

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ
ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ,
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ
ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ
ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

ΚΑΝΤΕΛΗ ΦΩΤΕΙΝΗ

Τεχνολόγος Τροφίμων
Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

2024

UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

POSTGRADUATE MASTERS STUDIES
IN TOXICOLOGY

**DETERMINATION OF PESTICIDE
RESIDUES, THEIR METABOLITES AND
OTHER VOLATILE ORGANIC
COMPOUNDS IN BEEKEEPING
SUBSTRATES**

KANTELI FOTEINI

FOOD TECHNOLOGIST
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

2024

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΩΝ, ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΠΤΗΤΙΚΩΝ
ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ**

ΚΑΝΤΕΛΗ ΦΩΤΕΙΝΗ

Αριθμός Γενικού Μητρώου: M041822006

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων στο
Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Κασιώτης Κωνσταντίνος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κωνσταντίνος Κασιώτης, Χημικός - Ερευνητής Α', Εργαστήριο
Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων, Μπενάκειο
Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας – Τοξικολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σέρκος Χαρουτουνιάν, Καθηγητής Χημείας, στο Εργαστήριο
Φυσιολογίας Θρέψεως & Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου
Αθηνών και Αντιπρύτανης Ακαδημαϊκών-Διοικητικών Υποθέσεων &
Φοιτητικής Μέριμνας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου, Δρ. Κωνσταντίνο Κασιώτη, Ερευνητή Α' στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων (ΕΤΕΓΦ) του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ).

Η επιστημονική καθοδήγησή του, η υποστήριξη και οι πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε σε όλη την διάρκεια της μελέτης, της υλοποίησης της πειραματικής διαδικασίας καθώς και της συγγραφής της διπλωματικής εργασίας αποτέλεσαν καθοριστικούς παράγοντες για την επιτυχή ολοκλήρωσή της. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Κυριακή Μαχαίρα, Γενική Διευθύντρια του ΜΦΙ, Προϊσταμένη του ΕΤΕΓΦ, Ερευνήτρια Α' για την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την εν λόγω μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους εργαζομένους στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων για τη δημιουργία ενός αρμονικού περιβάλλοντος και κυρίως τις υποψήφιες διδάκτορες Ηλέκτρα Μανέα Κάργα και Θεοδώρα Μπαρμπούνη για την άψογη συνεργασία μας και την απλόχερη βοήθεια τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή και Καθηγητή του Προγράμματος Π.Μ.Σ. Τοξικολογίας, κ. Δημήτριο Κουρέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να φοιτήσω στο εν λόγω μεταπτυχιακό πρόγραμμα και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου έδωσε για το πεδίο της Τοξικολογίας. Ευχαριστώ, επίσης και όλους τους υπόλοιπους διδάσκοντες του προγράμματος, που με τις γνώσεις τους και τη διδακτική τους εμπειρία μου έδωσαν την ευκαιρία να λάβω την απαραίτητη γνώση που αποτέλεσε θεμελιώδες εργαλείο για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου Πηνελόπη και τον πατέρα μου Πέτρο για όλη την στήριξη και τη δύναμη που μου έδωσαν σε όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού και ειδικά της διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών είναι τεράστια και τα υπολείμματά τους ακόμη μεγαλύτερα, που τα καθιστούν επικίνδυνα τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον άνθρωπο. Οι μέλισσες όντας οι σημαντικότεροι επικονιαστές στη φύση πλήττονται άμεσα από αυτές τις ενώσεις. Ως αποτέλεσμα είναι ο ξαφνικός θάνατος των μελισσών, η ραγδαία μείωση του πληθυσμού τους αλλά και η μόλυνση των μελισσοκομικών προϊόντων. Επίσης, η παραμονή τόσο των αντιβιοτικών όσο και των ακαρεοκτόνων που χρησιμοποιούνται για την εξάλειψη των ασθενειών της μέλισσας στα προϊόντα τους μπορεί να θέσει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των ανθρώπων. Γι' αυτό καθίσταται απαραίτητος ο προσδιορισμός των ουσιών αυτών με εξειδικευμένες μεθόδους. Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι ο προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών και ακαρεοκτόνων σε δείγματα μελιών. Πιο συγκεκριμένα οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι χρωματογραφικές τεχνικές, υγρής κα αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Η συνδυασμένη τεχνική LC-MS/MS φαίνεται να υπερτερεί καθώς χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και επιλεκτικότητα, ενώ παράλληλα με μία μόνο ανάλυση καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση πολλαπλών αναλυτών στόχων σε σύνθετες μήτρες τροφίμων, όπως είναι το μέλι.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας περιγράφονται τα κύρια στοιχεία για τη μέλισσα και την κοινωνία της, οι κύριες ασθένειες που την πλήττουν και πως αντιμετωπίζονται. Επιπρόσθετα, αναφέρονται λεπτομερώς η χρήση, η ταξινόμηση και οι επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων, των αντιβιοτικών (η φουμαγγιλίνη και οι νιτροϊμιδαζόλες) και των ακαρεοκτόνων (αμιτράζη) που χρησιμοποιούνται στη μελισσοκομία.

Στο πειραματικό μέρος, περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Παρουσιάζονται αναλυτικά οι μέθοδοι προετοιμασίας και κατεργασίας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν (SPE, QuEChERS) και οι αναλυτικές τεχνικές (LC-MS/MS, GC-MS/MS). Τέλος, περιγράφονται αναλυτικά όλα τα αποτελέσματα με τη συζήτηση και τη σχετική νομοθεσία των ευρημάτων.

ABSTRACT

In recent years, the use of pesticides is enormous and their residues are even greater, which make them dangerous for both the environment and humans. Bees, being the most important pollinators in nature, are directly affected by these compounds. As a result, is the sudden death of the bees, the rapid reduction of their population and the contamination of the beekeeping products. Also, the presence of both antibiotics and acaricides used to eradicate bee diseases in their products can seriously endanger human health. For this reason, it becomes necessary to determine these substances with specialized methods. The purpose of this thesis is the determination of pesticide, antibiotic and acaricide residues in honey samples.

Specifically, the analytical techniques used were chromatographic techniques, liquid and gas chromatography combined with mass spectrometry. The combined LC-MS/MS technique appears to be superior as it is characterized by high sensitivity and selectivity, while simultaneously with a single analysis it becomes possible to quantify multiple target analytes in complex food matrices, such as honey.

The first part of the thesis describes the main data about the bee and its society, the main diseases that affect it and how to treat them. In addition, the use, classification and effects of pesticides, antibiotics (fumagillin and nitroimidazoles) and acaricides (amitraz) used in beekeeping are described in detail.

The experimental part details all materials and reagents used. Sample preparation and processing methods (SPE, QuEChERS), analytical techniques (LC-MS/MS, GC-MS/MS) as well as method information and steps are presented. Finally, all the results are described in detail with the discussion and the relevant legislation of the findings.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΙ ΜΕΛΙΣΣΕΣ	12
1.1. ΕΠΙΚΟΝΙΑΣΗ	12
1.2. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ	13
1.2.1. HONEY BEES (<i>A. mellifera</i>)	13
1.2.2. ΟΙ BOMBINOI (BUMBLEBEES)	14
1.2.3. ΜΟΝΑΧΙΚΕΣ ΜΕΛΙΣΣΕΣ (SOLITARY BEES)	15
1.3. ΤΟ ΜΕΛΙΣΣΙ ΩΣ ΚΟΙΝΩΝΙΑ	16
1.4. ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΜΕΛΙ	18
2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ	18
2.2. Ο ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ	19
2.3. Η ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ	19
2.4. Η ΝΟΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ	20
2.5. ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	21
2.5.1. ΓΥΡΗ	21
2.5.2. ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΠΟΛΤΟΣ	22
2.5.3. ΠΡΟΠΟΛΗ	22
2.5.4. ΚΕΡΙ	23
2.5.5. ΔΗΛΗΤΗΡΙΟ	23
2.5.6. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	24
3.1. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	25
3.1.1. ΟΙ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	25
3.2. ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ	26
3.2.1. ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ	26
3.2.2. ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ	27
3.2.3. ΝΗΜΑΤΩΔΟΚΤΟΝΑ	27
3.2.4. ΤΡΩΚΤΙΚΟΚΤΟΝΑ	28
3.2.5. ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ	29
3.3. ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΤΟΥΣ ΔΟΜΗ	29
3.3.1. ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ (OCs)	30

3.3.2. ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ (OPs).....	31
3.3.3. ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΥΡΕΘΡΟΕΙΔΗ.....	31
3.3.4. ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ.....	32
3.3.5. ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ.....	32
3.3.6. ΤΡΙΑΖΙΝΕΣ.....	33
3.4. Η ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	34
3.5. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΚΑΤΑΛΟΙΠΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ.....	35
3.5.1. ΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΣΤΟ ΜΕΛΙ.....	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΟ ΜΕΛΙ.....	39
4.1. ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ ΣΗΨΙΓΟΝΙΑ (AMERICAN FOULBROOD).....	41
4.2. Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΣΗΨΙΓΟΝΙΑ (EUROPEAN FOULBROOD).....	41
4.3. ΝΟΣΕΜΙΑΣΗ (NOSEMA).....	42
4.4. ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ (FUMAGILLIN).....	44
4.5. ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ (NITROIMIDAZOLES).....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: VARROA-AMITPAZH.....	50
5.1. VARROA.....	51
5.2. AMITPAZH.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	54
6.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID PHASE EXTRACTION -SPE).....	55
6.1.1. ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	55
6.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ (LIQUID-LIQUID EXTRACTION – LLE).....	58
6.2.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	58
6.3. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe extraction).....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	61
7.1. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY – MS).....	61
7.1.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	62
7.1.2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	62
7.1.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ.....	63
7.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	65
7.2.1. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GAS CHROMATOGRAPHY).....	66
7.2.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LIQUID CHROMATOGRAPHY-LC).....	70
ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	78
1. ΥΛΙΚΑ & ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	78
1.1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ & ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	78
1.2. ΟΡΓΑΝΑ & ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ.....	78
1.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	80

1.3.1.	ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	80
1.3.2.	ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	83
1.3.3.	ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	84
2.	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	85
3.	ΜΕΘΟΔΟΙ	86
3.1.	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	86
3.1.1.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	87
3.1.2.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΓΡΗΣ/ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	87
3.2.	ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ	90
3.2.1.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	91
3.2.2.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC-MS/MS) ΓΙΑ ΤΙΣ ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ	91
3.3.	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ	92
3.3.1.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	93
3.3.2.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ(LC- MS/MS) ΓΙΑ ΤΗ ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ	93
3.4.	ΑΜΙΤΡΑΖΗ	94
3.4.1.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	94
3.4.2.	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC-MS/MS) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΜΗΤΡΑΖΗ	95
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	96
4.1.	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	96
4.2.	ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ & ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ	102
4.3.	ΑΜΙΤΡΑΖΗ	104
4.4.	ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΕΥΡΥΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	107
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	110

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

B ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Πίνακας 1.1. Οι ουσίες εμβολιασμού για τα φυτοφάρμακα με τα όρια ποσοτικοποίησης	80
Πίνακας 2.1. Αναλυτικά τα δείγματα που αναλύθηκαν	85
Πίνακας 3.1. Οι μεταπτώσεις των ενώσεων που αναλύθηκαν για τα φυτοφάρμακα με αέρια χρωματογραφία GC-MS/MS	89
Πίνακας 3.2. Χρόνος έκλυσης, πρόδρομα και θυγατρικά ιόντα, ενέργειες σύγκρουσης και αναλογία μεταπτώσεων	92
Πίνακας 3.3. Η βαθμιδωτή έκλυση για την μέθοδο της αμιτράζης και των μεταβολιτών της	94
Πίνακας 3.4. Οι μεταπτώσεις της αμιτράζης και των μεταβολιτών της	95
Πίνακας 4.1. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τα φυτοφάρμακα (παρατίθεται το MRL)	100
Πίνακας 4.2. Στοιχεία επικύρωσης για τις νιτροϊμιδαζόλες και τη φουμαγγιλίνη στο μέλι	102
Πίνακας 4.3. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την αμιτράζη και των μεταβολιτών της	104
Πίνακας 4.4. Τα όρια ποσοτικοποίησης για την αμιτράζη και τους μεταβολίτες της	105

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Α ΜΕΡΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

Εικόνα 3.1. Η ταξινόμηση των φυτοφαρμάκων με βάση την χημική τους δομή	30
Εικόνα 3.2. Ταξινόμηση των φυτοφαρμάκων σύμφωνα με την τοξικότητα	35
Εικόνα 4.1. Η χημική δομή της φουμαγγιλίνης	44
Εικόνα 4.2. Οι μεταβολίτες της φουμαγγιλίνης	46
Εικόνα 4.3. Η χημική δομή των νιτροαμιδαζολών και των μεταβολιτών τους	50
Εικόνα 5.1. Η δομή της αμιτράζης και οι κύριοι μεταβολίτες της	54
Εικόνα 6.1. Σχηματική Αναπαράσταση της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)	57
Εικόνα 6.2. Σχηματική Αναπαράσταση της εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE)	58
Εικόνα 7.1. Σχηματική απεικόνιση φασματομέτρου μάζας	62
Εικόνα 7.2. Σχηματική απεικόνιση τριπλού τετράπουλου	65
Εικόνα 7.3. Αέριος Χρωματογράφος	67
Εικόνα 7.4. Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	73

Β ΜΕΡΟΣ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Εικόνα 4.1. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας acetamiprid του δείγματος 1 με τη μέθοδο LC-MS/MS	96
Εικόνα 4.2. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας coumaphos στο διάλυμα εργασίας (standard) 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS	97
Εικόνα 4.3. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας coumaphos στο διάλυμα εμβολιασμού (spike) σε συγκεντρωση 5ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS	97
Εικόνα 4.4. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας coumaphos στο δείγμα 20 με τη μέθοδο LC-MS/MS	98
Εικόνα 4.5. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας tebuconazole του διαλύματος εργασίας (standard) 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS	98
Εικόνα 4.6. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας trifloxystrobin του διαλύματος εργασίας (standard) 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS	99
Εικόνα 4.7. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας trifloxystrobin του διαλύματος εμβολιασμού (spike) 1ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS	99
Εικόνα 4.8. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας trifloxystrobin του δείγματος 23 με τη μέθοδο LC-MS/MS	100
Εικόνα 4.9. Χρωματογράφημα της ουσίας DMF, μεταβολίτης της αμιτράζης σε δείγμα εμβολιασμού (spike) συγκεντρώσεως 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS	105
Εικόνα 4.10. Χρωματογράφημα της ουσίας DMPF, μεταβολίτης της αμιτράζης σε δείγμα εμβολιασμού (spike) συγκεντρώσεως 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS	106
Εικόνα 4.11. Χρωματογράφημα της ουσίας DMA, μεταβολίτης της αμιτράζης σε δείγμα εμβολιασμού (spike) συγκεντρώσεως 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS	106
Εικόνα 4.12. Η γεωγραφική κατανομή των δειγμάτων	107
Εικόνα 4.13. Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα μελιών	107
Εικόνα 4.14. Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν σε σχέση με την προέλευση των δειγμάτων	108

ΜΕΡΟΣ Α: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΙ ΜΕΛΙΣΣΕΣ

1.1. ΕΠΙΚΟΝΙΑΣΗ

Οι μέλισσες εμφανίστηκαν στη γη πριν από περίπου 80 εκατομμύρια χρόνια και εξελίχθηκαν από έντομα που έμοιαζαν με σφήκες (Murray, Kuhlmann, & Potts, 2009). Είναι έντομα της οικογένειας των υμενόπτερων, τα οποία θεωρούνται πολύ σπουδαία για τον άνθρωπο και για τη φύση, αφού διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ζωική παραγωγή και την κτηνοτροφία. Οι μέλισσες είναι δείκτες διατήρησης του οικοσυστήματος καθώς λειτουργούν ως επικονιαστές. Η επικονίαση είναι μια διαδικασία μεταφοράς αρσενικών γαμετών στο θηλυκό αναπαραγωγικό όργανο και είναι αναπόφευκτη για την αναπαραγωγή των φυτών, άρα και την απόδοση των καλλιεργειών. Η επικονίαση εξαρτάται από τη συμβιωτική σχέση μεταξύ επικονιαστή και γονιμοποιημένων φυτών. Τα περισσότερα είδη φυτών χρειάζονται επικονίαση και η μέλισσα είναι ο σημαντικότερος επικονιαστής, γεγονός που συμβάλλει στη βελτίωση της βιοποικιλότητας και της παγκόσμιας επισιτιστικής ασφάλειας. Οι μέλισσες έχουν ενεργό ρόλο στην γονιμοποίηση των φυτών, καθώς δρουν ως μηχανικοί μεταφορείς της γύρης. Την εποχή της ανθοφορίας, οι μέλισσες προκειμένου να τραφούν, πλάθουν την γύρη και την μεταφέρουν με τα πίσω πόδια τους στην κυψέλη. Πετώντας από άνθος σε άνθος, βοηθούν στην επικονίαση των φυτών, μεταφέροντας ασυναίσθητα την γύρη από τους ανθήρες στο στίγμα του άνθους. Η χρησιμότητα των μελισσών στην επικονίαση είναι μάλιστα και πολύ μεγαλύτερη από την παραγωγή μελιού, αφού μια μέτρια αποικία μελισσών υπολογίζεται ότι έχει 20 με 40 φορές μεγαλύτερη αξία για την επικονίαση που επιτελούν τα μελισσοσμήνη, παρά για την παραγωγή του μελιού (Mallinger, Gaines-Day, & Gratton, 2017).

1.2. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ

Σήμερα σε όλο τον κόσμο υπάρχουν πάνω από 20000 είδη μελισσών και 700 γένη. Το πιο διαδεδομένο είδος μέλισσας είναι η *Apis mellifera* (Brown & Paxton, 2009). Στην Ελλάδα έχουν βρεθεί η *A. Mellifera macedonica* που συναντάται στη βόρεια Ελλάδα, η *A. Mellifera cecropia* στην Πελοπόννησο και στην κεντρική Ελλάδα, η *A. Mellifera adami* στην Κρήτη και στα Επτάνησα η *A. Mellifera carnica* (Graham, 2015).

Οι μέλισσες μπορούν να χωριστούν σε τρεις κύριους τύπους, στις honey bees που ανήκει η *A. mellifera*, στους βομβίνους και στις μοναχικές μέλισσες.

