante stagioni primaverili ed estive secche, le gocce di guttazione provenienti da piante di mais possono costituire una fonte sicura d'acqua per gli insetti che ne richiedano elevate quantità per il loro metabolismo come le api [61, 62]. L'utilizzo diretto di acqua di guttazione fogliare da parte di api è stato già verificato in letteratura [63] ed è maggiormente verificabile in ambienti caratterizzati da monocolture di mais diffuse.

Le piante, se sono conciate o trattate con composti sistemici quali i neonicotinoidi, possono secernere gocce di guttazione contenenti concentrazioni estremamente elevate (anche a livelli di 350 mg/L [41]) di principio attivo, molto più che sufficienti per uccidere un'ape che dovesse per necessità berle [64, 65].

Poiché i neonicotinoidi sono dei composti sistemici che si distribuiscono molto velocemente all'interno di tutti i tessuti della pianta attraverso l'apparato xilematico, essi contaminano a livelli di concentrazione più o meno consistenti anche il polline delle piante trattate con questi pesticidi [48, 66, 67]. La raccolta di questo polline da parte delle api e la sua conservazione all'interno delle arnie fa sì che l'azione tossica e la somministrazione di questo polline contaminato continui nel tempo e possa portare alla morte le api anche in periodi apparentemente slegati da quelli di infiorescenza delle piante trattate [3, 46]. Questo è confermato da dati di letteratura [68] che riportano concentrazioni da 0,6 a 2,1 µg/kg nel polline prelevato dalle api nei campi di mais.

1.4.3.3 Persistenza, degradazione e destino ambientale

Data la loro bassissima volatilità, dimostrata dai bassi valori relativi alla costante di Henry e di pressione di vapore presenti nelle tabelle precedentemente riportate (vedi Paragrafo 1.2.3), la loro presenza nell'ambiente si può riscontrare solo nei suoli, nelle acque e negli eventuali esseri viventi con cui vengono in contatto.

Alcune delle caratteristiche di degradazione ambientale per questi principi attivi sono riportate in Tabella 1.4 [26].

Tabella 1.4: dati di degradazione dei principi attivi indagati e relativi coefficienti di ripartizione suolo/acqua espressi come μg di p.a. per grammo di carbone attivo

Principio Attivo	Persistenza nel suolo $t_{0,5}$ (giorni)	Fotolisi in acqua a pH 7 $t_{0,5}$ (giorni)	Idrolisi a 20 °C e pH 7 $t_{0,5}$ (giorni)	Persistenza in acqua $t_{0,5}$ (giorni)	K_{oc} ($\mu\text{g/g}$)
Thiamethoxam	39 - 50	2,7	Stabile	30,5 - 40	70
Clothianidin	121,2 - 545	0,1	Stabile	40,3 - 56	160
Imidacloprid	174 - 191	0,2	Stabile	30 - 129	225
Acetamiprid	2,6 - 3	34	Stabile	4,7	107
Thiacloprid	1,3 - 18	Stabile	Stabile	8,5 - 28	615
Fipronil	65 - 142	0,33	Stabile	54 - 68	577

Come si può vedere la persistenza di questi principi attivi nell'ambiente è moderatamente lunga. Se si osserva in particolare la persistenza nel suolo, luogo in cui vengono solitamente posti i semi concitati con questi principi attivi, si vedono tempi di dimezzamento che vanno dal giorno e mezzo ai 545 giorni e, anche se le stime di alcuni autori azzardano tempi di dimezzamento superiori ai 1000 giorni [42], la loro reale persistenza nell'ambiente può perdurare per più di due - tre anni a seconda dei tipi di terreno e della presenza di acqua, rimanendo così sempre disponibili per il prelievo da parte dell'apparato radicale delle piante. Analisi sulle foglie di mais hanno verificato una persistenza dei principi attivi all'interno delle stesse in concentrazioni apprezzabili anche dopo 60 - 80 giorni dalla semina [69].

I valori relativamente bassi della costante di assorbimento su carbone attivo fanno capire come questi principi attivi abbiano una mobilità, una volta rilasciati nell'ambiente, sufficientemente elevata. Essendo infatti questi principi attivi molto o discretamente solubili in acqua, essi possono diffondere non solo nei terreni adiacenti ai campi seminati ma anche nei fiumi e persino nelle falde acquifere; esempi in tale senso sono stati registrati sia in Florida che a New York [48].

Una visione schematica della degradazione di uno di questi principi attivi (l'Imidacloprid) nel suolo e in acqua è riportata nelle figure 1.8 e 1.9 [70].

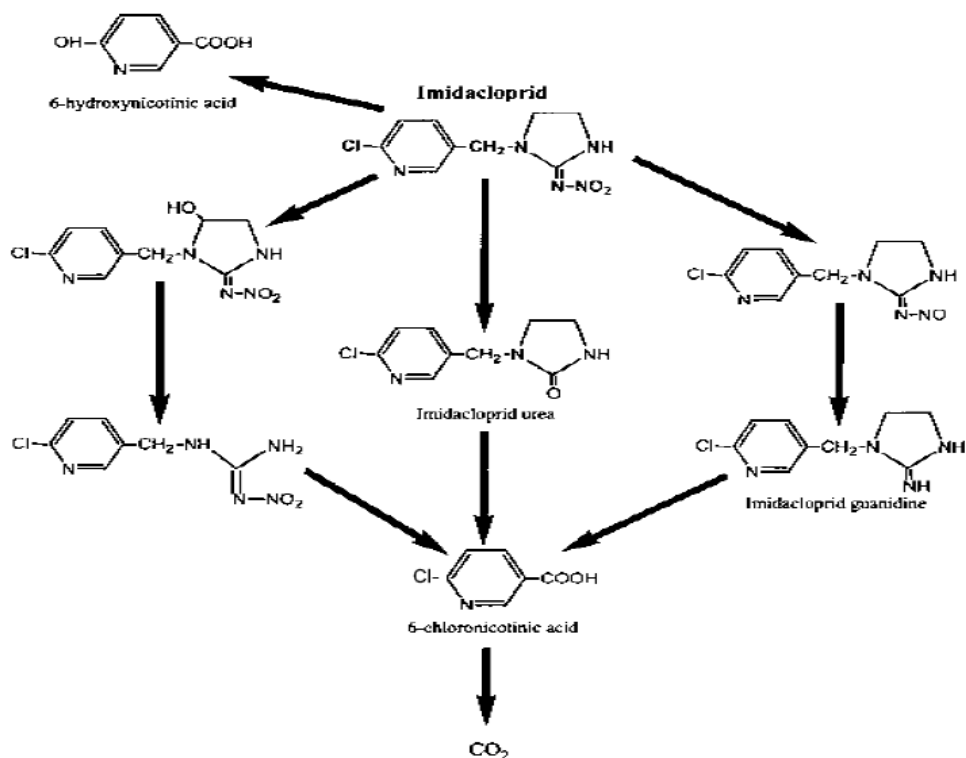


Figura 1.8: Schema di degradazione dell'Imidacloprid con relativi metaboliti nel suolo.

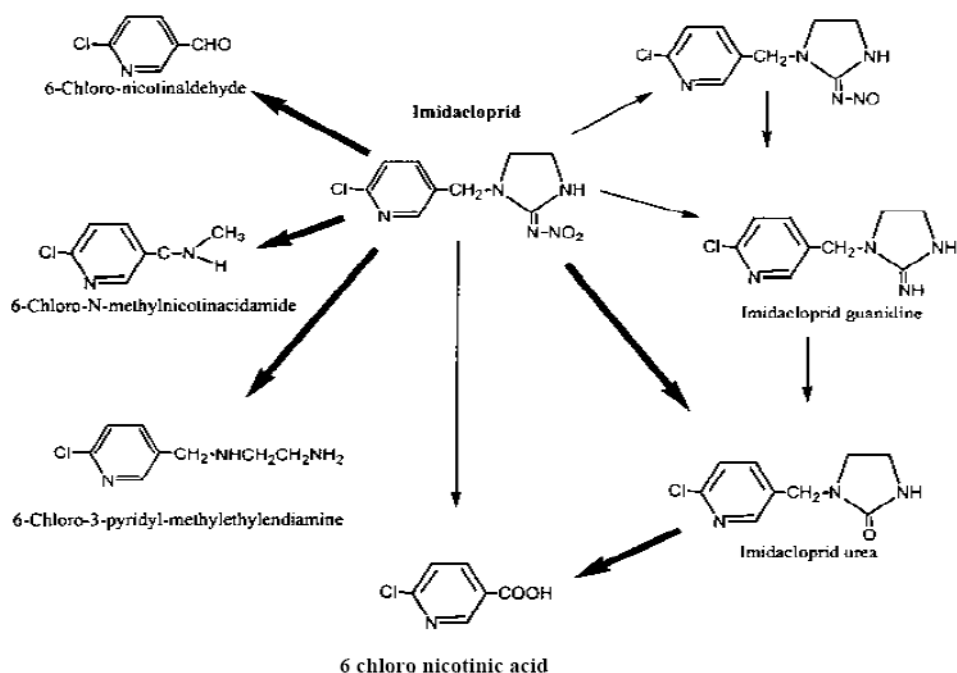


Figura 1.9: Schema di degradazione dell'Imidacloprid in acqua. Con le frecce di spessore maggiore sono indicati i cammini più probabili.

Oltre ai cammini degradativi di tipo chimico e fisico vi sono da considerare quelli di tipo biologico. Molti batteri comunemente presenti nei terreni e nelle acque sono in grado di biotrasformare questi composti in tempi relativamente brevi nei loro comuni metaboliti [71]; questi, si è osservato, sono spesso più tossici per gli insetti dei principi attivi stessi.

Studi sulle api, effettuati utilizzando Imidacloprid in bassi dosaggi, hanno poi portato a comprendere che le api, già dopo 20 minuti dall'assunzione, sono in grado di metabolizzare ben il 70% di questo principio attivo e sono i metaboliti prodotti da loro stesse a decretarne la morte [72]. Alcuni tra i metaboliti più comuni per questi principi attivi insetticidi sono riportati in tabella 1.5 [26].

Tabella 1.5: Metaboliti principali prodotti nel suolo a partire dai p.a. insetticidi indagati

Pricipio Attivo	Metaboliti più comuni
Thiamexoxam	Clothianidin
Clothianidin	N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N'-nitroguanidine, N-metil-N-nitroguanidina
Imidacloprid	1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]N-nitro-1H-imidazol-2-amine, acido 6-cloronicotinico
Acetamiprid	N-methyl(6-chloro-3-pyridyl)methylamine
Thiacloprid	thiacloprid-ammide, acido thiacloprid-solfonico
Fipronil	Fipronil-ammide, Fipronil-solfone, Fipronil-solfuro

1.5 Metodi di estrazione ed analisi in letteratura

1.5.1 Metodi di estrazione dei neonicotinoidi dalle api

In letteratura è presente solo un numero limitato di metodi estrattivi per i neonicotinoidi a partire dalla matrice "ape". Tre sono i tipi di estrazione principalmente utilizzati: l'estrazione da fase solida o SPE (Solid Phase Extraction), l'estrazione liquido liquido (preceduta sempre da una estrazione SPE essendo la matrice di partenza solida) o LLE (Liquid Liquid Extraction) e l'estrazione effettuata mediante una dispersione della matrice su fase solida o MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion) che è in pratica un'estrazione da fase solida particolare.

Le api possono preventivamente non subire alcun tipo di pretrattamento o essere sottoposte ad un processo di liofilizzazione o di essiccazione mediante riscaldamento.

L'unica particolarità che unisce tutte le metodologie di letteratura è l'utilizzo di un numero consistente di api che varia tra gli 8 e i 31 o più insetti.

I solventi utilizzati, per quanto riguarda le metodologie che utilizzano la SPE, sono l'acetone [73, 74] ed il diclorometano [75]. Qui, l'estrazione avviene mediante l'utilizzo di un bagno ad ultrasuoni e gli estratti così ottenuti vengono filtrati o su Celite o su carta da filtro

per eliminare la frazione più grossolana della matrice. Successivamente gli estratti vengono portati a secco o a un piccolo volume mediante l'uso di un evaporatore rotante e un flusso di azoto. Nel caso dell'estrazione con diclorometano vi è un'ulteriore fase di pulizia del campione ponendolo in una colonna cromatografica contenente Florisil ed eluendolo con una soluzione di acetato di etile ed esano 80:20 (v:v) prima di sciogliere i residui rimasti in colonna con acetonitrile. La soluzione in acetonitrile viene poi portata a piccolo volume mediante l'utilizzo di un evaporatore rotante, i residui ripresi, se necessario, con un'opportuna quantità di miscela eluente e, previa filtrazione su siringa munita di filtro, analizzati.

Le metodologie che utilizzano acetone hanno dei recuperi per l'Imidacloprid tra il 77 e l'87 % [73] e tra il 60 e il 71 % [74] per quanto concerne il Thiamethoxam con deviazioni standard relative in entrambi i casi attorno al 10 %. Nel caso dell'estrazione di Imidacloprid con diclorometano i recuperi si attestano tra il 68 e l'83 % con incertezza prossima al 10 % [75].

Le metodologie che si basano su una estrazione SPE seguita da una LLE sono le più comuni. In questi casi la prima estrazione avviene generalmente con a) una miscela 1:3 (v:v) di metanolo ed acqua [72, 76]; b) acetone [77, 78]; c) una miscela 2:1 (v:v) di acetonitrile ed acqua [79]. Dopo un mescolamento, effettuato manualmente o utilizzando un bagno ultrasonico o un frullatore, gli estratti vengono filtrati su Buchner con fondo ricoperto di Celite oppure, come nel caso c), centrifugati; in questo particolare caso prima della centrifugazione vengono aggiunti anche dei sali.

Nei metodi che utilizzano una miscela di metanolo ed acqua (caso a)), si elimina il metanolo utilizzando un evaporatore rotante e si pone la fase acquosa in una colonna ChemElut CE1020 successivamente eluita con diclorometano. Gli estratti vengono poi portati a secco mediante un evaporatore rotante e successivamente ripresi con una miscela di toluene ed acetato di etile in rapporto 85:15 (v:v) prima di essere posti in una seconda colonna contenente gel di silice ed eluiti con acetonitrile. Una volta portati nuovamente a secchezza gli estratti mediante evaporatore rotante essi devono essere ripresi con una miscela di acetonitrile ed acqua in rapporto 20:80 (v:v) prima dell'analisi.

Per quanto riguarda i metodi che utilizzano l'acetone per l'estrazione, il procedimento prosegue aggiungendo ai filtrati una soluzione coagulante lasciata poi a riposo per 30 minuti. La soluzione così ottenuta viene poi nuovamente filtrata su Celite. Dopo la filtrazione il campione viene diluito con una soluzione acquosa di cloruro di sodio al 2% (p:v) successivamente inserita in un imbuto separatore assieme a del diclorometano per l'estrazione liquido liquido. La fase organica, separata da quella acquosa, viene portata a secchezza

mediante un evaporatore rotante e/o un flusso di azoto. I residui così ottenuti vengono poi ripresi con un opportuno solvente prima di essere filtrati mediante una siringa munita di filtro ed analizzati.

Particolarmente complessa è la procedura estrattiva del caso c) a causa del gran numero di insetticidi estratti contemporaneamente con questa metodologia. Dopo la centrifugazione la parte surnatante viene prelevata e lasciata decantare in congelatore per una notte; l'estratto così ottenuto viene filtrato attraverso un batuffolo di cotone e centrifugato nuovamente con l'aggiunta anche in questo caso di sali e di alcuni composti assorbenti come la fase C18 e il Bondesil PSA. Terminata la centrifugazione il liquido surnatante viene prelevato ed acidificato mediante l'aggiunta di una soluzione al 5 % di acido formico in acetonitrile (v:v). Gli estratti vengono quindi portati a secco sotto flusso di azoto e ridisciolti in toluene.

I recuperi per i metodi riconducibili al caso a) sono dell'ordine del 98,6 % ($\pm 4,1$ %) [72] e del 101 % (incertezza non specificata) [76] per l'Imidacloprid. Per quanto riguarda i recuperi delle metodologie del caso b), quelli per l'Imidacloprid sono del 65 -67 % ($\pm 7 - 9$ %) [77] e dell'84,6 % ($\pm 6,3$ %) [78]. I recuperi di Thiamethoxam estratti mediante la metodologia riferibile al caso c) vanno dall'88 al 98 % con deviazioni standard relative dal 4 al 22 % [79].

La metodologia che sfrutta la MSPD [77] consiste nel porre le api, opportunamente macinate con un pestello in un mortaio assieme alla fase C18, all'interno di una colonna cromatografica di vetro vuota e successivamente eluita con una miscela di diclorometano e metanolo in rapporto 85:15 (v:v). L'estratto, ottenuto imponendo anche un leggero vuoto alla colonna, viene poi portato a secchezza mediante un flusso di azoto. Una volta ricostituito l'estratto con del metanolo esso viene filtrato mediante una siringa munita di filtro in teflon prima della procedura di analisi.

I recuperi dell'Imidacloprid per questa modalità estrattiva sono del 70 - 71% con una deviazione standard relativa tra il 6 e il 14 %.

1.5.2 Metodi di analisi dei principi attivi neonicotinoidi

Le metodologie d'analisi per questi principi attivi sono molteplici. La maggior parte degli autori utilizza la cromatografia liquida ad alta pressione per ottenere una separazione del principio attivo dal resto delle molecole presenti nel campione analizzato. Questa tecnica cromatografica viene utilizzata accoppiandola con un nutrito numero di diversi rivelatori: dallo spettrometro UV [75, 80-85], all'UV-DAD (Ultraviolet Diode Array Detection) [86-88],

all'hv – ED (Postcolumn Photochemical Reactor - Electrochemical Detector) [73, 74], al TLS (Thermal Lens Spectrometry) [89], allo spettrometro di massa. Quest'ultimo può esser collegato alla colonna cromatografica o tramite un sistema ESI (Electrospray Ionization) o tramite un sistema APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Gli spettrometri di massa utilizzati sono a tempo di volo e a quadrupolo e possono essere impiegati da soli [77, 90 - 94] o in tandem con un altro spettrometro di massa analogo [72, 76, 78, 95 - 98].

Solamente tre autori utilizzano la gascromatografia accoppiata in tutti i casi alla spettroscopia di massa [75, 99] (in un caso utilizzata in tandem [79]); questo non deve stupire essendo questi principi attivi decisamente poco volatili e stabili fino a temperature non eccessivamente elevate (vedi Paragrafo 1.2.3).

Ulteriori metodi di analisi più particolari sono presenti in letteratura ed alcuni di essi sono in grado di avvicinare le prestazioni dei metodi cromatografici o di rendere le analisi, considerando anche la preparazione dei campioni, più veloci. Tra questi vi sono due lavori che utilizzano un metodo voltammetrico, la DPV (Differential Pulse Voltammetry), con degli elettrodi o a base di pasta di carbonio [100] o a film di bismuto [101] per quantificare la presenza in varie matrici dei principi attivi indagati; oppure, sempre all'interno dello stesso gruppo di lavoro, viene applicata un'altra modalità di analisi effettuata mediante la DPP (Differential Pulse Polarography) [102] che viene descritta come semplice rapida e con delle prestazioni, a detta degli autori, migliori o analoghe di quelle ottenibili attraverso l'HPLC-DAD.

Un ulteriore metodo di analisi di tracce si propone di eliminare i procedimenti estrattivi e di analizzare direttamente i campioni attraverso un desorbimento diretto dei principi attivi dalla matrice mediante la tecnica DESI (Desorption Electro Spray Ionization) accoppiata a due spettrometri di massa in tandem [103].

Due sono inoltre i metodi biochimici proposti: il primo si basa sull'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) in cui vi è l'assorbimento dell'analita da parte di uno specifico enzima a cui, all'aumentare della concentrazione di analita, corrisponde un calo di assorbanza [104, 105] e il secondo è lo FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay) che si basa sul calo della fluorescenza, ottenuta con luce polarizzata, su una superficie di anticorpi specifici per l'analita le cui molecole vanno a scalzare da questi siti attivi le molecole della specie tracciante luminescente precedentemente legata agli anticorpi [106].

Un altro metodo particolare riportato in letteratura consiste nell'utilizzo di una microbilancia a cristalli di quarzo dotata di monostrati a "stampa molecolare" (MIMs, Molecular Imprinted Monolayer) costruiti in modo da avere dei siti di legame di forma

corrispondente alla sola molecola da indagare [107]; i diversi tempi necessari a generare uno specifico calo di frequenza determinano la concentrazione del principio attivo.

Le ultime due metodologie di analisi proposte si basano entrambe sull'utilizzo di sensori: nel primo caso l'analisi di questi principi attivi è effettuata tramite la FI-SPS (Flow Injection Solid Phase Spectroscopy) che utilizza un optosensore basato sulla fluorescenza fotochimicamente indotta o PIF (Photochemically Induced Fluorescence) [108]; questo metodo di analisi si basa sulla ritenzione selettiva in linea di un analita o di un suo derivato su un opportuno supporto solido e sulla misura diretta della sua emissione o del suo assorbimento di luce. Il secondo metodo si basa invece su nanosensori formati da Quantum Dot di CdTe che presentano o meno luminescenza a seconda della presenza o meno dello specifico analita; queste variazioni di luminescenza vengono poi misurate attraverso uno spettrofotometro UV [109].

Di questi metodi quelli con prestazioni migliori sono quelli che, dopo una separazione cromatografica effettuata mediante la cromatografia liquida, utilizzano due spettrometri di massa accoppiati in tandem; vi sono però anche dei parametri come i tempi di analisi, i costi e i trattamenti da operare sui campioni che non sono da trascurare e che possono far ricadere la scelta della metodologia di analisi verso altri tipi di strumentazione a seconda delle esigenze, dei mezzi a disposizione e dell'obiettivo prefissato.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

Apparati per misurazioni sul particolato atmosferico

- Campionatori di PM: - Zambelli Explorer Plus
- Zambelli ZB1
- Teste di prelievo per PM 10 e per PTS (per il particolato totale)
- “PCIS” Personal Cascade Impactor Sampler
- Contatore ottico di particelle (OPC) Grimm, modello 1.108
- Filtri in fibra di vetro Whatman GF/C, diametro 47 mm, porosità 1,2 µm
- Filtri in Teflon SKC, diametro 25 mm, porosità 3,0 µm
- Filtri in Teflon SKC, diametro 37 mm, porosità 2,0 µm
- Anemometro (modello Darcy) con registratore dati Solomat MPM 4000
- Cabina per il condizionamento dei filtri QBOX³ Momo Line

Sistema cromatografico UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) XR - Prominence Shimadzu

- Sistema di pompaggio LC-20AD XR
- Degasatore DGU-20A3
- Iniettore automatico SIL-20AC XR
- Forno termostato per colonne CTO-20A
- Rivelatore diodi – array SPD- M20A
- Modulo gestione CBM-20A
- Software di gestione “LC Solution”
- Colonna: Shimadzu XR-ODS II (2,2 µm, 2 x 100 mm)
- Precolonna: Phenomenex Security Guard - Phenomenex ODS (4 x 2,0 mm)
- Miscela eluente: acetonitrile – acqua MilliQ
- Flusso: 0,4 mL/min
- Temperatura colonna: 45 °C

Attrezzatura da laboratorio

- Bilancia analitica Ohaus AP250D con limite di sensibilità di 0,01 mg
- Forno termostato Binder

- Bagni Ultrasonici: - Transsonic Digital Elma
- Soltec Sonica MOD 3300M
- Centrifughe: - Centrifuge MOD 3226
- Hettich zentrifugen MIKRO 120
- Evaporatore rotante Heidolph VV2000 con pompa da vuoto Vacuubrand CVC 2 II
- Liofilizzatore con pompa Speedvac Edwards High Vacuum Pump MOD: ED200A
- Agitatore magnetico IKAMAG RCT
- Sistema di filtrazione eluenti SUPELCO con filtro in nylon 66 (diametro 47 mm) con pori da 0,45 μm
- Micropipette tarate Gilson P20, P100, P200, P1000 e P5000, con puntali monouso
- Pipette tarate classe A da 10 e 20 mL
- Matracci tarati da 10, 50 e 100 mL classe A
- Beute, becker, palloni, imbuti di vetro e vetrini da orologio di varie dimensioni
- Siringhe in polipropilene con ago in acciaio
- “Ago-micropipetta” costituito da un ago in acciaio collegato mediante ad un tubetto capillare in PVC ad un puntale per micropipetta con entrambe le giunzioni sigillate mediante colla indurente e parafilm.



- Filtri per siringa in PVDF (poliviniliden fluoruro) Millex-HV (diametro 4 mm) con diametro pori da 0,45 μm e Phenomenex (diametro 4 mm) con diametro pori da 0,20 μm
- Filtri per siringa in PTFE (politetrafluoroetilene) Millex-FH diametro 4 mm e diametro pori 0,50 μm
- Pinze e spatoline in acciaio
- Provette da 25 mL in vetro con tappi a vite in plastica fenolica con inserto in gomma ricoperto in PTFE
- Provette da 10 mL in polipropilene con tappi a pressione e a vite
- Fiale: - Wheaton di vetro da 4 mL con tappo a vite in TFE e gomma
- Chromacol di vetro da 1,5 mL con tappo a vite e setto in PTFE
- Microprovette Eppendorf da 1,5 mL

- Gooch G3
- Setacci Endecotts Test Sieve da 200 mm di diametro con fori da 1,00 e 2,00 mm e relativo fondo contenitore per il setacciato.
- Vaschette per pesate Sigma-Aldrich in polistirene

Reagenti e principi attivi impiegati

- Acetonitrile: LiChrosolv® gradient grade per cromatografia liquida, purezza: $\geq 99,9\%$
- Metanolo: HiPerSolv Chromanorm VWR per HPLC gradient grade, purezza $\geq 99,8\%$
- Acqua MilliQ: prodotta con apparecchiatura Millipore MilliQ
- Acetone: Fluka, Riedel De Haen, Pestanal, per analisi di residui, purezza $\geq 99,8\%$
- Diclorometano: Riedel De Haen stabilizzato con amylene (approssimativamente 25 mg/L), Pestanal, purezza $\geq 99,8\%$
- Etere etilico: Fluka, per analisi di residui, purezza $\geq 99,8\%$
- Pentano: Fluka (Chemica), purezza $\geq 98,0\%$
- Thiamethoxam (Purezza: 99,7%) Fluka Analytical, Pestanal
- Clothianidin (Purezza: 99,9%) Fluka Analytical, Pestanal
- Imidacloprid (Purezza: 99,9%) Fluka Analytical, Pestanal
- Acetamiprid (Purezza: 99,9%) Fluka Analytical, Pestanal
- Thiacloprid (Purezza: 99,9%) Fluka Analytical, Pestanal
- Fipronil (Purezza: 97,6%) Fluka Analytical, Pestanal

Sementi utilizzate

Tutte le sementi utilizzate nei diversi esperimenti sono sementi di tipo “Hi-Bred” conciate e distribuite da “Pioneer Italia”. Le sementi sono state fornite dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali al Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell’Università di Padova, per esclusivo uso sperimentale.

Le sementi utilizzate sono:

- sementi conciate Cruiser 350 FS (Syngenta), p.a. di concia Thiamethoxam, in dose nominale di 1,0 mg/semi (concia 2009) e 0,60 mg/semi (concia 2010);
- sementi conciate Poncho (Bayer Cropscience), p.a. di concia Clothianidin, in dose nominale di 1,25 mg/semi (conce 2009 e 2010);
- sementi conciate Gaucho 350 FS (Bayer Cropscience), p.a. di concia Imidacloprid, in dose nominale di 0,5 mg/semi (concia 2009) e 1,00 mg/semi (concia 2010);

- sementi conciate con Regent 500 FS (prodotto da BASF Italia), principio attivo di concia Fipronil, in dose nominale di 0,50 mg/semi.
- Sementi conciate Celest XL (concia 2009 e 2010)

Ogni tipo di semente utilizzata contiene inoltre all'interno della concia una miscela fungicida (denominata Celest XL) costituita dai principi attivi Fludioxonil e Metalaxyl.

2.2 Procedure Sperimentali

2.2.1 Preparazione di soluzioni standard ad elevata concentrazione dei diversi p.a.

La preparazione delle soluzioni madre dei diversi p.a. si attua sciogliendo una quantità nota degli stessi, in formulazione solida ad elevato grado di purezza (> 99,7 %, solo per Fipronil la purezza è del 97,6 %) in una quantità misurata di liquido. Il composto, in polvere, viene pesato mediante una bilancia con sensibilità di 0,01 mg su vaschetta in polistirene utilizzando una pinzetta in acciaio per i suoi spostamenti e una palettina in acciaio per il caricamento delle polveri. La polvere così pesata viene quindi trasferita quantitativamente in un matraccio da 100 mL servendosi anche di un imbuto di vetro e portando poi a volume con metanolo puro. Il matraccio viene quindi chiuso con tappo in polietilene e sigillato esternamente con del Parafilm. La soluzione viene conservata in frigorifero a 4 °C.

