



ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

## **DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE**

### **Ciclo 36**

Settore Concorsuale: 07/H2 – Patologia veterinaria e ispezione degli alimenti di origine animale  
Settore Scientifico Disciplinare: VET/04 – Ispezione degli alimenti di origine animale

## **Sviluppo di metodiche tramite spettrometria di massa per il monitoraggio di contaminati chimici nel miele**

**Presentata da:**

Dott.ssa Giulia Rampazzo

**Supervisore**

Prof.ssa Teresa Gazzotti

**Coordinatore di dottorato**

Prof.ssa Carolina Castagnetti

---

**Esame finale anno 2024**

# Indice

<b>Abstract</b> .....	7
<b>1. Introduzione</b> .....	8
1.1. Composizione chimica del miele .....	9
1.1.1 Principali componenti del miele .....	9
1.1.1.1 <i>Carboidrati</i> .....	9
1.1.1.2 <i>Proteine e amminoacidi</i> .....	10
1.1.1.3 <i>Fenoli e composti volatili</i> .....	11
1.1.1.4 <i>Idrossimetil furfuraldeide (HMF)</i> .....	12
1.1.1.5 <i>Minerali ed oligoelementi</i> .....	12
1.1.1.6 <i>Acidità e pH</i> .....	13
1.1.1.7 <i>Acqua</i> .....	13
1.1.1.8 <i>Vitamine</i> .....	14
1.2 Principali contaminanti naturali nel miele .....	14
1.2.1. Fitotossine .....	14
1.2.2. Micotossine .....	16
1.2.2.1 <i>Metodiche di analisi</i> .....	19
1.2.2.2 <i>Legislazione e presenza di micotossine nei prodotti dell'alveare</i> .....	23
1.3 Principali contaminanti di origine antropica nel miele .....	24
1.3.1 Metalli pesanti .....	24
1.3.2 Policlorobifenili (PCB) .....	26
1.3.3 Idrocarburi policiclici aromatici (IPA) .....	26
1.3.4 Sostanze alchiliche perfluorate (PFAS) .....	29
1.3.5 Pesticidi .....	29
1.3.5.1 <i>Clorpirifos</i> .....	31
1.3.5.2 <i>Formetanato</i> .....	33
1.3.5.4 <i>Oxamyl</i> .....	35
1.3.5.5 <i>Tiobencarb</i> .....	36

1.3.5.6 Triazofos .....	37
1.4 Pesticidi polari .....	38
1.4.1 Glifosato .....	38
1.4.1.1 Caratteristiche chimiche .....	39
1.4.1.2 Modalità d'azione del glifosato sulle piante.....	40
1.4.1.3 Tossicità nelle api.....	43
1.4.1.3.1 Alterazioni dello sviluppo delle api.....	44
1.4.1.3.2 Alterazioni del comportamento alimentare delle api .....	45
1.4.1.3.3 Alterazioni del microbiota intestinale delle api .....	45
1.4.1.3.4 Espressione genica .....	46
1.4.1.3.5 Alterazioni dei processi metabolici .....	47
1.4.1.3.6 Compromissione delle capacità di apprendere e ricordare .....	47
1.4.1.3.7 Influenza sul volo direzionale delle api.....	49
1.4.1.3.8 Disturbo da collasso delle colonie (CCD) .....	49
1.4.1.4 Tossicità nell'uomo e negli animali .....	50
1.4.1.4.1 Studi in vitro .....	50
1.4.1.4.2 Studi in vivo .....	52
1.4.1.4.3 Studi epidemiologici .....	52
1.4.1.5 Destino nell'ambiente .....	54
1.4.1.5.1 Destino nel suolo .....	55
1.4.1.5.2 Residui di glifosato nelle acque e nell'aria .....	57
1.4.1.6 Legislazione e valutazioni delle agenzie regolatorie (questione EFSA IARC) .....	58
1.4.1.6.1 Revisione tra pari EFSA luglio 2023.....	60
1.4.2. Glufosinato .....	62
1.4.2.1 Proprietà fisico-chimiche e modalità d'azione sulle piante .....	63
1.4.2.2 Degradazione nell'ambiente .....	64
1.4.3 Metodiche analitiche per la determinazione di glifosato, glufosinato e loro metaboliti .....	66
1.4.4 Evidenze della contaminazione di glifosato, glufosinato e metaboliti nel miele.....	68
1.5 Valutazione del rischio per il consumatore derivante dall'esposizione combinata a più sostanze chimiche.....	70
<b>2. Scopo del lavoro .....</b>	<b>72</b>

<b>Sviluppo e validazione di un metodo multi-residuale per la determinazione di micotossine e pesticidi in miele tramite HPLC-Q-TOF-HRMS</b> .....	74
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	74
3.1 Prodotti chimici e Reagenti .....	74
3.2 Campionamento .....	75
3.3 Procedura di preparazione del campione.....	75
3.4 Analisi HPLC-Q-TOF-HRMS .....	75
3.6 Validazione del metodo.....	77
3.7 Controllo Qualità/Assicurazione della Qualità dell'analisi e analisi statistica .....	78
<b>4. Risultati e discussione</b> .....	79
4.1 Il metodo QuEChERS.....	79
4.2 Ottimizzazione della procedura di preparazione del campione.....	80
4.3 Validazione del metodo.....	82
4.4 Applicazione del metodo a campioni reali.....	85
<b>5. Conclusioni</b> .....	85
<b>Determinazione di glifosato, glufosinato e metaboliti nel miele tramite cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) e cromatografia ionica-spettrometria di massa ad alta risoluzione (IC-HRMS).</b> .....	87
<b>6. Materiali e metodi</b> .....	87
6.1 Prodotti chimici e Reagenti .....	87
6.3 Preparazione del campione.....	88
6.4 Analisi in LC-MS/MS .....	89
6.5 Analisi in IC-HRMS .....	90
6.6 Validazione del metodo.....	92
<b>7. Risultati</b> .....	93
7.1 Parametri di validazione in LC-MS/MS .....	93
7.2 Parametri di validazione in IC-HRMS .....	95
7.3 Applicazione del metodo a campioni reali di miele.....	97
<b>8. Discussione</b> .....	98
8.1 Ottimizzazione della procedura di estrazione .....	98
8.2 Confronto delle prestazioni della validazione del metodo di IC-HRMS e UPLC-MS/MS per la rilevazione di pesticidi polari e metaboliti .....	101

8.3 Applicazione del metodo a campioni reali di miele.....	102
<b>9 Conclusioni</b> .....	104
<i>Ringraziamenti</i> .....	106
<b>Bibliografia</b> .....	108

*A mia madre, ogni mio traguardo è anche tuo.*

## Abstract

Il miele, oltre ad essere un prezioso alimento con notevoli benefici nutrizionali, è al centro di una catena di valore agroalimentare di rilievo in Europa. Tuttavia, la sua purezza può essere compromessa da contaminanti di origine antropica e naturale, rappresentando potenziali rischi per la salute umana. Questa tesi affronta la necessità di sviluppare metodiche innovative e efficienti per il monitoraggio di contaminanti chimici nel miele tramite l'utilizzo della spettrometria di massa, con particolare attenzione a micotossine e pesticidi. La ricerca, condotta attraverso una collaborazione tra il laboratorio FTCA dell'Università di Bologna, il laboratorio di scienze alimentari dell'Università di Valencia, il laboratorio di ispezione degli alimenti dell'Università di Milano e ICQRF-MASAF Italia, si è articolata in due fasi principali. La prima fase ha previsto lo sviluppo e la validazione di una metodologia multi-residuale per la determinazione di 19 micotossine e 6 pesticidi nel miele, utilizzando la spettrometria di massa ad alta risoluzione. La seconda fase della ricerca ha avuto come focus l'ottimizzazione e validazione dell'analisi di glifosato, glufosinato e loro metaboliti attraverso LC-MS/MS e IC-HRMS. Con i risultati ottenuti si è potuta dimostrare la comparabilità e l'efficacia degli approcci utilizzati anche a concentrazioni molto basse, fornendo dati affidabili sulla determinazione di contaminanti nei campioni di miele. I protocolli analitici di entrambe le fasi sono stati applicati a campioni di miele reali di varia provenienza, rivelando la presenza di pesticidi organofosfati in due campioni e la presenza di glifosato in più della metà dei campioni sottoposti ad analisi. Durante questo periodo di ricerca è stato possibile evidenziare come l'importanza della valutazione dei metaboliti e il valore di tecniche analitiche che bilancino studio della matrice, sensibilità, selettività e praticità per una valutazione accurata del rischio di esposizione del consumatore. La ricerca fornisce un contributo significativo alla sicurezza alimentare nel settore apistico, promuovendo l'adozione di protocolli analitici armonizzati per garantire coerenza e comparabilità nei dati. Infine, la tesi sottolinea l'importanza di continuare la ricerca e il monitoraggio per affrontare le sfide in evoluzione legate alla sicurezza alimentare e alla preservazione della qualità del miele e della filiera apistica.

# 1. Introduzione

Il miele costituisce una sostanza naturale ad alta densità energetica, riconosciuta dall'umanità da tempi molto antichi. Diverse specie di Imenotteri, quali *Apis mellifera* e *Apis cerana*, hanno sviluppato una specializzazione nel raccogliere nettare da una vasta gamma di fiori e da altre sostanze zuccherine, come la melata, una secrezione prodotta da insetti infestanti, ad esempio gli afidi, a beneficio della colonia. Queste materie prime, generalmente ricche di glucidi complessi e con un contenuto idrico elevato (90-95%), subiscono una trasformazione in un alimento concentrato, composto da zuccheri semplici in soluzione sovrasatura, che risulta stabile e capace di "autoprotgersi" dal deterioramento causato da batteri, miceti e altri fattori ambientali. Il processo di trasformazione da un liquido zuccherino diluito a una soluzione concentrata di zuccheri semplici avviene in fasi successive. Durante tale processo, il bottino raccolto dalle api cercatrici viene trasferito ad altre api e, ad ogni fase di "lavorazione", gli enzimi digestivi degli insetti scindono quasi completamente le molecole di zuccheri complessi, riducendo gradualmente la percentuale di umidità. Il raggiungimento completo della percentuale di umidità ottimale avviene nelle cellette dell'alveare, dove le api depongono il prodotto finale in strati sottili, permettendo all'acqua di evaporare grazie all'azione continua delle api ventilatrici. Successivamente, le cellette vengono sigillate con un diaframma sottile di cera, costituendo un efficiente metodo di conservazione dell'alimento da utilizzare durante i periodi invernali o comunque caratterizzati da una scarsità di fioriture. L'umanità ha riconosciuto il valore del miele fin dall'epoca preistorica, come attestato dalle testimonianze di apicoltura organizzata presenti nelle più antiche iscrizioni, risalenti a migliaia di anni prima di Cristo. Vasi di miele sono stati regolarmente rinvenuti nei corredi delle sepolture egizie, mantenendo una perfetta conservazione anche in contenitori sigillati. Nell'alimentazione umana, il miele è ampiamente impiegato come dolcificante naturale, nella preparazione di dolci tradizionali, come fonte energetica immediatamente disponibile,

particolarmente apprezzata dagli atleti ma anche come alimento altamente nutritivo per le popolazioni vulnerabili, come i bambini e gli anziani (Panseri et al., 2019).

Considerato infatti un valido integratore alimentare grazie al suo contenuto di minerali, vitamine e oligoelementi, il miele ha anche trovato impiego in campo medico fin dall'antichità grazie alle sue proprietà antibatteriche. La sua azione terapeutica si manifesta sia attraverso l'assunzione orale, con capacità battericide anche su ceppi antibiotico-resistenti ad alte dosi, sia mediante l'applicazione diretta sulle ferite, prevenendo le infezioni e favorendo il processo di cicatrizzazione (Mandal et al., 2011). Molti studi sono stati dedicati al ruolo del miele nella prevenzione delle malattie e nel mantenimento della salute umana. Tra le proprietà recentemente indagate, emerge l'interessante azione antiossidante del miele, attribuibile alle sue componenti fenoliche che proteggono le cellule dai radicali liberi (Lawag, 2023).

## 1.1. Composizione chimica del miele

Essendo il risultato di ripetuti processi digestivi avvenuti in organismi viventi, il miele contiene, oltre agli zuccheri semplici, piccole percentuali di zuccheri complessi e tracce di enzimi, aminoacidi, pigmenti, vitamine, acidi organici alifatici e aromatici, sali minerali e oligoelementi. L'espressione quantitativa di queste sostanze può variare in accordo alla "storia" del miele stesso: stagione, origine geografica, origine floreale, condizioni di salute dell'alveare, differenti metodi di lavorazione e conservazione del prodotto grezzo. Proprio in questa complessità risiede la variabilità organolettica del miele, che accanto ad una serie di aspetti essenziali relativamente costanti, come ad esempio la percentuale di umidità, può mostrare caratteristiche ben precise, legate essenzialmente al clima e alla fioritura. Esistono così moltissime varietà di miele, fra le quali alcune molto rare e costose (Ashagrie Tafere D., 2021).

### 1.1.1 Principali componenti del miele

#### 1.1.1.1 Carboidrati

I carboidrati rappresentano dal 66-83% della composizione chimica del miele e sono responsabili delle sue proprietà chimico-fisiche, quali viscosità, igroscopicità e granulazione

(Kamal et al., 2011). Le proporzioni della tipologia di glucidi dipendono principalmente dall'origine botanica del miele e sono influenzate dal clima, dalla lavorazione e dalla conservazione dell'alimento (Escuredo et al., 2014; Tornuk et al., 2013).

I monosaccaridi glucosio e fruttosio rappresentano circa il 75% degli zuccheri nel miele, con percentuali relative rispettivamente di 28-40% e 20-35% (Ranneh et al., 2021). Sono inoltre presenti disaccaridi (10-15%) e piccole quantità di altri zuccheri. La concentrazione di fruttosio e glucosio, così come il loro rapporto, sono indicatori utili per la classificazione dei mieli uniflorali (Kaskoniene et al., 2008). In quasi tutti i tipi di miele, il fruttosio è lo zucchero in maggior proporzione, tranne in alcuni mieli come quello di colza (*Brassica napus*) e di tarassaco (*Taraxacum officinale*), nei quali la frazione di glucosio può essere superiore alla frazione di fruttosio, conferendo a questi mieli la tendenza ad una rapida cristallizzazione (Escuredo et al., 2014).

I principali disaccaridi presenti nel miele invece sono saccarosio, maltosio, maltulosio, turanosio e nigerosio, mentre, in minime concentrazioni, possono essere rilevati altri trisaccaridi: erlosio, centosio, panosio, psopanosio, chetosio ecc. (Oddo-Persano et al., 2004).

#### *1.1.1.2 Proteine e amminoacidi*

Il contenuto proteico del miele varia a seconda della specie di api. Il miele di *Apis cerana* contiene dallo 0,1% al 3,3% di proteine, mentre il miele di *Apis mellifera* ne contiene tra lo 0,2% e l'1,6% (Won et al., 2008). Le proteine e gli aminoacidi contenuti nei mieli sono sia di origine vegetale, che provenienti dal corpo delle api, compresi i fluidi e le secrezioni delle ghiandole salivari e della faringe degli insetti (Escuredo et al., 2013; Sak-Bosnar et al., 2012). Gli aminoacidi rappresentano circa l'1% dei costituenti azotati del miele e le loro proporzioni relative possono variare in base all'origine e alla tipologia delle colonie (Hermosín et al., 2003). Gli aminoacidi presenti nel miele includono prolina, acido glutammico, acido aspartico, glutammina, istidina, glicina, treonina,  $\beta$ -alanina, arginina,  $\alpha$ -alanina, acido aminobutirrico, tirosina, valina, metionina, cisteina, isoleucina, leucina, triptofano, fenilalanina, ornitina, lisina, serina, asparagina e alanina (Hermosín et al., 2003; Keckes et al., 2013; Rebane et al., 2010). L'aminoacido più abbondante nel miele e nel polline è la prolina (Iglesias et al., 2006), seguita da acido glutammico, alanina, fenilalanina, tirosina,

leucina e isoleucina (Girolamo, et al., 2012). La prolina ha origine principalmente dalle secrezioni salivari delle api mellifere (*Apis mellifera* L.) durante la conversione del nettare in miele, rappresenta il 50–85% degli aminoacidi presenti (Iglesias et al., 2006; Truzzi et al., 2014) ed è stata utilizzata come criterio per la valutazione della maturazione e della qualità del miele. I valori normali di prolina sono di regola superiori a 200 mg kg<sup>-1</sup>; valori inferiori a 180 mg kg<sup>-1</sup> sono presumibilmente indicativi di adulterazione del miele con sciroppi di zuccheri (Bogdanov S., 2009).

Una piccola frazione dei composti azotati sono enzimi che provengono dal nettare, dalle api o da microrganismi presenti nel miele (Alvarez-Suarez et al., 2013); fra questi i principali sono invertasi, diastasi e glucosio ossidasi. L'invertasi, presente sia nei fiori che nell'apparato digerente delle api, scinde la maggior parte del saccarosio presente nel miele in glucosio e fruttosio (Ball D.W., 2007). La diastasi catalizza l'idrolisi dell'amido in maltosio ed è considerata un indicatore della qualità del miele (Ball et al., 2007; Popek S., 2002). La glucosio-ossidasi catalizza la trasformazione del glucosio in acido gluconico ed è prodotta dalle ghiandole faringee delle api (Ranneh et al., 2021).

#### *1.1.1.3 Fenoli e composti volatili*

I principali composti fenolici del miele sono i flavonoidi. Possono contribuire in modo significativo all'attività antiossidante dell'alimento, apportando effetti benefici per la salute umana (Alvarez Suarez et al., 2014). L'attività antiossidante di questi composti dipende dal numero e dalla posizione dei gruppi idrossilici e dalla glicosilazione e idrossilazione degli anelli flavonoidi (Silva et al., 2016).

L'aroma del miele è prodotto da miscele complesse di composti volatili, che possono differire in base all'origine botanica, alle condizioni di lavorazione e alle modalità di conservazione. I mieli uniflorali hanno proprietà organolettiche caratteristiche della pianta, dovute alla presenza di alcuni composti organici volatili provenienti dai nettari (Castro-Vázquez et al., 2007). Le api possono anche elaborare i costituenti vegetali in altri composti con proprietà volatili (Barra et al., 2010). Nel miele sono presenti in concentrazioni molto basse miscele complesse di composti volatili di diverse famiglie chimiche, che appartengono generalmente a monoterpeni, C13-norisoprenoidi, sesquiterpeni, derivati del benzene e

tracce di alcoli superiori, esteri, acidi grassi, chetoni e aldeidi (Pontes et al., 2007). La lunghezza delle catene di carbonio degli acidi carbossilici determina sapori diversi che possono variare dal piccante al rancido. Gli acidi carbossilici a catena corta, come l'acido acetico, conferiscono aroma e sapore speziati, mentre l'acido butanoico ed esanoico forniscono un aroma rancido (Barra et al., 2010). Gli alcoli sono una classe ampia e importante di composti presenti nel miele. I gruppi metilici con alcoli, come 3-metil-3-buten-1-olo e 2-metil-2-buten-1-olo, aggiungono al sapore del miele una nota di freschezza (Castro-Vázquez et al., 2007).

Sono stati identificati più di 400 composti diversi nella frazione volatile del miele e alcuni sono utilizzati come marcatori chemotassonomici di mieli commerciali, come 3,9-epossi-1-*p*-mentadiene, *t*-8-*p*-mentano-ossido-1,2-diolo e isomero *cis*-rose, proposti come marcatori del miele di limone; dichetoni, composti di zolfo e alcani caratteristici del miele di eucalipto; esanale ed eptanale, principali costituenti l'aroma dei mieli di lavanda (Castro-Vázquez et al., 2007; Radovic et al., 2001).

#### 1.1.1.4 Idrossimetil furfuraldeide (HMF)

L'HMF è un composto organico eterociclico a sei atomi di carbonio contenente sia il gruppo funzionale idrossimetilico (alcolico) che il gruppo aldeidico. HMF è un composto di degradazione del fruttosio, che si forma lentamente e in piccole proporzioni in condizioni naturali (costituendo così un parametro di valutazione dell'età del miele), o molto più rapidamente e massivamente se il miele viene riscaldato. Elevate concentrazioni di HMF sono indicative di cattiva qualità del miele. L'Unione Europea raccomanda il limite di 40 mg kg<sup>-1</sup> per i mieli commerciali, con le seguenti eccezioni: 15 mg kg<sup>-1</sup> per i mieli a basso contenuto in enzimi, e 80 mg kg<sup>-1</sup> per mieli provenienti da regioni tropicali (European Commission, 2002).

#### 1.1.1.5 Minerali ed oligoelementi

Il contenuto di minerali nel miele varia dallo 0,04% nei mieli chiari allo 0,2% nei mieli scuri (Alqarni et al., 2012). La quantità relativa di minerali può variare in accordo con l'area di raccolta. Il potassio è il più rappresentato, costituendo oltre un terzo del contenuto totale, ma è inoltre presente una grande varietà di oligoelementi, le cui percentuali relative

dipendono dall'origine botanica del miele. Uno dei motivi per cui il miele è importante nell'alimentazione umana risiede nel contenuto in minerali, fra cui, oltre al potassio, sono presenti cloro, zolfo, calcio, sodio, fosforo, magnesio, silicio, ferro, manganese e rame (Kocsis M. et al., 2022).

#### *1.1.1.6 Acidità e pH*

Secondo molti autori, tutti i mieli hanno una leggera acidità, dovuta ad un contenuto in acidi organici di circa lo 0,57% (Karabagias et al., 2014). Gli acidi organici derivano direttamente dal nettare o sono prodotti dagli enzimi secreti dalle api durante la trasformazione del nettare in miele (Cherchi et al., 1994). La presenza degli acidi contribuisce a determinare il colore e il sapore del miele, come anche le sue proprietà chimico-fisiche: acidità, pH e conduttività elettrica (Mato et al., 2006).

In mieli provenienti da diverse regioni del mondo sono presenti: acido aspartico, butirrico, citrico, acetico, fumarico, galatturonico, formico, gluconico, glutammico, glutarico, gliossilico, 2-idrossibutirrico,  $\alpha$ -idrossiglutarico, isocitrico, chetoglutarico, lattico, malico, malonico, metilmalonico, 2-ossopentanoico, propionico, piruvico, chinico, shikimico, succinico, tartarico, ossalico ecc. (Cherchi et al., 1994; Mato et al., 2006; Nozal et al., 2003). L'acido predominante nel miele è l'acido gluconico, prodotto dall'azione della glucosio-ossidasi (Karabagias et al., 2014). Oltre all'acido gluconico anche l'acido citrico è ben rappresentato nel miele, e la concentrazione relativa di queste due sostanze viene utilizzata come parametro affidabile per differenziare il miele floreale da quello di melata (Mato et al., 2006).

Il miele si comporta come una soluzione tampone, per cui il suo pH non varia aggiungendo piccole quantità di acidi o di basi. Questa proprietà è dovuta al contenuto in fosfati, carbonati e altri sali minerali (James et al., 2009).

#### *1.1.1.7 Acqua*

Il contenuto idrico del miele è fondamentale nel determinarne la resistenza a fenomeni fermentativi. Il miele selvatico può avere contenuti idrici inferiori al 14%. È riconosciuto a livello internazionale che un miele di buona qualità abbia contenuti idrici inferiori al 20%. Al di sopra di questa concentrazione un miele non pastorizzato fermenta ad opera di lieviti

osmofili naturalmente presenti in tracce. Per questo motivo la concentrazione di zuccheri è un fattore importante per determinare la qualità e la stabilità del miele (Yanniotis et al., 2006).

#### 1.1.1.8 Vitamine

Il miele contiene piccole quantità di vitamine, preservate grazie al pH acido (Bonté et al., 2013), soprattutto il complesso vitaminico B, che si trova in prevalenza nei granelli di polline. Le vitamine presenti nel miele includono tiamina (B1), riboflavina (B2), acido nicotinico (B3), acido pantotenico (B5), piridossina (B6), biotina (B8 o H) e acido folico (B9). È presente in quasi tutti i tipi di miele anche la vitamina C, importante per il suo effetto antiossidante. Il contenuto in vitamina C nel miele è incostante, dato che la molecola è molto vulnerabile all'ossidazione chimica ed enzimatica e tende a degradarsi rapidamente (León Ruiz et al., 2013).

## 1.2 Principali contaminanti naturali nel miele

Oltre alla presenza di sostanze chimiche introdotte dall'attività umana, ci sono anche contaminanti di origine naturale che possono essere presenti nel miele. Le micotossine, prodotte da muffe, e le tossine vegetali, presenti in alcune piante (fitotossine), sono esempi di contaminanti naturali che possono influenzare la sicurezza e la qualità del miele. La loro presenza può derivare da vari fattori, tra cui condizioni climatiche, pratiche agricole e conservazione degli alimenti (Rodriguez-Carrasco et al., 2013). Pertanto, è importante monitorare attentamente la presenza di tali contaminanti per garantire la sicurezza alimentare e adottare misure preventive durante la produzione e la lavorazione degli alimenti.

### 1.2.1. Fitotossine

Nel corso della storia sono stati segnalati molti casi di intossicazione associati al consumo di miele contaminato, i cui rischi erano noti fin dall'antichità (Gunduz et al., 2008). Alcune tossine possono causare gravi avvelenamenti anche in dosi minime (assunzione di 5-10 g di miele). I sintomi dell'avvelenamento da miele variano a seconda della tossina e includono vertigini, nausea, vomito, convulsioni, mal di testa, tachicardia e in alcuni casi la morte.

Sostanze naturali tossiche vengono trasferite al miele tramite il nettare e/o la melata, inclusi metaboliti secondari come alcaloidi pirrolizidinici, graianotossine (GTX), iosciamina, ioscina, saponina, stricnina, gelsemina, tutina, ienanchina, oleandrina e oleandrogenina (Nazmul et al., 2014; Christina et al., 2014).

L'avvelenamento dovuto al consumo di miele è stato documentato in tutto il mondo, e in particolare negli Stati Uniti (Gunduz et al., 2008), Turchia (Koca et al., 2007; Gunduz et al., 2008), Giappone (Saisho et al., 1994) e Nuova Zelanda (Howes, 1949; Love, 1990). Le piante associate a mieli tossici includono *Kalmia latifolia* (alloro di montagna) e specie simili, come *Kalmia angustifolia* (l'alloro di pecora); negli Stati Uniti (Mizrahi et al., 1997), *Melicope ternata* (il cespuglio di wharangi) e la *Coriaria arborea* (tutu) in Nuova Zelanda, dove sono stati riferiti casi di avvelenamento dovuto alla melata tossica prodotta dall'insetto infestante *Scolypopa australis*, che si nutre della linfa del tutu (Espina-Prez et al., 1983; New Zealand Food Safety Authority, 2010).

È stato segnalato che il nettare di alcuni fiori produce un miele psicoattivo per gli esseri umani, nonostante sia innocuo per le api e le loro larve (Mayor, 1995). Ad esempio, il miele proveniente da aree in cui è consentita la coltivazione del papavero da oppio può avere proprietà narcotiche (McAlpine, 2002).

Il miele prodotto dalle famiglie delle *Solanaceae* contiene solanina, glicoalcaloidi, saponine e sostanze simili all'atropina (Palmer-Jones, 1965; White et al., 1975).

Allo stesso modo, sono stati segnalati effetti tossici con il miele di alcune *Asteraceae*, in particolare di *Senecio jacobaea* (Senecione di San Giacomo), (Deinzer et al., 1977; Beuerle et al., 2011). Si ritiene inoltre che alti livelli di alcaloidi pirrolizidinici presenti in alcuni mieli causino una progressiva tossicità cronica, soprattutto tra neonati e feti (Edgar et al., 2002).

Il miele della famiglia delle *Ericaceae* (*Rhododendron ponticum* e *Andromeda*, *Kalmia*, *Leucothoe*, *Lyonia* e *Pieris*) è risultato tossico (Mayor, 1995; Nazmul et al., 2014) per un elevato contenuto in GTX, in presenza di una raccolta massiva monospecie che di rado si verifica in condizioni naturali, dato che le api liberamente raccolgono il nettare della maggior parte delle fioriture. Il pericolo di intossicazione ha però preoccupato le Autorità sanitarie e ha indotto l'UE a limitare la commercializzazione di mieli monospecie da *Ericaceae*

(EFSA 2023b), prodotti intenzionalmente e commercializzati ad alti costi per i loro impieghi come rimedi naturali (Silici et al., 2008; Xiong et al., 2009).

### 1.2.2. Micotossine

Le micotossine sono molecole tossiche a basso peso molecolare (<1000 Dalton) prodotti durante il metabolismo secondario di alcune tipologie di muffe, come *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, largamente diffuse in natura (Janik et al., 2020; Marin et al., 2013). La contaminazione delle derrate alimentari da parte di queste muffe è imprevedibile, può avvenire in diverse fasi della filiera alimentare ed è influenzata da molti aspetti, come pratiche agricole, condizioni ambientali e di raccolta e/o loro conservazione (Kharayat & Singh, 2018). In generale, tutte le colture e i cereali conservati in modo improprio a temperature elevate e con umidità elevata per un periodo prolungato possono essere soggetti alla crescita di muffe e alla contaminazione da micotossine (Magan e Olsen, 2004). Il mais è considerato la coltura più suscettibile a tale contaminazione. La maggior parte delle micotossine sono chimicamente e termicamente stabili durante le varie fasi di lavorazione degli alimenti, tra cui cottura, bollitura, cottura al forno, frittura, arrostitimento e pastorizzazione (Magan e Olsen, 2004). Nonostante i cereali siano la fonte alimentare più soggetta a tale contaminazione, le micotossine possono arrivare al consumatore anche attraverso prodotti di origine animale come carne, uova, latte, a seguito del consumo di mangime contaminato da parte dell'animale, e miele (Magan e Olsen, 2004). La presenza di micotossine è ormai da molto tempo una preoccupazione costante nelle industrie alimentari, agricole e zootecniche e tenderà ad esserlo sempre di più (Moretti et al., 2019). I cambiamenti climatici a cui stiamo assistendo, come l'aumento delle temperature oceaniche e atmosferiche, hanno un impatto significativo sugli stadi e sui tassi di sviluppo dei funghi tossinogeni, modificando le interazioni ospite-patogeno, influenzando profondamente anche le condizioni per la produzione di micotossine. Nei prossimi anni, infatti, in Europa è prevista un'estensione del rischio di contaminazione da aflatossine (Moretti et al., 2019). Attualmente, sono stati identificati e documentati oltre 300 tipologie di micotossine (El-Sayed et al., 2022). Tra le micotossine più rilevanti, conosciute per la loro diffusione negli alimenti e per il loro impatto negativo sulla salute umana, troviamo le aflatossine (B1, B2,

M1, G1, G2), i tricoteceni (deossinivalenolo, tossina T-2, tossina HT-2 ecc.), le fumonisine (A, B1, B2), l'ocratossina A (OTA) e lo zearalenone (ZEN) (Alshannaq e Yu, 2017; Silva et al., 2020).

Le micotossine possono avere un impatto altamente negativo sulla salute umana (Do et al., 2020). Quando si è esposti cronicamente anche a piccole quantità di tali sostanze, queste sono in grado di causare effetti patologici come carcinogenesi, mutagenesi, nefrotossicità e teratogenesi, oltre che avvelenamento acuto in caso di esposizione ad alte dosi (Do et al., 2020). L'aflatossina B1 è la più diffusa nei prodotti alimentari ed è una delle più potenti in termini di genotossicità e cancerogenicità. È prodotta sia dall'*Aspergillus flavus* sia dall'*Aspergillus parasiticus*. L'aflatossina M1 è uno dei principali metaboliti dell'aflatossina B1 nell'uomo e negli animali e può essere presente nel latte proveniente da animali nutriti con mangimi contaminati da aflatossina B1 (EFSA CONTAM 2020). Già nel 1987 la IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) concluse che nell'uomo esistevano prove sufficienti della cancerogenicità delle aflatossine presenti in natura. Ciò ha portato alla loro classificazione nel Gruppo 1 (Cancerogeno per l'uomo) (Ostry et al., 2017). Conclusione poi successivamente riaffermata con altre valutazioni nel 1993, 2002 e 2012. Le tossine derivate da *Fusarium moniliforme*, come la fumonisine B1 e B2 (FB1, FB2), sono state classificate come possibilmente cancerogene per l'uomo (Gruppo 2B) (Ostry et al., 2017).

Per esposizione a tricoteceni, sono stati osservati effetti come: perdita di peso, vomito, sanguinamento e gravi problemi cutanei (Sobrova et al., 2010). Il deossinivalenolo (DON) è noto per la sua tossicità enteropatogena (Mahato et al., 2022), tuttavia, sembra esercitare anche effetti immunotossici, causando una diminuzione della funzione del sistema immunitario (Silva et al., 2020). L'OTA, invece, è considerata una tossina nefrotossica, causando lesioni istopatologiche a livello renale. L'esposizione a OTA causa un'inibizione della sintesi proteica, di DNA e RNA (Silva et al., 2020), oltre che mutagenesi e genotossici (formazione di addotti OTA-DNA) (EFSA CONTAM 2020, Ostry et al., 2017). Viene classificata dalla IARC all'interno del Gruppo 2B (Possibile cancerogeno per l'uomo) (Ostry et al., 2017).

**Figura 1-** Classificazione delle micotossine più impattanti sulla salute umana secondo IARC e *Health Guidance* (Iqbal, 2021).

Mycotoxins	IARC Classifications	Health Guidance
<ul style="list-style-type: none"> <li>• AFs</li> <li>• AFM1</li> <li>• NIV</li> <li>• OTA</li> <li>• ZEN</li> <li>• FB1, FB2, FB3</li> <li>• PAT</li> <li>• T2, HT2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Group 1</li> <li>• Group 1</li> <li>• Group 3</li> <li>• Group 2B</li> <li>• Group 3</li> <li>• Group 2B</li> <li>• Group 3</li> <li>• Group 3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• As low as reasonably achievable, JECFA, 1997</li> <li>• TDI= 1 µg/kg bw/d (JECFA, 1997)</li> <li>• TDI= 1.2µg/kg bw/d (JECFA, 2013)</li> <li>• TWI= 120ng/kg bw/d (EFSA, 2006); PTWI= 100 ng/kg bw/d, JECFA, 2008)</li> <li>• PMTDI= 0.5µg/kg bw/d (JECFA, 2000); TDI = 0.25µg/kg bw/d (EFSA, 2011)</li> <li>• PMTDI= 2 µg/kg bw/d (JECFA, 2002); TDI = 2 µg/kg bw/d (SCF, 2003)</li> <li>• PMTDI = 0.4 1.2µg/kg bw/d (JECFA, 1995)</li> <li>• TDI (T2, HT2)= 0.06µg/kg bw/d (JECFA, 2011); PTDI= 0.01 µg/kg bw/d (JECFA, 2002)</li> </ul>

IARC classifications = **Group 1**= carcinogenic to humans; **Group 2A**, probably carcinogenic to humans; **Group 2B**, possibly carcinogenic to humans; **Group 3**, not classifiable as to its carcinogenicity to humans  
PMTDI (provisional maximum tolerable daily intake); TDI (tolerable daily intake); PTWI (provisional tolerable weekly intake); TWI (tolerable weekly intake).

Current Opinion in Food Science

Il miele può diventare un substrato adatto per la crescita di muffe. Questo può accadere a causa dell'alta concentrazione di zuccheri, dell'umidità presente, e di altri fattori ambientali (Keskin et al., 2023). Le muffe possono prosperare in condizioni favorevoli, anche se il miele ha naturali proprietà antimicrobiche. La contaminazione da muffe nel miele può compromettere la sua qualità, influenzare il suo sapore e, in alcuni casi, rappresentare un rischio per la salute (Keskin et al., 2023). È importante conservare il miele in condizioni ottimali, come un ambiente fresco e asciutto, per prevenire la crescita di muffe. Inoltre, il controllo della qualità del miele dovrebbe includere la verifica della presenza di muffe e delle tossine da esse prodotte per garantire un prodotto sicuro e di alta qualità per i consumatori (Keskin et al., 2023).

### 1.2.2.1 Metodiche di analisi

La determinazione delle micotossine in diverse categorie di alimenti è preceduta da diverse fasi come il campionamento, la preparazione del campione e successivamente, l'analisi strumentale. La fase di preparazione del campione comprende lo step di estrazione e la purificazione del/ degli analita/i target dalla matrice. Entrambi gli step sono fondamentali, non possono prescindere l'uno dall'altro e la loro adeguata esecuzione è cruciale per una corretta determinazione e quantificazione delle micotossine (Janik et al., 2021). Nel caso dell'analisi delle micotossine spesso il campionamento è già uno step particolarmente critico; studi precedentemente condotti da Janik et al., 2021 hanno dimostrato come la distribuzione delle micotossine negli alimenti non sia omogenea. Bensì, circa lo 0,1% del campione potrebbe essere contaminato da micotossine e quindi contenerne livelli elevati, mentre l'altra parte del campione potrebbe anche esserne priva (Janik et al., 2021). L'obiettivo di un buon piano di campionamento, infatti, è quello ottenere un campione affidabile che soddisfi parametri quali lo scopo delle indagini, rispetto la natura della matrice alimentare coinvolta e la natura della tossina. L'inaffidabilità dei risultati nasce sia quando si seleziona la parte fortemente contaminata di un campione, sia quella senza micotossine. Pertanto, è estremamente importante che il campionamento venga fatto su campioni precedentemente omogeneizzati e che le aliquote vengano raccolte da punti diversi dello stesso campione/ derrata, quando possibile (Iqbal, 2021, Janik et al., 2021). Passando alla fase di estrazione, questa mira ad estrarre le micotossine da alimenti e mangimi dal campione mediante l'utilizzo di solventi. Bisogna tenere a mente però, sia durante la fase di estrazione che di analisi vera e propria, che le mufte possono al contempo produrre più di una tipologia di micotossina, pertanto, sarà necessario che le tecniche di estrazione ed analisi siano in grado di determinare diverse tipologie di tossine contemporaneamente (Iqbal, 2021). Uno dei metodi utilizzati è l'estrazione liquido-liquido (LLE), la quale sfrutta la diversa solubilità delle tossine in fase acquosa ed in fase organica e la immiscibilità delle due fasi. Gli analiti estratti si ripartiranno in un solvente mentre la matrice resterà nell'altro (Turner et al., 2009). Un altro tipo di metodo estrattivo utilizzato per le matrici solide è l'estrazione solido-liquido (SLE), basato sulla pesatura del campione omogeneizzato sulla successiva aggiunta del solvente di estrazione, seguita dall'agitazione

in uno shaker, utilizzato spesso per l'estrazione delle micotossine dai cereali (Xie et al., 2016). L'estrazione liquida pressurizzata (PLE), nota anche come estrazione accelerata con solvente (ASE), è lo stesso metodo della SLE ma eseguita a pressione e temperatura aumentate in un recipiente resistente alla pressione (Miklos et al., 2020). In questi metodi, vengono utilizzati solventi convenzionali ad alte temperature (100–180 °C) e pressioni (1500–2000 psi) per migliorare l'estrazione degli analiti dalla matrice (Razzazi-Fazeli e Reiter, 2021). Il metodo successivo è l'estrazione del fluido supercritico (SFE). SFE può ridurre al minimo ed eliminare l'uso di solventi organici mediante l'applicazione di CO<sub>2</sub> supercritica. La procedura SFE è utilizzata principalmente per l'estrazione di molecole organiche non polari (Xie et al., 2016). La pulizia dell'estratto è fondamentale per ridurre gli effetti della matrice ed eliminare le sostanze che possono interferire con il successivo rilevamento di micotossine. La purificazione dell'estratto aumenta la specificità e la sensibilità, con conseguente miglioramento dell'accuratezza e della precisione della quantificazione. Tuttavia, i metodi più comunemente utilizzati per la purificazione delle micotossine sono l'estrazione in fase solida (SPE) e le colonne di immunoaffinità (IAC), perché sono rapide, efficienti e riproducibili con un ampio intervallo di selettività (Razzazi-Fazeli e Reiter, 2021, Alshannaq e Yu 2017). Il metodo SPE coinvolge dei sorbenti solidi (dove vengono assorbite le micotossine), che vengono solitamente confezionati in cartucce e risciacquati per rimuovere i contaminanti e catturare le micotossine (Huertas-Pérez et al., 2017). La SPE è una tecnica rapida, efficiente e riproducibile, ma presenta alcune limitazioni, come l'impossibilità di utilizzare un'unica cartuccia per il rilevamento di tutte le micotossine. Inoltre, l'efficienza può essere influenzata da diverse condizioni, come: il tipo di solvente, oppure il pH e la forza ionica del campione (Pereira et al., 2014). Tuttavia, un notevole miglioramento nella selettività della purificazione è stato successivamente ottenuto grazie allo sviluppo tecnologico che ha permesso l'introduzione delle colonne multifunzionali Mycosep e delle colonne ad immunoaffinità (IAC) alla fine degli anni '80 (Capriotti et al., 2012). Negli ultimi anni però, la fase di estrazione delle micotossine dalle matrici più disparate è stata ottimizzata maggiormente, con l'obiettivo di sviluppare metodiche rapide, semplici, robuste ed a basso costo. Tra queste, il metodo QuEChERS

rappresenta una delle metodiche più innovative ed utilizzate degli ultimi anni (González-Curbelo et al., 2015). Il metodo QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) è stato inizialmente sviluppato per l'analisi dei pesticidi, ma facilita il rilevamento simultaneo di diversi gruppi di micotossine in varie matrici (Pereira et al., 2015). Questo metodo richiede innanzitutto un'estrazione con acqua acetonitrilica, seguita da una ripartizione liquido-liquido indotta dall'aggiunta di sali inorganici. Di conseguenza, alcuni componenti polari della matrice rimangono nello strato acquoso, mentre le micotossine vengono spostate nella fase organica. Successivamente, viene applicata un'estrazione dispersiva in fase solida per ridurre altri composti della matrice dalla fase organica (González-Jartín et al., 2019). Il metodo verrà descritto in maniera dettagliata nella sezione 3.3.