1.2.1. HONEY BEES (*A. mellifera*)

Η μέλισσα είναι ένα κοινωνικό έντομο και ζει σε πολυάριθμες, καλά οργανωμένες κοινωνίες, τα μελίσσια. Κάθε μελίσσι περιλαμβάνει μερικές χιλιάδες μέλισσες, 40.000 ή και περισσότερες στις αρχές του καλοκαιριού, οι οποίες έχουν διαφοροποιηθεί σε τρεις τάξεις, τις εργάτριες που αποτελούν το σύνολο σχεδόν του πληθυσμού, τους κηφήνες και τη βασίλισσα. Πιο αναλυτικά ένα μελίσσι αποτελείται από:

➤ Τις Εργάτριες

Είναι το μικρότερο σε μέγεθος άτομο του μελισσιού. Έχει κοντή κοιλιά, μακριά φτερά, μακριά προβοσκίδα και κεντρί. Έχει όργανα για να συλλέγει και να μεταφέρει νερό, νέκταρ και γύρη, έχει αδένες που μεταξύ άλλων παράγουν βασιλικό πολτό και κερί. Η εργάτρια είναι ατελής θηλυκό και έχει ατροφικό αναπαραγωγικό σύστημα. Σε εποχές έντονης δραστηριότητας, δηλαδή την άνοιξη και το καλοκαίρι, ζει το πολύ 45 μέρες ενώ το χειμώνα μέχρι και 6 μήνες. Η κύρια αποστολή της είναι η ενασχόληση με όλες τις εργασίες του μελισσιού. (Murray, Kuhlmann, & Potts, 2009)

➤ Τον Κηφήνα

Είναι το αρσενικό άτομο του μελισσιού. Έχει κοντή προβοσκίδα, μεγάλα μάτια, φαρδιά κοιλιά και θώρακα. Σε αντίθεση με την εργάτρια δεν έχει κεντρί, ούτε όργανα συλλογής τροφής και παραγωγής κεριού. Το αναπαραγωγικό του σύστημα ωριμάζει 12 μέρες μετά τη γέννησή του και παράγει έως και 10.000.000 σπερματοζωάρια. Η

κύρια αποστολή του είναι η γονιμοποίηση της βασίλισσας. Έτσι όταν το νέκταρ σπανίζει, οι εργάτριες απομακρύνουν τους κηφήνες από το μελίσσι και τους αφήνουν να πεθάνουν από την έλλειψη τροφής. Η διάρκεια ζωής του είναι το πολύ 2 μήνες. (Murray, Kuhlmann, & Potts, 2009)

➤ Τη Βασίλισσα

Είναι το πιο μεγάλοςωμο άτομο του μελισσιού. Οι λαμπρότεροι χρωματισμοί και η μακρύτερη κοιλία την κάνουν να μοιάζει με σφήκα και να ξεχωρίζει εύκολα από τις πιο μικρόσωμες εργάτριες και τους κηφήνες. Δεν έχει όργανα για να συλλέγει γύρη ούτε κηρογόνους αδένες για την παραγωγή κεριού όπως έχουν οι εργάτριες. Η βασίλισσα ζει 3-5 χρόνια και μένει διαρκώς μέσα στην κυψέλη. Πετά έξω απ' αυτή μόνο δύο φορές στη ζωή της, μια για να γονιμοποιηθεί και μία για να σηπουργήσει. Αν βρεθεί από άλλη αιτία έξω από την κυψέλη, δεν μπορεί να επιστρέψει σ' αυτή. Κάθε μελίσσι έχει μια μόνο βασίλισσα, που είναι το μοναδικό τέλειο θηλυκό άτομο του μελισσιού και μαζί η μητέρα όλου του πληθυσμού. Δε συλλέγει τροφή ούτε ασχολείται με άλλες εργασίες. Κύρια αποστολή της είναι η ωοτοκία και η διοίκηση του μελισσιού. (Murray, Kuhlmann, & Potts, 2009)

1.2.2. ΟΙ BOMBINOI (BUMBLEBEES)

Ο Βομβίνος γνωστός ως βομβίνι, βομβιλίος, βόμβος, μπούσμπουρος, μπόμπος ή μπάμπουρας, είναι ημι-κοινωνικά έντομα και κατατάσσονται στις αγριομέλισσες του γένους *Bombus* (= μπόμπους). Οι βομβίνοι οφείλουν την ονομασία του στην ελληνική λέξη βόμβος (= θόρυβος), δηλαδή το χαρακτηριστικό “βόμβο” που παράγεται κατά την πτήση τους. Είναι οι φυσικοί επικονιαστές για πολλά φυτά και ανήκουν στην κατηγορία των ωφέλιμων εντόμων.

Παγκοσμίως είναι γνωστά περίπου 250 είδη βομβίνων τα οποία ανήκουν σε ένα γένος, το *Bombus Latreille*, με 38 υπογένη. Στην Ευρώπη έχουν αναγνωριστεί περίπου 70 είδη *Bombus*, από τα οποία στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί έως τώρα τα 33. (Goulson, Hanley, Darvill, Ellis, & Knight, 2005)

Ο βιολογικός κύκλος των βομβίνων είναι ο τυπικός των ημι-κοινωνικών υμενόπτερων, με τις νέες βασίλισσες να εισέρχονται σε χειμέρια διάπαυση, δηλαδή όταν η βασίλισσα σταματά την ωοτοκία της και δεν παράγεται καθόλου γόνος και η αποικία χάνεται (Goulson D. , *Bumblebees: Their Behaviour and Ecology*, 2003). Οι αποικίες τους είναι ετήσιες και αναπτύσσονται σε φωλιές που ανάλογα με το είδος είναι επιφανειακές ή υπόγειες (Goulson D. , *Bumblebees: Their Behaviour and Ecology*, 2003). Σε κάθε αποικία παράγονται πλήρη ανεπτυγμένα θηλυκά (βασίλισσες), ατελή θηλυκά (εργάτριες) και αρσενικά (κηφήνες). Προς το τέλος του κύκλου της κάθε αποικίας παράγονται τα αναπαραγωγικά άτομα, τα οποία θα συζευχθούν έξω στην ύπαιθρο. Σε όλα τα είδη *Bombus* μόνο οι νέες συζευγμένες βασίλισσες διαχειμάζουν, ενώ όλα τα άλλα μέλη της αποικίας, μαζί και η παλιά βασίλισσα με τους κηφήνες, χάνονται πριν το χειμώνα. (Goulson D. , *Bumblebees: Their Behaviour and Ecology*, 2003)

1.2.3. MONAXIKEΣ ΜΕΛΙΣΣΕΣ (SOLITARY BEES)

Οι μοναχικές μέλισσες ή όπως επιστημονικά ονομάζονται *Adrena spp.* και *Panurginus spp.*, εργάζονται μόνες τους και όχι σε μεγάλες αποικίες όπως οι honey bees και οι βομβίνοι (Danforth, Minckley, & Neff, 2019). Είναι εξαιρετικοί επικονιαστές και περνούν τον περισσότερο χρόνο τους συλλέγοντας νέκταρ και γύρη. Η ποικιλομορφία αυτών των μελισσών είναι τεράστια. Υπάρχουν πράσινες, μπλε, μαύρες, χνουδωτές και λείες μέλισσες (Maccagnani & Sgolastra , 2020). Χτίζουν μόνες τους τη φωλιά τους και γεννάνε αυγά χωρίς την παρουσία άλλων μελισσών. Μερικά από τα είδη αυτής της κατηγορίας μελισσών είναι:

- ο ***XYLOCOPA VIOLACEA***: ζει στην Ευρώπη και την Ασία, το χρώμα της είναι μαύρο και μπλε. Φωλιάζει μέσα σε νεκρό ξύλο φτιάχνοντας “τούνελ - σήραγγες”, για το λόγο αυτό ονομάζεται «μέλισσα ξυλουργός» (Maccagnani & Sgolastra , 2020)
- ο ***OSMIA CAREULESCENS***: ζει στην Ευρώπη, τη Β. Αφρική, την Κεντρική Ασία και τη Β. Αμερική. Το χρώμα της είναι σκούρο μπλε-μαύρο ή πράσινοι μεταλλικό και έχει αραιό τρίχωμα. Φωλιάζει μέσα σε υπάρχουσες κοιλότητες, πάνω σε

νεκρά κομμάτια ξύλου, ρωγμές σε τοίχους και σε ήδη έτοιμες φωλιές από άλλες μέλισσες ή σφήκες. (Maccagnani & Sgolastra , 2020)

- ο ***OSMIA BICORNIS***: ζει στην ηπειρωτική Ευρώπη, στο Ην. Βασίλειο, στην Τουρκία, στη Γεωργία και στο Ιράν. Φωλιάζει σε τρύπες ή μίσχους, και σε έτοιμες φωλιές, αποφεύγοντας να σκάψει τη δικιά της. Έχει βρεθεί σε κλειδαρότρυπες, παλιούς τοίχους, πέτρινες τρύπες και σε ρωγμές παραθύρων. (Maccagnani & Sgolastra , 2020)

Άλλα είδη μοναχικών μελισσών είναι οι *Andrena flavipes*, *Anthidium florentinum*, *Megachile Parientina*, *Anthophora Plumipes*, *Lasioglossum Malachurum*, *Hylaeus punctatus*. (Maccagnani & Sgolastra , 2020)

1.3. ΤΟ ΜΕΛΙΣΣΙ ΩΣ ΚΟΙΝΩΝΙΑ

Η μέλισσα ως κοινωνικό έντομο έχει ιδιαίτερα εντυπωσιακή κοινωνική δομή, το λεγόμενο μελίσσι ή σμάρι μελισσών. Παρουσιάζει χαρακτηριστικά γνωρίσματα κοινωνικών ομάδων όπως: η στατικότητα, η ενδοκοινωνική ομοιόσταση, η αμυντική τους ικανότητα, η εγκατάστασή τους σε πολύ καλές κρύπτες και ο μεγάλος αριθμός των μελών τους. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ο τρόπος λειτουργίας του μελισσιού όπως ο τρόπος που λειτουργεί ένας πολυκύτταρος οργανισμός, δηλαδή έχει συγκεκριμένη δομή, παρουσιάζει μια τυπική συμπεριφορά συλλογής τροφής, ανάλογη συμπεριφορά σύζευξης, αναπτύσσεται, πολλαπλασιάζεται, προσαρμόζεται στις μεταβαλλόμενες συνθήκες του περιβάλλοντος, παρουσιάζει ασθένειες, αλληλοεπιδρά με το περιβάλλον και διαθέτει σύστημα επικοινωνίας των ατόμων που το συγκροτούν, όπως περίπου το ορμονικό σύστημα των πολυκύτταρων οργανισμών. (Aryal, Ghosh, & Jung, 2020)

1.4. ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ

Οι μέλισσες αναπτύσσονται σε τέσσερις φάσεις: το αυγό, την προνύμφη, τη νύμφη και τέλος το ενήλικο έντομο. Για κάθε τάξη μέλισσας ο χρόνος διαφέρει. Πιο συγκεκριμένα, ο κηφήνας χρειάζεται 24 ημέρες για να αναπτυχθεί, οι μέλισσες εργάτριες χρειάζονται 21 ημέρες και η βασίλισσα 16 ημέρες (Παπαδόπουλος, 2014). Πιο αναλυτικά:

➤ Τα αυγά

Η βασίλισσα ωοτοκεί ένα αυγό σε κάθε κελί, το οποίο κολλά στον πυθμένα του κελιού, όρθιο. Μέσα σε 3 ημέρες το ωό γέρνει σταδιακά και ακουμπά στον πυθμένα του κελιού όπου εκκολάπτεται η προνύμφη της μέλισσας. Εάν η βασίλισσα επιλέξει να γεννήσει ένα αυγό σε κελί εργάτριας θα αφήσει ένα γονιμοποιημένο αυγό, αλλά αν επιλέξει να γεννήσει ένα αυγό σε κελί κηφήνα θα αφήσει ένα αγονιμοποίητο. Το ποσοστό του γονιμοποιημένου - αγονιμοποίητου αυγού άρα και τον αριθμό μεταξύ εργατριών - κηφήνων σε ένα μελίσσι το καθορίζουν οι μέλισσες κατά το χτίσιμο των κηρηθρών. (Παπαδόπουλος, 2014)

➤ Οι Προνύμφες

Τα αυγά της τρίτης ημέρας είναι έτοιμα για την εκκόλαψη της προνύμφης. Οι αναπτυσσόμενες προνύμφες τρέφονται από τις εργάτριες μέλισσες με βασιλικό πολτό, γύρη και μέλι μέχρι την ημέρα που οι εργάτριες θα σφραγίσουν τα κελιά με κερί. Αφού σφραγιστούν τα κελιά, οι προνύμφες πλέκουν κουκούλι και περνούν στο στάδιο της νύμφης. Οι προνύμφες που εξελίσσονται σε βασίλισσες τρέφονται αποκλειστικά με άφθονο βασιλικό πολτό όλες τις μέρες της διατροφής τους, ενώ οι προνύμφες που εξελίσσονται σε εργάτριες τρέφονται τις τρεις πρώτες μέρες με λιγοστό βασιλικό πολτό και τις υπόλοιπες με γύρη και μέλι. Η διαφοροποίηση αυτή ονομάζεται διαφοροποίηση κάστας. (Παπαδόπουλος, 2014)

➤ **Η Νύμφη**

Η προνύμφη αφού ολοκληρώσει την κατανάλωση της τροφής στο σφραγισμένο κελί, ακινητοποιείται με το κεφάλι προς την έξοδο του κελιού. Το στάδιο της προνύμφης διαρκεί 6 ημέρες για τη βασίλισσα, 7 ημέρες για την εργάτρια και 9 ημέρες για τον κηφήνα. Μετά την ύφανση του βομβυκίου η προνύμφη μεταμορφώνεται χωρίς αποδερμάτωση σε προ χρυσαλλίδα (prepupa). Στη διάρκεια αυτού του σταδίου γίνονται σημαντικές μεταβολές στο σώμα του εντόμου. (Παπαδόπουλος, 2014)

➤ **Το ενήλικο έντομο**

Μετά από τις 16 ημέρες η βασίλισσα, τις 21 ημέρες η εργάτρια και τις 24 ημέρες ο κηφήνας, που χρειάζονται για να αναπτυχθούν τα ενήλικα έντομα, μασώντας το κέρινο σφράγισμα του κελιού τους ελευθερώνονται από τα κελιά τους. (Παπαδόπουλος, 2014)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΜΕΛΙ

2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *A. mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων που βρίσκονται πάνω στα ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, τα μετατρέπουν αναμειγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματός τους, τα αποθέτουν, τα αφυδατώνουν, τα εναποθηκεύουν και τέλος τα φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν. (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 67 Παράρτημα I, 2016)

2.2. Ο ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ

Η πρώτη ύλη του μελιού είναι το νέκταρ από το οποίο παράγεται το ανθόμελο και το μελίτωμα. Το νέκταρ το παίρνουν οι μέλισσες από τα άνθη, ενώ το μελίτωμα προέρχεται από τα παράσιτα των φυτών (Tinsley, 2015). Τα παράσιτα απορροφούν το χυμό, ο οποίος περνά από το πεπτικό τους σύστημα και σχηματίζεται το μελίτωμα, το οποίο χρησιμοποιούν για τις ανάγκες τους (Tinsley, 2015). Αυτό που περισσεύει βγαίνει με μορφή σταγονιδίων, που οι μέλισσες απομυζούν από το σώμα των παρασίτων ή από τα φύλλα των φυτών όπου πέφτει το μελίτωμα (Tinsley, 2015). Οι συλλέκτριες προσθέτουν στο νέκταρ και στο μελίτωμα σάλιο και το μεταφέρουν στις κυψέλες. Εκεί το μοιράζουν στις εργάτριες και στους κηφήνες. Μέχρι να τοποθετηθεί στα κελιά περνά πολλές φορές από τη μια μέλισσα στην άλλη και κάθε φορά προστίθεται σάλιο, το οποίο μεταβάλλει τα σάκχαρα. Η διαδικασία αυτή συμπυκνώνει το υγρό. Κατά τη διάρκεια πολλών ημερών εξατμίζεται το νερό και η πυκνότητα του υγρού αυξάνει σε σάκχαρα ώσπου να φτάσει στο 70 με 80% (Clement, 2017). Στη συνέχεια οι μέλισσες καλύπτουν το συμπυκνωμένο μέλι με ένα κάλυμμα από κερί (Clement, 2017).

Η σύνθεση του μελιού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τα είδη φυτών απ' όπου συλλέγουν οι μέλισσες το νέκταρ και το μελίτωμα, τη φύση του εδάφους, το είδος των μελισσών, η φυσική κατάσταση του μελισσιού κ.α. Τα μέλια των μελιτωμάτων έχουν σκούρο χρώμα και είναι ελαφρώς κρυσταλλοποιημένα σε αντίθεση με τα μέλια από νέκταρ. Η χημική σύνθεση του μελιού ποικίλει από είδος σε είδος.

2.3. Η ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ

Το μέλι είναι ένα από τα πιο σύνθετα φυσικά τρόφιμα, που δε δέχεται καμία επεξεργασία. Αποτελείται από νερό, φυσικά σάκχαρα, αμινοξέα (κυρίως προλίνη), πρωτεΐνες, ένζυμα, μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Επίσης, περιέχει καροτενοειδή, βιταμίνες και αρωματικές ουσίες. Πιο αναλυτικά περιέχει βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Β2, Β3, Β5, Β6 και Β9), βιταμίνη C, μέταλλα (ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο, φώσφορο, ψευδάργυρο, κάλιο, σελήνιο, χρώμιο και μαγγάνιο), ένζυμα

(διασάση, ιμβερτάση, οξειδάση γλυκόζης, όξινη φωσφατάση, διασάση σακχαρόζης και καταλάση), πτητικές ενώσεις, οργανικά οξέα, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες, αλκαλοειδή, ανθρακινόνη (Masalha, et al., 2018). Είναι πλούσιο σε φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα που εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών επιδράσεων ως φυσικά αντιοξειδωτικά (Ranneh, et al., 2021). Έχει αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Τα θρεπτικά συστατικά που συναντώνται στο μέλι του προσδίδουν αντιμικροβιακή, αντικαρκινική, αντιδιαβητική και επουλωτική δράση (Ranneh, et al., 2021). Εκτός από το θρεπτικό και άμεσο περιεχόμενο, σχεδόν όλοι οι τύποι μελιού περιέχουν πολλές άλλες σημαντικές βιοδραστικές ενώσεις όπως κερκετίνη, φερουλικό οξύ, ισοραμετίνη, καμπεροόλη, ναριγγενίνη, βανιλικό οξύ, χρυσίνη, ελλαγικό οξύ, λουτεολίνη, πινομπανκσίνη, απιγενίνη, πινοσεμβρίνη, γκανιστίνη, γαλανγκίνη, εσπερετίνη, π-κουμαρικό οξύ, γαλλικό οξύ, συριγγικό οξύ και καφεϊκό οξύ (Ashraf, et al., 2023). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την σύστασή του είναι τα είδη φυτών απ' όπου συλλέγουν οι μέλισσες το νέκταρ και το μελίτωμα, η φύση του εδάφους, η ράτσα των μελισσών, η φυσική κατάσταση του μελισσιού, η εποχή, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι συνθήκες κατεργασίας. Τέλος, το μέλι ήταν το πρώτο προβιοτικό της φύσης (Esawy, Awad, Ahmed, Dania, & Mansour, 2012). Αποδείχτηκε, μετά από συνεχείς έρευνες ότι το μέλι των άγριων μελισσών περιέχει μεγάλες ποσότητες καλών βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Esawy, Awad, Ahmed, Dania, & Mansour, 2012). Παράλληλα, τα καλά βακτήρια γαλακτικού οξέος καταστρέφουν μεγάλες ποσότητες επιζήμιων μικροοργανισμών όπως βακτήρια και μύκητες που βρίσκονται στο νέκταρ και στη γύρη που συλλέγουν οι μέλισσες από τα λουλούδια και που θα μπορούσαν να καταστρέψουν την τροφή του μελισσιού.