2.2.2 Preparazione di soluzioni standard per la calibrazione strumentale

Le soluzioni standard a bassa concentrazione nei diversi p.a. per la determinazione delle funzioni di calibrazione strumentali vengono preparate mediante opportuna diluizione della soluzione madre. Una determinata aliquota di questa viene trasferita in un matraccio da 10 ml attraverso l'utilizzo di micropipette tarate dotate di puntale monouso. Si porta infine a volume con metanolo ed acqua MilliQ in modo da ottenere una soluzione finale al 50 % in volume in entrambi i solventi, chiudendo poi il matraccio con tappo in polietilene e sigillando ulteriormente l'esterno dell'imboccatura con del Parafilm. La soluzione viene conservata in frigorifero a 4 °C. Nel presente lavoro, per le normali determinazioni quantitative di p.a. insetticidi mediante UFLC sono state impiegate soluzioni standard a 0,200 - 0,400 - 0,600 - 0,800 - 1,000 - 5,000 - 10,000 mg/L.

Soluzioni standard più diluite (0,025 - 0,050 - 0,100 - 0,200 mg/L) sono invece state preparate per la calibrazione strumentale finalizzata alla determinazione del LOD.

2.2.3 Analisi del contenuto di p.a. in diverse matrici ambientali mediante HPLC

Il sistema cromatografico Shimadzu, dotato di rivelatore UV-DAD (Diode Array Detector), opera a maggiori pressioni rispetto ai tradizionali HPLC e può utilizzare quindi colonne ad altissima efficienza per ottenere risoluzioni elevate in tempi brevi.

Il sistema cromatografico, dotato di autocampionatore, prevede che i campioni siano precedentemente caricati in fiale di vetro da 1,5 mL dotate di un opportuno setto forabile che vengono successivamente collocate in posizioni ben definite del cassetto di caricamento in modo da far corrispondere ad una determinata posizione un determinato campione. Il campione deve essere in soluzione liquida e non deve presentare frazioni solide in soluzione, per non correre il rischio che l'eventuale particolato solido presente sia iniettato in colonna o vada ad otturare l'ago di prelievo o qualcuno dei tubi capillari da 0,1 mm di diametro che collegano il sistema di iniezione alla colonna cromatografica.

La determinazione quantitativa dei p.a. nei campioni analizzati sfrutta il metodo della retta di taratura (calibrazione esterna), effettuando quindi preventivamente una serie di misure su soluzioni standard a concentrazione nota preparate in una soluzione in rapporto 1:1 (v:v) di metanolo e acqua MilliQ.

Per ottenere una risposta strumentale ottimale i campioni devono essere preparati in miscela metanolo-acqua con un contenuto in metanolo che non sia superiore al 50% in volume per evitare sdoppiamento o allargamento dei picchi cromatografici. Tale accortezza deve essere presa anche se può esser causa di una diluizione dei campioni.

L'identificazione dei diversi principi attivi viene effettuata sfruttando il rivelatore DAD, impostato per registrare lo spettro delle sostanze eluite fra i 200 ed i 300 nm, corrispondente alla finestra utile per riconoscere i p.a. in questione. Vengono impostati da uno a quattro canali d'acquisizione del segnale strumentale a lunghezze d'onda diverse, corrispondenti circa alle λ massime d'assorbimento di ogni principio attivo o ad un massimo relativo (tabella 2.1).

Tabella 2.1: $\lambda_{\max}$ d'assorbimento per i p.a. indagati

Principio Attivo	$\lambda_{\max}$ d'assorbimento (nm)
Thiamethoxam	252
Clothianidin	269
Imidacloprid	269
Acetamiprid	244
Thiacloprid	244
Fipronil	210*

* Per il metodo "Vecchio" era di 215 nm

Ogni analisi viene svolta in doppio, ossia si operano due determinazioni cromatografiche per ogni singolo campione.

2.2.4 Preparazione di diverse matrici all'analisi dei p.a. insetticidi

La preparazione per l'analisi di tutti i tipi di matrice consta di un processo in tre fasi:

- 1) preparazione dei campioni all'estrazione;
- 2) estrazione vera e propria dei principi attivi effettuata mediante l'aggiunta di un'opportuna quantità di metanolo, trattamento in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti, aggiunta di una pari aliquota di H₂O MilliQ e ulteriore trattamento di sonicazione per 30 minuti attendendo sempre, dopo ogni trattamento ultrasonico, di operare su soluzioni a temperatura ambiente;
- 3) purificazione dei campioni prima dell'analisi mediante filtrazione su filtri con pori da 0,45 o da 0,20 µm preceduta in alcuni casi da una centrifugazione;

a) Preparazione dei semi di mais conciato

La preparazione dei campioni si attua ponendo un seme, di dimensioni medie e dalla pellicola di concia intatta, all'interno di una fiala di vetro da 25 mL. Per la procedura estrattiva si utilizzano 10 mL di metanolo e altrettanti mL di acqua MilliQ. La purificazione dei campioni si attua filtrando su filtri in PVDF con pori da 0,20 µm. Prima dell'analisi si effettua una diluizione prelevando 10 µL di liquido poi portati a 500 µL in una fiala di vetro da 1,5 mL con tappo a vite e setto in teflon mediante l'aggiunta di 490 µL di soluzione al 50% (v:v) di metanolo e acqua MilliQ.

b) Preparazione delle polveri di concia

Le polveri di concia dei semi per l'analisi vengono ottenute setacciando due sacchi di sementi di mais per ogni principio attivo (concia 2010) mediante l'utilizzo di setacci sovrapposti con fori da 2,00 e 1,00 mm raccogliendo il setacciato con un foglio di alluminio. Le polveri così ottenute vengono poi pesate su vetrino d'orologio evitando i pezzetti di seme eventualmente presenti e successivamente trasferite quantitativamente in una fiala da 25 mL. Per l'estrazione si utilizzano 10 mL di metanolo e altrettanti di H₂O MilliQ. I campioni così ottenuti vengono filtrati mediante filtri in PVDF da 0,20 µm prima di una diluizione 1:50 effettuata con l'ausilio di una soluzione di metanolo e H₂O MilliQ in rapporto 1:1 (v:v).

c) Preparazione delle polveri aerodisperse raccolte su filtri per il campionamento del particolato atmosferico

I filtri provenienti dai diversi tipi di campionamento vengono introdotti interi in fiale di polipropilene da 10 mL. La procedura di estrazione dei p.a. in essi contenuti si differenzia in base al tipo di campionamento effettuato:

- i) con i filtri in fibra di vetro provenienti dai campionamenti isocinetici l'estrazione viene effettuata aggiungendo 5 mL di metanolo e altrettanti di H₂O MilliQ;
- ii) con i filtri in fibra di vetro provenienti dal campionamento delle polveri totali (PTS) e PM 10 si utilizzano 2,5 mL di metanolo e analoghe quantità di acqua;
- iii) con i filtri in Teflon provenienti dai campionamenti con PCIS si utilizzano 2 mL di metanolo e 1 mL di acqua MilliQ.

Il trattamento finale di filtrazione con siringhe munite di filtri in PVDF con diametro dei pori da 0,20 µm è comune a tutti i filtri.

d) Preparazione dei campioni di gocce di guttazione fogliare

Per questo tipo di campione non è necessario alcun tipo di estrazione ma ci si limita ad un trattamento di pulizia del campione effettuato mediante filtrazione tramite filtri in PVDF con pori da 0,45 o 0,20 µm preceduta, quando possibile, da un trattamento in centrifuga a 10.000 giri/min per 10 minuti. Nel caso invece non sia disponibile un sufficiente volume di campione si procede prelevando la maggior quantità misurabile possibile di campione tramite micropipette tarate e aggiungendovi un'opportuna aliquota di acqua MilliQ tale da far raggiungere alla soluzione così ottenuta il volume minimo di 500 µL prima del passaggio in centrifuga e/o della filtrazione.

e) Preparazione all'analisi di una singola ape (metodo ottimizzato nel Paragrafo 3.2)

La preparazione ottimizzata per una singola ape consta di un processo preparativo, preventivo all'estrazione, che prevede il congelamento dell'ape, posta all'interno di una fiala di vetro da 4 mL con tappo a vite, a -20 °C per alcune ore prima di un trattamento di liofilizzazione della durata di 16 ore. L'estrazione dei p.a. si effettua, dopo aver sminuzzato l'ape con una palettina metallica, mediante l'aggiunta di 0,5 mL di metanolo prima e di 0,5 mL di H₂O MilliQ poi, entrambe seguite da un trattamento di 30 minuti in bagno ad ultrasuoni. La purificazione dell'estratto si attua centrifugandolo per 60 minuti a 10.000 giri al minuto e successivamente filtrando il liquido ottenuto mediante filtri in PVDF con pori del diametro di 0,20 µm prima dell'analisi cromatografica.

f) Preparazione di campioni costituiti da 20 api (contemporaneamente)

Per la preparazione all'analisi da un numero cospicuo di api, contenenti dei principi attivi neonicotinoidi in tracce, si opera ponendo venti api all'interno di una fiala in vetro con tappo a vite da 25 mL e, dopo un trattamento di liofilizzazione della durata di circa 16 ore (una notte) si frantumano le api mediante una palettina di acciaio. Il trattamento estrattivo avviene con l'ausilio di 5 mL di metanolo ed altrettanti di acqua MilliQ. Dal sistema vengono prelevati sei campioni da 1 mL ciascuno successivamente purificati tramite centrifugazione a 10.000 giri/min. e conseguente filtrazione con filtri in PVDF e pori da 0,20 µm.

2.2.5 Verifica qualitativa della metodica di preparazione da campioni di 20 api (Paragrafo 2.2.4 - f)

Nella fiala da 25 mL contenete i frammenti di api e circa 4 mL di estratto, rimasto dopo i prelievi (come descritto nel Paragrafo 2.2.4 – f), si aggiungono 6 mL di metanolo in modo da raggiungere un volume totale di solvente all'interno della fiala di circa 10 mL. I pezzetti di ape presenti nella fiala vengono lasciati sotto agitazione magnetica in questa soluzione per una notte. La miscela risultante viene centrifugata a 3.000 giri/min per circa 30 minuti. Tale processo estrattivo viene effettuato altre due volte variando i tempi per i trattamenti; innanzitutto si aggiungono al residuo di api 5 mL di metanolo per ognuna di queste nuove estrazioni e poi si lasciano sotto agitazione magnetica per 5 minuti centrifugando infine il tutto per 10 minuti. Gli estratti così ottenuti vengono filtrati mediante gooch G3, collegato ad un sistema da vuoto, e raccolti in un pallone da 50 mL lavando sempre il gooch con metanolo. Il pallone contenente i tre estratti si collega quindi ad un evaporatore rotante e il liquido al suo interno viene ridotto fino a 2 mL (principalmente costituiti da acqua). Il liquido risultante viene quindi travasato in un cilindro graduato tramite pipetta Pasteur per misurarne approssimativamente il volume e ad esso si aggiungono i 2 mL di metanolo utilizzati per lavare tutto il deposito presente sulle pareti del palloncino. Della soluzione così ottenuta, filtrata mediante siringa con filtri a porosità 0,45 µm in PTFE, 1 mL viene travasato in una microprovetta Eppendorf e centrifugato per 60 minuti a 10.000 giri al minuto. Dopo una ulteriore filtrazione mediante siringa dotata di filtri in PVDF con pori del diametro di 0,20 µm si pone quanto ottenuto in una fialetta in vetro da 1,5 mL con tappo a vite e setto in Teflon per l'analisi liquido cromatografica.

2.2.6 Campionamento del particolato durante simulazioni di semina di mais conciato

Per il campionamento delle polveri aerodisperse, generate durante l'attività di semina di mais conciato con p.a. insetticidi, sono stati effettuati quattro esperimenti di simulazione di semina nei terreni adiacenti la serra entomologica del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali. Questi esperimenti hanno avuto luogo a gruppi di due nei giorni 12 maggio 2010, e il 26 maggio 2010, caratterizzati da cielo sereno, e in condizioni di vento lieve nel primo giorno e variabile a folate nel secondo.

Le prime due simulazioni di semina sono state effettuate utilizzando mais conciato "Poncho" distribuito da Pioneer Italia (p.a. di concia Clothianidin – 1,25 mg/seme) confettatura 2009 prima e confettatura 2010 poi, seminati simulando le normali condizioni agronomiche tramite una seminatrice pneumatica "Monosem NG PLUS". Per questi esperimenti si è provveduto a disporre la seminatrice in campo collegandone il meccanismo di distribuzione del seme, mediante un giunto cardanico, ad un secondo trattore posto in posizione perpendicolare al primo e dal lato opposto rispetto al bocchettone di uscita dell'aria generata dalla ventola di aspirazione messa in moto dal primo trattore. Le ruote della seminatrice erano rialzate da terra in modo da poter girare a vuoto annullando quindi la formazione di polveri dal terreno.

Le condizioni di semina adottate sono state di 22 cm come distanza interseme per una densità di semina approssimativa di 60.600 semi/ha. La velocità di semina del trattore è stata di 11 Km/h e il tempo di semina per ettaro di 18 minuti (calcolato considerando una distanza interfila di 75 cm).

Nelle semine del 26 maggio sono invece state utilizzate nell'ordine prima sementi di mais conciato "Regent 500 FS" distribuito da Pioneer Italia (p.a. di concia Fipronil – 0,5 mg/seme, concia 2010) e poi "Cruiser 350 FS" distribuito da Pioneer Italia (p.a. di concia Thiamethoxam – 0,6 mg/seme, concia 2010), seminato con la stessa seminatrice descritta sopra, con condizioni di semina di 20 cm come distanza interseme per una densità di semina totale di 66.667 semi/ha. In questa semina la velocità di avanzamento del trattore è stata di 9,5 Km/h ed il tempo di semina per ettaro di 22 minuti (calcolato considerando una distanza interfila di 75 cm).

In entrambi gli esperimenti tra una semina e l'altra è stata fatta lavorare la seminatrice per 30 minuti a vuoto per pulire il sistema pneumatico prima della semina successiva.

I campionamenti effettuati sono stati di tre tipi:

a) Campionamento del particolato all'uscita dell'aspiratore centrifugo della seminatrice

Preventivamente al campionamento vero e proprio è stata effettuata una misura della velocità dell'aria in uscita dallo scarico dell'aspiratore centrifugo collegato al trattore con la seminatrice non in funzione, al fine di impostare il campionamento delle polveri in regime isocinetico e valutare la portata del sistema di aspirazione e distribuzione dei semi.

La velocità dell'aria in uscita è stata determinata mediante un misuratore di flusso Darcy.

Nel caso del secondo esperimento (quello del 26 maggio) è stata effettuata una seconda misurazione del flusso anche prima della seconda simulazione di semina.

L'emissione di polveri generate dalla semina all'altezza dello scarico d'aria è stata misurata attraverso un campionatore di particolato totale (PTS) equipaggiato con un campionatore Zambelli ZB-1 (regolato, in base ai dati ottenuti dalle misure di velocità, ad un flusso di aspirazione di circa 11 L/min nel primo esperimento e di 8 L/min nel secondo) ed un ugello di 5 mm di diametro per poter effettuare i campionamenti in condizioni isocinetiche.

Durante il primo esperimento l'aria in uscita dalla seminatrice veniva convogliata verso le teste di prelievo del campionatore attraverso un tubo di gomma con anima in ferro (diametro interno 20 cm) mantenuto in posizione rettilinea ed orizzontale, per cercare di evitare fenomeni di accumulo delle polveri lungo il tubo stesso. Nel secondo esperimento il tubo morbido è stato sostituito con uno rigido di analogo diametro interno ma più lungo e con le pareti interne lisce per cercare di ridurre sia la deposizione di particolato sulle pareti che le turbolenze nel flusso d'aria.

In entrambi gli esperimenti la testa di campionamento è stata posta nella zona della parte terminale del tubo in cui la velocità del flusso dell'aria rimaneva maggiormente costante.

Le prove sono state eseguite con un tempo di campionamento di 5 minuti in entrambi i casi ma nel secondo esperimento questo campionamento è stato effettuato due volte.

b) Valutazione del particolato a 5 e 10 metri dalla seminatrice

Nel primo esperimento, quello del 12 maggio, per il campionamento del particolato atmosferico a 5 metri di distanza dal trattore sono stati utilizzati: un campionatore fisso per le PTS (polveri totali sospese) con pompa Zambelli ZB1 impostata per un flusso di aspirazione di 25 L/min e due impattori multistadio PCIS (flusso di 9 L/min). Per il campionamento del particolato atmosferico a 10 metri di distanza dal trattore sono stati utilizzati: un campionatore fisso per le PTS (polveri totali sospese) con pompa Zambelli ZB1 impostata per un flusso di aspirazione di 25 L/min.

Nel secondo esperimento, invece, a 5 metri dalla seminatrice sono stati utilizzati un campionatore per le PTS con pompa Zambelli ZB1 impostata ad un flusso di aspirazione di 20 L/min e un campionatore multistadio PCIS con pompa impostata ad un flusso di aspirazione di 9 L/min. Sempre in questo esperimento a 10 metri dal trattore sono stati posizionati un campionatore per le PTS con pompa Zambelli ZB1 impostata ad un flusso di aspirazione di 20 L/min e un campionatore per il PM 10 con sistema Zambelli Explorer plus impostato ad un flusso di aspirazione di 38,3 L/min.

Per tutte e quattro le prove di semina i campionamenti sono durati 30 minuti.

I filtri utilizzati durante le varie prove, in fibra di vetro e Teflon, sono stati subito prelevati con pinze metalliche e richiusi nelle proprie scatole di plastica. Tali filtri venivano poi conservati in frigorifero a 4 °C in vista della successiva analisi.

c) Determinazione della distribuzione dimensionale di particelle emesse durante il funzionamento di una macchina seminatrice

La misura del numero di particelle presenti per unità di volume d'aria durante la semina, distinte per classe dimensionale, è stata effettuata tramite un contatore ottico OPC – Grimm. Lo strumento utilizzato può dividere le particelle rilevate fino ad un massimo di 15 intervalli (classi dimensionali), tra gli 0,3 e i 30 µm. Tramite una preventiva misura del numero di particelle presenti in aria con la seminatrice in funzione senza semi, è stato possibile determinare l'effettivo numero di particelle emesse in aria dalla semina di mais conciato, distinte per classe dimensionale.

Tali rilevamenti sono stati compiuti a 5 metri dallo scarico dell'aria della seminatrice e a un metro d'altezza nel primo esperimento (12 maggio 2010) e a 5 e a 10 metri dalla seminatrice e a varie altezze ossia a 1, 2, 2,5 e 3,5 metri dal suolo nel secondo (26 maggio 2010).

3 OTTIMIZZAZIONE DEI METODI

3.1 Ottimizzazione del metodo cromatografico

Il metodo per l'identificazione e la conseguente determinazione quantitativa dei p.a. insetticidi Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid e Fipronil in matrici di diverso tipo è stato ottimizzato a partire da una metodica sviluppata in un lavoro di tesi precedente [110] e dopo la consultazione di diverse pubblicazioni scientifiche in tale ambito (vedi Paragrafo 1.5).

L'utilizzo della cromatografia liquida ad elevate prestazioni (UFLC) con sistema di rivelazione UV-DAD permette un'efficace separazione dei sei p.a. eventualmente presenti in uno stesso campione ed il loro sicuro riconoscimento attraverso l'analisi dello spettro d'assorbimento dei picchi registrati nei cromatogrammi. Mediante le procedure qui ottimizzate (i cui dettagli sono riportati di seguito) l'identificazione e la quantificazione dei p.a. è infine risultata sufficientemente agevole per qualsiasi tipo di matrice analizzata, seppur con qualche difficoltà in più nel caso delle analisi sulle api; anche in questi casi è stato comunque possibile determinare con certezza i composti senza dover ricorrere a strumentazioni più costose e sofisticate (LC-MS) e/o alla rianalisi dei campioni mediante aggiunte standard come era invece necessario per altre metodiche [110].

La metodologia da cui si è partiti per l'ottimizzazione utilizzava le condizioni di flusso e temperatura descritti nel Paragrafo 2.1 con il programma di eluizione riportato in tabella 3.1.

Tabella 3.1: Programma di eluizione per il metodo “Vecchio”

Metodo (p.a. rivelati)	Tempi (min.)	Variazione della % di acetonitrile
“Vecchio” (Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid e Fipronil)	0 – 0,50	30
	0,50 – 1,50	30 – 100
	1,50 – 3,00	100
	3,00 – 3,50	100 – 30
	3,50 – 5,00	30

Questo metodo, molto rapido e dalle buone prestazioni per matrici semplici e per le concentrazioni a cui era impiegato (solitamente maggiori di 1 mg/L), non era però adatto alle nostre esigenze ed in particolare alle matrici complesse su cui operavamo (come vedremo nel Paragrafo 3.2).

A seguito di numerosi test si è visto che la migliore efficienza cromatografia, in termini di risoluzione e di minimizzazione di interferenze cromatografiche, si otteneva andando ad

ottimizzare il programma di eluizione della miscela acqua/acetonitrile. In tal modo si è giunti a sviluppare un metodo di analisi, riportato come Metodo 1 nella tabella 3.2 assieme al relativo programma di eluizione dei solventi, in grado di fornire ottime prestazioni per le diverse matrici indagate contenenti tutti e sei i p.a. anche a basse concentrazioni.

Poiché i campioni reali contenevano solamente alcuni dei p.a. (ad esempio nelle gocce di guttazione potevano esserci solo Thiamethoxam, Clothianidin e Imidacloprid), dal Metodo 1, della durata di 8 minuti, si sono poi sviluppati altri tre metodi (Metodi 2 - 4 di tabella 3.2) in modo da ridurre i tempi di analisi da 1 a 4,5 minuti rispetto agli 8 iniziali.

Infine, per quanto riguarda il Fipronil, in base all'osservazione del suo spettro di assorbimento UV, si è deciso di modificare leggermente la lunghezza d'onda a cui registrare il suo cromatogramma (da 215 a 210 nm).

Tabella 3.2: Programmi di eluizione per i metodi ottimizzati

Metodo (p.a. rivelati)	Tempi (min.)	Variazione della % di acetonitrile
1 (Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid, Acetamiprid, Thiacloprid e Fipronil)	0 – 2,65	16 - 41
	2,65 – 2,70	41 – 66,5
	2,70 – 4,55	66,5 – 68,5
	4,55 – 4,60	68,5 – 100
	4,60 – 5,20	100
	5,20 – 5,25	100 – 16
	5,25 – 8,00	16
2 (Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid e Fipronil)	0 – 2,05	16 – 36
	2,05 – 2,10	36 – 66,5
	2,10 – 3,95	66,5 – 68,5
	3,95 – 4,00	69,5 – 100
	4,00 – 4,60	100
	4,60 – 4,65	100 – 16
	4,65 – 7,00	16
3 (Thiamethoxam, Clothianidin e Imidacloprid)	0 – 2,10	16 – 36
	2,10 – 2,15	36 – 100
	2,15 – 2,60	100
	2,60 – 2,65	100 – 16
	2,65 – 5,00	16
4 (Fipronil)	0 – 1,10	67 – 70
	1,10 – 1,15	70 – 100
	1,15 – 1,50	100
	1,50 – 1,60	100 – 67
	1,60 – 3,50	67

A titolo di esempio sono riportati due cromatogrammi riferiti al Metodo 1 e al Metodo 4 riportati nelle figure 3.1 e 3.2.

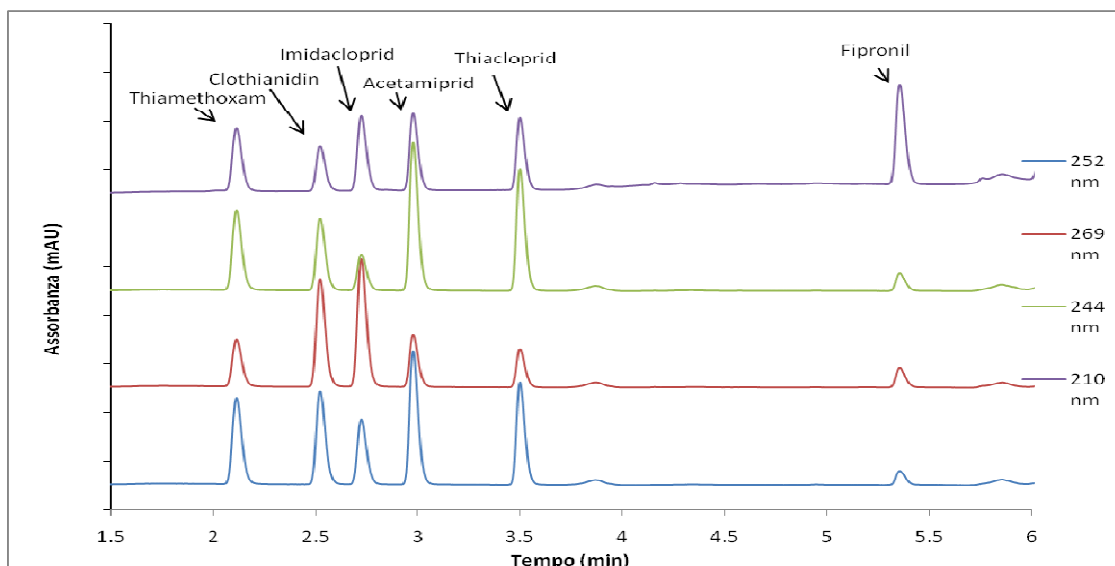


Figura 3.1: Cromatogramma esemplificativo a una concentrazione di 5 mg/L per il Metodo 1

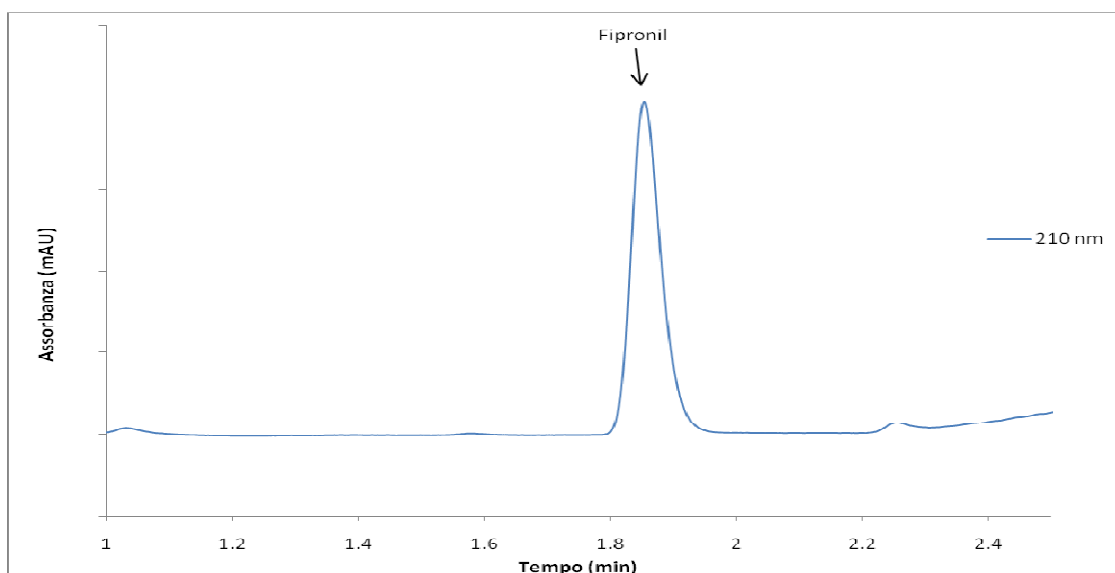


Figura 3.2: Cromatogramma esemplificativo a una concentrazione di 5 mg/L per il Metodo 4

I tempi di ritenzione per queste metodologie sono riportati in tabella 3.3.

