Indice

Sommario **v**

1 Introduzione **1**
1.1 L'importanza delle api 1
1.2 La sindrome da spopolamento degli alveari 3
1.3 Gli insetticidi neonicotinoidi 6
1.3.1 Modalità d'impiego e giro d'affari 6
1.3.2 Storia e caratteristiche dei neonicotinoidi 7
1.3.3 Normativa 10
1.3.4 Inquinamento ambientale da insetticidi 10
1.4 Effetti sulle api 12
1.4.1 Le dosi sub-letali 12
1.4.2 Modalità di intossicazione acuta 13
1.5 Scopo della tesi 15

2 Materiali e metodi **17**
2.1 Sistema Cromatografico UHPLC 17
2.2 Microscopio elettronico a scansione (SEM) 18
2.3 Strumentazioni e attrezzature di laboratorio 18
2.4 Reagenti e principi attivi impiegati 19
2.5 Sementi utilizzate 19
2.6 Sistema per la produzione di particolato 20
2.7 Procedure sperimentali 21
2.7.1 Campionamento delle polveri 21
2.7.2 Distribuzione dimensionale del particolato 22
2.7.3 Valutazione della DL_{50} per le api 23
2.7.4 Procedura di estrazione degli analiti 25

2.7.5 Preparazione di soluzioni standard ad elevata concentrazione dei diversi principi attivi 25
2.7.6 Preparazione di soluzioni standard per la calibrazione strumentale 26
2.7.7 Procedura di analisi UHPLC-DAD 26

3 Risultati e discussione **29**
3.1 Ottimizzazione del metodo analitico 29
3.2 Caratteristiche dei sistemi per la produzione di particolato 32
3.2.1 Sistema 1 32
3.2.2 Sistema 2 34
3.2.3 Sistema 3 34
3.3 Ottimizzazione delle condizioni di lavoro 38
3.3.1 Flusso di aspirazione dell'aria 38
3.3.2 Numero di semi introdotti nel sistema 39
3.4 Concentrazione di insetticida lungo la linea di esposizione 40
3.5 Dimensioni del particolato 41
3.6 Esposizione delle api al particolato 44
3.6.1 Flusso d'aspirazione dell'aria 44
3.6.2 Concentrazione delle polveri 44
3.6.3 Tempo di esposizione delle api 46
3.6.4 Numero di api esposte contemporaneamente 46
3.6.5 Condizioni finali utilizzate 48
3.7 Determinazione della DL_{50} 51

4 Conclusioni **57**

Appendice **61**
A Analisi del Methiocarb e dei suoi metaboliti 61
B Utilizzo del metodo Probit per la determinazione della DL_{50} 66
C Meccanismo d'azione degli insetticidi neonicotinoidi 70

Bibliografia **73**

Sommario

Gli insetticidi neonicotinoidi, introdotti nel mercato negli anni '90, hanno riscosso un notevole successo e vengono ancora oggi largamente utilizzati per diversi tipi di coltivazioni. Nel 2008 però l'uso di alcuni di questi prodotti è stato vietato in Italia a seguito di un decreto ministeriale, allo scopo di proteggere gli insetti non target dagli effetti nocivi di questi fitofarmaci. Il provvedimento si era reso necessario dato che in Italia, come in molte altre parti del mondo, si era registrato un indebolimento del patrimonio apistico, tanto da coniare il termine *sindrome da spopolamento degli alveari*.
Dal 1/12/2013 è entrata in vigore anche una sospensiva europea che vieta l'utilizzo di questi insetticidi su tutto il territorio dell'Unione. Questa norma ha però carattere provvisorio in attesa di ulteriori dati, che permettano di comprendere meglio come il declino del patrimonio apistico sia collegato all'uso degli insetticidi neonicotinoidi. Lo scenario attuale richiede quindi di continuare lo studio sui principi attivi oggetto della sospensione e di ampliarlo ai nuovi prodotti che li hanno sostituiti sul mercato.
Oltre alle consuete modalità di utilizzo (spray e granuli per il trattamento del terreno), gli insetticidi oggetto della sospensiva vengono applicati direttamente sul seme attraverso la concia e vedono il loro principale utilizzo nella coltivazione del mais, una coltura molto estesa in tutto il territorio europeo. Altre sementi conciate con neonicotinoidi sono colza, girasole, soia e barbabietola.
Per la semina di queste colture vengono utilizzate delle seminatrici pneumatiche che rilasciano in atmosfera un'elevata quantità di polvere, originata dall'erosione del materiale di concia. Questo particolato contiene l'insetticida e ricadendo al suolo causa la contaminazione della vegetazione limitrofa ai terreni coltivati. Inoltre le polveri sospese possono causa-

re l'impolveramento in volo delle api, se queste si trovassero a volare in prossimità della seminatrice durante le operazioni di semina, provocando un'intossicazione di tipo acuto.
In esperimenti precedenti è già stata valutata la quantità di insetticida raccolta dall'ape durante il passaggio in volo. Si è visto che le dosi di fitofarmaco sperimentate dall'ape sono molto alte e sufficienti per causarne la morte.
In letteratura sono presenti numerosi studi riguardanti la tossicità acuta di questi insetticidi. Tuttavia pochi fanno riferimento alle reali condizioni espositive che si realizzano in campo e nessuno ha finora quantificato la tossicità acuta per le api del "particolato da semina".
Per poter approfondire le indagini riguardanti l'impolveramento in volo delle api ed i suoi effetti tossici, si è studiato un sistema in grado di produrre delle polveri simili a quelle emesse dalla seminatrice, ma col vantaggio di poter lavorare in laboratorio. L'obbiettivo era di produrre un flusso d'aria contenente una concentrazione di insetticida nota e costante, che consentisse la sperimentazione *in vivo* sulle api. Una volta standardizzato il funzionamento di questo sistema lo si è potuto utilizzare per quantificare la tossicità di due diversi insetticidi nella particolare condizione dell'impolveramento in volo.
Inoltre, mediante questo dispositivo si potranno confrontare gli effetti di semi conciati con diversi insetticidi e studiare quali parametri influiscono sulla tossicità di queste polveri per le api (ad esempio: diverse condizioni di umidità atmosferica o di temperatura).

Abstract

Neonicotinoid pesticides were introduced in the 90s as product for crop treatment. They have been highly successful and are still widely used for many different crops. In 2008 the use of some of these products have been banned in Italy, to protect non-target insects (bees, in particular) from the toxic effects of these pesticides. This action was necessary because in Italy, and worldwide as well, beekeepers have reported severe colony loss in the period of corn sowing.
In December 2013 an European Regulation banned for two years the use of these pesticides in the whole territory of the European Union. In this period will be necessary to collect further data to better understand how the decline of honey bees is related to the use of neonicotinoid pesticides. Therefore is very important to continue the study on the active ingredients subject to the suspension and to extend it to new products that have replaced them.
There are many way of use the neonicotinoids: spray, granular for soil treatment and seed coating. Their main use is for the seed coating of corn, a crop widespread throughout the European territory. Other seeds treated with neonicotinoids are rapeseed, sunflower, soybean and sugar beet.
The drilling machines used for the sowing, release in the atmosphere large amount of particulate matter, originated from the abrasion of seeds coating. These particles contain the pesticide that causes the contamination of vegetation near to farmland. Furthermore, it causes the acute toxication of flying bees approaching the drilling machines.
Some previous experiments have already determinated the amount of insecticide collected by the bees in flight. The doses of pesticide are very high and could cause death of the insects.
In the literature there are many studies on the acute toxicity of these pes-

ticides. However, only few works consider the real exposure conditions that take place in the field. Moreover, so far, no study has yet quantified the acute toxicity toward bees of the particulate matter emitted by the drilling machines.

In order to investigate this toxic effects, we have optimezed a laboratory device for the production of particulate matter which reproduce that emitted by the drilling machine. The aim was the production of an air stream containing a precise and stable concentration of neonicotinoid, for the controlled expousere of bees and the conseguent *in vivo* experimentation. After the standardization of this system, it has been used to quantify the toxicity of two different insecticides used in the corn seed coating.

By this device it will be possible to compare the effects of different pesticides used for seed coating and to study the parameters that influence the toxicity of these powders (for example: different conditions of atmospheric humidity or temperature).

Capitolo 1

Introduzione

1.1 L'importanza delle api

L'*Apis mellifera* venne allevata dall'uomo fin dall'antichità per la produzione di miele, polline, cera, propoli e pappa reale. Ancora oggi l'apicoltura è praticata in tutto il mondo con oltre $72,6$ milioni di alveari, di cui $15,5$ milioni in Europa, secondo dati FAO. L'*Apis Mellifera* ha quindi in prima analisi un valore economico derivante dalla vendita dei prodotti apistici, che trovano applicazione in svariati campi, date le loro buone qualità nutrizionali e mediche. Il valore economico stimato derivante dalla vendita del solo miele nel 2007 è stato di $1,25$ miliardi di dollari.

Ancora più importante risulta la funzione ambientale svolta dalle api per quanto riguarda il mantenimento delle specie vegetali e della biodiversità, azione compiuta inconsapevolmente tramite l'impollinazione. Molte piante sfruttano infatti un'impollinazione di tipo entomofila e necessitano di insetti per veicolare il polline e garantire il mantenimento della specie. Le api svolgono quindi un'importante funzione per la diffusione delle piante selvatiche e spontanee, ma il loro prezioso lavoro viene sfruttato anche in agricoltura per favorire l'impollinazione ed aumentare la produttività delle coltivazioni. Si calcola che 52 delle 115 principali fonti di cibo derivanti dall'agricoltura dipendano dall'impollinazione delle api e la loro mancanza provocherebbe un calo significativo nella produzione di queste materie prime. Globalmente il valore economico derivante dall'impollinazione delle api è stimato essere di 212 miliardi di dollari, che

Figura 1.1: *Apis mellifera* durante la raccolta del polline.

rappresenta il $9,5\%$ del mercato agricolo mondiale.[1]
Le api non sono gli unici insetti impollinatori, ma in situazione di coltura intensiva risultano essere i più importanti, poichè l'uso di fitofarmaci causa la riduzione della vegetazione spontanea e delle specie pronube. Questa è una situazione molto comune in caso di mono-coltura estesa, dove spesso si sopperisce a questa mancanza portando alveari in prossimità dei terreni coltivati. L'ape ha inoltre delle ottime caratteristiche come insetto impollinatore, tra le quali: un vasto raggio d'azione, un grande numero di api bottinatrici per alveare e la capacità di comunicare la posizione delle fonti di cibo. La mancanza del prezioso lavoro di questi insetti o un calo della loro disponibilità avrebbero ripercussioni negative su tutto il comparto agricolo, con un conseguente aumento dei costi di produzione delle materie prime. Negli USA, dove il calo del patrimonio apistico è stato particolarmente acuto, si stanno già sperimentando alcune ripercussioni negative sulla produzione di prodotti apistici. Inoltre l'aumento del costo degli alveari noleggiati per l'impollinazione comincia a risentirsi su tutta la filiera, con un aumento del costo del prodotto finale, come si sta sperimentando per le mandorle in California.[2]
L'ape risulta importante anche come bio-indicatore dell'inquinamento ambientale. Infatti le sue buone capacità di esplorazione del territorio per la raccolta del cibo (nettare e polline) e di acqua per il suo sostentamento idrico, la espongono a possibili rischi derivanti dal contatto con eventuali sostanze tossiche presenti sul territorio. Un cattivo stato di salute di un alveare viene facilmente individuato dall'apicoltore e può indicare la presenza di inquinanti in una zona circoscritta.

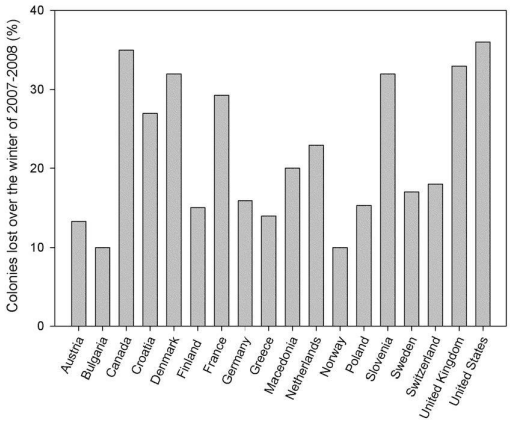


Figura 1.2: Percentuale di perdita invernale degli alveari tra il 2007 e il 2008 in vari paesi europei e negli USA.[1]

1.2 La sindrome da spopolamento degli alveari

Questo termine è stato coniato per descrivere il fenomeno di moria osservato per la prima volta circa 10 anni fa negli USA (in inglese *Colony Collapse Disorder*). Sebbene i primi report di CCD risalgano al 2003, i fenomeni più gravi di moria sono avvenuti tra il 2006 e il 2007, causando la perdita di circa un terzo del patrimonio apistico americano, con alcuni apicoltori che hanno riportato perdite anche del 80% o 100%. Questo fenomeno è stato particolarmente grave, ma un calo nella popolazione apistica era già in corso negli anni precedenti: dal 1947 al 2008 si era passati da $5,9$ a $2,3$ milioni di colonie presenti negli USA.
Anche in Europa a partire dagli anni '70 si è registrato un calo nella popolazione apistica, accentuatosi dopo gli anni '90 e portando da 21 a $15,5$ milioni di colonie registrate nel 2008.[1][3] In alcuni paesi europei (Francia, Germania, Svizzera, Slovenia e Italia), a seguito di eclatanti casi di moria avvenuti nel 2006-2007, si sono presi i primi provvedimenti legislativi atti a limitare l'uso degli insetticidi neonicotinoidi. Inoltre sono stati avviati dei programmi per monitorare lo stato di salute delle api come APENET in Italia e il German Honey Bee Monitoring Program in Germania.

Le sintomatologie del CCD osservato negli USA sono:[3]

- scomparsa improvvisa di un numero elevato di api operaie adulte
- covata opercolata con bassa presenza d'infestazioni di *Varroa*
- riduzione dei membri dell'alveare a poche api vive, con o senza regina
- l'abbandono di polline e miele nell'alveare, non soggetto a saccheggio
- la regina che depone circondata da un piccolo numero di nutrici
- la ritardata invasione dei parassiti dell'alveare

I fenomeni di mortalità avvenuti in Europa si differenziano da quelli osservati negli USA e sono caratterizzati da:

- presenza di numerose api adulte morte all'interno e all'esterno dell'alveare
- colonia spopolata con covata malata, deforme e incapace di completare la metamorfosi
- arnie completamente svuotate dalle api e assenza di scorte di polline e miele

Nonostante le numerose ricerche e l'ingente investimento economico le cause di questi fenomeni di moria rimangono ancora solo a livello di ipotesi. Questa difficoltà può essere implicata alla complessità del fenomeno, che sembra essere legato a diversi fattori in grado di intaccare lo stato di salute delle api.

L'attacco da parte di parassiti come *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, *Varroa jacobsoni* e *Varroa destructor* è molto comune negli alveari. Questi sono responsabili di un'elevata mortalità nei periodi di fine autunno e inverno, che può provocare la scomparsa dell'intera colonia in pochi anni. Per difenderla da questi attacchi si devono effettuare frequenti ispezioni dell'alveare e trattamenti con prodotti antiparassitari, divenuti essenziali per garantirne la sopravvivenza.[4]

Sono possibili anche infezioni virali, batteriche o fungine. Tra i virus sono particolarmente rilevanti il Deformed Wing Virus (DWV) e l'Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) correlati con le morie invernali dal German Bee Monitoring Program. Il Kashmir Bee Virus (KBV) invece risulta molto attivo negli USA e l'Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) è risultato fortemente correlato alla *Sindrome da spopolamento degli alveari.*[5] Inoltre la trasmissione di questi virus può essere mediata dalla *Varroa*, in grado di trasmettere una carica virale maggiore, con gravi conseguenze per la sopravvivenza dell'alveare[6].

Figura 1.3: Api morte ritrovate presso gli alveari

Altri fattori di mortalità possono essere la mancanza di diversità genetica, con il conseguente indebolimento della colonia, o uno stress di tipo gestionale derivante dall'utilizzo delle api come impollinatori e a fini produttivi.

L'avvelenamento da insetticidi è considerato uno dei fattori associabili, soprattutto nell'ultimo decennio, alla progressiva riduzione del patrimonio apistico. Questi insetti sono infatti continuamente a contatto con queste sostanze tossiche, sempre più utilizzate in ambito agricolo o anche per disinfestazioni di tipo municipale. Inoltre in tale contesto sono possibili anche casi di contaminazione acuta (vedi paragrafo 1.4.2), durante i quali le api sono esposte a dosi particolarmente elevate di insetticidi.

Tutti questi fattori possono agire in modo sinergico nel compromettere lo stato di salute delle api e concorrere insieme allo spopolamento degli alveari. Ad esempio gli insetticidi possono risultare maggiormente tossici per api già indebolite da parassiti o virus. Va tuttavia sottolineato che le morie improvvise manifestatesi in Europa a partire dagli anni 2002-2003, caratterizzate dall'improvvisa moria delle api bottinatrici (particolarmente gravi in Italia nel 2006-2008), sono ben identificabili come fenomeni di intossicazione acuta conseguente all'esposizione ad elevate dosi di insetticidi neonicotinoidi.

Sfortunatamente nella primavera del 2014 il fenomeno della moria delle api si è ripresentato in Veneto, Friuli e Lombardia, dato interessante perchè verificatosi in presenza di un provvedimento europeo di sospensione dei prodotti fitosanitari ritenuti più pericolosi per le api. Tutte le numerose segnalazioni pervenute sembrano riguardare casi di moria concomitanti con la semina del mais, come avvenuto in passato. Le cause

di questi nuovi episodi di elevata mortalità non sono ancora chiare, ma se dovessero essere ascrivibili all'uso di fitofarmaci si dovrebbe pensare che siano stati comunque utilizzati prodotti attualmente vietati o che i nuovi insetticidi utilizzati nella concia delle sementi siano altrettanto tossici per le api.
Questo episodio è la conferma che il problema della moria delle api è lontano dall'essere risolto. É quindi necessario continuare gli studi sulla pericolosità dei prodotti fitosanitari per le api ed in particolare sui meccanismi di esposizione e contaminazione delle api agli insetticidi in apicoltura.

1.3 Gli insetticidi neonicotinoidi

1.3.1 Modalità d'impiego e giro d'affari

Gli insetticidi neonicotinoidi, introdotti nel mercato nel 1990, hanno riscosso un notevole successo e attualmente sono tra i prodotti fitosanitari più utilizzati al mondo. La principale caratteristica di questi insetticidi è quella di essere sistemici. Questo significa che sono in grado di entrare nel sistema linfatico della pianta e diffondersi al suo interno, proteggendola così da possibili attacchi di agenti patogeni. Inoltre garantiscono una protezione persistente, in quanto il principio attivo può rimanere nella pianta anche per l'intero mese successivo al trattamento.
Sono inoltre molto flessibili nelle modalità di utilizzo ed esistono infatti diversi metodi di somministrazione, che dipendono dalle caratteristiche di sistemicità del principio attivo: spray, applicazione diretta nel suolo e concia delle sementi. La tecnica della concia prevede di ricoprire il seme con una pellicola contenente il principio attivo (circa 1 $mg/seme$), che sarà poi in grado di diffondere su tutta la pianta. Questa particolare tecnica è stata inizialmente utilizzata per il mais ed ora si è estesa ad altre sementi come colza, girasole, soia e barbabietola. Questi fitofarmaci vengono impiegati per proteggere le colture da parassiti quali la diabrotica, larve e afidi.
Negli anni '90 il mercato dei prodotti fitosanitari era dominato da carbammati, organofosfati e piretroidi. Attualmente gli insetticidi più utilizzati sono i neonicotinoidi, che nel 2010 sono arrivati a conquistare il 27 % del mercato, pari a circa $2,63$ miliardi di dollari. L'Imidacloprid

Figura 1.4: Semi di mais ricoperti con una pellicola di concia contenente l'insetticida

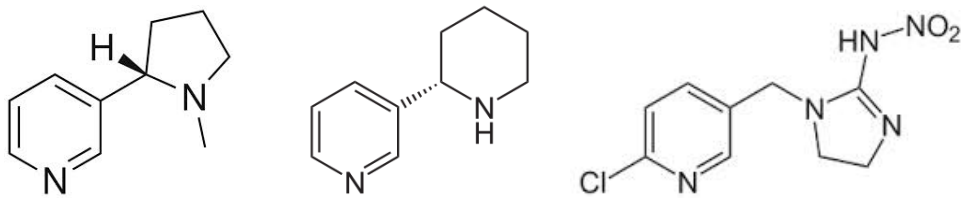
è stato l'insetticida più venduto al mondo nel 2008 ed il suo utilizzo è stato registrato per 140 diversi tipi di colture in 120 paesi. Più recentemente l'Imidacloprid è stato rimpiazzato in molte parti del mondo dal Thiamethoxam e dal Clothianidin (tutti e tre appartenenti alla classe dei neonicotinoidi). Nel 2011 nei soli USA si stima siano state utilizzate 818 tonnellate di Clothianidin, di cui il 95% nella coltivazione del mais.[7] L'utilizzo maggiore che viene fatto di questi insetticidi è come prodotti per la concia delle sementi, un mercato in enorme crescita, che sta ormai raggiungendo il valore di un miliardo di euro, di cui il 93% in peso è relativo ai principi attivi neonicotinoidi.[8] É evidente che le ditte produttrici hanno enormi interessi riguardanti le possibilità di utilizzo di questi prodotti fitosanitari.

1.3.2 Storia e caratteristiche dei neonicotinoidi

La nicotina e la neonicotina sono degli insetticidi naturali che possono essere estratti dalla pianta del tabacco e già nel 1690 la nicotina veniva usata come aficida. Questi prodotti di origine naturale hanno però uno spettro di applicazione troppo basso per garantire uno sviluppo di tipo commerciale.

A partire dalla loro struttura sono stati sintetizzati i moderni neonicotinoidi, dopo essersi accorti che alcuni derivati di nicotina e neonicotina avevano un'inaspettata efficacia come insetticidi. Il primo di questi composti ad entrare in commercio è stato l'Imidacloprid nel 1991. Questi insetticidi svolgono un'azione neurotossica nei confronti degli insetti parassiti, agendo sul recettore dell'acetilcolina (vedi Appendice C).

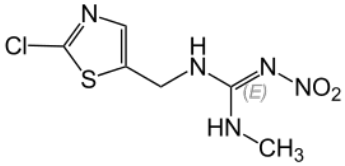
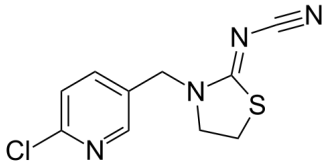
Nel presente lavoro di tesi si è concentrata l'attenzione su due neonico-



(a) Nicotina **(b)** Neonicotina **(c)** Imidacloprid

Figura 1.5: Formula di struttura di Nicotina, Neonicotina e Imidacloprid

Tabella 1.1: Formula di struttura e principali identificativi dei principi attivi studiati nel presente lavoro di tesi.