2.4. Η ΝΟΘΕΙΑ ΤΟΥ ΜΕΛΙΟΥ

Η περιορισμένη διαθεσιμότητα, η τεράστια διατροφική αξία και η υψηλή τιμή του μελιού έχουν οδηγήσει σε έντονο ενδιαφέρον για τη νοθεία του. Η ταυτότητα και η ποιότητα του μελιού θεωρούνται χρήσιμες παράμετροι για την ανίχνευση τυχόν αλλοιώσεων, καθώς και για την επιβεβαίωση των συνθηκών υγιεινής κατά τον χειρισμό και την αποθήκευση του. Ο πιο συχνός τρόπος νοθείας στο μέλι είναι η

προσθήκη φθινών γλυκαντικών ουσιών, όπως η ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο ή η ραφινάρισμαμένη ζάχαρη από ζαχαρότευτλα, το σιρόπι καλαμποκιού ή το σιρόπι μαλτόζης (Puscas, Hosu, & Cîmpoi, 2013). Ένας άλλος τρόπος αλλοίωσης και νόθευσης των μελιών είναι ο υπερσιτισμός των μελισσών με ζάχαρη ή κάποια άλλη μορφή σουκρόζης (Puscas, Hosu, & Cîmpoi, 2013). Η πρώιμη συγκομιδή, όπου η σακχαρόζη δεν έχει μετασχηματιστεί πλήρως σε γλυκόζη και φρουκτόζη καθώς και η παρατεταμένη τεχνητή σίτιση των μελισσών με σιρόπια σακχαρόζης έχουν αποτέλεσμα υψηλά εμπορικά κέρδη (Tornuk, Karaman, Ozturk, & Toker, 2013).

2.5. ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

2.5.1. ΓΥΡΗ

Η προέλευση της γύρης είναι φυτική και υπάρχει στα άνθη των φυτών. Βρίσκεται στους ανθήρες στην άκρη των στημόνων, υπό μορφή σκόνης, σε διάφορα χρώματα και σχήματα ανάλογα με το είδος του φυτού. Οι μέλισσες συλλέγουν τη γύρη από τα άνθη για να τη μεταφέρουν στη φωλιά τους και να τη χρησιμοποιήσουν ως βασικό είδος διατροφής. Αυτή που τους περισσεύει αποθηκεύεται για να χρησιμοποιηθεί αργότερα. Η γύρη αποτελεί βασικό στοιχείο της διατροφής των μελισσών και του γόνου τους, ειδικά στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των προνυμφών. Επίσης, η γύρη αποτελεί την αποκλειστική πρωτεϊνική τροφή των ενήλικων μελισσών καθώς περιέχει πρωτεΐνες, λίπη, ανόργανα στοιχεία και άλλα συστατικά που θεωρούνται αναγκαία για την ανάπτυξη, τη διατήρηση και τη λειτουργία του οργανισμού τους, σε αντίθεση με το μέλι που είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες και χρησιμεύει σαν πηγή ενέργειας.

2.5.2. ΒΑΣΙΛΙΚΟΣ ΠΟΛΤΟΣ

Ο βασιλικός πολτός είναι προϊόν των υποφαρυγγικών αδένων των εργατριών, το οποίο αποθηκεύεται στα βασιλικά κελιά για τη διατροφή των προνυμφών που θα γίνουν βασίλισσες ή για τη διατροφή των νεαρών προνυμφών, έως τριών ημερών. Είναι ουσία λευκή, κρεμμώδης με γεύση γλυκόξινη έως πικρή, πολύ πλούσια σε πρωτεΐνες και σάκχαρα, γεγονός που του προσδίδει υψηλή θρεπτική αξία. Επίσης, περιέχει βιταμίνες, κυρίως της ομάδας Β, καθώς έχει και αντιμικροβιακή δράση. (Ramanathan, Nair, & Sugunan, 2018)

2.5.3. ΠΡΟΠΟΛΗ

Η πρόπολη έχει ρητινώδη σύσταση. Την συλλέγουν εξειδικευμένες εργάτριες, κατά το τελευταίο στάδιο της ζωής τους, από φυτικά μέρη (Simone-Finstrom & Spivak, Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees, 2010). Στη συνέχεια την επεξεργάζονται και την αναμιγνύουν με δικά τους εκκρίματα και τη μεταφέρουν στην κυψέλη. Έχει χρώμα που ποικίλλει από καστανοκίτρινο έως μαύρο, ανάλογα με τη σύστασή της (Simone-Finstrom & Spivak, Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees, 2010). Η χημική σύσταση της πρόπολης όπως και οι φυσικές της ιδιότητες εξαρτάται άμεσα από την χλωρίδα της κάθε περιοχής, καθώς διαφορετικά φυτά δίνουν και διαφορετικές δυνατότητες στις μέλισσες για συλλογή ρητινωδών εκκρίσεων. Η χημική της σύσταση είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη καθώς σε αυτήν έχουν ανιχνευθεί περισσότερες από 300 χημικές ενώσεις (Simone-Finstrom, Borba, Wilson, & Spivak, 2017). Αποτελείται κυρίως από ρητίνη (50%), κερί (30%), αιθέρια έλαια (10%) και γύρη (5%) (Simone-Finstrom, Borba, Wilson, & Spivak, 2017). Τα υπόλοιπα συστατικά της είναι αρωματικές ουσίες, ζάχαρα, τερπένια, αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους, φλαβόνες, ανόργανες ουσίες, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία κ.α.

2.5.4. ΚΕΡΙ

Το κερί είναι προϊόν που παράγουν νεαρές εργάτριες από τους κηρογόνους αδένες που βρίσκονται στην κοιλιά τους (Tulloch, 2015). Τα κύρια συστατικά του είναι οι εστέρες λιπαρών οξέων (70%), λιπαρά οξέα (14%) και υδατάνθρακες (12,5-16%) (Tulloch, 2015). Το καθαρό κερί βγαίνει υπό μορφή λεπιών από τους αδένες και είναι λευκό. Το χρώμα του κεριού στην κυψέλη είναι συνήθως κιτρινωπό, λόγω της πρόσμιξης με γύρη και πρόπολη. (Tulloch, 2015)

2.5.5. ΔΗΛΗΤΗΡΙΟ

Το δηλητήριο της μέλισσας είναι ένα πολύπλοκο μείγμα χημικών ουσιών. Η φαρμακευτική δράση του επηρεάζει τη φυσιολογία του οργανισμού. Στα παλιά χρόνια το χρησιμοποιούσαν για τη θεραπεία των αρθρίτιδων (Kang, Pak, & Choi, 2002). Μερικά από τα συστατικά του προκαλούν στο ανθρώπινο σώμα την παραγωγή φυσικής κορτιζόνης που δεν έχει τις παρενέργειες της συνθετικής (Chen, Guan, Sun, & Fu, 2016). Η μελιτίνη είναι η κυριότερη ουσία του δηλητηρίου, η οποία συντελεί στο οίδημα (πρήξιμο) και στον πόνο που προκαλείται μετά το κέντρισμα, όπως και η ισταμίνη (βιογενής αμίνη) (Chen, Guan, Sun, & Fu, 2016). Η απαμίνη είναι μια άλλη ουσία του δηλητηρίου η οποία επηρεάζει το νευρικό σύστημα (Gu, Han, & Park, 2020). Περιέχονται ακόμη και διάφορα ένζυμα, όπως η υαλουρονιδάση και η Α-φωσφολιπάση (Gu, Han, & Park, 2020).

2.5.6. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Τόσο το μέλι όσο και τα υπόλοιπα μελισσοκομικά προϊόντα αποτελούν σημαντικές πηγές ενέργειας για την υγεία του ανθρώπου. Όχι μόνο από τη διατροφική άποψη αλλά και για τις υπόλοιπες ευεργετικές τους δράσεις. Αρχικά, χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής. Μεγάλη είναι η χρήση στον τομέα της κοσμετολογίας, τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας ως κύρια συστατικά σε κρέμες, σαπούνια και σε άλλα δερματικά σκευάσματα. Επιπρόσθετα, το κερί και οι αρωματικές ύλες

χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αρωματικών χώρου και διάφορων διακοσμητικών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Η σύγχρονη γεωργία χρησιμοποιεί μια σειρά από χημικές ουσίες για την ενίσχυση της απόδοσης των καλλιεργειών και την προστασία τους. Προστίθενται συνθετικά λιπάσματα για την αναπλήρωση των διαφόρων θρεπτικών συστατικών, τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους, την ενίσχυσή του λόγω της ανεπάρκειας των μετάλλων και την προσθήκη επιπλέον χημικών που απαιτούνται για τη σωστή ανάπτυξη υψηλής απόδοσης γεωργικών και κτηνοτροφικών προϊόντων.

Ως παράσιτο μπορεί να οριστεί κάθε οργανισμός που προκαλεί οικονομική απώλεια ή βλάβη στη σωματική ευημερία των ανθρώπων και των ζώων (Marrs & Lakshman Kavalliede, 2012). Επηρεάζουν αρνητικά τη γεωργία, τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Υπάρχει μια σειρά από χημικές ουσίες που μπορούν να σκοτώσουν ή να καταστρέψουν αυτά τα παράσιτα. Αυτές οι χημικές ουσίες ονομάζονται φυτοφάρμακα (Marrs & Lakshman Kavalliede, 2012).

Παρασιτοκτόνο (Pesticides) ή φυτοφάρμακο ή γεωργικό φάρμακό ορίζεται κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, δυνάμενη να χρησιμοποιηθεί ως μέσο καταπολέμησης των εχθρών και ασθενειών των φυτών ή να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών. Στα γεωργικά φάρμακα επίσης ανήκουν οι ρυθμιστές αύξησης των φυτών, οι ελκυστικές ουσίες των εντόμων, πτηνών και άλλων ζώων, οι φερομόνες, τα αποφυλλωτικά και αποξηραντικά φυτών, τα μικροβιακά σκευάσματα ή και προϊόντα του μεταβολισμού τους, που χρησιμοποιούνται εναντίον των εχθρών και ασθενειών των φυτών. Για τον όρο γεωργικό φάρμακο και φυτοφάρμακο η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει καθορίσει και χρησιμοποιεί πλέον τον όρο «φυτοπροστατευτικό προϊόν» ή «φυτοπροστατευτική ουσία». (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1907/2006, 2006)

3.1. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Στο πλαίσιο της δημόσιας υγείας, τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και την εξάλειψη φορέων ασθενειών όπως τα κουνούπια, τα τσιμπούρια και τα τρωκτικά, καθώς επίσης για την προστασία των ζώων από παράσιτα και ασθένειες. Επιπλέον, τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται για την προστασία των σιτηρών και άλλων προϊόντων διατροφής από προσβολές από έντομα και τρωκτικά κατά την αποθήκευση. Η χρήση φυτοφαρμάκων μπορεί να έχει διάφορες επιπτώσεις, θετικές και αρνητικές. Ενώ τα φυτοφάρμακα έχουν σχεδιαστεί για τον έλεγχο ή την εξάλειψη των παρασίτων, ο αντίκτυπός τους στο περιβάλλον, στην ανθρώπινη υγεία και στα μη στοχευόμενα είδη εγείρει ανησυχίες.

3.1.1. ΟΙ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΤΗΣ ΧΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

- Τα φυτοφάρμακα μπορούν να μολύνουν τον αέρα, το έδαφος και το νερό, οδηγώντας σε περιβαλλοντική ρύπανση, επηρεάζοντας τα υδάτινα οικοσυστήματα. Βλάπτουν τους οργανισμούς μη-στόχους, συμπεριλαμβανομένων των ωφέλιμων εντόμων, των πτηνών και της υδρόβιας ζωής, διαταράσσοντας τα φυσικά οικοσυστήματα. (Yigit & Yakup Sedat Velioglu, 2019)
- Τα φυτοφάρμακα μπορούν να βλάψουν ωφέλιμους οργανισμούς όπως επικονιαστές (μέλισσες, πεταλούδες) και φυσικούς θηρευτές παρασίτων, διαταράσσοντας την ισορροπία των οικοσυστημάτων. (Hassaan & Ahmed El Nemr, 2020)
- Σημαντικές επιπτώσεις προκαλούν τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων που πιθανότατα να παραμένουν στις επεξεργασμένες καλλιέργειες, οδηγώντας σε πιθανή έκθεση στους καταναλωτές. Αυτό έχει εγείρει ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των προϊόντων και τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.
- Η παρατεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα παράσιτα στόχους, καθιστώντας τα φυτοφάρμακα λιγότερο αποτελεσματικά με την πάροδο του χρόνου. Αυτό απαιτεί τη χρήση υψηλότερων δόσεων ή

εναλλακτικών χημικών ουσιών, συμβάλλοντας σε έναν κύκλο αυξανόμενης χρήσης φυτοφαρμάκων.

- Η έκθεση σε φυτοφάρμακα έχει συσχετιστεί με πολλά ζητήματα υγείας στους ανθρώπους, όπως οξεία δηλητηρίαση, χρόνια προβλήματα υγείας και αυξημένο κίνδυνο ορισμένων ασθενειών.
- Επιπλέον, ορισμένα έχουν αναγνωριστεί ως πιθανά καρκινογόνα. Η επαγόμενη από τη χρήση και την έκθεση σε αυτά αποτελεί θέμα συνεχιζόμενης έρευνας και οι ρυθμιστικοί φορείς αξιολογούν τα διαθέσιμα επιστημονικά στοιχεία για την ταξινόμηση ουσιών με βάση τη δυνατότητά τους να προκαλέσουν καρκίνο (Bassil, et al., 2007). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η αξιολόγηση της καρκινογένεσης είναι περίπλοκη και ότι διαφορετικοί ρυθμιστικοί φορείς ενδέχεται να καταλήξουν σε διαφορετικά συμπεράσματα με βάση τις αξιολογήσεις τους για τα διαθέσιμα στοιχεία. Επιπλέον, οι κανονισμοί και οι ταξινομήσεις φυτοφαρμάκων ενδέχεται να αλλάξουν με την πάροδο του χρόνου καθώς διεξάγονται συνέχεια επιστημονικές μελέτες.

3.2. ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ

Τα φυτοφάρμακα ανάλογα με τους τύπους των παρασίτων που σκοτώνουν ή ελέγχουν διακρίνονται σε μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, νηματοκτόνα, τρωκτικοκτόνα και εντομοκτόνα.

3.2.1. ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

Τα μυκητοκτόνα είναι βιολογικές ή χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ή την εξάλειψη μυκητιακών ασθενειών σε φυτά, ζώα και ανθρώπους (Pandya, 2018). Οι μύκητες μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες ασθένειες στις καλλιέργειες, οδηγώντας σε σημαντικές απώλειες στη γεωργική παραγωγή, καθώς και ασθένειες σε ανθρώπους και ζώα (RUSSELL, 2005).

Τα μυκητοκτόνα διακρίνονται σε:

A. Ανόργανα με βάση το θείο και τον χαλκό. Με βάση τον χαλκό χρησιμοποιούνται συχνά στη βιολογική γεωργία. (Pandya, 2018)

B. Οργανικά που προέρχονται από φυσικές πηγές και μπορεί να περιλαμβάνουν φυτικά εκχυλίσματα, αιθέρια έλαια ή μικροοργανισμούς. (Pandya, 2018)

Γ. Συνθετικά μυκητοκτόνα που είναι χημικές συνθετικές ενώσεις που έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν ειδικά και να αναστέλλουν την ανάπτυξη μυκήτων. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το azoxystrobin, το captan και το thiophanate-methyl. (Pandya, 2018)

3.2.2. ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ

Είναι οργανικά μόρια που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ζιζανίων. Τα ζιζάνια είναι κάθε φυτό που εμφανίζεται εκεί που δεν είναι επιθυμητό. Έχουν σχεδιαστεί για να σκοτώνουν φυτά που μερικές φορές ανήκουν στην ίδια οικογένεια με το καλλιεργούμενο φυτό. Επίσης, απαιτείται εκλεκτικότητα που είναι πολύ σημαντικότερη για τα ζιζανιοκτόνα από ότι για τα μυκητοκτόνα και τα εντομοκτόνα. Κατέχουν το μεγαλύτερο μέρος της αγοράς γεωργικών φαρμάκων παγκοσμίως. Αποτελούν συχνούς ρύπους των υπογείων και επιφανειακών νερών. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης, υπάρχουν εκλεκτικά και μη εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα, ζιζανιοκτόνα επαφής, μετατοπισμένα ζιζανιοκτόνα, ζιζανιοκτόνα που εφαρμόζονται στο φύλλωμα και ζιζανιοκτόνα που εφαρμόζονται στο έδαφος. (Barros, et al., 2020)

3.2.3. ΝΗΜΑΤΩΔΟΚΤΟΝΑ

Τα νηματωδοκτόνα είναι τύπος χημικού φυτοφάρμακου που χρησιμοποιείται για την εξόντωση των φυτό-παρασιτικών νηματωδών, οι οποίοι είναι μικροσκοπικοί στρογγυλοί σκώληκες που μπορούν να έχουν επιζήμιες επιπτώσεις στα φυτά, στα ζώα και στους ανθρώπους (Pandya, 2018). Γενικά έχουν τοξική δράση ευρέως φάσματος, υψηλή πτητικότητα και άλλες ιδιότητες που επιτρέπουν τη μεταφορά τους μέσω του χώματος. Οι σκώληκες αυτοί μπορούν να προκαλέσουν ζημιά στις καλλιέργειες, να

μειώσουν τις αποδόσεις και να μεταδώσουν ασθένειες. Ο τρόπος δράσης τους μπορεί να είναι υπό μορφή καπνισμού, υποκαπνισμού ή μη υποκαπνισμού (Gad, 2014).