Tabella 3.3: Tempi di ritenzione per i metodi utilizzati

Principio Attivo	Tempo di ritenzione (min)				
	Metodo "Vecchio"	Metodo 1	Metodo 2	Metodo 3	Metodo 4
Thiamethoxam	1,030	2,100	2,105	2,100	-
Clothianidin	1,290	2,530	2,515	2,520	-
Imidacloprid	1,450	2,735	2,715	2,720	-
Acetamiprid	1,615	2,990	-	-	-
Thiocloprid	2,080	3,510	-	-	-
Fipronil	2,960	5,355	4,780	-	1,875

3.2 Ottimizzazione del metodo estrattivo dei principi attivi dalle api

La progettazione di un nuovo metodo di estrazione dei principi attivi dalle api adatto alla nostra strumentazione ed economicamente e temporalmente vantaggioso è stata fatta basandosi su una approfondita ricerca bibliografica riguardante sia le caratteristiche chimico-fisiche di questi composti che i metodi finora utilizzati per l'estrazione da una matrice complessa e non convenzionale quale le api (vedi Paragrafi 1.2.3 e 1.5).

I coefficienti di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}) dei sei principi attivi indagati (a pH 7 e a 20°C) riportati nel Paragrafo 1.2.3 indicano che tali composti, ad eccezione del Fipronil (l'unico principio attivo non facente parte della famiglia dei neonicotinoidi), presentano una buona o discreta solubilità in acqua.

Tra i solventi organici, l'acetone è quello che presenta le migliori proprietà solvatanti per tutti i principi attivi con solubilità (a 20°C) che vanno dai 15,2 g/L del Clothianidin ai quasi 600 g/L per il Fipronil [26]. Buoni solventi sono anche il metanolo ed il cloruro di metilene. Questi solventi sono stati quindi testati nel corso del lavoro.

È da sottolineare che generalmente i metodi reperiti in letteratura utilizzano una certa quantità in grammi di api e richiedono un numero elevato di passaggi e non sempre sono accompagnati da recuperi soddisfacenti. I campioni utilizzati possono essere api “fresche” (ossia api senza alcun trattamento se non un congelamento per la loro conservazione), api liofilizzate o api “cotte” (ovvero api che subiscono un trattamento termico in stufa per alcune ore in modo da essere estratte secche) che vengono poi trattate integre o sminuzzate con tecniche diverse ed in seguito sottoposte ad estrazione con solventi o poste in colonne.

Tali metodi, laboriosi seppur efficaci, non si rivelavano idonei all'obiettivo della presente tesi in quanto lo scopo è stato quello di approntare un metodo di analisi su singola api per studi relativi alla valutazione di contaminazioni a partire da livello della LD₅₀ fino alle quantità con cui normalmente vengono in contatto nei campi. Si sono pertanto pianificate inizialmente differenti prove in cui si sono variati parametri quali solvente, tempo, temperatura ed altri ancora, in modo da individuare le migliori condizioni sperimentali per il raggiungimento dello scopo prefissato.

3.2.1 Valutazione del trattamento termico delle api sul processo estrattivo

Una prima serie di prove di analisi è stata effettuata utilizzando un metodo utilizzato in precedenza nel nostro laboratorio opportunamente adattato per l'utilizzo su singola ape

diminuendo proporzionalmente i volumi di estraente [110]. Si è valutato singolarmente il recupero su dodici api morte per congelamento ciascuna drogata con tutti i sei principi attivi. Tre api contenevano rispettivamente 0 ng (bianco), tre 100 ng, tre 200 ng e le ultime tre 400 ng di ciascun principio (eccezion fatta per il Clothianidin la cui quantità era all'incirca la metà). Le api, ognuna nella propria fiala, sono state essiccate mediante trattamento termico in stufa a 100 °C per due ore ed è quindi stato effettuato il procedimento estrattivo descritto nel Paragrafo 2.2.4. Per la loro purificazione gli estratti, dall'aspetto torbido e di colore dal giallo al marrone, sono stati filtrati su filtro in polivinilidenfluoruro (PVDF) da 0,45 micron ed analizzati. In tali prove, durante il trattamento dei campioni sono stati riscontrati i seguenti problemi:

- a) la non essiccazione completa delle api nelle 2 ore previste dal metodo che hanno portato ad un allungamento del periodo del trattamento termico di circa 5 ore rispetto al previsto sempre ad una temperatura di circa 100 °C;
- b) difficoltà nella fase di frantumazione a causa della presenza di agglomerati di color giallastro, probabilmente formati da residui zuccherini (miele fondamentalmente) e/o paraffinici, all'interno dell'addome di alcune delle api;
- c) la presenza nei cromatogrammi di un forte effetto matrice e la quasi totale assenza dei principi attivi negli estratti.

Le ipotesi avanzate per una plausibile spiegazione del non recupero dei principi attivi negli estratti analizzati sono state due:

- 1) un effetto dovuto alla temperatura che poteva causare una parziale evaporazione dei principi attivi e/o una loro degradazione (seppur i dati relativi alla stabilità di questi composti alla temperatura e alla loro scarsa volatilità non propendessero per quest'ipotesi essendo persino tutte le temperature di fusione superiori ai 100°C tranne per l'Acetamiprid [26]);
- 2) un effetto dovuto ad interazioni con la matrice o a decomposizioni delle molecole da noi ricercate ad alte temperature se combinate con i sistemi biologici in esame.

E' stato quindi effettuato un test di resistenza dei principi attivi alla temperatura ponendo in stufa a 110 °C per 24 ore una fiala lasciata aperta e contenente una soluzione in acqua MilliQ e metanolo in rapporto 1:1 (v:v) a circa 0,4 mg/L di concentrazione per ogni p.a. (0,2 mg/L nel caso del Clothianidin). Terminato il trattamento il contenuto della fiala è stato ripreso con 0,5 mL di MeOH e 0,5 mL di H₂O MilliQ prima di essere vigorosamente agitato ed analizzato. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 3.4.

Tabella 3.4: Test di resistenza termica dei principi attivi

Principio attivo	Concentrazione (mg/L)	
	Attesa	Trovata
Thiamethoxam	0,403	0,316
Clothianidin	0,193	0,173
Imidacloprid	0,383	0,327
Acetamiprid	0,380	0,307
Thiacloprid	0,392	0,326
Fipronil	0,434	0,224

Come si nota, la leggera flessione nelle concentrazioni ottenuta non è compatibile con la perdita pressoché totale avvenuta in presenza delle api e pertanto si è potuta escludere la temperatura come causa di tale fenomeno.

E' stato effettuato quindi un secondo test aggiungendo a 200 μ L di estratto di ape, ottenuto per trattamento termico con la procedura descritta in precedenza, 200 μ L di soluzione standard alla concentrazione di 2 mg/L aspettandoci così una concentrazione finale approssimativamente pari a 1 mg/L per tutti i principi attivi (0,5 mg/L nel caso del Clothianidin). I risultati ottenuti sono riportati in tabella 3.5.

Tabella 3.5: Test di interazione tra la matrice estratta e i neonicotinoidi

Principio Attivo	Concentrazione (mg/L)	
	Attesa	Trovata
Thiamethoxam	1,008	0,291
Clothianidin	0,483	-
Imidacloprid	0,958	0,795
Acetamiprid	0,950	0,603
Thiacloprid	0,981	-
Fipronil	1,084	0,786

Anche in questo caso i risultati evidenziando chiaramente la presenza di interferenze cromatografiche dovute alla complessità della matrice in particolar modo per quanto riguarda Thiamethoxam, Clothianidin e Thiacloprid, che presentano bassi o nulli recuperi. Osservando i dati di queste prove si può supporre quindi che l'effetto matrice abbia un ruolo molto più importante nel caso del riscaldamento delle api drogate.

3.2.2 Valutazione della capacità estrattiva di alcuni solventi

Si è deciso di ripartire innanzitutto tentando di trovare in primo luogo un processo di pulizia che permettesse di abbattere il rumore di fondo generato dalla matrice.

A 150 μL di estratto di ape filtrato e inizialmente privo di principi attivi sono stati aggiunti 150 μL di standard a 1 mg/L per tutti i p.a meno il Clothianidin (0,5 mg/L) e successivamente 1 mL di *n*-pentano. Dopo una vigorosa agitazione sono stati prelevati 800 μL della fase organica surnatante e sono stati posti in una fiala di vetro da 1,5 mL lasciata aperta ad evaporare per alcuni minuti a temperatura ambiente. Una volta evaporato tutto il *n*-pentano, i residui sono stati ridisciolti in 200 μL di metanolo e altrettanti di acqua MilliQ prima dell'analisi cromatografica. Le analisi effettuate hanno evidenziato che i cromatogrammi risultavano più puliti ma che l'unico composto chiaramente individuato e recuperato (0,818 mg/L contro i 1,084 mg/L attesi) era il Fipronil (Vedi Figura 3.3), cosa che sembrava ragionevole essendo il più lipofilico tra i principi attivi in esame e, pertanto, il più solubile in *n*-pentano.

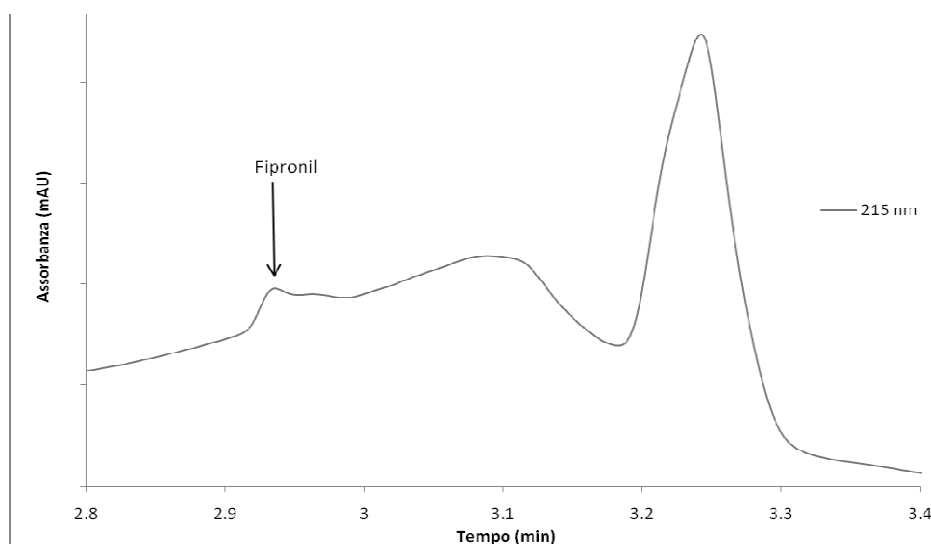


Figura3.3: Cromatogramma relativo alla prova di estrazione con *n*-pentano

Per verificare se il picco cromatografico di grandi dimensioni a tempi di ritenzione vicini a quello del Fipronil (visibile chiaramente in figura 3.3) derivasse dalla matrice o da impurezze presenti nel solvente sono state condotte tre prove in tre fiale (A, B e C) contenenti rispettivamente:

- A. 1 mL di *n*-pentano;
- B. 500 μL di soluzione standard a 0,400 mg/L (0,200 mg/L per il Clothianidin), 500 μL di acqua MilliQ e 1 mL di *n*-pentano;
- C. 500 μL di soluzione standard a 0,400 mg/L (0,200 mg/L per il Clothianidin), 500 μL di acqua MilliQ, 0,138 g di solfato di sodio e 1 mL di *n*-pentano.

Dopo trattamento delle fiale, l'unico principio estratto è stato il Fipronil e l'aggiunta di sale ha reso più netta la separazione di fase. I risultati sono riportati in tabella 3.6.

Tabella 3.6: Estrazione con Pentano

Campione	Concentrazione di Fipronil (mg/L)	
	Atteso	Trovato
Fiala A	0	-
Fiala B	0,271	0,263
Fiala C (con sale)	0,476	0,460

Pertanto, se con tale trattamento si otteneva una estrazione pressoché quantitativa di Fipronil e una pulizia abbastanza efficace della componente organica presente nella matrice (una delle cause principali del rumore di fondo nei cromatogrammi), per contro riscontrava una perdita degli altri principi attivi.

Al fine di evitare un eccessivo consumo di api sono stati poi approntati alcuni test volti a verificare l'efficacia di alcuni solventi come estraenti, od eventualmente come soluzioni pulenti per la matrice estratta, dei sei principi attivi da soluzioni standard in metanolo/acqua 1:1 (v:v). I solventi utilizzati sono stati il cloruro di metilene (2 prove) e l'etere etilico (3 prove). E' stata effettuata anche una prova con acetone; quest'ultimo solvente, riportato in letteratura per l'analisi su 35 api, è stato da noi utilizzato in quantità proporzionalmente ridotte per l'estrazione su una singola ape [73, 74]. I risultati ottenuti per queste tre prove sono riportati nelle tabelle 3.7 - 3.9.

Tabella 3.7: Analisi della fase estratta con diclorometano

Principio Attivo	Concentrazione (mg/L)		
	Attesa	Trovata	
		Fiala A	Fiala B
Thiamethoxam	0,605	0,564	0,578
Clothianidin	0,290	0,062	0,062
Imidacloprid	0,575	0,575	0,575
Acetamiprid	0,589	0,589	0,589
Thiacloprid	0,650	0,650	0,650
Fipronil	0,570	0,337	0,337

Tabella 3.8: Estrazioni con etere etilico

Principio Attivo	Concentrazione (mg/L)			
	Attesa	Trovata		
		Fiala C	Fiala D	Fiala E
Thiamethoxam	0,948	0,113	0,150	0,126
Clothianidin	0,454	0,109	0,120	0,119
Imidacloprid	0,901	0,181	0,210	0,209
Acetamiprid	0,923	0,148	0,175	0,163
Thiacloprid	1,020	0,227	0,253	0,260
Fipronil	0,894	0,391	0,393	0,423

Tabella 3.9: Estrazione con acetone

Principio Attivo	Concentrazione (mg/L)	
	Attesa	Trovata
Thiamethoxam	0,403	0,055
Clothianidin	0,193	0,084
Imidacloprid	0,383	0,145
Acetamiprid	0,380	0,151
Thiacloprid	0,392	0,321
Fipronil	0,434	0,171

I recuperi sono stati sufficientemente elevati solo nel caso del diclorometano mentre risultano esser medio - bassi per l'acetone (attorno al 50 %) e molto bassi (attorno al 10-20%) nel caso dell'etere

3.2.3 Valutazione dell'efficacia di tre diversi trattamenti sull'ape prima del processo estrattivo con tre diversi solventi

Una ulteriore serie di prove è stata effettuata con api trattate in tre maniere diverse e utilizzando per l'estrazione i tre solventi che, durante le prove preliminari, avevano mostrato il miglior comportamento (acetone, metanolo e cloruro di metilene).

Si sono poste 18 api in altrettante fiale e sono state drogate con 50 µL di una soluzione in metanolo contenente 20 mg/L in ciascuno dei sei principi attivi (10 mg/L nel caso del Clothianidin), in modo tale da ottenere una concentrazione di principio attivo pari a 1 µg/ape (0,5 µg/ape per quanto riguarda il Clothianidin). Asciugato il metanolo, le fiale sono state divise a gruppi di 6 per i successivi trattamenti: 6 fiale sono state trattate immediatamente (*sistema api fresche*); 6 fiale sono state poste in freezer a -20°C per preparare le sei api al successivo processo di liofilizzazione (*sistema api liofilizzate*), e 6 fiale sono state poste in stufa (*sistema api cotte*). In ciascun sistema, le fiale sono state divise in tre gruppi di due. Il primo gruppo di fiale è stato addizionato con 500 µL di metanolo, il secondo gruppo con 1 mL di acetone ed il terzo gruppo con 1 mL di cloruro di metilene. In tabella 3.10 sono riportati i risultati ottenuti nei vari sistemi.

1) Sistema api fresche

Dopo l'inserimento di metanolo e di acetone si è notato che le soluzioni nelle fiale erano diventate biancastre ed opache a differenza di quanto avvenuto con il diclorometano che rimaneva limpido e trasparente. Le fiale sono state poste in un bagno ad ultrasuoni per 30 minuti. Alle due fiale trattate con metanolo, dopo raffreddamento, si sono aggiunti 500 µL di

acqua MilliQ; la soluzione è quindi stata filtrata con filtri in PVDF con pori del diametro di 0,45 µm, anche se con molta difficoltà.

Le soluzioni nelle fiale addizionate con acetone e cloruro di metilene non sono state addizionate di acqua prima della loro filtrazione, effettuata con filtri con pori del diametro di 0,45 µm in PVDF per l'acetone e con filtri con pori da 0,50 µm in PTFE per il cloruro di metilene. Entrambe le soluzioni filtrate venivano portate a secchezza sotto flusso di azoto, riprese con una soluzione di metanolo/acqua MilliQ 1:1 (v:v) ed analizzate.

2) Sistema api liofilizzate

Le sei fiale dopo la permanenza in congelatore a -20 °C sono state poste nel liofilizzatore per circa 16 ore. All'interno delle fiale alcune api erano letteralmente esplose lasciando del liquido ceroso sulle pareti mentre altre avevano della schiuma biancastra fuoriuscita dall'addome. Le fiale sono quindi state immerse a bagno ultrasonico per 30 minuti e lasciate successivamente raffreddare fino a temperatura ambiente. I tre gruppi di fiale sono stati trattati con le stesse modalità descritte per il sistema api fresche. In questo caso, si è notato un deciso miglioramento nel processo di filtrazione, con un notevole risparmio di tempo e filtri. E' da rimarcare che il filtrato in metanolo-acqua risultava lievemente giallognolo e non limpido a differenza di quanto avvenuto con le api fresche.

Anche in questo caso sulle pareti delle fiale il cui contenuto era stato portato a secchezza si sono notati dei depositi incolori analoghi a quelli trovati per le api fresche.

3) Sistema api cotte

Le sei fiale sono state poste in stufa a 100 °C per 4,5 ore e sono quindi state lasciate raffreddare in un essiccatore fino a temperatura ambiente. Le api sono state quindi sminuzzate con una palettina e i tre gruppi di fiale trattati analogamente a quanto fatto per gli altri due sistemi. In questo caso la filtrazione è stata nuovamente molto ardua per le soluzioni in metanolo-acqua che apparivano di color arancio-marrone molto carico e presentavano una copiosa sospensione di "flocculi"; il filtrato è risultato di colore giallognolo e molto torbido. Gli estratti in acetone, negli altri due casi limpidi e incolori, apparivano di color giallastro ed opachi e anche dopo la filtrazione mantenevano una colorazione gialla tenue seppur la soluzione si presentasse limpida. Le soluzioni in CH₂Cl₂ sono risultate più semplici da filtrare rispetto agli altri due casi ma questa volta il filtrato appariva limpido ma di color giallo intenso e non più incolore.

Tabella 3.10: Recuperi per i vari principi attivi su api trattate con i tre sistemi in esame.

Principio Attivo	Recupero %								
	Api fresche			Api liofilizzate			Api cotte		
	MeOH	(CH ₃) ₂ CO	CH ₂ Cl ₂	MeOH	(CH ₃) ₂ CO	CH ₂ Cl ₂	MeOH	(CH ₃) ₂ CO	CH ₂ Cl ₂
Thiamethoxam	88,5	60,0	103	99,8	37,8	79,6	44,4	13,5	5,3
Clothianidin	74,2	71,6	93	82,7	60	74	36	8,9	2,2
Imidacloprid	78,6	83,6	103	94,5	59,6	76,8	106	13,4	5,9
Acetamiprid	84,7	91,4	108	105,1	57,9	75,2	75,5	11,0	5,1
Thiacloprid	93	88,6	115	100,8	70	90,5	70,9	12,0	6,2
Fipronil	115,9	108	121	94,1	77,7	99,0	78	52,9	48,7

I risultati migliori, con recuperi tra il 60 ed il 100 %, si sono ottenuti per tutti e tre i solventi utilizzando api fresche o liofilizzate; decisamente peggiori sono stati i recuperi quando si sono utilizzate api seccate mediante trattamento termico. I recuperi ottenuti con acetone e cloruro di metilene sono aumentati tendenzialmente all'aumentare della lipofilità del neonicotinoide indagato come ci si aspettava.

I cromatogrammi degli estratti da acetone presentavano un picco che compariva a tempi di ritenzione molto simili al Thiamethoxam, rendendo l'integrazione del picco di questo principio attivo molto incerta. La stessa difficoltà di integrazione si è riscontrata in molte delle prove anche con il picco relativo al Fipronil.

In conclusione di questa prima serie di test svolti, sulla base dei risultati dei recuperi ottenuti, dei procedimenti di estrazione, del numero di passaggi, dei tempi necessari e di altri fattori, si è potuto affermare che il miglior procedimento da adottare per i nostri scopi era quello che prevedeva il trattamento di liofilizzazione come pretrattamento della matrice e l'uso di metanolo come solvente estraente. Si è infatti constatato e considerato che:

1) Trattare direttamente le api senza alcun pretrattamento (*sistema api fresche*) consente un procedimento sicuramente più rapido nella fase iniziale e nel totale, ma crea notevoli problematiche durante la fase di filtrazione poiché all'aumentare del numero dei campioni da analizzare aumenta esponenzialmente il tempo di trattamento (aumento di 35 minuti ogni 2 campioni rispetto alle api liofilizzate*) che andrebbe così a compensare il tempo impiegato per liofilizzare che peraltro può avvenire senza la necessità della supervisione di un operatore;

2) I recuperi per le api liofilizzate trattate con metanolo sono lievemente ma costantemente superiori rispetto a quelli ottenuti a partire da api fresche con analogo solvente;

3) La presenza di acqua naturalmente presente all'interno delle api, se fresche, dovrebbe essere tenuta in considerazione (il che non è facilmente attuabile).

* questo prima dell'utilizzo della centrifuga

3.2.4 Valutazione della centrifugazione per la purificazione degli estratti da ape

Essendo il processo di filtrazione lungo, difficile e costoso visto l'elevato numero di filtri necessari per ogni singolo campione, si è provata ad utilizzare una centrifuga per verificare se, mediante questo procedimento, si riuscisse a migliorare questa fase del processo di preparazione dei campioni all'analisi. Le prime prove, effettuate su di una centrifuga che poteva raggiungere fino a 3-4.000 giri al minuto, hanno dato esiti altalenanti rendendo a volte più facile la successiva filtrazione. Questa incostanza nei risultati poteva esser dovuta a molti fattori tra cui la diversità nelle matrici e il fatto che questa centrifuga, ormai datata, fosse studiata per fiale di dimensione notevole e poteva esser utilizzata nel nostro caso solo con l'utilizzo di opportuni adattatori costruiti per noi ad hoc nell'officina del Dipartimento di Scienze Chimiche.

Una volta resasi disponibile una nuova centrifuga in grado di compiere fino a 14.000 giri al minuto, molto più piccola e stabile della precedente, sono stati svolti dei test per verificare la possibilità del suo utilizzo per rendere più puliti i campioni di estratti di api (e non solo).

Sono state quindi approntate alcune prove effettuate variando i tempi di trattamento e le velocità di rotazione ed osservando la limpidezza finale delle soluzioni. Da queste si è evinto che un'ora di centrifugazione a 10.000 giri al minuto rendeva la successiva filtrazione degli estratti estremamente semplice e veloce ottenendo soluzioni che presentavano un deciso miglioramento della qualità dei cromatogrammi specie nel rumore di fondo.

Dovendo ogni modifica, introdotta in una metodica analitica preesistente al fine di migliorarne le prestazioni, essere valutata anche in relazione al parametro "recupero", ossia all'eventuale ulteriore perdita di analita dal campione indotta dalla modifica apportata, si è effettuato un esperimento in tal senso. In particolare si è valutato il recupero nei principi attivi insetticidi per capire se questi tendessero o meno a concentrarsi nei residui di fondo formati durante la centrifugazione.

L'esperimento si è svolto come segue: cinquanta api prive di pesticidi sono state divise in due gruppi da 25 e poste in due fiale di vetro da 25 mL. Dopo trattamento con il metodo descritto nel Paragrafo 2.2.4 opportunamente modificato in funzione del numero delle api analizzate (utilizzando quindi 12,5 mL di metanolo e altrettanti di acqua MilliQ), si sono ottenute due soluzioni "medie" di estratto di matrice di api contenenti entrambe tutte le possibili molecole che potevano dare picchi interferenti nei cromatogrammi (bianco api). Con i due estratti si sono preparate, in matracci da 5 mL, rispettivamente due serie di quattro soluzioni a concentrazione 0, 0,1, 0,2 e 0,4 mg/L in tutti i p.a. insetticidi mediante l'aggiunta

di opportune quantità di soluzione standard a 100 mg/L. Entrambe le serie di soluzioni per ogni livello venivano analizzate in doppio sia dopo essere state sottoposte alla sola semplice filtrazione su filtri in PVDF con pori del diametro di 0,45 µm sia dopo trattamento su centrifuga per 60 minuti ad una velocità di 10.000 giri/min e successiva filtrazione su filtri in PVDF con pori da 0,20 µm. I risultati sono riportati in tabella 3.11.

Tabella 3.11: Recuperi per i diversi livelli di concentrazione al variare del trattamento; con “C + F” sono indicati i campioni trattati con centrifugazione seguita da filtrazione e con “F” quelli su cui è stata effettuata la sola filtrazione

Serie	Livello (mg/L)	Recupero neonicotinoidi dopo il diverso trattamento (%)							
		Thiamethoxam		Clothianidin		Imidacloprid		Fipronil	
		C + F	F	C + F	F	C + F	F	C + F	F
1	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,100	99,6	99,6	99,9	99,7	99,6	99,5	99,5	99,5
	0,100	99,6	99,8	99,9	99,8	99,8	99,6	99,6	99,7
	0,200	99,1	99,0	99,8	99,7	98,4	98,3	99,3	99,5
	0,200	99,2	99,1	99,7	99,5	98,5	98,3	99,2	99,3
	0,400	99,5	99,5	99,0	98,8	97,2	97,3	98,4	98,2
	0,400	99,7	99,3	99,0	99,0	97,3	97,3	98,7	98,4
2	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,000	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,100	99,7	99,7	99,1	98,8	99,8	99,8	99,6	99,4
	0,100	99,7	99,6	99,2	98,8	99,6	99,8	99,8	99,4
	0,200	99,7	99,7	99,5	99,2	100,0	99,8	99,4	99,6
	0,200	99,8	99,7	99,7	99,2	100,1	99,9	99,6	99,5
	0,400	99,9	99,8	99,9	99,9	100,0	99,9	99,7	99,3
	0,400	99,7	99,6	99,8	99,8	100,0	100,0	99,9	99,3

Come si può osservare dai risultati ottenuti, entrambi i trattamenti danno rese che si attestano attorno al 100 %. Inoltre, per entrambe le serie esaminate non vi sono differenze significative tra le concentrazioni dei campioni trattati con centrifugazione e filtrazione rispetto a quelli ottenuti con il metodo tradizionale di filtrazione diretta.

E' possibile quindi affermare che il trattamento di centrifugazione non causa una perdita di analiti dovuto ad un'eventuale accumulo dei neonicotinoidi nei depositi di fondo, ma permette solamente una maggior pulizia dei campioni, una più agevole filtrazione degli stessi ed un importante miglioramento nella risoluzione cromatografica.

Al termine di questo processo di ottimizzazione si è quindi stabilito che il metodo di preparazione ed estrazione dei p.a. insetticidi dalla matrice api migliore è il seguente:

- congelamento delle api a -20 °C per alcune ore seguito da circa 16 ore di liofilizzazione prima dello sminuzzamento delle api con palettina d'acciaio;
- estrazione effettuata mediante sonicazione per 30 minuti in presenza di 0,5 mL di metanolo e successiva sonicazione dopo un'aggiunta di 0,5 mL di acqua MilliQ;
- purificazione degli estratti mediante centrifugazione a 10.000 giri al minuto per 60 minuti e filtrazione con filtri in PVDF con pori del diametro di 0,20 µm.

3.3 Validazione del metodo

Ai fini della valutazione della robustezza di un metodo analitico, ossia di rispondere in maniera accurata e riproducibile nelle diverse condizioni di lavoro, è necessario valutare quelli che sono i parametri caratteristici che possono inficiare tale robustezza. Tra questi parametri vi sono l'accuratezza, la riproducibilità ristretta (su analisi ripetute sullo stesso campione) e quella allargata (su analisi su diversi campioni dello stesso tipo), la sensibilità, la precisione, il recupero, l'intervallo di linearità della risposta, i limiti di rivelabilità ed altri ancora.

In questo lavoro di tesi ci si è limitati a valutare solamente quattro di questi parametri che verranno di seguito trattati.

3.3.1 Verifica della linearità della risposta strumentale e funzioni di calibrazione

La determinazione della linearità della risposta del rivelatore è stata verificata all'interno dell'intervallo delle concentrazioni di p.a. utilizzate nelle soluzioni standard. Per tutti i p.a e per tutti i metodi di analisi utilizzati nel lavoro, la variazione del segnale (area del picco cromatografico) in funzione della variazione di concentrazione del p.a poteva essere ben rappresentata da una funzione lineare del tipo $y = a + b x$, dove a corrisponde all'intercetta e b alla pendenza della retta. In figura 3.4 viene riportato un esempio delle funzioni di calibrazione per il Metodo 1 ed in tabella 3.12 i parametri di regressione per i quattro metodi.

