

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

**Sviluppo e validazione di un metodo UHPLC-MS/MS per la
determinazione del glifosato e metaboliti nel miele**

Relatore

Prof. Birolo Marco

Correlatore

Dott. Mutinelli Franco

Dott.ssa Martinello Marianna

Laureanda

Sara Zanella

Matricola n. 2048406

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

INDICE

RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUZIONE.....	8
1.1. CLASSIFICAZIONE E COMPOSIZIONE DEI PRODOTTI FITOSANITARI	8
1.2. GLIFOSATO: CENNI STORICI, STRUTTURA E PROPRIETÀ CHIMICO FISICHE	9
1.2.1. <i>Meccanismo d'azione e degradazione del glifosato</i>	11
1.2.2. <i>Tossicità e legislazione</i>	13
1.3. IL RUOLO DELLE API NELL'ECOSISTEMA AGRARIO	17
1.3.1. <i>Prodotti dell'alveare</i>	18
1.3.2. <i>Miele come bioindicatore ambientale</i>	19
2. OBIETTIVI DELLA TESI	22
3. MATERIALI E METODI.....	23
3.1. REAGENTI E STANDARDS	23
3.1.1. <i>Soluzioni</i>	24
3.1.2. <i>Soluzioni di materiali di riferimento</i>	24
3.1.3. <i>Soluzioni accessorie per analisi UHPLC-MS/MS</i>	24
3.2. MATERIALI E APPARECCHIATURE.....	25
3.3. PROCEDURA DI ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEI CAMPIONI	25
3.4. STANDARDIZZAZIONE DELLA TECNICA DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	26
3.5. STRUMENTAZIONI E CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE	30
3.6. SVILUPPO DEL METODO DI RILEVAZIONE	31
3.7. PROCESSO DI VALIDAZIONE DEL METODO	32
3.8. ANALISI DEI CAMPIONI REALI	33
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	35
4.1. CURVE CROMATOGRAFICHE	35
4.2. VALIDAZIONE DEL METODO	36
4.3. ANALISI DEI CAMPIONI REALI	38
5. CONCLUSIONI	43
6. BIBLIOGRAFIA	45
7. SITOGRAFIA	47

RIASSUNTO

Il glifosato rappresenta l'erbicida più utilizzato al mondo grazie alla sua elevata efficacia e ai bassi costi di produzione. Nonostante il largo impiego, tale erbicida è da anni oggetto di attenzione per i potenziali impatti sulla salute umana e sull'ambiente. Infatti, alla base degli studi dibattuti e controversi sull'uso del glifosato, vi è la mancata chiarezza sui possibili effetti tossici per la salute umana, e non solo, evidenziata da ricerche scientifiche contrastanti, gruppi di interesse pubblico (tra i quali IARC, EFSA, ECHA) e mass media. Le discrepanze dei livelli autorizzati del principio attivo hanno portato le istituzioni a decidere di mettere in atto il principio di precauzione, istituendo dei limiti massimi residuali.

Le api stesse, come impollinatori, possono avere un contatto diretto con il glifosato durante la sua applicazione, o un contatto indiretto attraverso polline e nettare contaminati. Il glifosato di per sé non sembra rappresentare un agente particolarmente tossico per le api, ma risulta un problema quando trasferito nell'alveare a causa dei conseguenti rischi associati all'esposizione a lungo termine. La salute dell'alveare, e la salubrità dei prodotti che ne derivano, possono essere quindi compromessi dall'ambiente circostante.

Lo sviluppo e la validazione di un metodo rapido e preciso per la determinazione del glifosato e del suo metabolita AMPA nel miele è essenziale per adeguarsi ai piani di controllo dei residui dei pesticidi (MACP) della Commissione Europea. All'interno di questi programmi pluriennali rientra anche il glufosinato, erbicida molto simile al glifosato, ma ad oggi vietato in Europa. Questo metodo permette di avere un programma di monitoraggio per indagare la presenza di tali principi attivi in determinate aree, di verificare il rispetto dei relativi LMR e di valutare l'esposizione delle api ai loro residui. Nella presente tesi è stato sviluppato e validato un metodo in UHPLC-MSMS applicato a campioni di miele provenienti dal mercato e da apicoltori locali, ai fini di effettuare uno studio preliminare sulla presenza di tale inquinante nel miele consumato a livello regionale.

Alla luce dei risultati ottenuti, il metodo in UHPLC-MSMS risulta valido e affidabile per il monitoraggio dei livelli di glifosato, AMPA e glufosinato nel miele. Inoltre, sulla base della letteratura scientifica disponibile fino ad ora, si può concludere che il glifosato rappresenti uno strumento importante per aiutare gli agricoltori nella gestione delle malerbe, se inserito all'interno di un quadro di corrette pratiche agricole, ma deve ancora essere provata la sicurezza per l'ambiente in termini di salute e biodiversità.

ABSTRACT

Glyphosate is the most widely used herbicide in the world due to its high effectiveness and low production costs. Despite its widespread use, this herbicide has been the focus of attention for years on potential impacts on human health and the environment. In fact, the basis of the debated and controversial studies on the use of glyphosate is the lack of clarity on the possible toxic effects for human health, and not only, highlighted by conflicting scientific research, public interest groups (including IARC, EFSA, ECHA) and mass media. The discrepancies in the authorised levels of the active substance led the institutions to decide to implement the precautionary principle by establishing maximum residual limits.

Bees themselves, as pollinators, may have direct contact with glyphosate during its application, or indirect contact through contaminated pollen and nectar. Glyphosate itself does not appear to be a particularly toxic agent for bees but is a problem when transferred to the hive due to the consequent risks associated with long-term exposure. The health of the hive, and the health of the resulting products, can therefore be compromised by the surrounding environment.

The development and validation of a fast and accurate method for the determination of glyphosate and its metabolite AMPA in honey is essential to comply with the European Commission's coordinated multiannual control programme (MACP). Glufosinate, an herbicide very similar to glyphosate but banned in Europe to date, is also part of these multiannual programmes. This method allows a monitoring programme to investigate the presence of these active substances in certain areas, to verify compliance with the relevant MRLs and to assess the exposure of bees to their residues. In this thesis a UHPLC-MSMS method has been developed and validated applied to samples of honey from the market and from local beekeepers, to carry out a preliminary study on the presence of this pollutant in honey consumed at regional level.

In the light of the results obtained, the UHPLC-MSMS method is valid and reliable for monitoring glyphosate, AMPA and glufosinate levels in honey. In addition, based on the scientific literature available so far, it can be concluded that glyphosate is an important tool to help farmers manage weeds, if placed within a framework of good agricultural practice, but environmental safety in terms of health and biodiversity has yet to be proven.

1. INTRODUZIONE

1.1. Classificazione e composizione dei prodotti fitosanitari

Con il termine “pesticidi” si identificano tutti i microrganismi o sostanze chimiche utilizzati in agricoltura per salvaguardare la salute delle colture e garantirne la sopravvivenza, senza compromettere la produttività del terreno e la qualità del raccolto. L’etimologia di questo termine deriva dal latino “*pestis*” (che indica un flagello o una malattia contagiosa) e da “*cœdere*” (che significa “uccidere” o “abbattere”), quindi i pesticidi si definiscono “sterminatori di pesti”.

Sotto la designazione di “pesticida” rientrano principalmente i prodotti fitosanitari (Plant Protection Products - PPP) e i biocidi, utilizzati per diversi scopi. Il loro utilizzo permette di contenere e reprimere l'azione dei microrganismi deterioranti materiali come carta, legno, tessuti, plastica e fibre ([Commissione europea, 2002](#)).

Il [Regolamento \(CE\) n. 1107/2009](#), invece, riporta la definizione di “prodotti fitosanitari”, intesi come sostanze attive ed i preparati contenenti una o più sostanze attive, antidoti agronomici, sinergizzanti, coformulanti, coadiuvanti, adibiti ad uno dei seguenti utilizzi:

- difendere le colture vegetali dai microrganismi nocivi e dalle piante infestanti indesiderate, compresi i possibili corrispettivi effetti avversi;
- regolare le produzioni nella modalità desiderata e controllare la loro adeguata conservazione.

Inoltre, il suddetto regolamento disciplina l'immissione sul mercato dei PPP al fine di salvaguardare il benessere dell’uomo e degli animali, nonché la tutela dell’ambiente, della biodiversità e dell’ecosistema. L’applicazione di esso si estende anche ai quattro elementi che rappresentano la formulazione ricorrente dei PPP, in particolare:

- 1) il **composto attivo** (chimico o biologico), è la sostanza (intesa come singolo elemento chimico o composti di esso, ma anche microrganismi e virus) che agisce contro l’organismo bersaglio nella coltura e rappresenta la frazione prevalente del prodotto finito. Difatti, la sua concentrazione e classe di pericolosità sono essenziali per determinarne la tossicità e le conseguenti modalità di utilizzo del formulato commerciale;
- 2) i **coformulanti**, sostanze o preparati che riducono la concentrazione della sostanza attiva, agendo da diluenti inerti;
- 3) uno o più **coadiuvanti**, sostanze o preparati costituiti da uno o più coformulanti che potenziano l'effetto della sostanza attiva e ne migliorano la distribuzione;
- 4) uno o più **sinergizzanti**, sostanze o preparati che aumentano la potenzialità della sostanza attiva.

Al fine di ridurre od eliminare i possibili effetti fitotossici del prodotto finale, possono essere ulteriormente addizionati altri composti, definiti **antidoti agronomici**.

I PPP sono utilizzati principalmente in agricoltura per la cura delle colture vegetali, per proteggere e

ridurre le infestazioni di insetti, funghi (comprese le muffe) e piante infestanti. Vengono suddivisi in sei differenti categorie in base all'organismo bersaglio:

- 1) **antiparassitari**, contro i parassiti vegetali e gli animali (es. funghi, insetti, ratti, batteri);
- 2) **diserbanti o erbicidi**, contro le piante infestanti;
- 3) **fitoregolatori**, regolano i processi vitali delle piante agendo a livello ormonale (es. diradanti, anticascola);
- 4) **fisiofarmaci**, contro le fisiopatie delle piante (alterazioni non infettive e non parassitarie);
- 5) **repellenti**, respingono una determinata categoria di animali dalle piante grazie al loro odore/colore/sapore;
- 6) **modificatori del comportamento**, agiscono sul comportamento degli insetti (es. attrattivi sessuali, feromoni per disorientamento).

I prodotti fitosanitari si differenziano anche per spettro d'azione e selettività. In particolare, lo "spettro d'azione" si riferisce al campo di avversità contro cui il pesticida opera, che può essere ampio o più ristretto. La "selettività", invece, rappresenta la capacità del formulato di operare specificamente sul target d'azione ([Veneto Agricoltura, 2015](#)).

1.2. Glifosato: cenni storici, struttura e proprietà chimico fisiche

Il glifosato ($C_3H_8NO_5$) vanta di essere uno degli erbicidi più diffusi al mondo a livello di agricoltura intensiva, e la sua scoperta risale al secondo dopoguerra. Infatti, nel 1950 il chimico Dr. Henri Martin identificò questo composto presso una piccola azienda farmaceutica in Svizzera, senza capire la sua possibile applicazione in ambito medicale. La molecola del principio attivo fu così venduta a numerose compagnie per essere sottoposta ad ulteriori ricerche e studi e, solamente nel 1970, il chimico John E. Franz della Monsanto Company sperimentò il glifosato all'interno di una serra, scoprendone le proprietà erbicide. Dal 1974 iniziò ad essere commercializzato e, per i primi 20 anni, fu utilizzato per rimuovere le erbe infestanti prima della semina. Data la sua ottima traslocazione nel fogliame delle piante, non era infrequente la compromissione anche delle colture stesse ([Duke et Powles, 2008](#)).

Nel tempo trovò applicazione in numerose colture orticole e cerealicole (es. fragole, colza, girasole, soia, riso) e in colture legnose (es. nocciuleti, mandorletti, oliveti), ma anche negli argini dei fossati, aree urbane, parchi e strade. Il glifosato non fu utilizzato solo per la sua azione contro le erbe infestanti, ma anche con funzione preraccolta per coadiuvare la maturazione delle spighe di grano o per l'essiccazione dell'orzo nell'industria birraria ([Bianco et Jacomini, 2016](#)).

Ciò che ha reso veramente importante il glifosato, e che ne ha permesso l'utilizzo sempre più crescente negli anni, è indubbiamente il vantaggio di ridurre la lavorazione meccanica in profondità dei terreni adibiti alle coltivazioni. Le tecniche di aratura intensiva, infatti, possono avere impatti negativi nella struttura del suolo, provocando l'erosione dello stesso, compromettendone la compattazione e causando la perdita di

materie organiche, oltre che il deflusso di pesticidi e nutrienti nelle falde acquifere. Inoltre, il minor utilizzo di macchine agricole ha permesso anche una riduzione nel consumo di combustibili fossili e di emissioni di CO₂ ([Glyphosate Renewal Group, 2023](#)). Entrambe rappresentano problematiche attuali di sostenibilità dell'ambiente e delle sue risorse non rinnovabili che, per molto tempo, sono state aggredite da pratiche di lavorazione insostenibili. Il ricorso massiccio ad erbicidi a base di glifosate, però, ha provocato nel tempo la naturale resistenza di alcune piante a tale principio attivo, causando lo sviluppo di sementi geneticamente modificate (Ogm) e resistenti alla sua azione.

Il glifosato (il cui nome IUPAC è N-(fosfonometil) glicina) è un acido fosfonico risultante dall'accoppiamento ossidativo del gruppo metilico dell'acido metilfosfonico con il gruppo amminico della glicina, il più piccolo tra i 20 aminoacidi (quello col minor peso molecolare) solitamente presenti nella struttura delle proteine umane e di numerose proteine alimentari (es. carne, alghe, pesce, soia, formaggi). Il glifosato presenta tre gruppi funzionali caratterizzanti la molecola: gruppo carbossilico, amminico e fosfonico (Figura 1).

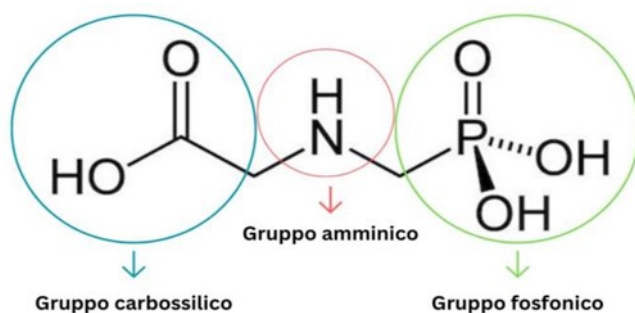


Figura 1. La struttura chimica dipolare del glifosato

Le costanti di dissociazione acida del glifosato sono ben quattro (Tabella 1):

Tabella 1. Solubilità in acqua del glifosato

Costante di dissociazione acida	Valori della costante di dissociazione	Protone dissociato
pKa ₁	0.8	Primo fosfonico
pKa ₂	2.3	Carbossilato
pKa ₃	6.0	Secondo fosfonico
pKa ₄	11.0	Ammina

Di conseguenza, questa molecola ha la tendenza a dissociare un protone dal gruppo più acido e ad associare quel protone al gruppo più basico, formando una molecola dipolare definita “zwitterione”. Per questo motivo la molecola risulta polare e anfotera, e si trova solitamente sotto forma di solido cristallino bianco, inodore, non volatile e fotoresistente ([PubChem, 2023](#)).