Τα νηματωδοκτόνα διακρίνονται σε:

A. Χημικά: είναι συνθετικές χημικές ουσίες που ταξινομούνται συχνά με βάση τη χημική δομή ή τον τρόπο δράσης τους. Ωστόσο, ορισμένα από αυτά ενδέχεται να δημιουργούν ανησυχίες για το περιβάλλον και την υγεία, οδηγώντας σε προσπάθειες για την εξεύρεση ασφαλέστερων εναλλακτικών λύσεων. (Gad, 2014)

B. Βιολογικά: πρόκειται για προϊόντα που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς, όπως βακτήρια, μύκητες, οι οποίοι δρουν ως φυσικοί εχθροί των φυτοπαράσιτων νηματωδών. Αυτή η κατηγορία θεωρείται πιο φιλική προς το περιβάλλον. (Gad, 2014)

3.2.4. ΤΡΩΚΤΙΚΟΚΤΟΝΑ

Τα τρωκτικοκτόνα είναι χημικές ουσίες που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για τον έλεγχο και την εξάλειψη των τρωκτικών. Τα τρωκτικά, όπως οι αρουραίοι και τα ποντίκια, μπορούν να δημιουργήσουν διάφορα προβλήματα, όπως καταστροφές στις καλλιέργειες, μόλυνση των τροφίμων καθώς και μετάδοση ασθενειών. Ωστόσο, η χρήση τους απαιτεί προσοχή λόγω πιθανών κινδύνων για το περιβάλλον και για τα ζώα που δεν αποτελούν στόχο.

Τα τρωκτικοκτόνα διακρίνονται σε:

A. Αντιπηκτικά (είναι τα πιο κοινά): παρεμβαίνουν στην πήξη του αίματος αναστέλλοντας τη δράση της βιταμίνης K, οδηγώντας σε εσωτερική αιμορραγία και στο θάνατο (Pelfrène, 2010). Τα αντιπηκτικά τρωκτικοκτόνα ταξινομούνται σε ενώσεις πρώτης γενιάς (π.χ. βαρφαρίνη) και δεύτερης γενιάς (π.χ. brodifacoum, bromadiolone). (McGee, McGilloway, & Buckle, 2020)

B. Μη Αντιπηκτικά: δρουν μέσω διαφορετικών μηχανισμών, όπως η διαταραχή των κυτταρικών λειτουργιών ή η επίδραση του νευρικού συστήματος. (McGee,

McGilloway, & Buckle , 2020). Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων είναι το φωσφίδιο ψευδαργύρου, η χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D3) και η βρωμεθαλίνη. (Pandya, 2018)

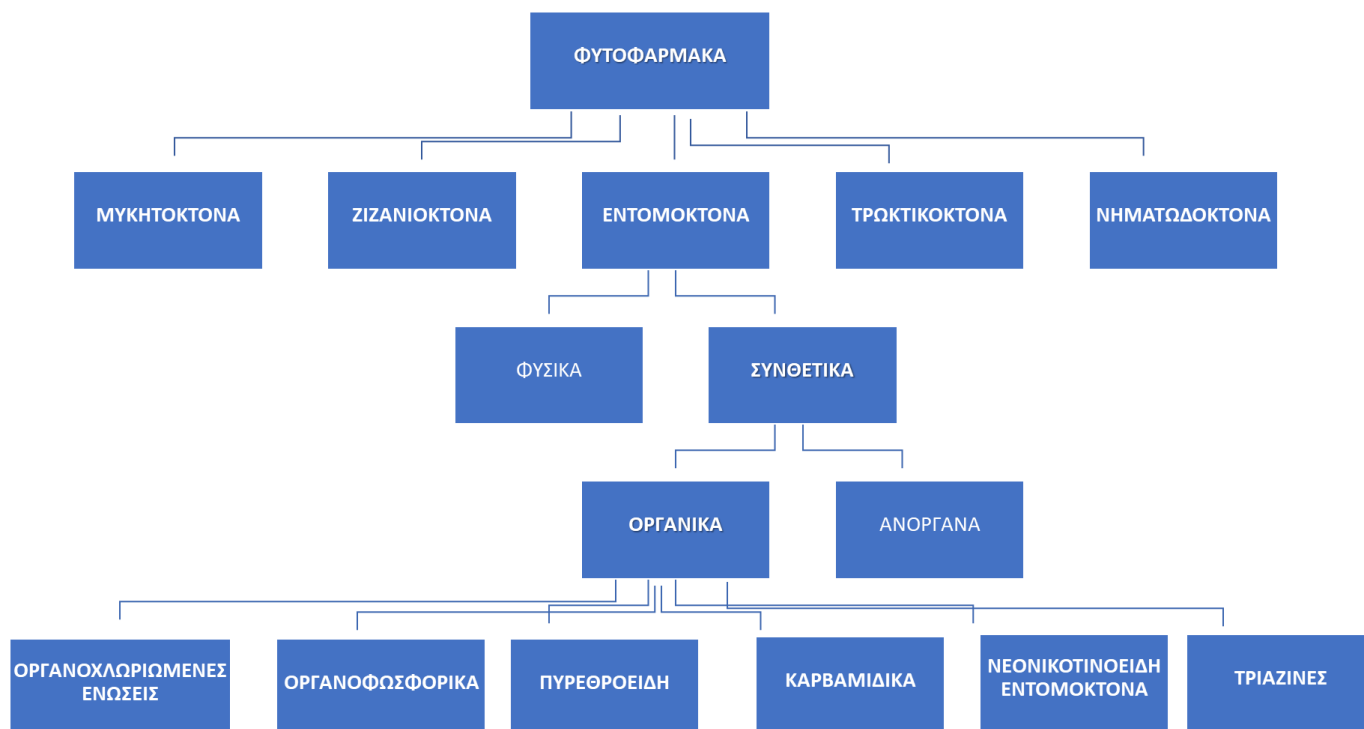
3.2.5. ENTOMOKTONA

Τα εντομοκτόνα είναι ουσίες είτε φυτικής είτε συνθετικής προέλευσης και ταξινομούνται με βάση των τρόπο χρήση τους. Πιο συγκεκριμένα διακρίνονται σε αυτά του στομάχου/πεπτικού σωλήνα (δηλητηριώδη κατά την κατάποση), δηλητήρια επαφής και υποκαπνιστά (εισπνεόμενα) (Aloizou , et al., 2020). Για παράδειγμα, τα φυσικά εντομοκτόνα περιλαμβάνουν *Azadirachta indica* (Margosa/Neem), *Boenighausenia albiflora*, *Peganum harmala*, Derris (ροτενόνη) και χρυσάνθεμο (πύρεθρο) (Pandya, 2018).

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων (IGR) είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα που αναστέλλουν την ανάπτυξη του εξωσκελετού ή τη σύνθεση χιτίνης (CA, Rajput KH, & Ugale BJ, 2017). Κάποια από τα συνθετικά εντομοκτόνα είναι πτητικά υγρά (καπνιστά) που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των εντόμων σε αποθηκευμένους σπόρους και φρούτα (Pandya, 2018).

3.3. ΟΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΤΟΥΣ ΔΟΜΗ

Τα χημικά φυτοφάρμακα είναι τοξικές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη θανάτωση παρασίτων. Με βάση τη χημική δομή, τα κύρια φυτοφάρμακα ομαδοποιούνται σε: (i) Οργανοχλωριομένες ενώσεις, (ii) Οργανοφωσφορικά, (iii) Πυρεθροειδή, (iv) Καρβαμιδικά, (V) Νεονικοτινοειδή και (vi) Τριαζίνες. (Leoci & Ruberti, 2021)



Εικόνα 3.1. Η ταξινόμηση των φυτοφαρμάκων με βάση την χημική τους δομή

3.3.1. ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ (OCs)

Πρόκειται για οργανικές ενώσεις που χαρακτηρίζονται από την παρουσία ατόμων χλωρίου. Είναι λιπόφιλα μόρια και παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με τον λιπώδη ιστό των ζώων. Επίσης, είναι ισχυρές τοξικές ενώσεις του νευρικού συστήματος (CA, Rajput KH, & Ugale BJ, 2017). Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις έχουν πολύ χαμηλή βιοαποικοδόμηση, συσσωρεύονται στο περιβάλλον προκαλώντας σοβαρά προβλήματα. Ο τρόπος δράσης τους εξαρτάται από τη χημική βάση του εντομοκτόνου. Το πιο διαδεδομένο είναι το DDT. Η συγκέντρωση του DDT που ανιχνεύεται στα υψηλότερα στρώματα της τροφικής αλυσίδας είναι 10.000.000 φορές μεγαλύτερη από αυτήν που υπάρχει στο νερό (Pandya, 2018). Λόγω των ιδιοτήτων τους, από τα τέσσερα κύρια εντομοκτόνα αυτής της ομάδας DDT, DDD, methoxychlor και perthane, τα δύο πρώτα έχουν παντελώς απαγορευθεί από κάθε χρήση (Sharma, Arun Kumar Sharma, & A. K. Chopra, 2020). Τα OCs, που έχουν ποια απαγορευτεί στις περισσότερες χώρες παγκοσμίως, έχουν ποικίλες θέσεις δράσης, όπως τα κανάλια νατρίου ή χλωρίου που ανταγωνίζονται την αναστολή του

γ-αμινοβουτουρικού οξέος (GABA receptor) (Zaganas, et al., 2013). Τα OCs έχουν αναφερθεί ότι έχουν οξείες και χρόνιες παρενέργειες, οι οποίες επηρεάζουν κυρίως τη λειτουργία του ήπατος και των οργάνων του αναπαραγωγικού συστήματος.

3.3.2. ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ (OPs)

Είναι κυρίως, εστέρες, αμίδια ή ανυδρίτες του φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος. Ο τρόπος δράσης τους είναι ο εξής: όπως και τα καρβαμιδικά αμφότερα αναστέλλουν το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE), οδηγώντας στη συσσώρευση ακετυλοχολίνης (ACh) στις συνάψεις (Costa, Giordano, Guizzetti, & Vitalone, 2008). Αν και τα συμπτώματα οξείας τοξικότητας τους είναι παρόμοια, η δηλητηρίαση που προκαλείται από τα καρβαμιδικά είναι συνήθως γρήγορα αναστρέψιμη, σε αντίθεση με τα OPs. Επιπλέον, τα OPs έχουν συνδεθεί με πιο χρόνιες ανεπιθύμητες ενέργειες σε σύγκριση με τα καρβαμιδικά, όπως η καθυστερημένη πολυνευροπάθεια, τα νευροψυχολογικά επακόλουθα και η αναπτυσσόμενη νευροτοξικότητα (Ranjan & Jindal, 2021). Έχουν μικρή υπολειμματικότητα και μικρό χρόνο ημιζωής στο περιβάλλον. Δυστυχώς, έχουν συχνά ευρεία δράση σε ωφέλιμα έντομα καθώς και επιβαρύνουν χημικά τα οικοσυστήματα και επιδρούν σε οργανισμούς μη-στόχους (Kumar & Jose Savio Melo, 2017). Τα γνωστότερα εντομοκτόνα αυτής της κατηγορίας είναι το παραθείο και το μαλάθειο (Kumar & Jose Savio Melo, 2017). Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά εναντίον των μυζητικών εντόμων, όπως η αφίδα (μελίγκρα) και τα ακάρεα, τα οποία τρέφονται απομυζώντας τους χυμούς των φυτών. (Pandya, 2018)

3.3.3. ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΥΡΕΘΡΟΕΙΔΗ

Είναι τροποποιημένοι εστέρες του χρυσανθεμικού οξέος, ενός χημικού που προσομοιάζει το βασικό συστατικό των χρυσανθέμων (Pandya, 2018). Αλλαγές στα όξινα συστατικά προσδίδουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής σε σύγκριση με τις φυσικές πυρεθρίνες (CA, Rajput KH, & Ugale BJ, 2017). Επίσης, οι δόσεις των συνθετικών πυρεθροειδών είναι το 10% των δόσεων των οργανοφωσφορικών. Παραδείγματα πυρεθροειδών είναι τα Allethrin, Bifenthrin και Cypermethrin, τα οποία είναι εντομοκτόνα ευρέος φάσματος ταχείας δράσης (Ahamad & Jitendra Kumar Ph.D, 2023). Τα πυρεθροειδή επιβραδύνουν την ενεργοποίηση και την αδρανοποίηση των διαύλων νατρίου, οδηγώντας σε υπερδιέγερση (Ensley, 2018).

3.3.4. ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ

Τα καρβαμιδικά είναι οργανικές ενώσεις παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος. Ο τρόπος δράσης των καρβαμιδικών είναι αρκετά παρόμοιος με αυτόν των οργανοφωσφορικών. Πιο συγκεκριμένα, οι καρβαμιδικές ενώσεις εμποδίζουν τη δράση του ενζύμου χολινεστεράση, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της ουσίας ακετυλοχολίνη, μεταξύ νEURων και μυών (νευρομυικές συνάψεις) (Pandya, 2018). Η δραστηριότητα αυτή είναι αναστρέψιμη (Cao, et al., 2020). Σε αντίθεση με άλλα φυτοφάρμακα όπως τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά φυτοφάρμακα δεν είναι ανθεκτικά στο περιβάλλον, ωστόσο, η αποικοδόμησή τους είναι κρίσιμη λόγω της τοξικότητάς τους στο περιβάλλον και τους ζωντανούς οργανισμούς (Mustapha, Normala Halimoon, Wan Lutfi Wan Johar, & Mohd Yunus Abd Shukor, 2019). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, κατηγοριοποίησε τα καρβαμιδικά φυτοφάρμακα ως τοξικά, επικίνδυνα και περιορισμένης χρήσης (Gupta, Jitendra K. Malik, & Dejan Milatovic, 2011). Χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο πολλών εντόμων και παρασίτων των καλλιεργειών. Μερικά χρησιμοποιούμενα καρβαμιδικά είναι το Carbofuran (Furadan), το Propoxur (Baygon) και το Aldicarb (Temik) (CA, Rajput KH, & Ugale BJ, 2017). Επίσης, παράγωγα καρβαμιδικών χρησιμοποιούνται ως ζιζανιοκτόνα (φαινυλοκαρβαμιδικά, θειοκαρβαμιδικά) και μυκητοκτόνα διθειοκαρβαμιδικά (Leoci & Ruberti, 2021). Τα καρβαμιδικά είναι χρήσιμα στον έλεγχο των νηματωδών και των σαλιγκαριών (Pandya, 2018).

3.3.5. ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ ENTOMOKTONA

Είναι σχετικά νέα κατηγορία εντομοκτόνων που προέρχονται από τη νικοτίνη. Τα νεονικοτινοειδή ασκούν τη δράση και την τοξικότητά τους μέσω της ενεργοποίησης των νικοτινικών υποδοχέων (Blacquie`re, Guy Smagghe, Cornelis A. M. van Geste, & Veerle Mommaerts, 2012). Εξαιτίας της υψηλής νευροτοξικότητάς τους για τα έντομα, τα συγκεκριμένα εντομοκτόνα είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά για τον έλεγχο ορισμένων παρασίτων (Pandya, 2018). Χρησιμοποιούνται για τον ψεκασμό των φυλλωμάτων, σε κόκκους ή ως επικάλυψη (επένδυση) των σπόρων (Sgolastra, et al., 2020). Χρησιμοποιούνται στο καλαμπόκι, τον ηλιάνθο, σε οπωροφόρα δέντρα, πατάτες και πολλές άλλες καλλιέργειες. Τα συγκεκριμένα εντομοκτόνα απορροφώνται από ολόκληρο το σύστημα των φυτών, ενώ τα υπολείμματά τους εντοπίζονται σε όλα τα μέρη των φυτών, συμπεριλαμβανομένων της γύρης και του

νέκταρ (Goulson D. , REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides, 2013). Ένα από τα πιο γνωστά νεονικοτινοειδή είναι η ιμιδακλοπρίδη (Goulson D. , REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides, 2013). Αυτή η ουσία έχει αποδειχθεί τοξική για τις μέλισσες. Οι χαμηλές ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις σε συνδυασμό με τη χαμηλή τοξικότητα της συγκεκριμένης ουσίας στους ανθρώπους είναι καθησυχαστικές για την ασφάλεια των καταναλωτών (Pandya, 2018). Αντίθετα, η υψηλή τοξικότητα για τις μέλισσες καθιστά τα νεονικοτινοειδή ύποπτα για το θάνατο των μελισσών. Αυτό έχει αναφερθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας που ευθύνεται για την απότομη μείωση του παγκόσμιου πληθυσμού των μελισσών, γνωστή ως διαταραχή κατάρρευσης αποικιών. Ως αποτέλεσμα, η χρήση νεονικοτινοειδών σε καλλιέργειες ανοιχτού αγρού απαγορεύεται πλέον στην ΕΕ και περιορίζεται σε ορισμένες περιοχές των ΗΠΑ, των Φιλιππίνων και του Καναδά (Blacquiere, Guy Smagghe, Cornelis A. M. van Geste, & Veerle Mommarts, 2012). Τα νεονικοτινοειδή έχουν έναν μοναδικό συνδυασμό ιδιοτήτων, όπως υψηλή τοξικότητα, μακροχρόνια ανθεκτικότητα, υψηλή συστημικότητα και υψηλή κινητικότητα, που τα κάνουν να ξεχωρίζουν από άλλα φυτοφάρμακα (CA, Rajput KH, & Ugale BJ, 2017).

3.3.6. ΤΡΙΑΖΙΝΕΣ

Οι τριαζίνες (Simazine, Atrazine, κ.τ.λ.) είναι μια ομάδα ζιζανιοκτόνων που προέρχονται από την ουρία (Trebst, 2008). Οι τριαζίνες χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των ζιζανίων στο τσάι, στον καπνό και στο βαμβάκι (Pandya, 2018). Οι τριαζίνες αναστέλλουν τη φωτοσυνθετική διαδικασία στα φυτά μπλοκάροντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II, οδηγώντας τελικά τα φυτά σε θάνατο (Trebst, 2008). Οι τριαζίνες είναι γνωστές για την παραμονή τους στο έδαφος, κάτι που μπορεί να είναι ένα πλεονέκτημα για τον έλεγχο των ζιζανίων για μεγάλο χρονικό διάστημα, ωστόσο, εγείρει ανησυχίες για πιθανές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Trebst, 2008).

3.4. Η ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Η τοξικότητα μιας ουσίας εκφράζεται σε τιμές μέσης θανατηφόρου δόσης LD₅₀ (Lethal dose). Πιο αναλυτικά, είναι η ποσότητα της ουσίας που θανατώνει το 50% ενός πληθυσμού πειραματόζωων όταν χορηγείται σε μια δόση. Η τιμή LD₅₀ εκφράζεται σε ppm ή σε mg ανά Kg βάρους του πειραματόζωου. Όσο πιο μικρή η LD₅₀, τόσο πιο τοξική είναι η ένωση. Εκτός από την LD₅₀, χρησιμοποιείται και ο όρος επίπεδο μη παρατήρησης αποτελέσματος (non observed effect level-NOEL) και είναι η μέγιστη συγκέντρωση στην οποία δεν εμφανίζεται καμία βλάβη στο πειραματόζωο. Με βάση το NOEL υπολογίζεται η ανώτατη επιτρεπτή ημερήσια δόση, επίσης σε mg/Kg βάρους σώματος του πειραματόζωου. Στη συνέχεια υπολογίζεται η αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (acceptable daily intake-ADI) για τον άνθρωπο. Για τον υπολογισμό αυτό θεωρείται πως ο άνθρωπος είναι δέκα φορές πιο ευαίσθητος από το πειραματόζωο και επιπλέον χρησιμοποιείται ένας δεκαπλάσιος συντελεστής ασφάλειας.