Principio attivo	Clothianidin	Thiacloprid
Nome IUPAC	(E)-1-(2-chloro-5-thiazolylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine	(Z)-3-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-1,3-thiazolidin-2-ylidenecyanamid
Numero CAS	210880-92-5	111988-49-9
PM (g/mol)	$249,70$	$252,72$
Indicazioni di pericolo	H302, H400/411	H332, H302, H412
Consigli di prudenza	P102, P101, P501, P273	P501, P273
Formula bruta	$C_6H_8ClN_5O_2S$	$C_{10}H_9ClN_4S$
Formula di struttura		

tinoidi: il Clothianidin attualmente sospeso in Europa come prodotto per la concia e il Thiacloprid che invece è ancora in commercio. In Tabella 1.3 sono indicate le proprietà tossiche dei principi attivi studiati, riportate come DL_{50} sia per contatto che per ingestione orale. Inoltre si riporta anche il dato riguardante il Methiocarb, un carbammato recentemente rilanciato sul mercato per sostituire i fitofarmaci oggetto della sospensiva europea.
La DL_{50} indica la dose di insetticida in grado di causare la morte del 50% della popolazione esposta ed è la grandezza comunemente utilizzata per indicare la tossicità di questi prodotti. La tossicità orale (detta anche per ingestione) viene comunemente determinata somministrando alle api una soluzione zuccherina contenente una quantità nota di principio attivo.
La determinazione della tossicità per contatto risulta invece più difficol-

Tabella 1.2: Proprietà chimico fisiche dei principi attivi studiati nel presente lavoro di tesi.

Principio attivo	Temp. Fusione ($℃$)	Densità (g/mL)	Solubilità in acqua a 20℃ (mg/L)	Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua a pH 7 e 20℃	Pressione di vapore a 25℃ (mPa)	Costante di Henry a 25℃ ($Pa \cdot m^3 \cdot mol^{-1}$)
Clothianidin	$176,8$	$1,61$	340	$8,04$	$2,8 \cdot 10^{-8}$	$2,90 \cdot 10^{-11}$
Thiacloprid	$136,0$	$1,33$	184	$18,2$	$3,0 \cdot 10^{-7}$	$5,00 \cdot 10^{-10}$

tosa e attualmente vengono utilizzate principalmente due tecniche. Una prevede di depositare una polvere contenente il principio attivo su una foglia, sulla quale vengono poi fatte sostare alcune api. In questo modo entrano a contatto con l'insetticida, ma risulta impossibile determinare la dose effettivamente somministrata e si può solo fare riferimento alla concentrazione del principio attivo presente sulla foglia.[9][10] Il secondo metodo è quello attualmente più utilizzato e prevede l'immobilizzazione dell'ape e l'applicazione sul suo dorso di una soluzione alcolica contenente l'insetticida. In questo caso il dosaggio è molto preciso, tuttavia anche se l'alcol viene velocemente fatto asciugare, la sua presenza può modificare l'assorbimento del principio attivo da parte dell'ape.[11]
Proprio a causa di tali incertezze, in letteratura è possibile trovare valori anche molto diversi di DL_{50} per contatto e in Tabella 1.3 sono riportati solo alcuni di questi. Si può notare facilmente che il Clothianidin risulta molto più tossico rispetto al Thiacloprid e la sua sospensione è dovuta proprio alla sua pericolosità per le api. Il Thiacloprid invece essendo molto meno tossico non fa parte degli insetticidi oggetto della sospensione dell'Unione Europea.
Il Methiocarb, del quale si hanno ancora pochi dati riguardanti la tossicità per le api, risulta meno tossico del Clothinidin, ma è comunque molto più pericoloso rispetto al Thiacloprid. Inoltre gli studi riguardanti la pericolosità di questo insetticida per le api risalgono al 2006 e considerano solo la via d'esposizione da polline, tralasciando nuove forme di esposizione rese evidenti da studi più recenti.
Risulta pertanto necessario lo sviluppo di metodologie che permettano una valutazione rapida degli effetti degli insetticidi emergenti sulle api.

Tabella 1.3: Dati di tossicità per le api relativi ai principi attivi studiati e al Methiocarb.[10][11][12][13][14]

Principio attivo	DL_{50} (ng/ape)	
	Orale a 48 h	Contatto a 24 h
Clothianidin	$2,844$	$21,8$ e $44,0$
Thiacloprid	17 320	14 600 e 38 820
Methiocarb	230	152

1.3.3 Normativa

A seguito dei gravi casi di moria di api avvenuti in Italia nel 2007 l'uso di alcuni insetticidi è stato vietato per effetto del Decreto Ministeriale del 17 settembre 2008 (GU 221, 2008) "Sospensione cautelativa dell'autorizzazione di impiego per la concia di sementi, dei prodotti fitosanitari contenenti le sostanze attive clothianidin, thiametoxam, imidacloprid e fipronil". In seguito questo decreto è stato prorogato negli anni e queste sostanze sono attualmente vietate in Italia.

Dal 1/12/2013 è entrato in vigore il Regolamento (EU) n° 485/2013 (GU L 139, 2013) che vieta l'utilizzo di questi insetticidi su tutto il territorio della Unione Europea. Oltre a l'utilizzo come prodotti per la concia li vieta anche in forma granulare e spray per le colture che attraggono le api. Questa norma ha però carattere provvisorio e la sua durata è prevista essere di due anni, in attesa di ulteriori dati che permettano di comprendere meglio come questi insetticidi possano influire sullo stato di salute delle api. In questo tempo sarà quindi necessario approfondire le conoscenze riguardanti gli effetti di questi fitofarmaci.

Questa norma ha fatto si che in Europa venissero rilanciati altri due prodotti fitosanitari: il Thiacloprid e il Methiocarb.

1.3.4 Inquinamento ambientale da insetticidi

La moria delle api è stato il primo effetto negativo sull'ambiente ad essere stato messo in relazione con l'uso degli insetticidi neonicotinoidi. Questo è dovuto alla sensibilità delle api all'inquinamento ambientale, ma anche alla loro caratteristica di essere insetti da allevamento, che rende più facile il monitoraggio del loro stato di salute e l'individuazione

di eventuali cali nella popolazione. Diversa è la situazione per la fauna selvatica, il cui monitoraggio risulta molto più difficile.
L'uso della concia ha portato negli anni ad un aumento della quantità di insetticida utilizzato per ettaro di terreno coltivato. Inoltre questa tecnica agronomica viene utilizzata a priori, senza considerare se il trattamento sia realmente necessario. Recentemente è emerso un quadro generale preoccupante di contaminazione ambientale da insetticidi e ci si sta rendendo conto di aver sottovalutato il rischio derivante dall'utilizzo continuato di questi prodotti agronomici.
Gli insetticidi sistemici sono infatti caratterizzati da un'elevata solubilità in acqua, che ne facilita la diffusione ambientale. Ormai è stato provato che la maggior parte del principio attivo non resta nel terreno dove è stato applicato, ma è in grado di diffondersi nell'ambiente circostante. Anche nel caso dell'applicazione dell'insetticida come concia sul seme meno del 10 % del prodotto resta effettivamente nel campo trattato.[15] Il restante 90 % si diffonde nella vegetazione circostante e può arrivare anche a contaminare le acque superficiali, causando un inquinamento non più ristretto al solo terreno coltivato. Inoltre alcuni di questi principi attivi hanno una lunga persistenza ambientale, che può arrivare anche a 1 000 giorni e dato il loro frequente utilizzo si va incontro ad un pericoloso fenomeno di accumulo di questi prodotti tossici, con un danno per l'ambiente ed in particolare per gli insetti non target.[16]
É ormai noto che i comportamenti dell'uomo incidono fortemente sull'ecosistema e dalla metà del novecento si sta osservando un calo generale della popolazione di insetti a causa di diversi fattori: un'agricoltura sempre più intensiva, la crescente urbanizzazione e un uso sempre più elevato di insetticidi. In particolare la situazione si è aggravata negli ultimi decenni e questo è stato messo in relazione con l'uso degli insetticidi sistemici.[17] Inoltre questa contaminazione comincia ad avere effetti non solo sugli insetti, ma anche su alcuni uccelli che vedono sparire la loro primaria risorsa di cibo. In alcune zone d'Europa si è riusciti a collegare una diminuzione della popolazione di uccelli all'uso dei neonicotinoidi.[15]
Il problema dell'uso di questi insetticidi si inserisce quindi in un quadro più ampio, che non riguarda solo la moria delle api, ma in generale la difesa dell'ambiente. Questa situazione ricorda quella descritta da Rachel Carson nel suo libro *"Silent Spring"*, pubblicato nel 1962, nel quale si descriveva come l'inquinamento prodotto dall'eccessivo uso di

DDT aveva causato grossi problemi all'ambiente, fino a provocare un forte declino nella popolazione di uccelli.[18]

1.4 Effetti sulle api

1.4.1 Le dosi sub-letali

Gli insetticidi neonicotinoidi sono stati associati alla moria delle api per la prima volta in Francia nel 1999,[19] dopo che vennero trovati alcuni $\mu g/L$ di Imidacloprid nel polline e nel nettare proveniente da coltivazioni di girasole ottenute da sementi conciate con questo insetticida.[20][21] Sulla base di questi risultati venne formulata l'ipotesi delle dosi sub-letali.[22]

Anche se gli insetticidi svolgono sicuramente un azione negativa per gli insetti impollinatori, che si trovano sempre di più a contatto con un ambiente contaminato da queste sostanze tossiche, le dosi generalmente sperimentate dalle api non sono sufficienti a provocare la loro morte per intossicazione acuta. Il contatto con gli insetticidi avviene principalmente tramite polline o nettare contaminati, sui quali si possono trovare quantità che si aggirano sui $6,1$ e $1,9$ $\mu g/L$ rispettivamente, che non risultano essere letali per le api.[23] Esistono comunque numerosi studi che dimostrano come il prolungato contatto con dosi sub-letali possa dare luogo ad effetti negativi per la colonia.[24] Si tratta di intossicazioni di tipo cronico che possono contribuire a indebolire lo stato di salute delle api, compromettendo le loro capacità di movimento, di sviluppo e di riproduzione, provocando una diminuzione della capacità di sopravvivenza dell'alveare. Questa teoria è supportata dal ritrovamento di residui degli insetticidi nel miele o in altri prodotti apistici ed attualmente è considerata essere la principale fonte di esposizione cronica agli insetticidi da parte delle api.

Anche se in letteratura si trovano numerosi lavori riguardanti gli effetti delle dosi sub-letali, questi dati non si presentano sempre coerenti e rimangono quindi nel campo delle ipotesi. Non è infatti ancora stato dimostrato come il contatto con dosi così basse di insetticida possa causare la scomparsa di intere colonie, come si è verificato nei casi di moria primaverile avvenuti nel periodo 2006-2008.

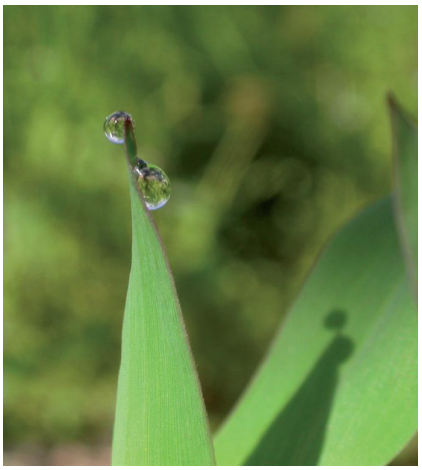


Figura 1.6: Gocce di guttazione di una pianta di mais.

1.4.2 Modalità di intossicazione acuta

La semina del mais rappresenta sicuramente un momento critico dato l'enorme utilizzo di insetticidi durante queste operazioni. Molti casi di moria primaverile registrati in questi anni sono infatti stati associati alla semina di questa coltura. Tuttavia il problema non riguarda solo la diffusa contaminazione ambientale, ma sono state individuate anche delle possibili vie di dispersione dell'insetticida in grado di causare un'intossicazione di tipo acuto: le guttazioni del mais e il particolato da semina. Queste modalità di intossicazione potrebbero spiegare le morie primaverili, che si differenziano da quelle invernali ascrivibili piuttosto a parassiti come la *Varroa*.[25]

Il fenomeno delle guttazioni riguarda l'espulsione di liquido xilematico dalle foglie, con la conseguente formazione di gocce. Questo è un processo fisiologico che perdura per 3-4 settimane da quando la plantula spunta dal terreno ed è causato dall'aumento della pressione radicale che si genera per l'entrata dell'acqua attraverso le radici, mentre la traspirazione è ancora molto bassa. Se la pianta è stata trattata con l'insetticida in queste gocce è possibile trovare elevate concentrazioni di principio attivo (dell'ordine di centinaia di mg/L) e alle api è sufficiente una sola ingestione (solitamente $10 - 20\ \mu L$) per morire nel giro di pochi minuti.

Anche se le guttazioni non rappresentano un'appetibile fonte idrica per le api, rimangono un pericolo per altri apidi selvatici non sociali come le *Halictus* e le *Andrena*.[26]

Figura 1.7: Particolato contenente l'insetticida fuoriuscito dalla seminatrice pneumatica, evidenziato dalla contemporanea presenza di talco.

Un'altra modalità di dispersione dell'insetticida sono le polveri che si generano durante la semina del mais. Queste sono state associate alle morie primaverili di api per la prima volta nel 2003 dal dott. Greatti dell'Università di Udine.[27] Durante le operazioni di semina vengono utilizzate delle macchine seminatrici basate su un funzionamento pneumatico, che lavorano con grandi quantità di semi tenuti in continuo movimento all'interno di una tramoggia. Attraverso l'azione di un flusso d'aria i semi vengono fatti cadere sul terreno, ottenendone un posizionamento molto preciso. Si ha così la formazione, per erosione, di notevole quantità di particolato (costituito dalla pellicola di concia contenente l'insetticida) che fuoriesce dalla seminatrice e forma una nube di circa $20 - 30\ m$. Queste polveri possono poi ricadere nell'ambiente circostante contaminandolo e dall'analisi della vegetazione adiacente al campo coltivato sono risultate concentrazioni di insetticida variabili tra i $123,7$ e $58,2\ ppb$.[28] Tuttavia queste dosi non rappresentano un reale pericolo di intossicazione acuta, che possa spiegare le morie primaverili.

Le polveri rappresentano invece un pericolo per le api che volano in prossimità della seminatrice durante le operazioni di semina, in quanto possono catturare particelle di particolato contenente l'insetticida. Questo è possibile dato che l'ape è dotata di una peluria predisposta per la raccolta del polline, che si rivela efficacie anche per catturare le polveri prodotte dalla seminatrice.[29][30][31] Le dosi di principio attivo con cui possono venire in contatto le api attraverso l'impolveramento in volo so-

no molto alte e possono dare effetti di tipo acuto, fino a causare la morte dell'ape. Le concentrazioni di insetticida in aria sono molto variabili in funzione della distanza, del tipo di concia presente sul seme e del modello di seminatrice utilizzata, ma il massimo misurato a 5 m dalla seminatrice è di 28 $\mu g/m^3$. Le polveri generate dalla seminatrice rappresentano quindi un serio pericolo di intossicazione acuta per le api, se queste si trovassero in prossimità di campi coltivati o li dovessero attraversare per raggiungere fonti di cibo.
Da alcuni esperimenti svolti in campo si è visto che le api effettivamente catturano elevate quantità di particolato nel passaggio vicino alla seminatrice. Le prove sono state fatte con api addestrate a sorvolare il campo coltivato per raggiungere una fonte di cibo o tenute in gabbia e fatte passare vicino alla seminatrice. In entrambi i casi si sono ottenuti risultati simili, con api che hanno catturato una quantità di insetticida variabile tra i 78 e i 1240 ng/ape.[29][30] Queste dosi si sono rivelate sufficienti per osservare elevata mortalità delle api esposte e permetterebbero di spiegare i fenomeni di moria improvvisa che si sono registrati in passato per molti alveari, difficilmente spiegabili tramite la teoria delle dosi sub-letali.

1.5 Scopo della tesi

In letteratura sono presenti numerosi studi riguardanti la tossicità acuta di questi insetticidi. Tuttavia pochi fanno riferimento alle reali condizioni espositive che si realizzano in campo e nessuno ha finora quantificato la tossicità acuta per le api del "particolato da semina".[24] Attualmente non esistono test che consentano di determinare la tossicità dell'insetticida per impolveramento diretto in volo, se non con le prove in campo, che però risultano particolarmente dispendiose e difficoltose nella realizzazione. I nuovi semi entrati sul mercato non sono quindi mai stati testati per questo tipo di esposizione e attualmente ci si basa solo sui dati di tossicità per ingestione o per contatto. Inoltre l'unico test attualmente utilizzato per la determinazione della tossicità da contatto di polveri non è efficacie per la valutazione della DL_{50}.
Per poter approfondire le indagini riguardanti l'impolveramento in volo delle api e quantificare i suoi effetti tossici, si è quindi studiato e messo a punto un sistema in grado di produrre delle polveri simili a quelle

emesse dalla seminatrice, col vantaggio di poter lavorare in laboratorio. L'obbiettivo era quello di riuscire a produrre un flusso d'aria contenente una concentrazione d'insetticida nota e costante, che consentisse la sperimentazione *in vivo* sulle api. Una volta standardizzato il funzionamento di questo sistema, si è potuto mettere a punto un test di laboratorio per la determinazione della tossicità dell'insetticida nella particolare condizione dell'impolveramento in volo. Mediante questo strumento si sono potuti confrontare gli effetti di semi conciati con diversi principi attivi e determinare le relative DL_{50}. É stato inoltre possibile valutare l'effetto dell'umidità atmosferica sulla mortalità delle api esposte all'insetticida. Per le prove sperimentali si sono utilizzati Clothianidin e Thiacloprid, in modo da testare il sistema con principi attivi che coprano un vasto spettro di tossicità.
La messa a punto di un test di laboratorio per determinare la tossicità del particolato prodotto durante la semina è necessaria anche per poter valutare la pericolosità di eventuali nuovi fitofarmaci che entrano sul mercato (es: Methiocarb). Inoltre questo sistema potrebbe risultare una valida alternativa per lo studio della tossicità da contatto delle polveri, rappresentando un buon metodo per la somministrazione del principio attivo sull'ape.

Capitolo 2

Materiali e metodi

2.1 Sistema Cromatografico UHPLC

L'analisi dei vari insetticidi nelle matrici di interesse è stata condotta mediante una strumentazione Shimadzu UFLC (Ultra Fast Liquid Cromatograpy) XR Prominence, costituita da:

- Contenitore della fase mobile (2 contenitori per gli eluenti A: H_2O + 10% CH_3CN e B: CH_3CN)
- Sistema di pompaggio LC-20AD XR
- Camera di miscelazione con programmazione del gradiente di eluizione
- Iniettore automatico SIL-20AC XR
- Colonna: Shimadzu Shim-pack XR-ODS II $2,2\ \mu m$ ($100 \times 2\ mm$)
- Precolonna: Phenomenex Security Guard KJO-4282
- Forno termostatato per colonne CTO-20A
- Rivelatore diode - array UV-Vis SPD-M20A
- Modulo gestione CBM-20A, Software di gestione "LC Solution"

Questo sistema cromatografico è stato utilizzato operando con:

- Miscela eluente: acetonitrile - acqua MilliQ
- Flusso: $0,3\ mL/min$
- Temperatura colonna: 35 °C

2.2 Microscopio elettronico a scansione (SEM)

Per l'osservazione delle particelle campionate si è utilizzato un microscopio elettronico a scansione, con strumentazione FEI modello Quanta 200 operante in modalità a basso vuoto. Per l'acquisizione delle immagini SEM è stato campionato il segnale prodotto dagli elettroni secondari, mentre l'analisi elementare è basata sulla fluorescenza X.

2.3 Strumentazioni e attrezzature di laboratorio

- Bilancia analitica con limite di sensibilità di $0,01\ mg$
- Bagno a ultrasuoni (ELMA® Transsonic Digitals)
- Micropipette tarate con puntali monouso
- Beute, matracci, becher, imbuti di vetro e vetrini da orologio di varie dimensioni
- Siringhe di vetro con ago in acciaio
- Filtri per siringa in PVDF (polivinilidén fluoruro) Phenomenex RC (diametro $4\ mm$) con diametro pori $0,20\ \mu m$
- Pinze e spatoline in acciaio
- Fiale di vetro da $1,5\ mL$ con tappo a vite e setto poroso in PTFE
- Provette in plastica da $10\ mL$
- Pompa (Zambelli ZB1 TIMER)
- Filtri in fibra di vetro, diametro $37\ mm$, porosità $1,0\ \mu m$ (Omega Speciality Instrument Co.)
- Filtri in policarbonato, diametro $47\ mm$, porosità $0,2\ \mu m$ (MILLIPORE, Isopore Membrane Filters)
- OPC, Portable Aerosol Spectrometer Model 1108-GRIMM Aerosol Technik

2.4 Reagenti e principi attivi impiegati

- Acetonitrile (LiChrosolv®, purezza $\geq 99,9$ %)
- Metanolo (HiPerSolv Chromanorm VWR, purezza $\geq 99,8$ %)
- Acqua MilliQ (prodotta con apparecchiatura Millipore MilliQ)
- Clothianidin (Fluka Analytical Pestanal, $> 99,7$ %)
- Thiacloprid (Fluka Analytical Pestanal, $> 99,7$ %)

2.5 Sementi utilizzate

Le sementi utilizzate nei diversi esperimenti sono conciate e distribuite da "Pioneer Italia". Le sementi conciate con Poncho® sono state fornite dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali al Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova, per esclusivo uso sperimentale. I semi conciati con Sonido® invece sono stati reperiti sul mercato nel 2014. Le sementi hanno le seguenti caratteristiche:

- sementi conciate con Poncho® (Bayer Cropscience), principio attivo Clothinidin, in dose nominale di $1,25\ mg/seme$ (concia 2010)
- sementi conciate con Sonido® (Bayer Cropscience), principio attivo Thiacloprid, in dose nominale di $1,0\ mg/seme$ (concia 2014)

Le sementi conciate con Poncho® (Bayer CropScience) contengono all'interno della concia anche una miscela fungicida (denominata Celest XL) costituita dai principi attivi Fludioxonil e Metalaxyl.