Per quanto riguarda la parte di determinazione strumentale, nel tempo sono stati studiati diversi approcci. In generale però la tecnica analitica predominante è quella cromatografica: cromatografia su strato sottile (TLC) e cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) in combinazione con vari rivelatori come serie di diodi, fluorescenza e UV. La cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) e la gascromatografia-spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS), tutte tecniche ampiamente applicate nel rilevamento delle micotossine (Janik et al., 2021, Nuvoloni et al., 2021). Mentre nei casi in cui è necessaria un'analisi rapida, viene spesso utilizzato il test ELISA, un metodo immunoenzimatico che sfrutta la rilevazione delle reazioni antigene-anticorpo. Per rendere le micotossine antigeniche però, è necessario che queste siano legate a una catena proteica o polipeptidica. Tuttavia, molte micotossine, come l'aflatossina, la tossina HT-2 e la tossina T-2, non mostrano reazioni di legame con catene proteiche o polipeptidiche, a causa della mancanza di gruppi reattivi. Pertanto, è necessario attaccare un gruppo carbossile reattivo o un altro gruppo alla molecola della tossina, il che influisce sulla sensibilità dell'analisi, come nel caso della tossina HT-2 e della tossina T-2 (Nuvoloni et al., 2021).

La tecnica TLC permette di effettuare uno screening economico di un grande numero di campioni. Tuttavia, ha come svantaggio la scarsa sensibilità e accuratezza, che rende la quantificazione molto difficile e poco affidabile (Singh e Mehta 2020). La tecnica LC,

ampiamente studiata per l'analisi delle micotossine, consente la determinazione simultanea di diverse micotossine, indipendentemente dalla loro struttura chimica e attività biologica, viene applicata generalmente come tecnica di separazione e determinazione di micotossine ad alta polarità, non volatili e termicamente labili (Yang et al., 2020). I rivelatori più comuni accoppiati all'LC sono quelli UV-visibile (UV) o fluorescenti (FLD), che si basano sulla presenza di un cromoforo nelle molecole ma anche le varie tipologie di MS (spettrometria di massa singola e tandem MS (MS/MS) o ad alta risoluzione HRMS) (Turner et al., 2009). Alcune tossine hanno già una fluorescenza naturale (ad esempio, AF, OTA) e possono essere rilevate direttamente in LC-FLD. Per altri tipi di micotossine, come la fumonisina B 1 (FB 1), che non possiedono cromofori nella loro struttura, è necessaria la derivatizzazione (Zhang et al., 2018). La derivatizzazione viene utilizzata per aggiungere cromofori o porzioni fluorescenti all'analita. Il processo può essere eseguito prima dell'analisi cromatografica (derivatizzazione precolonna) o dopo la separazione della colonna e prima del rilevamento (derivatizzazione postcolonna) (Moldoveanu e David 2015). I principali limiti della tecnica LC sono le questioni pratiche basate sull'effetto matrice e sulla preparazione del campione. I vantaggi di questa tecnica invece sono legati alla possibilità di determinare analiti a basso peso molecolare in concentrazioni molto basse, a livello di tracce, con un elevato grado di affidabilità e robustezza, soprattutto quando abbinata alla spettrometria di massa (Janik et al., 2021, Pascale et al., 2019). La LC-MS/MS fornisce elevata selettività e sensibilità, maggiore certezza dell'identificazione degli analiti e una gamma più ampia di matrici analizzabili rispetto ai metodi che utilizzano rilevatori convenzionali (Janik et al., 2021, Pascale et al., 2019). Inoltre, permette anche la determinazione simultanea di diverse micotossine. Diversi studi hanno confermato che la LC-MS/MS fornisce uno dei risultati più affidabili e sensibili per la determinazione simultanea dell'analisi multi-micotossine (Bessaire et al., 2019, Flores-Flores e González-Peñas, 2017, Al-Taher et al., 2013).

La tecnica GC, infine, viene utilizzata raramente nell'analisi delle micotossine a causa della bassa volatilità e dell'elevata polarità degli analiti. Con questa tecnica, la fase di derivatizzazione si rende necessaria per la loro conversione in derivati volatili utilizzando reagenti di derivatizzazione come trimetilclorosilano e N-trimetilsilimidazolo. Possiede

maggior applicazione quando accoppiata alla MS/MS. I principali problemi nell'analisi GC delle micotossine sono: blocco della colonna, risposte alla deriva, contaminazione incrociata da campioni precedenti e non linearità delle curve di calibrazione con alcuni tipi di rilevatori (Jannik et al., 2021). Questa tecnica, dunque, tende a risultare più laboriosa rispetto ad altri metodi di analisi ad oggi disponibili (Rodríguez-Carrasco et al., 2013).

#### *1.2.2.2 Legislazione e presenza di micotossine nei prodotti dell'alveare*

La normativa UE tutela i consumatori fissando i livelli massimi di aflatossine in alimenti e mangimi per garantire che non nuocciano alla salute umana o animale; mantenendo i tenori di micotossina al livello più basso ragionevolmente conseguibile, seguendo le buone pratiche raccomandate in materia di agricoltura, stoccaggio e lavorazione. I tenori massimi alcune micotossine e negli alimenti sono stabiliti nel regolamento (CE) 1881/2006 e successive modifiche. Le disposizioni relative ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine sono state introdotte con il regolamento (CE) n. 401/2006. La direttiva 2002/32/CE, invece, stabilisce i livelli massimi di contaminanti, comprese alcune micotossine, ammessi nei mangimi. Tuttavia, per il miele e i prodotti dell'apicoltura però, non sono ancora stati stabiliti limiti massimi residuali relativi alle micotossine. Diversi autori hanno riportato in letteratura evidenze circa la contaminazione da micotossine nei prodotti dell'alveare; per quanto riguarda il polline, Kostić, et al., (2017) riportano una concentrazione di aflatossina-B1 di  $16 \mu\text{g kg}^{-1}$ , più di quattro volte il limite raccomandato da Campos, et al., (2008) di  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Il DON invece, è stato trovato a concentrazione di  $29 \mu\text{g kg}^{-1}$  secondo quanto riportato da Nuvoloni, et al., (2021) e l'OTA a concentrazione di  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  da Kačániová, et al., (2011). Da uno studio recente di Keskin e Eypoglu 2023, si può evincere che, in media, le quantità di micotossine nei prodotti dell'apicoltura (miele, polline, propoli, pappa reale) risultano rispettivamente essere di  $1.601 \pm 0.32 \mu\text{g kg}^{-1}$  per DON,  $0.704 \pm 0.09 \mu\text{g kg}^{-1}$  per T-2,  $0.141 \pm 0.02 \mu\text{g kg}^{-1}$  per HT-2 e  $0.021 \pm 0.003 \mu\text{g kg}^{-1}$  per OTA. Le micotossine più frequentemente rilevate sono risultate essere DON (35,7%) e T-2 (35,7%) nei prodotti dell'apicoltura in generale. Inoltre, è importante notare come almeno una micotossina è stata rilevata nel 76,8% dei campioni analizzati. Per quanto riguarda il miele nello specifico, Cinar, A. (2020) e Kiš, et al., (2018)

hanno descritto nei loro lavori la presenza di muffe come *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Penicillium*, le quali potrebbero essere indice della presenza concomitante delle relative tossine. Keskin e Eypoglu (2023) riportano, infatti, la presenza di DON, tossina HT-2, tossina T-2 e OTA nei campioni di miele da loro analizzati. In particolare, l'ocratossina è stata la micotossina più frequentemente rilevata, (50,0%) con un valore medio di concentrazione pari a  $0,0211 \pm 0,004 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Keskin and Eypoglu 2023).

### 1.3 Principali contaminanti di origine antropica nel miele

Il miele e i prodotti dell'alveare possono essere contaminati da una serie di inquinanti chimici la cui presenza è legata ad attività antropiche come l'industria, l'impiego di combustibili fossili, l'apicoltura e l'agricoltura. Le api, infatti, possono agire come veicoli per il trasferimento di inquinanti all'interno dell'alveare mentre raccolgono nettare, polline, resina vegetale e acqua. Tra i vari contaminanti chimici i composti organici persistenti (POPs) rivestono un'importanza particolare a causa delle loro proprietà chimico-fisiche. Queste sostanze, infatti, presentano una forte resistenza alla degradazione e per tale motivo possono contaminare grandi estensioni di territorio. Inoltre, essendo alcune di esse altamente lipofile, hanno tendenza a bioaccumularsi (Simsek et al., 2021).

La presenza di inquinanti tossici nel miele può essere considerata un indicatore dello stato di contaminazione dell'ambiente circostante l'alveare, in quanto si stima che mediamente l'area di copertura delle api sia di circa 10 km<sup>2</sup> intorno alla loro sede (Kastrati et al., 2021). I maggiori contaminanti del miele risultano essere: metalli pesanti, policlorobifenili (PCB), idrocarburi policiclici aromatici (IPA), erbicidi e pesticidi.

#### 1.3.1 Metalli pesanti

L'industrializzazione e l'urbanizzazione del mondo moderno stanno contribuendo a un aumento significativo dei metalli pesanti tossici nell'ambiente, con effetti negativi sulla salute umana e sull'ecosistema. Il termine "metalli pesanti" fa generalmente riferimento a elementi con densità superiore a 5g/cm<sup>3</sup> e numero atomico maggiore di 20 (Hazrat et al., 2018). Questi metalli includono piombo (Pb), cadmio (Cd), arsenico (As) e mercurio (Hg), molti dei quali sono presenti nell'ambiente a causa di fonti sia naturali che antropiche. Si

ritiene che le emissioni naturali contribuiscano alla contaminazione ambientale da metalli pesanti in misura nettamente inferiore rispetto alle emissioni antropiche (Li et al., 2015), che comprendono lo stoccaggio e la combustione di combustibili fossili, l'uso di prodotti fitosanitari e fertilizzanti agricoli, la discarica di rifiuti tossici e industriali, etc. Questi elementi possono penetrare negli alimenti attraverso l'aria, l'acqua e il suolo contaminati (Nowak et al., 2021). Le emissioni industriali, tra cui quelle provenienti da acciaierie, cementifici, fonderie e trasporti su strada, sono considerate la fonte più significativa di inquinamento atmosferico (Nigra et al., 2019).

Tra i metalli pesanti, Pb, Cd, As e Hg, rappresentano le principali minacce per la salute umana, anche in tracce. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) classifica As e Cd come cancerogeni per l'uomo (gruppo 1), il Pb come probabilmente cancerogeno (gruppo 2A) e mercurio come non cancerogeno (gruppo 3) (IARC 2012, 2021).

Le api possono veicolare metalli pesanti provenienti dalle piante che a loro volta li assorbono dal suolo attraverso le radici o vengono contaminate tramite deposizione atmosferica (Kastrati et al., 2021). La concentrazione di Pb, Cd e As nei prodotti dell'alveare dipende da molti fattori, tra cui la località geografica, il grado di inquinamento dell'ambiente circostante, il clima, la stagione e le condizioni meteorologiche (vento, pioggia) (Matuszewska et al., 2021). In alcuni studi si è riscontrata una correlazione tra le concentrazioni di differenti metalli pesanti, suggerendo una fonte comune di provenienza (Bazeyad et al., 2019). Tra i prodotti dell'alveare testati per il contenuto in metalli pesanti il miele è stato maggiormente studiato rispetto alla propoli e al polline d'api (Nowak et al., 2021).

Secondo le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) del 2019, il miele dovrebbe essere privo di metalli tossici in quantità che possano rappresentare un pericolo per la salute umana, e in base agli standard FAO/OMS (2001) il contenuto massimo di piombo nel miele non dovrebbe superare i 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Demir Kanbur et al., 2021).

Il Regolamento della Commissione (CE) n. 915/2023 stabilisce per numerosi alimenti i livelli massimi di residui (LMR) di metalli pesanti tossici. L'unico metallo pesante incluso dalla

normativa per il miele è il Pb, i cui LMR non devono superare il limite di 100 µg kg<sup>-1</sup> di peso umido.

Attualmente l'OMS sta raccogliendo dati sui livelli di mercurio e piombo in vari tipi di cibo, incluso il miele, al fine di valutare i rischi per la salute umana (Food Safety News, 2021).

### 1.3.2 Policlorobifenili (PCB)

I PCB sono composti organici aromatici clorurati e costituiscono una classe di sostanze derivate dai bifenili, caratterizzate dalla sostituzione di alcuni atomi di idrogeno con atomi di cloro. I PCB sono classificati come POPs, utilizzati in passato in vari settori industriali come oli condensati, liquidi dielettrici per trasformatori, vernici, adesivi, plastica e altri materiali. Sebbene il loro utilizzo sia vietato da più di 50 anni, sono ancora presenti nell'ambiente e nei cibi (Hertz-Picciotto et al., 2005). La loro diffusione nell'ambiente sembra variare tra le diverse aree geografiche, con concentrazioni più elevate a livello di zone urbane e semi-urbane rispetto alle aree rurali. Questo può essere attribuito al differente inquinamento atmosferico e industriale presente in tali ambienti (Nowak et al., 2021).

I PCB si suddividono in "dioxin-like" e "non dioxin-like" a seconda della tossicità simile o diversa dalla diossina (EFSA, 2004). Secondo l'IARC i PCB rientrano nel gruppo 1 dei cancerogeni per l'uomo (IARC, 2016, 2021).

Gli studi condotti sui PCB nei prodotti dell'alveare evidenziano la loro presenza anche in aree precedentemente considerate prive di contaminanti (dos Santos et al., 2021), tuttavia la concentrazione di PCB risulta essere maggiore a livello di aree altamente industrializzate (Hertz-Picciotto et al., 2005). Ricerche condotte su varie matrici, quali pane d'api, miele e propoli, e sulle api stesse hanno rilevato concentrazioni più elevate di PCB a livello di queste ultime (Sari et al., 2021). Tali risultati potrebbero essere legati sia alla capacità di trattenere passivamente il particolato da parte della peluria degli insetti, sia all'accumulo degli inquinanti organici negli adipociti (Nowak et al., 2021).

### 1.3.3 Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Gli IPA costituiscono una categoria di composti chimici con strutture molecolari comprendenti un numero variabile da due a una dozzina di anelli aromatici. Questi composti, facenti anch'essi parte dei POPs, sono abbondantemente diffusi nell'ambiente a

causa di fonti naturali e antropogeniche. Le principali fonti antropogeniche includono l'emissione di fumi e particelle dai motori a combustione interna, dall'industria siderurgica, dalle centrali elettriche e dalla combustione di legno, carbone e petrolio.

L'Autorità per la sicurezza alimentare (EFSA) ha identificato quattro IPA specifici (benzo[a]antracene, crisene, benzo[b]fluorantene e benzo[a]pirene) come indicatori di citotossicità e genotossicità negli alimenti (EFSA, 2008). L'IARC ha classificato sessanta IPA in base al loro potenziale cancerogeno per gli esseri umani. Tra questi, il benzo[a]pirene è il solo IPA classificato cancerogeno di gruppo 1, mentre tre IPA sono considerati probabilmente cancerogeni di gruppo 2A e undici come possibilmente cancerogeni di gruppo 2B. I restanti quarantacinque IPA sono stati considerati come non classificabili in termini di cancerogenicità per l'uomo (gruppo 3) (IARC 2010, 2021).

Gli IPA possono essere presenti nel miele, tuttavia la letteratura sull'argomento è ancora limitata e si concentra principalmente sulla messa a punto di metodi analitici avanzati per rilevarli nei prodotti dell'alveare e nelle api (Gomez-Ramos, 2019).

In apicoltura il fumo viene comunemente utilizzato durante la raccolta del miele in quanto ha un effetto calmante sulle api e previene gli operatori da eventuali attacchi, ma questa pratica può favorire un aumento della concentrazione di IPA nei prodotti dell'alveare (Nowak et al., 2021). In generale la quantità di IPA prodotta durante la combustione del legno varia in base al tipo di legno utilizzato (Škaljac et al., 2018); studi condotti su campioni di miele prelevati prima e dopo la fumigazione hanno rilevato una concentrazione di IPA significativamente superiore dopo l'impiego del fumo (Cochard et al., 2021).

Ricerche recenti hanno permesso di correlare il grado di industrializzazione dell'area coperta dalle api bottinatrici con il contenuto di IPA nei prodotti dell'alveare. Un'indagine condotta da Kazazic et al. (2020) su campioni di miele provenienti da diverse località in Bosnia ha evidenziato che campioni prelevati da aree industrializzate presentavano concentrazioni di IPA più elevate rispetto a campioni provenienti da aree ritenute a bassa contaminazione. Cochard et al. (2021) hanno esaminato il contenuto di IPA negli insetti provenienti da diverse località, dimostrando una significativa differenza nella contaminazione da IPA tra le api provenienti da siti urbani e quelle provenienti da siti

seminaturali, mentre non sono emerse differenze significative tra campioni di api provenienti da siti agricoli. Sebbene lo studio avesse come oggetto il contenuto di IPA nel corpo delle api, i risultati possono costituire un'indicazione del contenuto di questi inquinanti nel miele e nei prodotti dell'alveare (Nowak et al., 2021).

Le condizioni meteo-climatiche possono influenzare la distribuzione di IPA nel miele (Kazazic et al., 2020). Durante l'estate, ad esempio, a causa delle temperature più elevate può aumentare la concentrazione di IPA in fase gassosa rispetto all'inverno, mentre la pioggia e il vento possono rimuovere gli IPA dai fiori (Nowak et al., 2021). Attualmente non sono stati fissati dal punto di vista legislativo gli LMR per gli IPA nei prodotti dall'alveare mentre il Regolamento della Commissione (UE) n. 915/2023 li stabilisce a livello di altre matrici. Secondo la legislazione in vigore i valori di LMR variano in funzione del tipo di alimento e si estendono da  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  ad un limite massimo di  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Diversi studi hanno rilevato valori superiori al limite di  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  nei prodotti dell'alveare. In uno studio condotto da Petrović et al. (2019) è emerso che lo 0,3% dei campioni di miele serbo acquistati al supermercato presentava una concentrazione di IPA superiore a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  e concentrazioni ben più elevate sono state misurate in campioni di miele turco (Kargar et al., 2017) e nigeriano (Iwegbue et al., 2016). Jovetić et al. (2018) hanno registrato valori massimi di IPA per il polline d'api di  $163,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ , un dato circa dieci volte superiore al valore massimo da loro riscontrato nel miele ( $18,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e secondo gli autori questi risultati sono attribuibili alla componente lipidica del polline, assente nel miele.

Dal momento che il miele può contenere quantità significative di IPA, Nowak et al. (2021) hanno calcolato l'assunzione giornaliera accettabile (ADI) di miele in base ai dati di consumo medio, concludendo che non sussisterebbero rischi significativi per la salute umana. Nonostante le concentrazioni di IPA nei prodotti dell'alveare superino i valori di  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  in alcune regioni industrializzate e urbanizzate, gli autori ritengono che l'assunzione alimentare complessiva di IPA proveniente da questi prodotti sia inferiore rispetto a fonti più comuni, come il pesce in scatola, il cioccolato e gli alimenti affumicati.

### 1.3.4 Sostanze alchiliche perfluorate (PFAS)

I PFAS costituiscono un gruppo complesso di composti organo-fluorurati di origine antropica e si caratterizzano per avere tutti o quasi tutti gli atomi di idrogeno degli idrocarburi alifatici sostituiti da atomi di fluoro (Menzel et al., 2021).

I PFAS possono essere suddivisi in due gruppi principali: acidi perfluorocarbossilici (PFCAs) e acidi perfluorosolfonici (PFSA) (Surma et al., 2016). Questi composti sono in uso dagli anni '40 e trovano applicazione in varie industrie come tessuti, prodotti per la casa, antincendio, edilizia ed elettronica (Meng et al. 2021).

A causa della loro persistenza e capacità di diffondersi nell'ambiente, i PFAS sono classificati come POPs (Menzel et al., 2021). Le principali vie di esposizione umana ai PFAS sono attraverso l'acqua potabile e il consumo di cibo. In letteratura sono disponibili poche informazioni sulla presenza di PFAS nel miele (Nowak et al., 2021). Solo di recente, il Regolamento (UE) 2023/915 ha stabilito i livelli massimi per 4 PFAS (PFOS, PFOA, PFNA, PFHx) e la somma dei 4 in alcuni alimenti, non prevedendo però limiti specifici per il miele. Surma et al., 2016 hanno condotto uno studio che ha esaminato campioni di miele provenienti da vari paesi europei per la presenza di 10 PFAS diversi. I PFAS sono risultati essere presenti in quasi tutti i campioni di miele analizzati, con concentrazioni che variavano da 0,124 a 0,798 ng g<sup>-1</sup>. I mieli provenienti dai paesi del Sud Europa presentavano i livelli più elevati di contaminazione da PFAS, mentre quelli provenienti dai paesi del Nord Europa avevano livelli più bassi, e sembra che le differenze osservate non siano correlabili a fattori meteo-climatici.

### 1.3.5 Pesticidi

I pesticidi rappresentano una categoria di sostanze chimiche nocive utilizzate per scopi di prevenzione, controllo, eliminazione o eradicazione di grandi popolazioni di erbe infestanti, insetti, funghi, roditori e altri parassiti dannosi (Nowak et al., 2021). Nel 2019, l'OMS ha introdotto linee guida per la classificazione dei pesticidi, suddividendoli in quattro categorie distinte: (i) estremamente pericolosi (classe Ia) e altamente pericolosi (classe Ib), (ii) moderatamente pericolosi (classe II), (iii) leggermente pericolosi (classe III), e (iv) sospetti di causare pericolo acuto (classe U). Quest'ultima categoria include alcuni composti chimici come il cloruro di mercurio e l'atrazina (World Health Organization, 2020). I

pesticidi possono contaminare i prodotti dell'alveare sia attraverso il loro uso diretto in apicoltura che in modo indiretto, a causa dell'inquinamento ambientale dovuto a pratiche agricole. (Nowak et al., 2021). Si stima che l'inquinamento indiretto del miele, dovuto all'impiego di prodotti fitosanitari, ne costituisca la principale fonte di contaminazione (Gaweł et al., 2019).

Si distinguono principalmente due grandi gruppi di pesticidi: gli organoclorurati (OC) e gli organofosfati (OP). Gli OC sono stati ampiamente impiegati in agricoltura a partire dagli anni '50 fino agli anni '80 e successivamente il loro utilizzo a livello globale è stato proibito. Nonostante le rigorose restrizioni, dal momento che gli OC appartengono alla categoria dei POPs, l'uomo e gli organismi viventi rimangono tutt'ora esposti a questi inquinanti attraverso l'aria, l'acqua, il suolo e la catena alimentare (Günes et al., 2021). Tra gli OC, il composto più comunemente riscontrato nei prodotti dell'alveare è lo stereoisomero dell'esaclorocicloesano noto come lindano ( $\gamma$ -HCH), noto per le sue proprietà insetticide (Günes et al., 2021). Tale composto è stato classificato secondo l'IARC come cancerogeno per l'uomo (IARC, 2021). Tra gli OP, uno dei pesticidi più utilizzati in agricoltura è il chlorpyrifos, noto per i suoi effetti estremamente tossici e letali per le popolazioni di api (Martinello et al., 2021). Alla categoria dei pesticidi OP appartiene anche l'erbicida glifosato, che sarà trattato in dettaglio nei prossimi paragrafi.

Per i prodotti dell'alveare, la contaminazione da pesticidi segue l'ordine seguente: propoli > miele > polline d'api (Nowak et al., 2021). In generale la propoli accumula concentrazioni maggiori di pesticidi e POPs rispetto agli altri prodotti dell'alveare e questa tendenza potrebbe essere legata alle proprietà lipofile di questi composti (Nowak et al., 2021). Uno studio condotto in Germania ha analizzato la concentrazione di inquinanti lipofili nella propoli e nel miele (Simsek et al., 2021), evidenziando una contaminazione della propoli legata a numerosi POPs quali pesticidi OC, IPA, eteri di difenile polibromurati (PBDE), mentre per quanto riguarda il miele è stata essenzialmente riscontrata una contaminazione da IPA. Da questo studio è emerso che il 67,5% dei campioni di propoli non risultava idoneo al consumo umano contro il 32,5% di campioni di miele (Simsek et al., 2021).

Gli LMR per i pesticidi sono stabiliti dal Regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 23 febbraio 2005 sugli LMR di antiparassitari nei prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale. Alcune regolamentazioni dei pesticidi negli alimenti sono specifiche anche per il miele e altri prodotti dell'alveare, ad esempio per il  $\lambda$ -cyhalothrin ( $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ), il DDT ( $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ ), il lindano ( $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e il coumaphos ( $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Alcuni studi, come quelli condotti da Yaqub et al. (2020), hanno rilevato livelli di pesticidi superiori a questi limiti nei campioni di miele e nei prodotti dell'alveare. Ad esempio, il  $\lambda$ -cyhalothrin è stato rilevato in quantità che superavano di circa cento volte il suo LMR. Anche il bifenthrin è stato occasionalmente riscontrato ad un livello molto superiore al limite consentito ma, in generale, la maggior parte degli studi ha riportato livelli di residui di pesticidi inferiori agli LMR fissati (Nowak et al., 2021).

Molti pesticidi possono accumularsi nei tessuti umani e causare effetti cronici nel corso del tempo. Ben Mukiibi et al. (2021) hanno stimato che l'assunzione media giornaliera dei campioni di miele analizzati comportava un'esposizione ai residui di OC potenzialmente pericolosa per la salute dei consumatori (rischio riproduttivo), mentre Günes et al. (2021) hanno stabilito che non vi è alcun rischio cancerogeno nel consumo di polline o campioni di miele analizzati.

Nel corso dei tre anni di dottorato che hanno portato alla stesura di tale elaborato, ci si è focalizzati sullo sviluppo e ottimizzazione di metodiche analitiche per la determinazione di alcuni pesticidi nel miele, i composti sui quali ci si è focalizzati sono stati: chlorpirifos, formetanate, omethoate, oxamyl, thiobencarb, triazophos ed infine, glifosato, glufosinato e loro metaboliti. Tutti quanti verranno descritti più nel dettaglio nei prossimi paragrafi.

#### *1.3.5.1 Clorpirifos*

Il clorpirifos è stato uno degli insetticidi più utilizzati in Europa e negli Stati Uniti fino ai primi anni 2000 (Wołejko et al., 2022, Hites 2021, Saunders et al., 2012). Arrivato sul mercato nel 1966 come sostituto al DDT, veniva utilizzato come insetticida ad ampio spettro in ambienti residenziali e agricoli (Hites 2021). Nel 2003 in Europa gli OP rappresentavano oltre il 59% (4.645 tonnellate) delle vendite di insetticidi, tra tutti il clorpirifos era il più venduto (15,6%, 1.226 tonnellate) (Wołejko et al., 2022). A differenza del DDT, il clorpirifos

non è molto persistente nell'ambiente, dove viene introdotto tramite applicazione diretta, attraverso la deriva dell'irrorazione o il lavaggio fogliare (Wolejko et al., 2022, Saunders et al., 2012). Nell'ambiente, il clorpirifos viene rapidamente ossidato a clorpirifos-ossone a velocità che suggeriscono una durata atmosferica di circa 2 ore. Anche l'ossone stesso non è persistente, avendo una vita atmosferica di circa 11 ore (Wolejko et al., 2022).

Il suo meccanismo d'azione primario, è correlato alla capacità che il suo metabolita, il clorpirifos-ossone, possiede di legarsi e inibire irreversibilmente l'acetilcolinesterasi (AChE) nei tessuti bersaglio. Il bersaglio primario è il sistema nervoso, poichè AChE e/o butilcolinesterasi (BuChE) catabolizzano il neurotrasmettitore acetilcolina, causando una interruzione della sua funzione sinaptica e suo accumulo, insieme ad altre molecole trasmettrici, all'interno della sinapsi nervosa (Saunders et al., 2012, Eaton et al., 2008). Altri studi in vitro invece, suggeriscono che il clorpirifos abbia anche altri effetti negativi sulle cellule, tra cui citotossicità, effetti sulla sintesi di macromolecole (DNA, RNA, proteine), interazioni con i recettori dei neurotrasmettitori, interazioni con le vie di trasduzione del segnale, effetti sulla differenziazione neuronale, interazioni con vari enzimi, altri effetti neurochimici (ad esempio rilascio o assorbimento di neurotrasmettitori) e altri effetti (ad esempio stress ossidativo, effetti sui microtubuli) (Eaton et al., 2008). Per quanto riguarda gli effetti sull'uomo e altri animali, potenzialmente esposti per via orale, dermica o per inalazione, questi sembrano essere correlati all'età e al sesso; infatti, possono variare sia quantitativamente che qualitativamente con le condizioni di esposizione, le dosi e la frequenza dell'esposizione (John e Shaike 2015). Diversi studi riportano effetti negativi sullo sviluppo del cervello, alterando l'attività e la reattività neuronale, effetti fetotossici e di interferenza endocrina, oltre che enotossicità e mutagenicità (John e Shaike 2015). Proprio a causa della sua elevata tossicità, l'utilizzo del clorpirifos è stato soggetto a restrizioni sul suo utilizzo in zone residenziali e domestiche già nel 2001 negli Stati Uniti, per poi essere vietato nel 2019 (Hites 2021). Anche la Commissione Europea non ha rinnovato l'autorizzazione al suo utilizzo il 16 gennaio 2020, con l'entrata in vigore i regolamenti n. 2020/18 e 2020/17 (Wolejko et al., 2022). Per quanto riguarda la sua presenza nei prodotti dell'alveare e sulle stesse api, questa è stata ampiamente documentata negli anni, a causa

dell'elevato utilizzo di clorpirifos nel tempo (Villalba et al., 2020, Urlacher et al., 2016, Lambert et al., 2013, Mullin et al., 2010, Kiljanek et al., 2017). È indubbio che tale insetticida abbia contribuito all'aumento delle perdite di colonie di api mellifere, che vede l'esposizione delle api a pesticidi, come il clorpirifos, tra le principali cause (Villalba et al., 2020). Il limite massimo residuale per il clorpirifos e il clorpirifos metil è fissato a 10 ng g<sup>-1</sup> dal Regolamento (UE) 2020/1085.

#### *1.3.5.2 Formetanato*

Il formetanato cloridrato [m -(((dimetilammino)metilen)ammino)fenilmetilcarbammato cloridrato] è un acaricida e insetticida altamente efficace utilizzato in agricoltura sugli agrumi e frutta con semi (Divito et al., 2007). Il formetanato cloridrato è dotato di due gruppi funzionali, formamidina e carbammato. La formamidina agisce come inibitore competitivo del neurotrasmettitore octopamina, e il gruppo carbammato inibitore dell'enzima acetilcolinesterasi che regola i neurotrasmettitori. Entrambi i gruppi agiscono causando la trasmissione costante di impulsi nervosi i quali provocano convulsioni negli insetti (Staroň et al., 2017). Il formetanato cloridrato è estremamente solubile in acqua (> 50 g 100 mL<sup>-1</sup>) ed è caratterizzato da uno scarso assorbimento da parte del suolo, ciò potrebbe tradursi in un impatto negativo da parte dell'insetticida su specie non-target (Heydari et al., 2022). Inoltre, è considerato un composto altamente tossico, infatti la sua LD 50 nel ratto è di soli 14,8 mg kg<sup>-1</sup>. L'ampio spettro d'azione, l'elevata solubilità, lo scarso potenziale di assorbimento da parte del suolo e l'elevata tossicità sono caratteristiche che conferiscono al formetanato un alto potenziale di contaminazione e lo rendono un composto ad elevato impatto negativo sulla salute umana e dell'ecosistema (Divito et al., 2007). Alcuni studi condotti sugli effetti del formetanato cloridrato sull'emoglobina umana, suggeriscono che il legame del formetanato cloridrato all'emoglobina attraverso la tasca dell'eme sembra essere energeticamente molto più favorevole rispetto al legame con la cavità centrale idrofobica. Il formetanato cloridrato, dunque, può causare cambiamenti conformazionali nell'emoglobina umana e il comportamento competitivo di questo insetticida per il sito dell'ossigeno può successivamente ridurre la disponibilità di emoglobina ossigenata per l'organismo umano (Heydari et al., 2022, Sharifiyeh et al., 2019). La stessa EFSA del 2006, all'interno del

documento “Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance formetanate” indica un alto rischio tossicologico per l’esposizione dei mammiferi a questa sostanza ed elevato rischio acuto, a breve e a lungo termine, per gli uccelli (EFSA, 2006). Per quanto riguarda il rischio di contaminazione per le api e i loro prodotti, il contatto con il formetanato può avvenire non solo in maniera diretta, ma anche dall’assunzione di nettare, polline e acqua contaminati, in questo modo l’insetticida può essere anche trasportato all’interno dell’alveare e trasferito nei suoi prodotti (Staroň et al., 2017). A tutela dei consumatori, la Commissione Europea ha stabilito tramite il Regolamento (UE) 2015/401 un LMR per il formetanato e relativi sali, espressa in (cloridrato di) formetanato pari a 50 ng g<sup>-1</sup>. A tutela della salute api mellifere, invece, EFSA suggerisce che gli insetticidi a base di formetanato non dovrebbero essere applicati oltre 2 settimane prima della fioritura degli arbusti, a causa dei potenziali effetti dannosi sulle api adulte e sui loro stadi di sviluppo (Staroň et al., 2017).

#### *1.3.5.3 Ometoato*

L’ometoato, è il metabolita principale dell’insetticida organofosfato dimetoato. Il dimetoato agisce per contatto e in maniera sistemica, contro un’ampia gamma di insetti in agricoltura che in ambito domestico. La sua modalità d’azione si espleta inibendo l’acetilcolinesterasi (AChE), producendo effetti analoghi a quelli causati dal clorpirifos riportati alla sezione 1.3.6. Le principali categorie a rischio esposizione a dosi elevate sono infatti i lavoratori in ambito agricolo (Sharma et al., 2005). Da quanto emerge dalla Riunione congiunta FAO/OMS sui Residui di pesticidi del 2019, l’ometoato svolgerebbe un ruolo chiave sul grado di tossicità del dimetoato in insetti e mammiferi. Tuttavia, gli studi in letteratura sull’argomento sono, purtroppo, ancora scarsi. Sembrerebbe infatti che possa avere anche forti effetti mutageni, da studi condotti sui topi, ma i dati avvaloranti tale tesi sono ancora inconsistenti per poter emettere un giudizio definitivo (Kanungo et al., 2021). Alcuni studi, riportano livelli di ometoato al di sopra dell’LMR stabilito per legge i campioni di pomodori melanzane e peperoni (Bandhari et al., 2019). Nel miele e prodotti dell’apicoltura il LMR per l’ometoato è stato fissato a 10 ng g<sup>-1</sup> dal Regolamento 2021/155.

#### 1.3.5.4 Oxamyl

Anche Oxamyl, come i pesticidi precedentemente trattati, fa parte della categoria inibitori reversibili dell'acetilcolinesterasi. È appartenente alla classe dei carbammati, intensamente utilizzati in agricoltura grazie al loro ampio spettro d'azione, pertanto, spesso sono segnalati come una delle principali cause di avvelenamento intenzionale o accidentale di varie tipologie di animali (Biancardi et al., 2020, Osman et al., 2009). Viene utilizzato principalmente come insetticida, nematocida e acaricida su molte colture, verdure, frutta e piante ornamentali di svariate tipologie. Può essere applicato direttamente sulle piante o sulla superficie del terreno. È caratterizzato da un'elevata solubilità in acqua (280 g/L a 25 °C), un coefficiente di assorbimento nel suolo molto basso ( $K_{oc} = 25$ ), dove viene degradato per idrolisi nel suo metabolita non tossico, metil N-idrossi-N', N'-dimetil-tioxamimidato (Biancardi et al., 2022). In Italia viene commercializzato generalmente con il nome Vydate, disponibile in forma granulata o come concentrato solubile. Le sue formulazioni sono generalmente stabili e, infatti, la soluzione acquosa si decompone lentamente: ha un'emivita >31 giorni a pH 5,8 giorni a pH 7, e 3 ore a pH 9. L'aerazione, la luce solare, l'alcalinità e le temperature più elevate aumentano il tasso di decomposizione (Biancardi et al., 2022). È un composto altamente tossico, tanto che la classificazione di rischio raccomandata dall'EFSA lo colloca nella Classe IB: altamente pericoloso (European Food Safety Authority, 2022). L'utilizzo è pertanto consentito solo a personale adeguatamente formato e munito di specifica licenza. Come accennato precedentemente, anche le api possono rientrare nella categoria di animali accidentalmente avvelenati dall'utilizzo di oxamyl a causa della loro esposizione quando il pesticida è presente nell'ambiente circostante al loro spazio vitale. Nonostante non siano presenti in letterature molte informazioni su specifici effetti che questo pesticida ha sulle api, esistono alcuni dati che permettono di supporre che gli effetti tossici dell'oxamyl in questa specie non riguardano solo l'inibizione dell'acetilcolina esterasi (con tutto ciò che poi ne consegue), ma che siano associati anche alla produzione di specie reattive dell'ossigeno, le quali causano danni ossidativi alle larve di api operaie (Prezenská, et., 2019). Inoltre, come nel caso degli altri pesticidi, entrando in contatto con tali composti nell'ambiente circostante, le api sono in grado di trasferire queste sostanze all'interno dell'alveare e potenzialmente nei loro prodotti rappresentando un potenziale rischio per il

consumatore finale. A tutela dei consumatori, LMR per l'oxamyl nel miele e prodotti dell'apicoltura è fissato a 50 ng g<sup>-1</sup> dal Regolamento 2019/552.