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό με τρεις τρόπους:

- Μέσω της δερματικής επαφής
- Από το αναπνευστικό σύστημα
- Από το στόμα

Οι τοξικές επιπτώσεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα πρόσληψης μεγάλων δόσεων σε μικρό χρονικό διάστημα (οξεία τοξικότητα), ή μικρών δόσεων για μεγάλο χρονικό διάστημα (χρόνια τοξικότητα).

Η τοξικότητα ενός γεωργικού φαρμάκου εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες. Εκτός της ομάδας στην οποία ανήκει, σημαντικό ρόλο παίζουν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, η δόση, η διάρκεια έκθεσης, ο τρόπος εφαρμογής, η φυσική του κατάσταση και τελικά ο τρόπος έκθεσης στο φάρμακο. Πολύ σημαντικό είναι η παρουσία πάνω από μίας φυτοπροστατευτικής ουσίας, καθώς είναι άγνωστο τι αλληλεπίδραση θα έχει με τις άλλες, ανταγωνιστική, συνεργιστική, πολλαπλασιαστική. Τέλος, καθοριστικό ρόλο παίζουν η τοξικοκινητική και η τοξικοδυναμική που χαρακτηρίζει την κάθε ουσία.

Στα αποτελέσματα μιας οξείας τοξικότητας μπορούν να αναφερθούν ως δηλητηριάσεις, δυσφορία, ερεθισμοί ματιών, δέρματος και αναπνευστικού συστήματος. Επίσης, τα παρασιτοκτόνα μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνα για την πρόκληση ορισμένων μορφών καρκίνου, καθώς και για την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου. Το γεγονός ότι ο πιο επικίνδυνος τρόπος έκθεσης σε μία δραστική ουσία είναι μέσω της κατάποσης καταδεικνύει τη σημασία που έχουν για τον καταναλωτή τα ελεύθερα από υπολείμματα τρόφιμα, που δεν υπόκεινται σε καμία μέθοδο επεξεργασίας. Άξια αναφοράς είναι η κατάταξη των δραστικών ουσιών και με βάση την τοξικότητα τους στις μέλισσες. Έτσι έχουμε φάρμακα πολύ τοξικά, μετρίως τοξικά και μη τοξικά για τις μέλισσες.

Class	Toxicity	Examples
Class IA	Extremely dangerous	Parathion, Dieldrin
Class IB	Highly dangerous	Eldrin, Dichlorvos
Class II	Moderately hazardous	DDT, Chlordane
Class III	Slightly hazardous	Malathion

Εικόνα 3.2. : Ταξινόμηση των φυτοφαρμάκων σύμφωνα με την τοξικότητα, (Garcia, Cortés Ascencio, Gaytan Oyarzun, Ceruelo Hernandez, & Vazquez Alavarado, 2012)

3.5. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΚΑΤΑΛΟΙΠΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

Ως υπολείμματα ορίζονται οι χημικές ουσίες ή οι μεταβολίτες φυτοπροστατευτικών προϊόντων που μπορούν να συσσωρευτούν στους ιστούς ή στα βρώσιμα μέρη των ζώων που έχουν υποστεί αγωγή (Md Shohel Rana, Lee, Kang, & Hur, 2019). Τα κατάλοιπα προέρχονται από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών από φυσικές τοξίνες, βιομηχανικούς ρύπους, αγροχημικά, κτηνιατρικά φάρμακα, από την επεξεργασία και την συσκευασία των τροφίμων (Md Shohel Rana, Lee, Kang, & Hur, 2019).

Αναγκαίο κρίνεται τόσο ο υπολογισμός των κατάλοιπων των σκευασμάτων αυτών όσο και σε ποια ποσότητα είναι επικίνδυνα για τους ανθρώπους, τα ζώα και το περιβάλλον. Έτσι, θεσπίστηκαν τα μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (Maximum Residue Levels– MRLs), τα οποία ορίζονται ως οι μέγιστες επιτρεπόμενες

συγκεντρώσεις καταλοίπων κτηνιατρικών προϊόντων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, οι οποίες επιτρέπονται νόμιμα και καθίστανται ως ασφαλείς για την υγεία του καταναλωτή.

Στον Καναδά τα MRLs κτηνιατρικών φαρμάκων καθορίζονται από την Κτηνιατρική Διεύθυνση του Καναδά, ενώ στις ΗΠΑ από το Κέντρο Διαχείρισης Φαρμάκων και Τροφίμων (Food and Drug Administration – FDA). Όσον αφορά την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων ορίζεται αυστηρώς μέσω του κανονισμού της ΕΕ 2377/90/ ΕΚ. Σε διεθνές επίπεδο τα MRLs καθορίζονται από τον διατροφικό κώδικα (Codex Alimentarius) (Khaled, Gionfriddo , Acquaro Jr, Singh, & Pawliszyn , 2019).

Τα περισσότερα φυτοφάρμακα μπορούν να καταστούν τοξικά και η χρήση τους πρέπει να ελέγχεται από πολλούς αρμόδιους κυβερνητικούς φορείς. Αυτό επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό των μεγίστων επιτρεπόμενων ορίων καταλοίπων στα επεξεργασμένα προϊόντα, ώστε να γίνει εκτίμηση του πιθανού κινδύνου στην ανθρώπινη υγεία. Η εκτίμηση βασίζεται στον έλεγχο της μέγιστης δοσολογίας χορήγησης, στον αριθμό των θεραπειών και στο ελάχιστο διάστημα μεταξύ τελευταίας εφαρμογής και συγκομιδής (Ambrus & Yang, 2015). Εάν υπάρχει έλλειψη βασικών δεδομένων έχει καθοριστεί ως μέγιστο επιτρεπόμενο όριο καταλοίπων από την Ευρωπαϊκή Ένωση τα 0,01 mg/kg, λαμβάνοντας υπόψη τα βρέφη και τα μικρά παιδιά (Li Z. , 2018). Η πρόσληψη καταλοίπων φαρμάκων μέσω της τροφής αποτελεί δυνητικό κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Συγκεκριμένα, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε πολλαπλά φάρμακα και καρκινογένεσης, διαταραχή της εντερικής φυσιολογικής μικροχλωρίδας (Md Shohel Rana, Lee, Kang, & Hur, 2019), αλλά και τερατογόνες επιδράσεις, αντιδράσεις υπερευαισθησίας στο φάρμακο και μεταλλαξιογόνες δράσεις.

Ο Κανονισμός 396/2005 της Ε.Ε. καθορίζει τις μέγιστες ποσότητες καταλοίπων φυτοφαρμάκων που επιτρέπεται να υπάρχουν σε προϊόντα ζωικής ή φυτικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για ζωοτροφές. Με τους κανονισμούς 2377/90 και 37/2010 σχετικά με φαρμακολογικές δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, απαγορεύτηκε η χρησιμοποίηση θεραπευτικών σκευασμάτων σε παραγωγικά ζώα όταν δεν έχουν καθοριστεί ανεκτές ποσότητες

καταλοίπων (MRL) στα προϊόντα που παράγονται, εκτός αν οι συγκεκριμένες ουσίες αναφέρονται στον κανονισμό ως ακίνδυνες. (European Commission, 2009)

3.5.1. ΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΣΤΟ ΜΕΛΙ

Με την πάροδο των χρόνων και την εξέλιξη της τεχνολογίας βελτιώθηκαν η παραγωγή και η επεξεργασία των τροφίμων. Έγιναν άλματα με τη χρήση βιομηχανικών λιπασμάτων, φυτοπροστατευτικών ουσιών και γενικότερα φαρμάκων για την προστασία από ασθένειες του ζωικού βασιλείου, με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής και την επάρκεια τροφίμων. Ωστόσο, η κατάχρηση που παρατηρήθηκε στην πορεία των χρόνων σε διάφορα προϊόντα τέτοιου τύπου (ζιζανιοκτόνα, παρασιτοκτόνα, εντομοκτόνα) και η τοξικότητα τέτοιων προϊόντων δημιούργησε προβλήματα σχετικά με την ασφάλεια και την ποιότητα των παραγόμενων τροφίμων. Το μέλι και τα μελισσοκομικά προϊόντα δεν αποτελούν εξαίρεση, καθώς υπολείμματα απαγορευμένων ή ανεπιθύμητων ουσιών ανευρίσκονται σε αυτά με αποτέλεσμα την εμφάνιση δυνητικών κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία λόγω, κυρίως, της χρόνιας τοξικότητας.

Η μέλισσα είναι επιρρεπής στη δηλητηρίαση από φυτοφάρμακα, παράγοντας που είναι πιθανή αιτία μείωσης του πληθυσμού των μελισσών και η εμφάνιση της διαταραχής κατάρρευσης αποικιών. Οι απώλειες αποικιών έχουν αποδοθεί σε πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών, των ακαρεοκτόνων και άλλων χημικών σκευασμάτων.

Η επιβάρυνση των μελισσοκομικών προϊόντων με υπολείμματα συμβαίνει κυρίως με δύο τρόπους:

- με την μεταφορά ουσιών στην κυψέλη από την ίδια τη μέλισσα καθώς αυτή συλλέγει τροφή. Πρόκειται κυρίως για φυτοπροστατευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες και στους περιβαλλοντικούς ρύπους (βαρέα μέταλλα)
- με κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιεί ο μελισσοκόμος στην κυψέλη προκειμένου να αντιμετωπίσει τις ασθένειες των μελισσών

Ο προσδιορισμός των MRLs στο μέλι και τα μελισσοκομικά προϊόντα έχει γίνει πολύ σημαντικός για την ανθρώπινη υγεία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή πληροφοριών παρακολούθησης σχετικά με τη χρήση φυτοφαρμάκων στη γεωργία. Μέχρι τώρα, τα περισσότερα φυτοφάρμακα είχαν όριο το 0,01 mg/kg ως προεπιλεγμένη τιμή για τα υπολείμματα MRL στο μέλι.

Σε όλο τον κόσμο, το μέλι εξάγεται και εισάγεται και τα περισσότερα έθνη αποδέχονται τα κριτήρια του Codex Alimentarius. Όμως, τα διάφορα έθνη έχουν τους δικούς τους κανονισμούς, οι οποίοι στερούνται ομοιογένειας στον έλεγχο των μέγιστων συγκεντρώσεων υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων προκαλώντας προβλήματα στο διεθνές μάρκετινγκ και το εμπόριο. Για παράδειγμα, η Γερμανία, η Ελβετία και η Ιταλία έχουν θέσει διαφορετικές τιμές MRL για τα φυτοπροστατευτικά amitraz, bromopropylate, coumaphos, cyamizole, flumetrine, και tau-fluvalinate, τα οποία είναι 0,01 με 0,1 mg/kg στη Γερμανία, στην Ελβετία είναι μεταξύ 5 και 500 mg/kg και έως 10 mg/kg στην Ιταλία (Ashraf, et al., 2023).

Ακόμη ένα παράδειγμα όσον αφορά την διαχείριση φυτοφαρμάκων είναι για τα νεονικοτινοειδή. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων κατέληξε στο συμπέρασμα τον Φεβρουάριο του 2018 ότι οι περισσότερες χρήσεις νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων αντιπροσωπεύουν κίνδυνο για τις μέλισσες. Έτσι, το 2018 απαγόρευσε την χρήση των clothianidin, imidacloprid και thiamethoxam. Ως εκ τούτου, όλες οι χρήσεις των τριών ουσιών σε εξωτερικούς χώρους απαγορεύονται και μόνο η χρήση σε μόνιμα θερμοκήπια παραμένει δυνατή (Regulation (EU) No 485/2013) (Jactel, et al., 2019)

Παρακάτω θα αναλυθούν οι πιο σημαντικές ασθένειες που μπορούν να πλήξουν τις μέλισσες, οι χημικές ενώσεις που τις αντιμετωπίζουν και οι επιπτώσεις που έχουν αυτές στη μέλισσα, στα προϊόντα της αλλά και στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΟ ΜΕΛΙ

Τα αντιβιοτικά πέρα από τη θεραπευτική τους χρήση στον τομέα της ιατρικής, χρησιμοποιούνται και σε άλλους τομείς, όπως είναι η κτηνοτροφία, οι ιχθυοκαλλιέργειες και η γεωργία, προκειμένου να εξασφαλίσουν τη βιωσιμότητα και την αύξηση της παραγωγικότητας των ζώων και των φυτών. Όμως, η ευρεία χρήση τους έχει οδηγήσει σε ανησυχητική αύξηση των ανθεκτικών στελεχών που απομονώνονται από τρόφιμα, τα οποία προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Τα σημαντικότερα προβλήματα που δημιουργούν τα ανθεκτικά στελέχη στα αντιβιοτικά τροφιογενή παθογόνα είναι:

1. η αναποτελεσματικότητα του αντιβιοτικού με αποτέλεσμα την αύξηση της δόσης του, η παράταση του χρόνου χορήγησης και η αύξηση του κόστους θεραπείας
2. η ενίσχυση της παθογόνου δράσης του βακτηρίου, με αποτέλεσμα την πρόκληση πιο μακροχρόνιας και πιο σοβαρής νόσου
3. ο αυξημένος κίνδυνος μόλυνσης των ανθρώπων που ήδη κάνουν χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων για την καταπολέμηση άλλων νόσων
4. η διασπορά ασθενειών στην κτηνοτροφία

Όταν οι αντιβακτηριακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται κατά μη ορθό τρόπο και τα υπολείμματα αυτών παραμένουν στα τρόφιμα, τότε αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τους καταναλωτές. Ειδικότερα ο κίνδυνος γίνεται μεγαλύτερος στις ευπαθείς ομάδες με αποτέλεσμα την εκδήλωση αλλεργικών αντιδράσεων και άλλων τοξικών συμπτωμάτων. Ωστόσο, είναι εξίσου σημαντικό να μην ξεχνάμε ότι ο κίνδυνος, στον οποίο εκτίθενται οι καταναλωτές από τα κατάλοιπα, δεν είναι ο ίδιος με εκείνον ο οποίος οφείλεται στη μητρική ουσία του φαρμάκου, καθώς τα φάρμακα μεταβολίζονται στον οργανισμό του ζώου στο οποίο χορηγήθηκε. Έτσι, για την προστασία της δημόσιας υγείας, μετά την ολοκλήρωση των φαρμακολογικών, τοξικολογικών και λοιπών ελέγχων ασφαλείας του φαρμακευτικού προϊόντος, το επόμενο στάδιο που ακολουθεί είναι ο ορισμός της Ημερήσιας Αποδεκτής Πρόσληψης (ADI). Η παρουσία αντιβιοτικών στα τρόφιμα, είτε είναι ζωικής, είτε φυτικής προέλευσης είναι ένα πολύ σοβαρό πρόβλημα. Το γάλα, το κρέας, τα ψάρια

ιχθυοτροφείου, τα αυγά και το μέλι παράγονται όλα σε αγροτικό περιβάλλον που εκμεταλλεύονται τα οφέλη της σύγχρονης φαρμακοβιομηχανίας. Τα υπολείμματα στα τρόφιμα δημιουργούν αμφισβήτηση στον καταναλωτή και αρνητικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία, με αποτέλεσμα τον ιδιαίτερα αρνητικό οικονομικό αντίκτυπο στη βιομηχανία τροφίμων.

Ένα από τα κύρια προβλήματα της ασφάλειας των τροφίμων και ειδικότερα του μελιού είναι η παρουσία κτηνιατρικών φαρμάκων και των υπολειμμάτων τους. Η ύπαρξη αντιβιοτικών, αλλά και των καταλοίπων στο μέλι μπορεί να οδηγήσει σε αρνητικές επιπτώσεις, για τις μέλισσες, αφού αποδυναμώνει το αμυντικό τους σύστημα, επηρεάζει τον τρόπο ανάπτυξής τους και τον μεταβολισμό τους. Εκτός από το αρνητικό αντίκτυπο των αντιβιοτικών στις μέλισσες, μπορούν να υπάρξουν αρνητικές συνέπειες και στον άνθρωπο έπειτα από κατανάλωση μελιού λόγω παρουσίας υπολειμμάτων. Ακόμη και ίχνη συγκέντρωσης στο μέλι και στα μελισσοκομικά προϊόντα μπορούν να είναι εξαιρετικά επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία. Η παράνομη χρήση αντιβιοτικών ως κτηνιατρικών φαρμάκων είναι καλά τεκμηριωμένη σε όλο τον κόσμο, ανεξάρτητα από την κοινωνικοοικονομική κατάσταση. Οι μέλισσες ως ζωντανοί οργανισμοί ασθενούν, καθώς η μελισσοκομία αποτελεί έναν αναπτυσσόμενο κλάδο της αγροτικής παραγωγής και παρουσιάζεται επιτακτική η ανάγκη της γνώσης, πρόληψης και αντιμετώπισης των ασθενειών που ταλαιπωρούν τα μελίσσια.

Οι κύριες ασθένειες των μελισσών για τις οποίες εφαρμόζονται αντιβιοτικά είναι η Αμερικάνικη Σηψιγονία (American foulbrood) , η Ευρωπαϊκή Σηψιγονία (European foulbrood) και η Νοσεμίαση (Venable, Haynes, & Cook, 2014). Οι λοιμώξεις από την Αμερικανική και την Ευρωπαϊκή Σηψιγονία προκαλούνται από βακτήρια, ενώ η Νοσεμίαση προκαλείται από μύκητα (Moretti, Saluti, & Galarini, 2017).

4.1. ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ ΣΗΨΙΓΟΝΙΑ (AMERICAN FOULBROOD)

Η Αμερικανική σηψιγονία είναι από τις πιο σημαντικές παθογόνους ασθένειες των μελισσών. Η ασθένεια προκαλείται από το βακτήριο, *Paenibacillus larvae larvae* (Graaf, et al., 2006). Προσβάλλει τις γηραιότερες λάρβες και τις νεαρές νύμφες, οι οποίες δέχονται πέψη από ένζυμα που εκκρίνονται από βακτήρια. Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι η αλλοίωση του χρώματος της κηρήθρας σε βαθύ καφέ, ο διάσπαρτος γόνος, η βύθιση των καλυμμάτων του σφραγισμένου γόνου με δημιουργία μικρής οπής σε ορισμένα απ' αυτά και ο σχηματισμός κολλώδους ελαστικής ίνας κατά το τράβηγμα, με χαρακτηριστική δυσάρεστη οσμή, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε λέπι που δεν απομακρύνεται εύκολα από τις μέλισσες (Ratnieks, 2015). Επειδή τα σπόρια είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά και μπορούν να επιβιώσουν για πολλά χρόνια, σε πολλές χώρες μεταξύ αυτών και στην Ελλάδα, επιβάλλεται να καίγονται οι προσβεβλημένες κηρήθρες αμέσως μετά τη διάγνωση (Ratnieks, 2015). Σε άλλες χώρες (Η. Π. Α., Καναδά), επιτρέπεται η χρήση αντιβιοτικών έτσι ώστε η ασθένεια να είναι ελεγχόμενη. Η Αμερικανική σηψιγονία μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε εποχή του έτους, αρκεί να υπάρχει γόνος στο μελίσσι. Ωστόσο, η πάθηση εκδηλώνεται πιο συχνά προς το τέλος του θέρους. Τα αντιβιοτικά μπορούν να περιορίσουν και όχι να εξαλείψουν την ασθένεια και γι' αυτό το λόγο στις μολυσμένες κυψέλες πρέπει να χορηγούνται συστηματικά, έτσι ώστε να αποφευχθεί ένα ξέσπασμα της ασθένειας. Αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα, η ασθένεια μπορεί να αφανίσει τον πληθυσμό της κυψέλης ή ακόμη και να αποδεκατίσει ένα μελίσσι (Graaf, et al., 2006).