La solubilità in mezzi acquosi del glifosato acido libero è discreta (circa 1,16 g/L a 25°C) e ciò limita la sua irrorazione e l'assorbimento rapido da parte delle piante, processo fondamentale affinché esso non

venga dilavato da possibili piogge. Per tale motivo, nelle formulazioni commerciali lo si trova solitamente nella sua forma salina in acqua (forma anionica del glifosato insieme a composti come l'ammonio, il sodio, il potassio o l'isopropilammina), vista la maggiore solubilità dei suoi sali monobasici in ambiente acquoso.

Diversamente, l'acido libero e i suoi sali risultano insolubili nella maggior parte dei solventi organici. Ciò è dovuto ai forti legami a idrogeno intermolecolari, i quali sono responsabili anche della ridotta volatilità del glifosato. Questa caratteristica chimico-fisica, assieme all'elevata densità, limitano l'evaporazione del glifosato dopo l'applicazione (Dill et al., 2010).

Affianco a questo fitofarmaco, è presente un secondo erbicida utilizzato per gli stessi impieghi dagli anni '90: il glufosinato. In egual modo, rientra tra i pesticidi non selettivi ed è simile al glifosato dal punto di vista chimico per la medesima appartenenza al gruppo degli organofosfati e al gruppo dei pesticidi anionici polari (Rampazzo et al., 2023).

1.2.1. Meccanismo d'azione e degradazione del glifosato

Il glifosato è un **erbicida fogliare sistemico non selettivo** (ad ampio spettro d'azione) poiché viene assorbito dalle parti verdi delle piante, e veicolato dal flusso linfatico all'interno del vegetale in maniera omogenea (Figura 2), interferendo con i relativi processi vitali. La sua non selettività implica l'azione su ogni organismo vegetale in attiva sintesi clorofilliana, attraverso l'inibizione della via metabolica dell'acido shikimico, grazie alla quale le piante sintetizzano tre amminoacidi essenziali (fenilalanina, triptofano e tirosina). Dal momento che gli animali non sono in grado di produrre questi aminoacidi, dovrebbero essere esenti all'azione del glifosato.

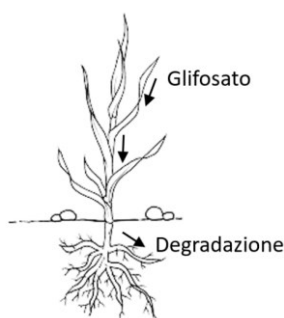


Figura 2. Azione di penetrazione del glifosato

Il glifosato, grazie alla sua struttura analoga con il fosfoenolpiruvato (PEP, significativo intermedio metabolico), compete per i siti attivi del 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasi (EPSPS), biocatalizzatore della reazione di condensazione tra il fosfoenolpiruvato (PEP) e lo shikimato-3-fosfato (S3P) (presente in vegetali, batteri e funghi). In tal modo, il ciclo di sintesi viene arrestato con aumento di shikimato all'interno delle cellule vegetali e con mancata produzione degli amminoacidi essenziali per la sintesi proteica.

Il glifosato, poi, viene utilizzato per convertire lo shikimato-3-fosfato (S3P) in shikimato, utilizzando un

grande quantitativo di carbonio, così sottratto alle altre vie metaboliche (Dill et al., 2010) (Figura 3).

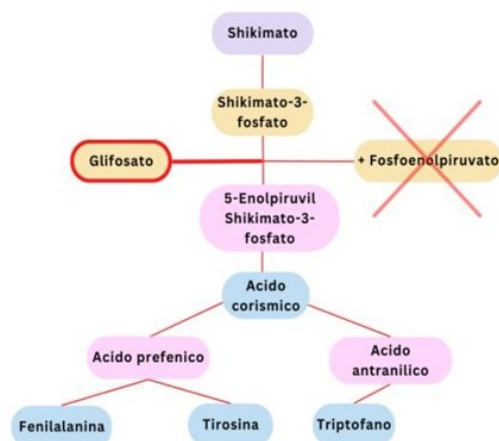


Figura 3. Processo del metabolismo dell'acido shikimico e sito di inibizione del glifosato

Pertanto, sia la mancanza di aminoacidi essenziali sia la sottrazione del carbonio, causano la morte delle piante trattate. Alcune condizioni climatiche, come temperature troppo alte o troppo basse, possono ostacolare, però, l'assorbimento del glifosato dalle superfici trattate. In aggiunta, l'assimilazione del glifosato risulta limitata da alcune caratteristiche fisiologiche delle piante stesse, qualora presentino, ad esempio, foglie eccessivamente spesse o cerose o con superficie fogliare modesta. Le tecniche di applicazione del glifosato, quindi, prevedono l'aggiunta di ulteriori sostanze chimiche come i tensioattivi, che rendono le superfici delle piante più penetrabili e ne aumentano la bagnabilità (<https://www.cropscience.bayer.it/landing-page/roundup>).

Il diserbo chimico con glifosato viene utilizzato principalmente come trattamento di post-emergenza sulle aree agricole, non possedendo alcuna attività nel suolo. In particolare, la sua applicazione avviene direttamente sulle erbe infestanti già presenti nei terreni coltivati, causando il progressivo appassimento per inibizione della sintesi degli aminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina e triptofano, le cui catene laterali contengono un gruppo aromatico), fino alla morte. Se inizialmente, il suo utilizzo era ristretto all'epoca antecedente alle colture stesse, o successivamente soltanto nelle colture geneticamente modificate, nel corso degli anni il suo impiego si è ampliato anche all'essiccazione in fase di raccolta o in aree non agricole (Van Bruggen et al., 2018).

Come tutti gli erbicidi, lo scopo principale del glifosato è quindi quello di rimuovere le erbe infestanti che, anche se non patogene per le piante coltivate, interferiscono con la crescita di queste ultime privandole di acqua, nutrienti e luce, permettendo la diffusione di parassiti e afidi che possono propagarsi nel campo.

Una volta assorbito nel suolo, però, il glifosato è soggetto ad un processo di degradazione, in cui la fotodegradazione e la decomposizione chimica rivestono solamente un ruolo marginale. L'attività microbica è di fatto la principale causa di degradazione del glifosato, poiché le popolazioni batteriche presenti ne

ricavano azoto e fosforo da utilizzare come fonte energetica per il proseguimento del loro metabolismo.

Le popolazioni microbiche (principalmente del genere *Pseudomonas*) agiscono preferibilmente in condizioni aerobiche, ma talvolta anche in assenza di ossigeno. Le tempistiche e l'efficienza della pathway di degradazione possono variare a seconda delle caratteristiche del suolo (pH, temperatura, tessitura, ecc.) e della flora batterica presente.

La degradazione del glifosato avviene secondo due possibili distinte pathway: una rivolta alla sintesi dell'intermedio AMPA (acido aminofosfonico) e acido gliossilico (trasformati ulteriormente fino ad ottenere in via definitiva fosfato, ammonio, anidride carbonica ed acqua), l'altra che porta agli intermedi sarcosina e glicina (Figura 4).

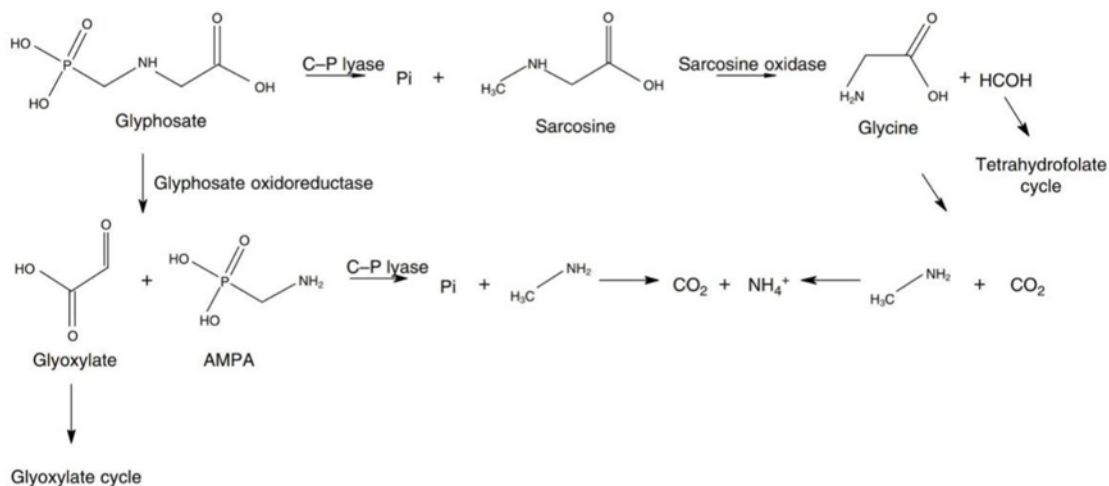


Figura 4. Processo di degradazione del glifosato (Borggaard e Gimsing, 2008)

Curioso riportare il fatto che anche alcune piante hanno acquisito esse stesse la capacità di degradare il glifosato. In particolare, si tratta delle colture geneticamente modificate precedentemente citate, immuni agli erbicidi a base di glifosate grazie all'introduzione di una forma resistente di enzima EPSPS nel loro sistema stesso (inserimento di un transgene), che favorisce l'eliminazione del principio attivo (Borggaard e Gimsing, 2008).

1.2.2. Tossicità e legislazione

A seguito dell'incremento esponenziale nella produzione e nell'utilizzo del glifosato, si è reso necessario svolgere ricerche approfondite sulla sua effettiva pericolosità e nocività. Differenti organismi hanno espresso pareri discordanti circa i possibili effetti tossici per l'ambiente, gli animali e l'uomo.

Innanzitutto, secondo il [Reg \(CE\) 1272/2008](#) (regolamento CLP, *Classification, Labelling and Packaging*) relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze chimiche (e delle loro miscele), il glifosato presenta i seguenti codici di pericolo: H318 (rischio di gravi lesioni oculari) e H411 (tossico per gli organismi acquatici) (Figura 5).



Figura 5. Pittogrammi della classificazione GHS del glifosate

Per quanto concerne, invece, il permesso del suo utilizzo all'interno dell'Unione europea, il [Reg. \(EU\) 2017/2324](#) ha prorogato il periodo autorizzativo fino al 15 dicembre 2023, rinnovo consentito al fine di una valutazione scientifica più completa, coerente ed esaustiva fra tutti gli studi controversi e dibattuti fino ad ora. Rimangono, però, invariate le misure di cautela in Italia presentate nel [Decreto ministeriale 9 agosto 2016](#) del Ministero della salute attinenti al:

- divieto di utilizzo del fitofarmaco nelle aree densamente popolate (parchi, giardini, campi sportivi, zone ricreative) o con presenza di gruppi di persone vulnerabili (es. strutture sanitarie);
- divieto dell'utilizzo non agricolo (es. impiego nelle zone verde domestiche o ambienti urbani);
- revoca dell'impiego in preraccolta al solo scopo di ottimizzare il raccolto o la trebbiatura.

Inoltre, l'utilizzo del glifosato come principio attivo impiegato nell'agricoltura no-tillage (agricoltura conservativa) per ridurre le pratiche di lavorazione dei terreni e ottimizzare la produzione agricola, deve seguire le migliori pratiche di lavorazione, al fine di ridurre i rischi e gli impatti sull'ambiente e sulla salute umana. A tal fine, è stata emanata la [Direttiva 2009/128/CE](#) relativa all'uso sostenibile di pesticidi ed erbicidi. Diversamente, il glufosinato è stato autorizzato per l'uso in Europa fino al 2018, anno dal quale ne è stato bandito l'impiego con il [Regolamento \(CE\) No 1107/2009](#). Negli Stati Uniti, Sud America e altre parti del mondo continua, invece, ad essere ampiamente utilizzato sia nelle colture che nelle aree non agricole.

Infine, rimangono invariati i limiti massimi di residui (LMR) di glifosato all'interno degli alimenti o sulle loro superfici determinati dall'EFSA con il [Regolamento \(CE\) n. 396/2005](#), al fine di tutelare tutte le categorie di consumatori dai potenziali effetti negativi.

I LMR (mg/kg) stabiliti sono differenti nelle diverse categorie di prodotto alimentare e, spesso non risultano equivalenti a quelli regolamentati da altri Stati (Tabella 2). Questo rappresenta un segno di evidente confusione e conflittualità sul tema "glifosato", oltre che di dissimilarità nei metodi di valutazione tossicologica. Nella tabella seguente sono riportate alcune commodity con i relativi LMR stabiliti da organi normativi differenti in base allo Stato.

Nel caso del miele, i livelli massimi autorizzati sono discordanti tra i diversi Stati come si evince dalla Tabella 2. Inoltre non tutti comprendono i metaboliti, AMPA e N-acetil glifosate, all'interno del limite. Per quanto concerne il glufosinato (somma degli isomeri glufosinato, dei suoi sali e dei suoi metaboliti, MPP e

N-acetil-glufosinato), invece, il Reg. (EU) 2016/1002 fissa LMR a 50 µg/kg.

Tabella 2. Limiti Massimi Residui (mg/kg) del glifosato in diverse categorie di prodotti alimentari in differenti Stati (<https://www.mpi.govt.nz>)

Categoria	UE	US	Australia	Cina	Giappone
Banana	0,1	0,2	0,2	0.1	0.2
Tè	2	1	20	1	1
Miele	0,05 (solo glifosate)	-- --	0,2 (somma di glifosate, N- acetil glifosate e AMPA)	-- --	0.05 (somma di glifosate e N-acetil glifosate)
Kiwi	0,1	--	0,05	--	0.1
Riso	0,1	0,1	--	0.1	0.1
Carote	0,1	5	--	--	0.2
Arachidi	0,1	0,1	0,1	--	0.1
Zucchero di canna	0,1	2	0,3	2	2
Soia	20	--	20	--	20
Uva	20	--	0,05	--	0.5
Crostacei	--	3	7	--	--

Oltre ai LMR, con il [Reg. \(EU\) 2017/2324](#) l'UE ha stabilito ulteriori limiti tossicologici per il glifosato, riportati in seguito, fondati in studi a lungo termine su animali e su osservazioni sull'uomo (Tabella 3).