2.6 Sistema per la produzione di particolato

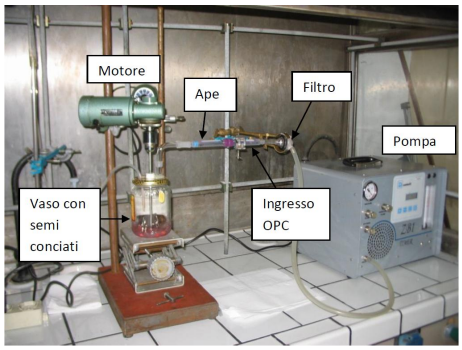
Per la produzione del particolato sono state utilizzate sementi di mais conciate, inserite in un sistema meccanico in grado di produrre polvere per erosione del materiale di concia. Al sistema è stata collegata una pompa che, introducendo un flusso d'aria, consentiva di aspirare il particolato prodotto. Sono state valutate le prestazioni di tre diversi sistemi per la produzione del particolato (Figura 2.1):

Sistema 1: i semi erano contenuti in un vaso di vetro e venivano mescolati da una catena metallica, messa in rotazione da un motore elettrico. Il vaso era chiuso da un coperchio, sul quale erano stati fatti due fori: uno era collegato alla pompa e consentiva l'aspirazione delle polveri prodotte attraverso un apposito condotto, mentre il secondo consentiva l'ingresso dell'aria nel vaso.

Sistema 2: i semi erano contenuti in un cilindro, la cui parete era costituita da una rete metallica, messo in rotazione da un motore elettrico. L'asse di rotazione del cilindro era orizzontale. La polvere si produceva per effetto degli urti causati dal continuo mescolamento dei semi e fuoriusciva attraverso la rete metallica che ne consentiva il passaggio. Il cilindro si trovava all'interno di un vaso di vetro, dal quale avveniva l'aspirazione del particolato nel medesimo modo utilizzato nel *Sistema 1*.

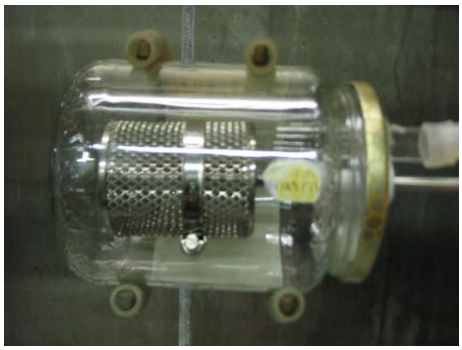
Sistema 3: i semi erano contenuti in un pallone da reazione da 100 mL messo in rotazione da un rotovapor. L'erosione della concia avveniva per gli urti dei semi tra loro e con la parete di vetro. In questo caso l'aspirazione avveniva direttamente dal pallone, tramite un tubo in vetro collegato alla pompa.

In tutti e tre i casi tra il sistema di erosione meccanica e la pompa veniva collocata una linea utile per l'esposizione delle api. Questa era composta da due provette in plastica, di cui la prima era preparata per contenere api vive, mentre la seconda era predisposta per l'eventuale utilizzo del contatore ottico di particelle (OPC). All'inizio di questa linea è stata collocata una rete metallica con fori da 100 μm per bloccare eventuali particelle di dimensioni particolarmente elevate.
Le condizioni sperimentali (№ semi, flusso d'aria, tempi d'esposizione dell'ape, velocità di mescolamento dei semi e № di api esposte) sono

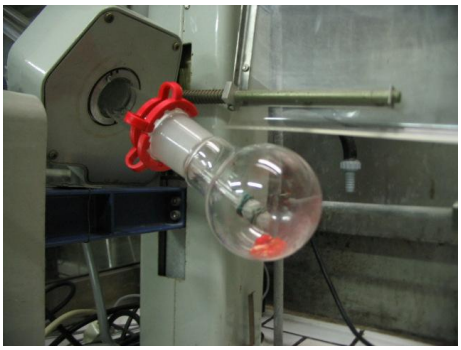


(a) Schema generale

(b) Sistema 1



(c) Sistema 2



(d) Sistema 3

Figura 2.1: Fotografie relative ai tre sistemi di produzione di particolato. La linea predisposta per l'esposizione dell'ape e per il campionamento su filtro è analoga in tutti e tre i casi e viene illustrata nella foto a.

state variate nel corso dei vari esperimenti allo scopo di determinare le condizioni ottimali di lavoro da impiegare durante i test di tossicità.

2.7 Procedure sperimentali

2.7.1 Campionamento delle polveri

Per il campionamento del particolato prodotto si sono utilizzati filtri in fibra di vetro da 37 mm, posizionati su un porta filtro di dimensioni opportune. Il filtro veniva collocato o all'inizio (in questo caso risultava impossibile una contemporanea esposizione delle api al particolato) o alla fine della linea predisposta per l'esposizione delle api e permetteva di raccogliere il particolato totale sospeso (PTS).
Con tutti i sistemi utilizzati le particelle di maggiori dimensioni non erano in grado di raggiungere il filtro e si depositavano sulle pareti del

sistema di produzione delle polveri. Questa aliquota di particolato non è stata considerata nella quantificazione delle polveri, in quanto si è tenuto conto solo delle particelle in grado di raggiungere la zona predisposta per l'esposizione delle api.
Il campionamento delle polveri durava un tempo variabile tra i 5 e i 10 minuti, durante i quali la pompa manteneva un flusso d'aspirazione costante. Terminato il campionamento su filtro si procedeva all'estrazione del principio attivo contenuto nel particolato per eseguire l'analisi all'UHPLC-DAD. Attraverso campionamenti consecutivi è stato possibile ottenere una misura della concentrazione di principio attivo nel flusso d'aria ogni 5 minuti. In questo modo è stato possibile monitorare il funzionamento del sistema di produzione di particolato, in termini di andamento della concentrazione di insetticida nel tempo.

2.7.2 Distribuzione dimensionale del particolato

Per stabilire le dimensioni del particolato sono stati utilizzati due diversi strumenti:

- contatore ottico di particelle (Optical Particel Counter) basato sulla diffusione della luce, che consente la rilevazione di particelle con un diametro compreso tra $0,3$ e 30 μm.
- microscopio elettronico a scansione (SEM) che consente l'osservazione di particelle di dimensioni fino a $0,2$ μm e un'analisi elementare delle singole particelle, mediante acquisizione dello spettro di emissione X.

L'OPC è fornito di un tubo aspirante che veniva inserito lungo la linea di campionamento come illustrato in Figura 2.1. Per l'esperimento di determinazione della distribuzione dimensionale è stato utilizzato il *Sistema 1* caricato con 6 semi conciati con Clothianidin. L'OPC è stato tenuto in funzione durante tutto l'esperimento, della durata di $1,5$ ore, durante le quali si è mantenuto un flusso d'aspirazione di 5 L/min.
Per l'osservazione al SEM il particolato è stato campionato su filtri in policarbonato da 47 mm, posizionati su un supporto opportuno. Il campionamento è durato 2 minuti, durante i quali si è mantenuto un flusso di 10 L/min. Per la produzione del particolato si è utilizzato il *Sistema 3*, col quale sono stati eseguiti due esperimenti: uno con sementi conciate con Clothianidin e uno con sementi conciate con Thiacloprid.

Per l'esperimento riguardante il Clothianidin sono stati utilizzati 6 semi mescolati per 15 minuti prima del campionamento. Per il Thiacloprid 60 semi sono stati mescolati per 1 *ora*. Si è operato in questo modo per simulare le condizioni utilizzate per gli esperimenti di esposizione delle api.

2.7.3 Valutazione della DL_{50} per le api

Le api utilizzate per la sperimentazione erano bottinatrici della specie *Apis mellifera*, provenienti da alveari collocati nei pressi dei dipartimenti coinvolti nella sperimentazione (Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente e Dipartimento di Scienze Chimiche). Le api venivano catturate in gabbie di tulle e trasportate in laboratorio al Dipartimento di Scienze Chimiche, per operare il drogaggio controllato. Durante il trasporto le api sono state alimentate con miele.

Alcune api vive, in numero variabile da 2 a 8, venivano trasferite in una provetta in plastica predisposta per essere collocata tra il sistema di produzione delle polveri e la pompa. La provetta è stata bucata sul fondo, in modo da consentire il passaggio del particolato contenente l'insetticida. Tuttavia le api non potevano uscirne, in quanto erano state posizionate delle reti che ne impedivano il passaggio. La rete sul fondo della provetta era fissa e le api venivano introdotte dal lato opposto che poi veniva bloccato tramite un tappo a vite forato, ma anch'esso provvisto di rete.

Questa provetta costituiva la prima parte della linea di esposizione delle api e poteva essere inserita e tolta facilmente dal sistema.

Una volta inserita la provetta contenente le api si attivava il mescolamento dei semi e la pompa per avviare l'aspirazione. Il tempo di esposizione delle api faceva riferimento al tempo che trascorreva dall'accensione allo spegnimento della pompa e variava tra $0,5$ e $5,0$ minuti.

Una volta esposte le api, queste venivano trasferite in una gabbia per il test di mortalità o congelate per l'analisi. Solitamente venivano esposte 8 api contemporaneamente, di cui 6 si utilizzavano per il test di mortalità, mentre le 2 rimanenti venivano analizzate. In questo modo ad ogni gabbia corrispondeva una dose di insetticida somministrata, determinata a posteriori attraverso l'analisi all'UHPLC-DAD.

Il test di mortalità durava 24 ore, durante le quali le api erano tenute in gabbie di tulle. Durante questo tempo venivano alimentate con miele, somministrato in piccole gocce direttamente sulla gabbia, per escludere il digiuno come causa di morte.
Al termine delle 24 ore si effettuava il calcolo del numero di insetti morti in ogni gabbia, valutando visivamente il decesso legato all'assenza di movimenti e successivo alla manifestazione di sintomi quali disorientamento e incurvamento dell'addome. Facendo riferimento al numero di morti rispetto al numero totale di api presenti nella gabbia si otteneva la percentuale di mortalità, associata ad una dose di insetticida attraverso l'analisi UHPLC-DAD sulle due api precedentemente analizzate.
Durante il test le api venivano sottoposte a due diverse condizioni di umidità atmosferica, al fine di valutarne l'influenza sulla mortalità:

Secco: le gabbie contenenti le api venivano tenute all'umidità ambiente presente in laboratorio (sempre inferiore al 70 % UR)

Umido: le gabbie contenenti le api venivano tenute in saturazione di umidità per le 3 ore successive all'esposizione. Per realizzare un ambiente in saturazione di umidità si utilizzava una scatola di plastica contenente sul fondo della carta assorbente bagnata. Le gabbie venivano tenute leggermente sollevate per impedire che le api si bagnassero. La scatola era chiusa con un coperchio che consentiva il raggiungimento della saturazione d'umidità, lasciando comunque un minimo passaggio d'aria.

Definite le percentuali di mortalità per ogni dose somministrata, è stato possibile determinare il valore della DL_{50} mediante la procedura probit, ottimizzata da Milani (vedi Appendice B). Questo è infatti il metodo normalmente utilizzato per la valutazione di un effetto dose/risposta di tipo acuto in campo biologico, come nel nostro caso è la valutazione di una dose letale di insetticida.

2.7.4 Procedura di estrazione degli analiti

Particolato su filtro

Il filtro da 37 mm veniva tagliato a metà e ognuna delle due parti era analizzata separatamente, in modo da ottenere due campioni per ogni filtro raccolto. Metà filtro veniva inserito in una provetta di plastica da 10 mL e si aggiungeva 1 mL di metanolo. A questo punto il campione era trattato in bagno a ultrasuoni per 15 minuti a temperatura ambiente. In seguito si aggiungeva 1 mL di acqua MilliQ e si ripeteva il trattamento ad ultrasuoni. La soluzione veniva filtrata prima dell'iniezione nel cromatografo mediante filtri siringa PVDF con porosità $0,2$ μm.

Singola ape

Le api da analizzare venivano messe in congelatore a -20 ℃ subito dopo l'esposizione, in modo da causarne la morte in pochi minuti ed escludere fenomeni di pulizia da parte dell'ape. Dopo alcuni minuti venivano prelevate dal congelatore e trasferite in una provetta da 10 mL. In ogni provetta si introduceva una sola ape e per l'estrazione dell'analita di usava la stessa metodica descritta precedentemente per mezzo filtro da 37 mm.

2.7.5 Preparazione di soluzioni standard ad elevata concentrazione dei diversi principi attivi

Le soluzioni madre dei diversi principi attivi (concentrazione di 100 mg/L) sono state preparate sciogliendo una quantità nota degli stessi, in formulazione solida ad elevato grado di purezza, in una quantità misurata di solvente.

Il composto, in polvere, è stato pesato con una bilancia analitica con sensibilità di $0,01$ mg e trasferito quantitativamente in un matraccio da 100 mL, portando a volume con metanolo. Il matraccio veniva quindi chiuso con tappo e sigillato esternamente con del Parafilm. La soluzione è stata conservata in frigorifero a 4 ℃.

2.7.6 Preparazione di soluzioni standard per la calibrazione strumentale

Le soluzioni standard a bassa concentrazione dei diversi principi attivi, necessarie per la determinazione delle funzioni di calibrazione strumentali, venivano preparate mediante opportune diluizioni della soluzione madre.
Una determinata aliquota della soluzione concentrata veniva trasferita in una fiala di vetro da $1,5\ mL$ e si aggiungeva la quantità di solvente necessaria per ottenere la diluizione desiderata. Sia la soluzione madre che il solvente venivano prelevati mediante l'utilizzo di micropipette tarate dotate di puntale monouso. Come solventi si utilizzavano acqua MilliQ e metanolo, in modo da ottenere sempre una soluzione acquosa di metanolo al 10 % circa. Le soluzioni venivano preparate direttamente su fiale di vetro predisposte per il cromatografo e analizzate il giorno stesso per la calibrazione strumentale.

2.7.7 Procedura di analisi UHPLC-DAD

Il sistema cromatografico Shimadzu, dotato di rivelatore UV-DAD (Diode Array Detector), è in grado di lavorare ad elevate pressioni (fino 660 *bar*) e può quindi utilizzare colonne ad alta efficienza per ottenere risoluzioni elevate in tempi brevi di analisi.
Questo sistema è dotato di autocampionatore e prevede che i campioni siano caricati su fiale di vetro da $1,5\ mL$ con tappo provvisto di opportuno setto forabile. Il campione deve essere liquido e non deve contenere sospensioni solide, per non rischiare che queste vengano iniettate compromettendo la funzionalità del sistema.
Per la determinazione quantitativa degli analiti si è sfruttato il metodo della retta di taratura (calibrazione esterna). L'identificazione degli analiti veniva effettuata sia per confronto con i tempi di ritenzione di standard analitici, sia sfruttando il rivelatore DAD impostato per registrare lo spettro di assorbimento UV tra 200 e 300 nm. Per i due principi attivi analizzati sono state impostate lunghezze d'onda differenti (λ massima di assorbimento):

- Clothianidin 269 nm
- Thiacloprid 244 nm

Ogni analisi veniva svolta in doppio: si operavano due determinazioni cromatografiche per ogni campione e si mediava il dato ottenuto.
Dato che le matrici analizzate contenevano un solo insetticida, sono stati messi a punto due metodi cromatografici differenti, uno per ogni principio attivo studiato nel corso del lavoro di tesi. I due metodi cromatografici utilizzati si differenziano solo per il gradiente di eluizione.
Il metodo ottimizzato per l'analisi su singola ape e su filtro contenente particolato da semina presenta le seguenti condizioni all'UHPLC-DAD: flusso di eluente $0,3\ mL/min$, volume di iniezione 5 μL, temperatura della colonna 35 ℃, eluente A acqua : acetonitrile = 90 : 10, eluente B acetonitrile, il gradiente binario di eluizione acqua/acetonitrile per i due metodi cromatografici è riportato in Tabella 2.1.

Tabella 2.1: Programma di eluizione per i due metodi cromatografici.

Clothianidin		**Thiacloprid**	
Tempo (min)	CH_3CN (%)	Tempo (min)	CH_3CN (%)
$0-1,5$	27	$0-2$	$32,5$
$1,5-2,7$	$27-100$	$2-2,5$	$32,5-100$
$2,7-5$	100	$2,5-4,5$	100
$5-5,5$	$100-27$	$4,5-5,5$	$100-32,5$
$5,5-9$	27	$5,5-8,5$	$32,5$

Capitolo 3

Risultati e discussione

3.1 Ottimizzazione del metodo analitico

Le informazioni per la messa a punto dei metodi analitici utilizzati per la determinazione degli insetticidi neonicotinoidi nelle matrici d'interesse, sono state ricavate dai lavori di Tapparo et al. e da precedenti progetti di tesi.[6][32][33][34] Le procedure analitiche sono state modificate per ottenere due metodi rapidi, che consentissero la quantificazione degli analiti oggetto di studio. L'ottimizzazione dei metodi si è incentrata sulla modifica dei gradienti di eluizione e le condizioni finali adottate sono riportate nel paragrafo 2.7.7 a pagina 26. Le prestazioni dei metodi invece sono riassunte nella Tabella 3.1.

L'incertezza strumentale nella quantificazione dell'analita è stata valutata attraverso la semidispersione massima tra le due analisi eseguite sullo stesso campione. Questo errore si riferisce però alla sola quantificazione strumentale dell'insetticida presente nella matrice. Per determinare l'errore relativo al campionamento delle polveri e alla determinazione della dose di insetticida somministrata all'ape si deve considerare l'errore relativo all'intera procedura.

L'errore sul campionamento delle polveri è stato valutato tramite la deviazione standard delle misure relative ad uno stesso filtro: due analisi ripetute per ogni metà filtro. Per il Clothianidin l'errore percentuale è risultato tra il 2 e il 25 %, con una media del 10 %, mentre per il Thiacloprid è tra il 3 e il 12 %, con una media del 7 %. Questo errore è dovuto alla non omogenea deposizione delle particelle sulla superficie del filtro,

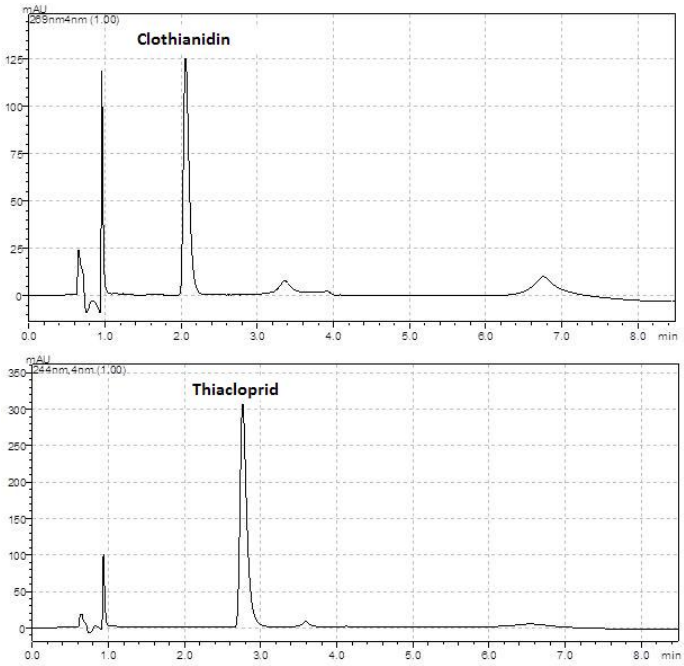


Figura 3.1: Cromatogrammi relativi ai due metodi analitici utilizzati.

campionate in un intervallo di tempo relativamente breve (5 min).

La dose somministrata ad un gruppo di api è stata determinata calcolando la media di principio attivo presente su api appartenenti ad uno stesso gruppo d'esposizione. L'errore relativo alla dose è stato calcolato tramite la deviazione standard delle misure utilizzate per il calcolo della media. Per quanto riguarda il Clothianidin sono stati fatti tre esperimenti appositi per valutare l'errore sulla dose somministrata, nei quali sono state analizzate tre api appartenenti allo stesso gruppo d'esposizione. All'incertezza strumentale si somma l'errore relativo alla non omogenea deposizione della polvere all'interno di un gruppo di api. L'errore è infatti molto più alto e si aggira tra il $10 - 40\,\%$, con un valore medio del $26\,\%$ per il Clothianidin. Mentre l'errore sulla dose di Thiacloprid è del $5 - 35\,\%$ con una media del $15\,\%$. Gli errori relativi al campionamento delle polveri e alla determinazione della dose di insetticida applicata sull'ape sono riassunti in Tabella 3.1

L'errore relativo alla dose somministrata è abbastanza elevato, soprattutto a causa di alcuni gruppi di api particolarmente poco omogenei. Tuttavia la precisione del metodo è stata considerata più che sufficiente per la determinazione della tossicità degli insetticidi. La non omoge-

Tabella 3.1: Prestazioni dei metodi analitici in termini di incertezza strumentale di misura e quantità minima di analita misurabile (LOD). Si riporta inoltre l'errore relativo al dosaggio dell'insetticida sull'ape e alla determinazione della concentrazione di principio attivo nel flusso d'aria.

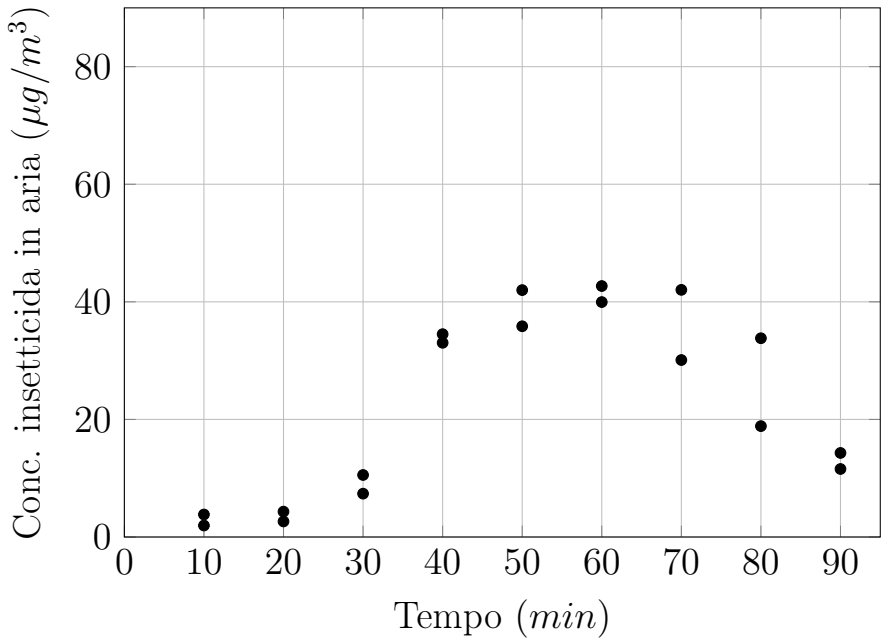
Metodo	Incertezza det. strumentale (%)	LOD (ng)	Errore dose (%)	Errore conc. di esposizione (%)
Clothianidin	$2,0 - 5,0$	14	26	10
Thiacloprid	$0,2 - 2,0$	24	15	7

neità può essere implicata alle diverse disposizioni delle api all'interno della linea d'esposizione, nella quale alcune possono venire schermate dal flusso d'aria o sperimentare concentrazioni di insetticida differenti (vedi paragrafo 3.3).
Il Limite di rivelabilità (Limit of Detection o LOD) è "la più piccola quantità di analita nel campione su cui si effettua l'analisi che può essere significativamente distinta dal bianco" (IUPAC, 2002). Per la sua determinazione è stato utilizzato il metodo proposto da Hubaux - Vos,[35] che si basa sulla costruzione delle bande di confidenza di funzioni di calibrazione lineare. Le bande di confidenza vengono costruite per un determinato livello di confidenza (nel nostro caso del 95 %) e vengono utilizzate per quantificare la probabilità di commettere errori di prima e seconda specie nel corso della determinazione. Operativamente si identifica il valore della risposta strumentale corrispondente all'intersezione della banda di confidenza superiore con l'asse delle ordinate. Questo è detto valore critico, al di sotto del quale i segnali hanno una probabilità del 95 % di appartenere al bianco. L'intersezione tra questo valore e la banda di confidenza inferiore fornisce il Limite di Rivelabilità, al di sopra del quale si ha una probabilità del 95 % che il segnale sia dovuto all'analita presente nel campione.
Il LOD stimato per i metodi d'analisi utilizzati è significativamente inferiore alla quantità (dose) di insetticida normalmente impiegate per eseguire il test di tossicità. Nel nostro caso non sono infatti necessarie prestazioni analitiche particolarmente elevate, dato che le dosi somministrate sono relativamente elevate. Il metodo analitico utilizzato si è quindi rivelato valido per l'accoppiamento al test biologico e ha consentito di eseguire gli studi sulla tossicità del particolato da semina.

