



**Progetto: Caratteristiche della cera d'api (fogli cerei) e possibili ricadute sull'allevamento delle api.
(CERAPI)**

Accordo di collaborazione fra enti pubblici, Regione del Veneto e Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve).

Riferimenti normativi: art. 15 della legge 241/1990.

1. Introduzione

Chimicamente, la cera d'api rappresenta una miscela organica complessa di oltre 300 composti, con predominanza di esteri di acidi grassi (circa 67%), idrocarburi (circa 14%) e acidi grassi liberi (circa 13%) (Tulloch, 1980).

La cera d'api viene ampiamente impiegata anche in diversi settori industriali come farmacia, cosmetica ed industrie alimentari (ad esempio come additivo E901).

La cera d'api svolge diversi e complessi ruoli all'interno dell'arnia, come ad esempio materiale da costruzione, conservazione degli alimenti, compartimento per la covata e mediazione nelle comunicazioni chimiche all'interno delle colonie.

Un aspetto importante dell'apicoltura è il riutilizzo dei favi per la fabbricazione dei fogli cerei che vengono successivamente utilizzati nelle pratiche apistiche.

Per foglio cereo s'intende una lamina di cera d'api su cui viene impresso, su entrambi i lati, lo stampo delle celle del favo. La cera d'api viene secreta sotto forma di scaglie che le api trasferiscono con le zampe anteriori alle loro mandibole, dove vengono masticate ed addizionate di secrezioni salivari, e quindi aggiunte al foglio che viene costruito. I principali vantaggi derivanti dall'utilizzo dei telaini con fogli cerei da parte dell'apicoltore sono, oltre ad una più rapida costruzione dei favi, una minore secrezione di cera da parte delle api e quindi un minore consumo di miele da parte delle stesse (per produrre 1 hg di cera le api consumano 1 kg di miele) e la costruzione regolare, senza punti di saldatura, del favo.

Dato il ruolo complesso e importante della cera nella colonia, è di fondamentale importanza che i fogli cerei siano genuini ed incontaminati. Le problematiche emergenti circa la qualità della cera d'api includono la contaminazione della stessa con residui di pesticidi derivanti dalle pratiche apistiche (come acaricidi per la lotta alla Varroa) o, in misura minore, di origine ambientale (agrofarmaci) e la presenza di sostanze adulteranti (Schroeder e Wallner, 2003; Bernal et al., 2005; Bogdanov, 2006; Chauzat e Faucon, 2007; Serra Bonvehí e Orantes Bermejo, 2010, 2012; Maia e Nunes, 2013; Ravoet et al., 2015; Svečnjak et al., 2015).

Per quanto riguarda la presenza di pesticidi, i dati sulla contaminazione della cera d'api da parte di sostanze farmacologicamente attive, sono molto rari rispetto agli studi sulla contaminazione del miele, e provengono per lo più da indagini a livello nazionale, semplicemente perché la cera d'api è generalmente considerata non edibile. La maggior parte dei pesticidi è liposolubile, non volatile e persistente e quindi può facilmente accumularsi nella cera d'api. Molte sostanze possono facilmente migrare nel miele, quindi i residui di pesticidi anche in tracce possono rappresentare un problema per la salute delle api ma anche dell'uomo. La cera d'api inoltre, non viene solo riciclata sotto forma di fogli cerei, ma viene anche lavorata per scopi farmaceutici o per l'industria alimentare e cosmetica.

Altro importante aspetto concernente la qualità della cera, è la sua adulterazione attraverso l'aggiungimento di altri prodotti grassi, favorita dal costo relativamente elevato della cera d'api. Questo aspetto, oltre ad essere un potenziale rischio per la salute umana, è anche una delle principali preoccupazioni degli apicoltori a causa del rifiuto o della cattiva accettazione da parte delle api di alcuni lotti di fogli cerei (Jimenez et al., 2006). I problemi legati alla presenza di queste sostanze possono avere un impatto rilevante in apicoltura a causa del commercio e del riciclo di favi contaminati, in quanto non vi sono regolamenti che impongano un controllo della qualità o dell'autenticità della cera in vendita per l'utilizzo in ambito apistico. Tuttavia, non esistono ancora metodi analitici standardizzati a livello internazionale per il controllo di autenticità della cera d'api. Ad oggi, più di 15 diverse cere naturali (cere derivate dal petrolio, minerali, animali e piante) e sintetiche