Tabella 3. Valori tossicologici¹ del glifosato

ADI <i>Acceptable Daily Intake</i>	ARfD <i>Acute reference Dose</i>	AOEL <i>Acceptable Operator Exposure Level</i>
0,5 mg/kg di peso corporeo/ die	0,5 mg/kg di peso corporeo/ die	0,1 mg/kg di peso corporeo/ die

Tutte queste misure precauzionali sono state istituite principalmente a seguito della decisione dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) di Lione nel 2015, che classifica il glifosato come sostanza “probabilmente cancerogena” (categoria 2A). In particolare, gli studi del gruppo di esperti hanno evidenziato la possibilità di sviluppo del linfoma non-Hodgkin principalmente negli operatori agricoli, esposti spesso a tale sostanza nell'ambito dell'utilizzo professionale ([AIRC, 2021](#)).

Anche in questo frangente è presente discordanza, ma questa volta all'interno della stessa Comunità

¹ **ADI (acceptable daily intake):** dose giornaliera accettabile (DGA), ovvero una stima della quantità di una sostanza consumata quotidianamente nell'arco della vita per mezzo di alimenti o acqua potabile senza alcun rischio per la salute;

ARfD (acute reference dose): dose acuta di riferimento (DAR), ovvero una stima della quantità di una sostanza chimica, su peso corporeo, che può essere ingerita in un breve arco di tempo con gli alimenti, senza alcun rischio per la salute;

AOEL (acceptable operator exposure level): dose accettabile di principio attivo al quale l'operatore può essere esposto giornalmente senza effetti avversi per la salute

Europea. Difatti, la decisione dello IARC non è stata condivisa da ECHA (Agenzia europea per le sostanze chimiche) ed EFSA (Autorità europea per la sicurezza alimentare): la prima responsabile della valutazione dei pericoli di una determinata sostanza, la seconda incaricata nella valutazione dei rischi causati dall'esposizione ad essa. Ambedue hanno raggiunto la medesima conclusione tramite studi approfonditi dai rispettivi esperti, ovvero l'improbabilità del pericolo di cancerogenicità rappresentato dal glifosato (EFSA, 2015), il quale non soddisfa i criteri che permettono di classificarlo come tale (ECHA, 2017).

Affianco a queste valutazioni scientifiche relative agli effetti tossici del glifosato sull'uomo, si riscontrano anche le conseguenze che l'utilizzo incontrollato di tale principio attivo potrebbe causare nella flora e sulla fauna circostante. La contaminazione dei terreni, ma anche dell'ambiente acquatico e della sua rispettiva popolazione (crostacei, pesci, rettili, anfibi), sono solo alcuni degli effetti che il glifosato sembra causare. Difatti, nonostante esso coinvolga complessi enzimatici caratteristici degli organismi vegetali, alcuni studi hanno smentito la sua innocuità per gli animali. Peillex e Pelletier (2020) hanno raccolto le ricerche più recenti a dimostrazione di una generale alterazione del sistema immunitario dei pesci a seguito di un'esposizione al glifosato, con aumento della produzione di citochine pro-infiammatorie, modificazione delle funzioni fagocitarie e di risposta dei linfociti. In precedenti studi si riscontrano, inoltre, mutazioni genetiche, danni cellulari, complicazioni inerenti alla sfera riproduttiva e altre numerose reazioni indesiderate (Gill et al, 2018). Tuttavia, qualora il principio attivo non venisse dilavato dalle correnti d'acqua, sembrerebbe rimanere confinato allo strato superficiale del terreno agricolo trattato a causa della sua scarsa capacità di permeazione in profondità. Questo provocherebbe complicanze per la crescita delle piante a livello di rizosfera con il verificarsi di una minore fissazione dell'azoto e un minor assorbimento delle sostanze nutritive essenziali da parte dei vegetali.

L'impatto negativo sulla resa delle colture deriverebbe anche dalla soppressione (per privazione dei nutrienti) di alcuni organismi del suolo (es. *Pseudomonas fluorescent*), non più disponibili per la protezione delle piante dagli agenti patogeni.

Le performances delle colture sembrerebbero così influenzate negativamente, così come le piante non target, raggiunte tramite i venti o le acque, potrebbero essere soggette da una perdita di diversità botanica e numerosità.

L'applicazione del glifosato nelle aree agricole potrebbe influenzare anche la vita degli insetti circoscritti alla zona del trattamento fitosanitario, in particolar modo sulle api della specie *Apis mellifera*, che utilizzano il nettare e altri prodotti vegetali in cui potrebbe essersi accumulato il principio attivo. Non si dubita che possa essere anch'esso uno dei fattori che contribuisce al cosiddetto "Colony collapse disorder, CCD" (Sindrome dello spopolamento degli alveari) (Bianco e Jacomini, 2016). Anche in questo frangente, però, l'impatto del glifosato non è ancora del tutto chiaro poiché gli studi sono contrastanti per quanto riguarda il suo effetto sulle api da miele. Se per alcuni non sembra dimostrare nessuna variazione sulle colonie, né sulle api adulte né sulle larve (Thompson et al., 2014), per altri sembra intaccare sia la fase

di sviluppo e riproduzione che alcune funzioni, come la percezione gustativa, l'apprendimento olfattivo e la navigazione (Gonalons e Farina, 2018).

Nonostante la presunta ridotta sensibilità al nettare e alla compromissione dell'apprendimento associativo nelle api, il comportamento di foraggiamento non sembrerebbe essere influenzato dall'alimentazione con glifosato. In tal caso, il nettare contaminato viene continuamente convogliato nell'alveare e alle altre api (Herbert et al., 2014). Questa via suggerisce, quindi, un'altra modalità di penetrazione del glifosato nella catena alimentare, ovvero tramite contaminazione del prodotto di origine animale miele (Ledoux et al., 2020). Al di là di questi studi, il database IUPAC sulle proprietà dei pesticidi (PPDP) riporta i seguenti valori di ecotossicità del glifosato per le api da miele: dose acuta cutanea $DL_{50}^2 > 100 \mu\text{g}/\text{ape}$, e dose acuta orale $DL_{50} 104 \mu\text{g}/\text{ape}$. Anche per il glufosinate sono stati determinati i seguenti valori: dose acuta cutanea $DL_{50} > 345 \mu\text{g}/\text{ape}$, e dose acuta orale $DL_{50} 600 \mu\text{g}/\text{ape}$.

1.3. Il ruolo delle api nell'ecosistema agrario

Per molti anni abbiamo pensato alle api come degli insetti che hanno sempre popolato la nostra Terra da quando ne abbiamo memoria, e di cui non abbiamo mai avuto particolari attenzioni e premure, se non fino a quando abbiamo notato la differenza della nostra vita senza di esse. La visione semplicistica di un addome giallo e nero, il cui pungiglione si è sempre scongiurato per il suo veleno, in realtà nasconde un esemplare straordinario e fedele alla propria famiglia e che, ad oggi, rappresenta un bene da tutelare.

Al mondo esistono ben 20.000 specie di api, di cui *A. mellifera* raffigura l'abitante più diffuso in Europa. La loro eusocialità è connessa all'importante ruolo di impollinatori che svolgono negli habitat naturali, contribuendo enormemente alle rese agricole a livello mondiale. Difatti, il contributo all'agricoltura di questi piccoli insetti è davvero essenziale sia per la riproduzione delle piante che per la produzione di alimenti e mangimi, ma anche per la sopravvivenza nel tempo di una biodiversità ambientale (FAO, 2018).

Le api sono responsabili dell'impollinazione di circa l'80% delle specie vegetali da fiore, un lavoro a costo zero per l'uomo, ma necessario per evitare l'estinzione di alcune piante ed incomparabile con l'impollinazione artificiale, sia a livello economico che di efficienza. La stragrande maggioranza delle specie di piante da fiore, infatti, produce semi solo se gli impollinatori spostano il polline dalle antere agli stigmi dei loro fiori. Per il successo dell'impollinazione è necessario, però, ci sia sincronia tra la comparsa degli insetti e l'inizio della fioritura.

Inoltre, questo servizio ecosistemico vitale è accompagnato dalla produzione di preziosi prodotti dell'alveare come miele, pappa reale, cera, polline e propoli. Tutti questi rappresentano un altro regalo che l'*A. mellifera* dona all'uomo attraverso un concatenato lavoro che vede partecipi intere famiglie di api, aumentando le potenzialità di e il reddito che possono generare (ISPRA, 2019).

² DL_{50} significa "dose letale 50", ovvero la quantità di una sostanza in grado di uccidere il 50% di una popolazione di animali da sperimentazione in un'unica somministrazione.

Il cambiamento climatico, l'inquinamento ambientale, l'intensificazione dell'agricoltura associata all'utilizzo di pesticidi hanno provocato però, un degrado degli habitat naturali; quindi, il decremento degli alveari e dei prodotti e benefici ad essi connessi. Artefice di questi cambiamenti è l'uomo stesso attraverso scelte mal ponderate e prolungate nel tempo, che possono essere però facilmente convertibili in pratiche sostenibili ai fini del recupero delle popolazioni di insetti.

1.3.1. Prodotti dell'alveare

Il miele rappresenta uno dei prodotti del lavoro delle api ed è il più antico dolcificante naturale utilizzato dall'uomo nella sua storia, a cui oggi sono attribuite anche proprietà antiossidanti, antibatteriche e molti altri claims salutistici.

La definizione legale di miele è inserita nel [D.Lgs. 179/2004](#) e riporta la seguente dicitura: "Per «miele» si intende la sostanza dolce naturale che le api (*Apis mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano, combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare".

Il miele è essenzialmente costituito da fruttosio e glucosio, in minore quantità da altri zuccheri, enzimi ed acidi organici. La differente colorazione del miele, da una tinta quasi assente ad un marrone scuro, può essere determinata in primis dalla specie botanica di provenienza, da cui anche sapore e aroma hanno poi origine. Il miele destinato al consumo umano può essere denso, liquido o cristallizzato, e deve rispettare specifici criteri e caratteristiche di qualità elencate in Tabella 4.

Il lavoro delle api coinvolge anche le loro ghiandole ceripare nella secrezione di cera d'api rivestita di propoli da utilizzare essenzialmente come materiale da costruzione, ma anche come compartimento per la covata o per preservare gli alimenti e mediare le comunicazioni chimiche all'interno della colonia. Questa miscela è prevalentemente caratterizzata da esteri di acidi grassi (circa 67%), acidi grassi liberi (circa 13%) e idrocarburi (circa 14%) ed utilizzata dall'uomo nell'ambito farmaceutico, cosmetico ed alimentare (ad esempio come additivo E901) ([progetto CERAPI](#)).

Tra i prodotti apistici rientrano anche il polline e la pappa reale: il primo raccolto dagli stami delle piante e impastato con melata e nettare per nutrire la colonia, il secondo secreto dalle ghiandole mascellari e ipofaringee e utilizzato per nutrire le larve delle api regine.

Il polline è fonte di numerose proteine ed è utilizzato dall'uomo per le sue proprietà terapeutiche, oltre che per il suo altissimo valore nutrizionale.

Tutti i prodotti apistici fino ad ora citati rappresentano degli alimenti per l'uomo e, come tali, devono rispettare tutte le disposizioni di legge applicabili alle derrate alimentari nonché le prescrizioni specifiche per il singolo prodotto di origine animale, ove presente.

La propoli e il veleno d'api, invece, sono due prodotti che sono impiegati principalmente in medicina e

cosmetica. Le resine degli alberi vengono raccolte dalle api e trasformate in propoli utilizzati per sigillare le celle del proprio alveare di appartenenza e, grazie alla sua proprietà battericida, rappresenta un disinfettante naturale per l'uomo. Il veleno d'api, invece, pur essendo un pericolo per alcuni soggetti vulnerabili, allo stesso tempo può essere utilizzato per diversi effetti curativi e biologici (Agroscope, 2023).

Tabella 4. Requisiti legali del miele

Caratteristica di composizione		Limite di legge
Tenore di zuccheri		
Somma di glucosio e fruttosio	miele di nettare	≥ 60 g/100 g
	- miele di melata, miscele di miele di melata e miele di nettare	≥ 45 g/100 g
Tenore di saccarosio	- in genere	≤ 5 g/100 g
	- <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Banksia menziesii</i> , <i>Hedysarum coronarium</i> , <i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i> , <i>Citrus</i> spp.	≤ 10 g/100 g
	- <i>Lavandula</i> spp., <i>Borago officinalis</i>	≤ 15 g/100 g
Tenore d'acqua		
	- in genere	≤ 20 %
	- miele di brughiera (Calluna) e miele per uso industriale in genere	≤ 23 %
	- miele di brughiera (Calluna) per uso industriale	≤ 25 %
Tenore di sostanze insolubili in acqua		
	- in genere	≤ 0.1 g/100 g
	- miele torchiato	≤ 0.5 g/100 g
Conduttività elettrica		
	- tipi di miele non elencati nel secondo e terzo trattino e miscele di tali tipi di miele	≤ 0,8 mS/cm
	- miele di melata e di castagno e miscele con tali tipi di miele ad eccezione di quelli indicati nel terzo trattino eccezioni: <i>Arbutus unedo</i> , <i>Erica</i> spp., <i>Eucalyptus</i> spp., <i>Tilia</i> spp., <i>Calluna vulgaris</i> , <i>Leptospermum</i> , <i>Melaleuca</i> spp.	≥ 0,8 mS/cm
Acidità libera		
	- in genere	< 50 meq/kg
	- miele per uso industriale	< 80 meq/kg
Indice diastatico		
	- in genere, tranne miele per uso industriale	≥ 8
	- miele con basso tenore naturale di enzimi (ad esempio, miele di agrumi) e tenore di HMF non superiore a 15 mg/kg	≥ 3
Tenore di idrossimetilfurfurale (HMF)		
	- in genere, tranne miele per uso industriale	≤ 40 mg/kg
	- miele di origine dichiarata da regioni con clima tropicale e miscele di tali tipi di miele	≤ 80 mg/kg

1.3.2. Miele come bioindicatore ambientale

Le api e i loro prodotti sono due indicatori biologici molto importanti della salubrità del territorio dove vivono, in particolare un'elevata mortalità delle colonie d'api e la presenza di residui di varia natura nei loro corpi e nei loro prodotti sono un chiaro segnale di allerta. Infatti, le api sono animali quasi totalmente ubiquitari dotati di una grande mobilità, che permettono così di sorvegliare vaste aree. Alcune delle loro caratteristiche morfologiche vengono in aiuto nello svolgimento di questo ruolo, come ad esempio la peluria che ricopre il loro torace, vettore importante di materiali e sostanze in esso incastrate. Un uso improprio dei prodotti fitosanitari, quindi, può essere facilmente smascherato grazie alle api, seppur a volte non più in vita, e alla loro attività (Porrini et al., 2003).