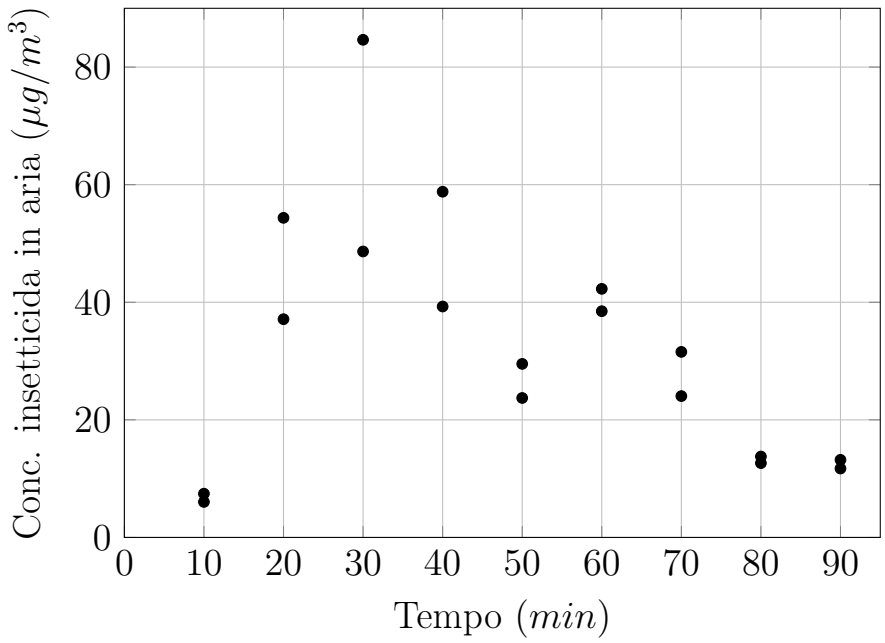
3.2 Caratteristiche dei sistemi per la produzione di particolato

3.2.1 Sistema 1

Questo sistema si è rivelato poco affidabile in termini di stabilità nella concentrazione delle polveri prodotte. Infatti in tutti gli esperimenti condotti per valutare l'andamento nel tempo di tale concentrazione, si è sempre ottenuta la formazione di un picco, che non consentiva di lavorare con un livello costante di polveri (Figura 3.2). In queste condizioni risultava difficile prevedere la concentrazione di insetticida a cui si sarebbero esposte le api, dato che questa era variabile nel tempo. Di conseguenza non si poteva programmare la dose di fitofarmaco da somministrare alle api prima dell'esposizione, ma bisognava rifarsi unicamente all'analisi successiva. Inoltre nel corso di uno stesso esperimento api esposte in successione sperimentavano concentrazioni di insetticida molto differenti e risultava impossibile somministrare la stessa dose a più gruppi di api. In sostanza, fluttuazioni di questa entità nella concentrazione di principio attivo risultavano incompatibili con la necessità di avere un sistema che consenta un dosaggio riproducibile dell'insetticida sull'ape.
Si è osservato che, la velocità di rotazione della catena influiva sulla cinetica di abrasione dei semi e quindi anche sulla quantità di polvere che si otteneva nel flusso d'aria. Modificando quindi la velocità di rotazione si poteva modificare il tempo di comparsa del picco e la concentrazione massima di insetticida. In Figura 3.2 si vede come una velocità maggiore permettesse di anticipare il picco e raggiungere concentrazioni di polvere notevolmente maggiori.
Tuttavia lavorando sulla velocità di rotazione e sul numero di semi non si è mai riusciti ad evitare la comparsa di un picco di concentrazione delle polveri. Questa è stata giudicata essere una caratteristica intrinseca del setting sperimentale e ha portato quindi a scartare il *Sistema 1* per i successivi test di tossicità.



(a) velocità minore



(b) velocità maggiore

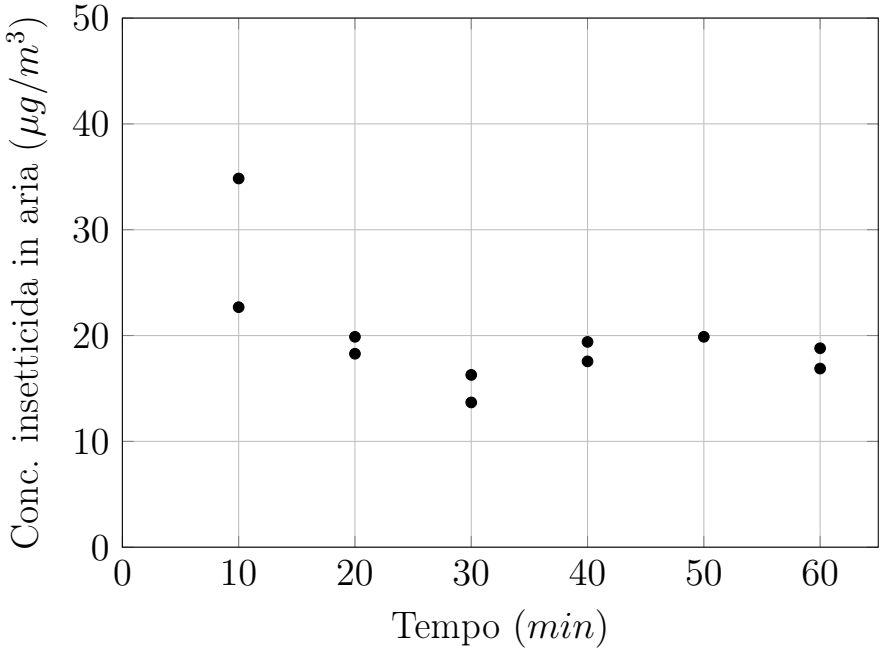
Figura 3.2: Confronto tra esperimenti condotti a diverse velocità con il *Sistema 1*. Si può notare che in entrambi i casi si è verificata la formazione di un picco di concentrazione di polveri. Condizioni sperimentali: 6 semi conciati con Clothianidin, flusso di 5 L/min.

3.2.2 Sistema 2

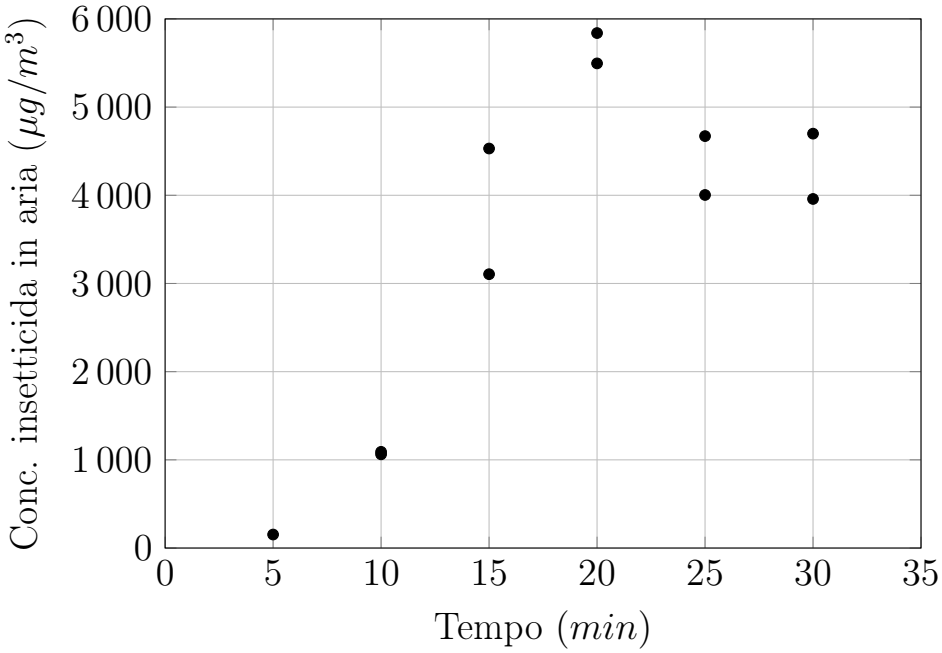
Questo sistema garantiva una buona omogeneità nella concentrazione delle polveri, però non permetteva di raggiungere alte concentrazioni di insetticida. Anche lavorando con un numero elevato di semi (il massimo sperimentato è stato di 60 semi) si sono ottenute solo concentrazioni relativamente basse di polvere, che non sono state sufficienti per eseguire i test di tossicità dell'insetticida (Figura 3.3). Infatti la quantità massima di principio attivo che si è riusciti a depositare sull'ape, utilizzando questo sistema, non permetteva di raggiungere elevati livelli di mortalità dei campioni esposti. Si ricorda che il raggiungimento del 100 % di mortalità è una condizione necessaria per la determinazione della DL_{50}.
Questo sistema presentava quindi un limite massimo di concentrazione raggiungibile insufficiente per i nostri scopi ed è stato abbandonato. Questo limite presumibilmente era dovuto al fatto che le particelle di concia una volta staccatesi dal seme uscivano dal cilindro metallico e si depositavano sul fondo del contenitore, senza subire ulteriore erosione. Al contrario negli altri sistemi utilizzati le particelle di concia continuavano ad essere macinate e producevano quindi polvere più sottile che poteva essere estratta dal flusso d'aria. Nel *Sistema 2* non si aveva evidentemente una sufficiente produzione di particelle di particolato in grado di uscire dal vaso con l'aspirazione fornita. Si evitava così la crescita nella concentrazione della polvere che portava alla formazione del picco nel *Sistema 1*, ma risultava anche impossibile raggiungere concentrazioni elevate.

3.2.3 Sistema 3

Questo sistema è caratterizzato da una crescita di concentrazione delle polveri nella fase iniziale di funzionamento, seguita da un periodo di stabilizzazione della concentrazione. Questo andamento è ben visibile in Figura 3.3b e 3.4a.
Il *Sistema 3* consentiva quindi di ottenere alte concentrazioni di polveri con pochi semi rispetto al *Sistema 2* e di avere concentrazioni molto più stabili di polvere rispetto al *Sistema 1*. Infatti una volta raggiunta la concentrazione massima di polvere il calo era molto meno accentuato rispetto al *Sistema 1* e non dava quindi luogo alla formazione di un picco. Questo consentiva di avere dei tempi sufficientemente lunghi per



(a) *Sistema 2* caricato con 60 semi conciati con Clothianidin.



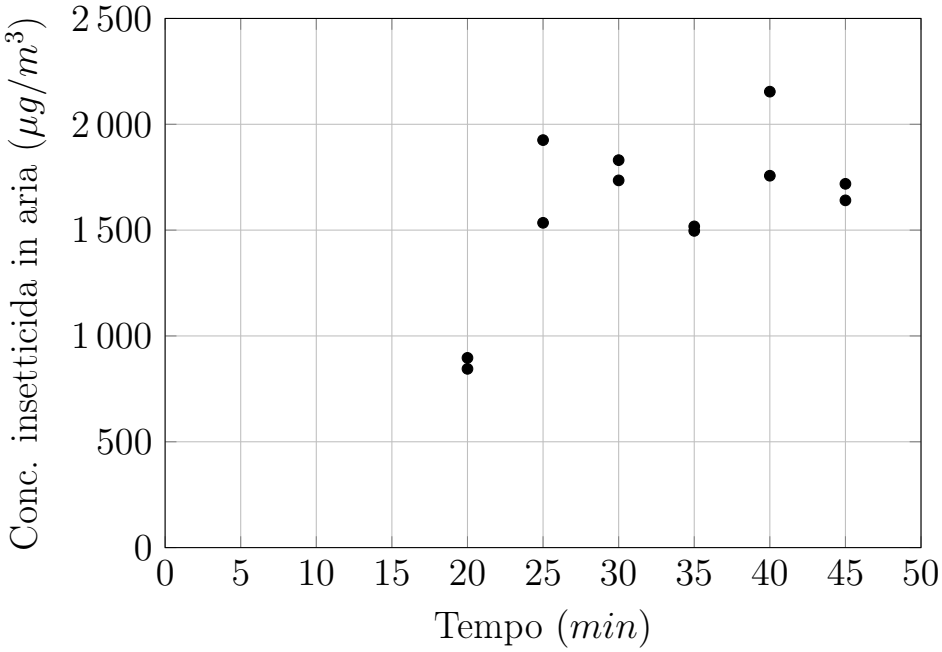
(b) *Sistema 3* caricato con 20 semi conciati con Clothianidin.

Figura 3.3: Confronto tra la concentrazione di insetticida raggiungibile con il *Sistema 2* e il *Sistema 3*.

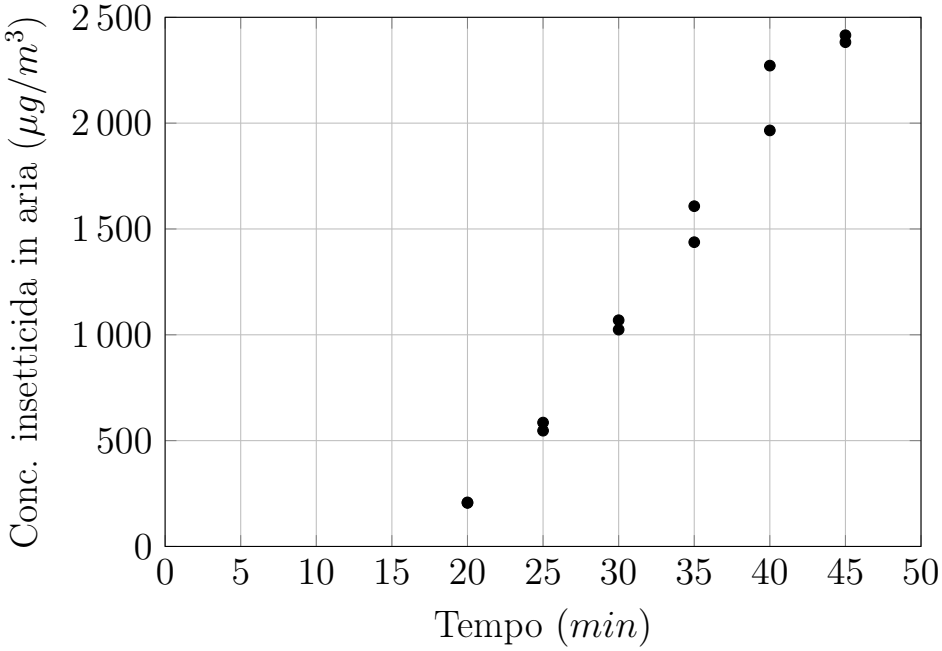
Tabella 3.2: Tempi di attesa per il raggiungimento di una zona stabile di concentrazione, utilizzando il *Sistema 3*, al variare del numero di semi utilizzati. Sementi conciate con Clothianidin.

№ semi	Tempo di attesa (min)
3	40
6	25
12	20
20	15

l'esposizione delle api a condizioni praticamente identiche. Per questo motivo il *Sistema 3* è stato scelto per le prove successive di produzione del particolato e per i test di tossicità degli insetticidi.
Questo sistema è stato utilizzato mescolando i semi per un certo tempo (diverso a seconda del numero di semi e del tipo di concia, Tabella 3.2) fino al raggiungimento di una concentrazione stabile e in seguito cominciando l'esperimento di esposizione delle api. Ad esempio, nell'esperimento di Figura 3.4a, 12 semi sono stati mescolati per 15 minuti e in seguito si è cominciato il campionamento delle polveri. Si osserva che la concentrazione è sufficientemente stabile nei 30 minuti successivi, che vengono infatti sfruttati per l'esposizione delle api.
Attraverso prove di questo tipo si sono quindi stabiliti quelli che sono i tempi di latenza del dispositivo, operante con diverse quantità di semi conciati con Clothinidin e i risultati sono riportati in Tabella 3.2. Tale ritardo è stato particolarmente critico lavorando con 3 semi, in quanto diventava difficile ottenere particolato da così pochi semi. Lavorare in queste condizioni risultava comunque interessante per l'ottenimento di basse concentrazioni, necessarie per la determinazione della DL_{50} del Clothianidin. Per quanto riguarda il Thiacloprid la situazione era molto diversa a causa del differente tipo di concia e della sua minore tossicità nei confronti delle api (vedi paragrafo 3.6.5).
Dalle prime prove sperimentali eseguite con questo sistema si è notato che il posizionamento del tubo di vetro utilizzato per l'aspirazione delle polveri influiva molto sulla loro concentrazione. Dopo una serie di specifici test, è stato quindi posizionato al centro del pallone, configurazione con la quale si sono ottenuti i risultati migliori (Figura 3.4).



(a) Tubo per l'aspirazione posizionato a metà pallone.



(b) Tubo per l'aspirazione posizionato sul fondo del pallone.

Figura 3.4: Andamento, nel tempo, della concentrazione di insetticida in aria con diversi posizionamenti del tubo di vetro nel *Sistema 3*. Esperimenti condotti con 12 semi conciati con Clothianidin.

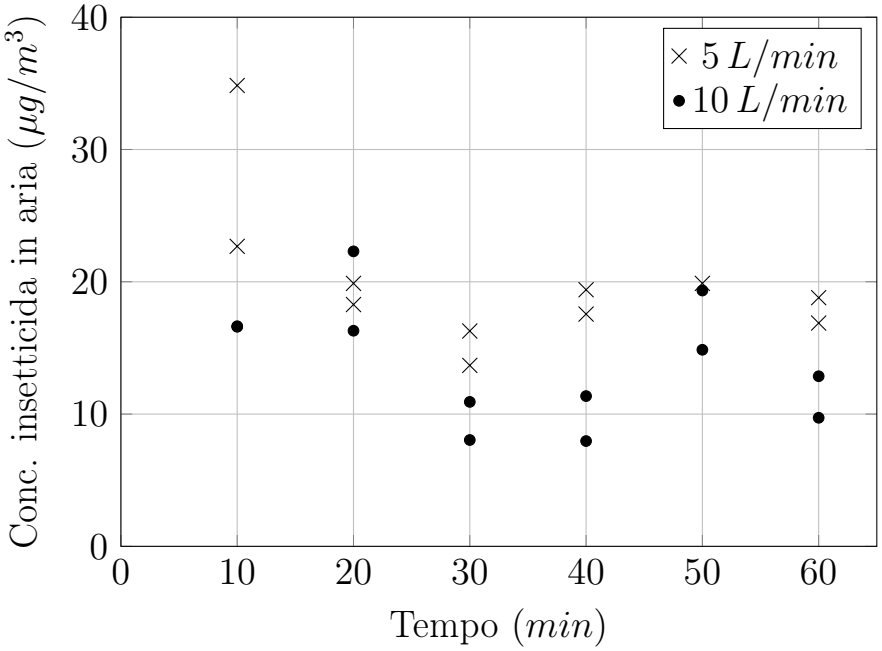


Figura 3.5: Particolato prodotto impiegando differenti flussi di aspirazione dell'aria, utilizzando il *Sistema 2* caricato con 60 semi conciati con Clothianidin.

3.3 Ottimizzazione delle condizioni di lavoro

Durante le prove di funzionamento dei diversi set sperimentali si è determinato come alcuni parametri di lavoro incidevano sulla produzione del particolato da semina. Particolare attenzione è stata posta al flusso d'aspirazione e al numero di semi utilizzato per la produzione della polvere.

3.3.1 Flusso di aspirazione dell'aria

Dalle prove effettuate si è osservato che il flusso di aspirazione non modificava in modo significativo le concentrazioni di insetticida presenti nel flusso d'aria (Figura 3.5). Nei filtri si è misurata una quantità maggiore di insetticida quando si sono utilizzati flussi più elevati. Infatti a flussi più alti è possibile asportare anche particelle più grosse, grazie alla maggiore velocità dell'aria. Tuttavia ad un aumento della massa di particelle raccolte sul filtro, corrispondeva anche un maggiore volume d'aria in cui queste venivano diluite. Non sono quindi state osservate variazio-

Tabella 3.3: Concentrazione dell'insetticida Clothianidin al variare del numero di semi introdotti nel sistema. Questi esperimenti sono tutti stati condotti con il *Sistema 3*, ad un flusso di 10 L/min.

№ semi	Concentrazione massima ($\mu g/m^3$)
3	142
6	647
12	1588
20	3358

ni significative nella concentrazione delle polveri a flussi diversi tra 5 e 10 L/min. Sebbene questo parametro non si sia rivelato molto interessante per quanto riguarda la regolazione delle polveri in aria, esso ha acquistato molta importanza per quanto riguarda la dose di insetticida che si deposita sull'ape, come verrà descritto nel paragrafo 3.6.1.

3.3.2 Numero di semi introdotti nel sistema

Il numero di semi soggetti ad abrasione incideva in modo molto evidente sulla quantità di polvere che il sistema poteva produrre. Lavorando con molti semi si raggiungevano concentrazioni maggiori, arrivando comunque ad un limite massimo imposto dal setting sperimentale (come visto per il *Sistema 2*). Questa proprietà è stata sfruttata per modulare la concentrazione di insetticida nel flusso d'aria e modificare le dosi di fitofarmaco somministrate alle api, come mostrato in Tabella 3.3.
Parzialmente il numero di semi modificava anche la velocità di erosione, come precedentemente riportato per il *Sistema 3*: si è visto infatti che lavorando con pochi semi aumentava il tempo di raggiungimento della massima concentrazione di polvere. Questo effetto era visibile anche lavorando con il *Sistema 1*, dove aumentando il numero di semi era possibile anticipare il picco di concentrazione della polvere. Tuttavia questo effetto era molto meno evidente rispetto all'effetto provocato della velocità di rotazione della catena.