4.2. Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΣΗΨΙΓΟΝΙΑ (EUROPEAN FOULBROOD)

Η Ευρωπαϊκή σηψιγονία παρουσιάζει παρόμοια συμπτώματα, με εκείνα της Αμερικάνικης, η διαφορά είναι ότι προκαλείται από τον μικροοργανισμό *Melissococcus plutonius*. Επίσης, είναι πιο ήπια σε σχέση με την Αμερικάνικη σηψιγονία (Floyd, et al., 2020). Γενικά, το βακτήριο προσβάλλει μόνο τις νεότερες προνύμφες. Η αντιμετώπιση της ασθένειας αυτής είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με αυτή της Αμερικάνικης. Μόνο σε οξείες περιπτώσεις, χρειάζονται δραστικά μέτρα

όπως το κάψιμο των μελισσιών. Χημικά μέσα που έχουν εφαρμοστεί για την αντιμετώπισή της είναι το σκεύασμα Arimycin με δραστική ουσία την ερυθρομυκίνη, η τεραμυκίνη και το Oxynvet 5% με δραστική ουσία την oxytetracycline (Floyd, et al., 2020). Άλλα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν εναντίον της Ευρωπαϊκής σηψιγονίας και είχαν περιορισμένη αποτελεσματικότητα είναι η penicillin, η streptomycin, η septilline, η chloramphenicol, η neomycin και η karpomycin (Floyd, et al., 2020).

4.3.ΝΟΣΕΜΙΑΣΗ (NOSEMA)

Η Νοσεμίαση προκαλείται από δύο είδη μικροσποριδιακών παρασίτων (είδος μύκητα που σχηματίζει σπόρους), το *Nosema apis* (*N. apis*) και το *Nosema ceranae* (*N. ceranae*) (Reybroeck, Residues of antibiotics and chemotherapeutics in honey, 2017). Το *N. apis* πιστεύεται ότι προέρχεται από ευρωπαϊκές μέλισσες, ενώ το *N. ceranae* ότι εξελίχθηκε ως παράσιτο των ασιατικών μελισσών (*Apis cerana*) καθώς άρχισε να επηρεάζει τις ευρωπαϊκές μέλισσες σχετικά πρόσφατα (Reybroeck, Residues of antibiotics and chemotherapeutics in honey, 2017). Το *N. ceranae* φαίνεται να είναι πιο επιζήμιο από το *N. apis*, καθώς προσβάλλει περισσότερα κύτταρα στο μέσο έντερο των ενήλικων μελισσών, οδηγώντας τις μολυσμένες μέλισσες στο θάνατο πιο γρήγορα από το *N. apis* (Reybroeck, Residues of antibiotics and chemotherapeutics in honey, 2017). Αυτά τα δύο είδη προσβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα του μέσου εντέρου των ενήλικων μελισσών (*Apis mellifera*), δηλαδή τις εργάτριες μέλισσες, τους κηφήνες και τις βασίλισσες (Mitrowska & Antczak, Transfer of nitroimidazoles from contaminated beeswax to honey, 2016). Όμως, η *N. ceranae* δεν καταστρέφει μόνο τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, αλλά και τα βασικά του κύτταρα, που σημαίνει ότι ο οργανισμός δεν απαλλάσσεται εύκολα από το παράσιτο, αλλά πιθανόν να δημιουργούνται επιπλέον προϋποθέσεις για την είσοδο και άλλων παθογόνων, όπως ιών που σε συνδυασμό με το ενεργειακό στρες, μπορούν να επηρεάσουν και την αποτελεσματικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, ώστε να τον καταστήσουν ιδιαίτερα ευπρόσβλητο και σε άλλα παθογόνα.

Αυτή η ασθένεια επηρεάζει αρνητικά την παραγωγικότητα και την επιβίωση των αποικιών μελισσών, τη μακροζωία των ενήλικων μελισσών, τις βασίλισσες, την εκτροφή του γόνου, τη βιοχημεία των μελισσών και τη συλλογή γύρης (Papini, et al., 2017). Επιπλέον, το *N. ceranae* συσχετίζεται με μια συγκεκριμένη μορφή νοζεμίας που μπορεί να οδηγήσει στην ερήμωση και την κατάρρευση των αποικιών (Evans & Schwarz, 2011).

Οι λοιμώξεις από τα στελέχη *Nosema* πιθανώς οφείλονται σε πρόσθετους παράγοντες όπως οι εποχικές και κλιματικές συνθήκες, η διατροφική κατάσταση της αποικίας, η δόση του εμβολιασμού, η ταυτόχρονη μόλυνση με άλλα παθογόνα και η γενετική του ξενιστή (Evans & Schwarz, 2011). Ως ολομεταβολικά έντομα, οι μέλισσες προχωρούν σε εμβρυϊκά, προνυμφικά, νυμφικά και ενήλικα στάδια ανάπτυξης που το καθένα περιλαμβάνει μια ξεχωριστή οικολογική θέση για τα μικρόβια (Evans & Schwarz, 2011).

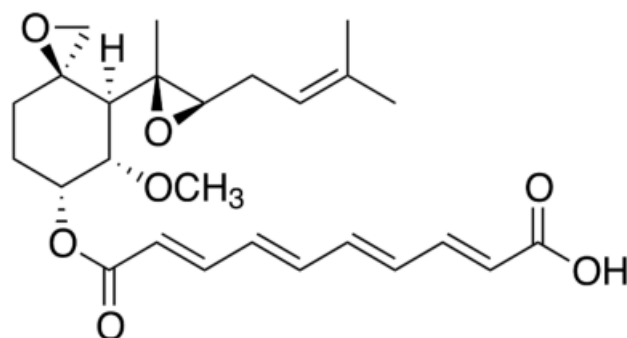
Οι παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη και την εξάπλωση της *N. apis* είναι: α) η τροφοδοσία των μελισσών με ακατάλληλες τροφές, β) η τροφοδοσία με σιρόπι πολύ αργά το φθινόπωρο, γ) οι κακές συνθήκες ξεχειμωνιάσματος, δ) η προσβολή μελισσιών από χρόνια παράλυση και οι ε) συχνές μετακινήσεις του μελισσοκομείου το φθινόπωρο.

Τα συνήθη συμπτώματα της *N. apis* είναι: α) οι μέλισσες με διογκωμένες κοιλίες που αδυνατούν να πετάξουν και σέρνονται με τα φτερά ανοιγμένα, β) τα περιττώματα μελισσών στα τοιχώματα και στα καπάκια των κυψελών, γ) ο σημαντικός αριθμός νεκρών μελισσών μπροστά στην είσοδο των κυψελών, δ) η αλλαγή του χρώματος του πεπτικού σωλήνα της προσβεβλημένης μέλισσας, από καστανοκόκκινο σε γκριζωπό που στη συνέχεια γίνεται γαλακτερό και δε διακρίνονται οι δακτύλιοι του (Goblirsch, 2017). Η *N. ceranae* έχει σημαντική επίπτωση στη διατροφική συμπεριφορά των προσβεβλημένων μελισσών. Συγκεκριμένα οι προσβεβλημένες μέλισσες ανταποκρίνονται περισσότερο στην κατανάλωση σουκρόζης και τείνουν να μοιραστούν λιγότερο το φαγητό τους με τις άλλες μέλισσες καθώς έχουν μεγαλύτερη πείνα σ' αυτή την περίπτωση (Goblirsch, 2017).

Το πιο συχνό αντιβιοτικό που έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της νοσεμίας είναι η Φουμαγγιλίνη, η οποία μπορεί να ελέγξει και τη μόλυνση από τη *N. ceranae*.

Άλλες χημικές ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ίδια ασθένεια είναι οι Νιτροϊμιδαζόλες.

4.4. ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ (FUMAGILLIN)



Εικόνα 4.1. Η χημική δομή της φουμαγγιλίνης (Guruceaga, et al., 2019)

Η φουμαγγιλίνη είναι ένα πολύπλοκο βιομόριο το οποίο χρησιμοποιείται σαν αντιμικροβιακός παράγοντας. Απομονώθηκε το 1949 από τον μύκητα *Aspergillus fumigatus* (Guruceaga, et al., 2019). Είναι αντιπροσωπευτική μίας ομάδας σεσκιτερπενίων, που εμφανίζει ενδιαφέρουσες βιολογικές δραστηριότητες. Πιο συγκεκριμένα, η φουμαγγιλίνη είναι ένα δεκατετραενοδιοϊκό οξύ που συνδέει ένα κυκλοεξάνιο με έναν εστερικό δεσμό. Το κυκλοεξάνιο έχει επίσης μια μεθοξύ ομάδα, ένα εποξείδιο και μια αλειφατική αλυσίδα που προέρχεται από ένα τερπένιο και περιέχει ένα άλλο εποξείδιο. Αυτά τα εποξείδια είναι εν μέρει υπεύθυνα για την αστάθεια του μορίου (Guruceaga, et al., 2019). Αρχικά, είχε περιγραφεί ως ένα αντιμικροβιακό μέσο αλλά ανακαλύφθηκε ότι αυτή η ένωση είναι ένας ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας αγγειογένεσης (Nozal M. , et al., 2008). Η αγγειογένεση αποτελεί διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων από ένα προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο και διακρίνεται σε φυσιολογική, που αναστέλλεται σε χρονικό διάστημα ημερών ή και εβδομάδων και σε παθολογική, που εξελίσσεται χρονίως και συνδυάζεται με τον καρκίνο (Nozal M. , et al., 2008).

Στην ιατρική, χρησιμοποιείται η ουσία fumagillin dicyclohexylamine για την αντιμετώπιση της μόλυνσης του εντερικού συστήματος από σποροζωικά παράσιτα (Moretti, Saluti, & Galarini, 2017). Στην κτηνιατρική, η φουμαγγιλίνη είναι αποτελεσματική στην καταστολή της προσβολής από σποροζωικά παράσιτα σε

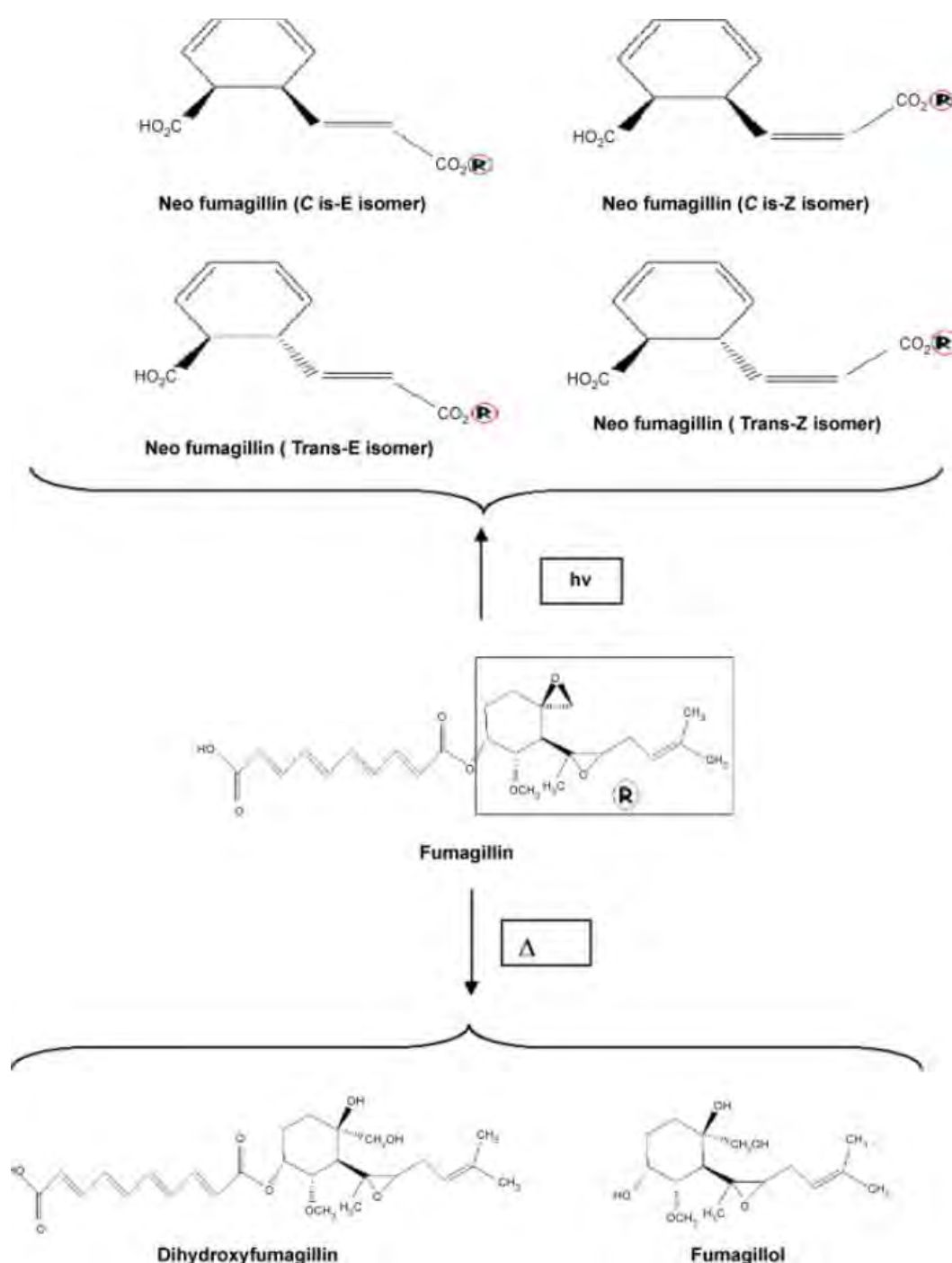
μέλισσες και ψάρια. Όμως, μέσω πειραμάτων διαπιστώθηκε ότι η φουμαγγιλίνη προκαλεί μία σημαντική μείωση στους μιτωτικούς δείκτες, οι οποίοι είναι ενδείξεις κυτταροτοξικότητας (Lima, et al., 2020). Αν παραμένουν υπολείμματα στο μέλι ή σε μία κυψέλη, υπάρχει πιθανότητα γενοτοξικού ρίσκου, δηλαδή γενετικών βλαβών, για τους μελισσοκόμους, καθώς εκτίθενται σε αυτήν κατά την εφαρμογή στις κυψέλες αλλά και για τους καταναλωτές μελιού, το οποίο έχει επιβαρυνθεί με αυτή την ουσία. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι όλες οι δοκιμασμένες συγκεντρώσεις της ουσίας αυτής αύξησαν σημαντικά τη συχνότητα της SCE (sister chromatide exchange) ανά κύτταρο (Lima, et al., 2020). Επομένως, λόγω της γενοτοξικής και καρκινογόνου δράσης της έχει απαγορευτεί η χρήση της. Όμως, κυκλοφορεί παράνομα πλέον για τη μελισσοκομία, ως σκεύασμα με την εμπορική ονομασία Fumidil – B. Το αντιβιοτικό Fumidil B είναι σε μορφή σκόνης, το οποίο αναμιγνύεται με ζάχαρη και νερό ώστε να σχηματιστεί σιρόπι για να τραφούν οι μέλισσες. Η τροφοδοσία δεν πρέπει να γίνεται κατά τη διάρκεια της συγκομιδής του μελιού και ούτε λίγο πριν από αυτή.

Η φουμαγγιλίνη έχει βρεθεί ότι είναι εξαιρετικά ασταθής όταν εκτίθεται στο ηλιακό φως. Επίσης, διασπάται και σε φθορίζον φως δωματίου. Είναι μη υδατοδιαλυτό μόριο, όμως μπορεί να διαλυθεί σε οργανικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη ή το DMSO (Nozal M. , και συν., 2008). Λόγω της όξινης φύσης της καρβοξυλικής ομάδας, η πολικότητα του μορίου αυξάνεται με το pH (Guruceaga, et al., 2019). Επομένως, η διαλυτότητα της φουμαγγιλίνης στο νερό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH. Το όξινο τμήμα του μορίου είναι υπεύθυνο για την ισχυρή απορρόφηση της ουσίας στην υπεριώδη περιοχή, με μέγιστο στα 335 και 350 nm (Guruceaga, et al., 2019). Η συγκεκριμένη ένωση μεταβολίζεται ταχύτατα σε τέσσερις ενώσεις, με την ίδια μοριακή μάζα, που είναι διαστερεοϊσομερή της neo fumagillin (Guruceaga, et al., 2019). Η θερμοκρασία έχει λιγότερο σημαντική επίδραση. Το σημαντικό είναι πως και οι μεταβολίτες της είναι εξίσου δραστικοί.

Έχει βρεθεί ότι τα όρια ανίχνευσης στο σκουρόχρωμο μέλι είναι υψηλότερα σε σχέση με τα πιο ανοιχτόχρωμα, οπότε χρειάζεται προσοχή η προέλευση του μελιού (Moretti, Saluti, & Galarini, 2017).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από πειράματα απέδειξαν ότι είναι ιδιαιτέρως αποτελεσματική στην καταπολέμηση της *N.ceranae* και της *N.apis*. Ο τρόπος δράσης της είναι να επηρεάζει την αντιγραφή των μικροσποριδίων και αποτρέπει τα

αναπαραγωγικά στάδια του παρασίτου από το να επιτεθούν στα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου της μέλισσας (Guruceaga, et al., 2019). Όμως η τοξική της δράση οδήγησε στην απαγόρευση της χρήσης της καθώς επίσης δεν έχουν ορισθεί MRLs για τη συγκεκριμένη ουσία. Το πρόβλημα που επιφέρει η τοξικότητά της μπορεί να λυθεί μέσω της ανάπτυξης παραγώγων αυτής που διατηρούν τη δραστηριότητά τους αλλά με χαμηλότερα επίπεδα τοξικότητας (Guruceaga, et al., 2019).



Εικόνα 4.2. Οι μεταβολίτες της φουμαγγιλίνης (Nozal M. , et al., 2008)

4.5. ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ (NITROIMIDAZOLES)

Μία από τις κύριες οικογένειες ενώσεων που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και τον έλεγχο της νοσεμίας στη μελισσοκομία πέρα από τη φουμαγγιλίνη είναι οι Νιτροϊμιδαζόλες (NMZs).