Relativamente ai trattamenti con i pesticidi, il Ministero della salute svolge annualmente in Italia un piano di controllo per ricercare residui di contaminanti chimici e di sostanze farmacologicamente attive

nelle categorie di animali e nei prodotti di origine animale successivamente elencate: ovi-caprini, volatili da cortile, selvaggina cacciata, selvaggina allevata, suini, acquacoltura, uova, bovini, latte e miele. La relazione finale che raccoglie i dati e i risultati dell'attività del Piano Nazionale Residui (PNR) dell'anno 2021 è di estrema rilevanza poiché riporta una non conformità per il glifosate (agente contaminante inserito nella categoria B3b - composto organofosforato fra le sostanze da ricercare nel piano di controllo) rispetto ai limiti massimi di residui determinati dalla norma nazionale. Il requisito, a fronte del quale è stata rilevata la non conformità, è indicato dal LMR specifico (0,05 mg/kg) della matrice alimentare in questione, ovvero il prodotto di origine animale "miele". Il mancato soddisfacimento del requisito è stato riscontrato nell'ambito dell'attività Extrapiano del PNR, definito dal Ministero o dalle Regioni con l'obiettivo di intensificare i controlli in riferimento a specifiche sostanze chimiche per esigenze nazionali o locali. Nel dettaglio, sono stati prelevati 1.114 campioni di diverse specie/categorie di animali e differenti prodotti di origine animale, tra cui 99 campioni di miele. Il numero dei risultati non conformi, considerando la totalità delle sostanze ricercate, corrisponde a 4, tra cui 2 campioni di miele e di cui uno causato da contaminazione ambientale dal glifosato ([Mattalia Giovanni et al, Ministero della Salute, 2022](#)). L'attenzione sull'alimento miele, e sul glifosato in esso presente, raffigura un elemento molto importante per il monitoraggio di tale composto. Difatti, nonostante la continua mancanza di una decisione comune inerente alle tematiche trattate nel capitolo precedente, si vede tuttora partecipare la Commissione europea e, in particolare, i suoi programmi pluriennali di controllo di residui di pesticidi (MACP, *Coordinated Multiannual Control Programme*).

Tali programmi di controllo, di durata triennale, ricoprono i prodotti alimentari che sono generalmente più consumati dai cittadini dell'Unione Europea. Questo permette un'analisi ciclica e continua degli alimenti, che ha come finalità la verifica del rispetto dei limiti massimi di residui dei prodotti fitosanitari, in aggiunta la valutazione dell'esposizione dei consumatori a tali residui e, infine, la verifica di una corretta applicazione dei pesticidi. Tale attività deve essere eseguita obbligatoriamente dai singoli Paesi UE attraverso l'applicazione di propri programmi nazionali di controllo (PCN) supplementari al MACP.


La Commissione Europea, al fine di coadiuvare la creazione dei PCN dei singoli Stati membri, redige e pubblica annualmente un "documento di lavoro sui pesticidi" (WD, Working Document). Tale documento, attualmente presente come [SANCO/12745/2013 rev. 14\(5\)](#), ha la volontà di suggerire l'inclusione di pesticidi nel MACP, ma anche incoraggiare l'integrazione su base volontaria di pesticidi nei PCN degli Stati membri. Il WD presenta una serie di Allegati (I-IX):

- **Allegato I:** comprende i pesticidi per i quali sono richiesti dati di monitoraggio per gestire specifici problemi annessi alla gestione del rischio;
- **Allegato II:** include i pesticidi per i quali è fondamentale il supporto degli EURL;
- **Allegato IV:** elenca le sostanze attive per le quali sono stati rilevati pochi residui durante la loro valutazione, ma di cui viene data conoscenza per permettere agli Stati membri di tenerne traccia nei loro PCN dato che la gran parte di essi viene analizzata da un'ampia frazione di laboratori;

- **Allegato V:** indica la metodologia di valutazione dei principi attivi;
- **Allegato VI:** illustra il modulo delle proposte di pesticidi da sottoporre a valutazione da parte degli EURL o degli Stati membri;
- **Allegato VII:** elenca le sostanze di interesse da analizzare nel miele nell'ambito dei PCN;
- **Allegato VIII:** elenca i prodotti di interesse da analizzare nell'ambito dei PCN;
- **Allegato IX:** presenta le sostanze che sono state spostate dal Capitolo 4 del presente documento al MACP dell'UE.

L'allegato VII è posto in evidenza poiché è l'unico fra tutti dedicato ad una specifica matrice alimentare, ovvero il miele. Questo a testimonianza dell'importanza di questo prodotto apistico come sistema di monitoraggio ambientale. L'EFSA incoraggia gli stessi Stati membri ad inserire nell'ambito dei loro programmi nazionali le sostanze presenti nella Tabella 5, e ricercarle nei campioni di miele.

Tabella 5. Sostanze per le quali si riscontrano frequentemente residui nel miele

<ul style="list-style-type: none"> • 2,4-D • Acetamiprid • Amitraz (veterinary medicinal product) • Azoxystrobin • Benzalkonium chloride (BAC) • Boscalid • Carbendazim and thiophanate methyl • Chlorates • Chlordane • Clothianidin • Chlorfenvinphos • Coumaphos (veterinary medicinal product) • Copper compounds • Didecyldimethylammonium chloride7 (DDAC) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dimoxystrobin • Dimethoate • Fluzifop-P • Glyphosate  • Iprodione • Imidacloprid • Lambda-cyhalothrin • Matrine • Orthophenylphenol (2-phenylphenol) • Oxymatrine • Picoxystrobin • Pendimethalin • Thiacloprid • Tritosulfuron
--	--

È evidente come il glifosato sia inserito nella lista redatta dall'EFSA, ed è lampante come ancora il miele rappresenti un protagonista necessario al fine di stimare l'esposizione delle api a tale pesticida e permettere di adattarne, quindi, i relativi LMR.

Infine, all'interno della lista di pesticidi del programma coordinato di controllo pluriennale dell'Unione per il 2023, il 2024 e il 2025 (MACP), rientra anche il glufosinato-ammonio ([Regolamento di esecuzione \(UE\) 2022/741](#)).

2. OBIETTIVI DELLA TESI

Lo scopo di questo studio è stato sviluppare e validare un metodo analitico per la determinazione del glifosate e dei suoi prodotti di degradazione, AMPA e N-acetil glifosato, nel miele. In secondo luogo, lo studio ha coinvolto un secondo erbicida, il glufosinate. Simile per struttura chimico-fisica al glifosato, e vietato attualmente nell'Unione Europea.

La prima fase del progetto ha previsto lo sviluppo e l'ottimizzazione della metodica attraverso un accurato studio bibliografico e prove scientifiche reiterate nel tempo, le quali prevedono una procedura di estrazione e purificazione dalla matrice mediante l'utilizzo della tecnica SPE (estrazione in fase solida), e la determinazione analitica eseguita adoperando la cromatografia ad alta prestazione accoppiata ad uno spettrometro di massa.

Successivamente, sono stati esaminati i fondamentali parametri di validazione quali:

- costruzione di curve di calibrazione ai fini della quantificazione degli analiti in matrice;
- studio dei parametri di linearità, robustezza e precisione della metodica analitica adottata;
- studio dei recuperi di estrazione.

La determinazione di tali parametri ha fornito risultati soddisfacenti riguardo alle prestazioni del metodo analitico.

Il secondo obiettivo della tesi è stato utilizzare la metodologia sviluppata per la ricerca degli analiti oggetto di studio in campioni reali provenienti dal mercato e da apicoltori locali, ai fini di effettuare uno studio preliminare sulla presenza di tali inquinanti nel miele consumato a livello locale.

3. MATERIALI E METODI

L'intero studio di ricerca è stato realizzato presso il laboratorio del Centro di Referenza Nazionale per l'Apicoltura (CRNA), Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - IZSve (Legnaro, PD).

3.1. Reagenti e standards

I reagenti utilizzati in questa sperimentazione sono riportati in seguito:

- Metanolo (MeOH) di grado LC-MS della Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Acetonitrile (ACN) di grado LC-MS della Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Acido formico (FA) di grado LC-MS (Chem-Lab ANALYTICAL bvba®, Zedelgem, Belgio);
- Ammonio formiato (NH₄HCO₂) purezza ≥ 99.0 % della Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Potassio idrossido (KOH) puriss.p.a. in pellets della Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Carbonato di sodio (Na₂CO₃) della Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Diclorometano (DCM) di CARLO ERBA Reagents S.r.l. (Milano, Italia);
- Acqua (H₂O) ultrapura con il sistema di purificazione Arium® Pro (Sartorius, Gottinga, Germania);
- Dimetilsolfossido (DMSO) di grado ACS della Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Fluorenilmetilcloroformiato puriss.p.a. (Fmoc-Cl) 97 % della Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Materiale di riferimento di Acido aminometilfosfonico (AMPA) in polvere puro della Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Materiale di riferimento di glufosinato di ammonio in polvere puro della Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Materiale di riferimento di glifosato puro (1000 µg/mL) in soluzione della Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Standard derivatizzato di glufosinate in polvere (10 mg) della Dr. Ehrenstorfer™ (LGC Standards, Regno Unito);
- Standard derivatizzato di AMPA in soluzione (100 µg/mL) della Dr. Ehrenstorfer™ (LGC Standards, Regno Unito);
- Standard derivatizzato di glifosato in soluzione (100 µg/mL) della Dr. Ehrenstorfer™ (LGC Standards, Regno Unito).

3.1.1. Soluzioni

Le soluzioni necessarie per lo svolgimento del metodo analitico sono le seguenti:

- Soluzione di acqua con 1% di acido formico: diluire 5 mL di acido formico in 500 mL di acqua, e conservare la soluzione in un sistema frigorifero;
- Soluzione di idrossido di potassio 6M: sciogliere 67.332 gr di idrossido di potassio in 200 mL di acqua;
- Soluzione di idrossido di potassio 0.6M e 0.1M: diluire con acqua la soluzione idrossido di potassio 6M fino a raggiungere le concentrazioni finali desiderate;
- Tampone carbonato di sodio 0.1M a pH 10: sciogliere 5.299 gr di carbonato di sodio in 500 mL di acqua, e conservare la soluzione in un sistema frigorifero;
- Soluzione FMOC-Cl 50 mg/mL: preparata giornalmente, sciogliendo la polvere di FMOC-Cl in acetonitrile.

3.1.2. Soluzioni di materiali di riferimento

Tutte le soluzioni, se correttamente conservate, hanno come data di scadenza 6 mesi dalla data di preparazione o di apertura. Inoltre, devono essere conservate in recipienti di polietilene, o altro materiale plastico, e poste al buio in un sistema frigorifero.

Le singole soluzioni standard di glifosato, AMPA e glufosinato sono state preparate per ottenere una concentrazione finale di 1 µg/mL in acqua ultrapura, ad eccezione delle soluzioni standard dei derivati FMOC che sono state preparate in acetonitrile:acqua 8:2 (v/v) ad una concentrazione finale di 0.1 µg/mL.

Le soluzioni intermedie di materiali di riferimento di 1000 e 100 µg/mL sono state preparate in acqua:acetonitrile 9:1 (v/v) da AMPA e glufosinate in polvere, la cui dissoluzione è stata facilitata dall'aggiunta di alcune gocce di dimetilsolfossido.

3.1.3. Soluzioni accessorie per analisi UHPLC-MS/MS

Per l'analisi strumentale sono necessarie le seguenti soluzioni:

- Fase eluente A UHPLC: (95% acqua, 5% metanolo, 5 mM ammonio formiato, 0.1% acido formico)
In un matraccio della capacità di 1000 mL, sciogliere 0.31 g di ammonio formiato in circa 30 mL di acqua, aggiungere 50 mL di metanolo e 1 mL di acido formico, quindi, portare a volume con acqua.
- Fase eluente B UHPLC: La soluzione deve essere preparata con metanolo:acetonitrile 1:1 (v/v).
- Soluzione di lavaggio UHPLC-MS/MS: Soluzione di acetonitrile e acqua.
- Soluzione di ricostituzione UHPLC-MS/MS: La soluzione deve essere preparata miscelando fase eluente A: fase eluente B 1:1 (v/v).

3.2. Materiali e apparecchiature

I materiali utilizzati sono i seguenti:

- Provette da centrifuga in polipropilene da 50 mL/15 mL;
- Eppendorf di plastica con volume 2 mL;
- Colonne SPE Supel™-Swift HLB bed wt 60 mg, volume 3 ml, pk di 54 ea della Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania);
- Colonna HPLC Accucore™ aQ C18 della Thermo Scientific® 100 x 2.1 mm 2.6 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts);
- Vial in polipropilene, con setti pretagliati in PTFE e silicone con porosità pari a 0.2 µm della Verex™ (Phenomenex®, Torrance, California).

Le apparecchiature utilizzate sono le seguenti:

- Bilancia analitica (sensibilità di 0.1 mg);
- Bagno ad ultrasuoni;
- pHmetro;
- Omogeneizzatore verticale Geno/Grinder;
- Centrifuga per provette eppendorf;
- Sistema di eluizione manuale per colonne SPE;
- Pompa da vuoto a membrana KNF;
- Sistema di evaporazione rotativo (RapidVap® della LabConco®);
- Sistema cromatografico ad alta prestazione con rivelazione a spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS);
- Agitatore per provette Multi Reax Heidolph;
- Miscelatore rotativo

3.3. Procedura di estrazione e purificazione dei campioni

Il metodo analitico si suddivide in tre principali fasi: derivatizzazione, purificazione dei campioni su sistema di eluizione manuale e separazione in cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelazione a spettrometria di massa tandem (UPLC-MSMS).

Step 1: Pesare due grammi di campione di miele in una provetta da centrifuga in polipropilene da 50 mL. Successivamente, aggiungere 5 mL di acqua acidificata (1% acido formico). Agitare l'aliquota manualmente fino a quando il miele non sarà completamente dissolto. Trasferire il campione in un bagno ad ultrasuoni per 10 minuti, e procedere con un'agitazione meccanica per il medesimo tempo, al fine di coadiuvare la disgregazione dei probabili complessi analiti-campione.

Per favorire la reazione di derivatizzazione, neutralizzare l'aliquota con 0.182 mL di soluzione di idrossido di potassio 6M, verificando il pH con l'apposito strumento e, se necessario, portare a circa pH 7 con le soluzioni di idrossido di potassio a molarità inferiore.

Trasferire 0.5 mL di campione in eppendorf di plastica con volume 2 mL, ed aggiungere 0.5 mL di soluzione tampone (carbonato di sodio 0.1M) per raggiungere pH≈9. L'aliquota viene addizionata con 0.2 mL di FMOc e nuovamente agitata con un omogeneizzatore verticale Geno/Grinder per 3 minuti. Lasciare reagire il campione in agitazione nel miscelatore rotativo per 1 h al buio.

Trascorso questo periodo, arrestare la reazione con l'aggiunta di 0.32 mL di acqua acidificata (1% acido formico) e centrifugare l'aliquota derivatizzata a 9000 rcf per 10 minuti a temperatura ambiente.

Step 2: Installare una colonna SPE in un sistema di eluizione manuale e condizionarla con 6 mL di metanolo e, in seguito, 6 mL di acqua acidificata (1% acido formico).

Passare l'aliquota derivatizzata e centrifugata attraverso la colonna SPE, e proseguire con lo stadio di lavaggio con 5 mL di acqua ultrapura e 5 mL di diclorometano sequenzialmente.