#### *1.3.5.5 Tiobencarb*

Il tiobencarb è un erbicida appartenente alla classe dei carbammati, acetilcolinesterasi inibenti. Ampiamente utilizzato a scopo preventivo, in pre-emergenza di in diversi Paesi, molto spesso viene applicato nello specifico nelle coltivazioni di riso, nelle risaie (An et al., 2022, Wang et al., 2019, Sancho et al., 2003). Agisce inibendo la biosintesi di acido salicilico, tende ad essere poco persistente, dunque ad avere una degradazione abbastanza rapida nell'ambiente, ma poiché dotato di elevata solubilità, si manifestano ripetuti apporti di tale sostanza negli ambienti acquatici; pertanto gli organismi acquatici spesso vengono esposti a dosi più o meno elevate (Sancho et al., 2003). I pesticidi usati nelle risaie possiedono un elevato potenziale ad essere indicati come inquinanti acquatici, poiché penetrano facilmente nei corsi d'acqua e nei fiumi fuori dal sito attraverso i sistemi di drenaggio (An et al., 2022). L'acqua di risaia, infatti, quando viene rilasciata può comportare rischi ecologici per gli organismi non bersaglio (Wang et al., 2019). Infatti, uno studio del 2006 ha rilevato livelli residui di tiobencarb fino a 200 µg/L nell'acqua drenata dalle risaie in Malesia (Sapari e Ismail, 2012). Dosi subletali di tale erbicida sono state individuate come inibitori dell'attività dell'ACHe cerebrale e dell'adenosina trifosfatasi (ATPasi) nei ratti albini in condizioni di laboratorio accompagnate da perdita di peso cerebrale (Sancho et al., 2003). L'ATPasi è un gruppo di enzimi che svolgono un ruolo importante nelle funzioni intracellulari e sono considerati un indicatore sensibile di tossicità (Yadwad et al., 1990). Inoltre, sembra che questo eserciti anche attività embrio-tossica, minando la vitalità degli embrioni. Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base dell'embriotossicità mediata dal tiobencarb devono ancora essere chiariti ed esistono ancora pochi studi e dati sull'argomento (An et al., 2022). Poiché tale sostanza, essendo potenzialmente presente nell'ambiente tramite utilizzo diretto o per contaminazione dell'acqua, può facilmente residuare nei prodotti dell'agricoltura e per gli stessi meccanismi già menzionati per i pesticidi descritti precedentemente, è ragionevole supporre che possa essere trasferita dalle api all'interno dei prodotti dell'alveare. Infatti, il Regolamento (CE) n. 396/2005 sancisce il limite massimo residuale di tale sostanza a 50 ng

g<sup>-1</sup> nel miele e altri prodotti dell'apicoltura. Nonostante ciò, i dati ad oggi disponibili sulla contaminazione di tiobencarb su tali prodotti sono molto scarsi.

#### *1.3.5.6 Triazofos*

Il triazofos è un pesticida organofosforico da contatto ad ampio spettro, inibitore dell'acetil colinesterasi, ampiamente utilizzato per la sua funzione insetticida, nematocida e acaricida, per proteggere varie colture come cotone, riso, grano, tè, frutta, olio semi e verdure (Yang et al., 2019). Tuttavia, a causa di alcune sue peculiarità, come grande stabilità chimica e fotochimica, desta molte preoccupazioni per la salute umana e degli ecosistemi. L'OMS infatti, l'ha classificato come composto tossico appartenente alla classe 1b (Organizzazione Mondiale della Sanità, 2010). Penetrando all'interno della catena alimentare, il triazofos rappresenta un rischio per la salute umana; negli animali in cui questa sostanza è stata somministrata a dosi acute hanno mostrato una sequenza di segni di tossicità, vale a dire. sintomi colinergici acuti dovuti all'inibizione dell'attività dell'AChE, neurotossicità e danni durante la trascrizione del mRNA (Yang et al., 2019). Il fibroadenoma della ghiandola mammaria era prevalente in tutti i tumori (63,2%) nei ratti alimentati con triazofos; tra i tumori, quelli dell'apparato riproduttivo femminile rappresentavano l'82,1%, gli altri erano tumori del sistema endocrino e genetico (22,9%). L'incidenza del tumore è aumentata nei ratti esposti ad alte concentrazioni di triazofos per un lungo periodo (Ma et al., 2007). Mentre negli organismi acquatici sembra causi teratogenicità negli embrioni e nelle larve dei pesci (Zhang et al., 2017). Il triazofos viene definito anche dall'ECHA (Autorità Europea per le Sostanze Chimiche) sostanza tossica se ingerita e inalata, molto tossica per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata e nociva a contatto con la pelle. Proprio a causa di tali effetti, L'UE nel 2002 aveva revocato l'autorizzazione al suo utilizzo (Regolamento 2076/2002). Tuttavia, nel 2014, EFSA ha dichiarato che le assunzioni massime giornaliere teoriche di triazofos (TMDI) stimate erano inferiori all'ADI (tra il 10 e il 19% dell'ADI) ed ha reputato improbabile che un'assunzione a lungo termine di residui di triazofos presenti un problema di salute pubblica nei paesi dell'UE, pertanto, l'autorizzazione al suo utilizzo è stata rinnovata con il Regolamento (CE) n. 1107/2009. I limiti massimi residuali di questa sostanza in alcune categorie di alimenti sono stabiliti dal

Regolamento (UE) 2017/626, nel miele e nei prodotti dell'apicoltura il LMR è fissato a 50 ng g<sup>-1</sup>. È da notare che il suo LMR è stato recentemente aumentato, poiché nel precedente Regolamento (Reg. (EU) No 441/2012) questo era fissato a 10 ng g<sup>-1</sup>. Alcuni studi, hanno riportato la presenza di triazofos nel miele (Bargańska et al., 2018 Gulati et al., 2004), in alcuni casi anche a livelli superiori al suo LMR, allora fissato a 10 ng g<sup>-1</sup>, di più del doppio (Bargańska, 2013).

## 1.4 Pesticidi polari

Nel contesto dei pesticidi, particolare enfasi è stata posta sui pesticidi polari, una vasta categoria di sostanze chimiche caratterizzate da specifiche proprietà chimico-fisiche. Alcuni tra i rappresentanti questa categoria sono stati oggetto di approfonditi studi durante il percorso di dottorato, considerando la complessità della loro determinazione analitica ed il loro impatto nell'attuale contesto della sicurezza alimentare. I pesticidi polari, classificati come quelli con un coefficiente di distribuzione n-octanol-water (log DOW) inferiore a 4.5, emergono come contaminanti di crescente preoccupazione (CEC). Questa categoria abbraccia una vasta gamma di fungicidi, erbicidi, insetticidi e altri biocidi, con la continua introduzione di nuovi composti chimici (Schäfer et al., 2019). L'Unione Europea ha progressivamente riconosciuto il rischio associato ai pesticidi polari, tanto da includerne diversi nella lista degli inquinanti prioritari (Taylor et al., 2020). Questa consapevolezza crescente riflette la necessità di un approccio globale per il monitoraggio e la gestione di tali contaminanti, al fine di garantire la sicurezza ambientale e alimentare. Una parte di questo elaborato ha riguardato lo sviluppo di un metodo, attraverso l'impiego della spettrometria di massa, per la determinazione di glifosato, glufosinato e loro metaboliti all'interno della matrice del miele e conseguente sua applicazione per il monitoraggio di campioni reali.

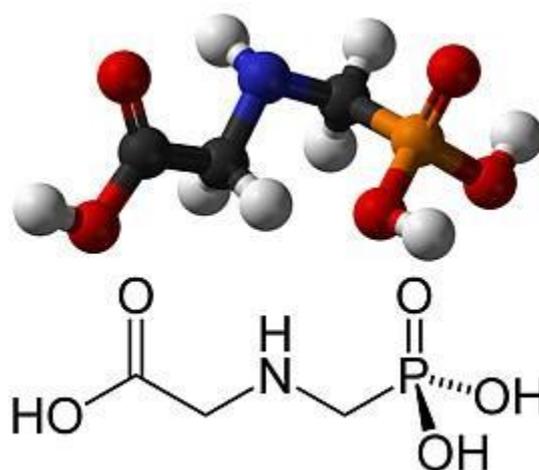
### 1.4.1 Glifosato

Tra i pesticidi polari, di grande interesse è la N-(fosfonometil)glicina, comunemente conosciuta come glifosato. Questa rappresenta il principale ingrediente attivo dei *glyphosate-based herbicides* (GBH), i pesticidi più diffusamente utilizzati a livello mondiale. Il glifosato è stato sintetizzato dal chimico Dr. Henri Martin nel 1950, ma la sua importanza come erbicida è stata pienamente compresa verso gli anni '70, quando la Monsanto ha brevettato

la miscela di glifosato RoundUp (Dill et al., 2010). La Monsanto ha mantenuto il controllo del mercato fino al 2000, anno in cui il brevetto originale è scaduto. Da allora, altre aziende hanno sfruttato l'efficacia del glifosato e attualmente sono in vendita, solo negli Stati Uniti, oltre 750 prodotti a base di questo erbicida (Henderson et al., 2010). I GBH includono il glifosato come principio attivo, spesso nella forma di sale di isopropilammonio (EFSA, 2015).

Dopo aver introdotto il glifosato sul mercato, la Monsanto ha continuato a dominare il settore sviluppando semi di piante glifosato-resistenti (RoundUp Ready). Queste colture geneticamente modificate (GM) sono state considerate economicamente ed ecologicamente sostenibili, poiché riducevano l'uso di erbicidi e aumentavano il rendimento dei raccolti (Phipps et al., 2002). Tuttavia, l'ampio utilizzo del glifosato su queste varietà di colture GM ha portato allo sviluppo di numerose specie di erbe infestanti resistenti. Attualmente, ben 55 specie di piante hanno sviluppato resistenza al glifosato e il numero continua a crescere dall'introduzione della soia RoundUp Ready nel 1996 (Heap, 2022).

**Figura 2-** Formula del glifosato (Lacroix et al., 2023)



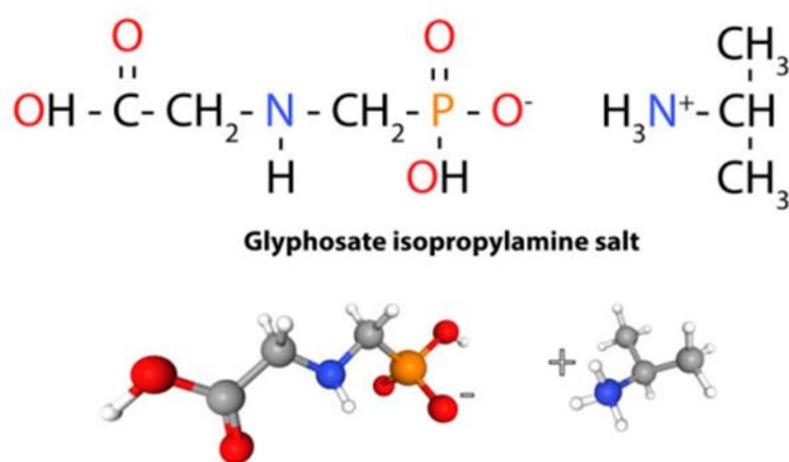
#### *1.4.1.1 Caratteristiche chimiche*

La N-(fosfonometil) glicina (nomenclatura IUPAC del glifosato), è un composto organofosforico che si forma mediante una reazione di accoppiamento ossidativo tra il gruppo metile dell'acido fosfonico metilato e il gruppo amminico alifatico della glicina. Si presenta come una polvere cristallina bianca, priva di odore, con formula chimica

C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P e massa molecolare di 169,1 g (Rojas et al., 2018). Il glifosato è un forte chelante di cationi metallici come rame, manganese, cobalto, ferro, zinco, calcio e magnesio, ed è stato inizialmente brevettato per questa caratteristica (brevetto USA n. 3.160.632, 1964).

La decomposizione ossidativa del glifosato inizia approssimativamente a 215° C e genera fumi altamente tossici contenenti ossido di azoto e ossido di fosforo. È solubile in acqua a una concentrazione di 10,2 g/l alla temperatura di 20 °C e pH 1,9, mentre è insolubile in solventi organici come lo xilene, l'acetone e l'etanolo (Mensah et al., 2015).

**Figura 3-** Sale di isopropilamina, comunemente utilizzato nei GBH (Lacroix et al., 2023)



La N-(fosfonometil) glicina è meno solubile nella sua forma acida; pertanto, i GBH sono solitamente preparati utilizzando sali di isopropilammina, ammonio, sodio, potassio e trimetilsulfonio. Queste miscele contengono inoltre tensioattivi polari come la poliossietilene amide (POEA), l'acido solforico e l'acido fosforico, che aumentano l'efficacia erbicida del glifosato in quanto lo rendono più solubile in acqua e facilitano i processi di penetrazione e assorbimento nelle piante (Rampazzo et al., 2023); sono inoltre aggiunti metalli pesanti come As e Co (Defarge et al., 2018).

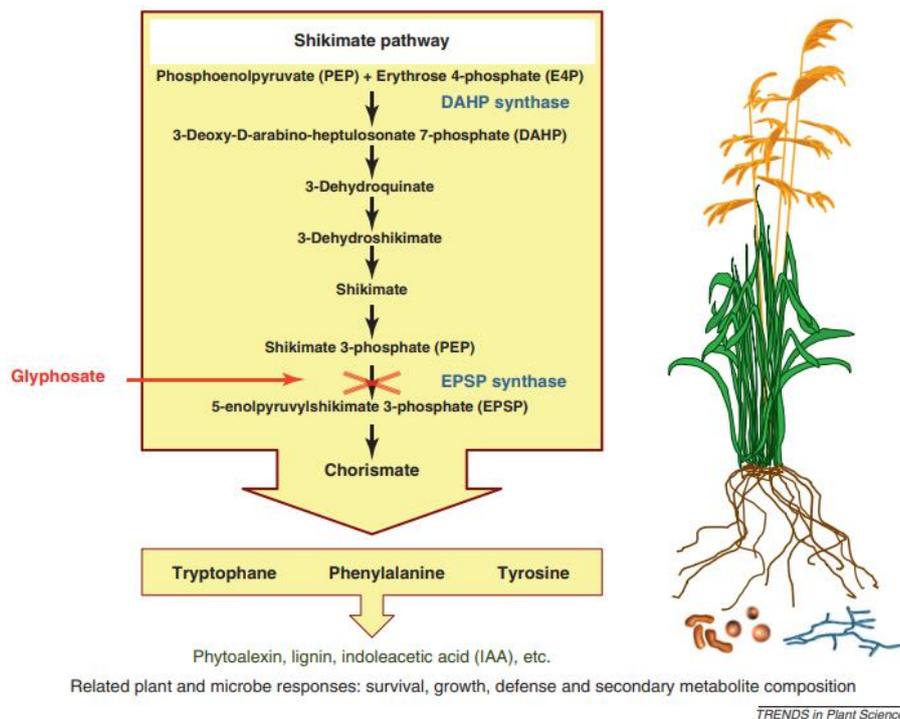
#### *1.4.1.2 Modalità d'azione del glifosato sulle piante*

Il glifosato agisce sulle piante indesiderate inibendo l'enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasi (EPSPS), coinvolto nella via dell'acido shikimico o via dello shikimato, un

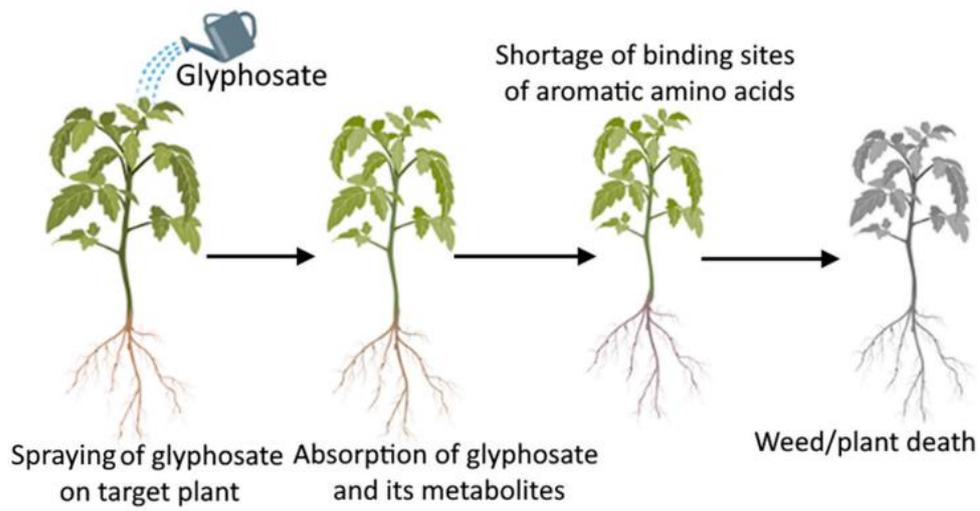
processo metabolico costituito da sette fasi presente nelle piante e nei microrganismi come batteri, funghi, alghe e alcuni protozoi. La via dello shikimato sintetizza composti aromatici essenziali per la crescita e il nutrimento delle piante, tra cui gli aminoacidi triptofano, tirosina e fenilalanina (Rawat et al., 2023).

L'assorbimento del glifosato sulle foglie delle piante è influenzato dalla specie vegetale e si ritiene che il composto diffonda nel floema attraverso la cuticola. Il glifosato viene assorbito più facilmente dalle piante che accumulano zuccheri, mentre il suo assorbimento può essere limitato in altre specie (Geiger et al., 1999). Una volta assorbito dal fogliame e dagli steli si distribuisce in tutta la pianta, con una concentrazione predominante a livello dei tessuti meristemati. Questo processo porta a un visibile deterioramento delle piante trattate, caratterizzato dalla perdita del colore verde delle foglie e dal loro raggrinzimento, che culmina infine nella morte.

**Figura 4-** Via dell'acido shikimico; il glifosato inibisce l'enzima 5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato sintetasi, riduce la produzione di aminoacidi e inibisce la crescita delle piante (Helander et al., 2012)



**Figura 5-** Assunzione e traslocazione del glifosato, che si concentra nei tessuti meristemati (Rawat et al., 2023)



**Figura 6-** Azione selettiva del glifosato in un campo di piante GM

Autore: JJ Gouin | Ringraziamenti: JJ Gouin - stock.adobe.com

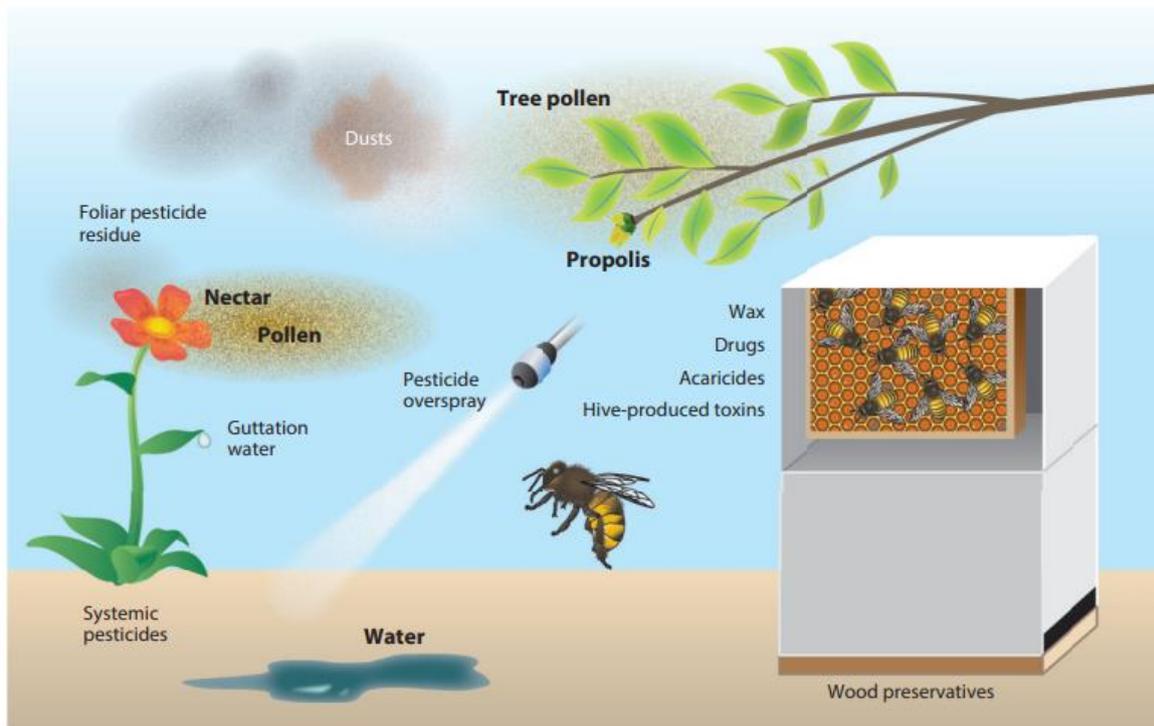
Copyright: © 2019



#### *1.4.1.3 Tossicità nelle api*

Le api mellifere sono insetti altamente sociali, e ognuno di loro svolge compiti specifici per garantire la sopravvivenza e la riproduzione delle colonie. Lavori meno recenti suggerivano che l'esposizione al glifosato non avesse effetti significativi sulle api mellifere a breve termine (Giesy et al., 2000). Lavori più recenti dimostrano che l'accumulo dell'erbicida nel favo potrebbe compromettere la capacità delle api di svolgere attività sociali essenziali, minacciando così la sopravvivenza dell'intera colonia. Il glifosato, infatti, può avere effetti negativi sul volo, l'appetito, la capacità di apprendimento associativo e i ritmi circadiani delle api (Balbuena et al., 2015; Almasri et al., 2020; Delkash-Roudsari et al., 2020). I risultati degli studi vanno comunque considerati con cautela, dato che i GBH contengono differenti adiuvanti i cui effetti, sommati a quelli della molecola di base, possono influenzare la riproducibilità dei modelli sperimentali (Mesnage et al., 2013).

**Figura 7-** Differenti modalità di contatto delle api con i pesticidi. In grassetto le sostanze contaminate. (Reed M. Johnson, 2014)



#### 1.4.1.3.1 Alterazioni dello sviluppo delle api

Durante il processo di sviluppo delle api, le larve attraversano quattro mute, ciascuna delle quali dura approssimativamente ventiquattr'ore, prima di trasformarsi in pupe all'interno di cellette sigillate fino alla schiusa (Bertholf, 1925; Michelette et al., 1993). Durante questo periodo le larve vengono periodicamente alimentate dalle api nutrici, che così trasmettono loro i contaminanti ambientali (Vázquez et al., 2018, Herbert et al., 2014). Odermer et al. (2020) hanno dimostrato che l'esposizione prolungata a concentrazioni elevate di glifosato ( $137,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pur non compromettendo la sopravvivenza delle larve, influisce sullo sviluppo delle api che presentano una riduzione del peso alla schiusa. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Vázquez et al. (2018) che impiegando concentrazioni di glifosato tra  $1,25$  e  $5,0 \text{ mg/L}$  ha registrato un ritardo nella schiusa e una diminuzione di peso delle larve proporzionale all'aumento della concentrazione. Uno studio meno recente ha dimostrato che il glifosato non ha effetti significativi sulla sopravvivenza delle larve, sullo sviluppo o sul peso medio delle pupe (Thompson et al., 2014.) Questi risultati potrebbero essere attribuiti all'impiego in questo esperimento del sale di isopropilammina, che utilizzato da solo non sarebbe un fattore significativo nel provocare alterazioni dello sviluppo larvale (Tan et al., 2022). Le ricerche suggeriscono che, sebbene il glifosato influisca sul peso alla

nascita delle larve e sul loro sviluppo, non sembra avere un impatto significativo sulla sopravvivenza complessiva della colonia (Odemer et al., 2020). Gli insetti eusociali come le api sono generalmente in grado di mettere in atto un meccanismo di compensazione definito “social buffering”, che preserva la colonia nel suo complesso quando un fattore di stress agisce sui singoli individui (Odemer et al., 2020).

#### *1.4.1.3.2 Alterazioni del comportamento alimentare delle api*

Diverse ricerche hanno fornito risultati contrastanti sull'effetto del glifosato sul comportamento alimentare delle api. Alcuni studi hanno indicato che il glifosato può stimolare le api a consumare più cibo (Almasri et al., 2020), mentre altri hanno evidenziato che l'erbicida può indurre un comportamento anoressico (Goñalons et al., 2018). Altri studi invece hanno riportato che il glifosato non sembra avere effetti significativi sul comportamento alimentare (Blot et al., 2019; Herbert et al., 2014; Thompson et al., 2014). Le discordanze potrebbero essere legate alle differenti condizioni sperimentali, dato che le concentrazioni di glifosato impiegate, la presenza di adiuvanti nelle formulazioni commerciali, la durata dei trattamenti e l'espressione genica delle colonie utilizzate non erano standardizzate negli studi citati (Tan et al., 2022). Le fluttuazioni stagionali delle concentrazioni di glifosato potrebbero contribuire alla scarsa riproducibilità dei risultati: in uno studio è stata ad esempio dimostrata una significativa riduzione del consumo di cibo solo nel 2014, ma non nei due anni successivi, nonostante siano state impiegate le stesse condizioni sperimentali (Goñalons et al., 2018).

#### *1.4.1.3.3 Alterazioni del microbiota intestinale delle api*

L'intestino delle api operaie adulte ospita diverse specie batteriche rilevanti, tra cui *Lactobacillus spp. Firm-4*, *Lactobacillus spp. Firm-5* (phylum *Firmicutes*), *Bifidobacterium spp.* (phylum *Actinobacteria*), *Snodgrassella alvi* e *Gilliamella apicola* (Kwong et al., 2016). Il microbiota intestinale viene acquisito nei primi giorni dopo la schiusa (Powell et al., 2014) e svolge un ruolo essenziale in numerosi processi fisiologici quali la digestione, la detossicazione e la resistenza agli agenti patogeni. Inoltre, esso è indispensabile per fornire nutrienti e vitamine (Kwong et al., 2014).

Alcune varianti microbiche intestinali (classe Ia) sono dotate dell'enzima EPSPS, e pertanto il loro equilibrio potrebbe essere compromesso dal glifosato: *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, *Frischella perrara*, *Bifidobacterium* e *Apibacter adventoris* (phylum *Bacteroidetes*) (Kwong et al., 2016; Motta et al., 2018). Studi condotti in laboratorio hanno rilevato che il glifosato ha effetti sub-letali a lungo termine sul microbiota intestinale delle giovani api operaie, interferendo con la normale colonizzazione batterica (Motta et al., 2018, Motta et al., 2020). Sia il glifosato che i GBH somministrati per via orale o topica possono alterare la popolazione batterica, ma i GBH hanno un impatto maggiore sulle api (Motta et al., 2020). È stato dimostrato che i GBH provocano una diminuzione dei batteri *Gilliamella apicola* e *Bifidobacterium* con conseguente aumento del tasso di mortalità degli insetti (Tan et al., 2022). *Snodgrassella alvi* forma uno strato protettivo di biofilm sulla parete dell'ileo delle api (Powell et al., 2016). È stato dimostrato che l'inibizione della crescita di questo batterio rende gli insetti suscettibili a disbiosi intestinale e pertanto maggiormente sensibili agli agenti patogeni (Raymann et al., 2018; Schwarz et al., 2016). Studi condotti sulle larve di api esponendole a differenti concentrazioni di glifosato hanno evidenziato una diminuzione della biodiversità del microbiota impiegando una concentrazione pari a 20 mg/L. Al contrario, non sono state riscontrate differenze significative a concentrazioni più basse, rispettivamente di 0,8 e 4 mg/L (Dai et al., 2018).

#### 1.4.1.3.4 Espressione genica

La sensibilità al glifosato sembra essere geneticamente determinata e in particolare correlabile all'espressione di geni che codificano enzimi quali la citocromo P450 monossigenasi (P450), la glutatione transferasi (GST) e la carbossi-colinesterasi, coinvolti nei processi di detossicazione (CCE) (Claudianos et al., 2006). Ogni colonia di api possiede un'espressione genica peculiare e questo potrebbe spiegare la tolleranza variabile al glifosato riscontrata a livello di colonie diverse. Inoltre, sebbene alcune colonie possano essere maggiormente tolleranti al glifosato, i processi metabolici difensivi messi in atto contro l'erbicida possono a lungo termine portare ad una condizione di stress cronico definito carico allostatico (Vasquez et al., 2018).

Soggetti appartenenti alla stessa colonia possono presentare alterazioni dell'espressione genica in base al loro grado di sviluppo e le larve di api sono risultate maggiormente suscettibili rispetto alle adulte (Macri et al., 2021). Studi condotti somministrando cronicamente glifosato alle larve hanno evidenziato la sovra-espressione di alcuni geni (UGT1-3 ed EST) e la sotto-espressione di altri (SLC1 e Hsp70a) (Gregorc et al., 2012) ma tuttora non è stato pienamente compreso quali siano i meccanismi molecolari responsabili di tali effetti (Tan et al., 2022).

#### *1.4.1.3.5 Alterazioni dei processi metabolici*

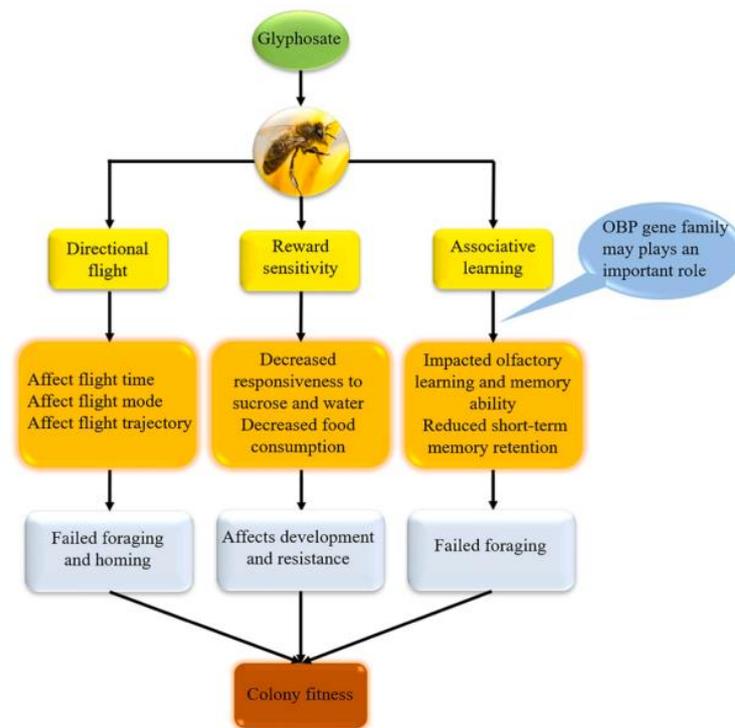
I processi di reazione allo stress ossidativo rappresentano un importante meccanismo di difesa contro gli agenti patogeni e sono legati alla produzione di numerose molecole quali l'acetil-colinesterasi, i carotenoidi e retinoidi A (Alvarez et al., 2014). Da alcuni studi risulta che il glifosato esercita un'azione inibente sull'attività dell'acetil-colinesterasi (Boily et al., 2013; Zhu et al., 2017), mentre altri hanno osservato un effetto stimolante (Almasri et al., 2020). Ricerche condotte sui carotenoidi A e retinoidi hanno evidenziato che il glifosato può influenzare il metabolismo di queste molecole (Alvarez et al., 2014) e i livelli di  $\beta$ -carotene sono risultati significativamente ridotti nelle api esposte all'erbicida (Helmer et al., 2015). Alcuni studi si sono concentrati sul metaboloma delle api (l'insieme dei metaboliti cellulari, caratteristico nelle condizioni di salute o di malattia) e hanno evidenziato che il glifosato potrebbe influenzare molte vie metaboliche come la produzione di amminoacidi e carboidrati e il metabolismo energetico (Tan et al., 2022). Ricerche condotte su due diverse specie di api, (*A. mellifera* e *A. cerana*) hanno dimostrato una maggiore quantità di metaboliti finali nelle cellule appartenenti ad *Apis cerana* e suggeriscono che questa specie sia in grado di mettere in atto processi metabolici difensivi più efficienti contro l'azione tossica esercitata dal glifosato (Zhao et al., 2020).

#### *1.4.1.3.6 Compromissione delle capacità di apprendere e ricordare*

L'apprendimento sotto forma associativa è fondamentale per le api, che hanno bisogno di riconoscere e memorizzare odori e colori per ottimizzare la ricerca di cibo. Studi di laboratorio hanno dimostrato che il glifosato compromette l'apprendimento e il senso di ricompensa nelle api mellifere, influenzando negativamente la loro capacità di memoria a breve termine. Per valutare questi effetti è stata utilizzata la risposta di estensione della

proboscide (PER), un indicatore chiave dell'apprendimento e della memoria delle api (Matsumoto et al., 2012). L'esposizione sia cronica che acuta al glifosato ad una concentrazione di 2,5 mg/L ha portato a una riduzione significativa dell'apprendimento associativo (Herbert et al., 2014). Risultati simili sono stati ottenuti da Luo et al. (2021), i quali hanno condotto il loro studio impiegando concentrazioni di glifosato oltre dieci volte superiori rispetto allo studio di Herbert et al. (2014). La somministrazione di glifosato ha determinato l'insorgenza di deformità anatomiche nelle antenne delle api, organi indispensabili per il corretto apprendimento associativo (Frasnelli et al., 2014). Altri studi come quelli condotti da Tomé et al. (2020) hanno rilevato anomalie a carico delle ciglia presenti a livello delle antenne in presenza una concentrazione di glifosato nella cera d'api di 54 ppb.

**Figura 8-** Effetti negativi del glifosato sul comportamento sociale delle api (Tan et al., 2022)



L'alterazione dei ritmi circadiani può influire sulla capacità di memorizzazione. Vazquez et al., (2020) hanno valutato lo stato di sonno considerando parametri quali il movimento delle antenne e la riduzione della tensione muscolare. Dal loro studio è emerso che la somministrazione del glifosato sotto forma di soluzione zuccherina alle dosi di 50 e 100 ng

induce le api a prolungare i periodi di riposo notturni. Il prolungamento dei periodi di riposo sarebbe correlabile all'attivazione dei processi metabolici di detossicazione.

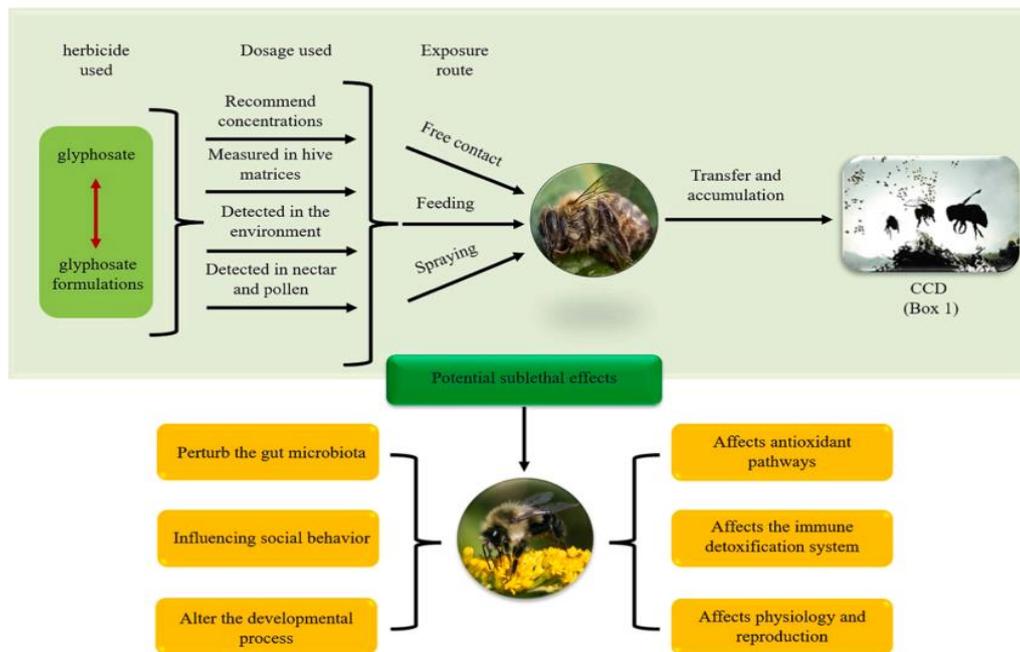
#### *1.4.1.3.7 Influenza sul volo direzionale delle api*

Durante la ricerca del cibo le api operaie devono compiere numerosi voli in direzione dell'alveare, grazie alla memorizzazione e l'integrazione di diverse informazioni riguardanti lo spazio e il percorso da seguire (Menzel R. et al., 2005; 2012). Questi voli di ritorno possono essere di due tipi: diretti (direttamente da un sito di raccolta all'alveare) o indiretti (con percorsi più complessi prima di raggiungere la colonia). È stato dimostrato che il glifosato influisce sul tempo di ritorno delle api all'alveare e sulla traiettoria di volo. In uno studio condotto da Balbuena et al. (2015) sono state impiegate concentrazioni crescenti di glifosato (rispettivamente 2,5; 5 e 10 mg/L) considerate comunemente presenti negli ambienti agricoli, ed è stato registrato un prolungamento del tempo di ritorno nelle api alimentate con le concentrazioni più elevate. Gli autori concludono che l'esposizione ai livelli di glifosato testati compromette nelle api mellifere la capacità di recuperare e integrare le informazioni spaziali indispensabili per il ritorno all'alveare.

#### *1.4.1.3.8 Disturbo da collasso delle colonie (CCD)*

Il CCD è la scomparsa improvvisa di un gran numero di api operaie sane che non fanno ritorno all'alveare. Nel corso di questo fenomeno non sono presenti cambiamenti patologici nelle larve o nelle operaie adulte. La regina di solito sopravvive e l'alveare contiene larve e alcune operaie appena mature. Il CCD ha causato gravi danni alle colonie di api selvatiche in tutto il mondo e all'industria dell'apicoltura in molti paesi, e si ritiene che abbia causato la perdita di oltre un milione di colonie di api mellifere in tutto il mondo (van Engelsdorp et al., 2011). I fattori che contribuiscono al CCD possono includere intossicazione da pesticidi, malnutrizione, acari, cambiamenti climatici e microrganismi patogeni (Tan et al., 2022). L'uso di erbicidi può avere effetti negativi sulle api non solo direttamente, influenzandone le capacità di apprendimento e orientamento, ma anche indirettamente riducendo la disponibilità di piante produttrici di nettare e polline (Johnson et al., 2015), tuttavia non è chiaro se il CCD sia causato da un singolo fattore o da una combinazione di fattori (Tan et al., 2022).