Οι νιτροϊμιδαζόλες ανήκουν στην ομάδα των νιτροετεροκυκλικών ενώσεων που παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία. Η πρώτη ετεροκυκλική ένωση που χρησιμοποιήθηκε στην ανθρώπινη ιατρική ήταν η νιτροφουραζόνη, ένα παράγωγο νιτροφουρανίου που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πολέμου για τις αντιβακτηριακές του ιδιότητες για τη θεραπεία εγκαυμάτων και πληγών (Biagi, 1982).

Οι νιτροϊμιδαζόλες είναι μια κατηγορία οργανικών ενώσεων που περιέχουν μια νιτροομάδα ($-NO_2$) και ένα δακτύλιο ιμιδαζόλης στη χημική τους δομή (MITAL, 2009). Η ιμιδαζόλη είναι ένας πενταμελής δακτύλιος που περιέχει δύο άτομα αζώτου και η προσθήκη μιας νιτροομάδας δημιουργεί τις νιτροϊμιδαζόλες (Vidal, Aguilera-Luiz, Romero-González, & Garrido Frenich, 2009). Οι νιτροϊμιδαζόλες είναι μια καλά εδραιωμένη ομάδα αντιπρωτοζωικών και αντιβακτηριακών παραγόντων που αναστέλλουν την ανάπτυξη τόσο των αναερόβιων βακτηρίων όσο και ορισμένων αναερόβιων πρωτόζωων, όπως τα *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* και *Giardia lamblia* (MITAL, 2009).

Η δράση των νιτροϊμιδαζολών πέρα από αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή, δρα και ως τρυπανοκτόνο, δηλαδή ως ένας αντιπρωτοζωικός παράγοντας που δρα στα παράσιτα του τρυπανοσώματος (Huang, Lin, & Yuan, 2011). Επίσης, τα παράγωγα των νιτροϊμιδαζολών έχουν δοκιμαστεί σε κυτταρικές αναλύσεις και σε προσδιορισμούς ενζύμων έναντι της ανασυνδυασμένης ανάστροφης μεταγραφάσης HIV (Biagi, 1982). Οι νιτροαμιδαζόλες έχουν χρησιμοποιηθεί έναντι της λεϊσμανίασης (MITAL, 2009). Η *Leishmania* είναι ένα πρωτόζωο που περνάει ένα μέρος του βιολογικού του κύκλου του σε σκνίπες και ένα μέρος του βιολογικού του κύκλου σε διάφορα θηλαστικά όπως οι σκύλοι, τα τρωκτικά και ο άνθρωπος (MITAL, 2009). Το παράσιτο αυτό προκαλεί σοβαρές λοιμώξεις, τις λεϊσμανιάσεις, που διαφέρουν ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή, το είδος του παρασίτου και το είδος της σκνίπας που εντοπίζεται σε κάθε περιοχή (MITAL, 2009). Επιπλέον, οι νιτροϊμιδαζόλες έχουν αξιοποιηθεί και ως ραδιοευαισθητοποιητές (Evans & Schwarz,

2011). Ο ραδιοευαίσθητοποιητής είναι ένας παράγοντας που κάνει τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στην ακτινοθεραπεία (Evans & Schwarz, 2011). Μπορεί η οικογένεια των νιτροϊμιδαζολών να παίζουν σημαντικό ρόλο έναντι διάφορων ασθενειών, όμως πειράματα και αναλύσεις έχουν δείξει ότι έχουν τοξική δράση με καρκινογόνοι και μεταλλαξιογόνοι αποτελέσματα (Biagi, 1982), (Lei, et al., 2018).

Μία από τις πιο σημαντικές ενώσεις της οικογένειας των νιτροϊμιδαζολών είναι η μετρονιδαζόλη, η οποία ταξινομείται στην ομάδα 2B ως πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο, καθώς έχουν αποδειχθεί οι καρκινογόνες ιδιότητές της σε ζώα (Biagi, 1982). Οι νιτροϊμιδαζόλες είναι γνωστό ότι μεταβολίζονται ταχέως στα ζώα (Cronly, et al., 2010). Για τη μετρονιδαζόλη, ο κύριος μεταβολίτης που σχηματίζεται από την υδροξυλίωση είναι η υδροξυμετρονιδαζόλη (Reybroeck, Residues of antibiotics and chemotherapeutics in honey, 2017). Με τον ίδιο τρόπο, η διμετριδαζόλη και η ρονιδαζόλη παράγουν υδροξυδιμετριδαζόλη και η ρονιδαζόλη μεταβολίζεται σε υδροξυρονιδαζόλη (Venable, Haynes, & Cook, 2014). Οι μεταβολίτες μπορεί να έχουν παρόμοιο μεταλλαξιογόνο δράση με τις αρχικές ενώσεις (Biagi, 1982). Κατά συνέπεια, δεν έχουν καθοριστεί ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRL) για αυτές τις ενώσεις. Επομένως, η διμετριδαζόλη και η ρονιδαζόλη έχουν απαγορευτεί, ενώ οι άλλες νιτροϊμιδαζόλες δεν έχουν λάβει άδεια χρήσης σε ζώα παραγωγής τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των μελισσών, εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (THE EUROPEAN COMMISSION, 2010).

Επιπλέον, ως αποτέλεσμα της Οδηγίας 96/23/EK του Συμβουλίου, αυτές οι νιτροϊμιδαζόλες ταξινομούνται ως ενώσεις A6 και η παρακολούθησή τους απαιτείται εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης καθώς και από τις χώρες που εξάγουν στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Αναφορά της Ευρωπαϊκής Επιτροπής 1996) (Melekhin, et al., 2024).

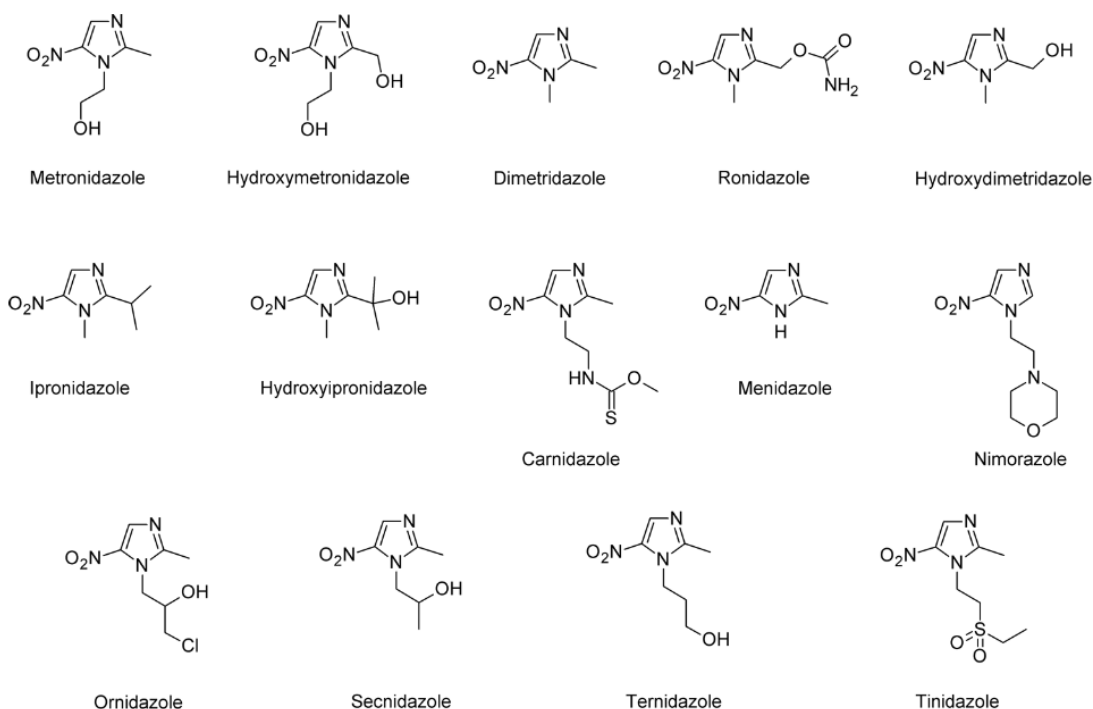
Οι νιτροϊμιδαζόλες απαγορεύονται παγκοσμίως (THE EUROPEAN COMMISSION, 2010) λόγω της καρκινογόνου και μεταλλαξιογόνου δράσης τους (Galarini, Saluti, Giusepponi, Rossi, & Moretti, 2015). Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει καθορίσει το ελάχιστο απαιτούμενο επίπεδο απόδοσης (MRPL) στα 3 µg/kg για τις νιτροϊμιδαζόλες (Melekhin, et al., 2024). Η τινιδαζόλη (TNZ) δεν έχει εγκριθεί ως κτηνιατρικό φάρμακο και θεωρείται επίσης ως απαγορευμένη ουσία στην Κίνα (Reybroeck, Daeseleire, Brabander, & Herman, 2012). Η μετρονιδαζόλη (MNZ) είναι

η πιο σύνηθες υπολειπόμενη ουσία που βρίσκεται στα δείγματα μελιών (Reybroeck, Daeseleire, Brabander, & Herman, 2012). Επίσης, η χρήση τους απαγορεύεται στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Κίνα (Cronly, et al., 2010).

Πέρα από τις νιτροϊμιδαζόλες, αντιβιοτικά όπως η χλωραμφενικόλη και τα νιτροφουράνια δεν γίνονται δεκτά ως κτηνιατρικά αντιμικροβιακά. (Venable, Haynes, & Cook, 2014). Όμως, εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ως ανθρώπινα αντιμικροβιακά. (MITAL, 2009)

Επιπρόσθετα, η προσθήκη των νιτροϊμιδαζολών στις ζωοτροφές ως αυξητικοί παράγοντες, χαρακτηρίζεται ως παράνομη πρακτική και αυτό σημαίνει επιτακτική ανάγκη διενέργειας εξαντλητικών ελέγχων με στόχο την ανίχνευσή τους. (Hernández-Mesa, García-Campaña, & Cruces-Blanco, 2014)

Στο μέλι δεν υπάρχει χρονικά εξαρτώμενη εξάντληση των υπολειμμάτων με βάση τη φαρμακοκινητική τους συμπεριφορά, όπως συμβαίνει στους ιστούς των θηλαστικών ή των πτηνών (Biagi, 1982). Τα υπολείμματα που μπορεί να υπάρχουν στο μέλι παραμένουν σε μεγάλο βαθμό και για μεγάλο χρονικό διάστημα (Vidal, Aguilera-Luiz, Romero-González, & Garrido Frenich, 2009). Κατά συνέπεια, η παράνομη χρήση αντιβακτηριακών θα μπορούσε να οδηγήσει σε συσσώρευση των υπολειμμάτων τους στο μέλι και σε άλλα προϊόντα μελισσών (Evans & Schwarz, 2011). Οι νιτροϊμιδαζόλες υπάρχει πιθανότητα να ενσωματωθούν όχι μόνο στο μέλι αλλά και στο κερι μέλισσας (Galarini, Saluti, Giusepponi, Rossi, & Moretti, 2015). Το κερι μέλισσας είναι ένα από τα πολυτιμότερα προϊόντα της μέλισσας εκτός από το μέλι. Έχει σημαντικές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων που απαιτεί κερι μέλισσας καλής ποιότητας (Biagi, 1982). Το κερι μέλισσας περιλαμβάνεται στη φαρμακοποιία διάφορων χωρών και είναι εγκεκριμένο συντηρητικό τροφίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση με την ονομασία E901 (Melekhin, et al., 2024). Είναι ένα φυσικό προϊόν και δεν πρέπει να υπάρχουν πρόσθετα. Ωστόσο, οποιεσδήποτε τοξικές ουσίες διαλυμένες ή ενσωματωμένες στο κερι μέλισσας μπορούν να απελευθερωθούν πολύ αργότερα όταν το κερι μέλισσας χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή καλλυντικών ή φαρμακευτικών προϊόντων, ακόμη και στην κατανάλωση ως τροφή (Shendy, Al-Ghobashy, Gad Alla, & Lotfy, 2016).



Εικόνα 4.3. Η χημική δομή των νιτροαμιδαζολών και των μεταβολιτών τους (Mitrowska, Andrzej Posyniak, & Jan Zmudzki, 2014)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: VARROA-AMITPAZH

Τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται στη μελισσοκομία στοχεύουν κυρίως στον έλεγχο παρασίτων, ακάρεων και των ασθενειών που επηρεάζουν τις αποικίες των μελισσών αλλά και τις ίδιες.

Τα ακάρεα και τα τσιμπούρια ανήκουν στα Acari, μια υποκατηγορία της Αραχνίδας που περιέχει πάνω από 54.000 περιγραφόμενα είδη (Rosenkranz, Aumeier, & Ziegelmann, 2010). Τα Acari περιλαμβάνουν πολλά επιβλαβή γεωργικά παράσιτα, συμπεριλαμβανομένων των ακάρεων της αράχνης, των ακάρεων Varroa, των ακάρεων των πουλερικών και πολλών ειδών τσιμπουριών (PETTIS, 2004).

Η εντατική χρήση εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων έχει οδηγήσει σε ανθεκτικότητα πολλών ειδών εντόμων και ακάρεων παγκοσμίως. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν αναπτύξει ανοχή σε τέτοιο βαθμό που ο έλεγχος τους γίνεται εξαιρετικά δύσκολος.

5.1. VARROA

Η βαρρόα είναι ένα μικροσκοπικό, παρασιτικό αρθρόποδο που συγκαταλέγεται στα ακάρεα (Liao, et al., 2023). Παρατηρήθηκε πρώτα το 1904 σε Ασιατικές αποικίες μελισσών στο είδος *Varroa jacobsoni* και το 2000 διαχωρίστηκε ως ξεχωριστό το ποιο καταστροφικό είδος, το *Varroa destructor* που πλήττει και τις Ευρωπαϊκές μέλισσες (Liao, et al., 2023).

Το είδος *Varroa destructor* αποτελεί τη μεγαλύτερη απειλή για τη μελισσοκομία (Fikadu, 2020). Έχει εξαπλωθεί σχεδόν σε όλο τον κόσμο μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (Rosenkranz, Aumeier, & Ziegelmann, 2010). Οι τακτικές που χρησιμοποιούνται έναντι του συγκεκριμένου παρασίτου αυξάνουν τον κίνδυνο χημικών υπολειμμάτων στα μελισσοκομικά προϊόντα (PETTIS, 2004).

Η *Varroa* ζει ως εξαρτώμενη από τις μέλισσες και χρειάζεται το μελίσι για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής της (Krupke, Hunt, & Foster, 2020). Αναπαράγεται μέσα στα κελιά του γόνου των μελισσών και στα κελιά των κηφήνων λόγω της μεγαλύτερης περιόδου εκκόλαψης και του μεγάλου χώρου (PETTIS, 2004). Η θηλυκή *Varroa* ξεχωρίζει με την οσμή τα κελιά του κηφήνα και μπορεί να προσκολληθεί σε μία εργάτρια μέχρι να οσμιστεί γόνο κηφήνα και να εισέλθει στο κελί του για να γεννήσει (Krupke, Hunt, & Foster, 2020). Αρχικά κρύβεται χαμηλά στο κελί και όταν το κελί έχει πλέον σφραγιστεί από τις εργάτριες, η θηλυκή *Varroa* ξεκινάει να γεννά τα αυγά της, από τα οποία συνήθως εκκολάπτονται θηλυκά ακάρεα και ένα αρσενικό (PETTIS, 2004). Μόλις εκκολαφτεί η μέλισσα ξενιστής τους, βγαίνουν μαζί της στην κυψέλη και απλώνονται (PETTIS, 2004). Επίσης, τρέφονται προσκολλώντας σε προνύμφες, νύμφες, και ενήλικα άτομα της κυψέλης, απομυζώντας την αιμολέμφο τους και αφήνοντας ανοιχτές πληγές (PETTIS, 2004). Οι προσβεβλημένες μέλισσες φέρουν στο σώμα τους μικροσκοπικά σφαιρικού σχήματος ξένα σώματα καφέ-κόκκινο χρώματος (PETTIS, 2004).

Η μετάδοση ιών σε συνδυασμό με την παρασιτική δράση της *Varroa* επηρεάζουν δυσμενώς τις κυψέλες (Leeuwen, Vontas, Tsagkarakou, Dermauw, & Tirry, 2010). Αυτό μπορεί να προσκαλέσει ανοσολογική ανεπάρκεια στον πληθυσμό των μελισσών, κάνοντας εκείνες ευάλωτες σε διάφορους εξωτερικούς παθογόνους, με αποτέλεσμα να οδηγήσει τις μέλισσες στην ολοκληρωτική εγκατάλειψη της κυψέλης (Leeuwen, Vontas, Tsagkarakou, Dermauw, & Tirry, 2010).

Οι τρόποι αντιμετώπισης κατά της Varroa διακρίνονται σε χημικούς και τεχνικούς (Fikadu, 2020). Η ολοκληρωτική εξάλειψη του ακάρεου είναι αδύνατη, όμως σκοπός των διαφόρων μελισσοκομικών χειρισμών είναι η σημαντική μείωση του πληθυσμού τους ώστε να μην επηρεάζει την εύρυθμη λειτουργία της κυψέλης (Fikadu, 2020). Οι μορφές στις οποίες διατίθενται τα διάφορα ακαρεοκτόνα ποικίλουν σε υγρή, κρυσταλλική, γέλη και σκόνη (Rouck, Īnak, Dermauw, & Van Leeuwen, 2023).

Η χρήση των ακαρεοκτόνων κοντά στην περίοδο παραγωγής του μελιού προς κατανάλωση, έχει μεγάλη πιθανότητα να αφήσει υπολείμματα δραστικής ουσίας μεγαλύτερα από τα επιτρεπόμενα όρια στο μέλι και στην κηρήθρα (Krupke, Hunt, & Foster, 2020).

Τα ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της Varroa, επιβαρύνουν σε μεγάλο βαθμό το περιβάλλον των κυψελών. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα χημικά ανήκουν στα πυρεθροειδή, όπως amitraz, fluvalinate, και flumethrin καθώς και τα οργανοφωσφορικά όπως coumaphos και chlorpyrifos (Locke, Forsgren, Fries, & Joachim R. de Miranda, 2012).