3.4 Concentrazione di insetticida lungo la linea di esposizione

Nel corso degli esperimenti è stata valutata l'omogeneità nella concentrazione di insetticida lungo la linea di esposizione delle api, attraverso dei campionamenti del particolato in diversi punti della linea. Dai risultati, riportati in Tabella 3.4, si nota un calo nella concentrazione dell'insetticida lungo la linea di esposizione, probabilmente dovuto ad un deposito delle particelle lungo le pareti del condotto.
In tutti gli esperimenti per la determinazione della DL_{50} le api sono state collocate nella prima metà della linea per l'esposizione e sperimentavano quindi una concentrazione di insetticida variabile in funzione della loro posizione nella provetta. Bisogna comunque considerare che le api tendevano a muoversi e a scambiarsi di posizione durante l'esposizione e questo ha garantito una distribuzione di insetticida sufficientemente omogenea all'interno del gruppo di api.
A questo punto è necessario precisare che quando si fa riferimento alla concentrazione di insetticida a cui sono state esposte le api, si fa sempre riferimento ad una concentrazione misurata all'inizio della linea di esposizione. Queste misure non possono essere contestuali all'esposizione delle api e quindi si è sempre eseguito un campionamento prima e dopo l'esposizione delle api alla polvere.

Tabella 3.4: Concentrazione di insetticida lungo la linea di esposizione. Per questi esperimenti è stato utilizzato il *Sistema 2* operando ad un flusso di 10 L/min (nd = dato non disponibile).

№ semi	Concentrazione clothianidin ($\mu g/m^3$)		
	Inizio linea di esposizione	Metà linea di esposizione	Fine linea di esposizione
15	$16,2$	$6,0$	nd
30	$25,8$	$10,8$	nd
60	$32,1$	nd	$13,0$

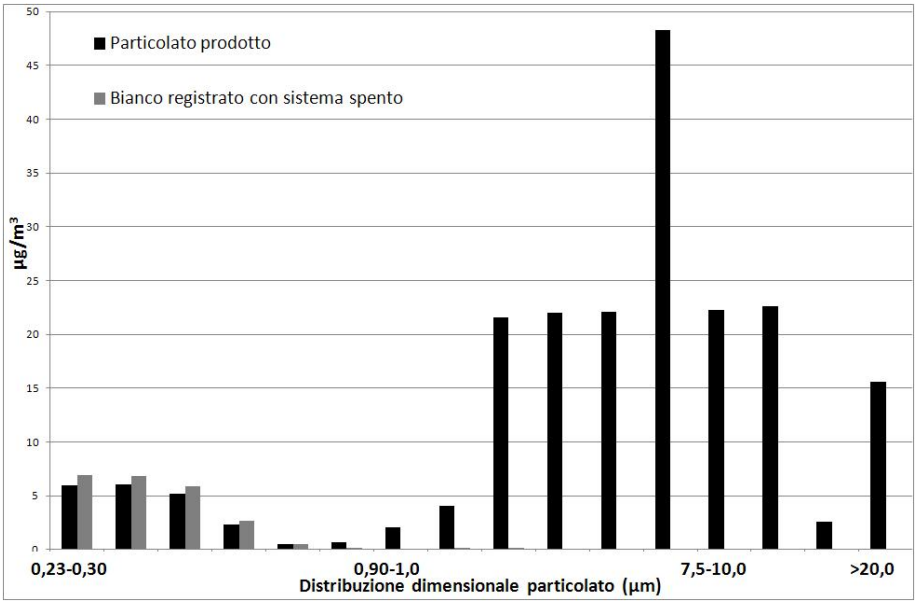


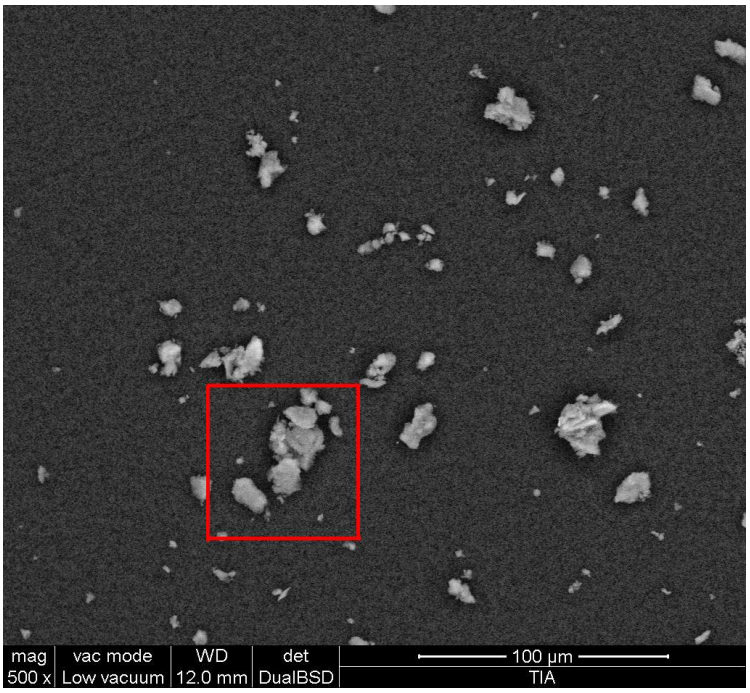
Figura 3.6: Distribuzione dimensionale del particolato da semina misurata con l'Optical Particel Counter. Le particelle costituenti il particolato da semina sono tutte di dimensioni maggiori o uguali a $1,0\ \mu m$.

3.5 Dimensioni del particolato

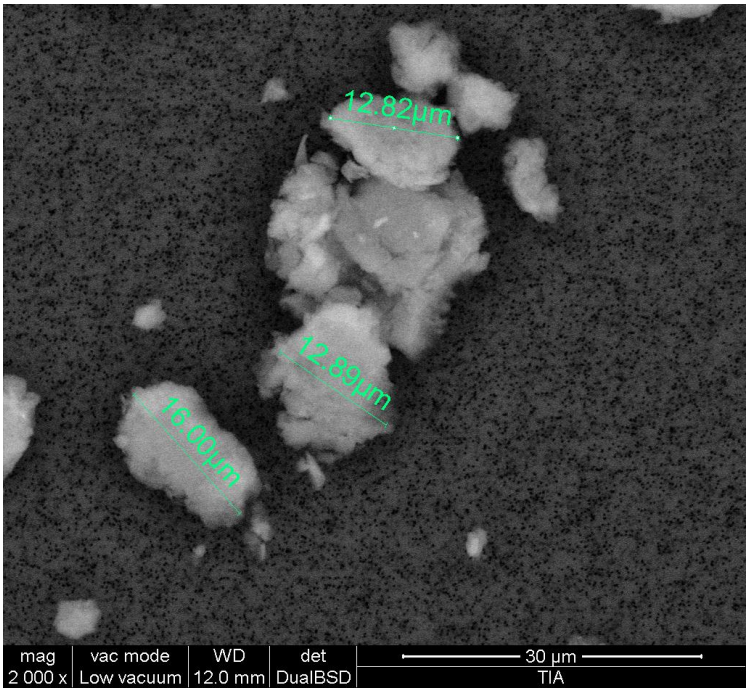
Tramite una strumentazione OPC è stata determinata la distribuzione dimensionale del particolato prodotto (Figura 3.6). Inizialmente l'intenzione era quella di utilizzare l'OPC per monitorare in tempo reale la concentrazione di polveri prodotte, ma si è rivelato impossibile un utilizzo continuativo di questo strumento. Infatti a concentrazioni così elevate di particolato lo strumento ha mostrato evidenti limiti (occlusione della linea di campionamento e mancanza di riproducibilità) e ha smesso di funzionare correttamente. Si è quindi abbandonato l'utilizzo di questo strumento per non comprometterne la funzionalità.

É stata eseguita anche una misura attraverso il microscopio elettronico a scansione. In questo modo sono state valutate visivamente le dimensioni delle particelle costituenti il particolato, che sono risultate di misura variabile, come visibile in Figura 3.7a. Si riporta anche la determinazione delle dimensioni di alcune delle particelle osservate in Figura 3.7b.

Per verificare che le particelle visionate al SEM fossero effettivamente provenienti dalla pellicola del seme si è analizzato il loro spettro di emissione X, facendo riferimento ai segnali relativi agli atomi di cloro e zolfo

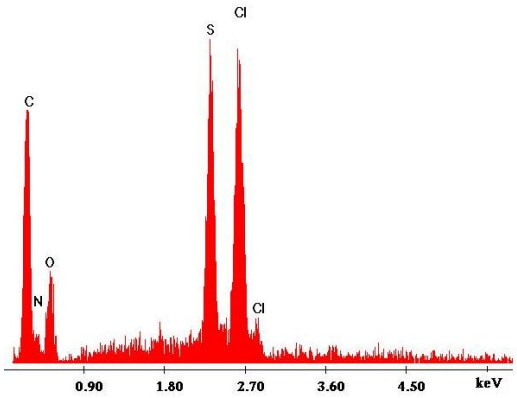


(a) In questa immagine sono visibili particelle di varie dimensioni.

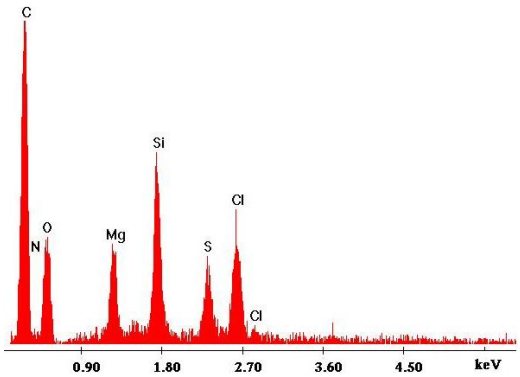


(b) Ingrandimento della zona evidenziata in rosso nella figura a e misura delle dimensioni di alcune particelle.

Figura 3.7: Immagini relative a particelle provenienti da semi conciati con Thiacloprid visionate al SEM.



(a) Spettro di emissione ai raggi X delle particelle osservate al SEM relative al Clothianidin.



(b) Spettro di emissione ai raggi X delle particelle osservate al SEM relative al Thiacloprid.

Figura 3.8: Spettro di fluorescenza X delle particelle costituenti il particolato da semina.

(Figura 3.8a e 3.8b). Infatti gli insetticidi studiati contengono questi elementi, che consentono di distinguere le particelle provenienti dalla concia del seme di mais rispetto a quelle costituite da materiale organico, metalli o vetro; dato che questi materiali sono caratterizzati da un differente spettro di emissione X, sprovvisto di questi segnali caratteristici.
Dalle misure effettuate sia con l'OPC che al SEM, il particolato si conferma essere di tipo grossolano, formato essenzialmente da particelle di dimensioni superiori a 1 μm. Tale distribuzione dimensionale è in perfetto accordo con quanto registrato in campo nel corso della semina del mais conciato mediante seminatrici pneumatiche.[30] Questo risultato era atteso, in quanto si tratta di particolato formatosi per erosione meccanica.
Inoltre conferma che il dispositivo di produzione delle polveri di concia qui ottimizzato, riproduce le condizioni emissive di campo e ne giustifica il suo utilizzo per i test di tossicità.

Tabella 3.5: Confronto tra le quantità di insetticida catturate dalle api nel corso di esperimenti di esposizione condotti a flussi diversi. Tempo di esposizione dell'ape 2 minuti, utilizzando il *Sistema 2*.

Flussi (L/min)	Principio attivo per ape (ng/ape)
5	157
10	363
20	211

3.6 Esposizione delle api al particolato

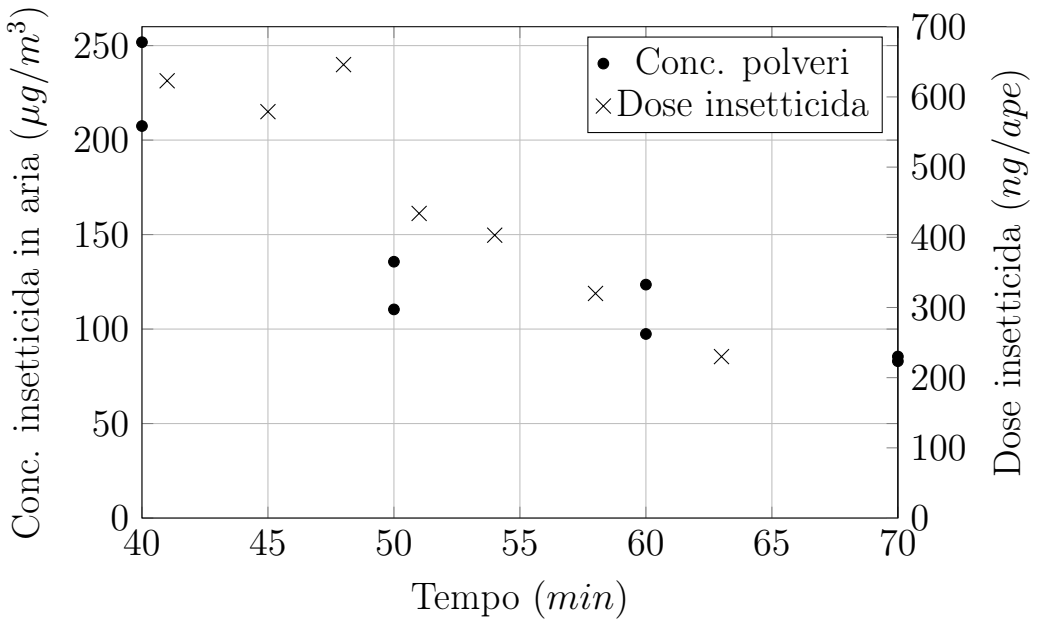
Come prevedibile, sono molte le variabili che influiscono sulla quantità di insetticida che si deposita sull'ape nel corso degli esperimenti di laboratorio; pertanto ne è stato valutato l'effetto al fine di modulare la dose di fitofarmaco somministrata all'ape. Le principali variabili che incidono sulla quantità di insetticida che si deposita sull'ape sono: flusso d'aspirazione, concentrazione delle polveri, tempo d'esposizione e numero di api esposte contemporaneamente.

3.6.1 Flusso d'aspirazione dell'aria

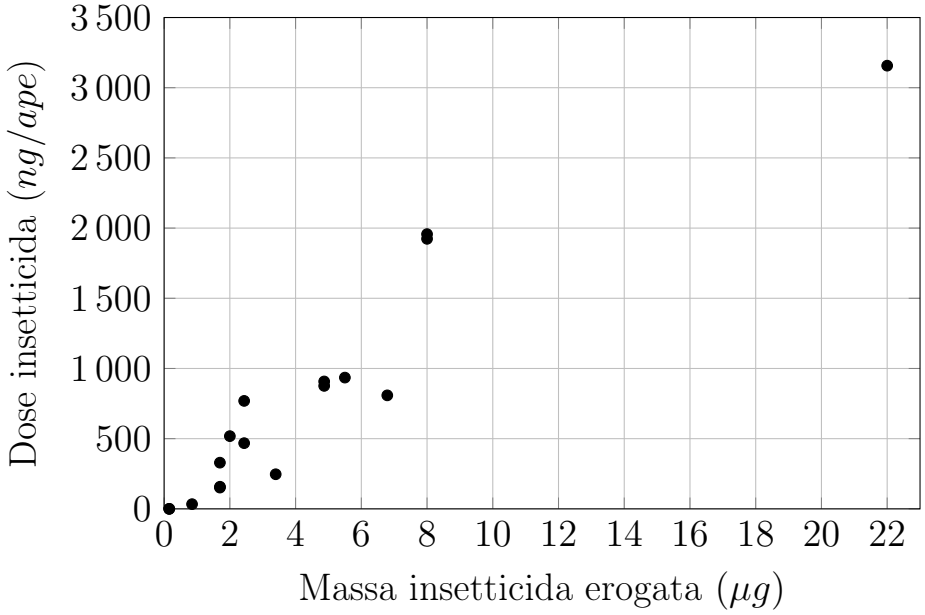
Nei test di esposizione delle api il flusso d'aspirazione è risultato un parametro molto importante, in quanto aumentando il flusso (e quindi la velocità dell'aria), variano significativamente le quantità di insetticida che si depositano sull'ape a parità di concentrazione (Tabella 3.5).
A riguardo sono stati fatti degli esperimenti a flussi diversi tra 5 e 20 L/min per cercare di capire come variava la quantità di insetticida depositato sull'ape. Si è deciso infine di lavorare a 10 L/min, dato che permetteva di aumentare la quantità d'insetticida depositata sull'ape rispetto ai 5 L/min. A flussi maggiori non sono stati osservati ulteriori guadagni sulla quantità di insetticida, ma le dosi diventavano meno riproducibili e con una maggiore variabilità all'interno del gruppo di api esposte.

3.6.2 Concentrazione delle polveri

Si è osservata anche un'importante correlazione tra la concentrazione di insetticida nel flusso d'aria e la dose di principio attivo presente sull'ape



(a) In questo grafico è visibile come ad un calo della concentrazione di insetticida, corrisponda una forte diminuzione nella quantità di fitofarmaco sull'ape. Api esposte per 1 minuto con il *Sistema 1*, caricato con 12 semi conciati con Clothinidin.



(b) In questo grafico sono raccolti i risultati di diversi esperimenti condotti con il *Sistema 3*, caricato con 6 semi conciati con Clothianidin. Le api sono state esposte per tempi diversi e la massa erogata viene calcolata come $massa = conc\ (\mu g/m^3) \cdot flusso\ (m^3/min) \cdot tempo\ esposizione\ (min)$. Sono state esposte 8 api di cui ne venivano analizzate due, mediando il risultato ottenuto.

Figura 3.9: Dipendenza della dose di insetticida somministrata all'ape in funzione della concentrazione di principio attivo nel flusso d'aria.

in seguito all'esposizione. Questo è stato osservato sia lavorando con un diverso numero di semi, sia sfruttando il calo nella concentrazione delle polveri che si riscontra negli esperimenti con il *Sistema 1* (Figura 3.9). Informazioni di questo tipo sono state ottenute per i vari sistemi impiegati, permettendo di dosare l'insetticida nei diversi esperimenti di esposizione delle api, in funzione della quantità di semi utilizzati. Ciò ha permesso, con il medesimo sistema, di somministrare alle api dosi di insetticida in un ampio intervallo di concentrazione. Inoltre è possibile quantificare gli effetti tossici di fitofarmaci con tossicità molto diverse, come nel caso di Clothianidin e Thiacloprid.

3.6.3 Tempo di esposizione delle api

Durante uno stesso esperimento si è potuto dosare la quantità d'insetticida anche variando i tempi di esposizione delle api (Figura 3.10). Tuttavia sopra i 3 minuti di esposizione non sempre si ha un aumento nella quantità di insetticida catturato dalle api. Per tale ragione, solitamente le esposizioni avevano una durata variabile da $0,5$ a 3 minuti. In conclusione va sottolineato che la variazione dei tempi di esposizione non è sufficiente per somministrare le dosi necessarie a coprire tutto il range di concentrazioni utili al completamento del test di mortalità. Bisogna infatti in primo luogo sfruttare diverse concentrazioni di polvere, agendo sul numero di semi, e solo per regolazioni di minore entità conviene agire sul tempo di esposizione.

3.6.4 Numero di api esposte contemporaneamente

Il numero di api che venivano inserite nella provetta per procedere all'esposizione, incideva fortemente sulla quantità di insetticida catturata da ogni ape (Figura 3.11). Lavorare con un numero elevato di api esposte contemporaneamente era necessario per avere sufficienti campioni per il test di mortalità e per la quantificazione della dose. I risultati sperimentali hanno dimostrato che è fondamentale lavorare ad elevate concentrazioni di insetticida, per poter applicare una sufficiente quantità di polvere su tutto il gruppo di api esposte.
Si sottolinea infine che le condizioni scelte per l'esposizione delle api in laboratorio non sempre possono riprodurre la reale situazione di campo, ma

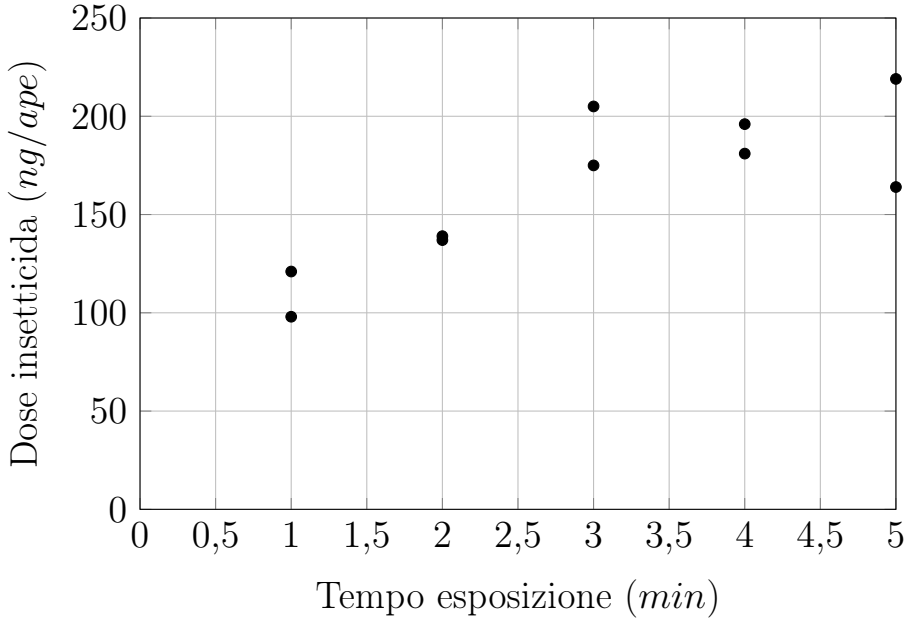


Figura 3.10: Dosi differenti di insetticida applicate alle api sfruttando diversi tempi di esposizione. *Sistema 1*, 12 semi conciati con Clothianidin, flusso 10 L/min.