**Figura 9-** Rappresentazione schematica riassuntiva degli effetti negativi del glifosato sull'alveare (Tan et al., 2022)



#### 1.4.1.4 Tossicità nell'uomo e negli animali

Gli effetti del glifosato sulla salute e sull'ambiente sono oggetto di ampia discussione. Attualmente non è stato del tutto chiarito se il glifosato e/o i suoi metaboliti siano tossici per gli habitat e gli animali non bersaglio, compreso l'uomo (Lacroix et al., 2023); numerosi studi epidemiologici e sperimentali sono in corso per rispondere a questi interrogativi.

##### 1.4.1.4.1 Studi in vitro

Gli esperimenti condotti in vitro su colture cellulari rappresentano un comune approccio per esaminare gli effetti intracellulari del glifosato sui tessuti animali. La citotossicità e la genotossicità del glifosato sono state confermate impiegando diverse linee cellulari; tuttavia, rimane oggetto di dibattito se tali risultati siano direttamente comparabili al comportamento di un complesso organismo multicellulare (Lacroix et al., 2023). Monroy et al. (2005) hanno osservato una riduzione della vitalità cellulare in fibroblasti e cellule di fibrosarcomi umani esposti per quattro ore a concentrazioni di 4 e 5,2 mM; Kwiatkowska et al. (2016) hanno dimostrato che il sale di isopropilammina del glifosato influisce sulla vitalità delle cellule mononucleari periferiche (PBMC) esposte per ventiquattro ore a concentrazioni di 10 mM. Ulteriori ricerche confermano un effetto genotossico associato al glifosato. Gao et al. (2019) hanno studiato l'effetto del glifosato su cellule renali umane (HK-2) a concentrazioni di 0,20,

40 e 60  $\mu\text{M}$ . I risultati di questo studio hanno evidenziato che il glifosato riduce la vitalità cellulare, inducendo apoptosi e stress ossidativo dose-dipendenti (Gao et al., 2019). L'esposizione ambientale al glifosato avviene di solito attraverso i GBH che risultano più tossici rispetto al glifosato da solo. Questo può essere dovuto a tre ipotesi: 1) gli adiuvanti nei GBH sono la causa della tossicità, non il glifosato stesso; 2) gli adiuvanti nei GBH aumentano la permeabilità delle cellule, incrementando così le concentrazioni intracellulari di glifosato; 3) il glifosato e gli adiuvanti GBH hanno effetti sinergici (Lacroix et al., 2023). Uno studio condotto su cellule di tumori umani (epatocarcinoma (HepG2), adenocarcinoma alveolare (A549) e neuroblastoma (SH-SY5Y) ha rivelato che il sale di isopropilammina non ha avuto alcun effetto sulla vitalità cellulare, tranne che sulla linea neuronale a concentrazioni molto elevate (circa 18,9 mM). (Hao et al., 2019). Al contrario è stato riscontrato sulle medesime linee cellulari a parità di condizioni un effetto inibitorio legato alla presenza dei formulanti etossilati. Per tale motivo, gli autori hanno concluso che tutti i formulanti etossilati testati e i GBH hanno un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare, mentre il principio attivo (glifosato) non ha una tossicità significativa (Hao et al., 2019). Alcuni studi suggeriscono che il glifosato possa agire come interferente endocrino. Gasnier et al. (2009) hanno dimostrato che il glifosato e in misura maggiore i GBH interferiscono con la trascrizione del recettore degli androgeni. Altre ricerche indicano che il glifosato può influenzare la proliferazione cellulare e l'attivazione del recettore alfa degli estrogeni in cellule di carcinomi mammari ormono-dipendenti. Inoltre, sono stati riscontrati effetti dose-dipendenti sul ciclo cellulare e sulla crescita cellulare delle cellule tumorali (Thongprakaisang et al., 2013; Mesnage et al., 2017).

Anche nei vertebrati parte dei batteri intestinali utilizza la via dello shikimato. Ricerche in vitro sul microbiota del pollame hanno evidenziato che i batteri patogeni sono in genere resistenti al glifosato contrariamente ai batteri commensali che risultano sensibili (Shehata et al. (2013). Il pollame può essere esposto al glifosato sia direttamente attraverso la vicinanza alle aree agricole, sia indirettamente attraverso la presenza in tracce nei mangimi o nell'acqua potabile. Entrambe queste vie di esposizione possono potenzialmente causare alterazione del microbiota degli animali (Lacroix et al., 2023).

#### *1.4.1.4.2 Studi in vivo*

La maggior parte degli studi condotti in vivo utilizza i roditori per testare gli effetti del glifosato sui mammiferi. L'esposizione cronica al glifosato altera la produzione di enzimi coinvolti nella detossicazione, come quelli citocromo P450-dipendenti. Uno studio condotto da Larsen et al. (2014) nei topi ha evidenziato un incremento dell'enzima glutatione perossidasi dopo la somministrazione cronica di glifosato a concentrazioni di 0,41 e 41,40  $\mu\text{M}$  nell'acqua potabile per un periodo di 90 giorni. In topi esposti a concentrazioni di glifosato di 400  $\text{mg kg}^{-1}$  giorno è stato evidenziato un incremento di morte cellulare indotta (apoptosi) nelle cellule del tubulo prossimale renale, dovuta ad una sovra-regolazione del recettore N-metil-d-aspartato 1 (NMDAR1) (Gao et al., 2019).

Numerosi studi sono stati condotti sui ratti sottoposti ad un'esposizione cronica al glifosato. Gli organi maggiormente colpiti sono i reni, nei quali è stata riscontrata una compromissione funzionale (Mesnage et al., 2015) e il fegato, con alterazioni istologiche comparabili a quelle di una steatosi epatica non alcolica (Mesnage et al., 2016). La fertilità dei ratti maschi è risultata compromessa sia impiegando un basso dosaggio (5  $\text{mg kg}^{-1}$ ) per periodi prolungati (Abarikwu et al., 2015) che una sola somministrazione a dosaggio elevato (500  $\text{mg kg}^{-1}$ ) (Dai et al., 2016). Sono state inoltre documentate alterazioni della morfologia degli spermatozoi e diminuzione del numero degli spermatidi (Nardi et al., 2017).

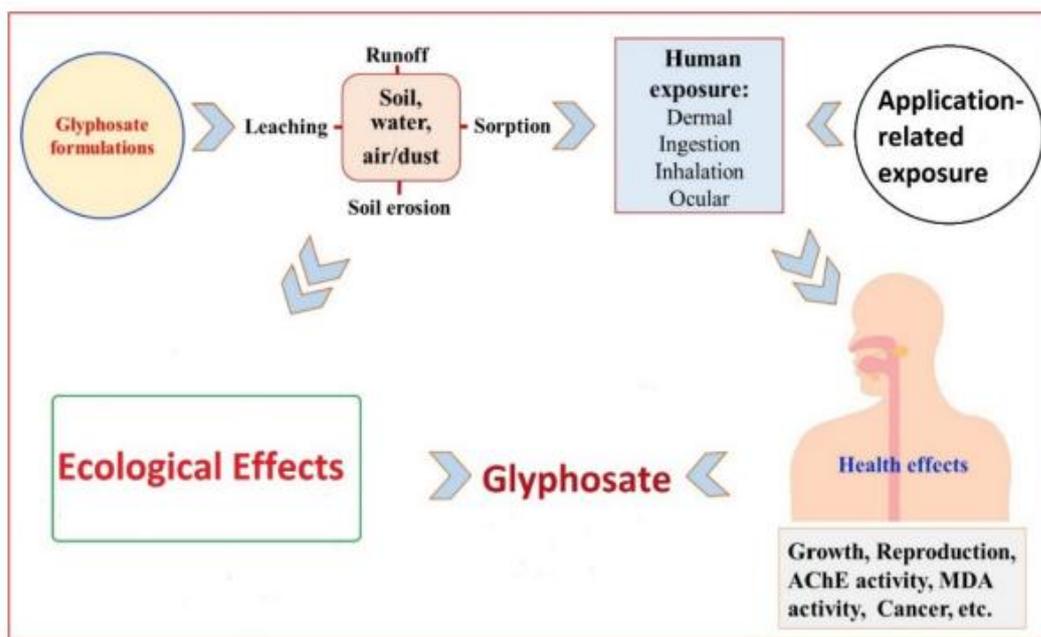
Il glifosato può bio-accumularsi nei mammiferi, come documentato da Panzacchi et al. (2018). È stato evidenziato che la somministrazione regolare di glifosato alla concentrazione di 1,75  $\text{mg kg}^{-1}$  provoca bio-accumulo nei ratti in fase di gestazione. Inoltre, il glifosato nelle urine è stato misurato in concentrazioni 100 volte superiori rispetto al suo metabolita acido aminometilfosfinicopropionico (AMPA), suggerendo che il glifosato non metabolizzato potrebbe essere un marker più indicativo di bioaccumulo rispetto ai suoi metaboliti (Panzacchi et al., 2018).

#### *1.4.1.4.3 Studi epidemiologici*

Le fonti di esposizione umana al glifosato sono molteplici e includono il consumo di acqua potabile e cibo, l'impiego nel settore agricolo e il domicilio vicino ad aree sottoposte a trattamento. La generalizzazione degli studi epidemiologici risulta complessa a causa del numero ridotto di campioni presi in esame e delle difficoltà nel quantificare l'esposizione

dei singoli soggetti agli erbicidi. Studi longitudinali hanno tenuto conto delle concentrazioni di glifosato nel tempo (Lacroix et al., 2023). Uno studio condotto in California ha evidenziato un aumento significativo dei livelli medi di glifosato nelle urine umane, passando da un valore iniziale di 118,29 pM a 1,83 nM dopo circa venti anni (Mills et al., 2017). Similmente, in Germania, si è registrato un aumento diffuso dell'esposizione al glifosato nell'arco di circa dodici anni (Conrad et al., 2017).

**Figura 10-** Esposizione dell'uomo al glifosato (Ojelade, B.S. et al., 2022)

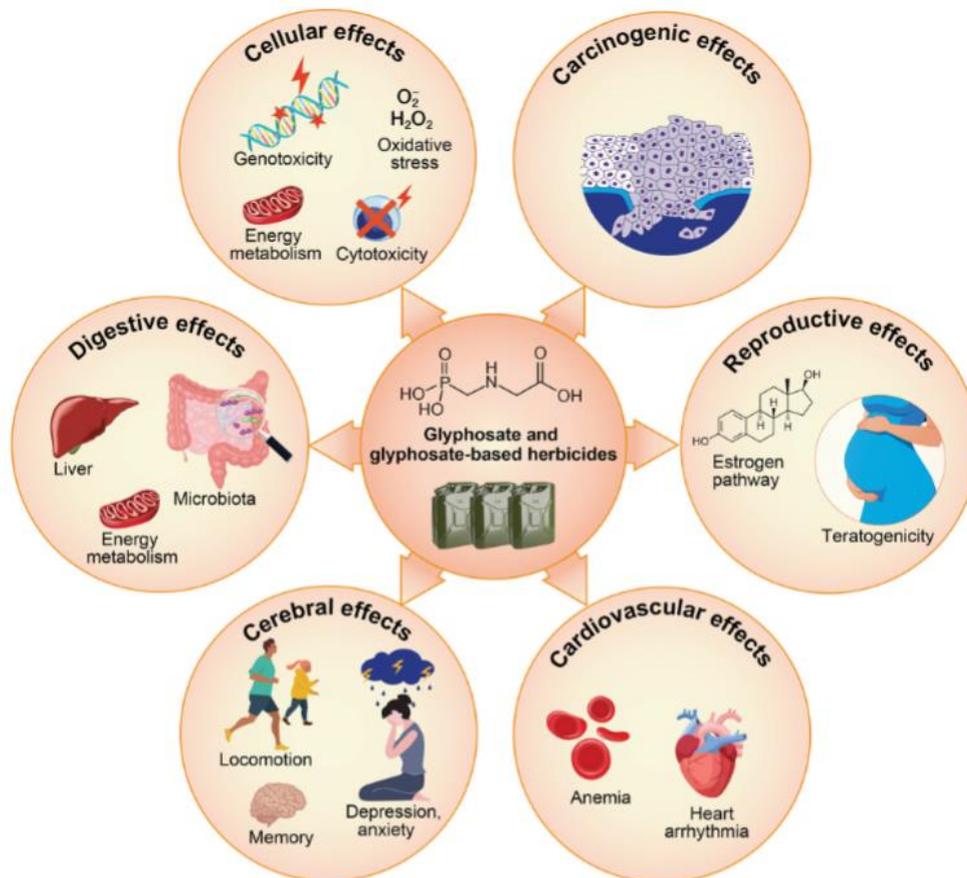


Alcuni studi epidemiologici hanno suggerito una possibile correlazione dell'esposizione al glifosato con il morbo di Parkinson e l'insorgenza di malformazioni congenite nei bambini (Garry et al., 2002; Kamel et al., 2007). Tuttavia, studi di coorte, caso-controllo e trasversali non hanno evidenziato una correlazione significativa tra l'uso di questo erbicida e patologie respiratorie non tumorali, diabete, infarto miocardico, artrite reumatoide, malattie della tiroide e morbo di Parkinson (Mink et al., 2012).

Gli effetti cancerogeni del glifosato sono controversi (Lacroix et al., 2023). L'Agricultural Health Study (AHS) ha valutato l'incidenza di tumori in un ampio campione numerico di lavoratori del settore agricolo esposti al glifosato, concludendo che non esiste un'associazione significativa tra l'uso di glifosato e i tumori, riscontrati nello studio in una

percentuale relativamente bassa di individui (circa il 13%) (Andreotti et al., 2018). È stato infine segnalato un aumento transitorio di linfociti binucleati nella popolazione colombiana residente in aree dove è documentato l'uso del glifosato (Bolognesi et al., 2009) ed effetti genotossici transitori sulla popolazione ecuadoriana (Paz-y-Miño et al., 2007; Paz-y-Miño et al., 2011).

**Figura 11-** Tossicità del glifosato nell'uomo (Peillex et al., 2020)

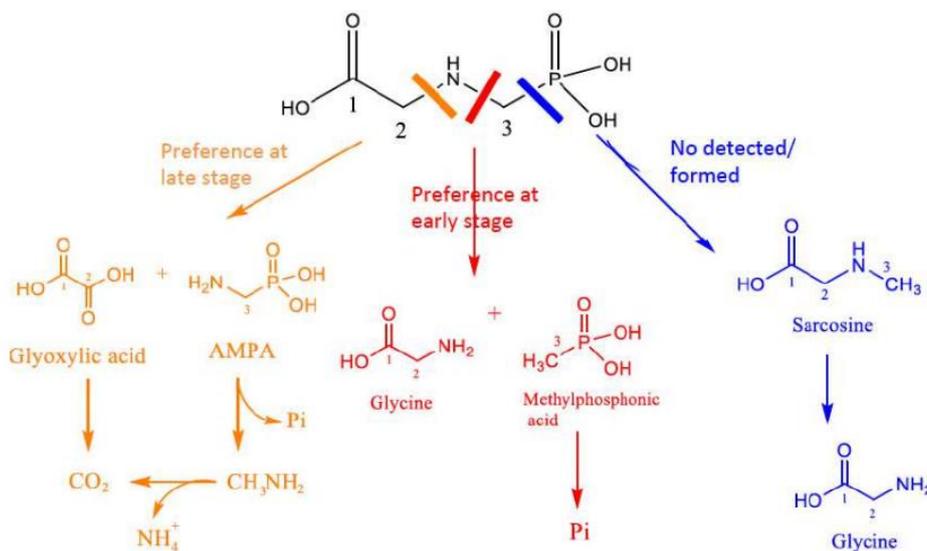


#### 1.4.1.5 Destino nell'ambiente

Una considerevole quantità di glifosato non viene assorbita dalle piante e si disperde nell'ambiente dove viene degradato attraverso reazioni abiotiche e biotiche quali la fotolisi, la termolisi e la biodegradazione. Il processo di bio-degradazione può seguire due vie principali (Grandcoin et al., 2017). La prima prevede la rottura del legame carbonio-azoto grazie all'azione dell'enzima glifosato ossidoreduttasi, con formazione dell'AMPA, il principale metabolita del glifosato, e acido gliossilico (trasformati ulteriormente nei prodotti

finali fosfato, ammonio, anidride carbonica ed acqua). La seconda coinvolge la frammentazione del legame carbonio-fosforo (C-P) grazie all'enzima C-P liasi, con formazione di glicina e sarcosina (Okada et al., 2016). La degradazione microbica del glifosato è la via principale che ne influenza il destino e il comportamento nel suolo, mentre la fotodegradazione e la degradazione chimica sono processi meno rilevanti (Mallat et al., 1998).

**Figura 12-** Percorsi di degradazione del glifosato (Sun et al., 2019)

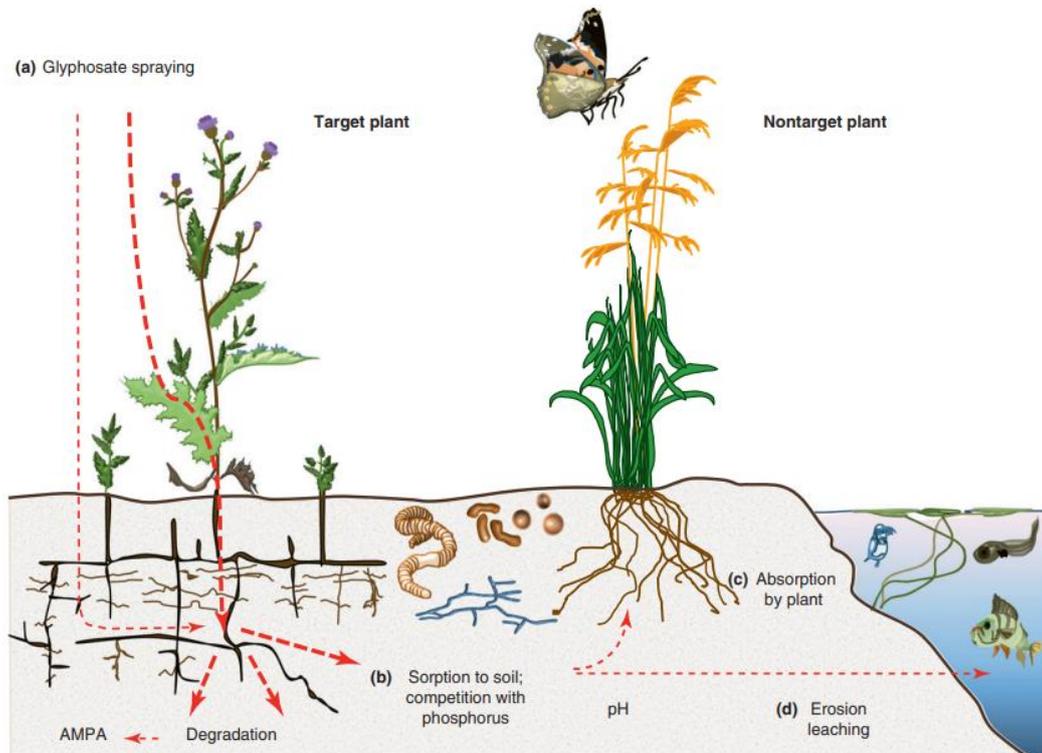


#### 1.4.1.5.1 Destino nel suolo

Il destino e il comportamento del glifosato dipendono da complesse interazioni tra l'erbicida e il suolo, che avvengono in specifiche condizioni ambientali locali. Queste condizioni possono includere fattori come le precipitazioni, la temperatura, la velocità del vento (Gimsing et al., 2004) e il dosaggio impiegato (Rampazzo et al., 2013). Il tempo di degradazione del glifosato (DT50) nel suolo è molto variabile e sono stati registrati valori compresi fra 1 e 130 giorni. L'AMPA è più persistente del glifosato con valori tra 76 e 240 giorni (European Commission Review Report for the Active Substance Glyphosate, 2002). Altri metaboliti noti del glifosato, come N-acetil-glifosato (N-acetil-N-(fosfonometil)glicina,

N-acetil-AMPA (acido acetamidometilfosfonico) e l'HMPA acido (idrossimetil)fosfonico non sono stati ancora sufficientemente studiati (Rampazzo et al., 2023).

**Figura 13-** Accumulo e trasporto del glifosato nel terreno (Helander et al., 2012)



Il glifosato e i GBH possono contaminare i terreni circostanti il loro sito di applicazione. Uno studio U.S.A., condotto in trentotto Stati su campioni di suolo e sedimento, ha evidenziato che il glifosato non viene completamente degradato nei terreni agricoli irrorati e che i processi di adsorbimento sono legati alle proprietà chimico-fisiche del suolo, tra cui il contenuto di materia organica e l'acidità. Il glifosato viene fortemente adsorbito in terreni ricchi di argilla e materia organica dove risulta relativamente stabile e inaccessibile ai processi di biodegradazione. Questo fenomeno è dovuto al fatto che il glifosato può legarsi a cationi polivalenti a loro volta adsorbiti su materia organica e argille (Ortiz et al., 2017). Nei suoli ad alta percentuale di argilla, il glifosato può accumularsi nel corso del tempo e perdurare per oltre un anno, mentre nei terreni sabbiosi tende a essere facilmente dilavato (Okada et al., 2017). La presenza di minerali nel suolo, soprattutto ossidi/idrossidi e silicati di ferro e alluminio, favorisce il processo di adsorbimento dell'erbicida. Al contrario, il fosforo inorganico incrementa la mobilità del glifosato in quanto entra in competizione con

quest'ultimo per i siti di adsorbimento (Padilla et al., 2019). Nei suoli che presentano un pH compreso tra 4 e 8, il glifosato si adsorbe più difficilmente e mostra una forte affinità per anioni mono-bivalenti e per cationi trivalenti come  $Al^{3+}$  e  $Fe^{3+}$  (Barja et al., 2005). Valori bassi di pH favoriscono l'adsorbimento dell'erbicida (Shushkova et al., 2009; Laitinen et al., 2009).

#### *1.4.1.5.2 Residui di glifosato nelle acque e nell'aria*

Si riteneva inizialmente che il glifosato avesse una scarsa mobilità nel suolo e pertanto comportasse rischi limitati per gli ecosistemi acquatici (Sihtmäe et al., 2013; Monsanto, 2014), tuttavia l'erbicida e i suoi metaboliti sono presenti nelle acque in concentrazioni dosabili. Glifosato e AMPA sono stati rilevati nei fossati e negli scarichi, nelle precipitazioni, nei fiumi e nei torrenti; meno frequentemente in laghi, stagni, zone umide ed acque sotterranee. Tracce di glifosato sono state rilevate nella pioggia durante la stagione di crescita delle colture, così come nell'acqua durante il disgelo primaverile (Battaglin et al., 2009; Battaglin et al., 2014). Si stima che fino allo 0,7% del glifosato applicato sui terreni agricoli si disperda nell'aria e che mediamente il 97% di questa quota venga eliminato da precipitazioni settimanali superiori a 30 mm/m<sup>2</sup>. (Chang et al., 2011).

Nelle regioni degli Stati Uniti in cui vengono coltivate piante GM resistenti al glifosato, l'erbicida e l'AMPA sono diffusamente presenti nelle acque superficiali e sotterranee (Battaglin et al., 2014). Le concentrazioni di glifosato misurate nell'acqua di fiumi e ruscelli variano da 2 a 430 µg/L (Battaglin et al., 2005, 2009; Coupe et al., 2011; Mahler et al., 2017). Residui di glifosato sono stati riscontrati in zone agricole dell'Iowa e del Mississippi, a concentrazioni variabili rispettivamente da < 0,01 a 9,1 ng/m<sup>3</sup> nell'aria e da < 0,1 a 2,5 µg/L nell'acqua (Chang et al., 2011).

La pioggia e l'erosione delle particelle del suolo sono responsabili del trasporto di glifosato e AMPA nelle acque superficiali, dove possono rimanere disciolti o associati a particelle solide (Maqueda et al., 2017). Quando particelle di suolo contaminato si depositano a livello del sedimento, la degradazione del glifosato risulta molto più lenta (Wang et al., 2016).

In Europa il glifosato è stato rilevato in varie tipologie di acque, ma in quantità inferiori rispetto agli Stati Uniti. Concentrazioni molto basse di glifosato (da < 0,1 a 2,5 µg/L) sono state registrate in campioni di acque superficiali in Germania (Skark et al., 1998), Svizzera

(Poiger et al., 2017), Ungheria (Mörthl et al., 2013) e nel nord-est della Spagna (Sanchís et al., 2012). Questa differenza potrebbe essere messa in relazione con il divieto di coltivazione di piante GM vigente in UE (Van Bruggen et al., 2018). Occasionalmente sono stati riscontrati livelli più elevati (fino a 165 µg/l) in Francia (Villeneuve et al., 2011) e Danimarca (Rosenbom et al., 2010).

Oltre al dilavamento dei terreni agricoli, anche il deflusso urbano rappresenta una fonte di glifosato nei torrenti e nei fiumi (Grandcoin et al., 2017; Hanke et al., 2010). Poiché il deflusso delle acque piovane è favorito dalle superfici pavimentate impermeabili e interconnesse, in diversi paesi del Nord Europa è stato vietato l'uso di glifosato su tali superfici (Kristoffersen et al., 2008; Rosenbom et al., 2010). Tuttavia, il glifosato e l'AMPA sono stati ugualmente rilevati in campioni di acque reflue e acque piovane (Birch et al., 2011), così come negli scarichi degli impianti di trattamento delle acque reflue (Grandcoin et al., 2017) e persino nell'acqua in bottiglia (Rendón-von Osten et al., 2017).

Il glifosato si riversa attraverso i fiumi e le piogge nell'acqua di mare, dove la sua persistenza, più elevata che nelle acque dolci, varia in funzione della temperatura e della luce. In particolare, in condizioni di oscurità e alla temperatura di 31 gradi è stato registrato un valore di DT50 di 315 giorni (Mercurio et al., 2014).

La contaminazione delle acque può influenzare la qualità del cibo, dei mangimi e degli ecosistemi e avere un impatto negativo sulla salute degli organismi, compresi gli esseri umani (Gasnier et al., 2009).

#### *1.4.1.6 Legislazione e valutazioni delle agenzie regolatorie (questione EFSA IARC)*

Il dibattito sulla cancerogenicità del glifosato ha portato a posizioni contrastanti da parte di diverse agenzie regolatorie. Nel 2015, l'IARC ha classificato il glifosato come possibilmente cancerogeno (Gruppo 2A) mentre l'Agenzia per la protezione ambientale degli Stati Uniti (EPA) e l'EFSA hanno concluso che un rischio di cancro per l'uomo è improbabile (Benbrook et al., 2019). EPA e IARC hanno utilizzato come riferimento per le loro valutazioni studi scientifici sugli effetti genotossici provocati dal sale di isopropilammina e dai GBH: mutazioni batteriche *in vitro*, aberrazioni cromosomiche (*in vivo/in vitro*), induzione di micronuclei *in vivo* nei mammiferi, danno al DNA e mutazioni genetiche nei mammiferi (*in*

*vivo/in vitro*). Del totale dei lavori condotti utilizzando il sale di isopropilammmina solo il 2% degli studi commissionati dai produttori di glifosato ha dimostrato la presenza di effetti avversi, contro il 67% degli studi sottoposti a revisione tra pari (Benbrook, 2019). Riguardo agli studi sui GBH, nessuno studio commissionato dai produttori ha riportato effetti avversi, contro il 75% degli studi sottoposti a revisione. Secondo Benbrook (2019) le posizioni differenti di EPA ed IARC sono dovute al fatto che l'EPA ha preso in considerazione in prevalenza i risultati degli studi commissionati dai produttori (in parte non sottoposti a revisione né pubblicati), mentre al contrario l'IARC ha attribuito maggiore peso ai lavori sottoposti a revisione fra pari. L'EPA ha valutato la genotossicità dell'erbicida prevalentemente da studi che utilizzano il sale di glifosato, mentre l'IARC ha privilegiato quelli che utilizzano i GBH. Infine, la valutazione dell'EPA si è concentrata su studi che simulano l'esposizione alimentare a prodotti contenenti il glifosato nei limiti di legge, e non ha preso in considerazione i rischi professionali da esposizione a concentrazioni elevate dell'erbicida. La valutazione dell'IARC al contrario comprendeva dati da esperimenti che simulavano i tipici scenari professionali di esposizione elevata.

Le differenti indicazioni delle Agenzie regolatorie hanno suscitato molte discussioni, e hanno indotto l'UE a prorogare, nel 2017, l'autorizzazione all'impiego del glifosato per soli cinque anni, con restrizioni all'impiego dell'erbicida. La decisione non è stata unanime, registrando pareri contrari da parte di alcuni Stati membri.

Per proteggere la salute dei consumatori, l'Unione Europea ha fissato gli LMR per i pesticidi nel miele e in altri prodotti dell'alveare. Il valore degli LMR per il glifosato nel miele è fissato a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  secondo il Regolamento (UE) 2013/293 della Commissione Europea. Tuttavia, il Regolamento (UE) 2018/62 chiarisce che gli LMR per il miele non si applicano ad altri prodotti dell'apicoltura a causa delle loro diverse caratteristiche chimiche.

Data la necessità di approfondire le ricerche sugli effetti avversi del glifosato e dei GBH l'Unione Europea nel dicembre 2022 ha prorogato il consenso all'impiego di questi prodotti per un anno, allo scopo di consentire una nuova revisione tra pari e acquisire ulteriori informazioni utili per il dibattito e il voto.

#### *1.4.1.6.1 Revisione tra pari EFSA luglio 2023*

Di recente è stata pubblicata la revisione approfondita dell'EFSA (EFSA 2023a) che copre numerosi aspetti, incluse analisi dei dati tossicologici relativi ai mammiferi e valutazioni dei metaboliti del glifosato. Sono stati inoltre valutati il comportamento ambientale, gli effetti sull'ecosistema e il potenziale di interferenza endocrina.

L'EFSA ha concluso che il glifosato presenta una bassa tossicità acuta per via orale, cutanea e per inalazione. Effetti avversi sono stati riscontrati solo a dosi superiori a 2 mg kg<sup>-1</sup> di peso corporeo somministrate oralmente. Gli effetti sugli organi variano in funzione della specie presa in esame. Nei ratti sono stati riscontrati a lungo termine anomalie dello sviluppo della vescica, riduzione del peso corporeo ed alterazioni a carico di fegato e polmoni. Effetti teratogeni sono stati registrati in studi condotti su animali impiegando dosaggi elevati ma non sono state riscontrate evidenze di neurotossicità o immunotossicità.

Gli studi epidemiologici sugli esseri umani non hanno stabilito un'evidente associazione tra esposizione al glifosato e l'insorgenza di patologie come il morbo di Parkinson o disturbi dello spettro autistico. Non è stata inoltre riscontrata una chiara correlazione con l'insorgenza di tumori.

Si ritiene improbabile che metaboliti del glifosato come AMPA, N-metil AMPA e N-acetil AMPA abbiano effetti genotossici. Sono state tuttavia identificate lacune nei dati relativi a metaboliti minori come N-gliceril AMPA e N-malonil AMPA ed è stata evidenziata la mancanza di un'analisi completa del potenziale aneugenico (capacità di indurre anomalie del numero di cromosomi) dell'N-acetil glifosato.

Studi sulle colture a rotazione (in particolare carota, lattuga e frumento) hanno evidenziato una lacuna di dati che non hanno permesso di calcolare il rischio del loro impiego nell'alimentazione umana; ricerche condotte su altre colture sia convenzionali che GM, come anche sugli alimenti per animali, hanno tuttavia permesso di escludere una criticità immediata per i consumatori.

L'EFSA ha anche esaminato il destino e il comportamento ambientale dell'erbicida, sottolineando che il glifosato può persistere nell'ambiente e che la sua degradazione è influenzata dal pH del terreno. La contaminazione delle acque sotterranee è stata

considerata bassa; il trattamento delle acque potabili secondo le normative vigenti rimuoverebbe comunque il glifosato e i suoi prodotti di degradazione.

Gli effetti del glifosato sulla biodiversità dipendono da vari fattori, inclusi il tipo di impiego e le condizioni ambientali locali. Sono state evidenziate possibili implicazioni sull'ecosistema dovute alla rimozione delle erbe infestanti.

È stato riconosciuto che il glifosato potrebbe compromettere alcune componenti del microbiota intestinale delle api e provocare alterazioni della crescita di colonie batteriche commensali; tuttavia, l'impatto di questi effetti a livello delle colonie non è ancora chiaro. Studi condotti sul microbiota intestinale umano non hanno fornito conclusioni definitive circa eventuali conseguenze sulla salute.

La valutazione del potenziale di interferenza endocrina ha portato a conclusioni diverse in funzione delle specie prese in esame. Il glifosato non sembra influenzare negativamente la tiroide o la produzione di estrogeni, androgeni e steroidi negli esseri umani e nei mammiferi. I dati sono risultati difficilmente interpretabili negli invertebrati, a causa della mancanza di una chiara relazione dose-risposta.

Sono state inoltre condotte valutazioni sulla sicurezza nell'impiego della formulazione GBH "MON 52276", utilizzata come prodotto commerciale di riferimento. La stima dei valori di esposizione è risultata inferiore ai Valori Accettabili di Esposizione Occupazionale (AOEL) nei lavoratori addetti al trattamento, a condizione che siano rispettate adeguate misure di protezione. Uno studio in vitro sulla pelle umana ha rivelato tassi ridotti di assorbimento cutaneo con la formulazione "MON 52276", tuttavia è stata rilevata una lacuna nei dati sulla tossicità a dosi ripetute. Gli esperti hanno concluso che le informazioni tossicologiche disponibili siano sufficienti per esprimere parere positivo sull'impiego in sicurezza della formulazione "MON 52276".

La revisione prende atto che gli allevamenti possono essere esposti a quote aggiuntive di glifosato per mezzo di mangimi prodotti utilizzando piante GM glifosato-resistenti, importabili da paesi terzi nei quali il loro utilizzo non è vietato. Dall'analisi della letteratura emerge la necessità sia di valutare i residui di glifosato negli alimenti come somma della molecola di base e dei suoi metaboliti, sia di modificare, presumibilmente al rialzo, i valori

di LMR per le categorie alimentari considerate. In analogia con quanto proposto per gli alimenti di origine animale, un simile incremento degli LMR è suggerito anche per il miele. Il 13 ottobre 2023 gli Stati membri hanno votato, in seno alla Commissione SCOPAFF (Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed), la proposta di rinnovo dell'autorizzazione all'impiego del glifosato per i prossimi 10 anni, basata sulle indicazioni rilasciate dall'EFSA. La maggioranza qualificata per accogliere o rigettare tale proposta non è stata però raggiunta; pertanto, la decisione è stata rimandata alla Commissione d'Appello, che si è riunita per la discussione e il voto nella prima metà di novembre. La Commissione europea ha annunciato il 16 novembre 2023 che rinnoverà l'autorizzazione all'impiego del glifosato per altri dieci anni.

#### 1.4.2. Glufosinato

Il glufosinato-ammonio (D,L-fosfinotricina) è un erbicida con diverse caratteristiche uniche che hanno intrigato i ricercatori di diverse aree scientifiche per molti anni. Il glufosinato è stato scoperto come prodotto naturale, inizialmente caratterizzato come "un aminoacido naturale con inaspettate proprietà erbicide" (Takano and Dayan, 2020). Il glufosinato è stato studiato inizialmente da due gruppi di ricerca diversi, i quali investigavano sugli attinomiceti, *Streptomyces hygroscopicus* e *S. viridochromogenes*. Questi microrganismi, in condizioni di coltura di fermentazione, possono produrre un tripeptide chiamato *bialaphos*, utilizzato già come erbicida non selettivo in Asia orientale. Una volta all'interno della pianta, il tripeptide viene metabolizzato, rilasciando la L-fosfinotricina, la molecola che possiede l'effettiva azione fitotossica (Takano and Dayan, 2020). Il glufosinato ha un profilo fisico-chimico insolito rispetto alla maggior parte degli erbicidi attualmente utilizzati nel mondo ed è l'erbicida più importante che mira alla sintesi della glutammina (GS). Il suo meccanismo d'azione è stato oggetto di controversie per quasi 30 anni, dalla sua prima introduzione nel 1993 (Forlani et al., 2006), tuttavia, le condizioni ambientali possono influenzare notevolmente le prestazioni del glufosinato in campo (Takano and Dayan, 2020). Questo erbicida è stato ampiamente commercializzato negli Stati Uniti e in Canada negli anni '90 come alternativa all'erbicida più popolare, il glifosato, da usare contro le erbe infestanti divenute ormai resistenti. Il suo utilizzo nel tempo è aumentato notevolmente,

soprattutto negli Stati Uniti, a causa della diffusione delle erbe resistenti al glifosato e si prevede che continuerà a crescere nel prossimo futuro (Takano and Dayan, 2020). Inoltre, a differenza di quanto sta accadendo con il glifosato, solo poche specie di erbe infestanti ne hanno sviluppato resistenza (Takano and Dayan, 2020). Il glufosinato è stato autorizzato per l'uso in Europa fino al 2018; tuttavia, la sua registrazione non è stata rinnovata dalla Commissione Europea a causa di preoccupazioni legate alla sua tossicità (Commission Regulation (EU) 2020/1068). Nonostante ciò, continua ad essere ampiamente utilizzato negli Stati Uniti, in Sud America e in altre parti del mondo, sia su coltivazioni agricole che in aree non agricole (Takano and Dayan, 2020).

#### *1.4.2.1 Proprietà fisico-chimiche e modalità d'azione sulle piante*

Il Glufosinato (peso molecolare 181,13 g mol<sup>-1</sup>) è un acido fosfinico appartenente alla famiglia chimica degli organofosforici, diversa da qualsiasi altra classe chimica di erbicidi. È l'erbicida più idrofilo (logKow: -4,0), con differenti valori di costante di ionizzazione (pKa: 2, 2,9 e 9,8) a causa della presenza di gruppi amminici e idrossilici nella sua struttura. Non è considerato volatile (pressione di vapore: 10<sup>-4</sup> Pa) e le formulazioni disponibili sono tipicamente il sale di ammonio, che tende a dissociarsi in soluzione acquosa (Takano and Dayan, 2020).

Diversi fattori influenzano l'assorbimento e la traslocazione del glufosinato nelle piante. Ad esempio, l'assorbimento del glufosinato può essere guidato da un trasportatore attivo a basse concentrazioni, ma alle normali dosi di campo, l'assorbimento avviene principalmente attraverso la diffusione da cellula a cellula, dipendente dal gradiente di concentrazione di glufosinato tra l'interno e l'esterno delle cellule (Forlani et al., 2006). Una volta all'interno della cellula vegetale, agisce come un analogo del glutammato nei confronti dell'enzima glutammato sintetasi. Questa inibizione irreversibile della reazione di condensazione tra glutammato e ammoniaca causa l'accumulo di quest'ultima all'interno delle cellule, con conseguenze deleterie per la pianta (Forlani et al., 2006). L'accumulo di ammoniaca porta alla disgregazione dei cloroplasti, le strutture cellulari coinvolte nella fotosintesi. L'inibizione di questo processo vitale determina la morte della pianta (Forlani et al., 2006).