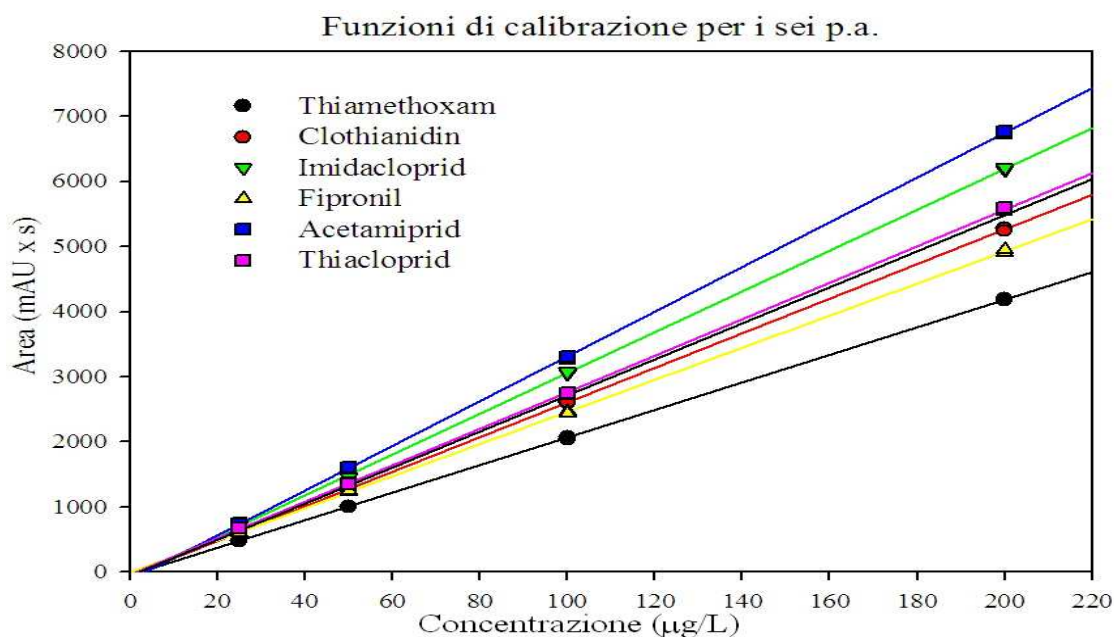


Figura 3.4: Esempio di retta di taratura per il Metodo 1

Tabella 3.12: Parametri di regressione dei metodi di analisi ottimizzati

Principio Attivo	a	b	R^2	$S_{y/x}$	S_a	S_b
Metodo 1						
Thiamethoxam	-48,2	21232	0,9999	13	7,8	68
Clothianidin	-60,3	26462	0,9999	13	8,2	71
Imidacloprid	-79	31440	0,9999	22	13	110
Acetamiprid	-121	34523	1,0000	18	11	93
Thiacloprid	-44	28103	0,9999	18	11	94
Fipronil	-7,4	24751	1,0000	15	9,2	80
Metodo 2						
Thiamethoxam	-36,3	21258	0,9998	19	6,5	57
Clothianidin	2,7	26167	0,9998	24	8,5	73
Imidacloprid	19,0	31170	0,9998	27	9,6	83
Fipronil	-197,6	22762	0,9998	25	8,7	76
Metodo 3						
Thiamethoxam	-61,2	20910	1,0000	9	5,6	48
Clothianidin	-63	26318	0,9999	17	11	92
Imidacloprid	-66	30960	0,9999	21	13	110
Metodo 4						
Fipronil	9,3	24076	1,0000	13	7,8	68

Per verificare la validità delle funzioni lineari applicate ai metodi ottimizzati sono stati effettuati due test statistici: il test della dipendenza lineare e il test dell'intercetta nulla.

Nei parametri di regressione, il coefficiente R di correlazione indica l'esistenza o meno di una dipendenza della variabile y dalla variabile indipendente x; un valore superiore a 0,999 indica una dipendenza. Il parametro R^2 , chiamato coefficiente di determinazione, è molto più importante in quanto è una stima della linearità o meno di tale dipendenza. Anche in questo caso, valori superiori a 0,998 indicano un'alta probabilità che la dipendenza di y da x non solo

esista ma che questa sia di tipo lineare. La verifica di ciò viene effettuata applicando il seguente t test statistico a due code all'ipotesi nulla H_0 : y dipende linearmente da x ?

$$t_{calcolato} = \sqrt{\frac{R^2(n-2)}{(1-R^2)}}$$

Se il valore del $t_{calcolato}$ è maggiore di quello del $t_{tabulato}$ a due code definito per un certo intervallo di confidenza (solitamente al 95 %) e per un numero di gradi di libertà v pari al numeri punti di misura per la costruzione della retta meno due, l'ipotesi nulla viene accettata e quindi anche la regressione lineare. In tutti i casi esaminati il test è sempre superato.

Il secondo test applicato alle funzioni di calibrazione è il t -test per l'intercetta nulla $t_a = \frac{|a-0|}{S_a}$ in cui l'ipotesi nulla da verificare è H_0 : lo zero è uno dei punti possibili della retta?

I risultati per questo secondo test sono riportati in tabella 3.13

Tabella 3.13: t -test per l'intercetta nulla per i quattro metodi ottimizzati

Principio Attivo	Metodo 1		Metodo 2		Metodo 3		Metodo 4	
	t_a		t_a		t_a		t_a	
	Calcolato	Tabulato ^a	Calcolato	Tabulato ^b	Calcolato	Tabulato ^a	Calcolato	Tabulato ^a
Thiamethoxam	6,146	2,44691	5,558	2,07387	11,022	2,44691	-	-
Clothianidin	7,374	2,44691	0,320	2,07387	5,935	2,44691	-	-
Imidacloprid	5,992	2,44691	1,978	2,07387	5,128	2,44691	-	-
Acetamiprid	11,285	2,44691	-	-	-	-	-	-
Thiacloprid	4,027	2,44691	-	-	-	-	-	-
Fipronil	0,808	2,44691	22,764	2,07387	-	-	1,186	2,44691

^a test a due code con $\alpha = \beta = 0,05$ e $v = 6$; ^b test a due code con $\alpha = \beta = 0,05$ e $v = 22$.

Come si può notare solo in rari casi lo zero risulta essere un punto delle rette di taratura ad indicare la presenza di un errore sistematico sulle misure.

3.3.2 Limiti di rivelabilità

In qualsiasi metodo di analisi, è di estrema importanza determinare qual è la più piccola concentrazione o quantità di analita (o di campione) che produce un segnale strumentale che, con ragionevole certezza statistica, può essere attribuito alla presenza di analita nel campione in esame. Questa concentrazione minima viene definita limite di rilevabilità, LOD, ed è numericamente uguale a tre volte la deviazione standard del valore medio della soluzione

standard dell'analita più prossima al bianco, sottratto del bianco stesso. Il bianco è definito come il procedimento analitico completo, con omissione del campione di prova.

Nel caso di misure cromatografiche, spesso è impossibile associare un valore di area ad un bianco, pertanto si è utilizzato per determinare il LOD il metodo IUPAC di Hubaux - Vos [111], che si basa sulla costruzione di bande di confidenza su funzioni di calibrazione lineari a concentrazioni di soluzioni standard prossime al bianco. Le bande di confidenza sono due, una superiore ed una inferiore, sono simmetriche rispetto la retta di regressione e vengono costruite con una fascia di confidenza stabilita dall'operatore, normalmente il 95 %. La banda di confidenza superiore interseca l'asse delle ordinate nel punto indicato come Y_c , limite critico al di sotto del quale i segnali hanno una probabilità definita (95%) di appartenere a campioni a contenuto nullo di analita. Il valore di ascissa, corrispondente all'intersezione di Y_c con la fascia di confidenza inferiore ed indicato con X_d , è il limite di rivelabilità (LOD), concentrazione che produce un segnale la cui distribuzione può essere assegnata al bianco (errore di 2^a specie) con una probabilità inferiore al 5%. Un esempio in tal senso è presentato in figura 3.5 per la determinazione del LOD nel caso del Thiamethoxam.

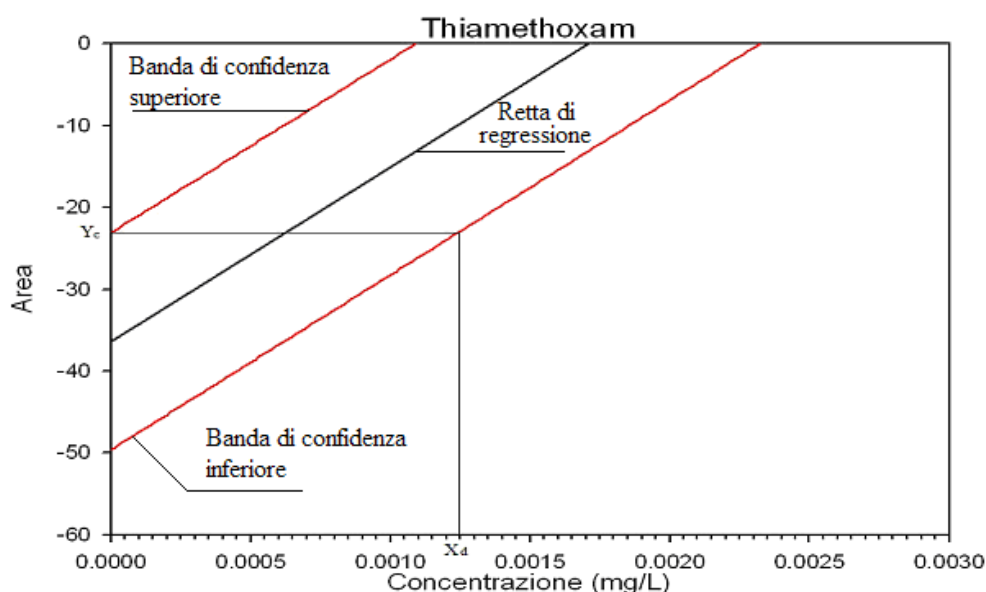


Figura 3.5: Esempio di determinazione del LOD del Metodo 2 per il p.a. Thiamethoxam

Il LOD dei 6 p.a. insetticidi è stato ottenuto per ognuno dei metodi d'analisi sviluppati mediante una serie di analisi di soluzioni standard contenenti tutti i diversi p.a. nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,025 e 0,200 mg/L. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 3.14.

Tabella 3.14: Limiti di rivelabilità per i quattro metodi ottimizzati

Principio Attivo	LOD (mg/L)			
	Metodo 1	Metodo 2	Metodo 3	Metodo 4
Thiamethoxam	0,00147	0,00125	0,00120	-
Clothianidin	0,00165	0,00131	0,00182	-
Imidacloprid	0,00160	0,00124	0,00188	-
Acetamiprid	0,00180	-	-	-
Thiacloprid	0,00147	-	-	-
Fipronil	0,00165	0,00155	-	0,00145

I limiti di rilevabilità per le metodiche ottimizzate in questo lavoro di tesi, se confrontate con quelli ottenuti con il metodo “Vecchio” [110], sono mediamente dalle 5 alle 10 volte inferiori (più di venti volte solo nel caso del Fipronil) e sono anche decisamente inferiori (fino a 20 volte) di quelli riportati in letteratura per strumentazioni simili (HPLC-DAD). Ciò conferma la migliore efficienza della strumentazione da noi utilizzata che è attribuibile sia all'utilizzo di una colonna impaccata con particelle di dimensioni più piccole (2,2 μm) rispetto a quelle presenti nelle normali colonne per cromatografia liquida che alle pressioni alle quali è in grado di operare una strumentazione UFLC rispetto ad una normale HPLC.

3.3.3 Precisione del metodo su campioni reali

La precisione è definita come il grado di accordo tra i risultati indipendenti ottenuti con un procedimento di analisi in condizioni ben specificate, quali metodo, operatore, giorno, ecc., ed è una stima dell'incertezza del metodo. Può essere anche rappresentata come una dispersione di una serie di dati rispetto al valore centrale. La dispersione viene quantificata mediante la deviazione standard σ , o la sua stima s , che tiene conto di tutti gli errori casuali presenti nelle misure.

Per valutare la precisione del metodo sono state elaborate tutte le concentrazioni di neonicotinoidi rilevate nelle api con le rispettive deviazioni standard. Ipotizzando l'esistenza di una dipendenza lineare dell'incertezza con la concentrazioni stimata: $s = a + bC$ (a e b sono i contributi riferiti all'incertezza del bianco ed alla presenza dell'analita) la deviazione standard relativa percentuale ($\text{err.\%} = \frac{s_x}{\bar{C}} \cdot 100$, con s_x e $\bar{C}$ che indicano rispettivamente la deviazione standard e la concentrazione media di p.a.) può essere correlata a $\bar{C}$ mediante l'interpolazione dei punti sperimentali con un'iperbole (figura 3.6).

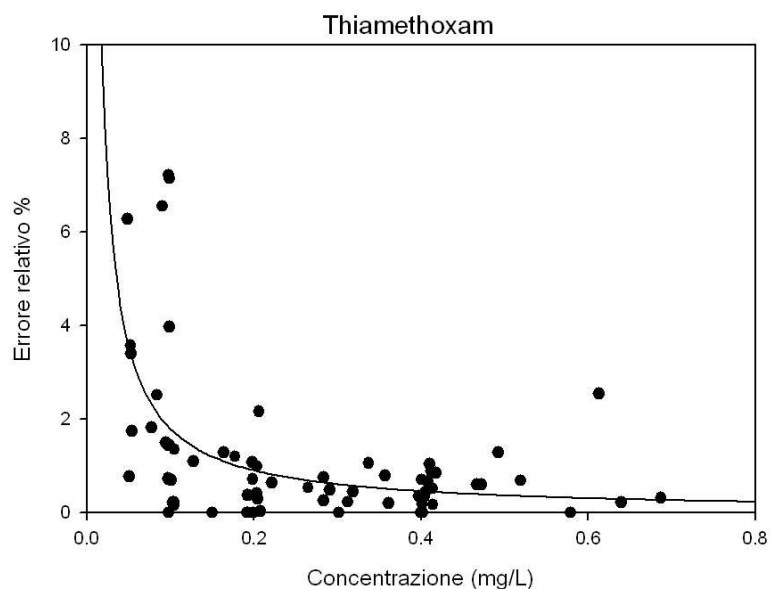


Figura 3.6: Variazione dell'errore % al variare della concentrazione di p.a. Thiamethoxam nei campioni di ape

Mediante tale modello è possibile così stimare quali siano gli errori % di misura associati alle metodologie ottimizzate per i diversi p.a. che risultano in tutti i casi inferiori all'1-2 % per concentrazioni superiori agli 0,200 mg/L. Avvicinandosi a concentrazioni più prossime ai LOD gli errori relativi delle misure aumentano ed in particolare già attorno agli 0,040 mg/L si collocano vicino al 5 % aumentando poi sempre più rapidamente.

3.3.4 Valutazione del parametro recupero sull'intero metodo estrattivo ottimizzato

Il recupero, ovvero la capacità di un metodo analitico di determinare la totalità dell'analita presente in una matrice, è uno dei parametri più importanti nel definire la robustezza del metodo stesso. A tale scopo è stata effettuata la seguente prova di recupero su api drogate per contatto con tutti e sei i principi attivi insetticidi a livelli di concentrazione compatibili con quelli delle LD₅₀.

Venticinque api morte prive di pesticidi sono state divise in 5 gruppi da 5 e poste ognuna in una fiala di vetro da 4 mL. Ad ogni gruppo di 5 api sono stati somministrati, tramite l'utilizzo di una soluzione standard concentrata in MeOH-H₂O MilliQ in rapporto 1:1 (v:v), rispettivamente 0, 50, 100, 200 e 400 ng di ognuno dei 6 principi attivi indagati. Dopo aver atteso il completo assorbimento dei principi attivi all'interno delle api, queste sono state trattate secondo la metodica ottimizzata e gli estratti analizzati mediante cromatografia liquida con il Metodo 1. I risultati della analisi sono riportati in Tabella 3.15.

Tabella 3.15: Prove di recupero da api singole addizionate con i sei p.a. a cinque diversi livelli di concentrazione

Livello	Quantità di p.a. aggiunta (ng/ape)	Principio Attivo	Recupero nelle singole api (%)					Recupero medio (%)	Dev. St.
			1	2	3	4	5		
1	0	Thiamethoxam	-	-	-	-	-	-	-
		Clothianidin	-	-	-	-	-	-	-
		Imidacloprid	-	-	-	-	-	-	-
		Acetamiprid	-	-	-	-	-	-	-
		Thiacloprid	-	-	-	-	-	-	-
		Fipronil	-	-	-	-	-	-	-
2	50	Thiamethoxam	92,1	96,8	95,4	87,5	98,0	94,0	4,2
		Clothianidin	90,9	91,6	84,9	77,6	98,4	88,7	7,8
		Imidacloprid	100,6	103,7	95,4	97,2	96,7	98,7	3,4
		Acetamiprid	97,8	96,8	89,5	88,8	100,6	94,7	5,3
		Thiacloprid	99,3	95,2	93,2	87,9	98,9	94,9	4,7
		Fipronil	237,5	210,8	115,8	176,1	91,2	166	62
3	100	Thiamethoxam	93,0	85,2	97,0	98,6	98,1	94,4	5,6
		Clothianidin	90,9	89,3	93,7	91,9	91,7	91,5	1,6
		Imidacloprid	95,1	90,0	96,6	98,6	97,9	95,7	3,4
		Acetamiprid	90,3	91,1	94,5	94,0	94,5	92,9	2,0
		Thiacloprid	92,4	92,9	93,1	89,6	94,9	92,6	1,9
		Fipronil	159,6	183,5	118,2	25,5	132,1	124	60
4	200	Thiamethoxam	95,4	94,8	93,6	93,7	94,1	94,3	0,8
		Clothianidin	96,5	97,0	96,3	98,8	98,2	97,4	1,1
		Imidacloprid	97,0	98,1	104,0	97,2	94,8	98,2	3,5
		Acetamiprid	97,1	98,3	98,9	96,8	97,1	97,6	0,9
		Thiacloprid	98,9	98,3	98,8	99,1	97,9	98,6	0,5
		Fipronil	139,0	159,1	70,4	54,9	103,6	105	44
5	400	Thiamethoxam	96,6	98,0	96,1	95,0	95,6	96,3	1,1
		Clothianidin	92,9	94,7	96,4	94,4	95,7	94,8	1,3
		Imidacloprid	93,3	94,5	98,3	92,5	93,8	94,5	2,3
		Acetamiprid	91,0	93,1	97,1	92,1	98,1	94,3	3,1
		Thiacloprid	89,9	92,5	96,8	91,8	96,6	93,5	3,1
		Fipronil	49,2	49,6	77,0	73,5	92,2	68	19

Ad eccezione del Fipronil, i recuperi ottenuti con tutti gli altri principi attivi sono mediamente superiori al 90% in tutti i livelli variando da un minimo dell'88 % ad un massimo del 104 % e sono compatibili con i recuperi ottenuti a livelli di concentrazione superiori (1 mg/L) e a quelli per la sola centrifugazione ottenuti in precedenza. Si può quindi affermare che questo metodo consente degli ottimi recuperi per i 5 neonicotinoidi in esame se confrontati con quelli di letteratura (vedi Paragrafo 1.5).

La grande variabilità osservata nei recuperi nelle prove con il Fipronil, non solo tra un livello di drogaggio ed un altro, ma anche da ape ad ape all'interno di uno stesso livello, è

imputabile a interferenze cromatografiche dovute alla matrice. A conferma di tale ipotesi, un tale problema non si era riscontrato nelle prove di recupero del fipronil dello stadio di ultracentrifugazione degli estratti di ape e nel primo test di recuperi a più alte concentrazioni.

A conclusione di questo processo di ottimizzazione e validazione si può affermare che tutte le metodologie consentono di ottenere separazioni con un'ottima risoluzione cromatografica e una risposta strumentale lineare, verificata nell'intervallo 0,025 – 10 mg/L, limiti di rivelabilità molto bassi per il tipo di strumentazione impiegato, tempi di analisi relativamente brevi che variano tra i 3,5 e gli 8 minuti e ottimi recuperi.

I principali vantaggi di questo metodo di analisi (su singola ape) rispetto a quelli riportati in letteratura sono fondamentalmente tre:

- l'analisi su api singole permette di conoscere puntualmente quanto una data ape viene contaminata;
- le analisi con questa metodologia non risentono di effetti di sottostima della contaminazione media dovuto ad un campionamento massivo in cui sono presenti anche api che, non potendo essere controllate singolarmente nei loro movimenti nell'aria, potrebbero anche non esser passate attraverso la nube di polveri di contaminate durante le semine ed essere morte per altre cause (campioni che invece, se analizzati singolarmente, potrebbero essere eventualmente esclusi);
- analizzare singole api consente di ridurre notevolmente il numero di insetti necessari per gli esperimenti riducendo così anche le variabili e la complessità dei sistemi.

4 APPLICAZIONI, RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Applicazione del metodo a sementi e polveri di concia

Per lo studio quantitativo della dispersione nell'ambiente di p.a. insetticidi, presenti su semi di mais conciati, si è resa necessaria una preventiva analisi del contenuto medio di principio attivo per seme unitamente ad un'analisi della variazione di contenuto di p.a. in semi della stessa tipologia.

Le sementi di mais utilizzate in questo lavoro di tesi sono sviluppate a partire da ibridi di mais selezionati e successivamente conciati da parte di industrie chimiche dedicate al comparto agricolo. Una volta operata la concia queste sementi vengono spedite all'azienda che si occupa della loro commercializzazione (nel nostro caso Pioneer Italia). La procedura di concia consiste nel porre a bagno grosse quantità di sementi in soluzioni caratterizzate da una ben nota concentrazione di principio attivo insetticida e da sostanze adesivanti di diverso tipo (anche dette coformulanti), il tutto mantenuto sotto continua agitazione. Tale procedura assicura la formazione di semi ricoperti da una certa dose di principio attivo (insetticida o fungicida che sia) che solitamente è riportata nell'etichetta della semente come contenuto di principio attivo in mg per seme.

Per verificare l'effettivo contenuto di principi attivi dichiarati nelle diverse sementi sono state disposte una serie di analisi su queste: innanzitutto si è valutata la quantità di principio attivo per seme per confrontarla con quella riportata in etichetta e, in secondo luogo, si è effettuato un test per verificare e quantificare la percentuale di principio attivo all'interno della pellicola conciante.

4.1.1 Determinazione del contenuto nei sei p.a. sulle sementi

Mediante il procedimento estrattivo descritto nel Paragrafo 2.2.4, operato su 5 semi per ogni tipo di concia, si sono ottenuti i risultati riportati in tabella 4.1 per quanto riguarda la quantità di principio attivo per seme nelle diverse tipologie di confettatura 2010. Le analisi sono state effettuate mediante una metodica di analisi ottimizzata riportata nel Paragrafo 3.1.

Dall'osservazione dei risultati si può in primo luogo notare come la variabilità nella quantità di principio attivo presente in semi diversi sia relativamente bassa e come i valori di concentrazione di principio attivo di concia nei semi siano in linea con quanto dichiarato dal

produttore con differenze massime del 16,4 % per quanto riguarda i semi conciatati con Fipronil e del 14,8 % per quanto riguarda quelli conciatati con Thiamethoxam.

Tabella 4.1: Quantità di Clothianidin, Thiamethoxam, Imidacloprid e Fipronil (concia 2010) per seme

Principio attivo (nome commerciale)	Media (mg/seme)
Thiamethoxam (Cruiser 350 FS)	0,689 ± 0,042 (Dichiarati 0,60)
Clothianidin (Poncho)	1,24 ± 0,17 (Dichiarati 1,25)
Imidacloprid (Gaucho 350 FS)	1,036 ± 0,070 (Dichiarati 1,00)
Fipronil (Regent 500 FS)	0,418 ± 0,039 (Dichiarati 0,50)

Il valore nominale dichiarato in etichetta è comunque solo indicativo poiché il processo di concia del seme subisce soprattutto l'influenza delle dimensioni superficiali di quest'ultimo; una maggior superficie e la presenza di eventuali rugosità superficiali permettono l'adesione di una maggior quantità di pellicola e quindi la presenza di una maggiore dose di principio attivo nella concia nel seme.

4.1.2 Determinazione del contenuto nei sei p.a. sulle conce dei semi

Per stabilire la percentuale di principio attivo di concia presente nelle confettature dei semi è stata effettuata una prova a partire da delle polveri di conciante recuperate dal fondo dei sacchi di mais come descritto nel paragrafo 2.2.4. In questa prova si sono utilizzate cinque aliquote di concia del seme per ognuna delle confettature 2010 contenenti rispettivamente Thiamethoxam, Clothianidin, Imidacloprid e Fipronil i cui quantitativi erano di circa 5,00 mg.

Le percentuali di principio attivo presenti nella pellicola di concia per i quattro pesticidi in esame sono riportate in tabella 4.2 e sono state ottenute utilizzando l'opportuno metodo di analisi tra quelli descritti nel Paragrafo 3.1.

Tabella 4.2: Percentuale di neonicotinoidi presenti nella concia dei semi 2010 con relative deviazioni standard

Campione	Principio attivo nella concia (%)			
	Thiamethoxam	Clothianidin	Imidacloprid	Fipronil
1	25,313	37,725	37,790	23,091
2	25,113	38,871	37,968	21,455
3	22,595	36,090	35,587	21,379
4	29,226	36,260	39,072	23,755
5	27,321	36,155	36,505	20,188
Valore medio (%)	25,9 ± 2,5	37,0 ± 1,4	37,4 ± 1,4	22,0 ± 1,4

Come si può notare i rapporti tra i p.a. e i supporti nella concia dei semi esaminati presentano una distribuzione abbastanza omogenea tra polveri contenenti lo stesso p.a.. Le

differenze tra le percentuali presenti tra i vari tipi di conciante seguono indicativamente l'andamento relativo al quantitativo di p.a. per seme dichiarato dai produttori; tuttavia la percentuale di Imidacloprid è maggiore di quella di Clothianidin nonostante quest'ultimo sia presente in quantità maggiore per ogni seme rispetto all'altro principio attivo.

Da misure precedenti effettuate su semi concianti con Clothianidin (conce 2009 e 2010), le cui polveri erano state ottenute mediante agitazione manuale di una quindicina di semi all'interno di fiale in polietilene, si erano registrate percentuali di p.a. all'interno delle polveri decisamente superiori e dell'ordine del 75 % per la concia 2009 e del 65 % per quella 2010. Chiaramente test così effettuati sono meno indicativi e riproducono meno sia la reale formazione di polveri all'interno della seminatrice che il rapporto tra p.a. e coformulante, essendo le uniche polveri campionate per queste prove quelle adese elettrostaticamente alle pareti delle fiale e non anche quelle presenti sul fondo delle stesse. Ad ogni modo si è potuta osservare la maggior quantità di coformulante presente all'interno della concia 2010 come verificato da misure di dispersione in campo di polveri insetticide effettuate durante semine di mais conciato con vecchia e nuova confettatura descritte in seguito.

Va infine osservato che, in una precedente valutazione effettuata da parte del personale del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova, dall'analisi delle scaglie più grossolane di pellicola di concia dei semi con confettatura Poncho 2009 (Clothianidin, 1,25 mg/seme), prelevata manualmente all'esterno della seminatrice senza una previa separazione da eventuali residui di cuticola, era stata misurata una percentuale di p.a. nella concia pari al 18,6 %.

4.2 Applicazione del metodo all'analisi della dispersione di p.a. insetticidi durante la semina di mais conciato

La semina di mais conciato con principi attivi insetticidi è stata una delle attività maggiormente incriminate per le morie di api verificatesi negli ultimi anni. Nel nostro paese in particolare questo problema ha riguardato soprattutto la Pianura Padana dove tali colture costituiscono un'elevata percentuale dell'intera superficie agricola. La stretta correlazioni fra le semine primaverili e le morie di api negli alveari posti nelle vicinanze dei campi su cui erano state compiute ha portato alcuni gruppi di ricercatori a studiare quale potesse essere il nesso fra tali fenomeni. Questo legame è stato riconosciuto in seguito essere la dispersione di notevoli quantità di insetticidi attraverso il flusso d'aria prodotto dalla seminatrice pneumatica

causato della disgregazione meccanica delle pellicole di concia che avvolgono i semi [55 - 57].