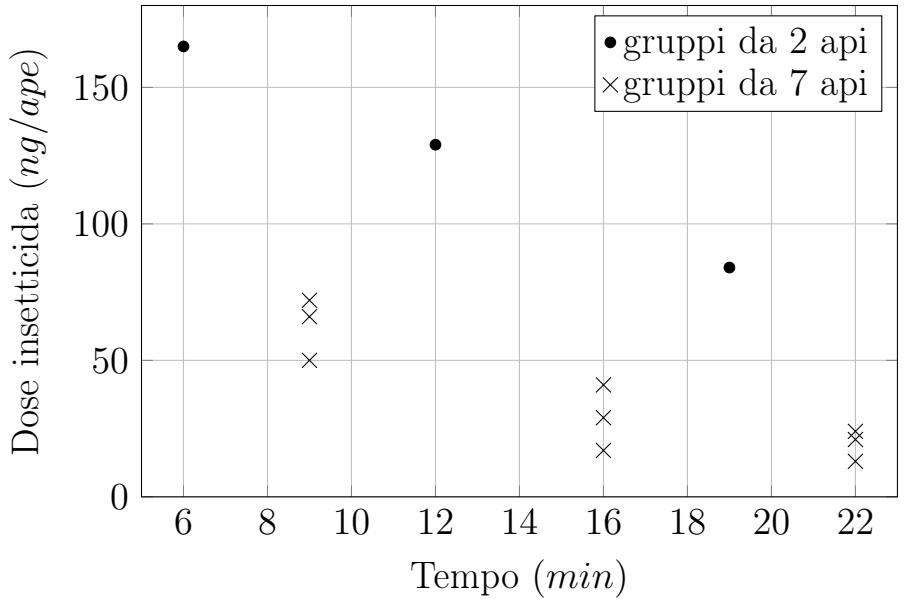


Figura 3.11: Grafico riguardante un esperimento dove sono state alternate api esposte in gruppi da 7 ed api esposte in coppia. É ben visibile come con 7 api diminuisca molto la quantità d'insetticida depositata su ognuna di esse. Delle api esposte in coppia ne è stata analizzata una sola, mentre delle api esposte in gruppi da 7 ne sono state analizzate 3. *Sistema 2* caricato con 60 semi conciati con Clothianidin, flusso 10 L/min.

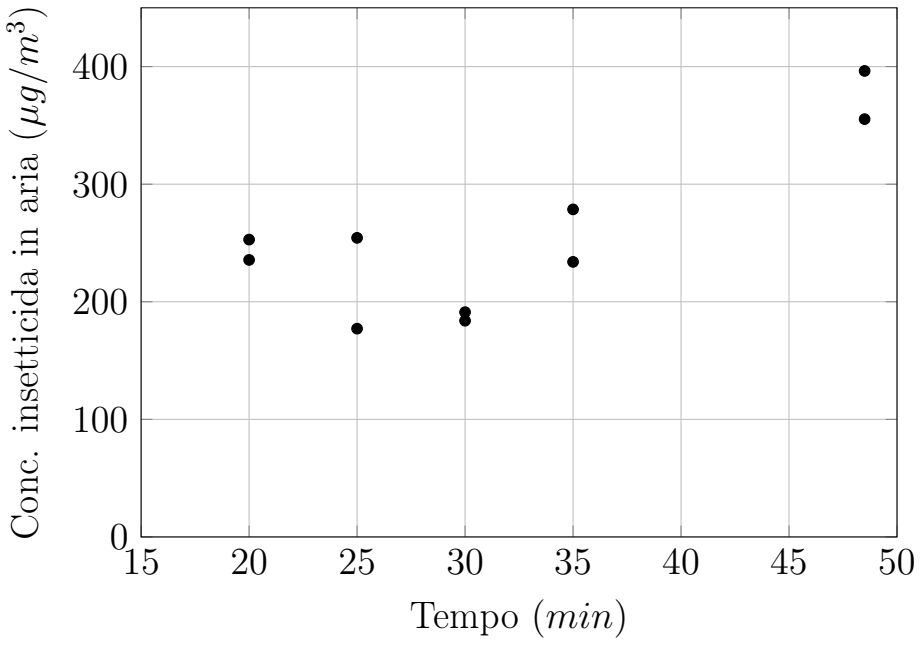


Figura 3.12: Risultato ottenuto mescolando 6 semi per 15 minuti e successivamente continuando l'esperimento con soli 3 semi. Flusso di 10 L/min, *Sistema 3* caricato di semi conciati con Clothianidin.

sono invece ottimizzate per quantificare l'effetto tossico del particolato da semina.

3.6.5 Condizioni finali utilizzate

Regolando in modo opportuno queste variabili è stato possibile contaminare l'ape con pochi ng o alcune decine di μg di principio attivo, coprendo quindi un range di concentrazioni molto vasto. Inoltre questo avveniva in modo sufficientemente prevedibile da consentire una pianificazione dei test di tossicità, che richiedono dosaggi differenti in grado di provocare diverse percentuali di mortalità nel campione di api esposte.
In conclusione, per gli esperimenti di esposizione si è convenuto di utilizzare sempre il *Sistema 3*, operando con un flusso di 10 L/min, con una quantità di semi variabile in base al tipo di concia e alle concentrazioni di insetticida desiderate.
Per gli esperimenti riguardanti il Clothianidin sono stati sufficienti pochi semi per raggiungere alte concentrazioni di polvere. Già con 6 semi infatti si ottenevano concentrazioni che causavano una mortalità del 100 %

nel campione di api. Ovviamente ciò è anche in relazione alla tossicità dell'insetticida e non solo all'entità del processo erosivo che porta alla formazione di polvere. Va comunque considerato che la concia presente su queste sementi risale a quattro anni fa, auspicando che nel frattempo le tecniche di concia siano state modificate e migliorate per ridurre l'emissione di polveri da parte delle seminatrici.
Negli esperimenti in cui si volevano applicare dosi elevate di Clothianidin sono stati utilizzati 6 semi mescolati per 25 minuti fino al raggiungimenti di una concentrazione relativamente stabile di polveri. Operando in questo modo si ottiene un elevato impolveramento dell'ape, che provoca una elevata percentuale di mortalità nel campione. Per ottenere una mortalità minore (inferiore al 50 %) si sono dovute modificare leggermente le condizioni sperimentali, in modo da ottenere concentrazioni di insetticida minori: 6 semi venivano mescolati per 15 minuti per produrre sufficiente polvere e in seguito ne venivano tolti 3, continuando l'esperimento con soli 3 semi. In questo modo si evitavano lunghi tempi d'attesa, necessari quando si lavorava con solo 3 semi, ma si potevano ugualmente ottenere concentrazioni significativamente più basse e relativamente stabili (Figura 3.12).
I semi conciati con Thiacloprid, di produzione più recente (2014), hanno una concia molto più resistente all'abrasione e si è quindi dovuto lavorare con un elevato numero di semi e con lunghi tempi di attesa, per ottenere concentrazioni di insetticida sufficientemente elevate. Inoltre per ottenere un elevata mortalità con questo fitofarmaco sono risultate necessarie concentrazioni di principio attivo in aria molto più alte (Figura 3.13), dato che si è confermato essere molto meno tossico per le api rispetto al Clothianidin. Con soli 6 semi non si otteneva praticamente formazione di polvere e ne servivano molti più semi per ottenere la forza abrasiva necessaria alla formazione di particolato in quantità significativa. Questo ci induce a pensare che anche in campo i semi conciati con Thiacloprid siano molto meno pericolosi di quelli conciati con Clothianidin, in quanto producono meno polvere e, aspetto non trascurabile, contengono un insetticida a minor tossicità.
Per raggiungere alte concentrazioni di polvere sono stati necessari 60 semi mescolati per almeno 30 minuti, con i quali però non si è lavorato in un intervallo stabile di concentrazione (Figura 3.14).

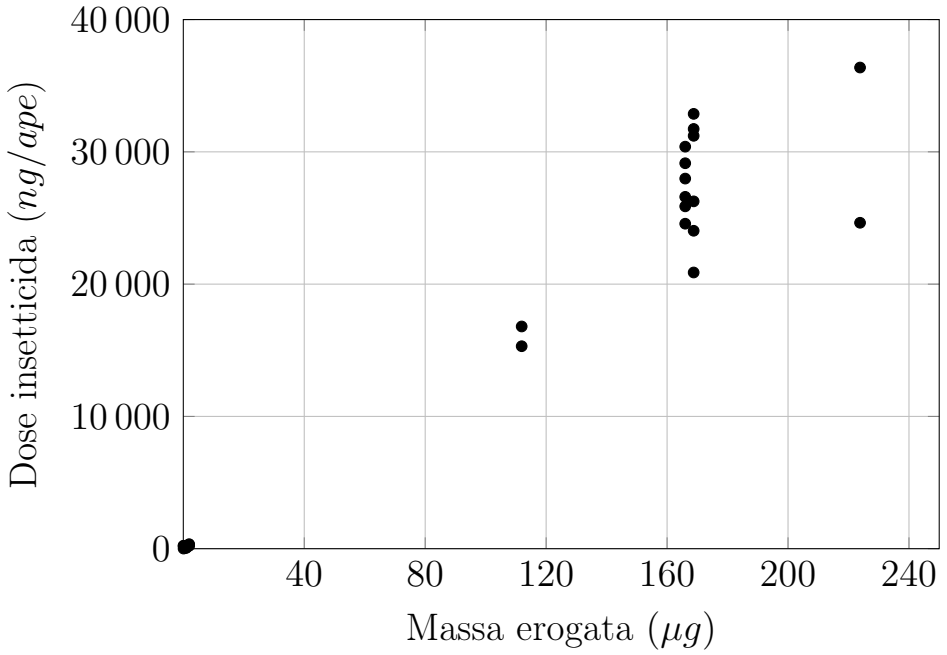


Figura 3.13: Dose somministrata all'ape in funzione della massa erogata. Risulta evidente che con il Thiacloprid è stato necessario lavorare con quantitativi molti più elevati di insetticida (vedi Figura 3.9b).

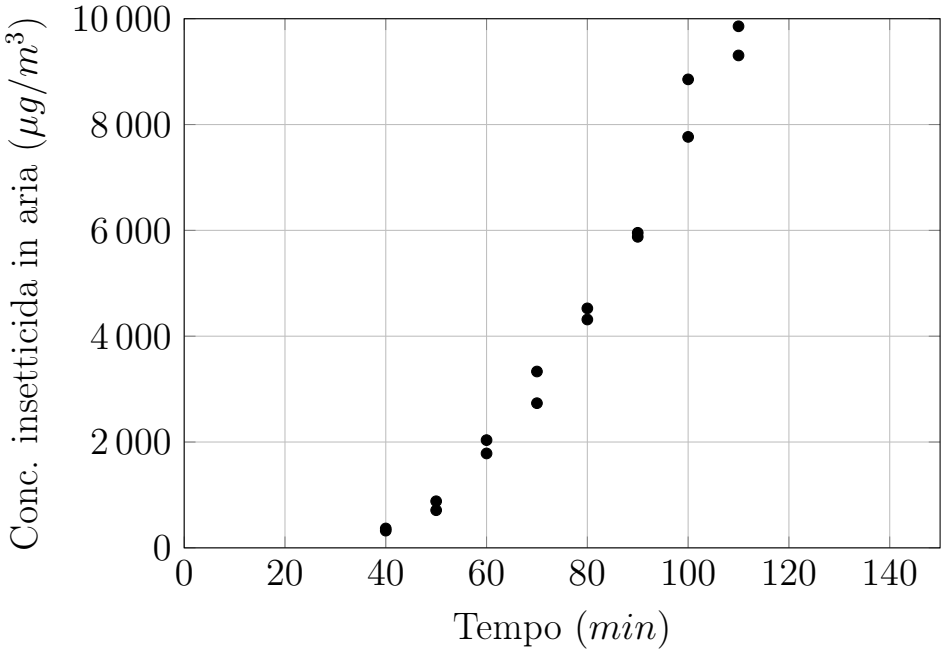


Figura 3.14: Produzione di particolato contenente Thiacloprid, ottenuto con 60 semi a un flusso di 10 L/min. É stato qui utilizzato il *Sistema 3* caricato con semi conciati con Thiacloprid.

Tabella 3.6: Tossicità acuta per le api degli insetticidi studiati, determinati tramite i test di mortalità e calcolati con il metodo probit.

Principio attivo	Condizione	DL_{50} (ng/ape)	Intervallo di fiducia al 95 % (ng/ape)
Clothianidin	secco	408	$273 - 659$
	umido	89	$37 - 131$
Thiacloprid		$24,8 \cdot 10^3$	$(19,7 - 33,6) \cdot 10^3$

3.7 Determinazione della DL_{50}

A conferma di quanto era già stato evidenziate con le esposizione delle api in campo[25], anche nei test di laboratorio, lavorando con il Clothianidin si è osservata un'importante differenza tra le api tenute, dopo l'esposizione, in condizioni di elevata umidità e quelle tenute ad umidità ambiente. I dati ricavati nelle diverse condizioni sono quindi stati trattati separatamente (Figura 3.16). É visibile una diversa risposta delle api all'insetticida nelle due condizioni, in particolare queste risultano molto più sensibili quando tenute in condizioni di elevata umidità. Dai dati sperimentali si è riusciti a determinare la DL_{50} per ognuna di queste due condizioni e tali valori confermano la pericolosità di questo prodotto. Si dimostra infatti che il particolato da semina è tossico per le api, in particolare in condizioni di elevata umidità atmosferica, per dosi di esposizione che facilmente si realizzano in campo.

In Figura 3.15 si riportano i dati elaborati con il metodo probit, dove la diversa risposta all'insetticida è rappresentata dalla diversa pendenza della retta di regressione lineare. I valori delle DL_{50} ottenuti con il metodo probit sono riportati in Tabella 3.6 (il metodo probit, utilizzato per la determinazione della DL_{50}, è illustrato nell'appendice B).

La diversa risposta all'insetticida può essere associata alla capacità dell'ape di ripulirsi dalla polvere che gli viene applicata.[25] Si suppone che possa farlo più facilmente in condizioni di bassa umidità (inferiore al 70 % UR), mentre in saturazione d'umidità la sua pulizia risulterebbe meno efficacie. Infatti il materiale proveniente dalla concia del seme potrebbe assorbire l'acqua e aderire meglio al corpo dell'ape, che non sarebbe più in grado di ripulirsi. Questo potrebbe tradursi in una maggiore sensibilità all'insetticida, per mancanza (o inibizione) di un meccanismo

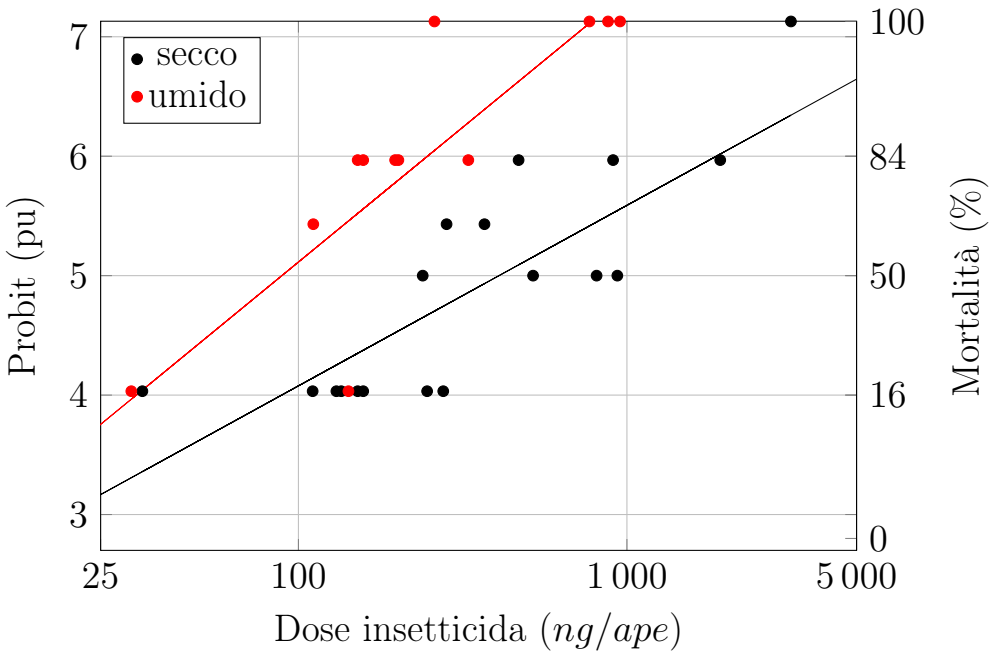
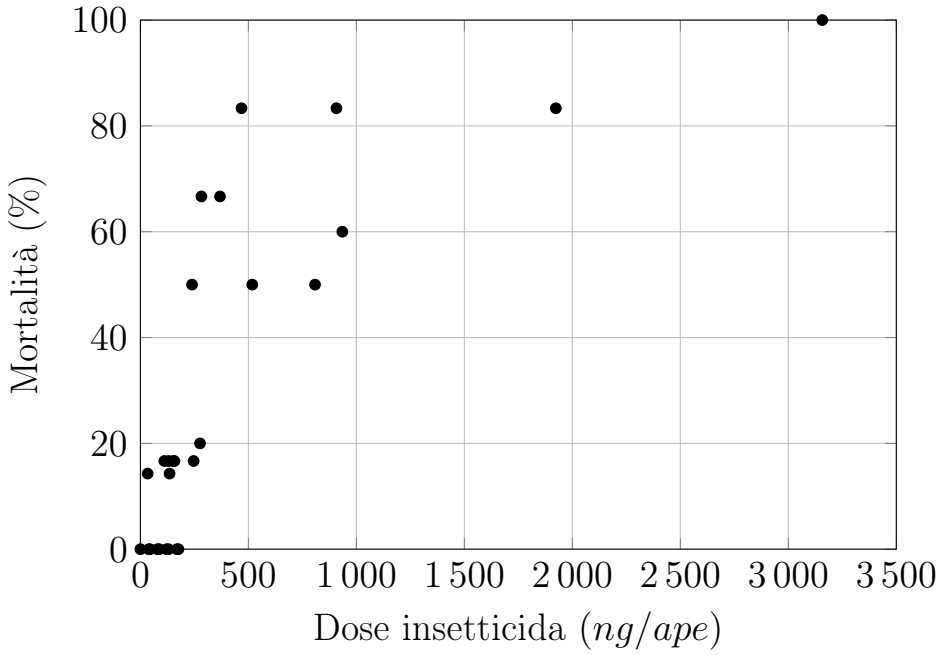


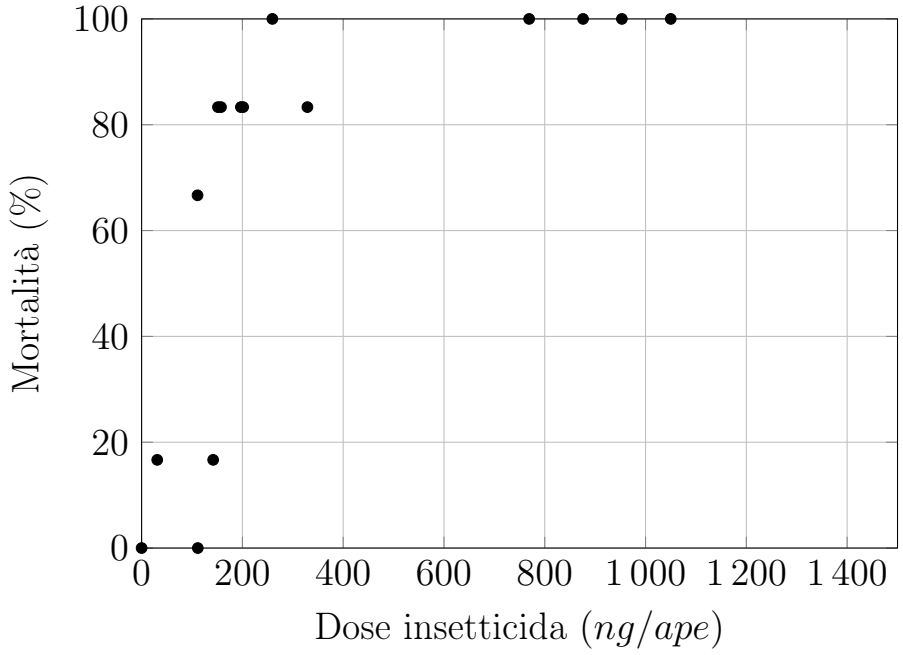
Figura 3.15: Elaborazione dei dati relativi al Clothianidin col metodo probit. La dose (in ascissa) è riportata in scala logaritmica.

di detossificazione. Tale ipotesi potrà essere meglio studiata con il sistema messo a punto durante questo lavoro di tesi, allo scopo di verificarne la veridicità e di quantificarne l'effetto.

Il Thiacloprid invece si è confermato molto meno tossico per le api, come del resto è indicato in letteratura (Tabella 1.3 a pagina 10). Con questo insetticida non si è riusciti ad identificare una differenza di tossicità tra le due diverse condizioni di umidità. In generale il test di mortalità è risultato meno preciso e l'effetto dose risposta ottenuto è meno chiaro rispetto agli esperimenti condotti con il Clothinidin (Figura 3.17). Questo può essere spiegato attraverso la capacità dell'ape di pulirsi dalla polvere, che diventa più rilevante per quantità così elevate di insetticida (e di polvere). Questo fenomeno porta ad una diminuzione dell'accuratezza con cui si determina la dose somministrata, in quanto è probabile che questa non venga valutata correttamente tramite l'analisi UHPLC-DAD. Inoltre, essendo questo un principio attivo notevolmente meno tossico, potrebbero intervenire anche processi di smaltimento dell'insetticida ad opera del metabolismo dell'ape. L'insieme di questi fattori causa una minore precisione nel test biologico di mortalità, che



(a) Condizione secco: umidità inferiore al 70 %



(b) Condizione umido: saturazione di umidità

Figura 3.16: Mortalità relativa (%) al variare della quantità di Clothianidin depositata sull'ape, nelle diverse condizioni di umidità.

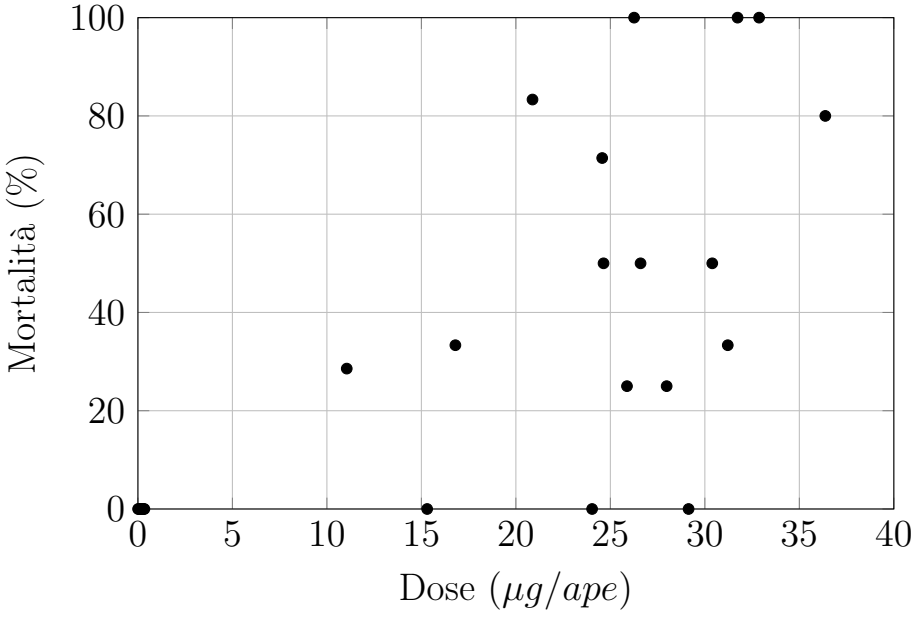


Figura 3.17: Mortalità relativa (%) al variare della quantità di Thiacloprid depositata sull'ape.