#### *1.4.2.2 Degradazione nell'ambiente*

La persistenza del glufosinato nell'ambiente è più breve rispetto ad altri erbicidi come glifosato, fenmedifam, etofumesato e metamitron (Takano and Dayan, 2020). La dissipazione del glufosinato nel suolo avviene principalmente attraverso reazioni di ossidazione, transaminazione e acetilazione da parte dei microrganismi del suolo (Takano and Dayan, 2020). Viene rapidamente degradato dai batteri terricoli, eliminando così il potenziale rischio di attività residuale, ciò evita, dunque, l'applicazione di particolari restrizioni alla rotazione delle colture (Takano and Dayan, 2020). La sua emivita in campo varia da 1 a 4 giorni, ma può aumentare notevolmente in presenza di suoli sterili (Laitinen et al., 2006). Inoltre, la L-fosfinotricina è preferenzialmente degradata rispetto all'isomero D, ed entrambi gli enantiomeri sono considerati stabili in acqua. L'ossidazione del glufosinato è irreversibile e porta alla liberazione di anidride carbonica. Tanto il glufosinato, quanto i suoi metaboliti, sono altamente solubili in acqua, risulta, infatti, essere suscettibile alla lisciviazione dalla superficie del suolo poche ore dopo la spruzzatura (Bartsch and Tebbe, 1989; Laitinen et al., 2006). Inoltre, non si volatilizzano né si accumulano nella catena alimentare (Takano and Dayan, 2020). Gli studi di laboratorio sulla sua velocità di degradazione nel suolo hanno riportato valori di DT50 (tempo necessario per ridurre del 50% la concentrazione) compresi tra 6 e 11 giorni (EFSA, 2005). Il suo principale metabolita è MPP [acido 3-(idrossi(metil)fosfinossi) propionico], che può subire ulteriori processi di degradazione per formare MPA (acido 2-metilfosfinicoacetico) e N-acetil-glufosinato. MPP e MPA sono moderatamente persistenti, con valori di DT50 nel suolo rispettivamente di 13–20 giorni e 17–18 giorni (EFSA, 2005)

#### *1.4.2.3 Tossicità ed effetti sulla salute umana e delle api*

Per quanto riguarda gli effetti che il glufosinato può esercitare sulla salute umana e delle api, approfonditi studi sono stati condotti sugli animali circa la sua tossicità (Takano and Dayan, 2020). Dai risultati di questi studi, emerge che l'esposizione a livelli elevati di glufosinato possono provocare una riduzione reversibile delle concentrazioni di glutammina nei tessuti dei mammiferi. Tuttavia, non sono state riscontrate prove di accumulo di glufosinato nei tessuti, in quanto si tratta di un composto altamente solubile in

acqua. La tossicità acuta del glufosinato per esposizioni orali e dermiche è risultata molto bassa nei ratti, mentre è stata leggermente più alta nei topi. Questa differenza potrebbe essere associata a divergenze nelle cinetiche e nella biodisponibilità tra le diverse specie animali. Nel complesso, non sono state rilevate differenze legate al sesso da nessuna via di somministrazione (Hoerlein 1994).

Inoltre, il glufosinato si è dimostrato non sensibilizzante per esposizioni cutanee o oculari, anche se è risultato moderatamente irritante per gli occhi, principalmente a causa di alcuni adiuvanti presenti in alcune formulazioni. Tuttavia, l'esposizione di glufosinato agli occhi ha incrementato la pressione intraoculare nei topi, suggerendo che l'erbicida potrebbe danneggiare i nervi ottici in caso di manipolazione impropria (Hoerlein 1994). Secondo L'OMS può essere dannoso per gli esseri umani quando ingerito o a contatto con la pelle. L'OMS lo classifica come un composto di categoria III, indicandolo come "moderatamente pericoloso" che può causare "inabilità temporanea o possibile lesione residua" (Donthi and Kumar, 2022). L'ingestione può causare nausea, vomito e diarrea. In alcuni casi, potrebbe anche provocare tremori, convulsioni e difficoltà respiratorie (Donthi and Kumar, 2022). Secondo il Database sulle Proprietà dei Pesticidi dell'IUPAC (PPDP), è potenzialmente tossico per i reni, la vescica, il sangue e i polmoni (IUPAC Pesticides Properties DataBase). Un aspetto rilevante è emerso da studi sull'esposizione prenatale al glufosinato nei topi, che ha evidenziato riduzione dell'attività locomotoria, compromissione della formazione della memoria e manifestazione di comportamenti simili all'autismo (Dong et al., 2020). Questi effetti sono stati associati a significative alterazioni del microbioma intestinale, suggerendo un possibile ruolo del microbiota nell'insorgenza di anomalie comportamentali (Dong et al., 2020). Per quanto riguarda gli specifici effetti tossici del glufosinato sulle api, esistono pochi studi e informazioni sull'argomento. Il PPDP riporta i seguenti valori di ecotossicità del glufosinato-ammonio per le api da miele: contatto acuto  $LD_{50} > 345 \text{ g bee}^{-1}$ ;  $LD_{50}$  acuta orale  $600 \text{ g bee}^{-1}$ . In generale, le valutazioni del rischio ecologico per la registrazione dei pesticidi dovrebbero considerare i rischi potenziali per le api e gli altri insetti impollinatori, considerata l'applicazione di alte concentrazioni alle colture che li attirano (EFSA, EPA, 2014). Tuttavia, va sottolineato che, nonostante alcune preoccupazioni relative a episodi di

avvelenamento acuto derivanti da un uso improprio del glufosinato, nel complesso l'erbicida sembra sicuro quando utilizzato correttamente come previsto dalle linee guida (Park et al., 2018). La rapidità di degradazione metabolica del glufosinato e la sua escrezione principalmente attraverso urine e feci contribuiscono al mantenimento di livelli di sicurezza elevati. Pertanto, i dati tossicologici indicano che il glufosinato, se utilizzato secondo le normative, non presenta rischi significativi per la salute umana e animale (Park et al., 2018).

#### 1.4.3 Metodiche analitiche per la determinazione di glifosato, glufosinato e loro metaboliti

Il glifosato, glufosinato e i loro metaboliti possiedono peculiarità fisico-chimiche che ne rendono problematico il dosaggio: piccole dimensioni molecolari, elevata polarità, mancanza di assorbimento dei raggi ultravioletti, elevata solubilità in acqua, bassa ionizzazione e bassa volatilità (Guo et al., 2014). L'elevata solubilità in acqua e le piccole dimensioni molecolari rendono difficile la loro estrazione selettiva, con un conseguente forte effetto matrice. L'alta concentrazione di zuccheri e altre sostanze polari nel miele può, oltre che determinare una soppressione ionica degli analiti target, causare anche una contaminazione più o meno importante degli strumenti analitici (Rampazzo et al., 2023). Per quanto riguarda le tecniche estrattive dei pesticidi polari dagli alimenti, Il "Quick Polar Pesticides Method" (QuPPE), è un metodo sviluppato e regolarmente aggiornato dai laboratori di riferimento dell'UE per i residui di pesticidi, il quale consente l'analisi di un gruppo di pesticidi altamente polari (tra cui glifosato, glufosinato e loro metaboliti) negli alimenti di origine vegetale e nel miele. Questo metodo prevede un'estrazione LLE con metanolo acidificato e l'uso di tecniche LC o IC-MS/MS per analizzare simultaneamente più combinazioni di pesticidi (Anastassiades et al., 2021). Tuttavia, anche la tecnica SPE può essere utilizzata per l'estrazione di pesticidi polari dagli alimenti. In un recente studio riguardante la determinazione di pesticidi anionici altamente polari nei prodotti dell'alveare, l'utilizzo di cartucce a forte scambio anionico (SAX) per l'estrazione ha permesso di raggiungere un elevato grado di pulizia del campione e selettività degli analiti, fronteggiando il problema di soppressione ionica causato da sostanze co-estratte appartenenti alla matrice (Jesùs et al., 2023).

Per ciò che riguarda invece le metodiche analitiche strumentali, al giorno d'oggi sono presenti numerose tecniche per la determinazione dei pesticidi polari nel miele, a complessità crescente; da metodi di screening enzimatico estremamente rapidi a procedure e strumentazioni sofisticate come l'HRMS (spettrometria di massa ad alta risoluzione). L'analisi mediante test immunoassorbente enzimatico (ELISA) raramente è stata riportata in letteratura e richiede l'utilizzo di un kit (Abraxis Glyphosate Plate Assay Kit 500086), progettato per analizzare il glifosato nelle acque (sotterranee, superficiali, e di pozzo) adattato poi a diverse matrici, compreso il miele (Rubio et al., 2014; Berg et al., 2018; John et al., 2018).

Fino ad alcuni anni fa l'uso della tradizionale cromatografia liquida (LC) a fase inversa non forniva una ritenzione ottimale di piccoli analiti polari e spesso richiedeva il ricorso alla derivatizzazione. La procedura di derivatizzazione consente una buona separazione degli analiti anche su colonne a fase inversa, ma presenta problemi legati alla contaminazione sia delle colonne che dei rilevatori, da parte di sottoprodotti degli agenti derivatizzanti. L'agente derivatizzante più comunemente utilizzato è FMOC-Cl (9-fluorenilmetossicarbonil cloruro) (Thompson et al., 2019; Bergero et al., 2021); un autore propone come alternativa il cloruro di dansile (5-(dimetilammino) naftalen-1-solfonile), segnalando una minore interferenza (Jansons et al., 2021). Recentemente però, sono state sviluppate colonne che permettono l'analisi in LC senza derivatizzazione le quali sfruttano vari approcci come la LC con interazione idrofila (HILIC), lo scambio anionico debole (WAX), lo scambio cationico debole (WCX) e fasi stazionarie di carbonio grafítico poroso. Tuttavia, solo di recente queste tecniche sono state sufficientemente perfezionate (Rampazzo et al., 2023). Esistono molti tipi di rilevatori accoppiabili alla cromatografia: a fluorescenza, a conducibilità, a fiamma pulsata, ad azoto e fosforo ecc. (Andersen et al., 2007). Tra tutti, i sistemi di spettrometria di massa tandem (MS/MS), ad oggi rappresentano l'approccio analitico più avanzato soddisfacendo tutti i requisiti di sensibilità e selettività necessari per questo tipo di analisi (Rampazzo et al., 2023). L'uso della spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS), inoltre, può migliorare ulteriormente queste prestazioni. Un'altra potenziale alternativa per l'analisi del glifosato e dei suoi metaboliti è rappresentata dalla cromatografia ionica (IC),

una tecnica ad alte prestazioni adatta per soluti carichi di piccole dimensioni, sebbene al momento non sia ancora ampiamente diffusa (Rampazzo et al, 2023).

#### 1.4.4 Evidenze della contaminazione di glifosato, glufosinato e metaboliti nel miele

Un problema significativo evidenziato nella letteratura presente sull'argomento riguarda l'assenza di metodi che comprendano l'analisi simultanea di vari pesticidi altamente polari e dei loro metaboliti. Tipicamente, la maggior parte degli studi pubblicati si concentra sull'analisi del glifosato, spesso includendo solo il suo metabolita AMPA (Jesús et al., 2023). Solo di recente, i profili metabolici completi di glifosato e glufosinato sono stati inclusi negli ultimi studi pubblicati in letteratura che riguardano la loro determinazione e monitoraggio nel miele e nei prodotti dell'apicoltura (Butovskaya et al., 2023; Jesús et al., 2023).

Uno studio condotto in Nuova Zelanda ha suggerito che la principale fonte di residui di glifosato nel miele è l'esposizione delle api agli erbicidi utilizzati in agricoltura e sui pascoli (New Zealand National Chemical Residues Programme Report, 2021). In particolare, il trifoglio e il foraggio, da cui provengono i mieli millefiori o miscelati, mostrano una concentrazione più elevata di residui di glifosato (New Zealand National Chemical Residues Programme Report, 2021). Alcune ricerche condotte nel Nord Italia invece, hanno rivelato che l'erbicida è stato trovato anche in campioni di polline raccolti a un'altitudine di 850 metri sul livello del mare, in aree non interessate da alcuna coltivazione intensiva (Bosco et al., 2023). Questo contraddice l'assunzione che la presenza di glifosato nei prodotti dell'alveare sia dovuta solo al suo impiego nelle vicinanze della colonia, suggerendo che possano essere interessate anche aree distanti dai siti di trattamento. Inoltre, la presenza di glifosato negli alveari è stata rilevata durante tutto l'anno, con concentrazioni che variano stagionalmente e che sembrano aumentare nel tempo (Rampazzo et al, 2023). L'AMPA invece, raramente viene rilevato nei prodotti dell'alveare (Bosco et al., 2023).

Rampazzo et al., (2023) hanno raccolto in un articolo i risultati sul monitoraggio dei residui di glifosato e glufosinato nei prodotti dell'alveare e specialmente sul miele, valutando dati provenienti da 20 differenti studi scientifici, fra cui monitoraggi nazionali condotti dalle autorità di controllo e monitoraggi condotti da associazioni di apicoltori. In tutto sono stati considerati 1.965 campioni di miele, nei quali il glifosato è stato ritrovato nel 25% dei casi

a concentrazioni comprese tra 2,0 e 5.500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , con valori massimi di 3.500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in Pakistan e 5.500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in Europa. In nove studi, sono state rilevate concentrazioni di AMPA comprese tra 1,9 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in 208 (44%) dei 471 campioni di miele analizzati. Thompson et al. (2019) hanno registrato percentuali molto elevate di campioni positivi sia per glifosato (99%) che per AMPA (99%), risultati simili sono riportati in uno studio condotto in Svizzera (94%) (Zoller et al., 2018).

In uno studio molto recente, Jesus et al., (2023) hanno identificato il glifosato in 16 campioni di miele (84%). Le concentrazioni variavano da 5 a 42  $\text{ng g}^{-1}$ , tutte al di sotto del limite massimo residuo (LMR) dell'UE di 50  $\text{ng g}^{-1}$ . La concentrazione più alta, 42  $\text{ng g}^{-1}$ , è stata osservata in un miele misto di eucalipto commerciale proveniente da Spagna e Uruguay, dove il metabolita AMPA è stato rilevato al di sotto del limite di quantificazione (LOQ) (5  $\text{ng g}^{-1}$ ). In un monitoraggio triennale sull'incidenza di glifosato e altri pesticidi polari nel miele italiano, invece, Butovskaya et al., (2023) hanno riportato la presenza di glifosato in 37 campioni (23,8%) nella regione Lombardia e in 25 campioni (37,9%) nella regione Emilia-Romagna. Nel periodo di monitoraggio, il glifosato è stato rilevato due volte a concentrazioni superiori al LMR, specificamente a 310 e 250  $\text{ng g}^{-1}$ , circa cinque volte il LMR. La contaminazione del miele da parte del glifosato, dunque, può essere definita come una realtà diffusa e oggettiva. Se i dati circa il monitoraggio e la ricerca scientifica legati alla contaminazione da glifosato nel miele sono limitati, quelli relativi al glufosinato sono ancora più rari. In uno studio condotto da Thompson et al., nel 2019, il glufosinato è stato identificato in 125 campioni (39%) di miele canadese, con livelli di contaminazione 1  $\text{ng g}^{-1}$  a 33  $\text{ng g}^{-1}$ . La scarsità di dati sulla contaminazione da glufosinato nel miele potrebbe essere dovuta a diversi fattori, come il suo utilizzo inferiore rispetto al glifosato, la sua rapida degradazione nel suolo e il mancato rinnovo della sua registrazione in Europa dal 2018. Per quanto riguarda N-acetil glifosato e N-acetil glufosinato, è stato segnalato un solo campione di miele nel Database dei Pesticidi dell'UE con valori non quantificabili.

In conclusione, gli studi evidenziano in generale la presenza diffusa di residui di glifosato e, in misura minore, di AMPA nel miele. Tali risultati sollevano preoccupazioni sulla possibile esposizione delle api agli erbicidi e mettono in evidenza la necessità di condurre

ulteriori ricerche per comprendere appieno l'entità della contaminazione da erbicidi nei prodotti dell'alveare (Rampazzo et al., 2023).

### 1.5 Valutazione del rischio per il consumatore derivante dall'esposizione combinata a più sostanze chimiche

L'esposizione umana e animale a sostanze chimiche è una realtà complessa e multifattoriale. L'uomo, infatti, è costantemente esposto a una pluralità di sostanze chimiche attraverso varie vie, come l'ambiente che lo circonda, ma anche e soprattutto attraverso il cibo che ingerisce (Shaw I.C., 2014). Ogni pasto che mangiamo contiene una miriade di sostanze chimiche: la maggior parte sono nutrienti, fibre o micronutrienti, tutti importanti per il nostro benessere nutrizionale. Una percentuale minuscola del nostro cibo comprende residui di sostanze chimiche utilizzate nella produzione alimentare (ad esempio pesticidi), additivi alimentari (ad esempio conservanti) e tossine naturali derivate dalle cellule degli animali o delle piante da cui ha avuto origine il prodotto alimentare. I residui chimici e gli additivi alimentari sono controllati da normative governative che garantiscono che i loro livelli negli alimenti non avranno un impatto negativo sulla salute del consumatore (Shaw I.C., 2014). Tuttavia, il tradizionale approccio alla valutazione del rischio di esposizione del consumatore ai residui chimici applicato alle singole sostanze chimiche sembra non essere più sufficiente, poiché potrebbe non riflettere accuratamente la complessità dell'esposizione reale andando a sottostimare, o sovrastimare, il rischio effettivo per gli individui (EFSA, 2019). La presenza nel medesimo alimento di residui di sostanze chimiche diverse (pesticidi, micotossine, farmaci, additivi ecc...), in concentrazione differente (*cocktail of residues*), potrebbe comportare effetti additivi o sinergici, aumentandone la tossicità (EFSA, 2019). Ad esempio, come nel caso di alcuni pesticidi, alcuni studi hanno rivelato che questi potrebbero potenzialmente incrementare l'attivazione metabolica di altri pesticidi (Shaw I.C., 2014). Questa interazione sembra essere più verosimile tra diverse classi di pesticidi piuttosto che all'interno della stessa classe (Shaw I.C., 2014). Risulta evidente, dunque, l'importanza di condurre ulteriori ricerche sull'argomento. Un'analisi più completa può portare a valutazioni più accurate e robuste. In risposta a questa complessità, l'Autorità Europea per

la Sicurezza Alimentare ha recentemente introdotto una guida armonizzata per la valutazione del rischio nell'esposizione combinata a sostanze chimiche multiple (EFSA, 2019). La standardizzazione delle metodologie di valutazione del rischio è diventata cruciale per garantire coerenza e comparabilità tra le valutazioni, semplificando la comunicazione dei risultati alle autorità competenti e al pubblico.

La guida dell'EFSA copre diverse aree, compresa la sicurezza alimentare per esseri umani e animali, considerando che molte sostanze chimiche possono contaminare il cibo e l'ambiente. L'obiettivo è migliorare la precisione delle valutazioni del rischio, passando da un approccio tradizionale basato su sostanze singole a un approccio più completo che tiene conto delle esposizioni multiple. La valutazione del rischio combinato segue un framework flessibile e armonizzato, che comprende la formulazione del problema, la valutazione dell'esposizione, l'identificazione e caratterizzazione del pericolo, e la caratterizzazione del rischio con analisi dell'incertezza (EFSA, 2019). Complessivamente, l'introduzione di questa guida riflette la necessità di affrontare la complessità dell'esposizione a sostanze chimiche e di adottare approcci armonizzati per migliorare la qualità e l'efficacia delle valutazioni del rischio, contribuendo così a garantire la sicurezza della salute umana, animale e dell'ambiente.

## 2. Scopo del lavoro

Il miele è un alimento dalle notevoli proprietà nutrizionali che apporta benefici significativi per la salute umana. Utilizzato ampiamente come dolcificante naturale, è anche considerato un alimento altamente nutritivo, particolarmente benefico per le popolazioni vulnerabili come i bambini e gli anziani. Inoltre, l'apicoltura europea rappresenta una catena di valore agroalimentare di rilievo, con impatti economici, ambientali e culturali di considerevole importanza. Nonostante i suoi numerosi vantaggi, è importante riconoscere che il miele può fungere anche da veicolo per sostanze indesiderate, sia di origine antropica che naturale, costituendo un potenziale rischio per i consumatori. Gli alveari, infatti, possono accumulare contaminanti ambientali raccolti dalle api nell'ambiente circostante. Le api bottinatrici, nel loro incessante lavoro, visitano quotidianamente migliaia di fiori, comportando almeno qualche milione di interazioni giornaliere. Oltre a raccogliere nettare, polline e propoli, le api attingono acqua dall'ambiente circostante e possono trasportare su di loro particelle in sospensione, le quali si depositano sulle piante. Il miele, di conseguenza, è spesso considerato un indicatore dello stato di "avvelenamento" dell'ambiente, riflettendo ciò che è presente nel suo contesto circostante. Oltre a contaminanti di origine antropica, il miele, in determinate condizioni, può essere un ottimo substrato per la crescita di contaminanti naturali, come le micotossine. La contaminazione da muffe nel miele può compromettere la sua qualità, influenzare il suo sapore e, in alcuni casi, rappresentare un rischio per la salute. Appare chiaro dunque, come comprendere e soprattutto, gestire attentamente queste dinamiche sia fondamentale per garantire la sicurezza e la qualità di questo prodotto. A tal fine, lo scopo di tale percorso di dottorato è stato quello di sviluppare metodiche innovative, rapide, robuste ed efficienti, per il monitoraggio di diversi contaminanti chimici nel miele tramite l'utilizzo della spettrometria di massa, potenzialmente adottabili anche nell'ambito di controlli ufficiali. La disponibilità di protocolli analitici armonizzati è ormai imperativa, in quanto promuove un approccio globale per garantire coerenza e comparabilità tra i diversi dati e studi.

Tale elaborato è il risultato di collaborazioni nate tra il FTCA, laboratorio di Farmacologia, Tossicologia e Chimica degli Alimenti (Dipartimento di Medicina Veterinaria DIMEVET, Università di Bologna) e il laboratorio di scienze alimentari del Dipartimento di Medicina Preventiva e Sanità Pubblica, Scienze Alimentari, Tossicologia e Medicina Legale, Università di Valencia e, successivamente, quella con il laboratorio di ispezione degli alimenti del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Scienze Animali DIVAS, Università di Milano e l'ICQRF-MASAF Italia (Dipartimento di Ispettorato Centrale per la Repressione delle Frodi e la Tutela della Qualità dei Prodotti Agroalimentari e Alimentari, Ministero dell'Agricoltura, Sovranità Alimentare e Foreste). Le prime fasi del lavoro sono state volte presso il Dipartimento di Medicina Preventiva e Sanità Pubblica, Scienze Alimentari, Tossicologia e Medicina Legale, Università di Valencia per un periodo di cinque mesi. L'obiettivo principale di questa fase è stato lo sviluppo, la validazione e l'applicazione di una metodologia multi-residuale finalizzata alla determinazione di 19 micotossine e 6 pesticidi nel miele, utilizzando l'approccio QuEChERS per la fase estrattiva e l'utilizzo della cromatografia liquida (HPLC) unita alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (Q-TOF-HRMS) per la fase di analisi strumentale. La seconda fase del lavoro, invece, ha visto una stretta collaborazione tra DIMEVET, DIVAS e l'ICQRF-MASAF la quale ha mirato a ottimizzare e sviluppare una metodica analitica specifica per il monitoraggio di glifosato, glufosinato e dei loro metaboliti nel miele testando approcci diversi, potenzialmente adottabili in sede di controlli ufficiali. Lo studio ha compreso un'analisi comparativa di procedure di convalida e monitoraggio, utilizzando la Cromatografia Liquida-Spettrometria di Massa Tandem (LC-MS/MS) e la Cromatografia Ionica-Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione (IC-HRMS), strumentazioni provenienti da due laboratori distinti. L'obiettivo era ottimizzare le condizioni sperimentali per migliorare la sensibilità e la selettività di entrambi gli approcci. La valutazione ha successivamente coinvolto l'analisi di 97 campioni di miele con caratteristiche, origini e metodi di produzione diversi, partecipando all'approfondimento di protocolli analitici esaustivi e raccolta di dati essenziali relativi alla determinazione e presenza di tali erbicidi polari e relativi metaboliti nel miele.

# Sviluppo e validazione di un metodo multi-residuale per la determinazione di micotossine e pesticidi in miele tramite HPLC-Q-TOF-HRMS

Di seguito verrà descritta parte sperimentale riguardante la collaborazione tra il FTCA-DIMEVET e il Dipartimento di Medicina Preventiva e Sanità Pubblica, Scienze Alimentari, Tossicologia e Medicina Legale, Università di Valencia.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1 Prodotti chimici e Reagenti

L'acqua deionizzata utilizzata (resistività > 18 M $\Omega$ ) è stata ottenuta da un sistema Milli-Q SP<sup>®</sup> Reagent Water (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Acetonitrile (ACN) e metanolo (MeOH) (grado TOF-MS) sono stati acquistati da Merck (Darmstadt, Germania). Acido formico (>99%) e formiato di ammonio (99%) sono stati acquistati da Acros Organics (New Jersey, NJ, USA). Cloruro di sodio (NaCl) e solfato di magnesio (MgSO<sub>4</sub>) sono stati ottenuti da Fisher Scientific (Madrid, Spagna). Il PSA, il sorbente a base di zirconio (Z-Sep+) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e mentre il sale C18 (grado analitico) è stato acquistato da Analisis Vinicos S.L. (Ciudad Real, Spagna). I tubi conici di polipropilene per centrifuga (15 mL e 50 mL) sono stati forniti da Labcon Scientific Instruments (Lakeville Hwy, Petaluma, USA). Le siringhe di polipropilene sono state acquistate da Becton Dickinson (Madrid, Spagna) mentre i filtri a siringa (PTFE, 13 mm, diametro 0,2  $\mu$ m) sono stati acquistati da Phenomenex (Castel Maggiore, Italia).

Gli standard analitici per pesticidi (purezza HPLC > 98%), ovvero triazofos, tiobencarb, formetanato, omethoate, oxamile, clorpirifos, e gli standard di micotossine (purezza HPLC > 98%) quali aflatossine (AFB1, AFB2, AFG1, e AFG2), tossina HT2 (HT2), tossina T2 (T2), neosolaniolo (NEO), zearalenone (ZEN), zearalanone (ZAN), beauvericina (BEA) e enniatine (ENA, ENNA1, ENNB e ENNB1), fumonisine (FB1, FB2), tentossina (TEN), sterigmatocistina (STE), fusarenone (FUS-X) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le soluzioni stock individuali sono state preparate a una concentrazione

di 10000 ng g<sup>-1</sup> in MeOH per ciascun analita. Successivamente, sono state preparate due soluzioni standard di lavoro, una contenente tutte le micotossine e un'altra tutti i pesticidi, mescolando le soluzioni stock individuali con una soluzione di MeOH: H<sub>2</sub>O (70:30 v/v), contenente lo 0,1% di acido formico a 5 mM di formiato di ammonio, in quantità appropriate per raggiungere la concentrazione di 1000 ng g<sup>-1</sup>. Le soluzioni sono state conservate in flaconi di vetro ambrato chiusi ermeticamente a -20 °C

### 3.2 Campionamento

I campioni di miele (n=18) sono stati forniti da apicoltori spagnoli.

### 3.3 Procedura di preparazione del campione

La procedura di estrazione è stata condotta seguendo una metodologia precedentemente sviluppata da Kijanek, et al., (2016). In breve, 5 g di miele sono stati trasferiti in un tubo di polipropilene da 50 mL. Successivamente, sono stati aggiunti 10 mL di acqua al campione e vortexati fino a dissoluzione completa del miele, seguiti dall'aggiunta di 10 mL di acetonitrile al 1% in acido formico e vortexati per 3 minuti. Successivamente, è stata aggiunta una miscela di 4 g di MgSO<sub>4</sub> e 1 g di NaCl, agitata e vortexata per 30 s e centrifugata a 3500 rpm a 4°C per 5 minuti. Il livello superiore (7 mL) è stato trasferito in un tubo di polipropilene da 15 mL per l'estrazione dispersiva in fase solida (d-SPE), contenente 1050 mg di MgSO<sub>4</sub>, 350 mg di C18 e 350 mg di PSA. La miscela è stata agitata, vortexata per 1 minuto e centrifugata a 3500 rpm a 4°C per 3 minuti. Il surnatante è stato quindi trasferito in un tubo di polipropilene da 15 mL e evaporato fino a secco sotto flusso di azoto a 40°C. Infine, il campione è stato ricostituito con 0,5 mL di MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30 v/v), entrambi contenenti acido formico allo 0,1% e formiato di ammonio a 5 mM, vortexato per 30 s e quindi filtrato attraverso un filtro a siringa in PTFE da 0,2 µm in vial di plastica prima dell'analisi HPLC-Q-TOF.

### 3.4 Analisi HPLC-Q-TOF-HRMS

Per l'analisi cromatografica è stato utilizzato un sistema LC Agilent 1200 Infinity Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) accoppiato a uno spettrometro di massa Q-TOF 6540 UHD Accurate-Mass (Agilent Technologies) dotato di ionizzazione a doppio getto

elettrospray (Dual AJS ESI) Agilent Technologies. La separazione cromatografica è stata effettuata attraverso una colonna Gemini-NX C18 (110 Å, 3 µm, 150 mm × 4,6 mm) (Phenomenex; Torrance, CA, USA) con temperatura impostata a 20°C. Il gradiente binario consisteva nell'eluizione di H<sub>2</sub>O (fase A) e MeOH (fase B) entrambi contenenti acido formico allo 0,1% e formiato di ammonio a 5 mM. Il gradiente cromatografico partiva da 0 minuti con una fase B al 50%, mantenuta per 6 minuti, poi aumentava linearmente al 100% B in 1 minuto e veniva mantenuto per 7 minuti. Successivamente, il gradiente diminuiva al 10% B in 1 minuto e veniva mantenuto per 5 minuti, quindi risaliva al 50% B mantenuto per 3 minuti per il ri-equilibrio della colonna. Il tempo totale di esecuzione era di 23 minuti con un flusso di 0,2 mL/min e un volume di iniezione di 5 µL. Lo spettrometro di massa Q-TOF operava in AutoMS/MS sia in modalità di ionizzazione positiva che negativa e le impostazioni erano le seguenti: flusso di gas di asciugatura (N<sub>2</sub>), 10 L min<sup>-1</sup>; temperatura del gas di asciugatura, 330 °C; pressione della nebulizzatore, 30 psi; flusso di gas di guaina, 9 L/min; temperatura del gas di guaina, 350 °C. I parametri della sorgente ionica erano: tensione di capillare, 3500 V; tensione di ugello 500 V, tensione di frammentazione 160 V, tensione di skimmer 30 V e picco di RF ottagonale, 750 V. Gli eventi di frammentazione sono stati condotti a energie di collisione fisse (10 e 40 V). L'acquisizione è stata effettuata nell'intervallo 100-1000 m/z per MS e a 40-700 m/z per l'acquisizione MS/MS, a una velocità di scansione di 5 spettri/s. La correzione di massa interna è stata effettuata attraverso due masse di riferimento: 121.0509 e 922.0098 m/z per la modalità di ionizzazione positiva e 112,9885 m/z e 1033,9881 m/z per la modalità di ionizzazione negativa. L'elaborazione dei dati è stata condotta utilizzando il software Agilent MassHunter Workstation B.08.00 (Agilent Technologies).

**Tabella 1-** Parametri di massa degli analiti ricercati

<b>Pesticidi</b>	<b>Formula molecolare</b>	<b>Addotto</b>	<b>Massa misurata (m/z)</b>	<b>Massa teorica (m/z)</b>	<b>Errore di massa (ppm)</b>
<b>Clorpirifos</b>	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	[M+H] <sup>+</sup>	349,9336	349,9335	0,29
<b>Formetanato</b>	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	222,1237	222,1235	0,90
<b>Ometoato</b>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> PS	[M+H] <sup>+</sup>	214,0297	214,0297	- 0,47
<b>Oxamyl</b>	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	242,0570	242,0570	-0,41

<b>Tiobencarb</b>	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> CINOS	[M+H] <sup>+</sup>	258,0714	258,0713	0,39
<b>Triazofos</b>	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	[M+H] <sup>+</sup>	314,0723	314,0722	0,32
<hr/>					
<b>Micotossine</b>					
<b>AFB1</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	313,0706	313,0707	-0,32
<b>AFB2</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	315,0856	315,0863	-2,22
<b>AFG1</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	329,0652	329,0656	-1,22
<b>AFG2</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	331,0808	331,0812	-1,21
<b>BEA</b>	C <sub>45</sub> H <sub>57</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	801,4433	801,4436	-0,37
<b>ENA</b>	C <sub>36</sub> H <sub>63</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	699,4923	699,4903	2,86
<b>ENA1</b>	C <sub>35</sub> H <sub>61</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	685,4773	685,4746	3,94
<b>ENB</b>	C <sub>33</sub> H <sub>57</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	657,4483	657,4463	3,04
<b>ENB1</b>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	671,4639	671,4609	4,47
<b>T-2</b>	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	484,2539	484,2541	-0,41
<b>HT-2</b>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	442,2415	442,2435	-4,52
<b>FB1</b>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	722,3958	722,3960	-0,28
<b>FB2</b>	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	706,3993	706,4008	-2,12
<b>TEN</b>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	415,2337	415,2339	-0,48
<b>STE</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	325,0714	325,0706	2,46
<b>FUS-X</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	355,1371	355,1387	-4,51
<b>NEO</b>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	400,1950	400,1965	-3,75
<b>ZEN</b>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	317,1404	317,1394	3,15
<b>ZAN</b>	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	319,1536	319,1551	-4,70

### 3.6 Validazione del metodo

La metodologia proposta è stata validata seguendo le linee guida stabilite dalle linee guida SANTE 11312/2021 concernenti i Controlli di Qualità Analitici e Procedure di Validazione del Metodo per l'Analisi dei Residui di Pesticidi in Alimenti e Mangimi. Inizialmente, sono state costruite curve di calibrazione in solvente puro e in matrice nell'intervallo 10-700 ng g<sup>-1</sup>. La *signal suppression/enhancement* del segnale (SSE) è stata valutata al fine di rilevare un'eventuale interferenza della matrice, quindi le pendenze delle curve di calibrazione sono state confrontate seguendo l'Equazione (1):

$$(1) \text{ SSE}(\%) = S_m/S_s \times 100$$

dove  $S_m$  è il coefficiente angolare della curva di calibrazione in matrice e  $S_s$  è il coefficiente angolare della curva di calibrazione costruita in solvente puro. Un SSE (%) inferiore all'80% o superiore al 120% indicava una soppressione o un aumento del segnale non trascurabili. L'accuratezza è stata valutata attraverso studi di recupero a tre livelli di fortificazione (100, 25 e 10 ng g<sup>-1</sup>). Campioni fortificati ai livelli precedentemente citati sono stati estratti in triplicato per tre giorni non consecutivi al fine di determinare la precisione in termini di ripetibilità (precisione intra-giorno, RSD<sub>I</sub>) e riproducibilità intra-laboratorio (precisione inter-giorno, RSD<sub>R</sub>). Il limite di quantificazione (LOQ) è stato definito come la concentrazione più bassa dell'analita alla quale la concentrazione poteva essere determinata con precisione e accuratezza ≤ 20%.

### 3.7 Controllo Qualità/Assicurazione della Qualità dell'analisi e analisi statistica

La corretta conferma degli analiti è stata ottenuta attraverso l'analisi di dati cromatografici e spettrali. In primo luogo, i tempi di ritenzione corrispondenti agli analiti presenti nei campioni sono stati confrontati con quelli nelle soluzioni standard con una deviazione massima del ±2,5% del tempo totale di esecuzione (23 minuti). Un insieme di campioni di controllo di qualità/assicurazione della qualità, tra cui un bianco di reagente, un bianco procedurale, un campione replicato e una calibrazione in matrice, sono stati introdotti all'inizio e alla fine di ogni lotto di analisi. Tutti gli esperimenti sulle prestazioni del metodo sono stati condotti in triplicato e i risultati sono stati espressi come valori medi e deviazione standard relativa (RSD %). L'analisi statistica dei dati è stata eseguita utilizzando il software statistico R versione 4.1.2. Lo *Student-t* test è stato applicato alle misurazioni ripetute per analizzare i risultati ottenuti; i valori di  $p \leq 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi per un intervallo di confidenza del 95%.

## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Il metodo QuEChERS

Nel 2003, Michelangelo Anastassiades e Steven J. Lehotay, insieme ai loro collaboratori, hanno presentato un innovativo metodo multiresiduo per l'estrazione di pesticidi da frutta e verdura. Questo metodo, che fa uso di uno step di estrazione con acetonitrile (LLE) e uno step di estrazione in fase solida dispersiva ("*dispersive solid-phase extraction*" d-SPE), è stato progettato per essere rapido, semplice, economico, efficace, robusto e sicuro. Il processo inizia con l'omogeneizzazione del campione, seguita da un'estrazione liquido-liquido con acetonitrile e da una pulizia mediante d-SPE, che prevede l'utilizzo di sali, variabili per tipo e quantità, al fine di eliminare eventuali interferenze dall'estratto. Sebbene 10 g di campione siano stati inizialmente stabiliti come aliquota standard, possono essere utilizzate anche dimensioni campionarie diverse (tipicamente 5-15 g), con la concomitante introduzione di adeguamenti appropriati (González-Curbelo et al., 2015).

Nel corso del tempo, le condizioni di estrazione e pulizia sono state via via ottimizzate al fine di massimizzare semplicità, velocità, selettività e recupero del metodo. Tra i solventi testati per l'estrazione, l'acetonitrile (ACN) è quello che ha dimostrato la maggiore capacità estraente e maggiore selettività per quanto riguarda lo step di estrazione LLE. Per quanto riguarda lo step d-SPE, il magnesio solfato ( $\text{MgSO}_4$ ), il quale agisce legando l'acqua, è stato utilizzato come sale essiccante per favorire la separazione di fase. L'aggiunta di cloruro di sodio ( $\text{NaCl}$ ) ha poi ulteriormente migliorato la separazione di fase e ridotto la co-estrazione di componenti della matrice. Infine, il metodo ottimizzato prevede l'estrazione di 10 g di campione con 10 mL di ACN, seguita dall'aggiunta di 4 g di  $\text{MgSO}_4$  anidro e 1 g di  $\text{NaCl}$ . Il pH del campione viene mantenuto in una condizione di acidità per evitare la degradazione di alcuni pesticidi. Dopo una prima centrifugazione, ulteriori aliquote di PSA (*Primary-Secondary Amine*) e  $\text{MgSO}_4$  vengono aggiunti al supernatante, seguiti da un'altra centrifugazione prima dell'analisi strumentale. Questo approccio ha dimostrato fin da subito di essere vantaggioso, consentendo a un singolo analista di preparare un lotto di 6-12 campioni in 30-45 minuti a un costo di circa \$1 (USA) per campione (González-Curbelo et al., 2015). Uno dei maggiori vantaggi derivanti dall'applicazione di tale metodica, sta nella

sua versatibilità; per quanto riguarda la fase di pulizia d-SPE, ulteriori adattamenti testati nel tempo hanno coinvolto l'uso di diverse quantità di PSA o C18 (*Octadecylsilane*) in combinazione con PSA, per ottenere estratti più purificati. L'impiego di C18 si è dimostrato particolarmente efficace per campioni con un alto contenuto di lipidi, come nel caso dei cereali. L'utilizzo di C18 non ha avuto impatti negativi sul recupero dei pesticidi, a differenza di quanto riscontrato con l'uso di quantità maggiori di PSA (~20% in meno per alcuni pesticidi polari). Di conseguenza, alcuni metodi modificati hanno optato esclusivamente per C18 per eliminare i grassi quando l'uso di PSA non era necessario o avrebbe compromesso il recupero. Inoltre, è stata sperimentata la combinazione di GCB (*Graphitized carbon black*) con PSA per rimuovere coestratti di clorofilla da matrici verdi, come lattuga, spinaci o foglie, ottenendo estratti meno pigmentati. Tuttavia, è noto che GCB comporta perdite circa il 25% nel recupero di alcuni pesticidi, come esaclorobenzene, tiabendazolo e terbufos, i quali tendono ad essere trattenuti sulla sua superficie (González-Curbelo et al., 2015).