d924f6bf



vengono utilizzate come adulteranti della cera d'api in tutto il mondo (Bogdanov, 2004, 2016). Tra queste, la paraffina rappresenta il problema maggiore a causa della sua ampia disponibilità e del basso prezzo. Inoltre, le proprietà chimico-fisiche della paraffina (è una sostanza chimicamente inerte, quasi inodore e bianca o incolore) la rende una sostanza "ideale" per l'adulterazione. Altri adulteranti, come l'acido stearico, il sego, la cera microcristallina e altri, sono rilevati sporadicamente. La presenza di elevate quantità di paraffina (> 60%) in fogli cerei commerciali è stata riportata in diversi studi recenti (Serra Bonvehí e Orantes Bermejo, 2012; Maia et al., 2013; Svečnjak et al., 2015, Svečnjak et al., 2016). I risultati ottenuti in questi studi, suggeriscono l'urgente necessità di controlli di routine dell'autenticità della cera d'api.

Ultimo aspetto affrontato dal presente progetto verte sulla eventuale presenza di *Paenibacillus* larvae, batterio sporigeno responsabile di una malattia della covata, la peste americana, di particolare rilevanza in ambito apistico. La cera d'api è un importante prodotto delle api che ritorna parzialmente nell'alveare sotto forma di foglio cereo. I fogli cerei non sono mai stati ufficialmente collegati alla diffusione di alcuna malattia delle api; la cera riciclata, tuttavia, quando collocata in una colonia, rappresenta un rischio elevato per la trasmissione di malattie e, in una certa misura, di acari parassiti (Mutinelli, 2011). Di conseguenza, sono necessari metodi di indagine applicabili alla cera d'api per garantirne la sterilità o almeno l'assenza di agenti patogeni specifici. La peste americana è una devastante malattia della covata causata dal batterio *P. larvae* (Hansen and Brodsgaard, 1999; de Graaf et al., 2013) ed è una delle malattie delle api elencata dall'Organizzazione mondiale per la salute degli animali (OIE) e soggetta a denuncia nell'Unione Europea. Protocolli di diagnosi riconosciuti a livello internazionale sono disponibili nel Manuale OIE per i test diagnostici e i vaccini per gli animali terrestri (OIE, 2016b). I metodi per rilevare il *P. larvae* nella cera d'api hanno implicazioni sia per la sterilità dei fogli cerei sia come valore prognostico.

2. Finalità dell'azione

La finalità del presente progetto riguardano la stesura di un quadro d'insieme sulle caratteristiche qualitative della cera d'api utilizzata nel territorio della regione Veneto, concentrando l'attenzione sugli aspetti sanitari connessi alla presenza di residui di farmaci veterinari e fitofarmaci, di adulteranti come le paraffine, nonché su quella di agenti batterici di particolare rilevanza e conseguente potenziale reazione dell'alveare a tali presenze.

3. Attività previste

3.1 Campionamento e indagini di laboratorio da eseguire sui fogli cerei

L'IZSve ha acquisito nel tempo una specifica competenza nella esecuzione di analisi di laboratorio destinate alla valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche della cera d'api e nel fornire un supporto tecnico-scientifico agli apicoltori al fine di migliorare la propria tecnica apistica. Anche per quanto riguarda la cera d'api, la disponibilità di una competenza tecnico-scientifica specifica come quella citata costituisce un fattore particolarmente rilevante considerato che la cera d'api è utilizzata per la costruzione dei favi dell'alveare che viene a contatto con le api, la covata, il polline (pane delle api) e il miele.

I fogli cerei, acquisiti sul mercato da diversi produttori nazionali e commercializzati anche nel territorio regionale, saranno campionati con criterio statistico tenendo conto della numerosità dei lotti acquisiti e sottoposti a controlli chimici e microbiologici per verificarne la qualità come di seguito descritto.

- Residui di pesticidi

I campioni saranno analizzati per circa 140 sostanze chimiche appartenenti a classi tossicologiche diverse (erbicidi, insetticidi, acaricidi e fungicidi), con tecnica di cromatografia liquida (LC) e gas-cromatografia (GC) con detector spettrofotometro di massa a triplo quadrupolo (MS/MS). L'estrazione dei pesticidi si effettua con tecnica QuEChERS: 2 g di cera vengono polverizzati con mulino ad azoto liquido e addizionati con standard interno e 10 mL di acqua. Dopo aver agitato per 10 minuti vengono aggiunti 10 mL di acetonitrile con 0,1% di acido acetico. Si agita per altri 25 minuti e poi si raffredda in congelatore per 15 minuti. Successivamente vengono aggiunti i sali per l'estrazione (EN method) e si agita vigorosamente per 1 minuto. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 3000 g a -20°C, vengono prelevati 7 mL di surnatante e posti in provette con resine per la purificazione di campioni grassi. Dopo ulteriore



d924f6bf



agitazione per 30 secondi e centrifugazione, vengono prelevati 4 mL e portati a secco a 40°C sotto vuoto. L'essiccato viene ricostituito con 1 mL di una miscela 50:50 di ammonio formiato 5 mM in acqua con 0,1% di acido formico e ammonio formiato 5 mM in metanolo con 0,1% di acido formico (fasi mobili cromatografiche) per analisi con LC-MS/MS o con etano per GC-MS/MS.