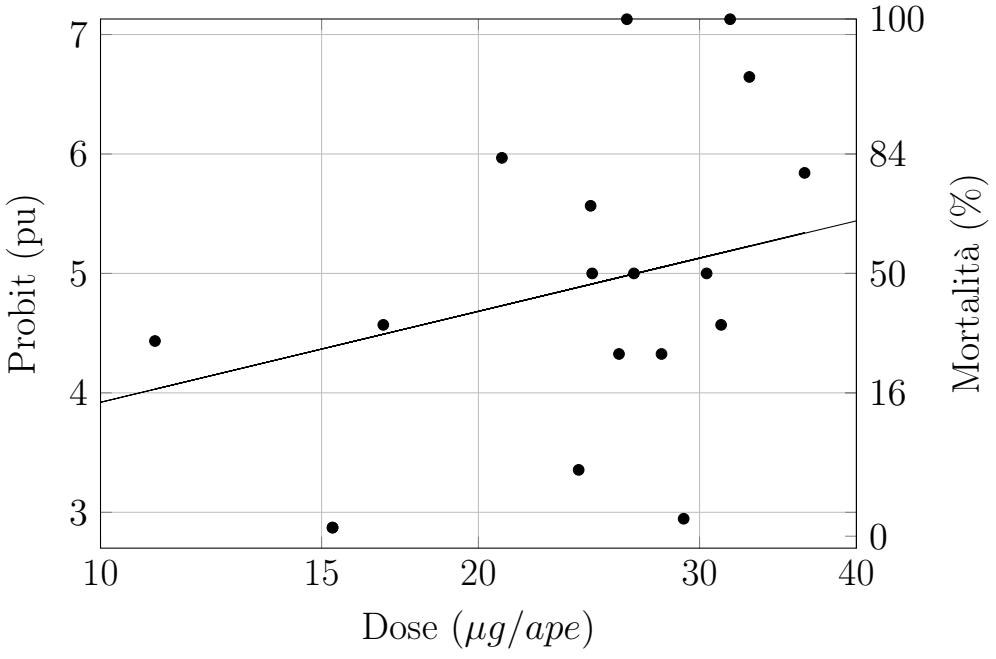


Figura 3.18: Elaborazione dei dati relativi al Thiacloprid col metodo probit. La dose (in ascissa) è riportata in scala logaritmica.

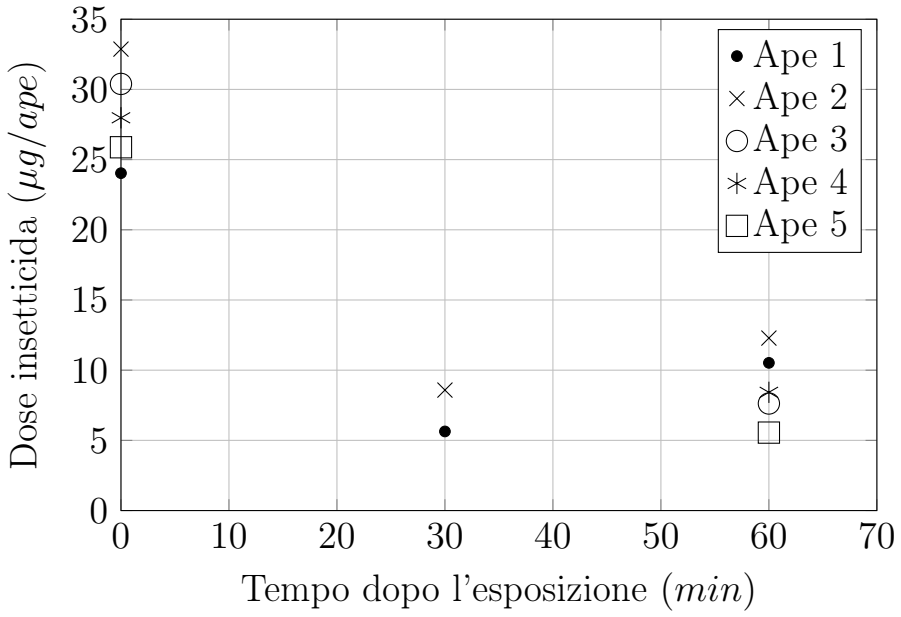


Figura 3.19: Quantità di Thiacloprid presente sull'ape misurata a tempi diversi dopo l'esposizione. Si nota che dopo 30 minuti l'ape si è già liberata di una buona parte dell'insetticida.

viene valutata attraverso l'intervallo di fiducia della DL_{50} calcolata con il metodo probit.

Durante gli esperimenti con il Thiacloprid in alcuni casi è stato possibile osservare della polvere rossa sul ripiano in cui venivano appoggiate le gabbie contenenti le api. Queste particelle provenivano sicuramente dalla concia dei semi e se ne deduce che, dopo essere state applicate alle api, queste avevano la possibilità di liberarsene durante i tempi di conduzione del test di mortalità (24 ore).

Il fenomeno della pulizia è stato osservato anche attraverso l'analisi UHPLC-DAD: cinque gruppi da 8 api sono stati esposti all'insetticida, di queste due sono state analizzate immediatamente, mentre altre due sono state analizzate dopo 30 o 60 minuti. In Figura 3.19 è visibile molto chiaramente che le api sono in grado di liberarsi di circa un terzo dell'insetticida che gli è stato somministrato. Queste prove sono servite solo per avere una conferma dell'esistenza del fenomeno, tuttavia utilizzando questo sistema sarà possibile quantificarlo in termini di velocità di pulizia e quantità di insetticida che l'ape è in grado di eliminare attraverso l'azione meccanica.

Nonostante queste difficoltà siamo riusciti a determinare la DL_{50} per il Thiacloprid somministrato attraverso le polveri di concia. Non avendo osservato differenze tra le condizioni di secco e umido i dati sono stati trattati contestualmente. A conclusione di questa sperimentazione sembra emergere che il Thiacloprid non presenti particolari problemi per un suo utilizzo in campo, almeno per quanto riguarda la tossicità delle polveri nei confronti delle api.

Capitolo 4

Conclusioni

Con il sistema messo a punto durante il presente lavoro di tesi è stato possibile ottenere un flusso d'aria contenente particolato da semina, ovvero polveri prodotte per erosione della concia dei semi di mais. Questo sistema si è rivelato utile per eseguire test di tossicità sulle api dei prodotti fitosanitari utilizzati nella concia della sementi ed immessi in atmosfera, in forma di particolato, nel corso delle operazioni di semina.
La concentrazione d'insetticida nel flusso d'aria è stata modulata agendo su diversi parametri sperimentali e il campionamento su filtro, delle polveri prodotte, ha permesso di monitorare il corretto funzionamento del sistema. La successiva analisi dei filtri ha consentito di stabilire con precisione la concentrazione di fitofarmaco a cui sarebbero state esposte le api durante il test di tossicità.
Il dispositivo si è rivelato efficace anche con sementi di recente produzione (semi conciati con Thiacloprid, commercializzati nel 2014), aspetto importante in quanto le moderne tecniche di concia hanno prodotto una pellicola più resistente all'abrasione rispetto a quelle realizzate in passato. In tal caso si è dovuto utilizzare un numero maggiore di semi e tempi di attesa più lunghi, rispetto a sementi con una concia meno recente (semi conciati con Clothianidin, 2010), per ottenere una buona produzione di polvere.
La metodica utilizzata ha permesso di depositare sull'ape l'insetticida sotto forma di polvere proveniente da materiale di concia, coprendo un ampio intervallo di dosaggio. É stato possibile prevedere, entro certi limiti, quali fossero le dosi di fitofarmaco somministrate all'ape. Infatti esponendole alle stesse concentrazioni di insetticida in aria, le dosi di

fitofarmaco presente sull'ape sono risultate sufficientemente riproducibili. Inoltre, sfruttando diversi tempi di esposizione delle api, si sono potute applicare dosi differenti nel corso di uno stesso esperimento.

Accoppiando l'analisi dell'ape al test di mortalità è stato possibile stabilire, successivamente all'esposizione e in modo molto preciso, quanta polvere fosse stata raccolta dall'ape e determinare così l'effettiva dose di fitofarmaco somministrata.

Le condizioni ottimali di lavoro sono risultate le seguenti:

Setting sperimentale: il *Sistema 3* si è rivelato il migliore in termini di stabilità nella concentrazione di insetticida e per capacità di produzione di polvere per erosione della concia dei semi.

Flusso: un flusso di 10 L/min si è rivelato ottimale per quanto riguarda il trasporto delle polveri e la loro applicazione sulle api.

№ api: lavorare con 8 api ha consentito di ottenere un numero sufficiente di replicazioni sia per il test biologico che per l'analisi chimica, riuscendo comunque ad applicare quantitativi elevati d'insetticida ad ogni ape.

Tempo di esposizione: è stato possibile lavorare da $0,5$ a 5 min di esposizione; tuttavia, a tempi maggiori di 3 min non sempre si è ottenuto un aumento nella quantità di insetticida depositata sull'ape.

№ semi: il numero di semi utilizzati ha permesso di dosare la concentrazione delle polveri nel flusso d'aria e quindi la quantità di polvere sull'ape. Si è utilizzato un numero variabile di semi (da 3 a 60 semi), in relazione al tipo di concia e alla tossicità del principio attivo. In relazione al numero di semi utilizzato variava anche il tempo di latenza necessario per ottenere una concentrazione costante di insetticida con il *Sistema 3*.

Umidità: l'umidità a cui vengono mantenute le api, nella fase successiva all'esposizione, si è rivelata essere un parametro molto importante per il test di tossicità. Nel caso del Clothianidin erano visibili chiare differenze, nella risposta all'insetticida in differenti condizioni di umidità, già dopo un ora dall'esposizione. Nel caso del Thiacloprid invece non si sono riscontrate differenze significative.

Una volta ottimizzato il sistema di produzione delle polveri è stato utilizzato per determinare la tossicità di due diversi insetticidi neonicotinoidi utilizzati nella concia del mais: il Clothianidin, attualmente vietato in

Europa perchè considerato tossico per le api e il Thiacloprid, attualmente in uso proprio grazie alla sua minore tossicità per le api. Il presente lavoro di tesi ha pienamente confermato questi dati.
Per il Thiacloprid infatti è stata determinata una DL_{50} (da contatto con le polveri di concia) molto alta: $24,8\ \mu g/ape$. Per il Clothianidin si è riusciti a determinare due diverse DL_{50} per due diverse condizioni di umidità atmosferica: 408 ng/ape per valori di umidità minori del 70% UR e 89 ng/ape in saturazione di umidità. Quindi, per api mantenute, dopo esposizione alle polveri, in saturazione d'umidità la tossicità del Clothianidin è risultata molto più elevata rispetto a quella stimata ad umidità ambiente (inferiore al 70 % UR).
Questi dati supportano l'ipotesi che in situazioni reali di campo possano avvenire gravi fenomeni di moria negli alveari esposti a polveri contenenti Clothinidin. In particolare se si verificano le condizioni peggiori (elevata umidità) sono sufficienti dosi di insetticida facilmente realizzabili in campo per ottenere un'elevata mortalità.
Determinando la DL_{50} di polveri contenenti Clothianidin e Thiacloprid si è potuto esplorare un vasto range di tossicità: questi due insetticidi si trovano infatti agli estremi opposti nella scala di tossicità dei neonicotinoidi. Questo sistema si è quindi rivelato utile sia per testare prodotti altamente tossici per le api, sia prodotti con una bassa tossicità. In generale si è rivelato essere un prezioso strumento per condurre esperimenti di tossicità per contatto di insetticidi e rappresenta un notevole miglioramento rispetto ai test attualmente in uso per la determinazione della tossicità alle polveri concianti.
Inoltre questo test consentirà di quantificare meglio alcuni fenomeni riguardanti le api e gli insetticidi, come la capacità di pulizia dell'ape e la velocità di assorbimento del principio attivo attraverso la cuticola dell'insetto. Infine, questo sistema potrà anche essere utilizzato per studi riguardanti altri importanti insetti impollinatori.

Appendice

A Analisi del Methiocarb e dei suoi metaboliti

Durante questo progetto di tesi è stata messa a punto anche una metodologia analitica per la quantificazione del Methiocarb e dei suoi metaboliti nelle gocce di guttazione del mais. Benchè datato, il Methiocarb è un insetticida emergente in Europa a seguito della sospensione degli insetticidi neonicotinoidi, ma gli studi riguardanti la sua pericolosità per le api sono ancora molto scarsi. In particolare non è ancora stato determinato il contenuto di insetticida nelle guttazioni provenienti da sementi conciate con Methiocarb.

É noto che questo fitofarmaco può subire diversi tipi di degradazione (Figura 1) e in un precedente progetto di tesi sono già stati individuati alcuni suoi metaboliti nelle guttazioni del mais.[14] Tuttavia la mancanza degli standard analitici di Methiocarb sulfone e dei derivati fenolici (Methiocarb fenolo, Methiocarb sulfossido fenolo e Methiocarb sulfone fenolo) ha impedito una completa quantificazione delle sostanze potenzialmente tossiche.

Fino ad ora nelle guttazioni sono stati identificati il Methiocarb sulfossido e, tramite spettroscopia di massa, il Methiocarb sulfossido fenolo. Inoltre in alcune prove di stabilità dello standard Methiocarb sulfone si è osservata una sua degradazione se conservato in acqua, che probabilmente porta alla formazione del relativo fenolo per idrolisi del carbammato.

Risultava pertanto necessaria la quantificazione di Methiocarb, Methiocarb sulfossido, Methiocarb sulfone e dei rispettivi fenoli nelle guttazioni del mais, per comprendere meglio quale sia la pericolosità di questo insetticida per le api. Dei primi tre analiti è possibile reperire lo standard

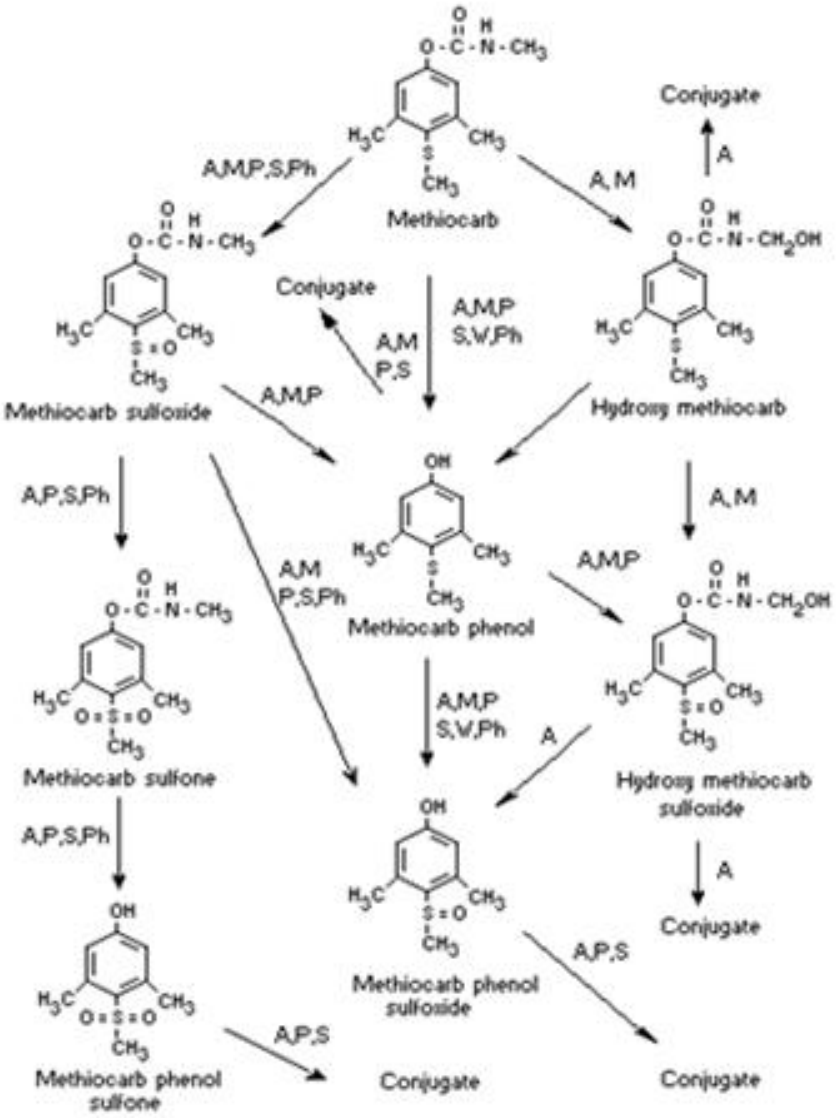


Figura 1: Possibili vie di degradazione proposte per il Methiocarb in animali (A), microorganismi (M), piante (P), suolo (S), e acqua (W) e durante la fotodegradazione (Ph) (FAO, 1999).

Tabella 1: Programma di eluizione.

Tempo (min)	Fase B (%)
$0-3,5$	$0-16,6$
$3,5-4,0$	$16,6-44,4$
$4,0-9,0$	$44,4-50,0$
$9,0-10,0$	$50,0-100$
$10-12$	100
$12-13$	$100-0$
$13,0-16,5$	0

in commercio. Non così per gli standard fenolici che, nell'ambito del presente lavoro, sono stati prodotti per idrolisi del carbammato a partire dal relativo standard di partenza.
La procedura utilizzata per la preparazione degli standard fenolici è stata ricavata da alcuni lavori presenti in letteratura[36][37][38] ed è la seguente:

1. Pesare $2,5$ mg dello standard di partenza e trasferirli quantitativamente in un matraccio da 25 mL in modo da ottenere alla fine una soluzione da 100 mg/L.
2. Aggiungere circa 5 mL di metanolo per sciogliere il composto.
3. Aggiungere 1 mL di una soluzione acquosa di NaOH 1 M.
4. Lasciar reagire nel bagno sonicatore per circa 10 minuti.
5. Acidificare con la quantità necessaria di HCl 1 M fino all'ottenimento di pH neutro o leggermente acido.
6. Portare a volume il matraccio con MeOH.

Per verificare l'esito della reazione la soluzione ottenuta è stata sottoposta ad analisi cromatografica (UHPLC-DAD) operata con lo strumento Shimadzu Prominence UFLC-XR. I seguenti parametri strumentali sono stati adottati: flusso di eluizione di $0,4$ mL/min, 5 μL volume di iniezione, 35 °C temperatura della colonna, segnale al detector UV a $\lambda = 202$ nm, eluente A: 90% acqua MilliQ e 10% acetonitrile, eluente B: 100% acetonitrile. Il metodo di eluizione utilizzato è riportato in Tabella 1.
Grazie all'analisi si è verificato che il composto di partenza ha effettivamente reagito quantitativamente, data la scomparsa del relativo picco cromatografico (Figura 3). Il nuovo picco cromatografico ottenuto viene

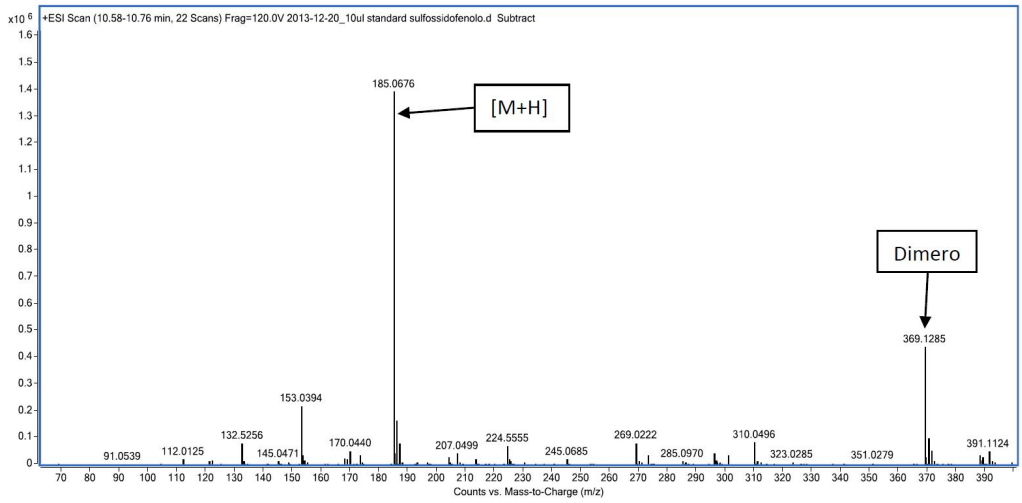
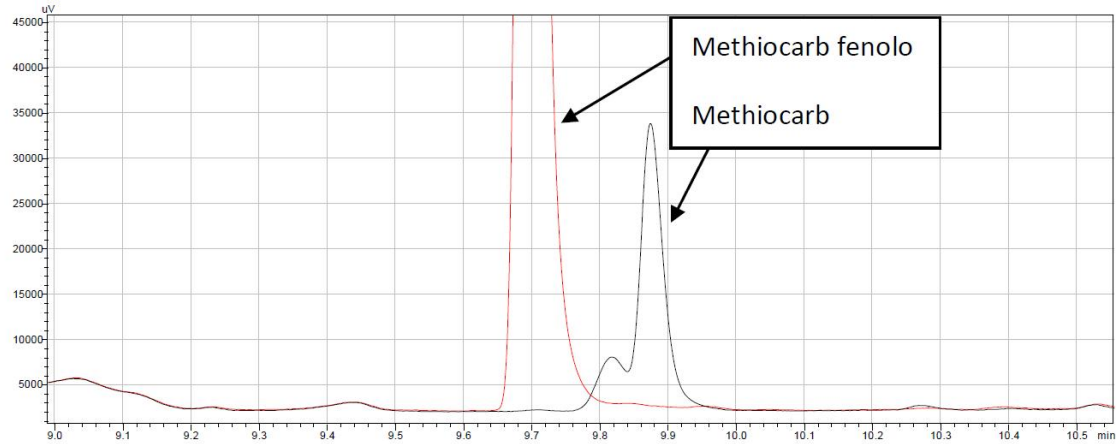


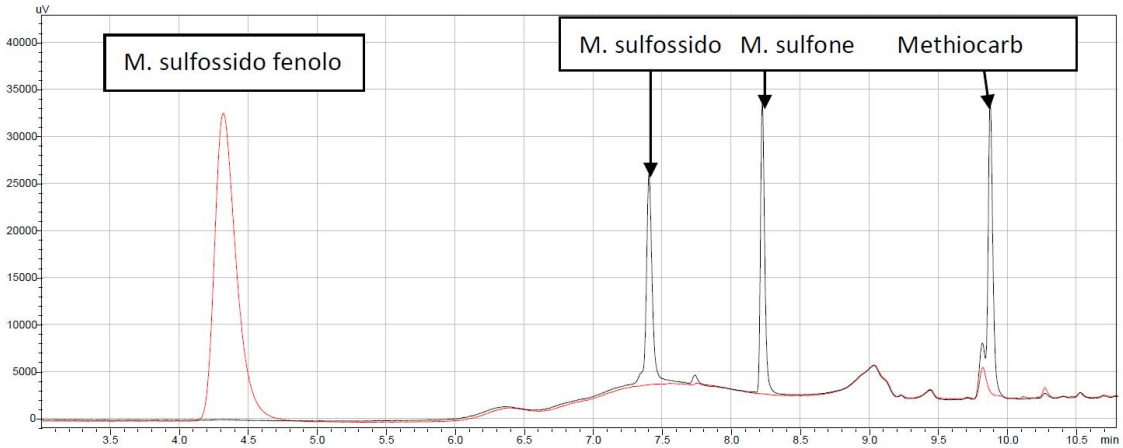
Figura 2: Spettro di massa relativo allo standard Methiocarb sulfossido fenolo. Il picco a 185 m/z corrisponde al picco molecolare e conferma la riuscita della reazione. A 369 m/z è presente il picco relativo alla formazione di un dimero.

identificato come relativo al fenolo. Per il Methiocarb sulfossido fenolo è stata eseguita anche un'analisi allo spettrometro di massa che ha confermato il buon esito della reazione (Figura 2). L'analisi tramite spettroscopia di massa dovrà essere ripetuta su tutti gli standard fenolici preparati, per avere un effettiva conferma della riuscita della reazione.