Collegare il sistema ad una pompa a membrana per 10 minuti in modo tale da eluire i residui di acqua in fase stazionaria e portare ad essiccamento la colonna.

Desorbire gli analiti dalla colonna con 5 mL di metanolo, raccogliendo gli eluati in provetta da centrifuga in polipropilene da 15 mL.

Evaporare a secchezza la soluzione metanolica con l'ausilio di un evaporatore rotativo settato nelle seguenti impostazioni: velocità 70%, temperatura 45°C, pressione 120 mBar.

Ridisciogliere il residuo in 0.5 mL di soluzione ricostituente.

Step 3: Trasferire il campione in vial filtrante 0.2 µm ed iniettare nel sistema cromatografico.

3.4. Standardizzazione della tecnica di preparazione del campione

Le principali considerazioni intraprese per sviluppare il metodo analitico, riportato nel precedente capitolo, riguardano fondamentalmente le difficoltà nella determinazione di glifosate, dei suoi metaboliti e del glufosinato ad una bassa concentrazione. Questo è dovuto alle loro caratteristiche chimico-fisiche: composti anfoteri, privi di composti cromofori e non volatili, oltre che particolarmente solubili in acqua, ma insolubili nei solventi organici. Ciò rende necessario l'impiego di una struttura laboratoristica importante, incluso personale altamente specializzato, apparecchiature e materiali specifici.

Relativamente ai materiali utilizzati, le perdite percentuali dovute all'interazione con essi sono in genere più elevate proprio a basse concentrazioni. A tal proposito, l'uso di materiale di plastica è altamente raccomandato in quanto i composti coperti da questo metodo tendono a interagire con le superfici di vetro. Tali interazioni sono tipicamente più pronunciate nelle soluzioni costituite da solventi aprotici (ad esempio, acetonitrile) ([Anastassiades et al., 2015](#)).

Inoltre, un'altra considerazione è stata rivolta alla difficoltà dovuta alla composizione del miele stesso, fonte frequente di forti "effetti matrice".

In seguito sono riportati i singoli passaggi per la standardizzazione della tecnica di preparazione del campione.

Step 1: Dimensione del campione. Inizialmente, la dimensione del campione testata era 5 gr, seguendo le indicazioni del metodo QuPPE (Quick Polar Pesticides) destinato all'analisi dei pesticidi altamente polari negli alimenti (compreso il miele), e pubblicato da EURL-SRM (laboratori di riferimento europeo per i residui di pesticidi) (Anastassiades et al., 2015). A causa della dimensione eccessiva del campione, però, l'efficienza di estrazione è stata sacrificata a causa della coestrusione maggiore di alcuni componenti della matrice, causando torbidità dell'estratto e successiva contaminazione dello spettrometro di massa. La dimensione, quindi, è stata ridotta a 2 gr, così permettendo di minimizzare la presenza di interferenti provenienti dal miele e, al contempo, facilitando la purificazione (Thompson et al., 2019).

Step 2: Solvente di estrazione. La diluizione del campione è stata una strategia utilizzata nell'analisi per i problemi di isolamento dei residui di pesticidi dalla matrice del campione, particolarmente ricca di monosaccaridi (glucosio e fruttosio), ma anche di una piccola percentuale di monosaccaridi e altri carboidrati polari. Gli zuccheri, infatti, costituiscono gran parte del peso del miele, in cui l'acqua è presente solamente ad una percentuale inferiore al 20 %.

L'acqua acidificata è stata scelta per la diluizione e l'estrazione degli analiti dal campione. L'ambiente di estrazione acido è assolutamente necessario per aumentare l'accessibilità degli analiti all'agente derivatizzante. Infatti, i cationi multivalenti e altri componenti della matrice interagiscono con il comportamento anfotero degli ioni del glifosato e di composti simili per formare complessi stabili.

Inizialmente è stata utilizzata acqua acidificata con 0.1% acido formico, ma i recuperi a fine analisi sono risultati nettamente minori rispetto ad una concentrazione dell'1% di acido formico nel solvente di estrazione. Il volume di acqua di diluizione ed estrazione scelto sono 5 ml (Thompson et al., 2019), un giusto compromesso per permettere di rilevare i residui con la modesta sensibilità della strumentazione a disposizione.

Per coadiuvare, inoltre, la disgregazione di eventuali complessi del glifosato con il miele, è risultata efficiente la sonicazione tramite bagno ultrasuoni.

Inizialmente, per il processo di estrazione era stato testato anche l'utilizzo di diclorometano assieme all'acqua acidificata per rimuovere le interferenze dovute ai pigmenti colorati nella matrice (Oulkar et al., 2017). Grazie ad un successivo passaggio di centrifugazione, la separazione di fase permetteva di separare i componenti colorati nella fase di diclorometano, mentre gli zuccheri e gli aminoacidi rimanenti nella fase acquosa. Questo passaggio, però, ha mostrato recuperi peggiori, probabilmente per una perdita degli analiti durante la loro fase di prelievo dallo strato di solvente organico. Per tale ragione, il passaggio con il diclorometano è stato abbandonato.

Step 3: Ottimizzazione della derivatizzazione. Il processo di derivatizzazione è stato essenziale per permettere di ridurre la polarità dei composti analitici, di conseguenza aumentare il tempo di ritenzione durante l'analisi strumentale, e migliorarne la separazione dai carboidrati altamente polari, di cui è ricca la matrice. La selettività e la sensibilità analitica sono così aumentate, in combinazione all'utilizzo di una fase stazionaria inversa. Per la derivatizzazione, 9-fluorenilmetil cloroformiato (FMOC-Cl), estere cloroformiato, è stato scelto visto il suo comune utilizzo come agente di derivatizzazione per rilevare i pesticidi polari in spettrometria di massa. In particolare, esso determina una reazione nucleofila in condizioni alcaline, attaccando l'ammino gruppo nella molecola di glifosato, eventuali metaboliti, e glufosinato (Figura 6). Questa reazione porta al percorso di frammentazione ionica degli analiti, che dopo derivatizzazione hanno una limitata solubilità in acqua.

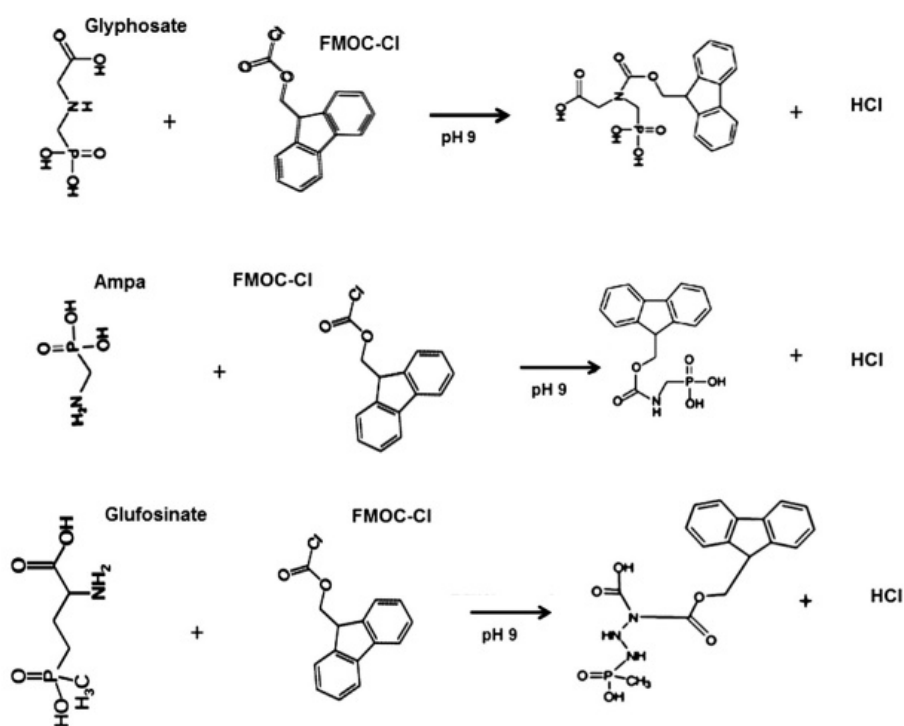


Figura 6. Reazione di derivatizzazione di glifosato, AMPA e glufosinato con l'agente FMOC-Cl (Campanale et al., 2022).

Dalle informazioni ricavate dalla letteratura, è necessario che per la derivatizzazione il mezzo di reazione sia alcalino ($\text{pH} \approx 9$). Il miele, però, è abbastanza acido in una soluzione relativamente concentrata con acido formico, e la soluzione di sodio carbonato non possiede sufficiente capacità tampone per consentire il pH della miscela risultante di raggiungere l'optimum di reazione (Thompson et al., 2019). È quindi molto importante neutralizzare precedentemente il mezzo in modo che il reagente tampone successivo possa raggiungere e mantenere l'alcalinità appropriata per la reazione di derivatizzazione (Demonte et al., 2018). Grazie alle informazioni presenti in numerosi articoli scientifici, sulle prime è stato utilizzato il tetraborato di sodio come agente per raggiungere il pH prossimo alla neutralità. Dopo numerosi tentativi, però, non è stato considerato adeguato in quanto, dopo l'aggiunta del tampone carbonato di

sodio, erano frequenti oscillazioni del pH del mezzo verso valori di acidità. L'idrossido di potassio a concentrazione 6M è risultato un valido sostituto (Campanale et al., 2022).

Per quanto concerne la preparazione del reagente derivatizzante, invece, è necessario utilizzare un solvente organico come l'acetonitrile in quanto FMOC-Cl è insolubile in acqua (Campanale et al., 2022).

La quantità richiesta di reagente è critica per assicurare una reazione completa e riproducibile. Un eccesso di reagente deve essere utilizzato per la completa ed efficiente derivatizzazione degli analiti presenti in un campione. L'ottimizzazione del quantitativo di FMOC-Cl è, inoltre, importante in quanto l'agente derivatizzante è altamente reattivo nell'acqua (reazione di un cloruro di acile con l'acqua) e questo potrebbe portare alla formazione del prodotto FMOC-OH. Questo sottoprodotto ha lo svantaggio di essere meno solubile in acqua rispetto ai derivati degli analiti e può precipitare, disturbando così le prestazioni della colonna cromatografica. Il reagente non reagito diventa un'impurità indesiderabile (Oulkar et al., 2017), che deve essere rimossa assieme ad altre impurezze attraverso una pulizia del campione.

L'influenza della quantità di FMOC-Cl sull'efficienza del processo di derivatizzazione è stato quindi indagata. Le prove preliminari consistevano nell'aggiunta di 2, 6, 8 ml di FMOC-Cl a due distinte concentrazioni, 5 e 6 mg/mL. In seguito, la derivatizzazione è stata verificata anche con volumi minori di FMOC-Cl a concentrazione maggiore: 0.2, 0.4, 0.96, e 0.98 ml di FMOC-Cl a 25 e 50 mg/mL. La formulazione 0.2 di FMOC-Cl 50 mg/mL in acetonitrile è stata stabilita ottimale sulla base dell'efficienza del processo di derivatizzazione (Thompson et al., 2019).

Oltre alle condizioni del mezzo e al volume di reagente, il tempo di reazione è un'altra variabile importante in quanto deve consentire una reazione completa e, al contempo, essere il più breve possibile per fornire una durata accettabile dell'analisi.

I tempi di reazione sperimentati sono 1 h e la durata di una notte, durante i quali i campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente, in assenza di luminosità e in agitazione blanda per tutto il protrarsi del tempo. Nel dettaglio, 60 minuti di derivatizzazione hanno dimostrato di essere adeguati per ottenere una reazione completa e riproducibile, coadiuvata da una precedente agitazione verticale per migliorare l'efficienza della reazione.

Step 4: Purificazione con SPE. Il problema principale della derivatizzazione è FMOC-OH, risultato della reazione di idrolisi e decarbossilazione dell'eccesso di reagente derivatizzante, che può precipitare nella sorgente ionica o nella colonna cromatografica. Questo diminuisce l'efficienza di ionizzazione, riducendo la sensibilità dello spettrometro di massa. Pertanto, è molto frequente l'uso di un trattamento di estrazione in fase solida (SPE) a cui sottoporre gli estratti.

Le fasi di pulizia SPE (condizionamento della cartuccia HLB SPE, caricamento del campione, lavaggio ed eluizione) sono stati ottimizzati e valutati in termini di percentuale di recupero.

Sono state selezionate le colonne SPE Supel™-Swift HLB della Supelco® per la concentrazione e la pulizia degli analiti, utilizzando un volume di lavaggio di 5 mL di acqua ultrapura e 5 mL di diclorometano,

dopo il condizionamento e il caricamento dell'estratto derivato per rimuovere le impurità dei sottoprodotti FMOCl. Successivamente l'eluizione finale è stata eseguita con 5 mL di metanolo (Oulkar et al., 2017).

Procedure alternative di lavaggio solo con diclorometano, o con l'aggiunta di etilacetato, non hanno mostrato risultati soddisfacenti in termini di recupero (Matysiak e Kiljanek, 2022). Allo stesso modo, per eliminare l'utilizzo di solventi cancerogeni, si è tentata la sostituzione del diclorometano con acqua:metanolo 1:1 (v/v), ma i risultati non sono egualmente migliorati.

L'estratto ottenuto dopo la pulizia con il metodo SPE era chiaro e quasi incolore e l'approccio con diclorometano è stato infine selezionato.

3.5. Strumentazioni e condizioni cromatografiche

Nella presente sperimentazione l'analisi strumentale è stata effettuata mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con analizzatore costituito da uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (Shimadzu LCMS-8045), con ionizzazione *electrospray* negativa.

Gli analiti derivatizzati sono rilevati operando in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Nelle Tabelle 6, 7, 8 e 9 sono riportati i parametri strumentali e di acquisizione.