Uno degli obbiettivi di questo lavoro di tesi è il proseguire nella quantificazione della dispersione ambientale delle molecole insetticide utilizzate nella concia del mais durante le normali attività di semina. A questo fine sono stati eseguiti nel corso della primavera 2010 due esperimenti di semina (o per meglio dire di simulazione di semina) in campo, rispettando le convenzionali velocità e distanze fra seme e seme utilizzate normalmente nella Pianura Padana, in cui le polveri emesse dal trattore sono state campionate su filtri secondo determinati schemi di raccolta.

4.2.1 Misura della concentrazione di principio attivo in corrispondenza dello scarico dell'aspiratore centrifugo della seminatrice

Nel primo esperimento (semi concati Poncho, p.a. Clothianidin concia 2009 e 2010) da misure effettuate in diversi punti del condotto è risultato un flusso estremamente variabile. Se di norma ci si aspetta un flusso massimo in corrispondenza del centro del condotto e via via minore avvicinandosi ai bordi, in questo caso il profilo di velocità è risultato molto diverso e in particolare la velocità dell'aria è risultata massima in corrispondenza del bordo superiore del condotto. La temperatura misurata nel condotto è stata di 31,5 °C.

Considerando i profili di velocità misurati è stato possibile determinare la portata dello scarico della seminatrice, che è risultata essere di 688 m³/h.

Si è deciso di prendere in considerazione il valore di flusso massimo e di effettuare i campionamenti in corrispondenza del punto del condotto situato a circa 2 cm sotto il bordo superiore, ovvero nella zona dove la velocità di flusso è risultata essere più stabile.

Per la determinazione della quantità di principio attivo emesso, i filtri in fibra di vetro sono stati trattati con la metodologia descritta nel Paragrafo 2.2.4. Le soluzioni sono state poi analizzate attraverso cromatografia liquida utilizzando la metodica di analisi ottimizzata più conveniente tra quelle riportate nel Paragrafo 3.1.

Già ad occhio nudo era evidente la presenza di una consistente quantità di frammenti di concia di colore rosso depositati sui filtri. In tabella 4.3 sono riportate le concentrazioni di Clothianidin nell'aria emessa dall'impianto pneumatico dalla seminatrice.

Tabella 4.3: Emissione di Clothianidin dalla seminatrice; tempo di campionamento 5 minuti

Tipo di concia	Concentrazione (mg/m ³)
Poncho (1,25 mg/semi) Concia 2009	3,66
Poncho (1,25 mg/semi) Concia 2010	10,92

Conoscendo la velocità di avanzamento simulata dal trattore di 11 km/h, la portata del sistema di aspirazione dei semi di 688 m³/h e la concentrazione di principio attivo nei semi di 1,25 mg/semi è stato possibile stimare sia i fattori emissivi che la percentuale di principio attivo rilasciata da ogni seme (tabella 4.4).

Tabella 4.4: Emissione di Clothianidin (concia 2009 e 2010) dalla seminatrice

Tipo di concia	Emissione (g/h)	Emissione (g/ha)	% p.a. disperso
Poncho (1,25 mg/semi), concia 2009	2,5	0,8	1
Poncho (1,25 mg/semi), concia 2010	7,5	2,3	3

Dai risultati ottenuti si è potuto notare che, contrariamente alle aspettative, le emissioni misurate per i semi trattati con concia 2010, concia proposta per diminuire il quantitativo di polveri emesse, risultavano invece nettamente superiori rispetto a quelle misurate per la concia 2009.

Nella seconda serie di esperimenti, quella del 26 maggio (semi conciat Regent 500 FS, p.a. Fipronil, concia 2010 e semi conciat Cruiser 350 FS, p.a. Thiamethoxam, concia 2010), il flusso allo scarico è risultato essere più omogeneo rispetto all'esperimento di semina precedente (grazie all'utilizzo di un condotto più lungo e a pareti lisce) ma ancora piuttosto variabile. La temperatura dell'aria all'uscita dalla seminatrice era di 36 °C.

Dai profili di velocità ottenuti è stato possibile determinare la portata dello scarico della seminatrice che è risultata essere di 608 m³/h, inferiore all'esperimento precedente probabilmente a causa della minore velocità di avanzamento simulata dal trattore. I campionamenti sono stati eseguiti posizionando la sonda di campionamento ad 1 cm dal bordo inferiore del condotto dove il flusso risultava più omogeneo.

Prima di eseguire l'esperimento con i semi conciat con Thiamethoxam è stata effettuata una seconda misurazione del flusso. Il flusso totale non è variato durante l'esperimento ma il profilo verticale di velocità si è invertito. Per il secondo esperimento si è quindi deciso di posizionare la sonda di campionamento ad 1 cm dal bordo sinistro del condotto.

Per la determinazione della quantità di principio attivo emesso i filtri sono stati trattati come descritto nel Paragrafo 2.2.4. Le soluzioni così ottenute sono state analizzate mediante

cromatografia liquida ad alte prestazioni utilizzando la metodica ottimizzata più adatta tra quelle riportate nel Paragrafo 3.1.

In tabella 4.5 vengono riportati i valori di concentrazione ricavati rispettivamente per il Fipronil ed il Thiamethoxam nei due esperimenti.

Tabella 4.5: Emissione di Fipronil e Thiamethoxam dalla seminatrice (concia 2010)

Principio Attivo	Concentrazione (mg/m ³)			
	Prima prova	Seconda prova	Media	Semi Disp.
Fipronil (0,5 mg/semi)	2,23	3,57	2,90	0,67
Thiamethoxam (0,6 mg/semi)	2,90	4,30	3,60	0,70

La misura della concentrazione di insetticida all'uscita dalla seminatrice non è risultata riproducibile. In entrambi i casi la seconda misura si è dimostrata decisamente più elevata rispetto alla prima. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che durante la prima misura, effettuata all'inizio della semina, la seminatrice non era ancora a regime e le polveri prodotte si stavano ancora depositando in parte all'interno del meccanismo di distribuzione del seme.

Conoscendo la velocità di avanzamento simulata dal trattore di 9,5 km/h, la portata del sistema di aspirazione dei semi di 608 m³/h e la concentrazione di principio attivo nei semi è stato possibile stimare i fattori emissivi e la percentuale di principio attivo rilasciata per ogni seme. Considerando che i semi per questo esperimento erano conciatati con 0,5 mg/semi di Fipronil o 0,6 mg/semi di Thiamethoxam, l'utilizzo di insetticida per ettaro è risultato essere di 34 g per il Fipronil e di 40 g per il Thiamethoxam.

I fattori emissivi sono riportati in tabella 4.6 considerando la concentrazione media (caso a) e quella massima (caso b) di insetticida nell'aria in uscita dalla seminatrice, ipotizzando che nella prima prova il sistema non fosse ancora a regime.

Tabella 4.6: Fattori emissivi di Fipronil e Thiamethoxam concia 2010 considerando nel caso a) la concentrazione media di insetticida nell'aria e nel caso b) quella massima

Fattori emissivi	a) Concentrazione media		b) Concentrazione massima	
	Fipronil	Thiamethoxam	Fipronil	Thiamethoxam
Emissione (g/h)	1,8	2,2	2,2	2,6
Emissione (g/ha)	0,6	0,8	0,8	0,9
% p.a. disperso	1,9	1,9	2,3	2,3

I risultati delle analisi dimostrano che durante la semina con mais conciato si disperdono grandi quantità di polveri contenenti Fipronil e Thiamethoxam. La percentuale di p.a. rilasciata risulta però minore rispetto al precedente esperimento in cui si sono quantificate le emissioni di Clothianidin. Per il Clothianidin si era quantificata una dispersione di insetticida dal seme del 3 % mentre per il Fipronil ed il Thiamethoxam il risultato è lievemente inferiore. Ciò potrebbe essere dovuto alla maggiore velocità di avanzamento simulata dal trattore nel

precedente esperimento, che potrebbe aver causato una maggiore erosione, oppure da una diversa tipologia di adesivante presente nelle conce contenenti un diverso principio attivo.

4.2.2 Misura della concentrazione di principio attivo nelle polveri aerodisperse a 5 e 10 metri di distanza dalla seminatrice

In base alla dimensione delle particelle emesse dallo scarico dell'aspiratore centrifugo della seminatrice è possibile che queste vengano trasportate dal vento a distanze più o meno grandi rispetto alla zona di semina. Questo fenomeno dipende dalla velocità iniziale delle particelle, dalla velocità del vento e sarà tanto più significativo quanto più piccole saranno le dimensioni dei frammenti dispersi.

Per quanto concerne il primo esperimento, quello in cui si sono utilizzate sementi conciate Poncho con confettatura 2009 e 2010, si sono posti una serie di campionatori fissi a cinque e a dieci metri dallo scarico del sistema pneumatico della seminatrice e allineati con la direzione del flusso dell'aria come descritto nel Paragrafo 2.2.6.

Per l'analisi in laboratorio anche in questo caso i filtri sono stati trattati, diversamente a seconda delle tipologie, come descritto nel Paragrafo 2.2.4 e successivamente analizzati mediante cromatografia liquida con la metodica più conveniente tra quelle descritte nel Paragrafo 3.1. I risultati ottenuti dal campionatore per le PTS sono riportati in tabella 4.7.

Tabella 4.7: Concentrazione di Clothianidin nelle PTS a 5 e a 10 metri dalla seminatrice

Tipo di concia	Concentrazione ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	
	5 metri	10 metri
Poncho (1,25 mg/seme), concia 2009	28,4	13,1
Poncho (1,25 mg/seme), concia 2010	15,0	5,3

Si può notare che le quantità di principio attivo rilevate nel caso del mais conciato con confettatura 2009 sono maggiori rispetto a quelle ottenute con il mais conciato con confettatura 2010, nonostante quest'ultimo tipo di sementi emetta un quantitativo di polveri maggiore dallo scarico della seminatrice come stabilito in precedenza. Si può affermare quindi che la nuova tipologia di concia proposta permette una minore dispersione di principio attivo attraverso il particolato atmosferico dovuta alla formazione di scaglie di confettatura di dimensioni grossolane che ricadono velocemente al suolo. Le concentrazioni a 10 metri dal trattore sono notevolmente più basse a confermare la principale presenza di particolato grossolano.

I risultati ottenuti mediante l'utilizzo dei due impattori multistadio PCIS sono riportati nelle tabelle 4.8 e 4.9.

Tabella 4.8: Concentrazione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) nei 5 stadi del PCIS, confettatura 2009

Poncho (1,25 mg/semi), concia 2009	Concentrazione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)				
	PM 10-2,5	PM 2,5-1	PM 1-0,5	PM 0,5-0,25	PM 0,25
PCIS n°1	2,13	0,57	0,23	0,22	0,54
PCIS n°2	2,93	0,29	0,35	0,17	0,87
Media	2,53	0,43	0,29	0,19	0,71
Deviazione Standard	0,57	0,20	0,09	0,04	0,23

Tabella 4.9: Concentrazione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) nei 5 stadi del PCIS, confettatura 2010

Poncho (1,25 mg/semi), concia 2010	Concentrazione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)				
	PM 10-2,5	PM 2,5-1	PM 1-0,5	PM 0,5-0,25	PM 0,25
PCIS n°1	0,72	0,54	0,17	0,09	0,09
PCIS n°2	0,86	0,33	0,23	0,11	0,09
Media	0,79	0,44	0,20	0,10	0,09
Deviazione Standard	0,10	0,15	0,04	0,01	0,00

I campionatori sono stati posti entrambi a 5 metri di distanza dalla seminatrice per valutare la ripetibilità dei dati ottenuti. I dati risultano essere piuttosto ripetibili considerando gli errori sperimentali. Si nota, come atteso, una quantità più rilevante di principio attivo nel particolato grossolano. E' inoltre osservabile come le quantità di polveri disperse nel caso della concia 2009 siano relativamente più consistenti rispetto a quello della concia 2010. Quest'ultima evidenza è in linea con le osservazioni esposte in precedenza riguardo le caratteristiche dei due tipi di concia. Le concentrazioni di Clothianidin nel particolato fine per la concia 2010 rispetto alla concia 2009 sono infatti decisamente più basse.

Dai dati di concentrazione ottenuti dai due impattori multistadio è possibile calcolare la concentrazione di p.a. nel PM 10, PM 2,5 e PM 1 a 5 metri dalla seminatrice (tabella 4.10).

Tabella 4.10: Concentrazione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) nel PM 10, PM 2,5 e PM 1

Tipo di semente	Concentrazione di Clothianidin ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		
	PM 10	PM 2,5	PM 1
Poncho (1,25 mg/semi), concia 2009	4,2	1,6	1,2
Poncho (1,25 mg/semi), concia 2010	1,7	0,8	0,4

Nella seconda serie di esperimenti, effettuata il 26 maggio 2010, si sono posizionati i campionatori in maniera analoga all'esperimento del 12 maggio, ossia a 5 e dieci metri dallo scarico dell'aspiratore centrifugo della seminatrice, seppur la strumentazione utilizzata presenti alcune differenze come riportato nel Paragrafo 2.2.6.

Ancora una volta i filtri sono stati trattati, a seconda della tipologia, nelle maniere descritte nel Paragrafo 2.2.4 e successivamente analizzati con la metodica di analisi più adatta

tra quelle ottimizzate riportate nel Paragrafo 3.1. In tabella 4.11 sono riportati i dati di concentrazione ottenuti per le PTS e il PM10.

Tabella 4.11: Concentrazione di p.a. nelle PTS e nel PM10 a 5 e a 10 metri dalla seminatrice

Tipo di concia	Concentrazione ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)		
	PTS (5 metri)	PTS (10 metri)	PM 10 (10 metri)
Fipronil (0,5 mg/semi)	13,5	1,9	0,5
Thiamethoxam (0,6 mg/semi)	4,2	1,0	0,6

Dai dati ottenuti si può notare come grosse differenze di concentrazione tra i due principi attivi si abbiano principalmente per quanto concerne le PTS a 5 metri. Va specificato che durante il tempo di campionamento del Thiamethoxam tirava un forte vento e questo può aver causato una dispersione più veloce e non rettilinea (i campionatori erano posizionati in linea retta di fronte allo scarico d'aria) delle polveri contenenti il principio attivo.

Le concentrazioni a 10 metri dal trattore, sia nel caso delle PTS che del PM10 sono notevolmente più basse e questo testimonia che il particolato emesso è principalmente grossolano, tipicamente prodotto per erosione del seme. Le distribuzioni dimensionali determinate con il PCIS a 5 metri dal trattore confermano questa ipotesi (tabelle 4.12 e 4.13).

Tabella 4.12: Concentrazione di p.a. ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) nei 5 stadi del PCIS

Tipo di concia	PM 10-2,5	PM 2,5-1	PM 1-0,5	PM 0,5-0,25	PM 0,25
Fipronil (0,5 mg/semi)	0,81	0,04	0,09	0,02	-
Thiamethoxam (0,6 mg/semi)	0,84	0,07	0,04	0,07	0,07

Tabella 4.13: Concentrazione di p.a. ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) nel PM 10, PM 2,5 e PM 1

Tipo di concia	PM 10	PM 2,5	PM 1
Fipronil (0,5 mg/semi)	0,96	0,15	0,11
Thiamethoxam (0,6 mg/semi)	1,10	0,26	0,19

4.2.3 Distribuzione dimensionale del particolato atmosferico generato dalle seminatrici

Nell'ipotesi che vi sia un effetto tossico acuto per le api associato all'esposizione al particolato di semina è estremamente importante, sia sotto il profilo ambientale che tossicologico, acquisire informazioni sulla distribuzione dimensionale delle particelle potenzialmente tossiche emesse in atmosfera. Tale valutazione è stata effettuata nei terreni adiacenti la serra entomologica del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali mediante l'utilizzo di un contatore ottico di particelle (OPC) posto in entrambi gli esperimenti a 5 metri dal trattore; è stato così possibile misurare la concentrazione di particolato disperso durante le operazioni di semina con mais conciato con neonicotinoidi in tempo reale con una frequenza di campionamento di 1 minuto.

Al fine di valutare il contributo dovuto alla disgregazione della concia, sono state preventivamente valutate le concentrazioni di particolato prima dell'inizio delle operazioni di semina (bianco) e durante il funzionamento del trattore senza semente (bianco trattore). Inoltre, la possibilità di far funzionare la seminatrice a trattore fermo permette di minimizzare il risollevamento di polvere dal suolo, campionando prioritariamente il particolato dovuto alla disgregazione della confettatura che ricopre i semi. In figura 4.1 sono riportati i risultati del campionamento per il primo esperimento.

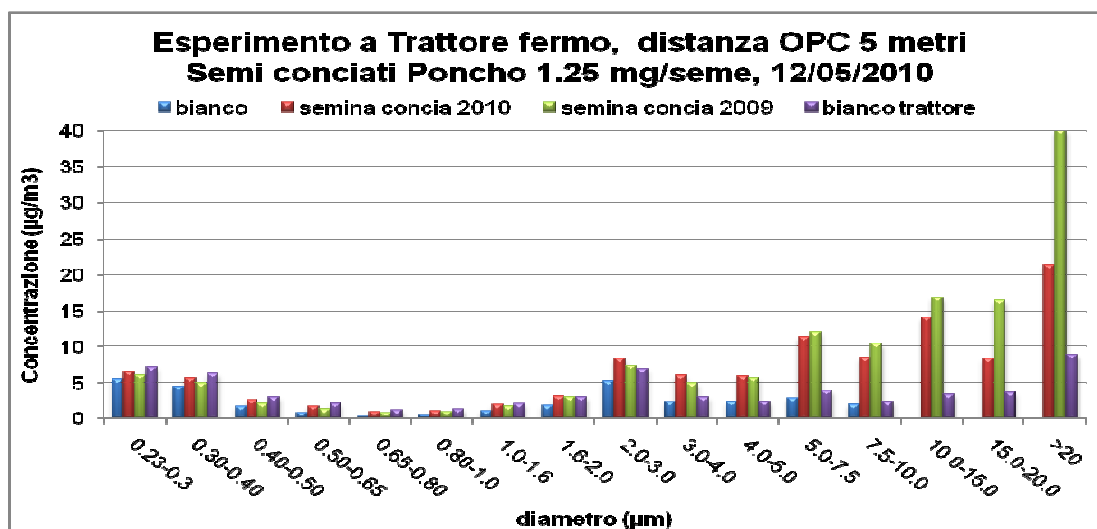


Figura 4.1: Concentrazioni di particolato a 5 metri dalla seminatrice

Il risultato sperimentale conferma le ipotesi precedentemente formulate. Significativi aumenti nella concentrazione di particolato durante le operazioni di semina si registrano solo per le classi di particolato a dimensione più grossolana (a partire da 2-3 µm di diametro). Inoltre la concentrazione di PM è molto maggiore per la semina con mais concia con confettatura 2009 a conferma dei risultati ottenuti dal campionamento su filtri. Le particelle che vengono emesse dai semi confettatura 2010 pur essendo in quantità maggiore, sono di dimensioni grossolane e ricadono principalmente a distanze minori dalla seminatrice.

Anche per quanto concerne il secondo esperimento sono state effettuate delle preventive misure della concentrazione di particolato prima dell'inizio delle operazioni di semina (bianco campagna) e durante il funzionamento del trattore senza semente (bianco trattore). In questo caso il primo bianco trattore è stato rilevato all'inizio in corrispondenza di un tavolo posto a 5 metri dal trattore e a circa 1 metro da terra, mentre il secondo bianco trattore è stato misurato nel tempo intermedio tra le due semine nella medesima posizione.

Per l'analisi vera e propria l'OPC è stato spostato in diverse posizioni al fine di valutare la dispersione del particolato derivante dalla disaggregazione della confettatura delle sementi; in particolare i dati sono stati raccolti nelle seguenti posizioni:

- a 5 metri di distanza dallo scarico e ad altezza dal suolo pari a 1 m, 2 m, 2,5 m e 3,5 m;
- a 10 metri di distanza dallo scarico e ad altezza dal suolo pari a 1 m, 2 m, 2,5 m, 3,5 m;

Chiaramente per una migliore precisione nella misura sarebbe stato opportuno effettuare il bianco in corrispondenza di ciascuna posizione di campionamento. I risultati dell'analisi sono riportati nelle figure 4.2 e 4.3.

Sorprendentemente le concentrazioni del bianco con trattore in funzione risultano più elevate rispetto alle concentrazioni di particolato misurate a quasi tutte le altezze durante la semina con fipronil. Le concentrazioni a 1 m dal suolo e a 3,5 metri dal suolo risultano lievemente più elevate rispetto alle altre altezze; va però ricordato che durante le operazioni di semina il flusso era stato deviato posizionando il tubo allo scarico della seminatrice per consentire il campionamento isocinetico.

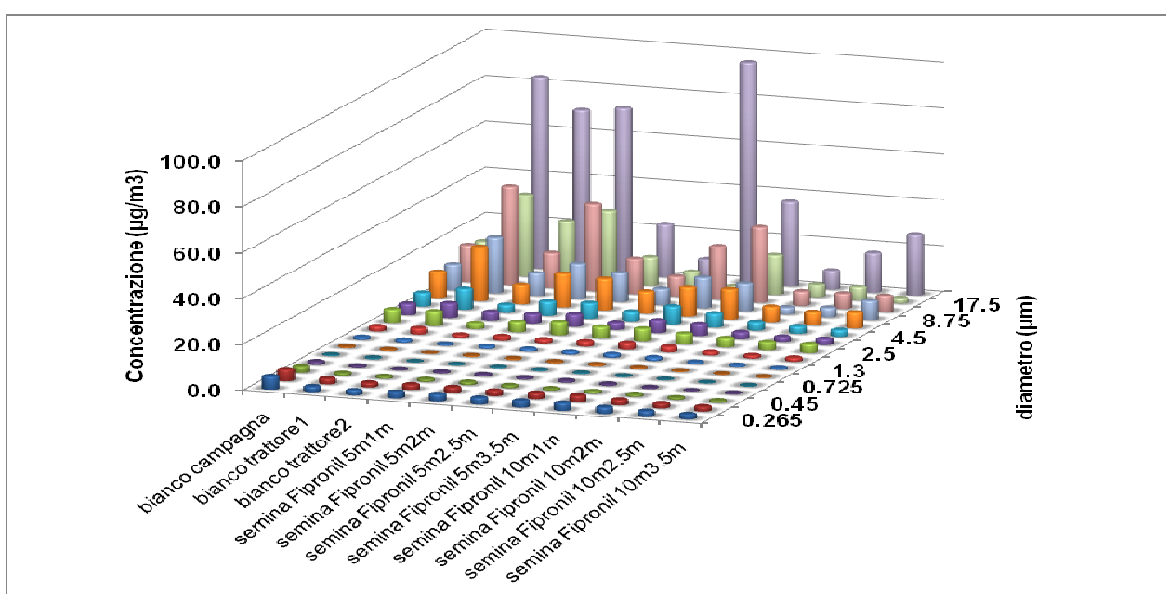


Figura 4.2: Distribuzione dimensionale delle polveri contenenti Fipronil

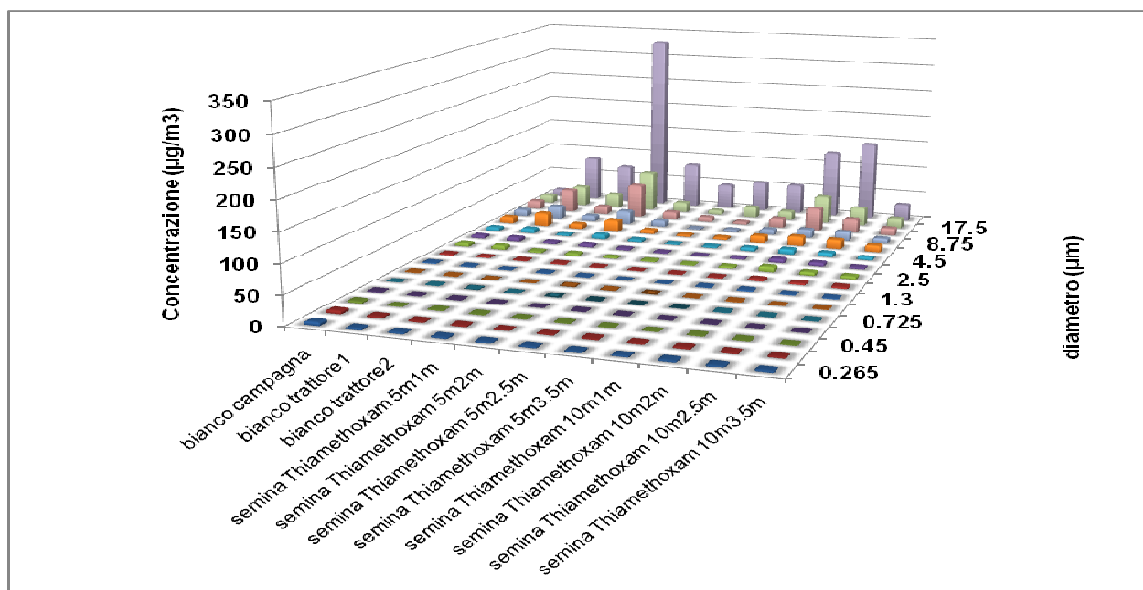


Figura 4.3: Distribuzione dimensionale delle polveri contenenti Thiamethoxam

Le concentrazioni di polveri durante la semina con semi conciatì con Thiamethoxam sono risultate essere decisamente maggiori. Tale aumento nella concentrazione di polveri è però imputabile al vento che, alzatosi durante le operazioni di semina, ha risollevato una grande quantità di polveri dal suolo.

I risultati sperimentali ottenuti in queste due serie di esperimenti confermano l'ipotesi di una consistente produzione e diffusione di particolato contenente l'insetticida durante le operazioni di semina con mais conciato.

Le concentrazioni misurate durante l'esperimento con Fipronil e Thiamethoxam sono più basse rispetto a quelle misurate nel primo caso per il Clothianidin. Ciò si può spiegare sia con una maggiore concentrazione di Clothianidin nella concia che con la maggiore velocità di avanzamento simulata dal trattore durante l'esperimento che potrebbe aver causato una maggiore abrasione dei semi. Una ulteriore ipotesi fa imputare queste differenze ad una probabile difformità nella tipologia di concia a seconda del principio attivo applicato ai semi.

Il confronto tra la semina con mais conciato Poncho confettatura 2009 e 2010 ha rivelato una emissione di una quantità di insetticida nelle polveri molto maggiore per la concia 2010 che era stata proposta al fine di emetterne una minore quantità. A 5 e 10 metri dalla seminatrice però si riscontrano delle concentrazioni di Clothianidin nelle polveri molto più elevate per la semina con concia 2009. Ciò si può spiegare con una produzione di polveri più grossolane per la concia 2010 che quindi, nonostante vengano emesse in quantità maggiore, ricadono velocemente al suolo.

La confettatura 2010 potrebbe risultare quindi meno tossica per le api che sorvolano il campo rispetto alla confettatura 2009 perché minore è la quantità di Clothianidin nel

particolato ad una distanza dalla seminatrice maggiore di 5 metri. Tuttavia, la diminuzione della dispersione di polveri non è tale da impedire una elevata diffusione di particolato contenente l'insetticida.

Anche nel caso del secondo esperimento la distribuzione dimensionale del particolato conferma che le particelle prodotte sono principalmente di tipo grossolano, dovute all'abrasione dei semi.

La distribuzione della concentrazione di particolato a diverse altezze dal suolo non ha prodotto risultati facilmente interpretabili; questo probabilmente a causa dell'eccessiva aerazione e del risollevamento di polveri dal suolo dovute al vento.

4.3 Applicazione del metodo all'analisi di gocce di guttazione fogliare raccolte da plantule di *Zea mays* ottenute a partire da semi conciat

Al fine di studiare il fenomeno della presenza dei neonicotinoidi nelle gocce di guttazione delle piantine di *Zea mays* sono stati effettuati numerosi test volti a stabilire alcuni dei parametri critici per questo fenomeno.