Nonostante sia un metodo sviluppato in origine per la determinazione dei pesticidi in matrici come frutta e verdura, il metodo QuEChERS, ha dimostrato di essere adattabile per l'estrazione di un vasto range di analiti da matrici sia di origine vegetale, che animale (González-Curbelo et al., 2015).

#### 4.2 Ottimizzazione della procedura di preparazione del campione

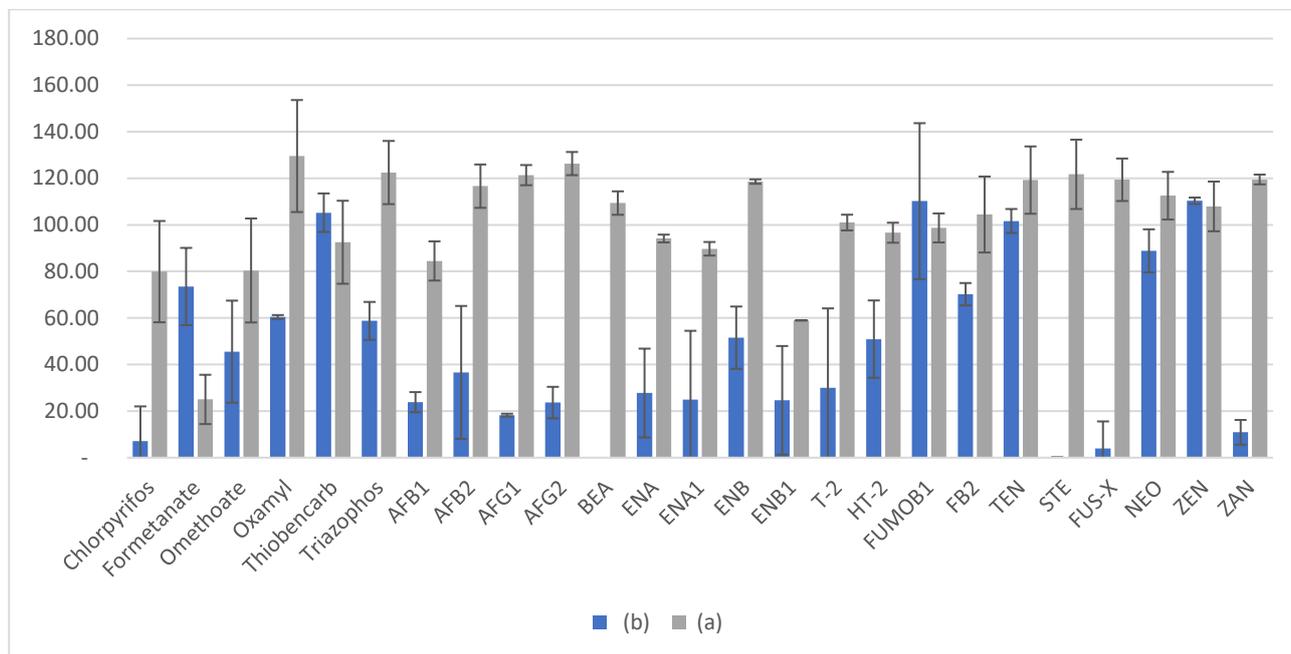
La preparazione del campione è una delle fasi più importanti nell'analisi multi-residuo. Una metodologia QuEChERS precedentemente sviluppata su questo tipo di campione è stata selezionata come punto di partenza. Kijanek, et al., (2016) ha testato l'uso di diverse combinazioni di porzioni di sorbenti nella fase di estrazione d-SPE per il recupero dei pesticidi negli estratti di api. La tipologia di sorbenti utilizzati è un elemento importante nell'estrazione QuEChERS; solitamente vengono impiegati agenti essiccanti, come  $MgSO_4$  e  $NaCl$ , per creare un gradiente osmotico al fine di separare l'acqua dal solvente organico (Rodriguez-Carrasco et al., 2013). PSA viene generalmente utilizzato per rimuovere zuccheri e altri elementi come acidi organici e grassi e pigmenti. C18 è un sorbente idrofobo a base di silice generalmente aggiunto per la sua elevata affinità verso i composti non polari. Z-

Sep+ è una miscela dei due sorbenti ottadecil (C18) e silice rivestita di biossido di zirconio, utile per l'analisi dei pesticidi in matrici grasse (Musarurwa et al., 2020). Nel lavoro di Kijanek, et al., (2016), la miscela dei sorbenti Z-Sep+ e PSA utilizzati ha mostrato un recupero migliore dei pesticidi rispetto alla stessa quantità di Z-Sep+ utilizzata singolarmente o quando è stata utilizzata la miscela PSA+C18.

Considerando la differenza nella composizione della matrice, sono state testate in questo lavoro diverse combinazioni di sorbenti nel miele fortificato a 100 ng g<sup>-1</sup> per trovare la miscela di *clean-up* ideale che consentisse il maggior recupero per il maggior numero di analiti. In particolare, sono state impiegate (A) 1050 mg di MgSO<sub>4</sub> + 350 mg di PSA + 350 mg di C18 e (B) 1050 mg di MgSO<sub>4</sub> + 350 mg di PSA + 350 mg di Z-Sep+. L'estrazione con la miscela A ha mostrato un maggior numero di analiti recuperati e una percentuale di recupero migliore per la maggior parte dei composti nell'intervallo 70-120%. La diversa efficienza di pulizia di una miscela rispetto all'altra è stata confermata anche tramite l'analisi statistica (test t di Student). I risultati dell'analisi hanno mostrato, infatti, una differenza statistica significativa per un intervallo di confidenza del 95% in termini di risultati di recupero quando sono state impiegate le estrazioni con A e B.

Per la fase di ricostituzione, inizialmente i campioni sono stati ricostituiti con MeOH: H<sub>2</sub>O (70:30 v/v), successivamente è stata testata una ricostituzione del campione con la fase mobile, MeOH: H<sub>2</sub>O entrambi contenenti acido formico allo 0,1% e formiato di ammonio a 5 mM nella proporzione 70:30 v/v. Questa opzione ha mostrato risultati migliori in termini di forma del picco e intensità del segnale, probabilmente a causa di una maggiore ionizzazione degli analiti considerando la presenza di additivi nella fase mobile. Di conseguenza, è stato utilizzato MeOH: H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) contenente sia acido formico allo 0,1% che formiato di ammonio a 5 mM.

**Grafico 1** - Effetto delle due miscele di sorbenti d-SPE (A, B) sul recupero di campioni di miele fortificato a un livello di 100 ng g<sup>-1</sup> con gli analiti studiati



#### 4.3 Validazione del metodo

Le sei curve di taratura in matrice (10 – 700 ng g<sup>-1</sup>) hanno dimostrato una buona linearità ( $R^2 > 0,98$ ) per tutti gli analiti considerati. Il metodo ha mostrato una ripetibilità e riproducibilità soddisfacenti, con valori di  $RSD_r$  e  $RSD_R$  compresi tra il 1% e il 19% e tra il 1% e il 20%, rispettivamente, per tutti gli analiti considerati. Per quanto riguarda l'effetto matrice o *signal suppression /enhancement*, alle concentrazioni di 10 e 25 e 100 ng g<sup>-1</sup>, questo si è dimostrato essere variabile ma in generale minore dell'80% nella maggior parte dei casi. Ciò vuol dire che la matrice esercita un effetto di soppressione ionica nei confronti della maggior parte degli analiti, che risulta essere più o meno marcato a seconda dell'analita considerato. Ciononostante, i valori relativi al recupero degli analiti alle concentrazioni di 10 e 25 e 100 ng g<sup>-1</sup> risultano essere in tutti i casi compresi all'interno del range 80-120%, determinando un elevato livello di accuratezza dell'analisi. Il limite di quantificazione (LOQ) per tutti gli analiti è stato fissato a 10 ng g<sup>-1</sup>, essendo il livello più basso al quale la concentrazione poteva essere determinata con precisione e accuratezza  $\leq 20\%$ . I valori relativi alla validazione della metodica per ciascun analita sono riportati in tabella 2.

**Tabella 2-** Parametri di validazione

Analita	SSE (%)	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	Recovery (%)			RSD <sub>r</sub>			RSD <sub>R</sub>		
			10 ng g <sup>-1</sup>	25 ng g <sup>-1</sup>	100 ng g <sup>-1</sup>	10 ng g <sup>-1</sup>	25 ng g <sup>-1</sup>	100 ng g <sup>-1</sup>	10 ng g <sup>-1</sup>	25 ng g <sup>-1</sup>	100 ng g <sup>-1</sup>
<b>Clorpirifos</b>	103	10	96	96	99	8	16	1	8	14	6
<b>Formetanato</b>	70	10	87	115	94	8	11	15	7	10	15
<b>Ometoato</b>	56	10	103	103	102	8	3	3	20	11	6
<b>Oxamyl</b>	90	10	104	97	103	18	9	6	16	7	14
<b>Tiobencarb</b>	69	10	117	118	92	6	4	1	20	11	11
<b>Triazofos</b>	62	10	107	103	110	3	4	1	5	11	9
<b>AFB1</b>	49	10	86	92	88	14	2	2	17	4	4
<b>AFB2</b>	55	10	95	94	117	8	4	9	8	20	5
<b>AFG1</b>	68	10	96	102	101	8	2	4	7	3	5
<b>AFG2</b>	75	10	99	108	106	4	1	5	4	4	5
<b>BEA</b>	75	10	76	95	109	10	1	5	14	4	17
<b>ENA</b>	55	10	92	72	56	18	19	5	13	20	8
<b>T-2</b>	58	10	78	108	88	6	1	3	14	4	14
<b>HT-2</b>	43	10	114	107	105	17	19	8	18	20	2
<b>FB1</b>	50	10	109	74	93	14	4	2	15	17	9
<b>FB2</b>	40	10	71	74	92	14	6	2	17	13	2
<b>TEN</b>	51	10	80	99	94	10	4	4	17	6	4

---

<b>STE</b>	58	10	104	109	97	16	7	1	18	16	1
<b>FUS-X</b>	36	10	108	115	111	8	14	7	7	19	3
<b>NEO</b>	62	10	107	117	117	7	4	2	13	8	2
<b>ZEN</b>	34	10	93	100	117	9	3	3	7	3	5
<b>ZAN</b>	52	10	111	117	109	3	14	7	9	11	7

---

#### 4.4 Applicazione del metodo a campioni reali

Il protocollo analitico sviluppato, ottimizzato e validato, descritto nei paragrafi precedenti è stato successivamente applicato a 18 campioni di miele forniti da apicoltori locali. Nei campioni di miele analizzati non sono state ritrovate tracce di micotossine. Tuttavia, come trattato nel paragrafo 1.2.2.2, da uno studio recente di Keskin e Eypoglu 2023, si evince che, in media, le quantità di micotossine nei prodotti dell'apicoltura si aggirano intorno a  $1.601 \pm 0.32 \mu\text{g kg}^{-1}$  per DON,  $0.704 \pm 0.09 \mu\text{g kg}^{-1}$  per T-2,  $0.141 \pm 0.02 \mu\text{g kg}^{-1}$  per HT-2 e  $0.021 \pm 0.003 \mu\text{g kg}^{-1}$  per OTA. Quest'ultima risulta essere la micotossina più frequentemente rilevata, con un valore medio di concentrazione pari a  $0,0211 \pm 0,004 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Keskin and Eypoglu 2023). Per quanto riguarda la contaminazione da parte di pesticidi, sono stati trovati livelli non quantificabili di due pesticidi organofosfati, oxamyl e clorpirifos, in 2 dei 18 campioni. Come già accennato precedentemente nella sezione 1.3.5.1, il clorpirifos è stato uno dei pesticidi più utilizzati in agricoltura fino a qualche anno fa con effetti molto tossici nell'uomo e nelle api; infatti, la sua presenza nei prodotti dell'alveare è già stata documentata. Tuttavia, ad oggi la sua autorizzazione in UE non è stata più rinnovata. Nel nostro caso, non sono stati rilevati livelli quantificabili di questo pesticida, ma generalmente questo è stato trovato nel miele a concentrazioni comprese tra 0,76 e 3,89  $\mu\text{g kg}^{-1}$  da Villalba et al., (2020) e 0,70 e 0,89  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Balayannis G. e Balayannis P., 2008) fino ad arrivare a valori di 9,40  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , quantificato da Panseri et al., (2014) in miele italiano proveniente da arnie posizionate in una zona ricca di frutteti. Ma i valori massimi di clorpirifos nel miele sono stati rilevati in Uruguay, in uno studio condotto da Pareja et al., (2011), dove il clorpirifos è stato uno dei composti più rilevati e le cui concentrazioni andavano da 30 a 80  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

## 5. Conclusioni

Micotossine e pesticidi fanno parte dei contaminanti che possono essere ritrovati nel miele e che potenzialmente rappresentano un rischio per il consumatore. La presenza di metodiche analitiche multi-residuo capaci di determinarli in conformità a quelle che sono le linee guida internazionali, è di fondamentale importanza. Queste metodiche consentono

una determinazione e quantificazione efficiente, veloce e affidabile, contribuendo così alla protezione del consumatore e fornendo dati preziosi per l'arricchimento delle conoscenze nella comunità scientifica. Durante il periodo trascorso all'estero presso il laboratorio di scienze alimentari del Dipartimento di Medicina Preventiva e Sanità Pubblica, Scienze Alimentari, Tossicologia e Medicina Legale, Università di Valencia è stato sviluppato un protocollo di analisi per la determinazione di micotossine e pesticidi nel miele sfruttando la metodica di estrazione QuEChERS, una tecnica progettata per essere rapida, semplice, economica, efficace, robusta e sicura. Il protocollo, in particolare lo step di estrazione, è stato sottoposto a una fase di ottimizzazione, che ha visto la sperimentazione di diverse tipologie e diverse quantità di sorbenti per la fase di *clean-up* in d-SPE. L'obiettivo era quello di massimizzare il recupero per il maggior numero di analiti possibile. Infine, il protocollo ultimato è stato sottoposto a validazione secondo quanto previsto dalle linee guida SANTE 11312/2021. Il metodo sviluppato ha mostrato buoni risultati in termini di linearità, precisione e accuratezza, dimostrandosi idoneo agli obiettivi e allo scopo.

Il protocollo analitico validato è stato infine applicato a 18 campioni di miele provenienti da apicoltori locali. Non sono state rilevate tracce di micotossine, ma in 2 dei 18 campioni sono stati individuati livelli non quantificabili di due pesticidi organofosfati, oxamyl e clorpirifos.

# Determinazione di glifosato, glufosinato e metaboliti nel miele tramite cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) e cromatografia ionica-spettrometria di massa ad alta risoluzione (IC-HRMS).

Di seguito verranno descritte le attività sperimentali condotte relative alla collaborazione nata tra il DIMEVET, DIVAS, l'ICQRF-MASAF Italia.

## 6. Materiali e metodi

### 6.1 Prodotti chimici e Reagenti

Glyphosate (purezza 98%), glyphosate-2-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N (purezza 97%) (standard interno, IS), acido aminometilfosfinicopropionico (AMPA), acido aminometilfosfinicopropionico <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N (standard interno, IS), N-acetil-glyphosate, N-acetil-AMPA, ammonio glufosinate, glufosinate-d3-cloridrato (IS), N-acetil-glufosinate sodio, N-acetil-glufosinate-d3 (standard interno, IS), 3-metilfosfinicopropionico (MPPA), 3-metilfosfinicopropionico sodio sale (MPPA-d3) (IS) sono stati acquistati presso TRC (Toronto Research Chemicals Inc., Canada). Acetonitrile, metanolo e acido formico, tutti di grado LC-MS, sono stati acquistati da Merck (Darmstadt, Germania). L'acqua ultrapura è stata prodotta da un sistema di purificazione dell'acqua Milli-Q® (Merck, Darmstadt, Germania). I filtri a siringa in PTFE (13 mm, 0,2 µm) sono stati acquistati presso Waters Corp. (Milford, MA, USA). Le soluzioni stock singole di glyphosate, AMPA, N-acetil-glyphosate, ammonio glufosinate, N-acetil-glufosinate sodio e MPPA a una concentrazione di 100 µg mL<sup>-1</sup> e standard interni relativi a una concentrazione di 40 µg mL<sup>-1</sup> in acqua sono stati preparati in fiale di plastica. I volumi appropriati di ciascuna soluzione stock sono stati diluiti per creare due soluzioni "mix" di lavoro contenenti una tutti tutti gli analiti, una gli standard interni, entrambe a una concentrazione di 1 µg mL<sup>-1</sup>. Tutte le soluzioni stock e di lavoro sono state conservate e refrigerate a +4°C.

**Tabella 3-** Campioni di miele coinvolti nel monitoraggio

<b>Origine Botanica del Miele</b>	<b>Numero</b>	<b>Metodo di Produzione</b>
Millefiori	55	Convenzionale
Millefiori	4	Biologico
Agrumi	7	Convenzionale
Acacia	12	Convenzionale
Trifoglio	1	Convenzionale
Sulla	1	Convenzionale
Erica	1	Convenzionale
Tarassaco	1	Convenzionale
Eucalipto	2	Convenzionale
Erba Medica	1	Convenzionale
Castagno	6	Convenzionale
Tiglio	3	Convenzionale
Adamesque	1	Convenzionale
Coriandolo	1	Convenzionale
Fiore Alpino	1	Convenzionale
<b>Totale</b>	<b>97</b>	

## 6.2 Campionamento

Un totale di 97 campioni di miele, provenienti da diverse origini botaniche e metodi produttivi (convenzionali e biologici), sono stati raccolti con il supporto dell'ICQRF attraverso una collaborazione ufficiale, come presentato nella Tabella 3. Prima dell'analisi, i campioni sono stati conservati in condizioni ambiente e al buio.

## 6.3 Preparazione del campione

Due grammi di miele sono stati pesati in una falcon di polipropilene da 15 mL. Successivamente, sono stati aggiunti 3 mL di metanolo e 7 mL di acqua contenente l'1% di acido formico, seguendo il protocollo sviluppato da Chiesa et al., (2019). Il campione è stato vortexato fino a completa dissoluzione, quindi sonicato per 15 minuti e successivamente centrifugato a 5000 rpm a 4°C per 10 minuti. Infine, 1 mL del campione è stato filtrato in vial di plastica, pronto per l'analisi LC-MS/MS. L'estratto è stato sottoposto a una diluizione 1:1 con acqua ultrapura prima dell'analisi in IC-HRMS.

## 6.4 Analisi in LC-MS/MS

La rilevazione dei pesticidi polari nel miele è stata ottenuta utilizzando la cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata a uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (UHPLC-MS/MS). Questo sistema analitico includeva una pompa binaria Waters Acquity UHPLC in combinazione con uno spettrometro di massa triple quadrupolo Xevo TQ-S micro della Waters Corporation, con sede a Milford, Massachusetts, USA. Lo strumento è dotato di una sorgente di ionizzazione a *electrospray* (ESI).

Le analisi sono state eseguite utilizzando la modalità di ionizzazione negativa (ESI-) e seguivano un approccio di monitoraggio di reazione multipla (MRM), come dettagliato nella Tabella 4 per i composti target. La tensione della capillare ESI è stata impostata a +3,00 kV, la tensione del cono è stata mantenuta a 20,00 V, la temperatura di desolvatazione è stata impostata a 600 °C e la temperatura della sorgente è stata regolata a 150 °C. I flussi di gas di desolvatazione e cono sono stati stabiliti rispettivamente a 1000 e 150 L/hr, come gas di collisione è stato utilizzato l'argon.

La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna "Anionic Polar Pesticide" (5 µm, 2,1 mm x 150 mm) della Waters Corporation, termoregolata a 50°C. Le condizioni cromatografiche erano configurate come segue: le fasi mobili includevano acido formico al 1,2% in acqua (A) e acetonitrile acidificato con acido formico al 0,5% (B). Il gradiente iniziava al 10% della fase A a 0 minuti, aumentava linearmente all'80% entro 1,5 minuti, si elevava ulteriormente al 95% in 1,5 minuti e poi tornava al 10% entro 17 minuti, con 1 minuto per riequilibrare la colonna. La durata totale dell'analisi era di 21 minuti, il flusso era mantenuto a 0,500 mL min<sup>-1</sup> e il volume iniettato era di 10 µL. L'autocampionatore è stato mantenuto a 20 °C durante l'intera analisi. L'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono state effettuate utilizzando il software Waters MassLynx 4.1, fornito da Waters Corporation con sede a Milford, Massachusetts, USA.

**Tabella 4-** Parametri MS/MS

<b>Analita</b>	<b>Ione precursore (m/z)</b>	<b>Ione prodotto 1 (m/z)</b>	<b>CE 1 (eV)</b>	<b>Ione prodotto 2 (m/z)</b>	<b>CE 2 (eV)</b>
Glyphosate	167,89	62,88	30	149,96	13
Glyphosate-2-13C,15N	170,90	62,85	20	80,88	15
AMPA	109,79	62,90	15	80,90	9
N-acetyl-AMPA	151,90	62,88	20	109,91	10
AMPA-13C15N	111,85	62,90	14	80,90	9
N-acetyl-glyphosate	209,90	62,90	24	150,01	10
Glufosinate	179,95	62,90	30	94,99	15
Glufosinate-d3	182,97	62,89	30	97,94	15
MPPA	150,90	132,93	12	62,88	25
MPPA-d3	153,90	135,95	12	62,90	27
N-acetyl-glufosinate	222,02	58,93	16	136,01	20
N-acetyl-glufosinate-d3	225,07	62,03	11	137,05	20

CE energia di collisione

## 6.5 Analisi in IC-HRMS

Un sistema di Cromatografia Ionica (IC) Dionex ICS-5000+ (Sunnyvale, CA, USA) composto da una Pompa Duale (DP), un Rivelatore di Conduttività (EG), un Modulo Rivelatore/Cromatografico (DC) e un Autosampler (AS-AP) è stato utilizzato per la separazione cromatografica. La colonna era una Thermo Scientific Dionex IonPac AS19- 4  $\mu\text{m}$  ( $2 \times 250$  mm, dimensione delle particelle 4  $\mu\text{m}$ ) con una colonna di protezione Dionex IonPac AG19-4  $\mu\text{m}$  ( $2 \times 50$  mm, dimensione delle particelle 4  $\mu\text{m}$ ) mantenuta a 30°C. Il flusso dell'eluente era di 0,30 mL min<sup>-1</sup> con un gradiente da 15 mM di KOH (aq), mantenuto per 8 minuti, aumentato a 55 mM di KOH (aq) a 20 minuti, mantenuto in queste condizioni per 4 minuti e tornato a 15 mM di KOH (aq) a 24,1 minuti fino a 30 minuti. L'eluente di KOH è stato neutralizzato utilizzando un soppressore rigenerato elettroliticamente Dionex ADRS 600, 2 mm (Thermo Scientific). Il volume di iniezione era di 10  $\mu\text{L}$ . Il rivelatore era un

Orbitrap Exploris 120™ (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), dotato di una sorgente di ionizzazione a spruzzo elettrificato riscaldato (HESI). La temperatura del tubo di trasferimento degli ioni e la temperatura del vaporizzatore erano impostate a 320°C e 280°C, mentre la tensione di spruzzo elettrico era impostata a 3,00 kV operando in modalità negativa. Gas di rivestimento e ausiliario erano impostati a 45 e 15 unità arbitrarie, con un livello RF della lente S di 70. La calibrazione dello strumento veniva eseguita ogni 2 giorni con un'infusione diretta di una soluzione di calibrazione Pierce™ FlexMix™ (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA). L'acquisizione Full Scan (FS) è stata combinata con una modalità di scansione degli ioni di prodotto per la risposta confermativa, basata su un elenco di inclusione. La potenza risolutiva di FS era impostata a 60000 Full Width at Half Maximum (FWHM), è stato selezionato un intervallo di scansione da m/z 50 a 250, il controllo automatico del guadagno (AGC) è stato impostato come standard, e il tempo massimo di iniezione è stato impostato in modalità automatica. L'MS<sup>2</sup> operava a 15000 FWHM. Il target AGC è stato impostato in modalità standard, con un tempo massimo di iniezione automatico. La risoluzione di Q1 è stata impostata a 1 m/z. La frammentazione dei precursori è stata ottimizzata come energia di collisione normalizzata (NCE) a due step (35 e 60 eV). La formula del composto, con la massa teorica esatta dei genitori e la transizione diagnostica utilizzata per confermare Gly, Glu e i loro metaboliti sono riportate nella Tabella 5. Il software utilizzato era Xcalibur™ 4.5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Stati Uniti).

**Tabella 5-** Parametri HRMS

<b>Analita</b>	<b>Formula</b>	<b>Ione precursore (m/z)</b>	<b>Ioni prodotto (m/z)</b>
Glyphosate	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P	168,0067	62,96417, 124,01687, 149,99612
Glyphosate-2- <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> NH <sub>8</sub> O <sub>5</sub> P	171,0105	62,96423, 80,97488, 153,00058
AMPA	CH <sub>6</sub> NO <sub>3</sub> P	110,0013	62,96417, 78,95904, 80,97468
N-acetyl-AMPA	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> P	152,0118	62,96422, 110,0138, 134,00165
AMPA- <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N	<sup>13</sup> CH <sub>6</sub> <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> P	112,0016	62,96429, 80,97503
N-acetyl-glyphosate	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>6</sub> P	210,0173	62,96421, 124,01717, 149,99636

Glufosinate	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>4</sub> P	180,0431	85,02955, 94,99042, 136,05329
Glufosinate-d <sub>3</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> D <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> P	183,0619	62,96429, 98,00951, 139,07257
MPPA	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> P	151,0166	62,96404, 107,02647, 133,00574
MPPA-d <sub>3</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> D <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	154,0354	62,96433, 110,04537, 136,02491
N-acetyl-glufosinate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> P	222,0537	59,01393, 136,05352, 180,04348
N-acetyl-glufosinate-d <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> D <sub>3</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub> P	225,0725	62,03248, 137,05921, 181,8164

## 6.6 Validazione del metodo

Riconoscendo la presenza di linee guida sul controllo di qualità analitica e le procedure di convalida nell'analisi dei residui di pesticidi alimentari, ed in concomitanza, di normative europee sui prodotti di origine animale, è stato progettato un protocollo sperimentale di validazione, che garantisca la conformità al Regolamento (UE) 2021/808 - sulla "Performance dei metodi analitici per i residui di sostanze farmacologicamente attive utilizzate negli animali destinati alla produzione di alimenti e sull'interpretazione dei risultati" ed, in contemporanea, alla Guida SANTE 11312/2021 - "Controlli di qualità analitica e procedure di convalida del metodo per l'analisi dei residui di pesticidi in alimenti e mangimi". Le prestazioni del metodo sono state valutate utilizzando un campione di miele precedentemente analizzato per l'assenza di residui. L'assenza di segnali superiori a un rapporto segnale-rumore di 3 ai tempi di ritenzione attesi dei composti target è stato utilizzato come criterio per confermare l'assenza di interferenze.

Per generare curve di calibrazione matrice-*matched* a sei punti, 2 grammi della matrice sono stati arricchiti con un volume appropriato della soluzione di lavoro, coprendo un intervallo di concentrazione da 5 a 100 ng g<sup>-1</sup>. La ripetibilità (RSD<sub>r</sub>), calcolata come coefficiente di variazione (CV %), è stata stabilita analizzando sei repliche a quattro diversi livelli di fortificazione (5, 10, 25 e 50 ng g<sup>-1</sup>). La riproducibilità intergiornaliera (RSD<sub>R</sub>) è stata valutata analizzando sei repliche dei quattro diversi livelli su tre giorni separati. I recuperi sono stati calcolati confrontando le concentrazioni dei composti arricchiti prima dell'estrazione con quelle arricchite alla fine del processo di estrazione, a due livelli di fortificazione (10 e 50 ng g<sup>-1</sup>) per tutti i composti.

Il limite di quantificazione (LOQ) del metodo è stato determinato come il livello di fortificazione validato più basso che soddisfaceva i criteri di recupero nell'intervallo del 70-120% e una Deviazione Standard Relativa (RSD) di  $\leq 20\%$  e  $\leq 25\%$  per concentrazioni inferiori a  $10 \text{ ng g}^{-1}$ . Inoltre, l'effetto matrice è stato valutato confrontando le aree dei picchi degli standard arricchiti negli estratti vuoti con le aree dei picchi ottenute dagli standard di soluzione pura alle concentrazioni di 10 e  $50 \text{ ng g}^{-1}$ , espresso come percentuale.

## 7. Risultati

### 7.1 Parametri di validazione in LC-MS/MS

Le curve di calibrazione in matrice a sei punti (0, 5, 25, 50, 75,  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ) hanno dimostrato una buona linearità ( $R^2 > 0,99$ ) per tutti gli analiti considerati. Il metodo ha mostrato una ripetibilità e una riproducibilità soddisfacenti, con valori di  $RSD_r$  e  $RSD_R$  compresi nell'intervallo del 3% al 18% e dal 6% al 22%, rispettivamente, per tutti gli analiti considerati, tranne per l'AMPA. L'AMPA ha mostrato valori di  $CV\% > 25\%$  alle concentrazioni di 5 e  $10 \text{ ng g}^{-1}$ . Tuttavia, tutti gli analiti hanno mostrato robusti tassi medi di recupero, compresi tra l'83% e il 106%, ai livelli di concentrazione di 10 e  $50 \text{ ng g}^{-1}$ . Per quanto riguarda l'effetto matrice, tutti i composti mostrano un effetto matrice nell'intervallo dell'80% al 104%, ai livelli di concentrazione di 10 e  $50 \text{ ng g}^{-1}$ , tranne AMPA e Glu. AMPA e Glu hanno mostrato un effetto matrice più pronunciato, del 3% e 54%, alla concentrazione di  $10 \text{ ng g}^{-1}$  e di 3% e 48%, alla concentrazione di  $50 \text{ ng g}^{-1}$ . Questa diminuzione del segnale per AMPA e Glu è probabilmente dovuta a interferenti nella matrice che causano una soppressione ionica. Tuttavia, il metodo mantiene un'accuratezza soddisfacente per questi analiti, rendendolo adatto allo scopo, grazie all'uso degli standard interni marcati. Per la stessa ragione, il limite di quantificazione (LOQ) per tutti gli analiti è stato fissato a  $5 \text{ ng g}^{-1}$ , tranne per AMPA. Nel caso di AMPA, il LOQ è stato aumentato a  $25 \text{ ng g}^{-1}$  a causa della mancata soddisfazione dei criteri di precisione ( $RSD_r$  e  $RSD_R$ ) entro l'intervallo  $\leq 25\%$  al livello di concentrazione di  $5 \text{ ng g}^{-1}$ . I risultati dei parametri di convalida sono mostrati nella Tabella 6.

**Tabella 6-** Parametri di validazione in LC-MS/MS

Analita	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	Linearità (R <sup>2</sup> )	Effetto matrice %		Recupero %		RSD <sub>r</sub> (CV) % (A 4 livelli <sup>a</sup> )			RSD <sub>R</sub> % (A 4 livelli <sup>a</sup> )
			10 ng g <sup>-1</sup>	50 ng g <sup>-1</sup>	10 ng g <sup>-1</sup>	50 ng g <sup>-1</sup>	Day 1	Day 2	Day 3	
Glyphosate	5	0,997	100	93	92	105	8-6-7-5	8-8-5-7	6-9-6-13	12-13-6-9
AMPA	25	0,998	3	3	83	87	64-23-14-9	66-61-10-8	57-21-11-18	63-42-11-14
N-acetyl-AMPA	5	0,999	86	105	105	105	10-12-13-8	11-3-10-6	7-3-3-13	10-12-8-10
N-acetyl-glyphosate	5	0,999	91	91	92	106	7-7-11-7	11-4-4-8	17-6-4-11	13-10-7-8
Glufosinate	5	0,999	54	48	87	103	17-19-16-10	12-10-8-9	7-10-8-12	15-22-10-12
MPPA	5	0,998	91	80	112	102	17-13-7-6	10-3-3-14	7-3-3-15	12-14-6-12
N-acetyl-glufosinate	5	0,996	90	104	96	100	12-13-13-4	12-13-13-4	9-9-6-13	15-11-9-8

<sup>a</sup>5,10,25,50 ng g<sup>-1</sup>

## 7.2 Parametri di validazione in IC-HRMS

Durante il processo di convalida utilizzando IC-HRMS, le curve di calibrazione, comprese le coordinate dei dati a 0, 5, 25, 50, 75 e 100 ng g<sup>-1</sup>, hanno dimostrato una buona linearità ( $R^2 > 0,99$ ) per tutte le sostanze in questione. Il metodo ha costantemente fornito risultati riproducibili tra i laboratori, con valori di  $RSD_f$  e  $RSD_R$  compresi rispettivamente nell'intervallo del 3% al 14% e dal 4% al 14%. Inoltre, sono stati ottenuti tassi di recupero favorevoli, variando dal 79% al 105%, ai livelli di concentrazione di 10 e 50 ng g<sup>-1</sup> per tutti gli analiti. Per quanto riguarda l'effetto matrice, tutti i composti rientrano nell'intervallo del 70-120% alla concentrazione di 10 e 50 ng g<sup>-1</sup>, l'unico caso eccezionale è stato l'AMPA a una concentrazione di 10 ng g<sup>-1</sup>, che ha mostrato un effetto matrice pronunciato pari al 61%. Questa diminuzione del segnale per l'AMPA, come anticipato nella Sezione 7.1, può essere attribuita alla presenza di interferenti co-eluenti appartenenti alla matrice. In questo caso, il metodo consente di stabilire i LOQ per tutti gli analiti a 5 ng g<sup>-1</sup> come indicato in tabella 7.

Tabella 7- Parametri di validazione in IC-HRMS

Analita	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	Linearità (R <sup>2</sup> )	Effetto matrice %		Recupero %		RSD <sub>r</sub> (CV) % (A 4 livelli <sup>a</sup> )			RSD <sub>R</sub> % (A 4 livelli <sup>a</sup> )
			10 ng g <sup>-1</sup>	50 ng g <sup>-1</sup>	10 ng g <sup>-1</sup>	50 ng g <sup>-1</sup>	Day 1	Day 2	Day 3	
Glyphosate	5	0,991	109	103	105	104	10-6-6-6	11-8-5-4	12-6-4-3	11-6-5-4
AMPA	5	0,991	61	83	79	104	9-13-11-6	11-8-6-6	11-7-7-6	10-9-8-6
N-acetyl-AMPA	5	0,991	94	98	99	102	9-8-5-8	7-9-7-6	5-8-7-4	6-8-7-6
N-acetyl-glyphosate	5	0,991	89	102	90	97	5-5-6-5	10-3-6-5	5-9-5-6	6-8-7-5
Glufosinate	5	0,993	77	81	81	98	12-7-9-8	13-5-8-4	14-11-5-7	14-8-8-7
MPPA	5	0,997	91	99	92	100	10-11-5-5	4-5-3-5	9-8-7-3	9-12-5-5
N-acetyl-glufosinate	5	0,991	81	94	91	103	4-10-6-4	7-10-8-5	5-10-5-6	6-10-6-6

<sup>a</sup>5,10,25,50 ng g<sup>-1</sup>

### 7.3 Applicazione del metodo a campioni reali di miele

Il metodo, ottimizzato e validato, è stato applicato per il monitoraggio dei 97 campioni di miele forniti da ICQRF. L'analisi di tutti i campioni è stata condotta simultaneamente in LC-MS/MS e in IC-HRMS. I risultati delle analisi condotte sulle due piattaforme strumentali hanno dimostrato un elevato grado di comparabilità. In particolare, sia nel monitoraggio IC-HRMS che in quello UHPL-MS/MS, il 12% dei campioni hanno mostrato la presenza di glifosato a livelli quantificabili (>LOQ), variabili da 7,06 a 118 ng g<sup>-1</sup>. In particolare, in un campione, la concentrazione di glifosato ha superato il LMR di 50 ng g<sup>-1</sup> di oltre il doppio. Inoltre, in altri 37 campioni sono state rilevate tracce di glifosato utilizzando entrambi gli approcci. Pertanto, nel 50% dei campioni il glifosato è stato rilevato a livelli quantificabili o in tracce. I dati completi sono forniti nella Tabella 8 e 9. Al contrario, il monitoraggio IC-HRMS e UHPLC-MS/MS non ha rivelato tracce di AMPA, N-acetil-AMPA, N-acetil-glifosato, Glu, MPPA e N-acetil-glufosinate.

**Tabella 8-** Numero e frequenza (%) dei campioni di miele contaminati da glifosato

	Campioni non quantificabili (LOD <x<LOQ)		Campioni quantificabili (X > LOQ)		Campioni > MRL	
	Numero	Frequenza (%)	Numero	Frequenza (%)	Numero	Frequenza (%)
<b>Glifosato</b>	37	38	12	12	1	1

**Tabella 9 -** Confronto della concentrazione di glifosato tramite LC-MS/MS e IC-HRMS

Concentrazione <sup>a</sup> di Gly		DS	Media	RDS (%)
LC-MS/MS	IC-HRMS			
117,79	111,38	±4,54	114,59	4
37,12	33,10	±2,84	35,11	8
29,82	31,40	±1,12	30,61	4
13,24	17,86	±3,27	15,55	21
11,56	12,80	±0,88	12,18	7
25,59	24,34	±0,88	24,96	4
28,00	30,25	±1,59	29,13	5
9,85	10,50	±0,46	10,18	4
10,10	8,44	±1,17	9,27	13
9,87	11,10	±0,87	10,48	8
8,57	7,06	±1,07	7,82	14
8,05	7,52	±0,37	7,78	5

<sup>a</sup> ng g<sup>-1</sup>, DS deviazione standard, RDS deviazione standard relativa

## 8. Discussione

### 8.1 Ottimizzazione della procedura di estrazione

Riconoscendo la presenza di un metodo sviluppato all'interno di un Laboratorio di Riferimento Europeo per l'analisi dei pesticidi polari negli alimenti, nelle prime fasi del progetto, è stato inizialmente impiegato il metodo di estrazione QuPPE (Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food, versione 12) sviluppato da Anastassiades et al., (2021). Tuttavia, si è notato che la procedura QuPPE non forniva indicazioni specifiche e dettagliate per la gestione di diverse tipologie di miele, in quanto il suo principale focus era sul processo di estrazione applicato a matrici vegetali. Durante l'implementazione della procedura di estrazione QuPPE, è emerso che determinati passaggi e additivi, necessari per le matrici vegetali, potrebbero non essere strettamente necessari quando applicati alle matrici miele. Di conseguenza, in seguito a uno studio della letteratura esistente sull'argomento, si è deciso di adottare il protocollo di Chiesa et al., 2019, che ha semplificato il processo, prevedendo meno passaggi e ridotto i tempi necessari per l'estrazione. La procedura di preparazione del campione sopra menzionata è stata originariamente sviluppata per la rilevazione di glifosato e dei suoi metaboliti negli alimenti di origine animale. Per adattare questo metodo a vari tipi di miele ed assicurare la sensibilità necessaria, in particolare per l'analisi UHPLC-MS/MS, sono state apportate essenziali modifiche.