Tabella 6. Parametri cromatografici

Parametro operativo	Valore/Settaggio
Colonna	Colonna HPLC Accucore™ aQ C18 della Thermo Scientific® 100 x 2.1
Temperatura colonna	mm 2.6 µm 35 °C
Fase eluente A	95% H ₂ O Milli-Q, 5% MeOH, 5 mM NH ₄ HCO ₂ ,
Fase eluente B	0,1% CH ₂ O ₂ Metanolo:Acetonitrile 1:1 (v/v)
Volume di iniezione	10 µL

Tabella 7. Parametri cromatografici: gradiente LC

Tempo (min)	Percentuale Fase eluente A	Percentuale Fase eluente B	Flusso(mL/min)
0	95	5	0.3500
1	95	5	0.3500
10	40	60	0.3500
10.10	10	90	0.3500
14	10	90	0.3500
14.10	95	5	0.3500
17	95	5	0.3500

Tabella 8. Parametri spettrofotometrici

Parametro operativo	Valore/Settaggio
Polarity	Negative
Nebulizing Gas Flow	3 L/min
Heating Gas Flow	5 L/min
Interface Temperature	350 °C
DL Temperature	200 °C
Heat Block Temperature	300 °C
Drying Gas Flow	10 L/min

Tabella 9. Parametri di acquisizione degli ioni frammento con relativi parametri di massa

Analita	Precursore > ione frammento (m/z)	CE (V)	Tempo di ritenzione (min)
Glifosato-FMOC	390 > 168.1	13.0	7.5
	390 > 149.9	26.0	7.5
	390 > 123.5	40.0	7.5
AMPA-FMOC	390 > 110.0	7.0	7.9
	390 > 135.9	14.0	7.9
	390 > 62.9	49.0	7.9
Glufosinate-FMOC	390 > 180.2	10.0	8.5
	390 > 206.1	16.0	8.5
	390 > 134.1	28.0	8.5
	390 > 162.1	21.0	8.5

3.6. Sviluppo del metodo di rilevazione

Per lo sviluppo di un metodo LC-MS/MS progettato per l'analisi degli analiti in oggetto, la selezione di una colonna di separazione idonea è fondamentale per mantenere nel tempo valori analitici di merito. Pertanto, in base alle informazioni disponibili in studi precedenti, l'utilizzo di diverse colonne è stato analizzato in dettaglio. Dapprima, la scelta è ricaduta sulla colonna LC Raptor Polar X - Restek (2.7 μ m, 2.1 mm x 30 mm) con annessa passivazione, seguendo i suggerimenti presenti nel metodo QuPPE di EURL-SRM ([Anastassiades et al., 2015](#)) dove non è però prevista la fase di derivatizzazione. Nonostante la specificità della colonna per l'analisi dei pesticidi polari, è stata necessaria la sostituzione con la colonna HPLC Accucore™ aQ C18 della Thermo Scientific® (2.6 μ m, 100 x 2.1 mm) a fase inversa ([Campanale et al., 2022](#)).

L'ottimizzazione dei parametri MS ha coinvolto, dapprima, l'iniezione degli analiti target (standards) utilizzando la modalità di acquisizione di iniezione di flusso, operando in polarità ESI sia positiva che negativa. La migliore ionizzazione è stata ottenuta in modalità ESI negativa.

Successivamente, condizioni cromatografiche quali la fase mobile, il gradiente LC, il volume d'iniezione e la velocità del flusso sono state ottimizzate per produrre le condizioni migliori per separazione cromatografica, forma del picco e stabilità del tempo di ritenzione. Da subito le fasi mobili utilizzate erano A: soluzione 5 mM di ammonio formiato in acqua (95%) + 0.1% acido formico, B: soluzione 5 mM di ammonio formiato in metanolo (95%) + 0.1% acido formico ([Campanale et al., 2022](#)). In un secondo momento, la seconda fase mobile è stata sostituita da metanolo puro. In queste prove, non si è riusciti a trovare un buon compromesso tra dimensione delle aree dei picchi cromatografici e forma stessa del picco, in cui spesso si presentava il fenomeno del "tailing".

Inoltre, il picco cromatografico del glifosato mostrava aree eccessivamente alte e il rapporto di frammentazione tra lo ione primario e i suoi frammenti non era mantenuto nel tempo. Tuttavia, è noto che ogni molecola ha una frammentazione caratteristica, specifica ma costante, che dipende sia dalle proprietà della molecola stessa sia dalle condizioni operative di ionizzazione.

Per confermare o meno l'identità del glifosato, si sono analizzati i medesimi campioni con lo spettrometro di massa ad alta risoluzione e precisione, modello Q-Exactive - Orbitrap™ della Thermo Fisher™ afferente ad una struttura laboratoristica comunicante. Questo sistema combina la selezione dello ione precursore tramite quadrupolo con il rilevamento a trappola orbitale per riuscire a determinare qualitativamente la "massa esatta" del picco nello spettro cromatografico da noi ottenuto. Grazie all'accuratezza migliore di questa strumentazione, è stato possibile confermare l'esattezza dell'identità del glifosato, ma allo stesso tempo rilevare un interferente di massa e struttura somigliante a tale analita, eluito ad un tempo di ritenzione simile.

Preso conoscenza di questo "effetto matrice" rilevante, non presente in solvente, l'unica soluzione possibile era sfruttare le caratteristiche della colonna cromatografica per eluire le due molecole in tempi differenti.

Innanzitutto, si è lavorato sulle fasi mobili e sulla velocità del flusso, ottenendo i migliori risultati alle seguenti condizioni: fase mobile A invariata, fase mobile B metanolo:acetonitrile 1:1 (v/v) con flusso intermedio 0.3500 mL/min. Per separare cromatograficamente il glifosato e la molecola interferente, è stato necessario anche modificare la rampa. Le condizioni iniziali del gradiente LC erano: da 0 a 1 min, isocratica (95% A:5% B); da 1 min a 10 min, un lineare aumento di B da 0 a 90%; da 10 min a 17 min, un lineare decremento di B da 90 a 5%. Questa rampa è stata modificata con una riduzione della sua pendenza nel seguente modo: da 0 a 1 min, isocratica (95% A:5% B); da 1 min a 10 min, un lineare aumento di B da 0 a 60%; da 10 min a 14 min, un lineare aumento di B da 60 a 90%; da 14 min a 17 min, un lineare decremento di B da 90 a 5%.

Infine, il volume di iniezione di 10 µL è stato selezionato come miglior compromesso tra 5 e 15 µL.

3.7. Processo di validazione del metodo

La validazione del metodo segue i criteri stabiliti dalla linea guida europea [SANTE/11312/2021](#), complementare e integrante i requisiti della norma ISO/IEC 17025. La validazione è necessaria per tutti i laboratori che effettuano un controllo ufficiale sulla presenza di residui di pesticidi nei prodotti alimentari, destinati sia all'uomo che agli animali. Questa conferma, sostenuta da evidenze oggettive come criteri e strumenti statistici, ha lo scopo di dimostrare che il metodo analitico sviluppato è adatto allo scopo previsto.

La validazione del metodo è stata eseguita utilizzando un miele millefiori senza residui rilevabili, seguendo la procedura presentata nell'*Appendice A* del presente documento normativo.

I principali parametri considerati per la validazione sono stati: linearità, limite di quantificazione (LOQ), recupero medio (come misura di veridicità), robustezza, effetto matrice e precisione (come ripetibilità RSD_r), .

Sensibilità/linearità: La linearità di un metodo analitico è determinata dalla sua capacità di produrre risultati direttamente proporzionali alla presenza di un analita, in relazione alla sua quantità nel

campione. Per soddisfare il parametro di linearità, i residui (%) devono essere $\leq 20\%$.

$$RESIDUO [\%] = \frac{\text{valore teorico} - \text{valore reale}}{\text{valore teorico}} \cdot 100$$

LOQ: Il LOQ è il limite di picco più basso che soddisfa i criteri di identificazione e di prestazione del metodo per il recupero e la precisione. Deve essere inferiore a LMR.

Recupero medio: La misura dell'esattezza è stata stimata in base alla media dei recuperi in termini percentuali, il cui valore deve essere all'interno del range 70 - 120%.

$$RECUPERO [\%] = \frac{\text{concentrazione determinata}}{\text{concentrazione aggiunta}} \cdot 100$$

Robustezza: La robustezza di un metodo indica la sua capacità di non essere influenzato in modo significativo da fattori esterni e/o dalla sensibilità verso le interferenze della matrice del campione.

Per garantire la robustezza di un metodo si fa riferimento ai recuperi medi.

Precisione: La precisione è stata valutata come deviazione standard relativa di ripetibilità (RSD_r , %) per tutti gli analiti analizzati e per ogni livello di concentrazione con una tolleranza $\leq 20\%$.

$$RSD_r [\%] = \frac{\text{deviazione standard}}{\text{media}} \cdot 100$$

Effetto matrice: La matrice può influenzare la risposta strumentale, generando fenomeni di soppressione o di arricchimento del segnale. L'effetto matrice (ME%) viene valutato per i tre analiti, comparando la pendenza della curva di calibrazione nel solvente con la pendenza della curva di calibrazione della matrice attraverso la seguente equazione:

$$ME [\%] = 100\% - \left(\frac{\text{pendenza della retta in matrice di ogni analita}}{\text{pendenza della retta in solvente di ogni analita}} \cdot 100\% \right)$$

Qualora questo valore sia superiore al 20%, gli effetti matrice devono essere eliminati o compensati con una calibrazione corrispondente alla matrice o l'utilizzo di uno standard interno.

3.8. Analisi dei campioni reali

È stata condotta un'indagine di mercato per valutare la presenza di glifosate, AMPA e glufosinato in campioni di miele commerciale. Nell'analisi dei residui non è stato incluso il secondo metabolita, N-acetil glifosato, per difficoltà tecnico-analitiche che hanno portato a limitare la ricerca iniziale solo verso gli analiti principali. Venticinque mieli (10 di millefiori, 10 di acacia, 5 di castagno) sono stati acquistati nei mercati locali e analizzati applicando il metodo sviluppato. La provenienza del miele era prevalentemente nazionale

(21 dall'Italia). Due dei campioni raccolti erano miscele contenenti mieli di diversi Paesi (tra cui Ungheria, Turchia e Romania), mentre l'origine di un solo campione era di origine totalmente extra-nazionale (Ungheria), pur rimanendo all'interno del territorio europeo.

Inoltre, il metodo è stato anche applicato ad un campione di miele nell'ambito dell'attività di "Ring Test" (conosciuto anche con il nome "Proficiency Test"). Si tratta di una prova interlaboratorio utile per valutare le prestazioni di un laboratorio e garantire la qualità e l'affidabilità dei metodi analitici condotti, compresi i risultati che ne derivano.

Il proficiency test EUPT-SRM18 è stato condotto utilizzando il miele come matrice oggetto di prova. Il miele di robinia è stato acquistato e addizionato con una serie di pesticidi dai laboratori di riferimento dell'Unione Europea per i residui di pesticidi (EURL - SRM). Una panoramica dei pesticidi addizionati al materiale di prova è mostrato nella Tabella 10. Dopo l'aggiunta e l'omogeneizzazione, il miele è stato spedito (in data 19 maggio 2023) ai laboratori partecipanti al RingTest all'interno di bottiglie di plastica con tappi a vite.

Tabella 10. Lista degli analiti target nel test SRM18

• 2,4-D	• DDAC-C10
• BAC-C14	• Fluazifop
• Chlorate	• Matrine
• Nicotine	• Glyphosate €
• Oxymatrine	• Perchlorate
• Phosphonic acid	• Trinexapac

Tra gli analiti target del proficiency test è presente il glifosato e, per tale motivo, il metodo sviluppato e validato in questo studio di tesi è stato applicato nell'analisi di questo campione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Curve cromatografiche

Grazie all'ottimizzazione e all'applicazione del metodo sopra descritto è stato possibile ottenere curve cromatografiche per ciascun analita, ad esclusione di N-acetil glifosato, mostrate In Figura 7 e Figura 8, a due diverse concentrazioni: 10 e 50 µg/kg. In corrispondenza dei cromatogrammi del glifosato (A), si può notare la separazione dell'analita in blu dal picco di interferenza alla sua destra grazie al metodo cromatografico ottimizzato. La separazione di base fornisce picchi acuti per tutti gli analiti evidenziati in blu, in cui è presente un leggero "tailing".

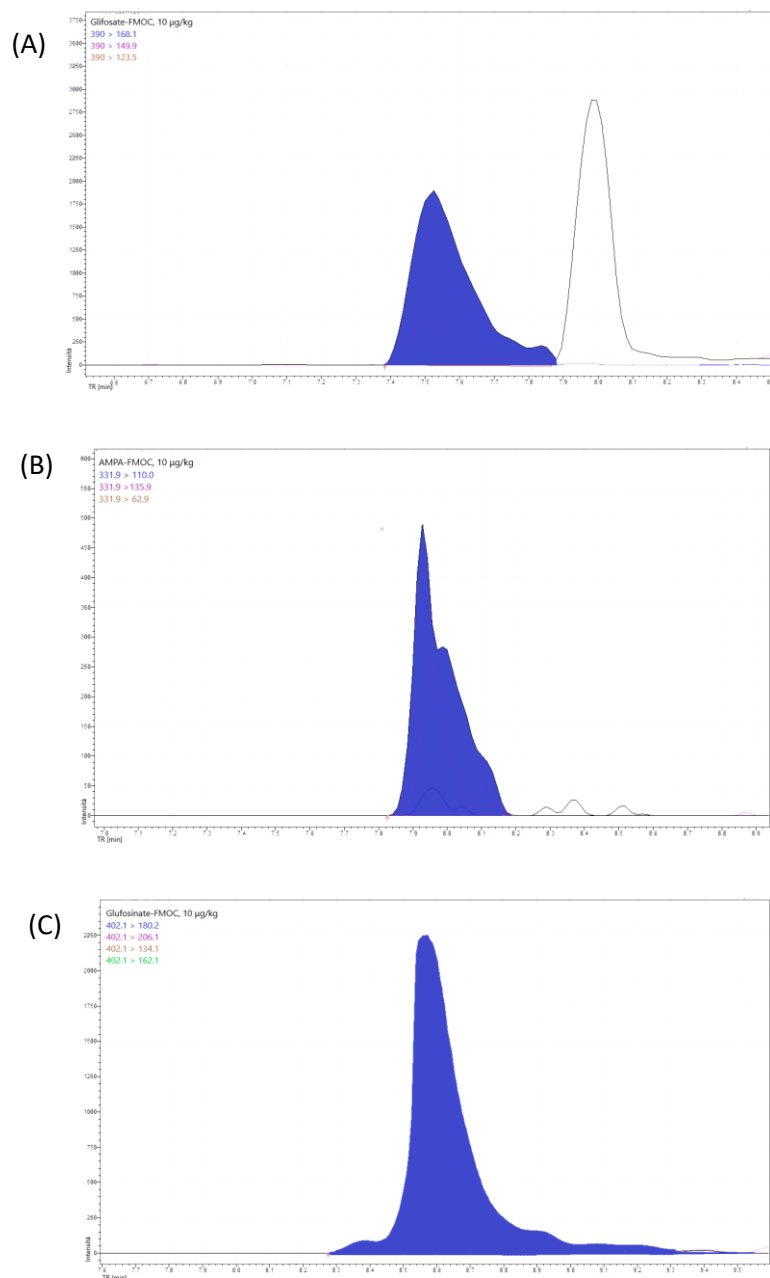


Figura 7. Cromatogrammi corrispondenti ad un campione addizionato con glifosato (A), AMPA (B) e glufosinato (C) a livello di 10 µg/kg e sottoposti a derivatizzazione.