Un primo esperimento è stato svolto in un campo aperto di circa un ettaro adiacente alla serra entomologica del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali. In tale sito sono stati seminati sei filari di mais con semi conciat con neonicotinoidi e due con semi conciat solo con Celest XL, una miscela fungicida presente in tutte le sementi, come controllo. In particolare, nel primo, nel secondo e nel terzo filare sono stati piantati semi con confettatura 2009 contenenti rispettivamente Thiamethoxam, Clothianidin e Imidacloprid e nella sesta, nella settima e nell'ottava fila semi di mais con confettatura 2010 contenenti rispettivamente nell'ordine Imidacloprid, Clothianidin e Thiamethoxam. Nella quarta e nella quinta fila erano presenti i semi trattati con solo Celest XL. All'interno dello stesso filare i semi distavano l'uno dall'altro di circa 25 cm. I campionamenti delle gocce di guttazione sono stati effettuati con le seguenti modalità:

- 1) una prima serie di campionamenti è stata svolta mediante due tipi di prelievo:
 - a) per ogni filare sono state effettuate delle raccolte multiple di goccioline di guttazione da circa 40 piante tra le 7:30 e le 8:30 e stoccate in una singola fiala per filare (per principio attivo di analoga confettatura);
 - b) per ogni filare, tranne i due contenenti solo Celest XL, sono state effettuate nuove raccolte multiple da circa 40 piante da un'ulteriore zona del campo tra le 10:00 e le 11:00 dello stesso giorno e anche queste sono state poste in una fiala diversa per

ogni principio attivo e confettatura differenti;

- 2) altre sei serie di campionamenti sono state effettuate in date diverse
- 3) altre due serie di campionamenti sono state effettuate su parte dello stesso campo ma riparato dalle intemperie mediante una lastra in plexiglass.

La semina è stata effettuata il giorno 21 aprile 2010 e le piante hanno presentato una completa emergenza dal terreno solo il 29 aprile 2010. La prima serie di campionamenti nella modalità descritta al punto 1 è stata effettuata il giorno successivo, ossia il 30 aprile 2010. I campionamenti del punto 2, a causa della frequente piovosità del periodo, sono stati effettuati nei giorni 7, 14, 17, 18 e 21 maggio ad orari variabili e sempre su circa 40 piante per tutti i tipi di concia tranne per quelle contenenti solo Celest XL. I campionamenti descritti al punto 3 sono stati effettuati nei giorni 6 e 14 maggio e riguardavano gocce di guttazione fogliare prelevate da piante conciate con solo Poncho con confettatura 2010 (p.a. Clothianidin) e Gaucho 350 FS con concia 2010 (p.a. Imidacloprid).

Tutti campioni sono stati trattati come descritto nel Paragrafo 2.2.4 e poi analizzati tramite cromatografia liquida ad elevate prestazioni UFLC.

1) Guttazioni fogliari raccolte nello stesso giorno

I risultati delle analisi delle guttazioni fogliari raccolte nello stesso giorno sono riportati in tabella 4.14 e rappresentati mediante il grafico presente in figura 4.4.

Tabella 4.14: Concentrazioni di diversi p.a. nei campioni di guttazione fogliare raccolte da circa 40 piante il 30 aprile 2010 (punti 1 - a e 1 - b)

Orario di Prelievo	Thiamethoxam		Clothianidin		Imidacloprid	
	Concia	Concia	Concia	Concia	Concia	Concia
	2009 (mg/L)*	2010 (mg/L) *	2009 (mg/L)	2010 (mg/L)	2009 (mg/L)	2010 (mg/L)
8:00	79,1	117,3	31,9	44,7	105,7	179,8
11:00	201,3	227,3	46,3	19,2	221,7	76,9

*Nei campioni contenenti Thiamethoxam si è notata la presenza anche di Clothianidin in concentrazioni variabili tra i 5 e i 13 mg/L

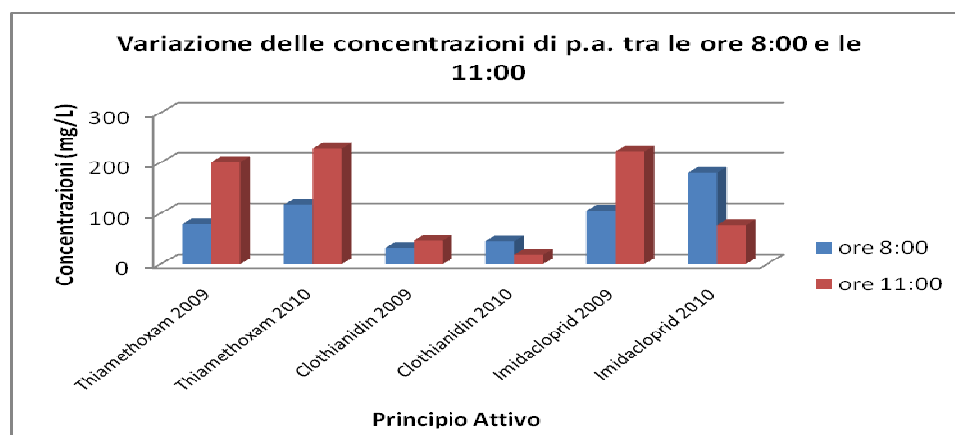


Figura 4.4: Variazione delle concentrazioni dei p.a. in esame tra le ore 8:00 e le ore 11:00

Dai risultati ottenuti per le guttazioni “multiple” alle ore 8:00 (tabella 4.14 e figura 4.4) si può notare un comportamento analogo per le due annate di confettatura: l’Imidacloprid si disperde in maniera maggiore nelle piante attraverso la linfa rispetto al Thiamethoxam che a sua volta si distribuisce meglio del Clothianidin. Tale andamento risulta sommariamente concorde con l’idrofilicità di questi p.a. (vedi Paragrafo 1.2.3), essendo la linfa un mezzo fondamentalmente acquoso, nonostante essa non sia l’unico parametro in gioco.

Per quanto riguarda le guttazioni prelevate alle ore 11:00 si osserva un comportamento simile per le conce 2009 e 2010 solo nel caso del Thiamethoxam la cui concentrazione aumenta di circa il 100 % rispetto a quella rilevata alle ore 8:00. Gli altri due principi attivi mostrano invece un comportamento opposto, ossia un calo di circa il 50% per le conce 2010 e un aumento dal 30 al 100% per le conce 2009.

Poiché tra i due tipi di concia non si nota una sostanziale differenza fisica, al momento attuale è difficile dare un’interpretazione a questi risultati poiché l’andamento atteso, un aumento nelle concentrazioni dovuta all’evaporazione della parte acquosa causata dal maggior irraggiamento solare passando dalle ore 8:00 alle ore 11:00, è riscontrabile solo nelle guttazioni delle piante da semi con la confettatura 2009.

2) Analisi dei p.a. delle guttazioni in tempi diversi.

I risultati sono riportati in tabella 4.15 e nel grafico presente nella figura 4.5.

Tabella 4.15: Variazione della concentrazione dei principi attivi nelle gocce di guttazione nel tempo

Giorno	Thiamethoxam		Clothianidin		Imidacloprid	
	Concia 2009 (mg/L)	Concia 2010 (mg/L)	Concia 2009 (mg/L)	Concia 2010 (mg/L)	Concia 2009 (mg/L)	Concia 2010 (mg/L)
30/04	140,2	172,3	39,1	31,9	163,7	128,4
07/05	1,3	2,4	1,3	1,0	2,2	1,0
14/05	0,3	0,4	2,4	1,0	0,8	0,8
17/05	0,1	0,2	0,8	1,1	0,4	0,5
18/05	0,2	0,3	1,2	0,8	0,6	0,4
21/05	0,1	0,1	0,7	0,6	0,4	0,2

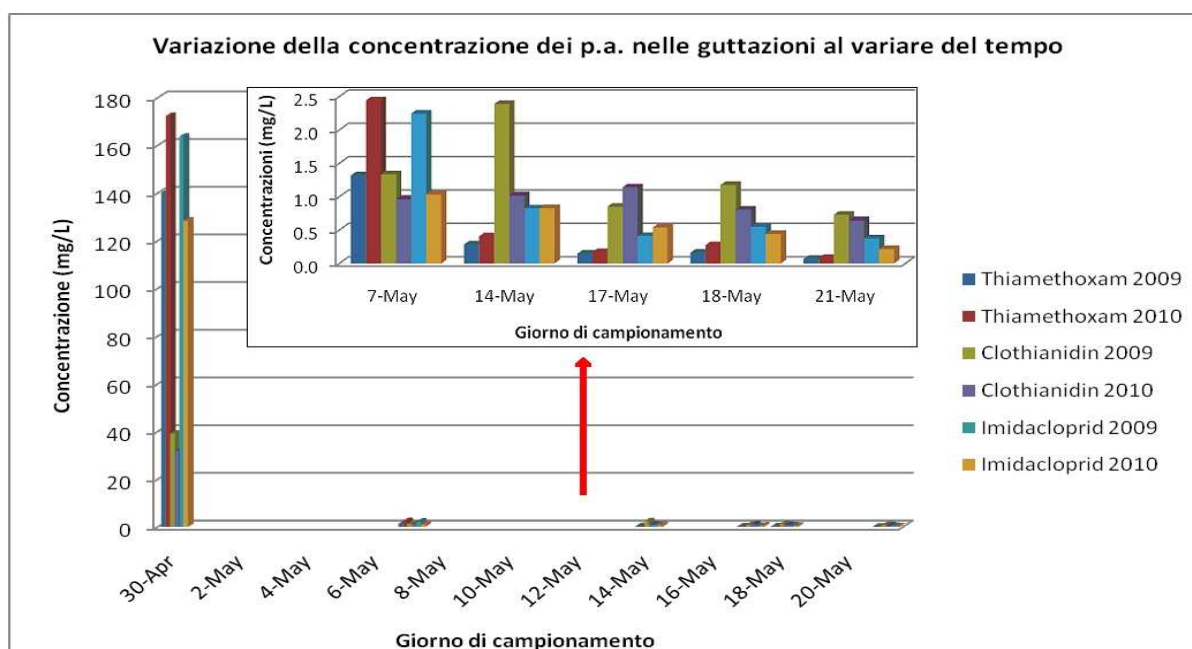


Figura 4.5: Variazione delle concentrazioni dei p.a. presenti nelle guttazioni in funzione del tempo con un esploso della zona a più basse concentrazioni

Osservando i risultati ottenuti dall'analisi delle guttazioni in campo aperto (tabella 4.15 e figura 4.5), effettuate in vari giorni successivi alla completa emergenza delle piante dal terreno, come atteso si può notare un andamento esponenzialmente decrescente nelle concentrazioni dei principi attivi col passare dei giorni.

3) Confronto tra le concentrazioni in p.a. da guttazioni di piante riparate e non

I risultati sono riportati nelle tabelle 4.16 e 4.17.

Tabella 4.16: Concentrazioni di diversi principi attivi nelle guttazioni fogliari prelevate da piante poste sotto una copertura di plexiglass al variare del tempo

Giorno	Clothianidin 2010 (mg/L)	Imidacloprid 2010 (mg/L)
6 Maggio	1,716	3,953
14 Maggio	2,376	1,172

Tabella 4.17: Concentrazioni di due diversi principi attivi al variare delle condizioni ambientali

Giorno	Situazione Piante	Clothianidin 2010 (mg/L)	Imidacloprid 2010 (mg/L)
14 Maggio	Campo aperto	1,021	0,825
14 Maggio	Sotto Copertura	2,376	1,172

Confrontando le concentrazioni di Clothianidin e Imidacloprid presenti nelle piante poste sotto alla copertura in plexiglass con quelle di analoghe piante (con gli stessi principi attivi) poste in campo aperto (tabelle 4.16 e 4.17) si osserva una presenza maggiore di principio attivo in quelle protette dalla pioggia; questo può essere dovuto probabilmente sia ad un minor dilavamento del principio attivo che dalla maggior concentrazione delle gocce di guttazione per il diverso microclima presente.

A conclusione di questo primo esperimento è da notare la scarsa correlazione fra dose di concia e livello di p.a. riscontrato nelle guttazioni che può essere spiegata dalla variabilità di risposta della singola pianta alla dose di conciante e dalle caratteristiche chimico-fisiche dei diversi principi attivi che si adattano in maniera difforme alle diverse condizioni ambientali e meteorologiche.

E' stato successivamente effettuato, al fine di studiare il fenomeno della presenza dei neonicotinoidi nelle gocce di guttazione delle piantine di mais e della loro diversa concentrazione al variare del tipo di terreno in esame, un secondo esperimento. Utilizzando tre diversi appezzamenti ubicati nell'alto vicentino e caratterizzati da terreni dalle caratteristiche differenti, sono stati seminati 4 filari di piantine di mais rispettivamente conciate con Celest XL (fila 1, come controllo) Poncho (p.a. Clothianidin, concia 2010, fila 2), Gaucho 350 FS (p.a. Imidacloprid, confettatura 2010, fila 3) e Cruiser 350 FS (p.a. Thiamethoxam, concia 2010, fila 4). I tre diversi appezzamenti avevano le seguenti caratteristiche:

- a) terreno sabbioso e pietroso molto drenante ("Campo S")
- b) terreno a medio impasto ("Campo M")
- c) terreno argilloso, ricco di sostanza organica e poco drenante ("Campo N")

I campionamenti delle gocce di guttazione sono stati effettuati mediante pipette Pasteur raccogliendo gocce di più piante della stessa fila all'interno di una fialetta di vetro da 1,5 mL con tappo a vite (una per ogni giorno di prelievo e per ogni tipo di terreno)

Le date di semina, i giorni di emergenza delle plantule di mais dal terreno e i giorni di campionamento per tutti i tipi di semente sono indicati in tabella 4.18.

Tabella 4.18: Giorni di semina, emergenza dal terreno e campionamento per il mais seminato nei tre diversi tipi di terreno

Tipo di Terreno	Giorno di semina	Giorno di emergenza delle plantule	Giorni di Campionamento
Campo S	30/04	11/05	19/05, 21/05, 24/05, 26/05, 31/05, 01/06, 07/06
Campo M	30/04	11/05	26/05 ^{a,b} , 31/05, 01/06 ^{c,d} , 04/06, 07/06
Campo N	21/05	29/05	07/06, 11/06, 12/06, 17/06

^a effettuata due volte per la fila 1; ^b non effettuata per la fila 4; ^c effettuata due volte per la fila 4; ^d non effettuata per la fila 1.

I campioni così ottenuti sono stati trattati secondo la metodica descritta nel Paragrafo 2.2.4 prima di essere analizzati. I risultati delle analisi sono riportati in tabella 4.19 in cui, accanto alle concentrazioni dei neonicotinoidi propri delle file, vengono riportate anche le concentrazioni di altri p.a. eventualmente presenti.

Tabella 4.19: Concentrazioni di neonicotinoidi nelle guttazioni fogliari di piante coltivate in tre diverse tipologie di terreno

Campo	Data	Neonicotinoidi (mg/L) ^a				
		Fila 2	Fila 3	Fila 4		
		Clothianidin	Imidacloprid	Clothianidin	Thiamethoxam	Clothianidin
S	19/05	143,964	242,070	2,400	53,428	14,278
	21/05	40,418	16,731	-	15,822	4,277
	24/05	13,593	6,527	-	1,048	0,307
	26/05	8,073	1,775	-	0,606	0,150
	31/05	0,725	0,093	-	0,020	0,012
	01/06	0,509	0,137	-	0,015	0,007
	07/06	0,644	0,227	-	-	0,025
M	26/05	2,503	1,826	-	- ^b	- ^b
	26/05	- ^b	- ^b	- ^b	- ^b	- ^b
	31/05	0,367	0,179	-	0,035	0,018
	01/06	0,532	0,238	-	0,089	0,034
	01/06	- ^b	- ^b	- ^b	-	-
	04/06	0,533	0,116	-	-	0,040
	07/06	0,367	0,128	-	-	0,033
N	07/06	20,813	2,970	-	5,434	0,909
	11/06	2,899	0,613	-	1,016	0,408
	12/06	5,213	0,970	-	0,531	0,258
	17/06	0,131	0,048	-	0,022	0,021

^a le deviazioni standard non sono riportate ma variano da 0,001 a 0,004 mg/L; ^b Campionamenti non effettuati.

Nelle guttazioni delle piante della fila 1 (semi conciatati con solo Celest XL) non si sono mai trovati altri p.a., ad eccezione dei giorni 26 e 30 maggio in cui nelle guttazioni del campo M si è riscontrata la presenza del solo Clothianidin a concentrazioni rispettivamente di 0,267 e 0,013 mg/L. Il Clothianidin era generalmente presente anche nelle guttazioni delle piante delle file 3 e 4.

In figura 4.6 è riportato un esempio dell'andamento delle concentrazioni dei p.a. nel tempo.

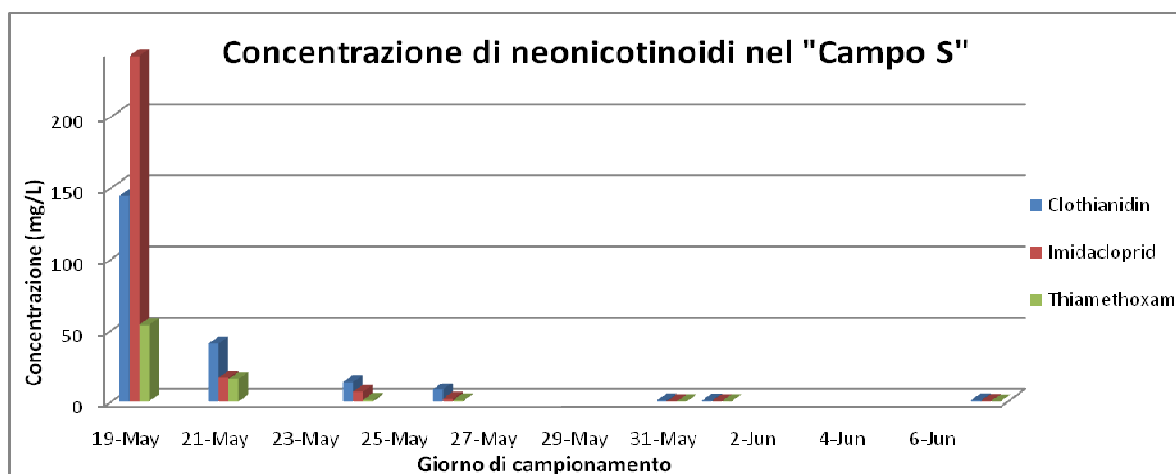


Figura 4.6: Concentrazioni di Clothianidin, Imidacloprid e Thiamethoxam presenti nelle gocce di guttazione fogliare prelevate dalle piante di mais coltivate nel "Campo S"

Dai risultati ottenuti è possibile osservare che in tutti i tre tipi di terreno si ha un decadimento esponenziale delle concentrazioni dei tre principi attivi man mano che ci si allontana dal giorno di semina. L'andamento generale per tutti e tre i campi in esame vede una presenza in concentrazione maggiore di Clothianidin rispetto agli altri due principi attivi seguito poi dall'Imidacloprid e dal Thiamethoxam per i campi "S" ed "M" (ordine inverso rispetto all'idrofilicità). Nel caso del campo con terreno argilloso ("Campo N"), invece, le concentrazioni di Thiamethoxam risultano mediamente superiori rispetto a quelle di Imidacloprid. Una possibile spiegazione di questo comportamento potrebbe essere la maggiore affinità del Thiamethoxam (molto idrofilico) per la linfa rispetto al terreno ricco di sostanza organica.

Una ulteriore osservazione riguarda la presenza di notevoli quantità di Clothianidin nelle gocce di guttazione prelevate da piante di mais conciate con altri principi attivi dovute probabilmente a possibili contaminazioni avvenute durante o prima della semina.

A conclusione di questi esperimenti si può affermare che i risultati della ricerca di p.a. insetticidi all'interno delle gocce di guttazione mostrano, in entrambi gli esperimenti, presenze molto elevate di questi nelle gocce di guttazione. Tali livelli di concentrazione, considerati i possibili volumi di ingestione d'acqua da parte di api, prossimi ai 30 μ L, risultano chiaramente ben al di sopra delle DL_{50} per ingestione per tali organismi.

4.4 Applicazione del metodo su api contaminate da principi attivi insetticidi

4.4.1 Analisi delle api campionate dopo o durante le simulazioni di semina

In questo lavoro di tesi sono stati svolti vari test ed analisi sulle api. Il primo esperimento è stato effettuato su 50 api trovate morte nei pressi delle loro arnie e campionate in data 17/05/2010 per valutare l'eventuale presenza di tracce di neonicotinoidi al loro interno. Tali api erano state prelevate cinque giorni dopo la simulazione di semina del 12/05/2010 effettuata con semi di mais conciatati con Clothianidin (Poncho, concia 2009 e concia 2010) e si voleva quindi investigare la possibile connessione tra i due eventi.

Dopo aver scelto in maniera casuale 10 api tra le 50 a disposizione, queste sono state trattate con la metodica descritta nel Paragrafo 2.2.4. Dall'analisi si è riscontrata l'assenza di p.a. neonicotinoidi in tutti e dieci i campioni analizzati e non è stato quindi possibile affermare nulla di certo riguardo la loro morte.

L'assenza di principi attivi, infatti, poteva esser dovuta sia alla non contaminazione delle api (morte quindi per altre cause) sia alla totale o parziale metabolizzazione o alla eliminazione dei principi attivi ricercati da parte delle api stesse o dell'ambiente in cui erano state lasciate per 5 giorni. L'impatto ambientale nella possibile degradazione dei p.a. nelle api è stato oggetto di numerosi esperimenti (descritti in seguito) atti a tentare di stabilire quale tra vari parametri fosse la causa dell'assenza di analita all'interno delle api analizzate.

Durante il secondo esperimento di simulazione di semina, effettuato il 26/05/2010 con mais conciato Regent 500 FS (Fipronil, confettatura 2010, 0,5 mg/semi) e con mais conciato Cruiser 350 FS (Thiamethoxam, confettatura 2010, 0,6 mg/semi), si è cercato di verificare l'ammontare dell'impolveramento subito delle api di passaggio attraverso il flusso d'aria emesso dalla seminatrice. Per essere certi del passaggio di un cospicuo numero di api, esse erano state in precedenza abituate a trovare una soluzione zuccherina in degli appositi dispensatori posti al termine del campo su cui poi è stato svolto l'esperimento.

Le api sono state prelevate vive dai dispensatori (in un caso anche nei pressi dell'arnia) a vari tempi dall'inizio della semina e poste subito all'interno di gabbie di tulle. Queste gabbiette venivano quindi poste o in normali condizioni di umidità o in ambiente reso altamente umido. Il numero di api raccolte, il tempo di prelievo e le condizioni di conservazione sono descritti in tabella 4.20.

Tabella 4.20: Descrizione dei campioni raccolti

Principio Attivo	Numero di api campionate	Tempo di prelievo dopo l'inizio della semina (min)	Condizioni di conservazione ^a
Fipronil	6	0	Umido
	6	30	Secco
	4	30	Umido
Thiamethoxam ^b	5	5	Umido
	4	15	Umido
	6	30	Secco
	5	30	Umido
	4	45	Umido
	4	60	Umido
	4 ^c	60	Umido

^a Con "Secco" è indicata una condizione di umidità normale, mentre con "Umido" alta umidità; ^b La semina in questo caso si è protratta per 45 min. e non per 30 min come per il Fipronil; ^c api campionate fuori dalle arnie.

Le api, una volta sopraggiunta la morte, sono state prelevate e mantenute a -20 °C fino al procedimento di estrazione che è stato eseguito mediante la metodica ottimizzata descritta nel Paragrafo 2.2.4 e seguito dall'analisi con l'opportuna metodica presente nel Paragrafo 3.1. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4.21.

Prima di commentare la tabella occorre precisare che, nel caso della semina con Thiamethoxam, 8 api sono state prelevate anche dopo 60 minuti, sebbene la seminatrice fosse

stata già spenta da 15 minuti. Ciò può spiegare la contrazione nelle quantità di principio attivo osservata in tali insetti.

Tabella 4.21: Quantità di neonicotinoidi reperiti nelle api al variare dell'umidità e del tempo all'inizio della semina.

Ape	Condizioni sperimentali		Principio Attivo					
	Tempo (min)	Clima	Thiamethoxam ^a			Fipronil		
			Quantità (µg/ape)	Media (µg/ape)	Dev. St. (µg/ape)	Quantità (µg/ape)	Media (µg/ape)	Dev. St. (µg/ape)
1	0	-	- ^b			-		
2	0	-	- ^b			-		
3	0	-	- ^b			-		
4	0	-	- ^b	- ^b	- ^b	-	-	-
5	0	-	- ^b			-		
6	0	-	- ^b			-		
1	5	Umido	0,319			- ^b		
2	5	Umido	0,414			- ^b		
3	5	Umido	0,362	0,31	0,12	- ^b	-	-
4	5	Umido	0,338			- ^b		
5	5	Umido	0,105			- ^b		
6	5	Umido	- ^b			- ^b		
1	15	Umido	0,493			- ^b		
2	15	Umido	0,467	0,523	0,064	- ^b	-	-
3	15	Umido	0,613			- ^b		
4	15	Umido	0,520			- ^b		
1	30	Secco	-			0,047		
2	30	Secco	0,085			0,278		
3	30	Secco	0,265	0,104	0,087	0,052	0,21	0,16
4	30	Secco	0,102			0,316		
5	30	Secco	0,078			0,448		
6	30	Secco	0,095			0,147		
1	30	Umido	0,313			0,974		
2	30	Umido	0,284			1,260		
3	30	Umido	0,284	0,267	0,059	0,501	0,85	0,33
4	30	Umido	0,291			0,675		
5	30	Umido	0,165			-		
1	45	Umido	0,411			- ^b		
2	45	Umido	0,222	0,49	0,22	- ^b	-	-
3	45	Umido	0,640			- ^b		
4	45	Umido	0,688			- ^b		
1	60	Umido	0,302			- ^b		
2	60	Umido	0,150	0,189	0,078	- ^b	-	-
3	60	Umido	0,128			- ^b		
4	60	Umido	0,178			- ^b		
1	60 ^c	Umido	0,579			- ^b		
2	60 ^c	Umido	0,357	0,456	0,095	- ^b	-	-
3	60 ^c	Umido	0,473			- ^b		
4	60 ^c	Umido	0,415			- ^b		

^a Nei Campioni contenenti Thiamethoxam si è riscontrata anche la presenza di Fipronil in quantità massime di 0,1 mg/L; ^b Campione non presente; ^c Api prelevate di fronte alle arnie e non negli abbeveratoi presenti nel campo.

Dai dati riportati emergono alcune considerazioni:

- 1) la presenza di Fipronil nelle api (al massimo 0,1 mg/L) passate sopra le polveri durante la seconda semina di mais conciato con Thiamethoxam è da imputare alla polvere di concia della prima semina di mais (Fipronil) rimasta nella seminatrice anche dopo un lungo periodo di attesa e di pulizia dell'impianto di semina del trattore tra la prima e la seconda semina. Pertanto non è da escludere a priori un possibile concorso alla morte delle api catturate durante la semina con Thiamethoxam da parte del Fipronil;
- 2) non è possibile riscontrare un trend di crescita della quantità di principio attivo in funzione del tempo di impolveramento poiché probabilmente le api sono state catturate dopo un solo volo oppure, più semplicemente, per una questione meteorologica dovuta alla elevata ventilazione presente durante la semina con mais conciato Cruiser 350 FS che ha portato ad una maggiore diluizione e dispersione del principio attivo nell'aria;
- 3) durante le prove di semina si sono continuati a riutilizzare gli stessi semi più volte e ciò ha portato ad un inevitabile leggero calo nel tempo della quantità di polveri di concia espulse dalla seminatrice;
- 4) dal confronto delle prove in differenti condizioni di conservazione delle api (secco o umido) si evidenzia una maggiore quantità di principio attivo presente nelle api tenute in condizioni ad elevata umidità rispetto a quelle tenute in condizioni normali; un aumento di due volte nel caso del Thiamethoxam e di quattro volte nel caso del Fipronil (cfr. dati in tabella 4.21 per i campioni presi a 30 minuti in condizioni di "secco" e "umido"). Questo può essere in parte spiegato con il fatto che con una maggiore umidità le polveri tendono a rimanere adese più tenacemente alla superficie corporea delle api che non riescono così a scrollarsele di dosso come invece riescono a fare in situazioni di bassa umidità. Un'altra possibilità è che l'umidità possa favorire la penetrazione dei principi attivi all'interno dell'ape sia perché questi sono solubili nell'acqua (il Thiamethoxam molto più del Fipronil) sia per la differente condizione di idratazione della superficie stessa. Dall'osservazione dei tempi di sopravvivenza delle api durante il campionamento si è osservato infatti che le api tenute nelle gabbie umidificate tendevano a morire molto più rapidamente (entro 45 min) di quelle in gabbie non umidificate (oltre le tre ore).

Da questo secondo esperimento emerge infine che le api sono state effettivamente esposte a dosi molto elevate di p.a. ben al di sopra delle rispettive DL_{50} per contatto stimate in qualche decina di ng/ape.