- **Presenza di paraffine**

A 5 g di cera d'api vengono aggiunti 25 ml di soluzione alcolica al 12% KOH (preparata fresca), e posti a riscaldare fino ad ottenere una consistenza pastosa. Successivamente vengono sciolti rapidamente con 20 mL di glicerina calda e acqua distillata calda. In presenza di paraffina (o cerasina, una cera minerale) si produce un liquido lattiginoso o un precipitato. Con questa tecnica è possibile individuare campioni di cera adulterati con paraffina con una concentrazione superiore al 10%. I campioni risultati positivi o dubbi in seguito a questo test qualitativo, saranno sottoposti ad analisi di conferma mediante tecnica GC-MS/MS. In questo caso 0,01 g di cera d'api vengono sciolti in 10 mL di cloroformio mediante agitazione per 2 minuti o fino a completa dissoluzione e viene aggiunto lo standard interno con una concentrazione (riferita alla massa di cera d'api) del 2%. L'analisi sarà effettuata confrontando i cromatogrammi degli idrocarburi in cera d'api pura e adulterata. Il metodo consente anche l'analisi quantitativa di n-alcani, determinando un grado di adulterazione della cera fino ad un 3% di concentrazione (Waś et al., 2016). L'adulterazione è evidenziata dalla presenza di idrocarburi con un numero di atomi di carbonio maggiore di 35, dal contenuto più elevato di singoli n-alcani ($C_{20}H_{42}$ - $C_{35}H_{72}$) e da un contenuto globalmente più elevato di questi composti, rispetto ai contenuti massimi riportati per la cera d'api (Waś et al., 2014).

- **Presenza di Paenibacillus larvae**

Esame colturale. Ad 1 g di cera vengono aggiunti 8,5 mL di acqua distillata sterile e 0,5 mL di Tween 80 precedentemente riscaldato (30 minuti in bagnomaria a 70°C). Il tutto viene posto in bagnomaria a 70°C, agitando ogni 10 minuti per 30 minuti o fino a scioglimento completo della cera. Dopo aver raffreddato per 2-4 ore e ottenuto una evidente separazione liquido/solido, vengono prelevati 2-5 mL di liquido, posti in una provetta sterile e addizionati di un egual volume di acqua distillata sterile. Il tutto viene agitato per 5 minuti ed incubato in termostato a 90°C per 10 minuti. Dopo opportuno raffreddamento, 200 µL di tale sospensione vengono seminati con ansa sterile su piastra con terreno MYPGP – PN (brodo Mueller – Hinton, estratto di lievito, fosfato di potassio, glucosio, piruvato) e posti in incubatore a 37°C, in una giara con busta per microaerofilia CampyGen OXOID, per 5-8 giorni. Al termine verrà valutata la presenza di colonie riferibili a *P. larvae* (colonie piccole, regolari, prevalentemente ruvide, piatte o rilevate e di colore da biancastro a beige).

Test di conferma. La morfologia delle colonie di per sé non è sufficiente e pertanto è necessario procedere con altri test. Test biochimico delle catalasi: una goccia di H_2O_2 al 3% viene posta su un vetrino portaoggetto; le colonie batteriche sospette vengono prelevate con ansa sterile e stemperate nella goccia di H_2O_2 ; *P. larvae* è catalasi negativo, quindi non dovrebbe essere osservata la formazione di bollicine (O_2). Colorazione di GRAM: le colonie risultate catalasi negative vengono sottoposte a colorazione di GRAM (una colonia viene stemperata con un una goccia di soluzione fisiologica su vetrino, fissata alla fiamma e poi coperta con cristal-violetto per 1 minuto; poi il tutto viene lavato con acqua e coperto con soluzione iodata per 1 minuto; successivamente si lava e fissa con etanolo per 30 secondi e poi si lava e copre con safranina per altri 10 secondi, lavando al termine), ed osservate al microscopico con obiettivo ad immersione 100x. *P. larvae* è GRAM positivo (blu-viola), con morfologia bastoncellare, con bacilli lunghi (1,5 - 6 µm) e sottili (larghezza 0,5 - 0,6 µm), disposti a singola cellula, ma più spesso in lunghi filamenti diversa lunghezza.