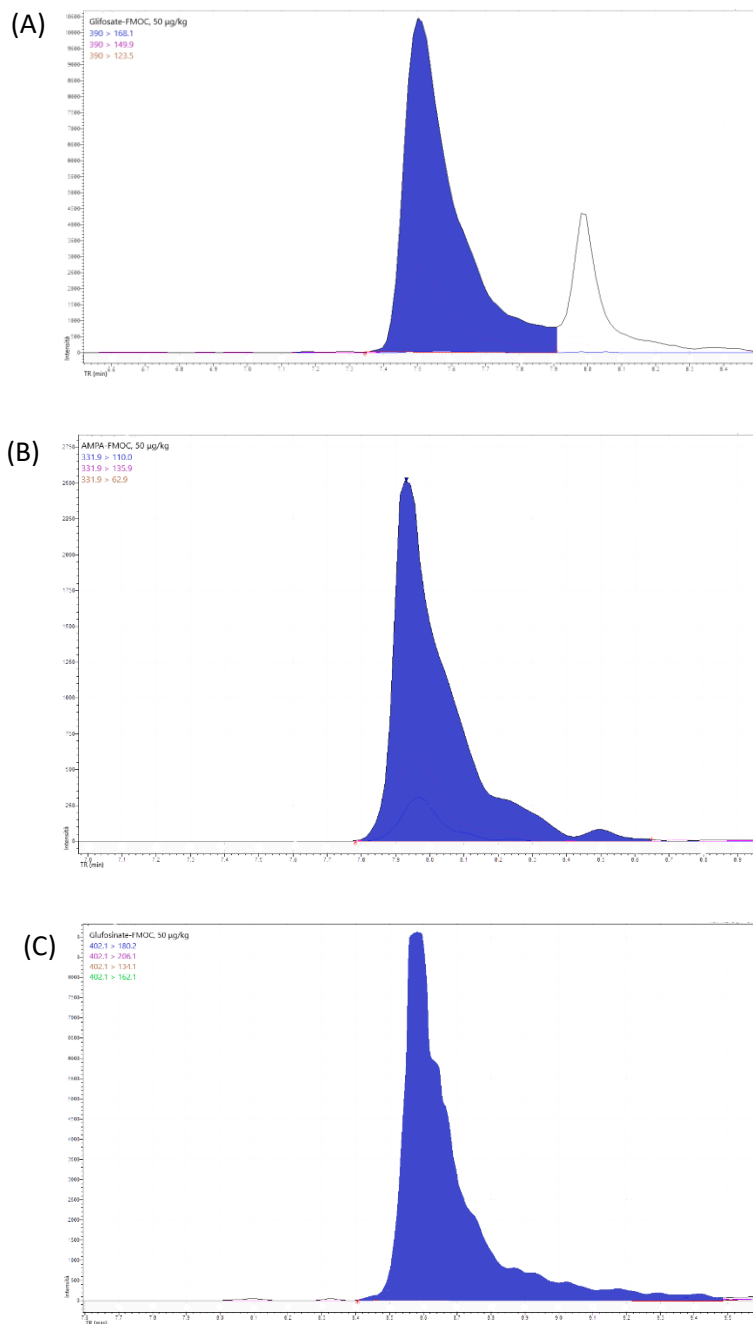


Figura 8. Cromatogrammi corrispondenti ad un campione addizionato con glifosato (A), AMPA (B) e glufosinato (C) a livello di 50 µg/kg e sottoposti a derivatizzazione.

4.2. Validazione del metodo

La *linearità* del metodo è stata testata sia nella retta di calibrazione nel solvente sia nella matrice. Nel primo caso, il solvente utilizzato consiste nella fase ricostituente fortificata con la soluzione degli standard derivati FMOC, mentre nel secondo caso il miele millefiori è stato fortificato con la soluzione di materiali di riferimento sottoposti a derivatizzazione.

Sono stati analizzati cinque livelli di soluzioni di calibrazione dei tre analiti, in particolare a 3, 8, 13, 18 e 23 µg/kg. Gli estremi delle curve devono essere < LOQ e > LMR; il limite massimo di residui (LMR) del glifosato nel miele è 0.05 mg/kg.

La linearità ottenuta dall'analisi di regressione è stata considerata soddisfacente con un coefficiente di correlazione (R^2) superiore a 0,98 per entrambe le rette (Figura 9).

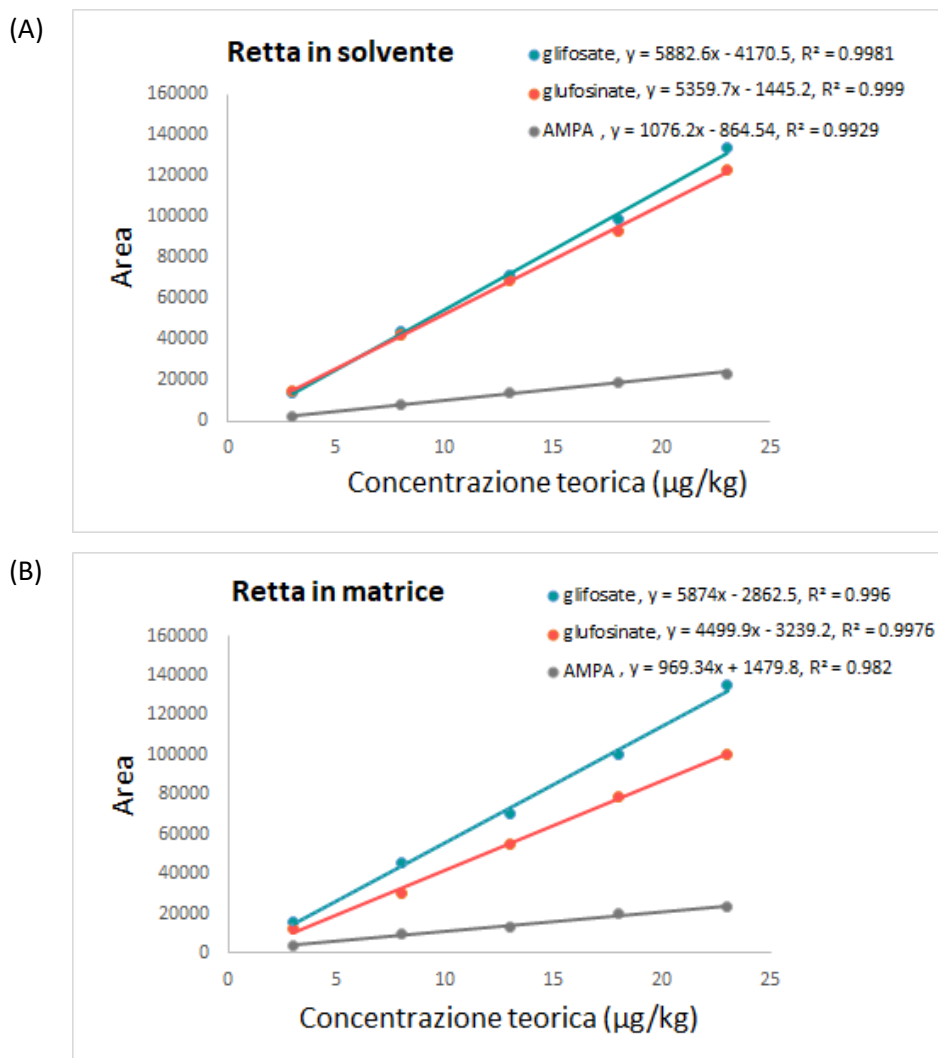


Figura 9. Rette di calibrazione e intervallo di linearità per glifosate, AMPA e glufosinate in solvente (A) e in matrice (B)

Inoltre, i residui (%) sono risultati < 20% in entrambi i casi.

Il "limite di quantificazione" (LOQ, *limit of quantification*) definito in questo metodo è uguale 10 µg/kg, ed indica la concentrazione più bassa che si può quantificare con sufficiente probabilità statistica, considerando i limiti strumentali.

I recuperi medi, la robustezza e la precisione sono stati verificati con 5 repliche di campione miele millefiori, sia a livello del LOQ (10 µg/kg) che a livello 5 x LOQ (50 µg/kg).

I recuperi [%] medi sono compresi tra il 70 - 120% e la Residual Standard Deviation (RSD_r) [%] risulta inferiore al 20%, considerando sia la retta di calibrazione in matrice che in solvente (Tabella 11).

Tabella 11. Risultati della validazione: Recuperi e precisione usando la retta in matrice e in solvente

Analita	Concentrazione (mg/kg)	Retta in matrice		Retta in solvente	
		Recuperi [%]	RSD [%]	Recuperi [%]	RSD [%]
Glifosate	0.01	91.86	6.62	91.73	6.62
	0.05	94.65	4.59	90.51	4.59
AMPA	0.01	100.25	13.72	90.30	13.72
	0.05	114.50	1.72	103.13	1.72
Glufosinate	0.01	105.15	8.07	88.28	8.07
	0.05	95.52	2.00	80.20	2.00

Per quanto riguarda “l’effetto matrice”, invece, dato il suo valore superiore al 20%, il metodo richiede l’utilizzo di uno standard interno o di una retta di calibrazione in matrice. A tal fine, nello studio di validazione si è considerato il miele maggiormente commercializzato e consumato in Italia, ovvero il miele millefiori, per elaborare la retta in matrice. Tuttavia, per effettuare ulteriori studi sugli “effetti matrice”, sono state prese in considerazione altre due tipologie di miele ampiamente commercializzati e totalmente diversi tra loro e dal precedente per caratteristiche fisiche e chimiche: l’acacia dal colore quasi trasparente e con una minore densità, e il castagno con un maggior contenuto di pigmenti scuri ed una consistenza più densa. Generalmente, quest’ultima categoria influenza maggiormente le prestazioni analitiche, generando una soppressione del segnale e un elevato “effetto matrice” (Paoletti et al., 2022).

4.3. Analisi dei campioni reali

Il metodo sviluppato è stato utilizzato per quantificare la quantità di glifosato, AMPA e glufosinato nel miele e valutarne l'applicabilità in campioni ambientali reali raccolti dal mercato locale. Questo ha permesso di convalidare e applicare il metodo utilizzando miele con diversa origine botanica di provenienza. Ogni campione è stato analizzato preparando rette di calibrazione in corrispondenza della matrice con la medesima appartenenza botanica (ad esempio millefiori, castagno o acacia) dei mieli analizzati.

Il glifosato è stato rilevato in oltre la metà dei campioni di miele con residui pressoché uguali o inferiori al LOQ di 10 µg/kg. Il glufosinate è stato ritrovato in una piccola percentuale di campioni (6 mieli testati) sempre a concentrazioni nell’intorno del LOQ. Il terzo analita, AMPA, non è mai stato trovato.

Nonostante la numerosità campionaria ridotta in questa sperimentazione, quindi non completamente rappresentativa della realtà, non può venir meno il confronto tra i risultati ottenuti dai campioni di miele analizzati in questo studio e quelli precedentemente riportati da altri gruppi di ricerca. Thompson et al. (2019) hanno sviluppato un metodo relativamente semplice con SPE online nel miele con LOQ di 1 µg/kg, tramite il quale hanno testato duecento campioni di miele. In nessuno dei campioni di miele testati dagli autori sono stati riscontrati residui di glifosato superiore al LMR (UE) di 50 µg/kg. Tuttavia, diversamente da

quanto emerso nella presente tesi, [Thompson et al. \(2019\)](#) hanno osservato residui di AMPA nel 99% dei campioni da loro analizzati (media 10.3 µg/kg con un massimo di 50.1 µg/kg).

[El Agrebi et al. \(2020\)](#) hanno condotto uno studio di monitoraggio nelle regioni del Belgio circa l'entità della contaminazione dei prodotti dell'apicoltura mediante residui di glifosato e AMPA. Sono state analizzate tre differenti matrici:

1. Pane d'api (100 campioni), polline impastato con miele e arricchito dagli enzimi salivari delle api lavoratrici per essere poi depositato nelle celle dei favi, dove è soggetto ad una fermentazione lattica e poi utilizzato per alimentare le larve nell'alveare. Qualora il polline fosse contaminato dai pesticidi, potrebbe rappresentare una matrice di contaminazione;
2. Cera d'api dei favi da nido (100 campioni), componente essenziale nell'alveare che potrebbe presentare residui di pesticidi tramite il diretto contatto con le api e le relative fonti alimentari contaminate;
3. Cera d'api proveniente dal melario (10 campioni) e i corrispondenti campioni di miele estratti dalla medesima struttura (10 campioni) per valutare un possibile trasferimento dalla cera al miele.

Nel pane d'api, il glifosato è stato trovato nel 91.4% di campioni con una media di 55.46 ng/g, mentre l'AMPA era presente nel 25.9% delle matrici con una media di 38.58 ng/g. Nella seconda tipologia di campioni, il glifosato è stato trovato per il 32% con un valore medio di 52.27 ng/g, mentre non sono stati ritrovati residui del suo metabolita. Infine, dalle 10 colonie d'api che mostravano le più alte concentrazioni di glifosato nella cera d'api dei favi, sono stati raccolti sia il miele che la cera dal melario. Solo 1 campione di cera era contaminato con residui di pesticida di 48 ng/g, mentre 2 campioni di miele sono risultati positivi. Hanno determinato la concentrazione di 11 ng/g nel primo, mentre nel secondo non è stata possibile la quantificazione essendo il valore < LOQ 10 ng/g.

La bassa contaminazione del melario e l'alta concentrazione di glifosato nei favi suggeriscono come la trasformazione chimico e fisica del nettare sia un elemento influente sul quantitativo di residui nel miele finale ([El Agrebi et al., 2020](#)).

Invece, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, [Gasparini et al. \(2020\)](#) hanno misurato residui a concentrazioni ben più elevate, vicino a LMR, in dieci campioni di miele locali con il metodo da loro sviluppato con LOQ 0.01 mg/kg.

Sono molteplici i fattori, però, che possono contribuire alle differenti concentrazioni ottenute nelle sperimentazioni. Diversità nella composizione chimica dei mieli così come condizioni di manipolazione/stoccaggio, tempi di applicazione dell'erbicida relativamente al periodo di foraggiamento delle api da miele e differenze nelle colture trattate sono solo alcune delle condizioni che contribuiscono alla quantità di glifosato e alla sua degradazione nel prodotto AMPA. Risulta, quindi, ancora complicato stabilire una tendenza relativa alla quantità di residui nel miele ([Thompson et al., 2019](#)).

Ad ogni modo, per quanto riguarda i valori rilevati nel presente studio, pur considerando una bassa numerosità campionaria, sono state osservate basse concentrazioni di glifosato, ampiamente all'interno delle tolleranze applicabili nell'UE. Considerando anche i dati riportati negli altri studi, si mette alla luce la sicurezza del prodotto alimentare “miele” per i consumatori grazie a residui di pesticida molto bassi.

L'applicazione del metodo è stata, inoltre, testata anche nel campione di miele inerente al “Proficiency Test EUPT-SRM18 (2023)” dell'Unione Europea. Nel [Report preliminare](#) (rilasciato il 10 luglio 2023), in corrispondenza del codice assegnato al nostro laboratorio di appartenenza, è possibile osservare il risultato rispetto al valore reale definiti dai EURL-SRM (Tabella 12).