4.4.2 Test di degradazione dei principi attivi nelle e sulle api

Il primo test di verifica della degradazione dei principi attivi sulle api è stato svolto su degli insetti campionati il 6 maggio 2010 dal personale del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova ed esposti allo scarico d'aria di una seminatrice in funzione caricata con semi conciatati con Imidacloprid. Gli obiettivi di questo esperimento erano tre:

- Verificare l'eventuale degradazione nel tempo dovuta alla permanenza delle api all'ambiente esterno;
- Verificare l'eventuale perdita di p.a. per degradazione metabolica o pulizia per scrollamento effettuata dalle api stesse rimaste vive per più tempo.
- Verificare l'eventuale degradazione dovuta alla cattiva conservazione dei campioni

A tal fine, settantadue api sono state poste in due gabbie contenenti ciascuna circa 40 api e posizionate a 2 metri d'altezza e distanti 2 metri dallo scarico d'aria di una seminatrice caricata con sementi conciate Gaucho 350 FS (p.a. Imidacloprid, concia 2010). Dopo circa 40 secondi di esposizione è stata spenta la seminatrice e le api sono state prelevate con una pinzetta e poste a gruppi di 6 in 12 gabbiette suddivise come descritto in tabella 4.22.

Tabella 4.22: Descrizione dei campioni raccolti

Tempo di prelievo dopo la contaminazione (TEMPO)	Quantità di api	Periodo a T. amb. (h)	Temperatura di conservazione (°C)
0 min. (TEMPO 0)	12	-	- 80
30 min. (TEMPO 1)	6	-	- 80
	6	-	+2/+4
	6	24	- 80
	6	48	- 80
	6	96	- 80
	6	120	- 80
180 min. (TEMPO 2)	6	-	- 80
	6	-	+2/+4
	6	24	- 80
	6	48	- 80

Le api sono state poste ognuna in una fiala diversa, trattate con la metodica ottimizzata descritta nel Paragrafo 2.2.4 e quindi analizzate.

Dall'osservazione delle api prima dei trattamenti estrattivi si è potuto notare come in molte di esse si fosse formato uno strato di muffa di cui si ignora l'eventuale effetto metabolico sui principi attivi indagati. I risultati delle analisi sono riportati in Tabella 4.23.

Dai dati ottenuti non è possibile stabilire l'attuarsi di un effettivo aumento della degradazione all'aumentare del tempo di esposizione all'ambiente delle api in quanto le concentrazioni di Imidacloprid paiono rimanere pressoché costanti (vedi medie TEMPO 1 in

tabella 4.23). Una tale valutazione risulta ancora più difficile anche in considerazione delle differenze morfologiche notevoli tra ape ed ape e alla non certa uniformità dell'esposizione tra le api.

Tabella 4.23: Quantità di Imidacloprid nelle api esposte a diverse condizioni ambientali e di conservazione prima dell'analisi

TEMPO	Trattamento sulle api					
	-80 °C Conc. µg/ape	+2/+4°C Conc. µg/ape	24 h T. amb. Conc. µg/ape	48 h T. amb. Conc. µg/ape	96 h T. amb.. Conc. µg/ape	120 h T. amb. Conc. µg/ape
0	1,774	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	0,189	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	2,502	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	1,595	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	1,360	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	2,886	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	1,889	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	0,242	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	0,335	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	1,502	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	1,483	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
0	0,910	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
MEDIA	1,4 ± 0,9	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
1	1,195	1,555	1,862	3,246	1,554	4,435
1	8,076	0,766	3,029	1,022	0,521	1,005
1	3,234	6,468	1,948	1,712	1,745	0,084
1	0,897	2,970	0,696	0,591	3,000	0,321
1	1,327	3,063	0,296	0,541	1,169	1,138
1	4,969	3,294	1,381	0,202	3,415	0,223
MEDIA	3,3 ± 2,8	3,0 ± 2,0	1,5 ± 1,0	1,2 ± 1,1	1,9 ± 1,1	1,2 ± 1,6
2	1,433	0,219	0,336	1,839	- ^a	- ^a
2	1,398	1,028	0,978	3,70	- ^a	- ^a
2	0,889	0,380	1,706	5,059	- ^a	- ^a
2	0,897	2,751	0,869	4,392	- ^a	- ^a
2	3,565	2,650	0,407	4,050	- ^a	- ^a
2	3,565	1,838	1,603	13,945	- ^a	- ^a
MEDIA	2,0 ± 1,3	1,5 ± 1,1	1,0 ± 0,6	5,5 ± 4,3	- ^a	- ^a

^a Campione non presente

Al fine di evidenziare perdite di p.a. dovute a possibili processi degradativi metabolici e/o allo scrollamento della polvere da parte delle api stesse, si sono comparati in tabella 4.24 e figura 4.7 i dati relativi ai diversi TEMPI (0, 1 e 2) omogenei per trattamento.

Tabella 4.24: Degradazione metabolica dei principi attivi

Tempo	Trattamento	Concentrazione (µg/ape)	Dev. St. (µg/ape)
0	-80°C	1,39	0,85
1	-80°C	3,3	2,8
2	-80°C	2,0	1,3
1	24 h T amb.	1,54	0,98
2	24 h T amb.	0,98	0,58
1	48 h T amb.	1,2	1,1
2	48 h T amb.	5,5	4,3

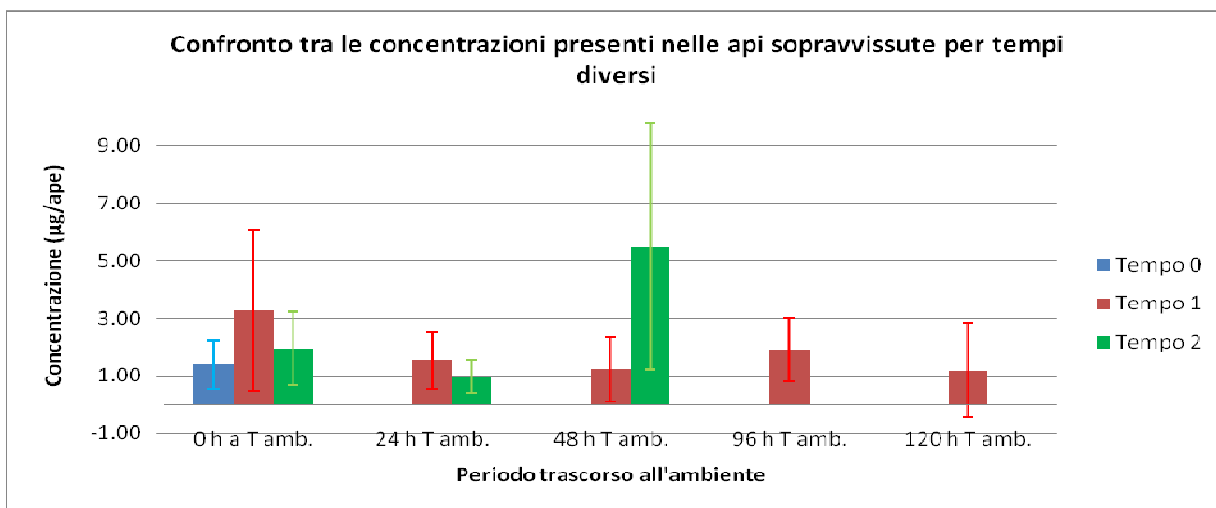


Figura 4.7: Confronto tra i risultati ottenuti nelle medesime condizioni per le api sopravvissute per i tre diversi TEMPI (0, 1 e 2).

Come si può osservare, il trend decrescente che ci si aspettava rimane disatteso visto l'andamento scostante delle concentrazioni non consentendo alcuna conclusione certa a riguardo.

Per ultimo, si è tentato di valutare un'eventuale degradazione di p.a. dovuta al particolare tipo di conservazione (dati in tabella 4.25).

Tabella 4.25: Degradazione dei principi attivi in funzione del tipo di conservazione

Tempo	Trattamento	Concentrazione (µg/ape)	Dev. St. (µg/ape)
1	-80°C	3,3	2,8
1	+2/+4	3,0	2,0
2	-80°C	2,0	1,3
2	+2/+4	1,5	1,1

Per quanto concerne questo punto, ossia la possibile degradazione dovuta ad una cattiva conservazione, il confronto tra i valori medi dei campioni di api mantenuti a – 80°C e quelli delle api conservate in frigorifero a +2/+4°C sembra evidenziare un calo nelle concentrazioni anche se l'incertezza sulle misure risulta elevata. Questo calo potrebbe essere attribuito a processi degradativi dovuti alla presenza di muffe sulle api, ipotesi comunque attualmente non verificata.

Una secondo set di analisi è stato effettuato a metà luglio. Per questo esperimento il personale del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova ha preparato alcune arnie mantenendone un primo gruppo sotto nebulizzazione e un altro alle normali condizioni ambientali. Il giorno 20/07/2010 presso i terreni adiacenti la serra entomologica del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali è stata effettuata una semina di mais conciato con il principio attivo Clothianidin (Poncho, confettatura 2010) facendo in modo che, durante questa operazione, un gran numero di api

attraversasse la nube d'aria contaminata prodotta dalla seminatrice. La raccolta dei campioni (le api) è stata effettuata davanti alle arnie dopo 3 ore per un primo set di campioni (uno per condizione di umidità) e dopo un giorno per tutti gli altri. Le api trovate morte il 21/07/2010 sono state prelevate davanti alle due arnie (una per tipo di trattamento) che presentavano il maggior numero di morti (circa 400-500 api per arnia). A questo punto sono state suddivise le api morte in 6 gruppi di circa 25 api per entrambe le condizioni di umidità e sono state poste in buste di tulle lasciate poi sul manto erboso sottostante gli alveari per 1, 2, 3 e 5 giorni rispettivamente.

Per ogni tipo di campione sono state trattate 5 api prese singolarmente con la metodica riportata nel Paragrafo 2.2.4 e successivamente analizzate. In nessuno dei campioni analizzati è stata riscontrata la presenza di alcun neonicotinoide.

Per verificare se le concentrazioni non fossero troppo basse per essere rivelate mediante cromatografia liquida con il metodo utilizzato fin'ora, è stata effettuata una prova di estrazione massiva utilizzando 20 api prelevate dal campione che ne conteneva il numero maggiore (Tempo 2 U) con la metodica descritta nel Paragrafo 2.2.4. Anche in questo caso l'analisi non ha mostrato la presenza dei principi attivi da noi ricercati.

Si è quindi deciso di verificare se questa seconda metodica, con un utilizzo minore di solvente, fosse la causa dell'assenza di Clothianidin nei cromatogrammi mediante la prova di estrazione effettuata con la metodica descritta nel Paragrafo 2.2.5.

Neppure con questa metodica si sono palesati i picchi cromatografici corrispondenti ai neonicotinoidi e si è quindi dedotto che il problema della loro non rivelazione non era da attribuirsi al poco volume di metanolo utilizzato (che avrebbe forse potuto non esser sufficiente all'estrazione) ma alla loro assenza o infinitesima presenza nei campioni analizzati. Questo è spiegabile con una probabile degradazione del principio attivo nel tempo sia per via fotolitica che metabolica nonché alla probabile "diluizione" delle polveri con cui erano entrate in contatto le api per sfregamento autonomo (dovuto al movimento e al volo di queste api durante le 3 o le 24 ore prima dei prelievi), per quello avvenuto contro le altre api e per quello svoltosi contro le pareti dell'arnia stessa al ritorno delle api in quest'ultima.

L'ultimo esperimento, effettuato presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Chimiche di Padova, è stato svolto per cercare di eliminare alcune variabili e per meglio valutare, in presenza di temperatura ed umidità costanti, il processo degradativo dei principi attivi presenti all'interno di api già morte e drogate durante questo test (risultati riportati in tabella 4.26).

Tabella 4.26: Valutazione della degradazione di Thiamethoxam iniettato all'interno di api morte alla concentrazione di circa 500 ng/ape

Campione	Tempo (h)	Drogaggio (ng/ape)	Concentrazione (ng/ape)	Media (ng/ape)	Dev. St. (ng/ape)
1	0	Bianco	-	-	-
2	0	Bianco	-		
3	0	Bianco	-		
4	0	Bianco	-		
5	0	Bianco	-		
6	0	500	402,0	336	167
7	0	500	438,0		
8	0	500	103,5		
9	0	500	223,5		
10	0	500	513,0		
11	1	500	360,5	429	168
12	1	500	162,5		
13	1	500	550,0		
14	1	500	538,5		
15	1	500	534,5		
16	2	500	533,0	508	56
17	2	500	533,5		
18	2	500	532,5		
19	2	500	535,0		
20	2	500	407,0		
21	4	500	536,0	522	24
22	4	500	529,5		
23	4	500	533,0		
24	4	500	536,0		
25	4	500	479,5		
26	8	500	44,0	239,7	225
27	8	500	476,0		
28	8	500	76,5		
29	8	500	107,0		
30	8	500	495,0		
31	16	500	-	307	217
32	16	500	284,5		
33	16	500	535,0		
34	16	500	493,5		
35	16	500	223,0		
36	24	500	467,0	458	77
37	24	500	522,5		
38	24	500	537,0		
39	24	500	352,5		
40	24	500	411,5		
41	48	500	448,5	462	23
42	48	500	489,0		
43	48	500	465,5		
44	48	500	431,5		
45	48	500	479,0		

In questo esperimento quarantacinque api morte sono state suddivise in gruppi da cinque. Cinque api formavano il gruppo “bianco api” mentre le altre quaranta sono state drogate con circa 500 ng di Thiamethoxam mediante iniezione sottocutanea addominale di 5 µL di una soluzione acquosa contenente 100 mg/L in principio attivo effettuata mediante un “agomicropipetta”. I vari gruppi sono stati lasciati per tempi diversi in un box (QBOX³ Momo line) a temperatura (24 ± 1 °C) e umidità (50 ± 5 %) costanti e subito posti in congelatore a -20 °C fino all'estrazione e all'analisi. I campioni consistevano in 5 api non drogate lasciate nel box 0 h (bianco), e 40 api drogate e lasciate a gruppi di 5 nel box per rispettivamente 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 48 ore.

Se si considerano come errori di manualità in fase di iniezione i dati di concentrazione trovata risultati molto lontani dal valore più ricorrente nel gruppo, il quadro risultante indica chiaramente che fino a 48 ore di permanenza nelle condizioni descritte non sembrano esserci evidenti indicazioni di processi degradativi del neonicotinoide in questione a carico dell'ambiente esterno. Pertanto si può ragionevolmente escludere che il non reperimento di principio attivo in api morte raccolte davanti all'alveare nelle prove precedenti sia da ascrivere a fattori di tipo ambientale.

Al termine di questi test di degradazione per p.a. sulle api è quindi possibile affermare che la via preferenziale per questo processo è di tipo biologico e che quindi, per determinare la presenza di questi principi attivi all'interno di api recuperate dopo molte ore dalla loro contaminazione e morte, è opportuno ricercare i metaboliti piuttosto che i principi attivi stessi.

5 CONCLUSIONI

Nel corso del presente lavoro di tesi si è ottimizzato un metodo estrattivo e di analisi HPLC/DAD per singole api con delle prestazioni tali da consentire la rivelazione di quantità di p.a. insetticidi prossime a quelle degli LD₅₀ orali e per contatto di questi insetti. Le metodologie approntate per le varie matrici consentono:

- separazioni cromatografiche con un'ottima risoluzione e una risposta strumentale lineare nell'intervallo di concentrazioni indagato e tempi di analisi relativamente brevi che variano tra i 3,5 e gli 8 minuti.
- dei limiti di rivelabilità fino a 20 volte più bassi di quelli riportati in letteratura per strumentazioni analoghe.
- una precisione su misure effettuate su matrici reali attorno al 1-2% al di sopra di concentrazioni sopra gli 0,200 mg/L e attorno al 5 % per concentrazioni di 0,040 mg/L aumentando poi sempre più avvicinandosi ai LOD.
- dei recuperi per il metodo estrattivo per tutti i principi attivi mediamente superiori al 90 %, seppur talvolta risentano di variazioni nelle matrici analizzate.

Inoltre l'analisi su singola ape presenta notevoli vantaggi rispetto a quelle su più api riportate in letteratura ed in particolare consente di utilizzare un numero limitato di insetti per avere una buona stima dei valori medi di contaminazione senza dover spopolare interi alveari e permette una determinazione puntuale sulla reale contaminazione di ogni ape. Questo secondo aspetto può rivelarsi particolarmente utile durante futuri test in vivo poiché avere condizioni controllate per un numero limitato o per una sola ape è decisamente più semplice che non nel caso si abbia a che fare con centinaia di api contemporaneamente.

Per quanto concerne l'applicazione dei metodi ottimizzati su campioni reali si è osservato che:

- la variabilità nella quantità di principio attivo presente in semi diversi è relativamente bassa e i valori di concentrazione di p.a. di concia nei semi sono in linea con quanto dichiarato dal produttore;
- le quantità di insetticida nelle conce 2010 sono per tutti i p.a. nell'ordine del 25-35%, minori di quelle registrate per semine di annate precedenti;
- durante le simulazioni di semina allo scarico vi è una maggior emissione di polveri da parte delle conce di nuova generazione rispetto alle vecchie; questa maggior emissione è concomitante ad una maggior dimensione del particolato che poi, all'allontanarsi dal trattore, tende a depositarsi più velocemente al suolo ed è quindi meno a disposizione

delle api in volo (come verificato dai dati ottenuti a 5 e 10 metri di distanza). Durante le semine si disperdono comunque grandi quantità di polveri contenenti p.a. insetticidi che possono venire a contatto con le api; la percentuale di rilascio per seme varia tra il 2 e il 3 % a seconda delle condizioni di semina e del tipo di confettatura. Inoltre i dati relativi alla distribuzione dimensionale forniscono indicazioni riguardo al fatto che la frazione più consistente di particolato formato è di tipo grossolano;

- la concentrazione di p.a. nelle guttazioni fogliari diminuisce nel tempo all'allontanarsi dal giorno di semina e dipende dalle caratteristiche chimico fisiche del principio attivo stesso (l'idrofilicità in particolare). Grande importanza hanno anche il clima, le precipitazioni, le temperature e il suolo in cui le piantine di mais crescono. Le gocce di guttazione delle piante di mais presentano delle concentrazioni di p.a. particolarmente elevate e, se vengono utilizzate dalle api come fonte di acqua, ne possono causare la morte in pochi minuti;
- durante le semine la concentrazione media di p.a. sulle api campionate in campo è pari a 400 – 500 ng/ape (ben al di sopra degli LD₅₀); l'umidità gioca un ruolo importante nella loro contaminazione poiché ad un suo aumento corrisponde un incremento delle quantità di p.a. sulle api fino a 2 - 4 volte ed una conseguente drastica riduzione dei tempi necessari al sopraggiungere della morte;
- sulle api campionate dopo ore e giorni dalla contaminazione il ritrovamento di p.a. insetticidi risulta scarso o assente. Questo problema è stato valutato e si è dimostrato che l'assenza dei p.a. nelle api non è determinata da processi degradativi di tipo ambientale ma principalmente dalla metabolizzazione degli stessi da parte delle api o di altri organismi presenti sul o nel loro corpo.

6 BIBLIOGRAFIA

- [1] Benvenuti M, Frascchetti L, Gubiani M, Masci A. *Schema di riferimento per le iniziative nel settore apistico*. Rete Rurale Nazionale 2009; 1-78
- [2] Todisco A. *Introduzione*. In Atti del Workshop “Sindrome dello spopolamento degli alveari”. Ed. V. Bellucci, 7. Roma 2008.
- [3] <http://www.extension.umn.edu/honeybees/>, Spivak M. *Honeybee Protection and Insecticides*, 2008
- [4] Kluser S, Peduzzi P. “*Global Pollinator Decline: A Literature Review*”. UNEP/GRIDEurope.© UNEP 2007
- [5] vanEngelsdorp D, Hayes J, Jr., Underwood RM, Pettis J. *A Survey of Honey Bee Colony Losses in the US, Fall 2007 to Spring 2008*. Plos One 2008; 3: e4071
- [6] Kaplan K. *Colony collapse disorder - A complex buzz (Reprinted from Agricultural Research, May/June, 2008)*. American Bee Journal 2008; 148: 617-618
- [7] Johnson R. *Recent Honey Bee Colony Declines*. CRS Report for Congress 2008; 1-16.
- [8] Hendricks P, Chauzat MP, Debin M, Neuman P, Fries I, Ritter W, Brown M, Mutinelli F, Le Conte Y, Gregorc A. *Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe*. EFSA Scientific Report 2009; 1-217.
- [9] www.mieliditalia.it, Panella F. *Hanno fatto un deserto e lo hanno chiamato...agricoltura!*. Dossier U.N.A.API 2007; 1-15
- [10] Cox-Foster D, Vanengelsdorp D. *Saving the HONEYBEE*. Scientific American 2009; 300: 40
- [11] Mutinelli F. *La sindrome dello spopolamento degli alveari o colony collapse disorder*. IASMA Notizie 2008; 7 (3): 1-4
- [12] Crailsheim, K, Brodschneider R, Neumann P. *The COLOSS Puzzle. Filling in the gaps*. In “Proceedings of the 4th Coloss Conference – Prevention of honeybee Colony LOSSes”. 46-47 Zagreb (Croatia) 2009.
- [13] vanEngelsdorp D, Cox-Foster D, Frazier M, Ostiguy N, Hayes J. “*Fall-Dwindle Disease*”: *Investigations into the causes of sudden and alarming colony losses experienced by beekeepers in the fall of 2006*. Rexrod C., USDA’s ARS, Statement before the Subcommittee on Horticulture and Organic Agriculture, U.S. House of Representative 2007; 1-22
- [14] Anderson D, East IJ. *The latest buzz about colony collapse disorder*. Science 2008; 319: 724-725
- [15] Johnson RM, Evans JD, Robinson GE, Berenbaum MR. *Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (Apis mellifera)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009; 106: 14790-14795

[16] Bruss B. *New Insecticides and Honey bee Colony Collapse*. NCDA & CS Inspector Meeting 2008.

[17] Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan P, Brieseman T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder*. Science 2007; 318: 283-287

[18] vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarry DR, Pettis JS. *Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study*. Plos One 2009; 4: e6481

[19] Pettis J, Vanengelsdorp D, Cox-Foster D. *Colony collapse disorder working group pathogen sub-group progress report*. American Bee Journal 2007; 147: 595-597

[20] Ratnieks FLW, Carreck NL. *Clarity on Honey Bee Collapse?*. Science 2010; 327: 152-153

[21] Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y. *Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (Apis mellifera)*. Environmental Microbiology 2009; 1-9

[22] <http://maarec.psu.edu>, Frazier M. *Protecting Honey Bees from Chemical Pesticides*. 2007.

[23] Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. *Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, Apis mellifera*. Crop Protection 2004; 23: 371-378

[24] Oldroyd BP. *Coevolution while you wait: Varroa jacobsoni, a new parasite of western honeybees*. Trends in Ecology & Evolution 1999; 14: 312-315

[25] Kim U. *Neonicotinoid Insecticides*. MMG 445 Basic Biotechnology eJournal 2006; 2 (1): 46-52

[26] <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>, The PPDB Pesticide Properties Database

[27] European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Directorate E1 - Plant Health. *Review report for the active substance acetamiprid*. SANCO/1932/2001, 2004, 1-33

[28] www.dayoochem.com, Dayoo Chemical Industrial

[29] BASF, *Safety data sheet for REGENT TS*, 2005, 1-9

[30] Tomizawa M, Casida JE. *Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors*. Annual Review of Entomology 2003; 48: 339-364

- [31] Desneux N, Decourtye A, Delpuech J. *The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods*. Annual Review of Entomology 2007; 52: 81-106
- [32] Tomizawa M, Lee DL, Casida JE. *Neonicotinoid insecticides: Molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2000; 48: 6016-6024
- [33] Matsuda K, Kanaoka S, Akamatsu M, Sattelle DB. *Diverse Actions and Target-Site Selectivity of Neonicotinoids: Structural Insights*. Molecular pharmacology 2009; 76: 1-10
- [34] Kakamand FAK, Mahmoud TT, Amin ABM. *The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honeybee apis mellifera l. workers*. Journal of Dohuk University 2008; 11 (1): 144-151
- [35] Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH. *Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae)*. Journal of economic entomology 2008; 101: 1743-1748
- [36] Bortolotti L, Montanari R, Marcellino J, Medrzycki P, Maini S, Porrini C. *Effects of sublethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees*. Bulletin of Insectology 2003; 56 (1): 63-67
- [37] Aliouane Y, el Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M. *Subchronic Exposure of Honeybees to Sublethal Doses of Pesticides: Effects on Behavior*. Environmental Toxicology and Chemistry 2009; 28: 113-122
- [38] El Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C. *Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (Apis mellifera)*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2008; 54: 653-661
- [39] Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R, Belzunces LP. *Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (Apis mellifera)*. Neurobiology of learning and memory 2001; 76: 183-191
- [40] Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham-Delegue MH. *Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (Apis mellifera L.)*. Pesticide biochemistry and physiology 2004; 78: 83-92
- [41] <http://www.cra-api.it/online/index.php>. Relazione sull'attività svolta e sui primi risultati ottenuti nell'ambito del progetto Apenet per la tematica "Effetti del mais conciato sulle api" 2009.
- [42] <http://www.buglife.org.uk/>, Kindemba V. *The impact of neonicotinoid insecticide on bumblebees, Honey bees and other non-target invertebrates*. 2009; 1-52
- [43] Suchail S, Guez D, Belzunces LP. *Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in Apis mellifera*. Environmental Toxicology and Chemistry 2001; 20: 2482-2486

- [44] <http://www.apat.gov.it/>, Greatti M. *Gli insetticidi impiegati nella concia del seme di mais: effetti sulle api e dispersione nell'ambiente*.
- [45] Gross M. *Pesticides linked to bee deaths*. Current Biology 2008; 18: R684-R684
- [46] Bruneau E, Panella F, Kievits J. *La valutazione dei prodotti fitosanitari*. ARPA rivista 2008; 4: 10-11
- [47] Prichard AM. *Notice of decision to initiate reevaluation of chemicals in the nitroguanidine insecticide class of neonicotinoids*. California Notice 2009; 02: 1-3
- [48] Yen PY. *Environmental fate of imidacloprid*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 1997; 213: 95-AGRO
- [49] Connelly P. *Environmental fate of fipronil*. Department of Pesticide Regulation, California. U.S. Environmental Protection Agency 2001.
- [50] <http://www.millersriver.net/pollen/>, Stoner K, Eitzer B. *Pesticides in Pollen Collected From Honey Bee Hives in Connecticut*. Pollinator Conference 2008.
- [51] Furlan L. *LA DIFESA DEL MAIS NELLE PRIME FASI DI SVILUPPO: conoscenze ed esperienze di lotta integrata*. Convegno "Difesa dagli insetti terricoli - Attuali conoscenze e strategie d'intervento" Bologna 2009
- [52] <http://newsroom.bayercropscience.com/>, Bayer Cropscience. *Professor Vincenzo Girolami proposes scientific study of guttation water in maize*. Background Information 2009
- [53] Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W, Nauen R. *Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection*. Pest management science 2008; 64: 1099-1105.
- [54] <http://www.reterurale.it/api>, Scheda APENET: *Monitoraggio e ricerca in apicoltura*. APENET. Servizio della Rete Rurale Nazionale 2009
- [55] Schnier HF, Weing G, Laubert F, Simon V, Schmuck R. *Honey bee safety of imidacloprid corn seed treatment*. Bulletin of Insectology 2003; 56 (1): 73-75.
- [56] Greatti M, Sabatini GA, Barbattini R, Rossi S, Stravisi A. *Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results*. Bulletin of Insectology 2003; 56: 69-72.
- [57] Greatti M, Barbattini R, Stravisi A, Sabatini AG, Rossi S. *Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with Gaucho dressed seeds*. Bulletin of Insectology 2006; 59: 99-103.
- [58] Greatti M, Barbattini R, Stravisi A, Sabatini AG, Rossi S. *Dispersione nell'ambiente del conciante Gaucho 350FS (s.a. imidacloprid) durante la semina del mais. Gli insetticidi impiegati nella concia del seme di mais*. Notiziario ERSA 2/2008; 32-35
- [59] Tapparo A, Girolami V, Mazzon L, Giorio C, Marzaro M, Targa A. *Assessment of the environmental exposure of honey bees to neonicotinoid insecticides coming from corn coated*

seeds. Indo-Italian Conference on Emerging Trends in Waste Management Technologies (ETWMT 2009) Pune (India), 2009.