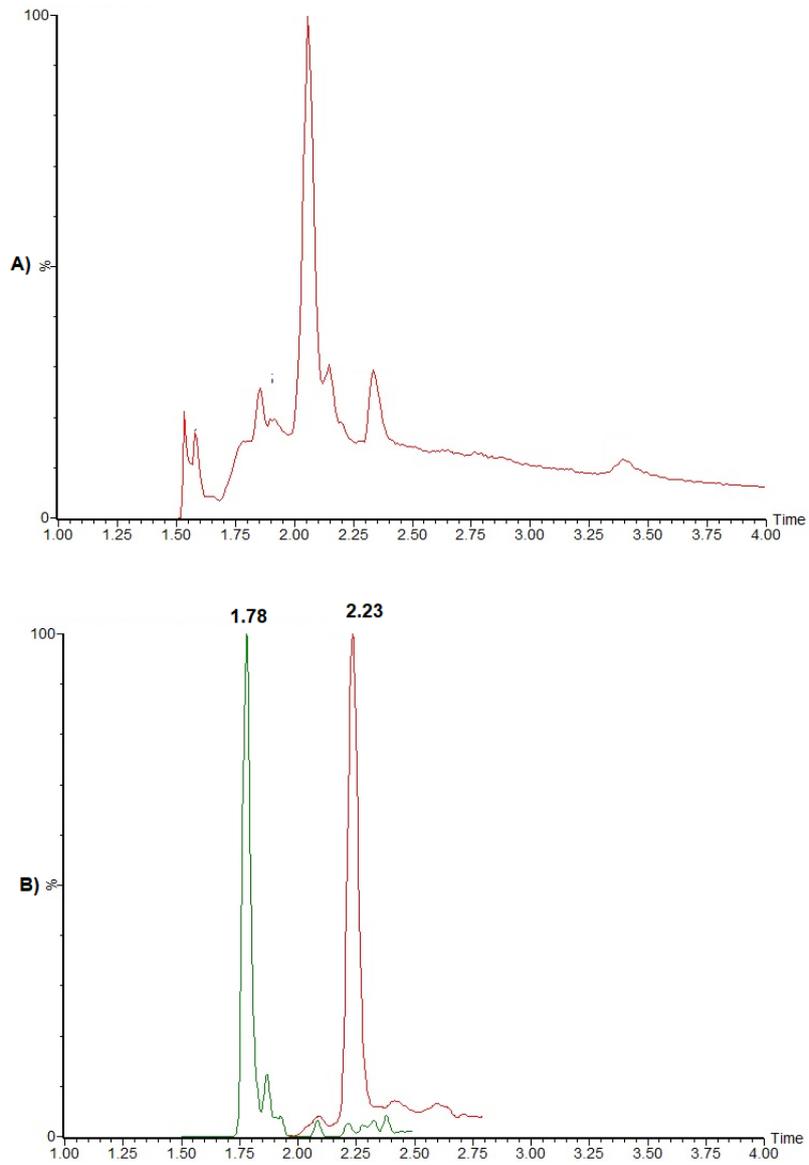
Diversamente da quanto previsto dal protocollo già pubblicato, si è deciso di aumentare la quantità iniziale di matrice, optando per 2 grammi come aliquota iniziale per l'estrazione. Tuttavia, nel caso dell'analisi IC-HRMS, gli estratti sono stati diluiti 1:1 con acqua prima dell'iniezione. L'uso dell'acqua, per sua natura polare, come solvente di estrazione implica la co-estrazione di una quantità sostanziale di componenti a loro volta polari della matrice, i quali possono co-eluire insieme agli analiti. Ciò aumenta la potenziale presenza di interferenti, influenzando sulla generazione di analiti ionizzati liberi all'interno della sorgente ESI, tale processo può tradursi in una riduzione dell'intensità del segnale degli analiti target. Inoltre, la abbondante presenza di questi co-estratti costituisce un rischio di contaminazione

del sistema strumentale (Jesús et al., 2023). Ciononostante, la maggior parte dei composti analizzati ha mostrato un effetto di matrice minimo, tranne per l'AMPA e, in misura minore, per il glufosinato.

Come dimostrato anche da Jesús et al., (2023), l'analisi del Total Ion Counting (TIC) di un estratto di miele iniettato in ESI - in modalità *Full Scan* (m/z 50-650) consente di condurre una valutazione del profilo della matrice. La Figura 14, infatti, illustra come la maggiore quantità di co-estratti vengono eluiti nell'intervallo di tempo che va da tra 1 e 2,5 minuti, causando dunque una forte soppressione ionica per gli analiti eluiti anch'essi in questo intervallo di tempo. Grazie a tale valutazione, può trovare spiegazione la scarsa sensibilità riscontrata nel determinare AMPA e Glufosinato, aventi rispettivamente un tempo di ritenzione di 1,78 min e 2,23 min, come mostrato nella Figura 13.

Un estratto di miele è principalmente composto da zuccheri e altri composti minori come proteine, sostanze azotate, acidi organici, minerali, polifenoli e vitamine idrosolubili. Tuttavia, la sua composizione può variare a seconda delle materie prime utilizzate nella sua produzione. Diversi studi condotti sull'argomento infatti, hanno indicato che l'effetto di matrice può essere influenzato dall'origine floreale del miele (Souza et al., 2016; Tomasini et al., 2012), evidenziando dunque la possibilità di variazioni sostanziali tra campioni individuali di miele.

**Figura 14-** A) TIC di un estratto di miele iniettato in modalità *Full Scan* ( $m/z$  50-650) in UPLC-MS/MS. B) Cromatogramma degli standard di AMPA (TR 1.78) e Glufosinato (TR 2.23) in UHPLC-MS/MS



## 8.2 Confronto delle prestazioni della validazione del metodo di IC-HRMS e UPLC-MS/MS per la rilevazione di pesticidi polari e metaboliti

Tra gli scopi di questa parte del lavoro, c'era condurre un confronto tra il processo di validazione e le prestazioni analitiche di due tecniche avanzate. L'obiettivo di questo confronto era identificare limiti, vantaggi e svantaggi nell'analisi di pesticidi polari e dei loro metaboliti attraverso la spettrometria di massa, utilizzando sia uno spettrometro di massa triplo quadrupolo che uno ad alta risoluzione. Le informazioni derivanti da tale disegno sperimentale possono essere preziose nel momento in cui ci si trova nella situazione di scegliere la piattaforma analitica più idonea in base allo scopo preposto, considerando sia gli aspetti sperimentali che scientifici, oltre che nel caso di controlli ufficiali.

Dall'analisi e dal confronto dei dati ottenuti attraverso gli esperimenti di validazione del metodo utilizzando entrambe le piattaforme strumentali, emerge una completa comparabilità nell'analisi dei pesticidi polari regolamentati a livello europeo. Di conseguenza, entrambe le piattaforme risultano adatte per controlli ufficiali.

Tuttavia, dai risultati del nostro studio emerge che la spettrometria di massa ad alta risoluzione potrebbe mostrare una sensibilità leggermente maggiore rispetto al triplo quadrupolo nella rilevazione di alcuni metaboliti polari dei pesticidi, specialmente l'AMPA, a concentrazioni estremamente basse. Tale capacità può essere attribuita alla superiore risoluzione di cui questa strumentazione è dotata e, di conseguenza, alla maggiore precisione nel determinare le masse molecolari. Questi vantaggi risultano significativi nel momento in cui ci si trova ad affrontare la complessità della matrice del miele e la necessità di identificare e misurare tracce minime di metaboliti. Ciò diventerebbe particolarmente rilevante se si decidesse di includere l'AMPA nella valutazione del livello massimo residuo del glifosato, considerando che l'AMPA è il suo principale metabolita attivo, come già avviene in altri Paesi come Australia e Nuova Zelanda, dove il LMR per la somma di glifosato, N-acetil-glyphosate e AMPA, è espresso come glifosato nel miele ed è di 200 ng g<sup>-1</sup> (Rampazzo et al., 2023). In aggiunta, investigare sui livelli di contaminazione da metaboliti potrebbe essere particolarmente interessante nel caso di studi di tossicità, considerando la co-presenza di vari pesticidi e dei loro metaboliti all'interno di una matrice. Negli ultimi

anni, infatti, questa circostanza viene sempre più considerata e assume importanza, tant'è che l'EFSA ha sviluppato un quadro armonizzato per valutare i potenziali "effetti combinati" di miscele di sostanze chimiche negli alimenti e nei mangimi (EFSA Scientific Committee et al., 2019).

Infine, l'uso dell'HRMS consente l'iniezione di quantità diluite di matrice e permette la valutazione di un processo di estrazione che coinvolge quantità iniziali di matrice più esigue. Infatti, l'aumento da 1 g a 2 g di matrice rispetto al protocollo di estrazione originale è stato influenzato dalla sfida di raggiungere livelli di sensibilità più elevate con il triplo quadrupolo. Introducendo quantità più piccole di matrice nell'apparecchiatura, si minimizza l'effetto della matrice causato dalla presenza di composti interferenti co-eluenti, riducendo a contempo il rischio di contaminazione. Tuttavia, nel caso dell'analisi del triplo quadrupolo, questo rischio può essere mitigato ugualmente, attraverso pratiche efficaci di manutenzione di routine, come il lavaggio e la pulizia del cono dopo ogni lotto di analisi e l'esecuzione di frequenti iniezioni di lavaggio per mantenere il sistema nelle condizioni ottimali. È importante però specificare, che i livelli di sensibilità raggiungibili, fortemente influenzati dall'effetto della matrice, possono variare a seconda del tipo di miele analizzato.

### 8.3 Applicazione del metodo a campioni reali di miele

Considerando i risultati ottenuti durante il monitoraggio dei 97 campioni di miele, la situazione riguardo al livello di contaminazione rimane rassicurante. I dati ottenuti sono in linea con quelli attualmente presenti nella letteratura sui livelli di contaminazione da glifosato nel miele. Tuttavia, un notevole problema identificato dallo studio della letteratura, riguarda l'assenza di metodi che comprendano l'analisi simultanea di vari pesticidi altamente polari e dei loro metaboliti. Di solito, la maggior parte degli studi si focalizza sull'analisi del glifosato, spesso includendo il suo metabolita AMPA (Jesús et al., 2023). Solo recentemente, negli ultimi studi pubblicati riguardanti l'analisi e il monitoraggio dei pesticidi polari nel miele e nei prodotti dell'alveare, si è iniziato a includere i loro profili metabolici completi nelle indagini (Butovskaya et al., 2023; Jesús et al., 2023).

Jesús et al. (2023) hanno identificato il glifosato in 16 campioni di miele (84%) con concentrazioni comprese tra 5 e 42 ng g<sup>-1</sup>, tutte al di sotto del LMR di 50 ng g<sup>-1</sup>. La

concentrazione più elevata,  $42 \text{ ng g}^{-1}$ , è stata osservata in un miele commerciale di eucalipto proveniente da Spagna e Uruguay, dove il anche AMPA è stato rilevato al di sotto del LOQ ( $5 \text{ ng g}^{-1}$ ). Mentre durante il monitoraggio triennale sulla presenza di glifosato e di altri pesticidi polari nel miele italiano, Butovskaya et al. (2023) hanno riportato la presenza di glifosato in 37 campioni (23,8%) proveniente dalla regione Lombardia, e in 25 campioni (37,9%) della regione Emilia-Romagna. Nel periodo del monitoraggio, il glifosato è stato rilevato due volte a concentrazioni superiori al LMR, specificamente a  $310$  e  $250 \text{ ng g}^{-1}$ , circa cinque volte il LMR. La contaminazione del miele da glifosato, dunque, può essere definita una realtà oggettiva e diffusa. In sintesi, quadro generale riguardo i livelli di contaminazione da glifosato nel miele varia da  $2,0 \text{ ng g}^{-1}$  a  $5.500 \text{ ng g}^{-1}$  (Bergero et al., 2021, Thompson et al., 2019, Zoller, et al., 2018), con concentrazioni notevoli osservate in Pakistan ( $3.500 \text{ ng g}^{-1}$ ) nello studio di Yaqub et al., (2020) e in Europa ( $5.500 \text{ ng g}^{-1}$ ) secondo quanto riportato da Karise et al., (2017). Pochi studi indagano contemporaneamente la presenza di concentrazioni di AMPA, raramente riscontrato in tale matrice, che vanno da  $5 \text{ ng g}^{-1}$  a  $100 \text{ ng g}^{-1}$  (Jesús et al., 2023; Rampazzo et al., 2023).

Mentre la contaminazione da glifosato nel miele è soggetta a monitoraggio e ricerca, lo studio circa i livelli di contaminazione da glufosinato è notevolmente più scarso. Prima degli articoli pubblicati solo recentemente da Jesus et al., (2023) e Butovskaya et al., (2023), il glufosinato compare solo nell'indagine condotta da Thompson et al. che ne ha rivelato la presenza nel 39% di 125 campioni di miele canadesi nel 2019, con livelli di contaminazione che vanno da  $1 \text{ ng g}^{-1}$  a  $33 \text{ ng g}^{-1}$ . La scarsità di dati sulla contaminazione da glufosinato può essere attribuita a fattori come il ridotto utilizzo rispetto a glifosato, la rapida degradazione nel terreno e la mancata rinnovazione della registrazione in Europa dal 2018.

## 9 Conclusioni

Durante questa fase di ricerca, sono state esaminate e approfondite le sfide analitiche legate alla rilevazione di glifosato, glufosinato e dei loro metaboliti nel miele, poiché lo studio, che ha visto la collaborazione tra DIMEVET, DIVAS e ICQRF, coinvolgeva sia il confronto delle procedure di validazione che il monitoraggio di 97 campioni di miele, utilizzando LC-MS/MS e IC-HRMS.

Tale confronto sperimentale ha cercato di valutare i vantaggi e gli svantaggi associati all'analisi di pesticidi polari e dei loro metaboliti attraverso la spettrometria di massa, impiegando approcci strumentali distinti. I risultati ottenuti forniscono preziosi spunti nella scelta oculata della tecnica più adatta, considerando scopi sperimentali, considerazioni scientifiche e l'adesione ai requisiti normativi. L'ottimizzazione della procedura di estrazione, tramite l'adozione di protocolli il più possibile idonei alle matrici del miele, ha evidenziato l'importanza dello studio e della comprensione del profilo della matrice e del suo potenziale effetto di soppressione ionica sugli analiti in esame. I nostri risultati indicano un alto grado di comparabilità tra le due piattaforme strumentali per l'analisi di pesticidi polari regolamentati a livello europeo e dei loro metaboliti, evidenziando la loro idoneità per i controlli ufficiali. Inoltre, il processo di ottimizzazione ha consentito la validazione di un metodo in grado di rilevare e quantificare livelli residuali estremamente bassi di analita, ben al di sotto dei livelli massimi residuali stabiliti, utilizzando entrambi gli approcci. Ciò assume notevole importanza nell'ambito di una valutazione accurata del rischio di esposizione del consumatore, garantendo l'allineamento al quadro armonizzato previsto dell'EFSA per valutare potenziali "effetti combinati" da miscele di sostanze chimiche negli alimenti e nei mangimi.

Da quanto emerso dal nostro studio, la spettrometria di massa ad alta risoluzione potrebbe dimostrare una sensibilità leggermente superiore rispetto al triplo quadrupolo nell'identificare l'AMPA a concentrazioni estremamente basse. Questo diventa particolarmente pertinente se si scegliesse di incorporare l'AMPA nella valutazione del livello massimo residuo di glifosato, come già avviene in Australia e Nuova Zelanda. Tuttavia, è bene specificare che i livelli di sensibilità raggiungibili possono variare in base

al tipo di miele. Durante il monitoraggio di campioni reali, sono stati osservati livelli quantificabili di glifosato nel 12% dei campioni, con un campione che superava il LMR di più del doppio. Pertanto, il glifosato è stato rilevato nel 50% dei campioni, mentre i metaboliti di glifosato e glufosinato non sono stati rilevati. I risultati ottenuti dallo studio si allineano alla letteratura esistente sulla contaminazione da glifosato nel miele, confermando la realtà oggettiva della sua presenza.

In conclusione, è evidente che il dibattito sulla sicurezza di glifosato persiste, rendendo necessaria una maggiore ricerca e il monitoraggio continuo. Il nostro studio fornisce preziose considerazioni su approcci analitici all'avanguardia, evidenziando l'importanza di considerare i metaboliti e impiegare tecniche analitiche che bilancino studio della matrice, sensibilità, selettività e praticità nella valutazione dei residui di pesticidi nel miele. Questi rappresentano un utile contributo al settore della sicurezza alimentare, concorrendo a garantire la protezione del consumatore e migliorando la sicurezza all'interno del settore apistico.

## *Ringraziamenti*

*“Le scelte di un giovane dipendono dalla sua inclinazione, ma anche dalla fortuna di incontrare un grande maestro” Rita Levi Montalcini*

*Al termine di questi tre lunghi, intensi, sorprendenti anni ci tengo fortemente ad esprimere la mia immensa gratitudine nei confronti della Prof.ssa Teresa Gazzotti e Prof. Giampiero Pagliuca per avermi dato l'opportunità di vivere questa esperienza, per avermi accolta nel loro laboratorio, non avermi mai fatta sentire fuori posto, per aver trovato sempre le parole giuste quando ce n'era bisogno, ed infine, per aver creduto in me prima e più di me. Siete stati Insegnanti, Mentori e anche un po' compagni in questo percorso. Qualsiasi direzione prenderanno le nostre strade, gli anni passati sotto la vostra guida rimarranno tra i più significativi della mia vita.*

*Al prof. Yelko Rodriguez-Carrasco, nonostante il tempo trascorso sotto la sua supervisione non sia stato molto, è stato comunque carico di insegnamenti. A Lei va un grande grazie per non aver mai dato nulla per scontato e non essersi mai tirato indietro dal sedersi accanto a me riuscendo a trasmettermi tutta la passione che mette nel suo lavoro.*

*Vorrei infine ringraziare tutte le persone conosciute durante questi tre anni di dottorato, insegnanti e colleghi, chi semplicemente di passaggio chi spero per tutta la vita, ognuno di voi ha contribuito, in piccola o in grande parte, alla mia crescita personale e professionale.*



## Bibliografia

Abarikwu, S.O., Akiri, O.F., Durojaiye, M.A. (2015). Combined effects of repeated administration of Bretmont Wipeout (glyphosate) and Ultrazin (atrazine) on testosterone, oxidative stress and sperm quality of Wistar rats. *Toxicol. Mech. Meth.* 25, 70–80.

Almasri, H., Tavares, D.A., Pioz, M., Senè, D., Tchamitchian, S., Cousin, M., Brunet, J.L., Belzunces, L.P. (2020). Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 203:111013.

Alqarni, A. S., Owayss, A.A., Mahmoud, A.A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society* 5, 618–625.

Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health*, 14(6), 632.

Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health*, 14(6), 632.

Al-Taher, F., Banaszewski, K., Jackson, L., Zweigenbaum, J., Ryu, D., & Cappozzo, J. (2013). Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(10), 2378-2384.

Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Battino, M. (2013). Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Current medicinal chemistry* 20, 621-638

Alvarez-Suarez, R., Vaz, B., Gronemeyer, H., de Lera, A.R. (2014). Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chem. Rev.* 114 (1), 1–125.

An, G., Park, J., Lim, W., & Song, G. (2022). Thiobencarb induces phenotypic abnormalities, apoptosis, and cardiovascular toxicity in zebrafish embryos through oxidative stress and inflammation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 261, 109440.

Anastassiades, M., Mack, D., Wildgrube, C., Barth, A., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D., & Cerchia, G. (2016). Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC- or IC-MS/MS Measurement I. *Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method)*.

- Andersen J.H., Bille, R.L., Granby, K. (2007). An intercomparison study of the determination of glyphosate, chlormequat and mepiquat residues in wheat. *Food Addit Contam Part A*. 24, 140–148.
- Andreotti, G., Koutros, S., Hofmann, J.N., Sandler, D. P., Lubin, J.H., Lynch, C.F., Lerro, C. C., De Roos, A.J., Parks, C.G., Alavanja, M.C., (2018). Glifosato and cancer incidence in the agricultural health study. *J. Natl. Cancer Inst.* 110, 509.
- Ashagrie Tafere, D. (2021). Chemical composition and uses of honey. A review. *J Food Nutr Res*; 4(3), 194-201.
- Balayiannis, G., & Balayiannis, P. (2008). Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 462-470.
- Balbuena, M.S., Tison, L., Hahn, M.L., Greggers, U., Menzel, R., Farina, W.M. (2015). Effects of sublethal doses of glifosato on honeybee navigation. *J. Exp. Biol.* 218 (17), 2799–2805.
- Ball, D.W., (2007). The chemical composition of honey. *J Chem Educ.*, 84(10), 1643–1646.
- Bargańska, Ż., Konieczka, P., & Namieśnik, J. (2018). Comparison of two methods for the determination of selected pesticides in honey and honeybee samples. *Molecules*, 23(10), 2582.
- Bargańska, Ż., Ślebioda, M., & Namieśnik, J. (2013). Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food control*, 31(1), 196-201.
- Barja, B., dos Santos Afonso, M. (2005). Aminomethylphosphonic acid and glifosato adsorption onto goethite: a comparative study. *Environ. Sci. Technol.* 39, 585-592.
- Barra, M.P.G., Ponce-Díaz, M.C., Venegas-Gallegos, C. (2010). Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble Province, Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70, 75–84.
- Bartsch, K., & Tebbe, C. C. (1989). Initial steps in the degradation of phosphinothricin (glufosinate) by soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), 711-716.
- Battaglin, W.A., Meyer, M.T., Kuivila, K.M., Dietze, J.E. (2014). Glifosato and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 50, 275–29.
- Battaglin, W.A., Rice, K.C., Focazio, M.J., Salmons, S., Barry, R.X. (2009). The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005–2006. *Environ. Monit. Assess.* 155, 281–307.

Bazeyad, A.Y., Al-Sarar, A.S., Rushdi, A. I., Hassanin, A.S., Abobakr, Y. (2019). Levels of heavy metals in a multifloral Saudi honey. *Environmental Science and Pollution Research International* 26(4), 3946–3953.

Ben Mukiibi, S., Nyanzi S.A., Kwetegyeka, J., Olisah, C., Taiwo, A.M., Mubiru, E., Tebandeke E., Matovu, H., Odongo, S., Abayi, J.J.M. et al. (2021). Organochlorine pesticide residues in Uganda's honey as a bioindicator of environmental contamination and reproductive health implications to consumers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 214:112094.

Benbrook, C.M. (2019). How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides? *Environ Sci Eur* 31, 2.

Berg, C.J., King, H.P.; Delenstarr, G., Kumar, R., Rubio, F., Glaze, T. (2018). Glifosato Residue Concentrations in Honey Attributed through Geospatial Analysis to Proximity of Large-Scale Agriculture and Transfer off-Site by Bees. *PLoS ONE*, 13:e0198876.

Bergero, M., Bosco, L., Giacomelli, A., Angelozzi, G., Perugini, M., Merola, C. (2021). Agrochemical Contamination of Honey and Bee Bread Collected in the Piedmont Region, Italy. *Environments* 8, 62.

Bertholf, L., 1925. The moults of the honeybee. *J. Econ. Entomol.* 18 (2), 380–384.

Bessaire, T., Mujahid, C., Mottier, P., & Desmarchelier, A. (2019). Multiple mycotoxins determination in food by LC-MS/MS: An international collaborative study. *Toxins*, 11(11), 658.

Beuerle, T., Blacquièrre, T., von der Ohe, W. (2011). Pyrrolizidin-Alkaloide. Was bedeutet dies für Bienen, Honig und Pollen? *ADIZ*, 45(10), 14–15.

Bhandari, G., Zomer, P., Atreya, K., Mol, H. G., Yang, X., & Geissen, V. (2019). Pesticide residues in Nepalese vegetables and potential health risks. *Environmental research*, 172, 511-521.

Biancardi, A., Aimo, C., Piazza, P., Lo Chiano, F., Rubini, S., Baldini, E., ... & Manfredini, S. (2022). Acetylcholinesterase (AChE) Reversible Inhibitors: The Role of Oxamyl in the Production of Poisoned Baits. *Toxics*, 10(8), 432.

Birch, H., Mikkelsen, P.S., Jenson, J.K., Lützhøft, H.C. (2011). Micropollutants in stormwater runoff and combined sewer overflow in the Copenhagen area, Denmark. *Water Sci. Technol.* 64, 485–493.

- Blot, N., Veillat, L., Rouze, R., Delatte, H. (2019). Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS One* 14 (4): e0215466.
- Bogdanov, S. (2009). Honey composition. *The honey book*, 27-36.
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (8), 5603–5614.
- Bolognesi, C., Carrasquilla, G., Volpi, S., Solomon, K.R., Marshall, E.J.P. (2009). Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J. Toxicol. Environ. Health A* 72, 986–997.
- Bonté, F., Desmoulière, A. (2013). Le miel : Origine et composition. *Actualités Pharmaceutiques*, 531, 18–21.
- Bosco, L., Bergero, M., Panella, F., Oldani, S., Concari, C. Dossier | 2017–2019 Environmental Bio-Monitoring with Bees. Disponibile on line: [https://www.lapisonline.it/wps/wp-content/uploads/2021/09/ENGL\\_dossier\\_02\\_2019\\_biomonitorag.pdf](https://www.lapisonline.it/wps/wp-content/uploads/2021/09/ENGL_dossier_02_2019_biomonitorag.pdf)
- Butovskaya, E., Gasparini, M., Angelone, B., Cancemi, G., Tranquillo, V., Prestini, G., Bosi, F., & Menotta, S. (2023). Occurrence of Glyphosate and Other Polar Pesticides in Honey from Lombardy and Emilia-Romagna Regions in Italy: Three-Year Monitoring Results. *Foods*, 12(24), 4448. <https://doi.org/10.3390/foods12244448>
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103, 601–606.
- Chang, F.C., Simcik, M.F., Capel, P. (2011). Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 548–555.
- Cherchi, A., Spanedda, L., Tuberoso, C., Cabra, P. (1994). Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. *Journal of Chromatography A*, 669, 59–64.
- Chiesa, L.M., Nobile, M., Panseri, S., Arioli, F. (2019). Detection of glyphosate and its metabolites in food of animal origin based on ion chromatography-high resolution mass spectrometry (IC-HRMS). *Food Addit Contam: part A*, 36(4), 592–600.
- Christina, K., Arne, D., Verena, K., Katharina, B., Michael, B., Otmar, Z., Gudrun, Beckh, Cord, L. (2014). Analysis of Swiss honeys for pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 75–83.

Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G. (2006). A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15 (5), 615–636.

Cochard, P., Laurie, M., Veyrand B., Le Bizec, B., Poirot, B., Marchand, P. (2021). PAH7 concentration reflects anthropization: A study using environmental biomonitoring with honeybees. *The Science of the Total Environment* 751:141831.

Commission Regulation (EU) 2020/1068 of 15 May 2020 Amending Annexes I and V to Regulation (EU) No 649/2012 of

Conrad, A., Schröter-Kermani, C., Hoppe, H.W., Rütther, M., Pieper, S., Kolossa-Gehring, M. (2017). Glifosatoin German adults—Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220, 8–16.

Coupe, R.H., Kalkhoff, S.K., Capel, P.D., Gregoire, C. (2011). Fate and transport of glifosatoand aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basin. *Pest Manag. Sci.* 68, 16–30.

Dai, P., Hu, P., Tang, J., Li, Y., Li, C. (2016). Effect of glifosatoon reproductive organs in male rat. *Acta Histochem.* 118, 519–526.

Dai, P., Yan, Z., Ma, S., Yang, Y., Wang, Q., Hou, C., Wu, Y., Liu, Y., Diao, Q. (2018). The herbicide glifosatonegatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. *J. Agric. Food Chem.* 66 (29), 7786–7793.

Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., and Seralini, G.E. (2018). Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicol. Rep.* 5, 156–163.

Deinzer, H.L., Thomson, P. A., Burgett, D.L. (1977). Pyrrolizidine alkaloids: their occurrence in honey from tansy ragwort. *Science*, 195, 497–499.

Delkash-Roudsari, S., Chicas-Mosier, A.M., Goldansaz, S.H., Talebi-Jahromi, K., Ashouri, A., Abramson, C.I. (2020). Assessment of lethal and sublethal effects of imidacloprid, ethion, and glifosatoon aversive conditioning, motility, and lifespan in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 204:111108.

Demir Kanbur, E., Yuksek, T., Atamov, V., Ozcelik, A.E. (2021). A comparison of the physicochemical properties of chestnut and highland honey: The case of Senoz Valley in the Rize province of Turkey. *Food Chemistry* 345:128864.

Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C.C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J.L., Farmer, D., Wright, D. (2010). Glyphosate: Discovery, development,

applications, and properties. In *GlifosatoResistance in Crops and Weeds* (VK Nandula, Ed.), pp. 1–33.

Divito, C. B., Davies, S., Masoudi, S., & Muhoro, C. N. (2007). Relative stability of formamidine and carbamate groups in the bifunctional pesticide formetanate hydrochloride. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5377-5382.

Do, T. H., Tran, S. C., Le, C. D., Nguyen, H. B. T., Le, P. T. T., Le, H. H. T., ... & Thai-Nguyen, H. T. (2020). Dietary exposure and health risk characterization of aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, and zearalenone in food from different provinces in Northern Vietnam. *Food Control*, 112, 107108.

Dong, T., Guan, Q., Hu, W., Zhang, M., Zhang, Y., Chen, M., ... & Xia, Y. (2020). Prenatal exposure to glufosinate ammonium disturbs gut microbiome and induces behavioral abnormalities in mice. *Journal of hazardous materials*, 389, 122152.

Donthi, D.N.R.; Kumar, A.D.D. *Glufosinate Ammonium An Overview*, Pesticide Action Network, India. 2022. Available online: [https://pan-india.org/wp-content/uploads/2022/12/Glufosinate-Ammonium-An-overview\\_PAN-India\\_Dec2022.pdf](https://pan-india.org/wp-content/uploads/2022/12/Glufosinate-Ammonium-An-overview_PAN-India_Dec2022.pdf)

dos Santos, M.C.S., Vareli, B., Janisch, I. R., Pizzutti, J., Fortes, C.K., Sautter Costabeber, I.H. (2021). Contamination of polychlorinated biphenyls in honey from the Brazilian state of Rio Grande do Sul. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 38 (3):452–63.

Eaton, D. L., Daroff, R. B., Atrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L. G., ... & Spencer, P. S. (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical reviews in toxicology*, 38(sup2), 1-125.

Edgar, J.A., Roeder, E., Molyneux, R.J. (2002). Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: a potential threat to health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2719–2730.

EFSA (2004). The EFSA's 1st scientific colloquium report—Dioxins. *EFSA journal* 1(1),124-169.

EFSA (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food. Scientific opinion of the Panel on Contaminations in the Food Chain. *EFSA Journal* 724, 100–114.

EFSA (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 13, 4302.

EFSA (2023a). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 21(7), 816.

EFSA (2023b). Risks for human health related to the presence of grayanotoxins in certain honeys. *EFSA Journal*, 7886.

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). (2017). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA Journal*, 15(9), Article 4718. 10.2903/j.efsa.2017.4718.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Schrenk, D., Bodin, L., Chipman, J. K., del Mazo, J., Grasl - Kraupp, B., ... & Bignami, M. (2020). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA journal*, 18(5), e06113.

EFSA Scientific Committee, More, S. J., Bampidis, V., Benford, D., Bennekou, S. H., Bragard, C., Halldorsson, T. I., Hernández-Jerez, A. F., Koutsoumanis, K., Naegeli, H., Schlatter, J. R., Silano, V., Nielsen, S. S., Schrenk, D., Turck, D., Younes, M., Benfenati, E., Castle, L., Cedergreen, N., ... Hogstrand, C. (2019). Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA Journal*, 17(3).

EFSA, 2006. Conclusione relativa alla revisione tra pari della valutazione del rischio antiparassitario della sostanza attiva formetanato. Il giornale dell'EFSA, [Internet]. [citato 10 ottobre 2016] 4(6):RN-69, 1-78

El Agrebi, N., Tosi, S., Wilmart, O., Scippo, M.-L., de Graaf, D. C., & Saegerman, C. (2020). Honeybee and consumer's exposure and risk characterisation to glyphosate-based herbicide (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. *Science of The Total Environment*, 704, 135312.

El-Sayed, R. A., Jebur, A. B., Kang, W., & El-Demerdash, F. M. (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: Characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2(2), 91-102.

Emily Guo, F.R. Survey of Glyphosate Residues in Honey, Corn and Soy Products. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 2014, 5, 1-8.

Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Seijo, M.C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84-90.

Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., Seijo, M.C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138, 851–856.

Espina-Prez, D., Ordetx-Ros, G.S. (1983). *Flora Apícola Tropical Costa Rica*. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Costa Rica, 406.

European Commission (2002). Council Directive 2001/110/CE concerning honey. *Official Journal of European Communities* 10, 47-52.

European Food Safety Authority (EFSA) (2005.). Conclusion Regarding the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Glufosinate. *EFSA J.* 27, 1–81.

European Food Safety Authority (EFSA). Advancing Environmental Risk Assessment for Bees and Other Insect Pollinators. Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/events/advancing-environmental-risk-assessment-bees-and-other-insectpollinators>

European Food Safety Authority, Alvarez, F., Arena, M., Auteri, D., Binaglia, M., Federica Castoldi, A., ... & Villamar-Bouza, L. (2022). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance oxamyl. *EFSA Journal*, 20(5), e07296.

European Food Safety Authority. (2014). Scientific support for preparing an EU position in the 46th Session of the Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR). *EFSA Journal*, 12(7), 3737.

Flores-Flores, M. E., & González-Peñas, E. (2017). An LC–MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. *Food chemistry*, 218, 378-385.

Food Safety News. (2021). WHO wants data on heavy metals in food. Online: <https://www.foodsafetynews.com/2021/07/who-wants-data-on-heavy-metals-in-food/>. Last access: 11/01/24

Forlani, G., Obojska, A., Berlicki, Ł., & Kafarski, P. (2006). Phosphinothricin analogues as inhibitors of plant glutamine synthetases. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3), 796-802.

Frasnelli, E., Haase, A., Rigosi, E., Anfora, G., Rogers, L.J., Vallortigara, G. (2014). The bee as a model to investigate brain and behavioural asymmetries. *Insects* 5 (1), 120–138.

Gao, H., Chen, J., Ding, F., Chou, X., Zhang, X., Wan, Y., Hu, J., Wu, Q. (2019). Activation of the N-methyl-d-aspartate receptor is involved in glyphosate-induced renal proximal tubule cell apoptosis. *J. Appl. Toxicol.* 39, 1096-1107.

- Garry, V.F., Harkins, M.E., Erickson, L.L., Long-Simpson L.K., Holland, S.E., Burroughs, B.L. (2002). Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environ Health Perspect* 110, 441–449.
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C., Seralini, G.E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262, 184–191.
- Gaweł, M., Kiljanek T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Goliszek, M. Burek, O., Posyniak, A. (2019). Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 282, 36–47.
- Geiger, D.R., Shieh, W.J., Fuchs, M.A. (1999). Causes of self-limited translocation of glifosatoin *Beta vulgaris* plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 64, 124–133.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 35–120.
- Gimsing, A., Borggaard, O., Bang, M. (2004). Influence of soil composition on adsorption of glifosatoand phosphate by contrasting Danish surface soils. *Eur. J. Soil Sci.* 55, 183–191.
- Girolamo, F.D., D'amato, A., Righetti, P.G. (2012). Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *Journal of Proteomics*, 75, 3688–3693.
- Gómez-Ramos, M.M., Ucles, S., Ferrer, C., Fernández-Alba, A.R., Hernando, M.D. (2019). Exploration of environmental contaminants in honeybees using GC-TOF-MS and GC-Orbitrap-MS. *Science of the Total Environment* 647, 232–244.
- Goñalons, C.M., Farina, W.M. (2018). Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *J. Exp. Biol.* 221 (7).
- González-Jartín, J. M., Alfonso, A., Rodríguez, I., Sainz, M. J., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2019). A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. *Food chemistry*, 275, 703-710.
- Grandcoin, A., Piel, S., Baurès, E. (2017). AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: its sources, behavior and environmental fate. *Water Res.* 117, 187–197.
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D. (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.* 58 (8), 1042–1049.

Guidance SANTE 11312/2021 – Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed Available online <https://www.accredia.it/documento/guidance-sante-11312-2021-analytical-quality-control-and-method-validation-procedures-for-pesticide-residues-analysis-in-food-and-feed/> Last access: 11/01/24

Gulati, R., Kumari, B., & Sharma, S. K. (2004). Field residual toxicity of some insecticides to honeybee (*Apis mellifera* L.) and residues of common insecticides from apiary honey. *Journal of Apiculture*, 19(1), 51-56.

Gunduz, A., Turedi, S., Russell, R.M., Ayaz, F. (2008). Clinical review of grayanotoxin mad honey poisoning past and present. *Clinical Toxicology (Philadelphia)*, 46, 437–442.

Günes, M.E., Sari, M.F., Esen, F. (2021). Organochlorine pesticides in honeybee, pollen and honey in Bursa, Turkey. *Food Contaminants: Part B Surveillance* 14 (2):126–32.

Hanke, I., Wittmer, I., Bischofberger, S., Stamm, S., Singer, H. (2010). Relevance of urban glifosatoouse for surface water quality. *Chemosphere* 81, 422–429.

Hao, Y., Zhang, Y., Ni, H., Gao, J., Yang, Y., Xu, W., Tao, L. (2019). Evaluation of the cytotoxic effects of glifosatoherbicides in human liver, lung, and nerve. *J. Environ. Sci. Health B* 54, 737–744.

Hazrat, A., Ezzat, K. (2018). What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’— Proposal of a comprehensive definition. *Toxicological and Environmental Chemistry* 100 (1), 6–19.

Heap, I. (2022). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online: [weedsience.com/Home.aspx](http://weedsience.com/Home.aspx). Last access 11/01/24

Helander, M., Saloniem, I., Saikkonen, K. (2012). Glifosatoin northern ecosystems. *Trends in Plant Science* 17 (10).

Helmer, S.H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M. (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glifosatoon lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (11), 8010–8021.

Henderson, A.M., Gervais, J.A., Luukinen, B., Buhl, K., Stone, D., Jenkins, J. (2010). GlifosatoGeneral Fact Sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services.

Herbert, L.T., Vazquez, D.E., Arenas, A., Farina, W.M. (2014). Effects of field-realistic doses of glifosatoon honeybee appetitive behaviour. *J. Exp. Biol.* 217 (19), 3457–3464.