3.2 Indagini in campo sui fogli cerei distribuiti

I fogli cerei acquisiti, suddivisi per lotto e produttore saranno distribuiti in forma anonima agli apicoltori delle forme associate in modo da assicurare il coinvolgimento di tutto il territorio regionale e far partecipare il maggior numero possibile di apicoltori al progetto.

Si ritiene che il numero di fogli cerei distribuiti potrà coinvolgere circa il 10/15% degli alveari presenti sul territorio regionale.



d924f6bf



In corrispondenza di un appropriato momento dell'attività e secondo le indicazioni delle buone pratiche apistiche, detti fogli cerei saranno inseriti nell'alveare in sostituzione dei vecchi fogli, ed utilizzati per il naturale sviluppo della colonia.

In coincidenza con la distribuzione dei fogli cerei, sarà somministrato agli apicoltori un questionario, precedentemente strutturato in modo da poter raccogliere informazioni specifiche in merito alle modalità di utilizzo e di turnazione dei fogli cerei stessi da parte dei partecipanti al progetto.

Alla fine del periodo produttivo (ottobre), verrà somministrato agli stessi apicoltori un ulteriore questionario al fine di rilevare eventuali anomalie riscontrate, scarsa o alterata accettazione.

Al fine di dare significatività alla ricerca dovrà essere coinvolto il maggior numero di apicoltori nell'ambito della somministrazione dei diversi questionari.

Verrà quindi concentrata l'attenzione sugli aspetti sanitari connessi alla presenza di residui di farmaci veterinari e fitofarmaci nonché su quella di agenti batterici di particolare rilevanza.

3.3 Diffusione dei risultati

L'attività di laboratorio e di campo sarà integrata con eventi informativi/formativi diretti alle forme associate al fine di migliorare le conoscenze degli apicoltori relativamente alla cera, ai fogli cerei e al loro utilizzo nella pratica apistica corrente.

4. Enti coinvolti

La Regione del Veneto e il Centro regionale per l'apicoltura presso l'IZS delle Venezie, Legnaro in qualità di realizzatori del programma coinvolgeranno i seguenti soggetti:

- le forme associate degli apicoltori della regione Veneto, al fine della realizzazione delle attività paragrafo 3.2;
- quanti possano essere utili al raggiungimento degli obiettivi prefissati.

Competenze

Regione del Veneto

In qualità di coordinatore regionale, partecipa in affiancamento all'IZSve alla predisposizione della progettualità, al coordinamento delle attività svolte in collaborazione con le forme associate, allo svolgimento delle attività divulgazione e diffusione dei risultati, alla valutazione delle modalità più opportune per il raggiungimento delle finalità dell'azione.

Centro regionale per l'apicoltura e Laboratorio di Parassitologia presso IZS delle Venezie

L'IZS delle Venezie si occuperà della predisposizione del piano, della realizzazione delle attività sopra indicate, di periodici sopralluoghi e campionamenti a supporto alle associazioni degli apicoltori. Sarà inoltre responsabile della stesura dei report delle attività e della relazione finale del progetto.

5. Risultati minimi attesi:

Tutti i dati rilevati, relativi alle analisi sui campioni dei lotti, sulle modalità di utilizzo e turnazione dei fogli e sulle eventuali anomalie riscontrate in campo verranno analizzati in modo integrato al fine di fornire un quadro sulle caratteristiche qualitative della cera d'api utilizzata nel territorio della regione Veneto concentrando l'attenzione sugli aspetti sanitari connessi alla presenza di residui di fitofarmaci di paraffine, nonché su quella di agenti batterici di particolare rilevanza.

L'attività svolta nel corso del progetto ed i relativi risultati di laboratorio e di campo saranno presentati sotto forma di relazione al termine del progetto stesso.



d924f6bf



Tempistica indicativa di svolgimento delle attività												
Dettaglio attività	Mesi anno											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Paragrafo 3.1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Paragrafo 3.2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Paragrafo 3.3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Prospetto finanziario

Ripartizione finanziaria	
Categoria di spesa	Preventivo
Spese per personale comprensive delle spese per viaggi e trasferte e rimborso spese	6.000,00
Spese per acquisto di materiali utili per lo svolgimento delle attività	44.000,00
Totale	50.000,00 euro



d924f6bf