[60] Curtis LC. *THE EXUDATION OF GLUTAMINE FROM LAWN GRASS*. Plant Physiology 1944; 19 (1): 1-5

[61] Visscher PK, Crailsheim K, Sherman G. *How do honey bees (Apis mellifera) fuel their water foraging flights?*. Journal of insect physiology 1996; 42: 1089-1094

[62] Kuhnholz S, Seeley TD. *The control of water collection in honey bee colonies*. Behavioral Ecology and Sociobiology 1997; 41: 407-422

[63] Shawki MAA, Titera D, Kazda J, Kohoutkova J, Taborsky V. *Toxicity to honeybees of water guttation and dew collected from winter rape treated with Nurelle D registered*. Plant Protection Science 2005; 42: 9-14.

[64] Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C, Tapparo A. *Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees*. Journal of economic entomology 2009; 102: 1808-1815

[65] www.jki.bund.de, Joachimsmeier I, Schenke D, Pistorius J, Heimbach U. *Exposure assessment of pesticides in guttation droplets following seed treatment - Maize and winter barley in greenhouse -*. 2009

[66] Aajoud A, Raveton M, Azrou-Isghi D, Tissut M, Ravanel P. *How can the fipronil insecticide access phloem?*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008; 56: 3732-3737

[67] Laurent FM, Rathahao E. *Distribution of [C-14]imidacloprid in sunflowers (Helianthus annuus L.) following seed treatment*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003; 51: 8005-8010

[68] Bonmatin JM, Marchand PA, Charvet R, Moineau I, Bengsch ER, Colin ME. *Quantification of imidacloprid uptake in maize crops*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005; 53: 5336-5341

[69] Greatti M, Barbattini R, De Colle M, Sabatini AG, Rancan M, Rossi S. *EFFETTI DI ALCUNI INSETTICIDI UTILIZZATI NELLA CONCIA DEL SEME DI MAIS NEI CONFRONTI DI METCALFA PRUINOSA*. ATTI Giornate Fitopatologiche 2008; 1: 233-239

[70] Catella G, Ghiringhelli R, Pandolfi F, Fabbro I. *Determinazione di IMIDACLOPRID e suoi metaboliti in acque superficiali e profonde mediante HPLC/MS/MS*. APAT - Workshop "Piano di controllo degli effetti ambientali dei prodotti fitosanitari" Roma 2006

[71] Chen T, Dai Y, Ding J, Yuan S, Ni J. *N-demethylation of neonicotinoid insecticide acetamiprid by bacterium Stenotrophomonas maltophilia CGMCC 1.1788*. Biodegradation 2008; 19: 651-658

[72] Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP. *Metabolism of imidacloprid in Apis mellifera*. Pest management science 2004; 60: 291-296

- [73] Rancan M, Sabatini AG, Achilli G, Galletti GC. *Determination of Imidacloprid and metabolites by liquid chromatography with an electrochemical detector and post column photochemical reactor*. *Analytica Chimica Acta* 2006; 555: 20-24
- [74] Rancan M, Rossi S, Sabatini AG. *Determination of Thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor*. *Journal of Chromatography a* 2006; 1123: 60-65
- [75] Rossi S, Sabatini AG, Cenciarini R, Ghini S, Girotti S. *Use of high-performance liquid chromatography-UV and gas chromatography-mass spectrometry for determination of the imidacloprid content of honeybees, pollen, paper filters, grass, and flowers*. *Chromatographia* 2005; 61: 189-195
- [76] Schmuck R, Schoning R, Stork A, Schramel O. *Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L. Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers*. *Pest management science* 2001; 57: 225-238
- [77] Totti S, Fernandez M, Ghini S, Pico Y, Fini F, Manes J, Girotti S. *Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography-mass spectrometry detection*. *Talanta* 2006; 69: 724-729
- [78] Gil Garcia MD, Martinez Galera M, Santiago Valverde R, Galanti A, Girotti S. *Column switching liquid chromatography and post-column photochemically fluorescence detection to determine imidacloprid and 6-chloronicotinic acid in honeybees*. *Journal of Chromatography a* 2007; 1147: 17-23
- [79] Walorczyk S, Gnusowski B. *Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry*. *Journal of Chromatography a* 2009; 1216: 6522-6531
- [80] Hernandez JL. *HPLC Determination of Imidacloprid in Surface and Well Water*. CALIFORNIA DEPT. OF FOOD & AGRICULTURE, Method: 33.5, 2001
- [81] Hirrano D, Hernandez JL. *HPLC Determination of Total Imidacloprid in Vegetation*. CALIFORNIA DEPT. OF FOOD & AGRICULTURE, Method: EM 12.7, 2002
- [82] Zhou Q, Ding Y, Xiao J. *Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to high-performance liquid chromatography*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006; 385: 1520-1525
- [83] Singh SB, Foster GD, Khan SU. *Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52: 105-109

- [84] Mohan C, Kumar Y, Madan J, Saxena N, Lai D. *Simultaneous evaluation of neonicotinoids in cotton seed cake using reverse phase high-performance liquid chromatography*. Journal of the science of food and agriculture 2009; 89: 1250-1252
- [85] Bourgin M, Bize M, Durand S, Albet J, Violleau F. *Development of a Rapid Determination of Pesticides in Coated Seeds Using a High-Performance Liquid Chromatography-UV Detection System*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009; 57: 10032-10037
- [86] Watanabe E, Baba K, Eun H. *Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in agricultural samples by solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography equipped with diode-array detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2007; 55: 3798-3804
- [87] Seccia S, Fidente P, Montesano D, Morrica P. *Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection*. Journal of Chromatography a 2008; 1214: 115-120
- [88] Ying GG, Kookana RS. *Simultaneous determination of imidacloprid, thiacloprid, and thiamethoxam in soil and water by high-performance liquid chromatography with diode-array detection*. Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes 2004; 39: 737-746
- [89] Guzsvany V, Madzgalj A, Trebse P, Gaal F, Franko M. *Determination of selected neonicotinoid insecticides by liquid chromatography with thermal lens spectrometric detection*. Environmental Chemistry Letters 2007; 5: 203-208
- [90] Fidente P, Seccia S, Vanni F, Morrica P. *Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. Journal of Chromatography a 2005; 1094: 175-178
- [91] Obana H, Okihashi M, Akutsu K, Kitagawa Y, Hori S. *Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003; 51: 2501-2505
- [92] Di Muccio A, Fidente P, Barbini DA, Dommarco R, Seccia S, Morrica P. *Application of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruit and vegetables*. Journal of Chromatography a 2006; 1108: 1-6
- [93] Seccia S, Fidente P, Barbini DA, Morrica P. *Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residues in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 2005; 553: 21-26
- [94] Ferrer I, Thurman EM. *Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography a 2007; 1175: 24-37

- [95] Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER. *A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens*. Analytical Chemistry 2003; 75: 2027-2033
- [96] Coscolla C, Yusa V, Marti P, Pastor A. *Analysis of currently used pesticides in fine airborne particulate matter (PM 2.5) by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography a 2008; 1200: 100-107
- [97] Coscolla C, Yusa V, Isabel Beser M, Pastor A. *Multi-residue analysis of 30 currently used pesticides in fine airborne particulate matter (PM 2.5) by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography a 2009; 1216: 8817-8827
- [98] Lee SJ, Park S, Choi JY, Shim J, Shin E, Choi J, Kim ST, El-Aty AMA, Jin JS, Bae DW, Shin SC. *Multiresidue analysis of pesticides with hydrolyzable functionality in cooked vegetables by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Biomedical Chromatography 2009; 23: 719-731
- [99] Navalon A, GonzalezCasado A, ElKhattabi R, Vilchez JL, FernandezAlba AR. *Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography-mass spectrometry*. Analyst 1997; 122: 579-581
- [100] Papp Z, Svancara I, Guzsvany V, Vytras K, Gaal F. *Voltammetric determination of imidacloprid insecticide in selected samples using a carbon paste electrode*. Microchimica Acta 2009; 166: 169-175
- [101] Guzsvany V, Kadar M, Papp Z, Bjelica L, Gaal F, Toth K. *Monitoring of photocatalytic degradation of selected neonicotinoid insecticides by cathodic voltammetry with a bismuth film electrode*. Electroanalysis 2008; 20: 291-300
- [102] Guzsvany V, Kadar M, Gaal F, Toth K, Bjelica L. *Rapid differential pulse polarographic determination of thiamethoxam in commercial formulations and some real samples*. Microchimica Acta 2006; 154: 321-328
- [103] Garcia-Reyes JF, Jackson AU, Molina-Diaz A, Cooks RG. *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Trace Analysis of Agrochemicals in Food*. Analytical Chemistry 2009; 81: 820-829
- [104] Xu T, Jacobsen CM, Cho IK, Hara AH, Li QX. *Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of imidacloprid in wiliwili tree, Erythrina sandwicensis O. deg, for control of the wasp Quadrastichus erythrinae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006; 54: 8444-8449
- [105] Watanabe E, Eun H, Baba K, Arao T, Ishii Y, Endo S, Ueji M. *Rapid and simple screening analysis for residual imidacloprid in agricultural products with commercially available ELISA*. Analytica Chimica Acta 2004; 521: 45-51
- [106] Shim W, Yakovleva ME, Kim K, Nam B, Vylegzhanina ES, Komarov AA, Eremin SA, Chung D. *Development of Fluorescence Polarization Immunoassay for the Rapid Detection of*

6-Chloronicotinic Acid: Main Metabolite of Neonicotinoid Insecticides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009; 57: 791-796

[107] Bi X, Yang K. *On-Line Monitoring Imidacloprid and Thiacloprid in Celery Juice Using Quartz Crystal Microbalance*. Analytical Chemistry 2009; 81: 527-532

[108] Flores JL, Diaz AM, de Cordova MLF. *Development of a photochemically induced fluorescence-based optosensor for the determination of imidacloprid in peppers and environmental waters*. Talanta 2007; 72: 991-997

[109] Qu F, Zhou X, Xu J, Li H, Xie G. *Luminescence switching of CdTe quantum dots in presence of p-sulfonatocalix[4]arene to detect pesticides in aqueous solution*. Talanta 2009; 78: 1359-1363

[110] Targa A. *Studio dell'esposizione ambientale delle api agli insetticidi neonicotinoidi impiegati nella concia dei semi di mais e sua rilevanza per la comprensione del Colony Collapse Disorder (CCD)*. Tesi di Laurea Specialistica; Padova (Italia), 2009

[111] Hubaux A, Vox G. *Decision and Detection Limits for Linear Calibration Curves*. Analytical Chemistry 1970; 42 (8): 849-855

7 APPENDICE A

Spettri di assorbimento UV per i principi attivi insetticidi indagati in questo lavoro di tesi.

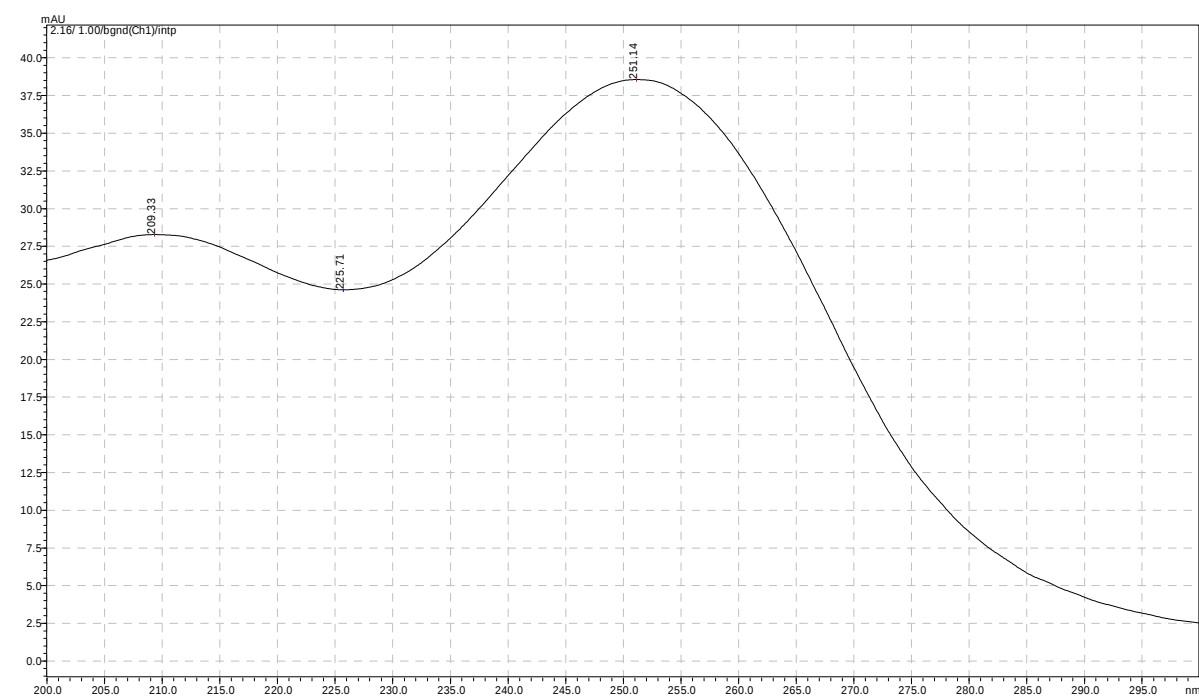


Figura 7.1: Spettro di assorbimento UV per il Thiamethoxam

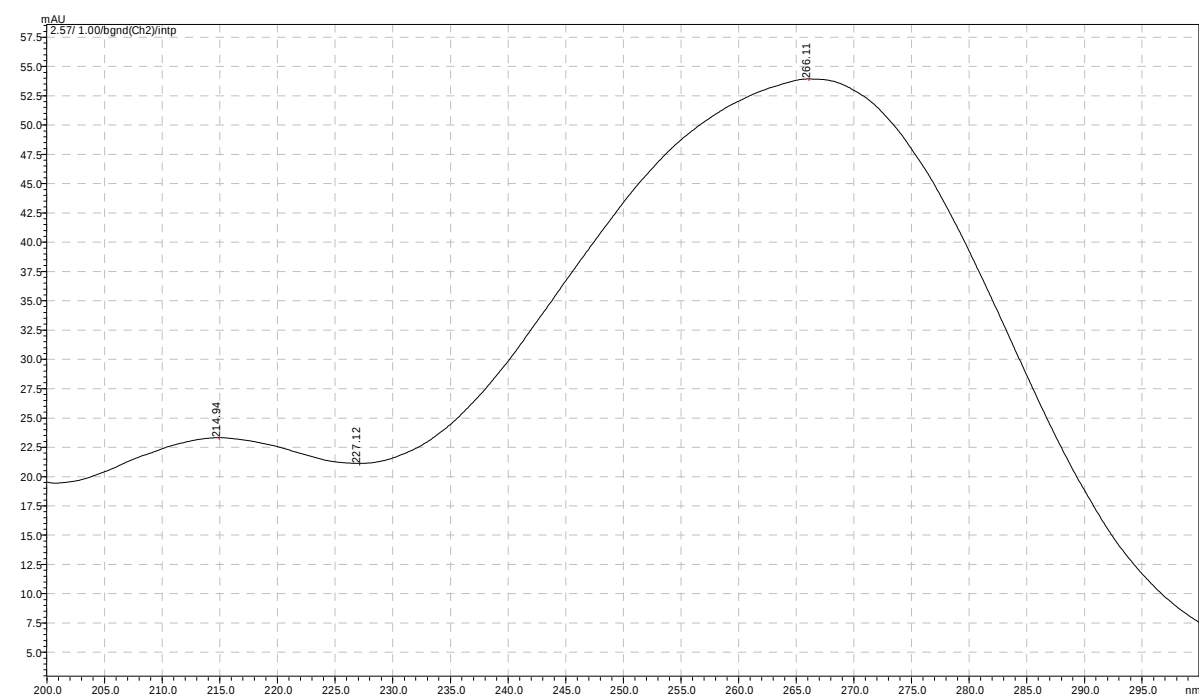


Figura 7.2: Spettro di assorbimento UV per il Clothianidin

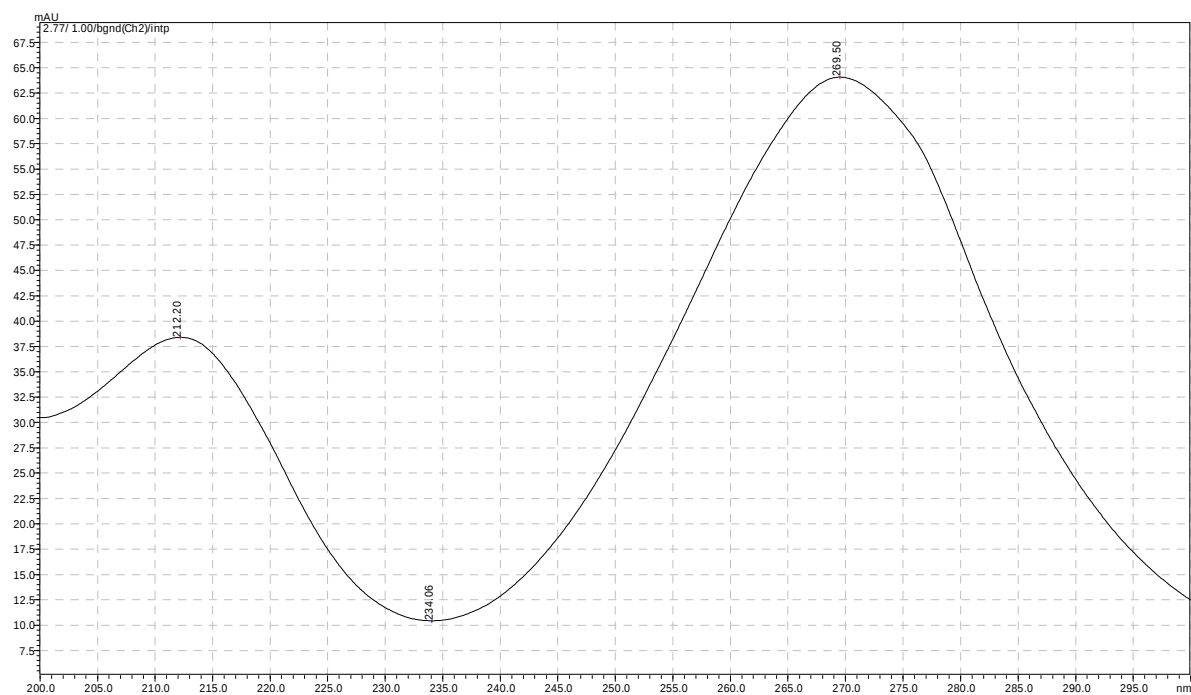


Figura 7.3: Spettro di assorbimento UV per l'Imidacloprid

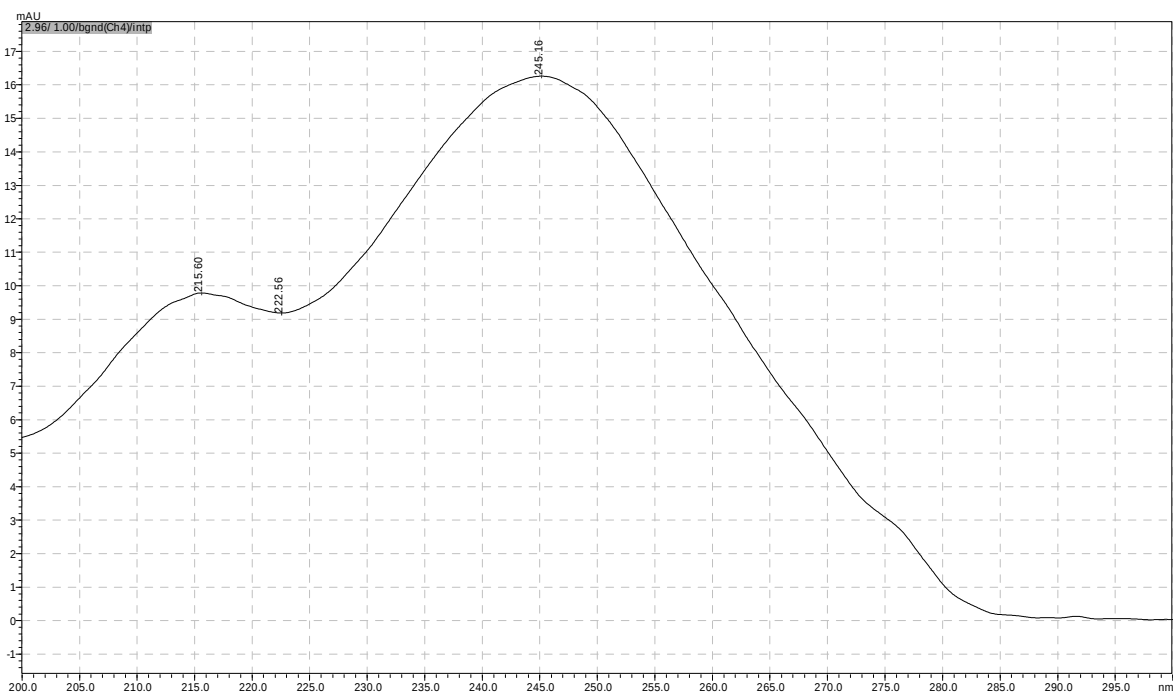


Figura 7.4: Spettro di assorbimento UV per l'Acetamiprid

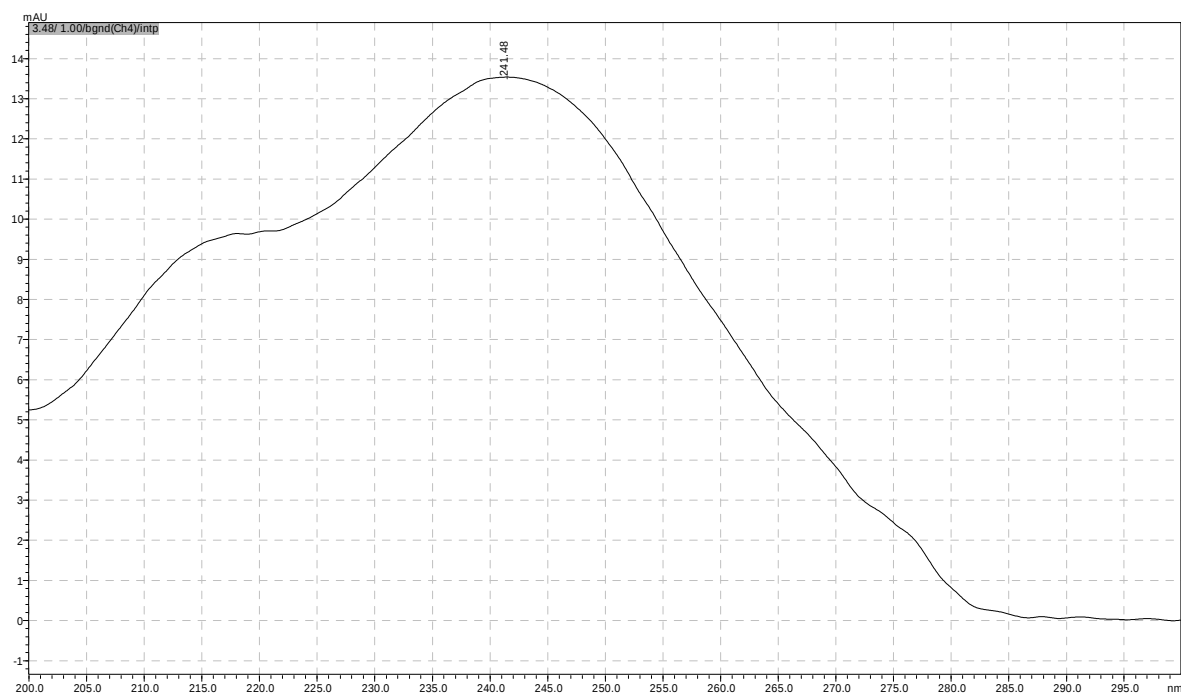


Figura 7.5: Spettro di assorbimento UV per il Thiocloprid

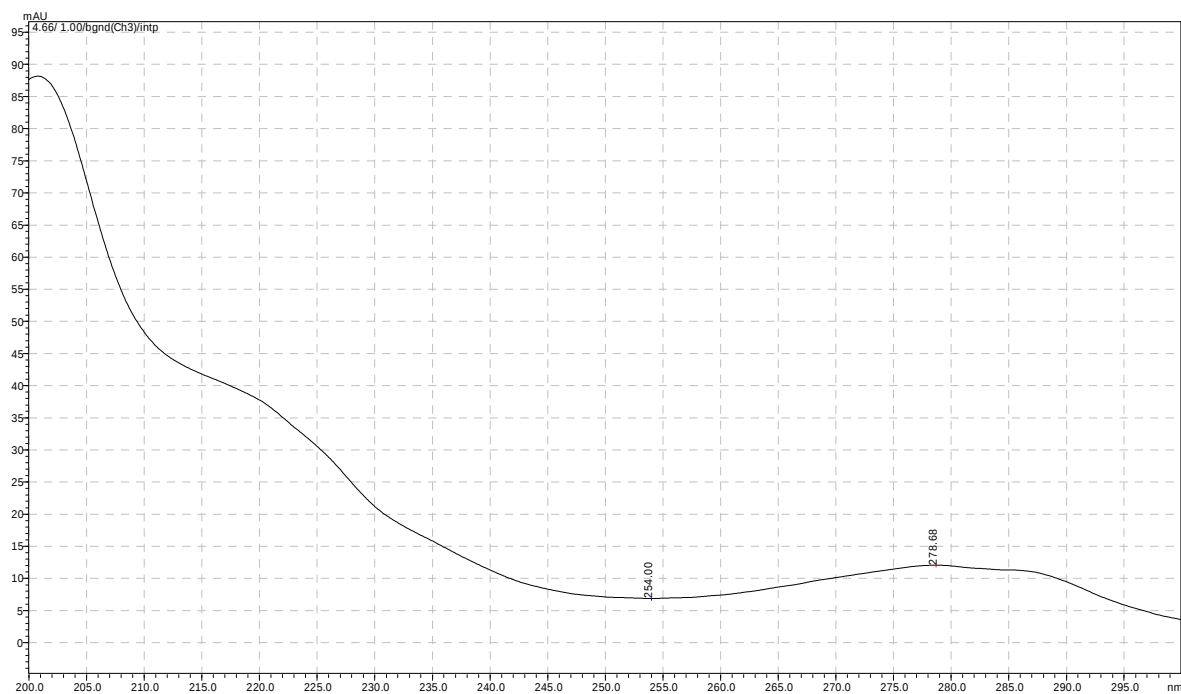


Figura 7.6: Spettro di assorbimento UV per il Fipronil

8 RINGRAZIAMENTI

Ringrazio sentitamente innanzitutto il prof. Daniele Marton che ha saputo in questi mesi darmi tanto aiuto, suggerimenti e spunti su cui riflettere per il prosieguo del mio lavoro di tesi.

Un sincero ringraziamento lo devo anche a Lidia che più di ogni altro mi ha seguito ed aiutato, a Chiara che è stata una presenza fissa sempre disponibile in caso di dubbi o informazioni, al prof. Andrea Tapparo e a tutti quelli che per un motivo o per l'altro hanno avuto a che fare con le mie api o sono passati per i laboratori del 6° piano in questi mesi; tra questi ultimi un ringraziamento preventivo e particolare va a Ketty che continuerà il mio lavoro e avrà quindi in eredità un numero spropositato di fiale da lavare.

Ringrazio poi il prof. Maurizio Vidali per i consigli, la disponibilità e la tranquillità che ha saputo trasmettermi.

Un ulteriore grande ringraziamento va ai collaboratori del Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova, ossia al prof. Vincenzo Girolami, a Matteo, a Linda e ad Andrea per esser sempre stati estremamente disponibili e gentili e per avermi fornito le api e praticamente tutti i campioni per questo internato.

Un ringraziamento non può non andare anche ai miei genitori per la pazienza che hanno avuto ma anche a chi, nel bene o nel male, ha condiviso con me, a tratti più o meno brevi, questo lungo cammino che è ormai pare giunto a termine; tra questi in particolare voglio citare i colleghi del venerdì sera all'Astra e gli amici di "sempre" che non nominerò ma mi auguro già sappiano chi sono.

Ringrazio infine le mie piante per aver sopportato questo periodo in cui non ho potuto degnarle delle attenzioni che meritavano dandomi comunque soddisfazioni ed il fico d'india del pianerottolo del sesto piano dell'interchimico per avermi fatto un po' di compagnia e per aver premiato le mie cure con una decina di nuove foglie.

Sicuramente avrò dimenticato qualcuno e me ne dolgo, ma vedrò di fare ammenda in qualche maniera, prima o poi.