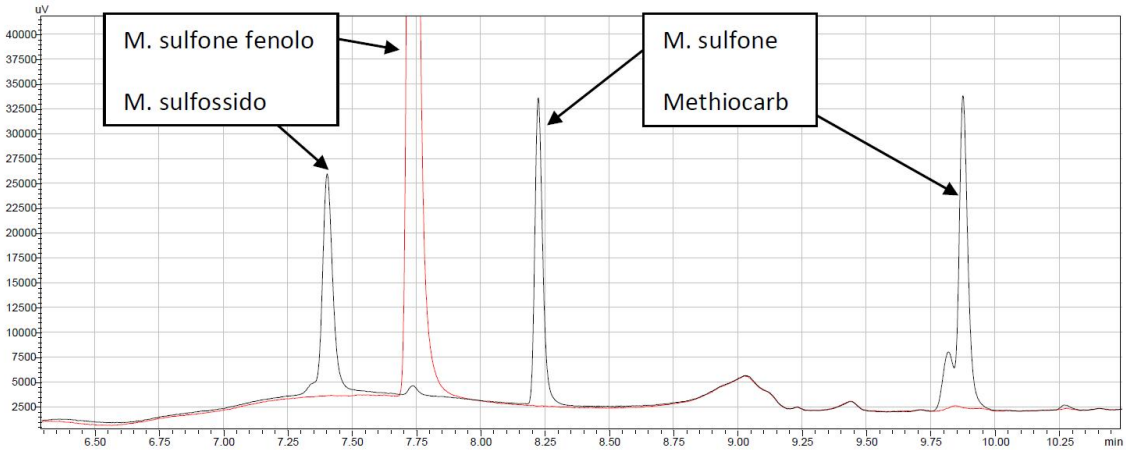
Una volta disponibili tutti gli standard, con il metodo analitico precedentemente illustrato sarà possibile identificare i prodotti di degradazione del Methiocarb effettivamente presenti nelle guttazioni del mais e determinarne la concentrazione. Inoltre sarà necessario determinare la pericolosità per ingestione di questi metaboliti, attraverso opportuni studi di tossicità sulle api, per stabilire in modo corretto quale sia la pericolosità delle guttazioni provenienti da sementi conciate con Methiocarb.



(a) Methiocarb fenolo



(b) Methiocarb sulfossido fenolo



(c) Methiocarb sulfone fenolo

Figura 3: Cromatogrammi relativi all'analisi degli standard fenolici preparati in laboratorio (linea rossa), confrontati con gli standard di partenza (linea nera).

B Utilizzo del metodo Probit per la determinazione della DL_{50}

Un problema comune nei test biologici riguarda la quantificazione della risposta ad uno stimolo fornito ad una popolazione di individui, come può essere la determinazione della tossicità acuta di una sostanza.
La risposta dipenderà dalla dose somministrata, in particolare questa deve eccedere una soglia di tolleranza, sotto la quale non sono visibili effetti. Tuttavia la tolleranza varia, a seconda del soggetto, in funzione della dose secondo l'equazione:

$$dP = f(x)\,dx \tag{1}$$

dP rappresenta la probabilità che il soggetto abbia una tolleranza compresa tra x e $x + dx$ (si ha un effetto con la dose $x + dx$, ma non con la dose x). In realtà è impossibile ottenere questa informazione, perchè il test non può essere ripetuto più volte sullo stesso soggetto nel caso della determinazione della tossicità acuta di una sostanza. É più facile stabilire quanti soggetti all'interno di una popolazione rispondano ad una determinata dose. Se la dose x viene data ad un'intera popolazione, la frazione di soggetti che risponde allo stimolo sarà funzione dell'equazione:

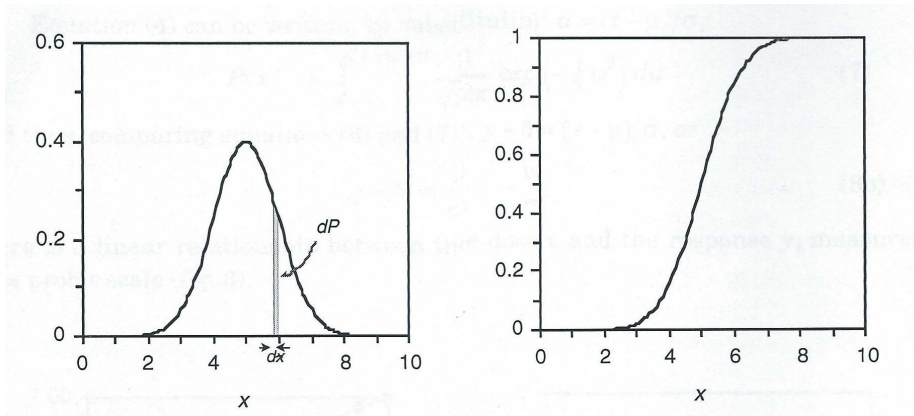
$$P(x) = \int_{-\infty}^{x} f(t)\,dt \tag{2}$$

La distribuzione delle tolleranze $f(x)$ all'interno di una popolazione è solitamente normale e possiamo quindi riscrivere l'equazione (1) e (2) come:

$$dP = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}}\,exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)dx \tag{3}$$

$$P(x) = \int_{-\infty}^{x} \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}}\,exp\left(-\frac{(t-\mu)^2}{2\sigma^2}\right)dt \tag{4}$$

Se la tolleranza rispetta una distribuzione normale la relazione tra la dose somministrata x e la mortalità percentuale non sarà lineare. Per questo motivo è conveniente un cambio di scala e solitamente viene usata la scala probit, calcolata come la funzione inversa della distribuzione



(a) Normale **(b)** Cumulativa

Figura 4: Distribuzione normale e cumulativa della tolleranza di una popolazione ad una sostanza tossica.

normale cumulativa (equazione (4)) con $\mu = 0$ e $\sigma = 1$:

$$y = Probit(P) \Leftrightarrow P = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{y-5} exp\left(-\frac{1}{2}t^2\right) dt \tag{5}$$

Dove il 5 è una semplice costante additiva, che consentirà di lavorare con valori maggiori di zero. Il probit corrisponde ad una certa percentuale di effetto tossico (ad esempio mortalità) e può quindi essere ricavato dall'equazione (5), calcolando la funzione inversa della distribuzione normale cumulativa (Figura 5). Per il calcolo del probit a partire dalla percentuale di mortalità è stato utilizzato un foglio di calcolo Excel.
L'equazione (4) può essere opportunamente riscritta sostituendo
$u = (t - \mu)/\sigma$:

$$P(x) = \int_{-\infty}^{\frac{x-\mu}{\sigma}} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} exp\left(-\frac{1}{2}u^2\right) du \tag{6}$$

Comparando le equazioni (5) e (6) si ottiene:

$$y - 5 = \frac{x - \mu}{\sigma} \Rightarrow y = \frac{1}{\sigma}x - \frac{\mu}{\sigma} + 5 \tag{7}$$

Si dimostra così che la relazione tra la dose x e la risposta y è lineare, se misurata in scala probit.

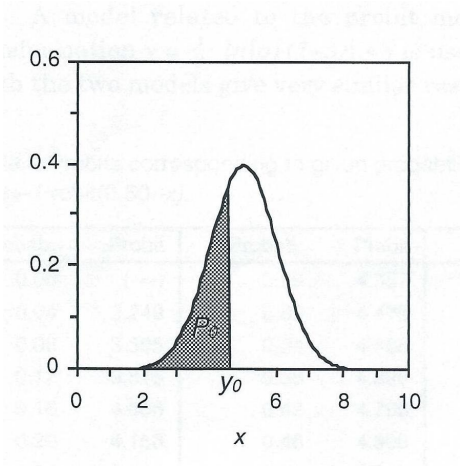
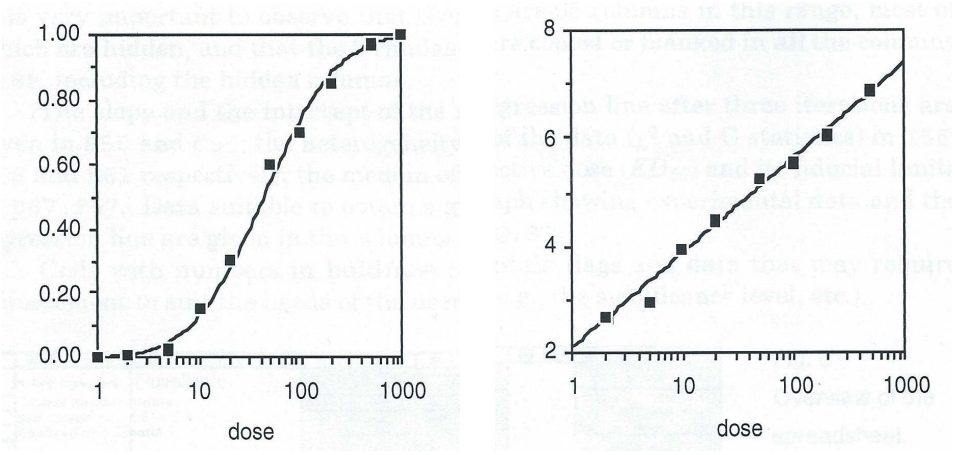


Figura 5: Il probit y_0 corrisponde all'ascissa che si ottiene quando l'area sotto la curva normale è uguale alla probabilità P_0.



(a) In ordinata è riportata la mortalità (probabilità di ottenere risposta da una certa percentuale di popolazione).

(b) Scala probit. Si nota che passando in scala probit si ottiene una risposta di tipo lineare.

Figura 6: Relazione dose risposta utilizzando le due diverse scale. La dose è riportata in scala logaritmica.

Nei test di tossicità, per ogni dose di insetticida somministrata è stata ricavata la mortalità percentuale e convertita nel corrispondente valore probit. É stato quindi tracciato il grafico dose/probit e tramite la regressione lineare dei punti sperimentali si è ricavata la DL_{50} con il relativo intervallo di fiducia. La DL_{50} è la dose corrispondente ad un valore di 5 probit e ad una mortalità del 50 %.

C Meccanismo d'azione degli insetticidi neonicotinoidi

Gli insetticidi neonicotinoidi sono prodotti neurotossici, che agendo come antagonisti dell'acetilcolina sui ricettori nicotinici postsinaptici (nAChR) bloccano il funzionamento del sistema nervoso, causando la morte dell'insetto target.[7] Gli effetti tossici sulle api, che precedono il decesso da intossicazione acuta, si manifestano con incurvatura dell'addome, disorientamento e mobilità ridotta.

I ricettori nicotinici si trovano prevalentemente nel sistema nervoso centrale dell'insetto e la penetrazione degli insetticidi fino al suo interno è favorita dalla loro idrofobicità. In tale contesto i neonicotinoidi si sono rivelati molto più efficaci dei loro progenitori, i nicotinoidi.

Parte del successo commerciale degli insetticidi neonicotinoidi deriva dalla loro selettività d'azione verso gli insetti rispetto ai mammiferi, dovuta alle diverse caratteristiche strutturali del recettore nAChR. Nel caso degli insetti nell'nAChR è presente un atomo d'idrogeno o una carica positiva, che può interagire con il gruppo nitro carico negativamente attraverso un legame idrogeno o un'interazione elettrostatica. Mentre nei recettori nAChR dei mammiferi non è presente questa stabilizzazione e quindi l'insetticida non può legarsi in modo efficace (Figura 7).

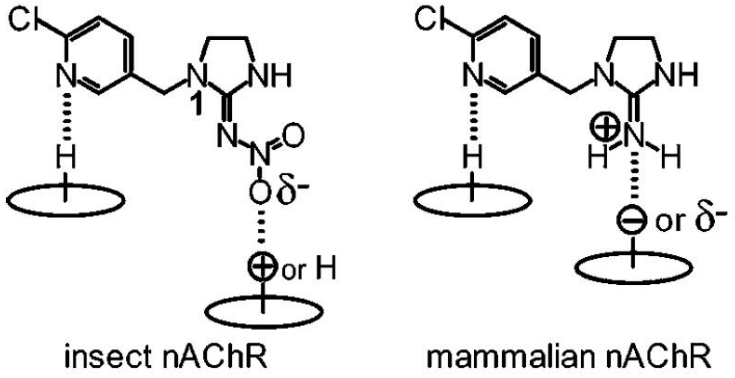


Figura 7: Interazione molecolare tra i ricettori nicotinici di insetti e mammiferi con l'insetticida. Si nota che i neonicotinoidi, rappresentati dall'Imidacloprid (a sinistra), sono selettivi nei confronti degli insetti. I ricettori nicotinici dei mammiferi invece interagiscono meglio con insetticidi nicotinoidi, rappresentati dal desnitro-Imidacloprid (a destra).[39]

Anche la diversa tossicità tra Clothianidin e Thiacloprid può essere imputata alla loro diversa struttura, che provoca una diversa interazione con i ricettori nicotinici. Infatti il Thiacloprid non presenta il gruppo nitro, ma un ciano gruppo, che rende l'insetticida meno affine all'interazione col sito di legame dell'acetilcolina.[11]

Bibliografia

[1] Dennis vanEngelsdorp and Marina Doris Meixner. A historical review of managed honey bee populations in europe and the united states and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009.

[2] Ellis Jamie. *Outlooks on Pest Management: The Honey Bee Crisis*, volume Volume 23. Research Information, February 2012.

[3] Kluser Stéphane and Peduzzi Pascal. Global pollinator decline: A literature review. *United Nations Environment Programme. United Nations Environment Programme*, 2007.

[4] Elke Genersch, Werner von der Ohe, Hannes Kaatz, Annette Schroeder, Christoph Otten, Ralph Buchler, Stefan Berg, Wolfgang Ritter, Werner Muhlen, Sebastian Gisder, Marina Meixner, Gerhard Liebig, and Peter Rosenkranz. The german bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *EDP Sciences*, 2010.

[5] Diana L. Cox-Foster, Sean Conlan, Edward C. Holmes, Gustavo Palacios, Jay D. Evans, Nancy A. Moran, Phenix-Lan Quan, Thomas Briese, Mady Hornig, David M. Geiser, Vince Martinson, Dennis vanEngelsdorp, Abby L. Kalkstein, Andrew Drysdale, Jeffrey Hui, Junhui Zhai, Liwang Cui, Stephen K. Hutchison, Jan Fredrik Simons, Michael Egholm, Jeffery S. Pettis, and W. Ian Lipkin. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 2007.

[6] Sebastian Gisder, Pia Aumeier, and Elke Genersch. Deformed wing virus: replication and viral load in mites *(Varroa destructor)*. *Journal of General Virology*, 2009.

[7] Simon-Delso N., Gibbons D.W., McField M., Stark J.D., Amaral-Rogers V., Giorio C., Mineau P., Tapparo A., Belzunces L.P., D. Girolami V. Goulson, Mitchell E.A.D., Van Dyck H., Van Praagh J., Bonmatin J.M., Kreutzweiser D.P., Morrissey C.A., Van der Sluijs J.P., Chagnon M., Krupke C.H., Noome D.A., Whitehorn P.R., Downs C., Liess M., Pisa L., Settele J., Furlan L., Long E., and Wiemers M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014.

[8] Alfred Elbert, Matthias Haas, Bernd Springer, Wolfgang Thielert, and Ralf Nauen. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*, 2008.

[9] Fabio Sgolastra, Teresa Renzi, Stefano Draghetti, Piotr Medrzycki, Marco Lodesani, Stefano Maini, and Claudio Porrini. Effects of neonicotinoid dust from maize seed-dressing on honey bees. *Bulletin of Insectology*, 2012.

[10] Daniela Laurino, Marco Porporato, Augusto Patetta, and Aulo Manino. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 2011.

[11] Takao Iwasa, Naoki Motoyama, John T. Ambrose, and R. Michael Roe. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, apis mellifera. *Crop Protection*, 2003.

[12] Axel Decourtye and James Devillers. *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media, 2010.

[13] Teresa C. van Dijk. *Effects of neonicotinoid pesticide pollution of Dutch surface water on non-target species abundance*. Thesis in sustainable development track land use, environment and biodiversity, Utrecht University, 2 Luglio 2010.

[14] Lorenzo Barbiero. *Valutazione dell'esposizione e della tossicità per api di insetticidi impiegati nella concia delle sementi di mais*. Tesi di laurea magistrale in scienze e tecnologie per l'ambiente e il territorio, Università degli studi di Padova, 2013/2014.

[15] Dave Goulson. Pesticides linked to bird declines. *Nature*, 2014.

[16] J.-M. Bonmatin, C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D. P. Kreutzweiser, C. Krupke, M. Liess, E. Long, M. Marzaro, E. A. D. Mitchell, D. A. Noome, N. Simon-Delso, and A. Tapparo. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014.

[17] Maarten Bijleveld van Lexmond, Jean-Marc Bonmatin, Dave Goulson, and Dominique A. Noome. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides. global collapse of the entomofauna: exploring the role of systemic insecticides. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014.

[18] Rachel Carson. *Silent Spring*. Houghton Mifflin, 1962.

[19] Schmuck R. No causal relationship between gaucho® seed dressing in sun¯owers and the french bee syndrome. *Pfanzenschutz Nachrichten Bayer 52, 257-299*, 1999.

[20] Richard Schmuck, Ralf Schoning, Andreas Stork, and Oliver Schramel. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* l, hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science*, 2001.

[21] J. M. Bonmatin, P. A. Marchand, R. Charvet, I. Moineau, E. R. Bengsch, and M. E. Colin. Quantification of imidacloprid uptake in maize crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005.

[22] Laura Bortolotti, Rebecca Montanari, José Marcelino, Piotr Medrzycki, Stefano Maini, and Claudio Porrini. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*, 2003.

[23] Dave Goulson. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 2013.

[24] Tjeerd Blacquiere, Guy Smagghe, Cornelis A.M. van Gestel, and Veerle Mommaerts. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology. Springer*, 2012.

[25] V. Girolami, M. Marzaro, L. Vivan, L. Mazzon, M. Greatti, C. Giorio, D. Marton, and A. Tapparo. Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. *Journal of Applied Entomology*, 2011.

[26] V. Girolami, L. Mazzon, A. Squartini, N. Mori, M. Marzaro, A. Di Bernardo, M. Greatti, C. Giorio, and A. Tapparo. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: A novel way of intoxication for bees. *Journal of Economic Entomology*, 2009.

[27] Moreno Greatti, Anna Gloria Sabatini, Renzo Barbattini, Simona Rossi, and Antonella Stravisi. Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. preliminary results. *Bulletin of Insectology*, 2003.

[28] Moreno Greatti, Renzo Barbattini, Antonella Stravisi, Anna Gloria Sabatini, and Simona Rossi. Presence of the a.i. imidacloprid on vegetation near corn fields sown with gaucho® dressed seeds. *Bulletin of Insectology*, 2006.

[29] V. Girolami, M. Marzaro, L. Vivan, L. Mazzon, C. Giorio, D. Marton, and A. Tapparo. Aerial powdering of bees inside mobile cages and the extent of neonicotinoid cloud surrounding corn drillers. *Journal of Applied Entomology*, 2012.

[30] Andrea Tapparo, Daniele Marton, Chiara Giorio, Alessandro Zanella, Lidia Soldà, Matteo Marzaro, Linda Vivan, and Vincenzo Girolami. Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. *Environmental Science & Technology. American Chemical Society*, 2012.

[31] Matteo Marzaro, Linda Vivian, Andrea Targa, Luca Mazzon, Nicola Mori, Moreno Greatti Edoardo Petrucco Toffolo, Andrea Di Bernardo, Chiara Giorio, Daniele Marton, Andrea Tapparo, and Vincenzo Girolami. Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. *Bulletin of Insectology*, 2011.

[32] Veronica Mestriner. *Determinazione di insetticidi neonicotinoidi in singola ape mediante UHPLC-MS*. Tesi di laurea magistrale in chimica, Università degli studi di Padova, 2012/2013.

[33] Andrea Tapparo, Chiara Giorio, Matteo Marzaro, Daniele Marton, Lidia Soldà, and Vincenzo Girolami. Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011.

[34] Andrea Tapparo, Chiara Giorio, Matteo Marzaro, Daniele Marton, Lidia Soldà, Sara Bogialli, and Vincenzo Girolami. UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012.

[35] Hubaux A. and Vos G. Decision and detection limits for linear calibration curves. *Analytical Chemistry*, 1970.

[36] Y.S. Keuml, K.H. Liul, Y.S. Leel, J.S. Lee, B.J. Chung, and J.H. Kim. Gas chromatographic analysis of methiocarb and its metabolites in soil and rice. *Chromatographia*, 2000.

[37] Manuel Molina, Dolores Pérez-Bendito, and Manuel Silva. Multiresidue analysis of n-methylcarbamate pesticides and their hydrolytic metabolites in environmental waters by use of solid-phase extraction and micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 1999.

[38] Fang Tian, Zhimin Qiang, Wenjun Liu, and Wencui Ling. Methiocarb degradation by free chlorine in water treatment: Kinetics and pathways. *Chemical Engineering Journal*, 2013.

[39] Motohiro Tomizawa and John E. Casida. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 2003.