Tabella 12. Risultati riportati dalla partecipazione a “EUPT-SRM18”³

Lab Code	Cat	Analyte	pr. AV (mg/kg)	Prel. CV*	Conc. (mg/kg)	prel. z score	prel. AAZ
43	B	2,4-D (free acid)	0.0523	18.9%	0.0441	-0.6	
		Glyphosate	0.102	12.8%	0.127	1.0	

La prestazione viene considerata discutibile o inaccettabile in caso di z-score > 2, inclusi falsi negativi o falsi positivi. Considerando il nostro risultato, si evince un z-score uguale a 1.0. La discrepanza tra il dato reale e quello da noi riportato, è giustificato dalla quantificazione di glifosato non perfettamente in linea con la rispettiva curva di calibrazione.

In un secondo momento, il “Ring Test” è stato ripetuto nuovamente come prova non più ufficiale all'interno del laboratorio. Per valutare la riproducibilità e la robustezza del metodo la misurazione è stata eseguita da un operatore diverso, oltre che in tempi differenti rispetto alla prova precedente. La concentrazione di glifosato è risultata uguale a 0.105 mg/kg (dato non riportato in tabella), molto vicino al valore reale riportato dai EURL-SRM.

Una considerazione chiave durante lo sviluppo di questo metodo è stata sin da subito l'utilizzo di una retta di calibrazione in matrice, in accordo con i risultati ME > 20% ottenuti dalle prove di laboratorio. Come suggerito dalla [SANTE/11312/2021](#), però, l'intervento migliore per compensare gli effetti matrice è

-
- ³ **Cat:** categorizzazione dei laboratori in base all'ambito. Cat A è stata assegnata a laboratori che hanno analizzato e trovato correttamente almeno 9 su 10 gli analiti obbligatori presenti nel campione e hanno analizzato almeno 13 dei 15 analiti obbligatori elencati nell'elenco dei pesticidi target. Inoltre, non hanno riportato risultati falsi positivi relativamente agli analiti obbligatori;
 - **pr. AV: Prelim. Assigned Value [mg/kg]:** valore preliminare assegnato;
 - **CV:** coefficiente di variazione preliminare tra il valore rilevato con il metodo sviluppato e il valore reale di riferimento;
 - **Conc. [mg/kg]:** concentrazione di analita dal nostro laboratorio partecipante;
 - **prel. z score:** è il rapporto tra la deviazione del laboratorio dal valore medio dei dati impostati sulla deviazione standard all'interno dell'insieme di dati;
 - **prel. AAZ:** media preliminare dei punteggi z assoluti degli analiti obbligatori per 5 o più risultati.

l'utilizzo di uno standard interno. Per motivi di tempistiche stringenti, si sono effettuate solo prove preliminari con l'utilizzo dello standard interno PESTANAL™ Glyphosate-2-¹³C,¹⁵N (99%) della Supelco® (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) mediante il quale è stato possibile la costruzione di opportune rette di calibrazione per determinare la concentrazione degli analiti. Nonostante la somiglianza nelle caratteristiche chimico-fisiche di glifosate, AMPA e glufosinate, è subito risultato come sia, invece, necessario l'utilizzo di standard interni specifici per ogni analita per ottenere buone performance nell'analisi quantitativa.

Per una migliore quantificazione, inoltre, è suggerito svolgere ulteriori prove cromatografiche per minimizzare l'allargamento dei picchi il più possibile, riducendo il fenomeno di tailing per avvicinarsi sempre di più alla forma ideale della curva gaussiana. Questo potrebbe migliorare ulteriormente anche la separazione nello spettro cromatografico del picco del glifosato e del suo interferente.

Per avvalorare maggiormente la robustezza e la riproducibilità del metodo, sarebbe interessante svolgere aggiuntive prove inter-laboratorio (Proficiency Test). Non da meno, avere la possibilità di ampliare l'indagine ad un numero di campioni più rappresentativo, includendo anche campioni extra-UE, e permettere quindi la realizzazione di un'analisi statistica come risultato di un programma di monitoraggio ambientale consistente.

Sarebbe auspicabile che ulteriori ricerche future sondassero l'esistenza di residui non solo del metabolita principale del glifosato (acido amminometil fosfonico), ma anche l'N-acetil-glifosate, che per motivi tecnico-analitici non è stato più preso in considerazione nella ricerca. Lo studio potrebbe, al contempo, essere esteso ai metaboliti stessi del glufosinate, acido 3-(idrossimetilfosfonil)propionico (MPP) e N-acetil-glufosinate (NAG).

5. CONCLUSIONI

Nella presente Tesi di Laurea è stato sviluppato un metodo relativamente semplice per la determinazione dei residui di glifosato, AMPA e glufosinato nel miele con un LOQ di 10 µg/kg per ciascun analita. In particolare, il presente lavoro descrive lo sviluppo di un metodo di derivatizzazione con l'agente FMOC-Cl e basato su UHPLC-MSMS per la quantificazione di glifosato e AMPA in campioni di miele. L'approccio proposto mostra diverse differenze e vantaggi rispetto ad altri metodi disponibili ed ogni passo del metodo è stato ottimizzato per consentire l'analisi più sensibile e affidabile degli analiti con le strumentazioni analitiche a disposizione. È prevista una fase iniziale di estrazione, seguita dalla derivatizzazione, al cui termine è necessaria una fase di purificazione con la tecnica SPE per una pulizia sostanziale dei componenti della matrice al fine di minimizzare la possibilità di contaminazione dello spettrometro di massa.

La prestazione del metodo analitico e la correttezza della scelta e dell'ottimizzazione di ogni fase dell'analisi sono state convalidate grazie alla partecipazione al circuito d'analisi *Ring Test* proposto da EURL-SRM, portato a termine con risultati soddisfacenti. Il metodo è stato, inoltre, applicato a cinquantadue campioni reali provenienti dal mercato e da apicoltori locali, ai fini di effettuare uno studio preliminare sulla presenza di tali inquinanti nel miele consumato a livello locale. I primi dati esplorativi, seppure in numero limitato, hanno mostrato una frequenza a basse concentrazioni di glifosato, AMPA e glufosinato. Le successive applicazioni di questo metodo nella pratica forniranno risultati più affidabili circa l'esposizione delle api ai residui di glifosato, ad oggi al centro del dibattito per il suo potere cancerogeno. Alla luce delle discrepanze a livello legislativo sul suo consenso o meno, l'analisi dei residui del miele potrebbe essere uno strumento valido per monitorare possibili contaminazioni soprattutto in aree vocate all'agricoltura intensiva.

6. BIBLIOGRAFIA

- Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Sante 11312/2021. (disponibile online: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf ; accesso in luglio 2023).
- Anastassiades, M., Kolberg, D. I., Benkenstein, A., Eichhorn, E., Zechmann, S., Mack, D., ... & Barth, A. (2015). Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPe-method). *EU reference laboratory for pesticides requiring single residue methods (EURL-SRM)*. CVUA, Stuttgart, Germany.
- Bianco, P.M., Jacomini, C. (2016). Effetti del Glifosate sulla qualità ambientale e sugli organismi viventi. Technical report of PI® PURE SRL.
- Borggaard, O. K., & Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64, 441-456.
- Campanale, C., Triozzi, M., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2022). Development of a UHPLC-MS/MS method to enhance the detection of Glyphosate, AMPA and Glufosinate at sub-microgram/L levels in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1672, 463028.
- DECRETO 9 agosto 2016 del Ministero della Salute Revoca di autorizzazioni all'immissione in commercio e modifica delle condizioni d'impiego di prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva «glifosate», in attuazione del regolamento di esecuzione (UE) 2016/1313 della Commissione del 1° agosto 2016.
- DECRETO LEGISLATIVO 21 maggio 2004, n.179: Attuazione della direttiva 2001/110/CE concernente la produzione e la commercializzazione del miele.
- Demonte, L. D., Michlig, N., Gaggiotti, M., Adam, C. G., Beldoménico, H. R., & Repetti, M. R. (2018). Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Science of the Total Environment*, 645, 34-43.
- Dill, G. M., Sammons, R. D., Feng, P. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., ... & Haupfear, E. A. (2010). Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management*, 1-33.
- Direttiva 2009/128/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi.
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64, 319-325.
- El Agrebi, N., Tosi, S., Wilmart, O., Scippo, M. L., de Graaf, D. C., & Saegerman, C. (2020). Honeybee and consumer's exposure and risk characterisation to glyphosate-based herbicide (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. *Science of the Total Environment*, 704, 135312.
- EU PROFICIENCY TEST EUPT-SRM18, 2023, Residues of Pesticides Requiring Single Residue Methods Test Item: Honey Preliminary Report, (disponibile online: https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl/article.asp?LabID=200&CntID=1237&Theme_ID=1&Pdf=False&Lang=EN ; accesso in: agosto 2023).
- EUROPEE, C. D. C. (2002). Verso una strategia tematica per la protezione del suolo, 179. *Bruxelles, COM*.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2018, Why bees matter - The importance of bees and other pollinators for food and agriculture, 16 p (disponibile online: <https://www.fao.org/publications/card/en/c/I9527EN/> ; accesso in luglio 2023).

- Mutinelli, F., Manzinello, C., Dainese, N., Giuliano, I., Martinello, M., Barzon, L., Gallina, A. (2021). Il progetto CERAPI 2018 e 2020 nella regione del Veneto (I a parte), 5 p (disponibile nella rivista "l'APIcoltore italiano" n.3 - Aprile).
- Gasparini, M., Angelone, B., & Ferretti, E. (2020). Glyphosate and other highly polar pesticides in fruit, vegetables and honey using ion chromatography coupled with high resolution mass spectrometry: Method validation and its applicability in an official laboratory. *Journal of Mass Spectrometry*, 55, e4624.
- Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental chemistry letters*, 16, 401-426.
- Giovanni Mattalia, Francesca Roberti, Michele de Martino, Clara Ventre, Ministero della Salute, 2022, Piano Nazionale per la ricerca dei Residui (PNR) - Risultati anno 2021, 40 (disponibile online: [p> Piano nazionale per la ricerca dei residui \(PNR\) - Risultati anno 2021 </p>](https://salute.gov.it) (salute.gov.it) ; accesso in luglio 2023).
- Herbert, L. T., Vázquez, D. E., Arenas, A., & Farina, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of experimental biology*, 217, 3457-3464.
- Ledoux, M. L., Hettiarachchy, N., Yu, X., Howard, L., & Lee, S. O. (2020). Penetration of glyphosate into the food supply and the incidental impact on the honey supply and bees. *Food Control*, 109, 106859.
- Małysiak, M., & Kiljanek, T. (2022). Method of Glyphosate, AMPA, and Glufosinate Ammonium Determination in Beebread by Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry after Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction. *Molecules*, 27, 5741.
- Mengoni Goñalons, C., & Farina, W. M. (2018). Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *Journal of Experimental Biology*, 221, jeb176644.
- Oulkar, D. P., Hingmire, S., Goon, A., Jadhav, M., Ugare, B., Thekkumpurath, A. S., & Banerjee, K. (2017). Optimization and validation of a residue analysis method for glyphosate, glufosinate, and their metabolites in plant matrixes by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 100, 631-639.
- Paoletti, F., Sdogati, S., Barola, C., Giusepponi, D., Moretti, S., & Galarini, R. (2022). Two-procedure approach for multiclass determination of 64 antibiotics in honey using liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Food Control*, 136, 108893.
- Peillex, C., & Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, 17, 163-174.
- Porrini, C., Sabatini, A. G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., ... & Celli, G. (2003). Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 38, 63-70.
- Rampazzo, G., Gazzotti, T., Zironi, E., & Pagliuca, G. (2023). Glyphosate and Glufosinate Residues in Honey and Other Hive Products. *Foods*, 12, 1155.
- Regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE.
- Regolamento (UE) 2016/1002 della Commissione, del 17 giugno 2016, che modifica gli allegati II, III e V del regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di AMTT, diquat, dodina, glufosinato e tritosulfuron in o su determinati prodotti.
- REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2022/741 DELLA COMMISSIONE del 13 maggio 2022 relativo a un programma coordinato di controllo pluriennale dell'Unione per il 2023, il 2024 e il 2025, destinato a garantire il rispetto dei livelli massimi di residui di antiparassitari e a valutare l'esposizione dei

consumatori ai residui di antiparassitari nei e sui prodotti alimentari di origine vegetale e animale e che abroga il regolamento di esecuzione (UE) 2021/601.

Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006.

Regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 febbraio 2005, concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio.

REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2017/2324 DELLA COMMISSIONE relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE del 12 dicembre 2017 che rinnova l'approvazione della sostanza attiva glifosato, in conformità al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari, e che modifica l'allegato del regolamento di esecuzione (UE) n. 540/2011 della Commissione.

Thompson, H. M., Levine, S. L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P., & von Mérey, G. (2014). Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integrated environmental assessment and management*, 10, 463-470.

Thompson, T. S., van den Heever, J. P., & Limanowka, R. E. (2019). Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36, 434-446.

Van Bruggen, A. H., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris Jr, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the total environment*, 616, 255-268.

Veneto Agricoltura, 2015, I prodotti fitosanitari, 28 (disponibile online: <https://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/GUIDA%20PRODOTTI%20FITOSANITARI%20ED.2015/Capitolo%203.pdf> ; accesso in luglio 2023).

7. SITOGRAFIA

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm> (accesso in agosto 2023)

<https://echa.europa.eu/sl/-/glyphosate-not-classified-as-a-carcinogen-by-echa> (accesso in febbraio 2023)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3496> (accesso in febbraio 2023)

<https://www.agroscope.admin.ch/agroscope/it/home/temi/animali-reddito/api/bienenprodukte.html>

(accesso in luglio 2023)

<https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/corretta-informazione/vero-glifosato-un-erbicida-diffuso-mondo-cancerogeno> (accesso in febbraio 2023)

<https://www.cropscience.bayer.it/landing-page/roundup> (accesso in aprile 2023)

<https://www.efsa.europa.eu/it/press/news/151112> (accesso in maggio 2023)

<https://www.glyphosate.eu/it/informazioni-utili/agricoltura-sostenibile/glyphosate-enables-no-tillage-farming/> (accesso in maggio 2023)

<https://www.isprambiente.gov.it/it/attivita/biodiversita/notizie/il-ruolo-delle-api-per-l2019uomo-e-l2019ambiente> (accesso in giugno 2023)

<https://www.mpi.govt.nz/agriculture/plant-products-requirements-and-pesticide-levels/pesticide-maximum-residue-levels-mrls-for-plant-based-food-for-nz-and-other-countries/pesticide-maximum-residue-level-legislation-around-the-world/> (accesso in maggio 2023)

<https://www.informamiele.it/wp-content/uploads/2018/07/Effetti-del-Glifosate-sulla-qualita%CC%80-ambientale-e-gli-organismi-viventi.pdf> (accesso in giugno 2023)