Hermosín, I., Chicón, R. M., Cabezudo, M. D. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83, 263–268.

Hertz-Picciotto, I., Charles M. J., James, R. A., Keller, J. A., Willman, E., Teplin, S. (2005). In utero polychlorinated biphenyl exposures in relation to fetal and early childhood growth. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 16 (5), 648–656.

Heydari, M., Khatibi, A., & Zarrabi, M. (2022). The Effect of Formetanate Hydrochloride on the Glycated Human Hemoglobin. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 41(5), 1804-1811.

Hites, R. A. (2021). The rise and fall of chlorpyrifos in the United States. *Environmental science & technology*, 55(3), 1354-1358.

Hoerlein, G. (1994). Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 138, 73-146.

Howes, F. N. (1949). Sources of poisonous honey. *Kew Bulletin*, 4(2), 167–171.

Huertas-Pérez, J. F., Arroyo-Manzanares, N., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2017). Solid phase extraction as sample treatment for the determination of Ochratoxin A in foods: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(16), 3405-3420.

IARC (2010). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Volume 92.

IARC (2016). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human: Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. Volume 107.

IARC (2021). Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans, list of classification, agents classified by the IARC monographs, volumes 1–129.

Iglesias, M. T., Martián-Alvarez, P.J., Polo, M.C., Lorenzo, C., Gonzalez, M., Pueyo, E.N. (2006). Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9099–9104.

Iqbal, S. Z. (2021). Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. *Current Opinion in Food Science*, 42, 237-247.

IUPAC Pesticides Properties DataBase. Available online: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm> Last access 11/01/24

Iwegbue, C.M.A., Tesi, G.O., Obi, G., Obi-Iyeke G.E., Igbuku, U.A., Martincigh, B.S. (2016). Concentrations, health risks and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in Nigerian honey. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 8 (1), 28–42.

James O.O., Mesubi, M.A., Usman, L.A., Yeye, S.O., Ajanaku, K.O., Ogunniran, K.O., Ajani, O.O., Siyanbola, T.O. (2009). Physical characterization of some honey samples from North-central Nigeria. *International Journal of Physical Sciences* 4 (9), 464-470.

Janik, E., Niemcewicz, M., Ceremuga, M., Stela, M., Saluk-Bijak, J., Siadkowski, A., & Bijak, M. (2020). Molecular aspects of mycotoxins-a serious problem for human health. *International journal of molecular sciences*, 21(21), Article 8187. 10.3390/ijms21218187.

Janik, E., Niemcewicz, M., Podogrocki, M., Ceremuga, M., Gorniak, L., Stela, M., & Bijak, M. (2021). The existing methods and novel approaches in mycotoxins' detection. *Molecules*, 26(13), 3981.

Jansons, M.; Pugajeva, I.; Bartkevics, V.; Karkee, H.B. (2021). LC-MS/MS Characterisation and Determination of Dansyl Chloride Derivatised Glyphosate, Aminomethylphosphonic Acid (AMPA), and Glufosinato in Foods of Plant and Animal Origin. *J. Chromatogr. B*, 1177:122779.

Jesús, F., García, A.R., Stecconi, T., Cutillas, V., Fernández-Alba, A.R. (2023). Determination of highly polar anionic pesticides in beehive products by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem. Online*:

John, E. M., & Shaik, J. M. (2015). Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 13, 269-291.

John, J., Liu, H. (2018). Glifosato Monitoring in Water, Foods, and Urine Reveals an Association between Urinary Glifosato and Tea Drinking: A Pilot Study. *Int. J. Environ. Health Eng.* 7, 1-5.

Johnson, R.M. (2015) Honeybee Toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 7 (60), 415-434.

Jovetić, M.S., Redžepović A.S., Nedić N.M., Vojt, D., Đurđić, S.Z, Brčeski, I.D., Milojković-Opsenica, D.M. (2018). Urban honey. The aspects of its safety. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 69 (3), 264–274.

Kamel, F., Tanner, C., Umbach, D., Hoppin, J., Alavanja, M., Blair, A., Comyns, K., Goldman, S., Korell, M., Langston, J. (2007). Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. *Am. J. Epidemiol.* 165, 364–374.

- Kanungo, D., Moretto, A., & Sacco, A. F. (2021). Pesticide residues in food—2019, 239.
- Karabagias, I.K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., Kontominas, M.G. (2014). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry* 146, 548–557.
- Kargar, N., Matin, G., Matin, A.A., Buyukisik, H.B. (2017). Biomonitoring, status and source risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using honeybees, pine tree leaves, and propolis. *Chemosphere* 186, 140–50.
- Karise, R., Raimets, R., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Pihlik, P., Keres, I., Williams, I. H., Viinalass, H., & Mänd, M. (2017). Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments? *Chemosphere*, 188, 389–396.
- Kaskoniene, V., Venskutonis, P.R., Ceksteryte, V. (2008). Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania. *Food Chemistry*, 111, 988–997.
- Kastrati, G., Paçarizi, M., Sopaj, F., Tašev, K., Stafilov, T., Mustafa, K. (2021). Investigation of concentration and distribution of elements in three environmental compartments in the region of Mitrovica, Kosovo: Soil, honey and bee pollen. *International Journal of Environmental Research and Public Health*; 18 (5), 2269.
- Kazazic, M., Djapo-Lavic, M., Mehic, E., Jesenkovic-Habul, L. (2020). Monitoring of honey contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons in Herzegovina region. *Chemistry and Ecology* 36 (8),726–732.
- Keckes, J., Trifkovic, J., Andric, F., Jovetic, M., Tesic, Z., Milojkovic-Opsenica, D. (2013). Amino acids profile of Serbian unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3368–3376.
- Keskin, E., & Eyupoglu, O. E. (2023). Determination of mycotoxins by HPLC, LC-MS/MS and health risk assessment of the mycotoxins in bee products of Turkey. *Food Chemistry*, 400, 134086.
- Kharayat, B. S., & Singh, Y. (2018). Mycotoxins in foods: mycotoxicoses, detection, and management. In *Microbial contamination and food degradation* (pp. 395-421). Academic Press.
- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Gawęł, M., Semeniuk, S., Borzęcka, M., Posyński, A., & Pohorecka, K. (2017). Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees—Preliminary exposure assessment. *Chemosphere*, 175, 36-44.

- Kiljanek, T., Niewiadowska, A., Semeniuk, S., Gawel, M., Borzęcka, M., & Posyniak, A. (2016). Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry — Honeybee poisoning incidents. *Journal of chromatography A*, 1435, 100-114.
- Koca, I., Koca, A. F. (2007). Poisoning by mad honey: a brief review. *Food and Chemical Toxicology*, 45(8), 1315–1318.
- Kocsis, M.; Bodó, A.; Kőszegi, T.; Csepregi, R.; Filep, R.; Hoffmann, G.; Farkas, A. (2022). Quality Assessment of Goldenrod, Milkweed and Multifloral Honey based on Botanical Origin, Antioxidant Capacity and Mineral Content. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 769.
- Kristoffersen, P., Rask, A.M., Grundy, A.C., Franzen, I., Kempenaar, C., Raisio, J., Schroeder, H., Spijker, J., Verschwele, A., Zarina, L. (2008). A review of pesticide policies and regulations for urban amenity areas in seven European countries. *Weed Res.* 48, 201–214.
- Kwiatkowska, M., Reszka, E., Wozniak, K., Jabłonska, E., Michałowicz, J., Bukowska, B. (2017). DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem. Toxicol.* 105, 93–98.
- Kwong, W.K., Engel, P., Koch, H., Moran, N.A. (2014). Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (31), 11509–11514.
- Kwong, W.K., Moran, N.A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (6), 374–384.
- Lacroix, R., Kurrasch, D.M. (2023). Glyphosate toxicity: in vivo, in vitro, and epidemiological evidence. *Toxicological Sciences* 192(2), 131–140.
- Laitinen, P., Rämö, S., Nikunen, U., Jauhiainen, L., Siimes, K., Turtola, E. (2009). Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. *Plant Soil* 323, 267–283.
- Laitinen, P., Siimes, K., Eronen, L., Rämö, S., Welling, L., Oinonen, S., ... & Ruohonen-Lehto, M. (2006). Fate of the herbicides glyphosate, glufosinate-ammonium, phenmedipham, ethofumesate and metamitron in two Finnish arable soils. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(6), 473-491.
- Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., L'Hostis, M., Wiest, L., ... & Pouliquen, H. (2013). Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of Western France. *PloS one*, 8(6), e67007.
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., Virkel, G. (2014). Effects of sublethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of

reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys, and small intestine. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 811–818.

Lawag, I.L., Islam, M.K., Sostaric, T., Lim, L.Y., Hammer, K., Locher, C. (2023). Antioxidant Activity and Phenolic Compound Identification and Quantification in Western Australian Honeys. *Antioxidants* 12, 189.

León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A.V., Andrés, M.P.S. (2013). Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods*, 6, 488–496.

Li, W.C., Tse, H.F. (2015). Health risk and significance of mercury in the environment. *Environmental Science and Pollution. Research International* 22 (1), 192–201.

Love, J.L. (1990). Toxic honey: a New Zealand story. *Analytical Proceedings*, 27, 8789.

Luo, Q.H., Gao, J., Guo, Y., Liu, C., Ma, Y.Z., Zhou, Z.Y., Dai, P.L., Hou, C.S., Wu, Y.Y., Diao, Q.Y. (2021). Effects of a commercially formulated glifosatosolutions at recommended concentrations on honeybee (*Apis mellifera* L.) behaviours. *Sci. Rep.* 11 (1), 1–8.

Ma, G. Y., Dong, J. W., Li, Z. G., Zhong, W. J., Xiao, P., & Yao, X. M. (2007). Experimental pathologic observation on carcinogenicity of pesticide triazophos in rats. *Journal of Environmental and Occupational Medicine*, 24(6), 592-595.

Macri, I.N., Vazquez, D.E., Pagano, E.A., Zavala, J.A., Farina, W.M. (2021). Evaluating the impact of post-emergence weed control in honeybee colonies located in different agricultural surroundings. *Insects* 12 (2), 163.

Magan, N., & Olsen, M. (Eds.). (2004). *Mycotoxins in food: detection and control*. Woodhead Publishing.

Mahato, D. K., Pandhi, S., Kamle, M., Gupta, A., Sharma, B., Panda, B. K., ... & Kumar, P. (2022). Trichothecenes in food and feed: Occurrence, impact on human health and their detection and management strategies. *Toxicon*, 208, 62-77.

Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Burley, T.E., Loftin, K.A. (2017). Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glifosatoand atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season. *Science of the Total Environment* 579, 149–158.

Mallat, E., Barcelo, D. (1998). Analysis and degradation study of glifosatoand of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography–post-column derivatization with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823, 129–136.

Mandal, M.D., Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed* 1(2), 154-160.

- Maqueda, C., Undabeytia, T., Villaverde, J., Morillo, E. (2017). Behaviour of glifosato in a reservoir and the surrounding agricultural soils. *Sci. Total Environ.* (593-594), 787–795.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and chemical toxicology*, 60, 218-237.
- Martinello, M., Manzinello, C., Dainese, N., Giuliato, I., Gallina, A., Mutinelli, F. (2021). The honey bee: An active biosampler of environmental pollution and a possible warning biomarker for human health. *Applied Sciences* 11 (14), 6481.
- Mato, I.S., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J.S., Sancho, M.T. (2006). Rapid determination of nonaromatic organic acids in honey by capillary zone electrophoresis with direct ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1541–1550.
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J.C., Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: a step toward standardized procedures. *J. Neurosci. Methods* 211 (1), 159–167.
- Matuszewska, E., Klupczynska, A., Maciołek, K., Kokot, Z.J., Matysiak J. (2021). Multielemental Analysis of bee pollen, propolis, and royal jelly collected in West-Central Poland. *Molecules*; 26 (9), 2415.
- Mayor, A. (1995). Bees and the baneful Rhododendron: Mad honey! *Archaeology*, 48(6), 32–40.
- McAlpine, A. (2002). *Adventures of a collector*. Crows Nest, NSW: Allen & Unwin.
- Meng, L., Song B., Zhong H., Ma X., Wang Y., Ma D., Lu Y, Gao W., Wang Y., Jiang G. (2021). Legacy and emerging per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in the Bohai Sea and its inflow rivers. *Environment International* 156:106735.
- Mensah, P.K., Palmer, C.G., Odume, O.N. (2015). Ecotoxicology of glifosato and glyphosate-based herbicides – toxicity to wildlife and humans. *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*. 281–304.
- Menzel, J., Abraham, K., Dietrich, S., Fromme, H., Völkel, W., Schwerdtle, T., Weikert, C. (2021). Internal exposure to perfluoroalkyl substances (PFAS) in vegans and omnivores. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 237:113808.
- Menzel, R., Fuchs, J., Kirbach, A., Lehmann, K., Greggers, U. (2012). Navigation and communication in honey bees. *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Springer, 103–116.

Menzel, R., Greggers, U., Smith, A., Berger, S., Brandt, R., Brunke, S., Bundrock, G., Hülse, S., Plümpe, T., Schaupp, F. (2005). Honey bees navigate according to a map like spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (8), 3040–3045.

Mercurio, P., Flores, F., Mueller, J.F., Carter, S., Negri, A.P. (2014). Glifosato persistence in seawater. *Mar. Pollut. Bull.* 85, 385–390.

Mesnage, R., Arno, M., Costanzo, M., Malatesta, M., Seralini, G.E., Antoniou, M.N. (2015). Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. *Environ. Health* 14, 70–84.

Mesnage, R., Bernay, B., Seralini, G.E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313 (2–3), 122–128.

Mesnage, R., Phedonos, A., Biserni, M., Arno, M., Balu, S., Corton, J. C., Ugarte, R., and Antoniou, M.N. (2017). Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food Chem. Toxicol.* 108, 30–42.

Mesnage, R., Renney, G., Seralini, G.E., Ward, M., Antoniou, M.N. (2016). Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. *Sci Rep* 7, 39328.

Michelette, F., Soares, A. (1993). Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 24 (4), 431–440.

Miklós, G., Angeli, C., Ambrus, Á., Nagy, A., Kardos, V., Zentai, A., ... & Bartók, T. (2020). Detection of aflatoxins in different matrices and food-chain positions. *Frontiers in microbiology*, 11, 1916.

Mills, P. J., Kania-Korwel, I., Fagan, J., McEvoy, L.K., Laughlin, G.A., Barrett-Connor, E. (2017). Excretion of the herbicide glifosato in older adults between 1993 and 2016. *JAMA* 318, 1610–1611.

Mink, P.J., Mandel, J.S., Scurman, B.K., and Lundin, J.I. (2012). Epidemiologic studies of glifosato and cancer: A review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63, 440–452.

Mizrahi, A., Lensky, Y. (1997). Bee products – properties, application and apitherapy. London: Kluwer Academic, 269.

Moldoveanu, S., & David, V. (2015). Chapter 9—The Role of Derivatization in Chromatography. *Modern Sample Preparation for Chromatography*; Moldoveanu, S., David, V., Eds, 307-331.

Monroy, C.M., Cortes, A.C., Sicard, D.M., de Restrepo, H.G. (2005). Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate. *Biomed. Rev. Inst. Nac Salud* 25, 335–345.

Monsanto, (2014). *Backgrounder Glifosatoand Water Quality*.

Moretti, A., Pascale, M., & Logrieco, A. F. (2019). Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends in food science & technology*, 84, 38-40.

Mörrtl, M., Németh, G., Juracsek, J., Darvas, B., Kamp, L., Rubio, F., Székács, A. (2013). Determination of glifosatoresidues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchem. J.* 107, 143–151.

Moschet, C., Wittmer, I., Simovic, J., Junghans, M., Piazzoli, A., Singer, H., ... & Hollender, J. (2014). How a complete pesticide screening changes the assessment of surface water quality. *Environmental Science & Technology*, 48(10), 5423-5432.

Motta, E.V., Moran, N.A. (2020). Impact of glifosatoon the honey bee gut microbiota: effects of intensity, duration, and timing of exposure. *Msystems* 5 (4).

Motta, E.V., Raymann, K., Moran, N.A. (2018). Glifosato perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115 (41), 10305–10310.

Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., VanEngelsdorp, D., & Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS one*, 5(3), e9754.

Musarurwa, H., Chimuka, L., & Tavengwa, N. T. (2020). Z-sep+ based QuEChERS technique for the pre-concentration of malathion pesticide in fruits followed by analysis using UV-Vis spectroscopy. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(12), 2093-2108.

Nardi, J., Bonamigo Moras, P., Koeppe, C., Dallegrove, E., Bainy Leal, M., Grazziotin RossatoGrando, L. (2017). Prepubertal subchronic exposure to soy milk and glifosato leads to endocrine disruption. *Food Chem. Toxicol.* 100, 247–252.

Nazmul, I., Khalila, I., Islamb, A., Ganb, S. H. (2014). Toxic compounds in honey. *Journal of Applied Toxicology*, 34(7), 733–742.

New Zealand Food Safety Authority (2010). *Compliance Guide to the Food (Tutin in Honey) Standard 2010*.

New Zealand National Chemical Residues Programme Report (2021). *Results for Agricultural Compound Residues in Honey*. Online:

<https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/44002-Results-for-1-July-2019-30-June-2020> Last access 11/01/24

Nigra, A.E., Olmedo P., Grau-Perez, M., O'Leary, R., O'Leary M., Fretts A.M., Umans J.G., Best, L.G., Francesconi K.A., Goessler, W. (2019). Dietary determinants of inorganic arsenic exposure in the strong heart family study. *Environmental Research* 177:108616.

Nowak, A., Nowak, I. (2021). Review of harmful chemical pollutants of environmental origin in honey and bee products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 63(21), 5094-5116.

Nozal, M.J., Bernal, J.L., Gómez, L.A., Higes, M., Meana, A. (2003). Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomic structures of bees. *Apidologie*, 34, 181–188.

Oddo-Persano, L., Piro, R. (2004). Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie* 35, 38–81.

Odemer, R., Rosenkranz, P. (2020). Chronic exposure to a neonicotinoid pesticide and a synthetic pyrethroid in full-sized honey bee colonies. *J. Apic. Res.* 59(1), 2–11.

Ojelade, B.S., Durowoju, O.S., Adesoye, P.O., Gibb., S.W., Ekosse, G.I. (2022). Review of Glyphosate-Based Herbicide and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA): Environmental and Health Impacts. *Appl. Sci.* 12, 8789.

Okada, E., Luis Costa, J., Bedmar, F. (2016). Adsorption and mobility of glifosatoin different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263, 78–85.

Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (2010) L'OMS ha raccomandato la classificazione dei pesticidi in base al pericolo e le linee guida per la classificazione del 2009. OMS, 21–23

Ortiz, A.M.G., Okada, E., Bedmar, F., Costa, J.L. (2017). Sorption and desorption of glifosatoin Mollisols and Ultisols soils of Argentina. *Environ. Toxicol. Chem* 36, 2587-2592.

Osman, K. A., Al-Rehiyani, S. M., Al-Deghairi, M. A., & Salama, A. K. (2009). Bioremediation of oxamyl in sandy soil using animal manures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(3), 341-346.

Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, 33, 65-73.

Padilla, J.T., Selim, H.M. (2019). Interactions among glifosatoand phosphate inn soils: laboratory retention and transport studies. *J. Environ. Qual.* 48, 156-163.

- Palmer-Jones, T. (1965). Poisonous honey overseas and in New Zealand. *New Zealand Medical Journal*, 64, 631–637.
- Panseri, S., Catalano, A., Giorgi, A., Arioli, F., Procopio, A., Britti, D., Chiesa, L.M., 2014. Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. *FoodControl* 38,150 e156
- Panzacchi, S., Mandrioli, D., Manservigi, F., Bua, L., Falcioni, L., Spinaci, M., Galeati, G., Dinelli, G., Miglio, R., Mantovani, A. (2018). The Ramazzini Institute 13-week study on glyphosatebased herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: Study design and first in-life endpoints evaluation. *Environ. Health* 17, 52.
- Pareja, L., Colazzo, M., Pérez-Parada, A., Niell, S., Carrasco-Letelier, L., Besil, N., ... & Heinzen, H. (2011). Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International journal of environmental research and public health*, 8(10), 3844-3858.
- Park, S., Kim, D. E., Park, S. Y., Gil, H. W., & Hong, S. Y. (2018). Seizures in patients with acute pesticide intoxication, with a focus on glufosinate ammonium. *Human & Experimental Toxicology*, 37(4), 331-337.
- Pascale, M., De Girolamo, A., Lippolis, V., Stroka, J., Mol, H. G., & Lattanzio, V. M. (2019). Performance evaluation of LC-MS methods for multimycotoxin determination. *Journal of AOAC International*, 102(6), 1708-1720.
- Paz-y-Miño, C., Muñoz, M. J., Maldonado, A., Valladares, C., Cumbal, N., Herrera, C., Robles, P., Sanchez, M.E., Lopez-Cortes, A. (2011). Baseline determination in social, health, and genetic areas in communities affected by glifosatoaerial spraying on the northeastern Ecuadorian border. *Rev. Environ. Health*. 26, 45–51.
- Paz-y-Miño, C., Sanchez, M.E., Arevalo, M., Muñoz, M.J., Witte, T., De-la-Carrera, G.O., Leone, P.E. (2007). Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genet. Mol. Biol.* 30, 456–460.
- Peillex, C., Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glifosatoand glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of immunotoxicology* 17(1), 163–174.
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 96-136.

- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2015). Comparative assessment of three cleanup procedures after QuEChERS extraction for determination of trichothecenes (type A and type B) in processed cereal-based baby foods by GC–MS. *Food chemistry*, 182, 143-149.
- Petrović, J., Kartalović, B., Ratajac, R., Spirić, D., Djurdjević, B., Polaček, V., Pucarević, M., (2019). PAHs in different honeys from Serbia. *Food Additives & Contaminants: Part B* 12 (2), 116–123.
- Phipps, R.H., Park, J.R. (2002). Environmental benefits of genetically modified crops: Global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *Journal of Animal and Feed Sciences* 11, 1-18.
- Poiger, T., Buerge, I.J., Bächli, A., Müller, M.D., Balmer, M.E. (2017). Occurrence of the herbicide glifosato and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environ. Sci. Poll. Res.* 24, 1588–1596.
- Pontes, M., Marques, J.C., Câmara, J.S. (2007). Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 74, 91–103.
- Popek, S. (2002). A procedure to identify a honey type. *Food Chem.* 79(3), 401– 406.
- Powell, J.E., Leonard, S.P., Kwong, W.K., Engel, P., Moran, N.A. (2016). Genome-wide screen identifies host colonization determinants in a bacterial gut symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48), 13887–13892.
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K., Moran, N.A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (23), 7378–7387.
- Prezenská, M., Sobeková, A., & Sabová, L. (2019). Antioxidant enzymes of honeybee larvae exposed to oxamyl. *Folia Veterinaria*, 63(4), 9-14.
- Radovic, B.S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., Anklam, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72, 511–520.
- Rampazzo, G., Gazzotti, T., Zironi, E., Pagliuca, G. (2023). Glifosato and Glufosinato Residues in Honey and Other Hive Products. *Foods*. 12, 1155.
- Rampazzo, N., Todorovic, G.R., Mentler, A., Blum, W.E. (2013). Adsorption of glifosato and aminomethylphosphonic acid in soils. *Int. Agrophys.* 27, 203-209.

Ranneh, Y., Akim, A.M., Hamid, H.A. (2021). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 21, 30.

Rawat D., Bains, A., Chawla, P., Kaushik, R., Yadav, R., Kumar, A., Sridharf, K., Sharma, M. (2023). Hazardous impacts of glifosatoon human and environment health: Occurrence and detection in food. *Chemosphere* 329, 138676.

Raymann, K., Bobay, L.M., Moran, N.A. (2018). Antibiotics reduce genetic diversity of core species in the honeybee gut microbiome. *Mol. Ecol.* 27 (8), 2057–2066.

Razzazi-Fazeli, E., & Reiter, E. V. (2011). Sample preparation and clean up in mycotoxin analysis: Principles, applications and recent developments. *Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed*, 37-70.

Rebane, R., Herodes, K. (2010). A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using precolumn derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. *Analytica Chimica Acta*, 672, 79–84.

Regolamento (CE) 2005/396 concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale.

REGOLAMENTO (CE) N. 2076/2002 DELLA COMMISSIONE del 20 novembre 2002 che prolunga il periodo di tempo di cui all'articolo 8, paragrafo 2, della direttiva 91/414/CEE del Consiglio e concernente la non iscrizione di talune sostanze attive nell'allegato I della suddetta direttiva e la revoca delle autorizzazioni di prodotti fitosanitari contenenti dette sostanze

Regolamento (UE) 2013/293 della Commissione, del 20 marzo 2013, che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) 2005/396 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di emamectina benzoato, etofenprox, etoxazolo, flutriafol, glifosato, fosmet, piraclostrobina, spinosad e spirotetrammato.

Regolamento (UE) 2015/401 della Commissione, del 25 febbraio 2015, che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di acetamiprid, cromafenozide, ciazofamid, dicamba, difenoconazolo, fenpirazamina, fluazinam, formetanato, nicotina, penconazolo, pimetrozina, piraclostrobin, tau-fluvalinato e tebuconazolo in o su determinati prodotti  
REGOLAMENTO (UE) 2017/626 DELLA COMMISSIONE del 31 marzo 2017 che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di acetamiprid, cyantraniliprole, cipermetrina, ciprodinil, difenoconazolo, etefon, fluopyram, flutriafol, fluxapyroxad,

imazapic, imazapir, lambda-cialotrina, mesotrione, profenofos, propiconazolo, pirimetanil, spirotetrammato, tebuconazolo, triazofos e triflossistrobina in o su determinati prodotti

Regolamento (UE) 2018/62 concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale che sostituisce l'allegato I del regolamento (CE) n. 396/2005.

Regolamento (UE) 2019/552 della Commissione, del 4 aprile 2019, che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di azossistrobina, bicyclopyrone, clormequat, ciprodinil, difenoconazolo, fenpropimorf, fenpirossimato, fluopyram, fosetil, isoprotilano, isopyrazam, oxamil, protioconazolo, spinetoram, triflossistrobina e triflumezopyrim in o su determinati prodotti

Regolamento (UE) 2021/155 della commissione del 9 febbraio 2021 che modifica gli allegati II, III e V del regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda i livelli massimi di residui di tetracloruro di carbonio, clorotalonil, clorprofam, dimetoato, etoprofos, fenamidone, metiocarb, ometoato.

Regolamento (UE) 2023/915: relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti che abroga il regolamento (CE) n. 1881/2006 e il Regolamento (UE) 2022/2388 della Commissione del 7 dicembre 2022 per quanto riguarda i tenori massimi di sostanze perfluoroalchiliche in alcuni prodotti alimentari.

Regolamento di esecuzione (UE) 2020/18 della commissione del 10 gennaio 2020 concernente il mancato rinnovo dell'approvazione della sostanza attiva clorpirifos, in conformità al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari, e la modifica dell'allegato del regolamento di esecuzione (UE) n. 540/2011 della Commissione

Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC

Rendón-von Osten, J., Dzul-Caamal, R. (2017). Glifosatoresidues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: a survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14, 595.

Rodríguez-Carrasco, Y., Font, G., Mañes, J., & Berrada, H. (2013). Determination of mycotoxins in bee pollen by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(8), 1999-2005.

Rodríguez-Carrasco, Y., Font, G., Manes, J., & Berrada, H. (2013). Determination of mycotoxins in bee pollen by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(8), 1999-2005.

Rojas, A., Lopez-Pazos, S., Chaparro-Giraldo, A. (2018). Screening of Colombian soybean genotypes for *Agrobacterium* mediated genetic transformation conferring tolerance to glyphosate. *Agron. Colomb.* 36, 24–34.

Rosenbom, A.E., Brüsch, W., Juhler, R.K., Ernsten, V., Gudmundsson, L., Kjær, J., Plauborg, F., Grant, R., Nyegaard, P., Olsen, P. (2010). The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme Monitoring Results May 1999–June 2009. Online: <https://vap.dk/wp-content/uploads/Rapporter/2009/Monitoring-results-May-1999%E2%80%93June-2009.pdf>  
Ultimo accesso: 16/11/2023 Last access: 11/01/24

Rubio, F., Guo, E., Kamp, L. (2014). Survey of GlifosatoResidues in Honey, Corn and Soy Products. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 5, 1–8.

Saisho, K., Toyoda, M., Takagi, K., Satake, M., Takahashi, S., Yamamoto, Y., Kasai, K., Hashimoto, S., Saito, Y. (1994). Identification of aconitine in raw honey that caused food poisoning. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 35(1), 4650.

Sak-Bosnar, M., Sakac, N. (2012). Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chemistry* 135, 827–831.

Sanchís, J., Kantiani, L., Llorca, M., Rubio, F., Ginebreda, A., Fraile, J., Garrido, T., Farre, M. (2012). Determination of glifosato in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by online solid phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2335-2345.

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M. D., & Andreu-Moliner, E. (2003). Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 56(3), 434-441.

Sari, M.F., Esen, F., Tasdemir, Y. (2021). Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in honeybees and bee products and their evaluation with ambient air concentrations. *Atmospheric Environment* 244, 117903.

Saunders, M., Magnanti, B. L., Correia Carreira, S., Yang, A., Alamo-Hernández, U., Riojas-Rodríguez, H., ... & Bartonova, A. (2012). Chlorpyrifos and neurodevelopmental effects: a

literature review and expert elicitation on research and policy. *Environmental Health*, 11, 1-11.

Schäfer, R. B., Liess, M., Altenburger, R., Filser, J., Hollert, H., Roß-Nickoll, M., ... & Scheringer, M. (2019). Future pesticide risk assessment: narrowing the gap between intention and reality. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-5.

Schwarz, R.S., Moran, N.A., Evans, J.D. (2016). Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (33), 9345–9350.

Sharifiyeh, A. K., Pajouhesh, E. R., & Moosavi-Nejad, Z. (2019). Investigating the Effects of Formetanate Hydrochloride on Human Hemoglobin by Spectroscopic Analysis and Molecular Docking Modeling. *Medical Laboratory Journal*, 13(4).

Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Gupta, S. D., & Dogra, T. D. (2005). Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicology*, 206(1), 49-57.

Shehata, A.A., Schrödl, W., Aldin Alaa, A., Hafez, H.M., Krüger, M. (2013). The effect of glifosatoon potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr. Microbiol.* 66, 350–358.

Shushkova, T., Ermakova, I., Leontievsky, A. (2009). Glifosatobioavailability in the soil. *Biodegradation* 21, 403–410.

Sihtmäe, M., Blinova, I., Kunnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M., Kahru, A. (2013). Ecotoxicological effects of different glifosatoformulations. *Appl. Soil Ecol.* 72, 215–224.

Silici, S., Uluozlu, O.D., Tuzen, M., Soylak, M. (2008). Assessment of trace element levels in *Rhododendron* honeys of Black Sea Region. *Turk. J. Hazard. Mater.* 156, 612–618.

Silva P.M., Gauche, C., Valdemiro Gonzaga, L., Oliveira Costa, A.C. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* 196, 309-323.

Silva, L., Pereira, A., Duarte, S., Pena, A., & Lino, C. (2020). Reviewing the analytical methodologies to determine the occurrence of citrinin and its major metabolite, dihydrocitrinone, in human biological fluids. *Molecules*, 25(12), 2906.

Simsek, I., Kuzukiran, O., Yurdakok-Dikmen, B., Snoj, T., Filazi A. (2021). Determination of persistent Organic Pollutants (POPs) in propolis by solid-phase extraction (SPE) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). *Analytical Letters* 54 (10), 1668–1682.

- Singh, J., & Mehta, A. (2020). Rapid and sensitive detection of mycotoxins by advanced and emerging analytical methods: A review. *Food science & nutrition*, 8(5), 2183-2204.
- Singh, S., Tiwari, R. K., & Pandey, R. S. (2018). Evaluation of acute toxicity of triazophos and deltamethrin and their inhibitory effect on AChE activity in *Channa punctatus*. *Toxicology Reports*, 5, 85-89.
- Škaljac, S., Jokanović, M., Tomović, V., Ivić, M., Tasić, T., Ikonić, P., Šojić, B., Džinić, N., Petrović, L. (2018). Influence of smoking in traditional and industrial conditions on colour and content of polycyclic aromatic hydrocarbons in dry fermented sausage. "Petrovska klobása." *LWT – Food Science and Technology* 87, 158–162.
- Skark, C., Zullei-Seibert, N., Schottler, U., Schlett, C. (1998). The occurrence of glifosato in surface water. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 70, 93–104.
- Sobrova, Pavlina, Adam, Vojtech, Vasatkova, Anna, Beklova, Miroslava, Zeman, Ladislav and Kizek, Rene. "Deoxynivalenol and its toxicity" *Interdisciplinary Toxicology*, vol.3, no.3, 2010, pp.94-99.
- Staroň, M., Sabo, R., Sobeková, A., Sabová, L., Legáth, J., Lohajová, L., & Javorský, P. (2017). Formetanate toxicity and changes in antioxidant enzyme system of *Apis mellifera* larvae. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 14060-14070.
- Sun, M., Jaisi, D.P. (2019). Degradation of glifosato and bioavailability of phosphorus derived from glifosato in a soil-water system. *Water research*, 163, 114840.
- Surma, M., H. Zieliński, Piskuła, M. (2016). Levels of contamination by perfluoroalkyl substances in honey from selected European countries. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 97 (1), 112–118.
- Takano, H. K., & Dayan, F. E. (2020). Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Management Science*, 76(12), 3911-3925.
- Tan, S., Li, G., Liu, Z., Wang, H., Guo, X., Xu, B. (2022). Effects of glifosato exposure on honeybees. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 90, 103792.
- Tette-Souza, P.A., Guidi-Rocha, L., Glória-de Abreu, M.B. (2016). Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta* 149, 124–141.
- Thompson, H.M., Levine, S.L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P., von Mérey, G. (2014). Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glifosato as an example. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10 (3), 463–470.

Thompson, T.S.; van den Heever, J.P.; Limanowka, R.E. (2019). Determination of Glyphosate, AMPA, and Glufosinato in Honey by Online Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A36*, 434–446.

Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J. (2013). Glifosatoinduces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem. Toxicol.* 59, 129–136.

Tomasini, D., Sampaio M.R.F., Caldas, S.S., Buffon, J., Duarte, A.F., Primel, G.E. (2012). Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* 99, 380-386.

Tomé, H.V., Schmehl, D.R., Wedde, A.E., Godoy, R.S., Ravaiano, S.V., Guedes, R.N., Martins, G.F., Ellis, J.D. (2020). Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environ. Pollut.* 256, 113420.

Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Toker, O.S., Tastemur, B., Sagdic, O. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, 46, 124–131.

Truzzi, C., Annibaldi, A., Illuminati, S., Finale, C., Scarponi, G. (2014). Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chemistry*, 150, 477–481.

Turner, N. W., Subrahmanyam, S., & Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica chimica acta*, 632(2), 168-180.

U.S. Environmental Protection Agency. U.S. Environmental Protection Agency's Policy to Mitigate the Acute Risk to Bees from Pesticide Products. Available online: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2014-0818-0477>

Urlacher, E., Monchanin, C., Rivière, C., Richard, F. J., Lombardi, C., Michelsen-Heath, S., ... & Mercer, A. R. (2016). Measurements of chlorpyrifos levels in forager bees and comparison with levels that disrupt honey bee odor-mediated learning under laboratory conditions. *Journal of chemical ecology*, 42, 127-138.

Van Bruggen, A.H.C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R., Morris, J.G. Jr. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment* (616–617), 255–268.

- Van Engelsdorp, D., Hayes Jr., J., Underwood, R.M., Caron, D., Pettis, J. (2011). A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *J. Apic. Res.* 50 (1), 1–10.
- Vazquez, D.E., Balbuena, M.S., Chaves, F., Gora, J., Menzel, R., Farina, W.M. (2020). Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Sci. Rep.* 10 (1), 10516.
- Vazquez, D.E., Iliina, N., Pagano, E.A., Zavala, J.A., Farina, W.M. (2018). Glifosato affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS One* 13 (10), e0205074.
- Villalba, A., Maggi M., Ondarza P. M., Szawarski N., Miglioranza, K.S.B. (2020). Influence of land use on chlorpyrifos and persistent organic pollutant levels in honey bees, bee bread and honey: Beehive exposure assessment. *The Science of the Total Environment* 713:136554.
- Villeneuve, A., Larroudé, S., Humbert, J.F. (2011). Herbicide contamination of freshwater ecosystems: impact on microbial communities. *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*, 285–312.
- Wang, C., Lin, X., Li, L., Lin, S. (2016). Differential growth responses of marine phytoplankton to herbicide glyphosate. *PLoS One* 11 (3), 0151633.
- Wang, R., Luo, Y., Chen, H., Yuan, Y., Bingner, R. L., Denton, D., ... & Zhang, M. (2019). Environmental fate and impact assessment of thiobencarb application in California rice fields using RICEWQ. *Science of The Total Environment*, 664, 669-682.
- White, J.W., Willson, R.B., Maurizio, A., Smith, F.G. (1975). Physical characteristics of honey. *Honey: a comprehensive survey*, 207–239.
- WHO (2020). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. Online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241547963> Last access: 11/01/24
- Wołejko, E., Łozowicka, B., Jabłońska-Trypuć, A., Pietruszyńska, M., & Wydro, U. (2022). Chlorpyrifos occurrence and toxicological risk assessment: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(19), 12209.
- Won, S., Lee, D.C, Ko, H.S., Kim, J., Rhee, H. (2008). Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, 41, 952–956.
- Xie, L., Chen, M., & Ying, Y. (2016). Development of methods for determination of aflatoxins. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(16), 2642-2664.

- Xiong, J., Zhonghua, Z., Jianshe, L., Yang, W. (2009). The effect of root of *Rhododendron* on the activation of NF- $\kappa$  B in a chronic glomerulonephritis rat model. *J. Nanjing Med. Univ.* 23, 73–78.
- Yang, F. W., Li, Y. X., Ren, F. Z., Wang, R., & Pang, G. F. (2019). Toxicity, residue, degradation and detection methods of the insecticide triazophos. *Environmental Chemistry Letters*, 17, 1769-1785.
- Yang, Y., Li, G., Wu, D., Liu, J., Li, X., Luo, P., ... & Wu, Y. (2020). Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. *Trends in food science & Technology*, 96, 233-252.
- Yanniotis, S., Skaltsi, S., Skaraburniote, S. (2006). Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. *J Food Ing* 22(4), 372-377.
- Zhang, L., Dou, X. W., Zhang, C., Logrieco, A. F., & Yang, M. H. (2018). A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines. *Toxins*, 10(2), 65.
- Zhang, L., Sun, W., Zhang, Z., Chen, H., Jia, X., & Cai, W. (2017). Gender-specific metabolic responses in gonad of mussel *Perna viridis* to triazophos. *Marine pollution bulletin*, 123(1-2), 39-46.
- Zhang, Y., Ren, M., Li, J., Wei, Q., Ren, Z., Lv, J., ... & Ren, S. (2014). Does omethoate have the potential to cause insulin resistance?. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(1), 284-290.
- Zoller, O., Rhy, P., Rupp, H., Zarn, J. A., & Geiser, C. (2018). Glyphosate residues in Swiss market foods: Monitoring and risk evaluation. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), 83–91.