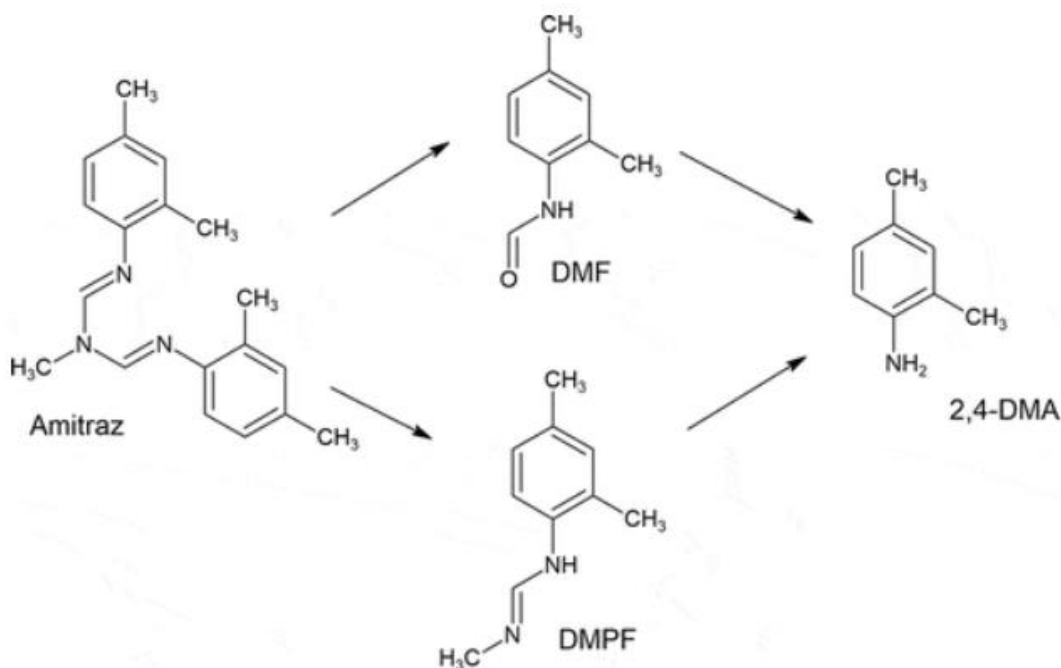
Η αποτελεσματικότητα των coumaphos και tau-fluvalinate έχει μειωθεί με την πάροδο του χρόνου, λόγω της αντίστασης στο μεταβολισμό και στη θέση στόχο στους πληθυσμούς της Varroa (Fikadu, 2020). Επίσης, έρευνες έχουν δείξει ότι τη μεγαλύτερη υπολειμματικότητα στις κυψέλες την έχουν αυτά τα δύο ακαρεοκτόνα, πιθανότατα ως αποτέλεσμα της συνεχούς χρήσης τους από τους μελισσοκόμους και της λιπόφιλης φύσης τους που τους επιτρέπει να παραμένουν στο κερί της μέλισσας (Krupke, Hunt, & Foster, 2020).

5.2. AMITPAZH

Η αμιτράζη (amitraz) (N,N'-[(μεθυλιμινο)διμεθυλιδυν]δι-2,4-ξυλιδίνη) είναι ένα ακαρεοκτόνο φορμαμιδίνης που κυκλοφόρησε αρχικά στις Ηνωμένες Πολιτείες με την εμπορική ονομασία Mitecur, έως το 1994 όπου αποσύρθηκε από την εμπορική μελισσοκομική χρήση (O'Neal, Brewster, Bloomquist, & Anderson, 2017). Ωστόσο,

η αμιτράζη παρέμεινε διαθέσιμο ως κτηνιατρικό ακαρεοκτόνο με την εμπορική ονομασία Tactic, το οποίο δεν χρησιμοποιούταν στη μελισσοκομία μέχρι να καταχωρηθεί εκ νέου με την ονομασία Apivar (O'Neal, Brewster, Bloomquist, & Anderson , 2017).

Η αμιτράζη είναι εξαιρετικά ασταθής σε συνθήκες όξινου pH και υφίσταται ταχεία βιομετατροπή (O'Neal, Brewster, Bloomquist, & Anderson , 2017). Το μόριό της υδρολύεται μέσω των ενδιάμεσων μεταβολιτών N-2,4-διμεθυλφαινυλ-N-μεθυλφορμαμίδίνη (DMPF) και N-2,4-διμεθυλφαινυλφορμαμίδιο (DMF), για να σχηματίσει την περιβαλλοντικά σταθερή τοξική ένωση 2,4-διμεθυλανιλίνη (2,4-DMA) (Kubiak & Biesaga, 2020). Η ανάλυση δειγμάτων μελιού εμβολιασμένων με αμιτράζη σε εργαστηριακές συνθήκες έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι κύριοι μεταβολίτες της είναι ο DMF και ο DMPF με σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις υπολειμμάτων 2,4-DMA (Papaefthimiou, Papachristoforou, & Theophilidis, 2013). Η αμιτράζη δεν παραμένει τόσο στο περιβάλλον της κυψέλης όσο οι μεταβολίτες της. Πιο συγκεκριμένα, ο μεταβολίτης DMPF συσσωρεύεται και είναι μεταξύ των δέκα πιο συχνά ανιχνευόμενων δραστικών ουσιών στο κερί, τη γύρη ακόμη και στις ίδιες τις μέλισσες (Papaefthimiou, Papachristoforou, & Theophilidis, 2013).



Εικόνα 5.1. Η δομή της αμιτράζης και οι κύριοι μεταβολίτες της (Kubiak & Biesaga, 2020)

Ο τρόπος δράσης των φορμαμιδών είναι πολύπλοκος με δοσοεξαρτώμενες θανατηφόρες και υποθανατηφόρες επιδράσεις (Evans & Gee , 1980). Δρουν ως οκταμινεργικοί αγωνιστές υποδηλώνοντας ότι είναι πιθανό να επηρεάσουν τη συμπεριφορά, τη μάθηση και το σχηματισμό μνήμης των μελισσών (Schulz & Robinson , 2001). Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλουν την μονοάμινο οξειδάση και είναι αγωνιστές των υποδοχέων της οκταπαμίνης (Schulz & Robinson , 2001). Η μονοάμινο οξειδάση μεταβολίζει τους μονοαμινικούς νευροδιαβιβαστές στα έντομα και η οκταπαμίνη μεταβάλλει τις τονικές συσπάσεις στους μύες του παρασίτου (Evans & Gee , 1980). Τα υψηλά επίπεδα οκτοπαμίνης στον εγκέφαλο των μελισσών μπορούν να επηρεάσουν τον καταμερισμό της εργασίας εντός της αποικίας και να επηρεάσουν τη συμπεριφορά ως προς την αναζήτηση της τροφής τους (Evans & Gee , 1980).

Η οξεία έκθεση στην αμιτράζη έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί κυτταρικό θάνατο στο μεσαίο έντερο των προνύμφων, αλλά δεν επηρεάζει τη μάθηση, τη βραχυπρόθεσμη μνήμη ή τα επίπεδα οκτοπαμίνης της αιμολύμφου, ούτε έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την επιβίωση ή τη βιωσιμότητα του σπέρματος των κηφήνων (Schulz & Robinson , 2001).

Ο κανονισμός αριθ. 37/2010 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (European Commission) για τις φαρμακολογικά δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα μέγιστα όρια καταλοίπων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης ορίζει τα υπολείμματα δεικτών amitraz ως το άθροισμα της αμιτράζης και όλων των μεταβολιτών που περιέχουν το τμήμα 2,4-DMA, εκφραζόμενο ως αμιτράζη (THE EUROPEAN COMMISSION, 2017). Το μέγιστο επίπεδο υπολειμμάτων (MRL) του amitraz στο μέλι είναι 200 ng/g (THE EUROPEAN COMMISSION, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ

ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για τον έλεγχο της ύπαρξης καταλοίπων ουσιών, φυτοφαρμάκων και αντιβιοτικών πρώτα πρέπει να γίνει η κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων. Η ανάλυση

χημικών ενώσεων που βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μέσα σε μια πολύπλοκη μήτρα δείγματος, όπως είναι το μέλι, συνήθως απαιτεί και μια ιδιαίτερη προσέγγιση που θα περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, την προετοιμασία του δείγματος, την απομόνωση του επιθυμητού συστατικού και τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του (Fumes, Silva, Andrade, Domingues Nazario, & Lancas, 2015). Η προετοιμασία αυτή, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για τον εμπλουτισμό των αναλυτών και για την απομάκρυνση των παρεμβαλλόμενων στοιχείων της μήτρας του δείγματος, είναι ένα κρίσιμο βήμα που παίζει σημαντικό ρόλο στην αναλυτική χημεία (Xu, et al., 2016).

6.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID PHASE EXTRACTION - SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είναι μια τεχνική εκχύλισης στερεού-υγρού, με την οποία ενώσεις που είναι διαλυμένες ή εναιωρούνται σε ένα υγρό μείγμα διαχωρίζονται, απομονώνονται ή καθαρίζονται από άλλες ενώσεις του μείγματος, σύμφωνα με τις φυσικές και χημικές τους ιδιότητες. (Ötles & Kartal, 2016)

6.1.1. ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αρχή λειτουργία της SPE βασίζεται στην επιλεκτική προσρόφηση και την έκλουση (Ötles & Kartal, 2016). Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στη διαφορετική ικανότητα κατακράτησης των ουσιών στην επιφάνεια του προσροφητικού (Buszewski & Szultka, 2012). Τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι είτε μικροστήλες, οι οποίες περιέχουν κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό (C-18, diol, silica, florisil), είτε δίσκοι στους οποίους το χρωματογραφικό υλικό είναι με μορφή μεμβράνης ενσωματωμένης πάνω σε ένα δίκτυο μικροϊνιδίων πολυτετραφθοροαιθυλαινίου (PTFE). (Buszewski & Szultka, 2012)

Υπάρχουν πολλοί συνδυασμοί προσροφητή-διαλύτη για εκλεκτικές εκχυλίσσεις. Για την επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού θα πρέπει να γίνει η μελέτη της φύσης του

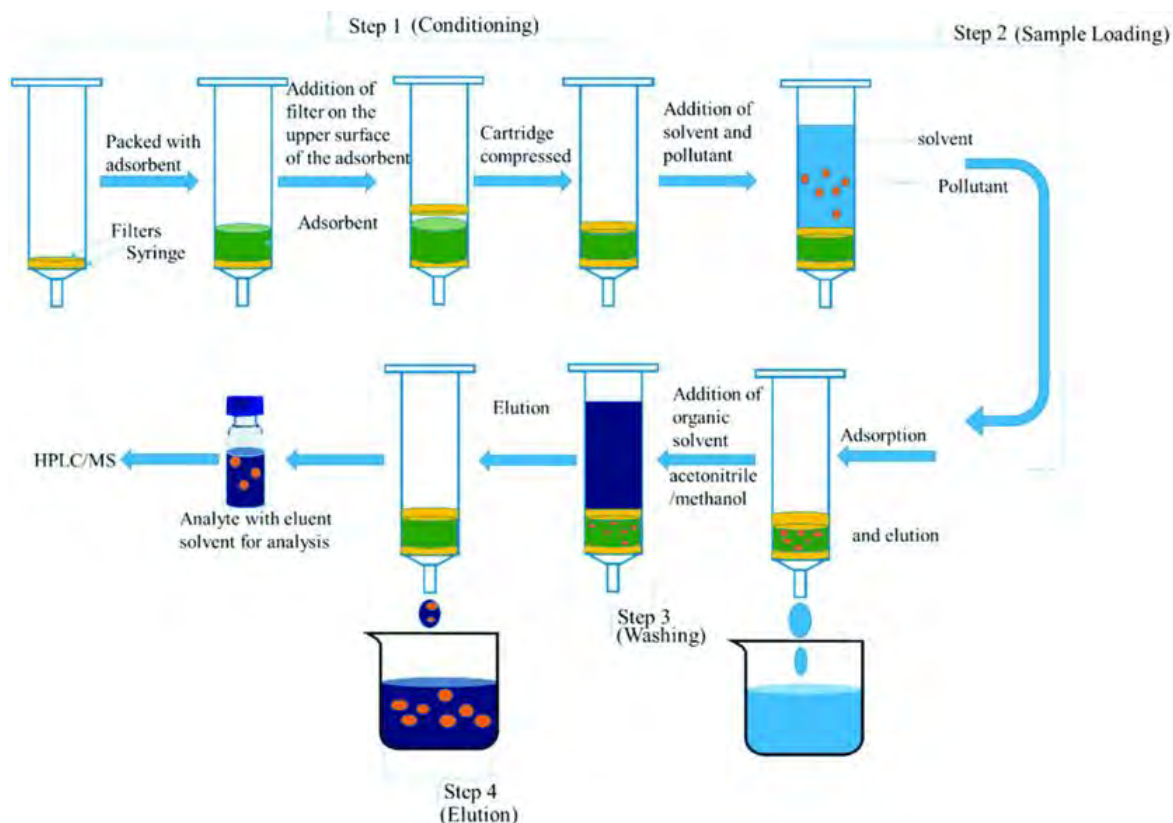
αναλύτη και του υποστρώματος καθώς και η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη.
(Buszewski & Szultka, 2012)

6.1.1.1. ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι τα παρακάτω:

- I. Η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού (conditioning): Μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη και στη συνέχεια μικρή ποσότητα δυσαπεσταγμένου νερού διέρχονται μέσω της μικροστήλης ή του δίσκου εκχύλισης (Andrade-Eiroa, Canle, Leroy-Cancellieri, & Cerdà, 2016). Ένα μέρος αυτής της ποσότητας προσροφάτε στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και την καθιστά πιο συμβατή με το διάλυμα του δείγματος, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη επιφανειακή επαφή μεταξύ τους (Andrade-Eiroa, Canle, Leroy-Cancellieri, & Cerdà, 2016). Με αυτή τη διαδικασία απομακρύνονται και ξένες προς την ανάλυση οργανικές ουσίες οι οποίες βρίσκονται προσροφημένες στο στρώμα του προσροφητικού. (Andrade-Eiroa, Canle, Leroy-Cancellieri, & Cerdà, 2016)
- II. Φόρτιση του δείγματος: Το προς ανάλυση δείγμα διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης, με εφαρμογή πίεσης ή κενού (Ötles & Kartal, 2016). Στο στάδιο αυτό θα πρέπει ο ρυθμός της ροής να διατηρείται όσο γίνεται πιο σταθερός (Ötles & Kartal, 2016). Το δείγμα που βρίσκεται σε υγρή μορφή διέρχεται από το φυσίγγιο.
- III. Έκπλυση: Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η απομάκρυνση των παρεμποδιστικών ουσιών χωρίς να γίνει έκλυση των αναλυτών (Ötles & Kartal, 2016).

IV. Έκλυση: Κατάλληλος όγκος οργανικού διαλύτη ή μίγμα διαλυτών διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης με σκοπό την ποσοτική εκρόφηση των αναλυτών (BRAITHWAITE & SMITH, 1996).



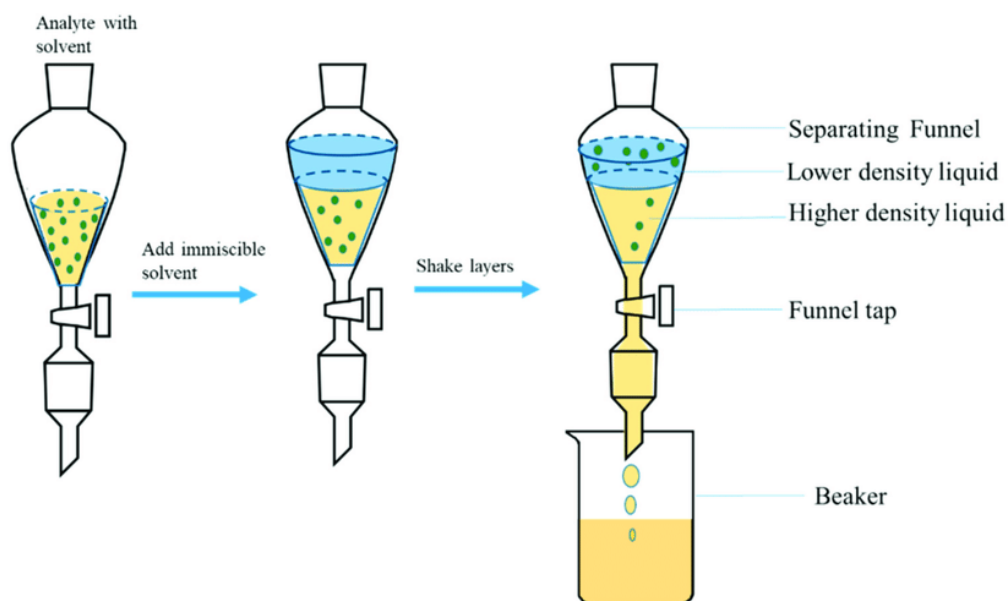
Εικόνα 6.1. Σχηματική Αναπαράσταση της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) (Targuma, Berka Njobeh, & Ndungu, 2021)

6.1.1.2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνουν την μείωση παρεμβολών της μήτρας, την αύξηση της ευαισθησίας καθώς διευκολύνει την αναγνώριση και την επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Ωστόσο, πέρα ότι είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα (Ötles & Kartal, 2016), υπάρχουν περιορισμοί με αυτή την τεχνική, όπως η απώλεια μιας ένωσης ενδιαφέροντος κατά τη φόρτωση του δείγματος στο ροφητικό, η οποία προκαλεί απόφραξη των φυσιγγίων από την αιωρούμενη ύλη του δείγματος με την πιθανότητα

λήψης χαμηλών ανακτήσεων μέσω της αλληλεπίδρασης του ροφητικού με τις αναλυόμενες ουσίες (Targuma, Berka Njobeh, & Ndungu, 2021).

6.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ (LIQUID-LIQUID EXTRACTION – LLE)



Εικόνα 6.2. Σχηματική Αναπαράσταση της εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE) (Targuma, Berka Njobeh, & Ndungu, 2021)

6.2.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι μια ευρέως γνωστή ως τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων, η οποία πλεονεκτεί συγκριτικά με τις απλές μέθοδοι εκχύλισης, λόγω της υψηλής επιλεκτικότητας που έχει (Targuma, Berka Njobeh, & Ndungu, 2021). Η LLE καθώς και η SPE, είναι από τις πιο παλιές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ποικίλων χημικών ενώσεων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Αυτή η προσέγγιση εκχύλισης βασίζεται σε δύο μη αναμίξιμους διαλύτες, τον υδατικό διαλύτη και τον οργανικό διαλύτη. Ο διαλύτης που περιέχει την αναλυόμενη

ουσία τοποθετείται σε ένα χωνί, και ένας μη αναμίξιμος διαλύτης προστίθεται, σχηματίζοντας δύο στρώματα που ανακινούνται μεταξύ τους. Η αναλυόμενη ουσία στη συνέχεια μεταναστεύει από τον αρχικό διαλύτη στον δεύτερο διαλύτη με βάση τη σχετική διαλυτότητά του. Διακρίνεται σε συνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται εν θερμώ με τη συσκευή Soxhlet και σε ασυνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται με επαναληπτικές δόσεις διαλύτη με μηχανική ανάδευση ή σε συσκευή υπερήχων (Khatibi, Hamidi, & Siah-Shadbad, 2020). Μετά την εκχύλιση συνήθως ακολουθεί καθαρισμός (προαιρετικά) και συμπύκνωση του εκχυλίσματος, ώστε να μειωθεί ο όγκος της οργανικής φάσης καθώς και για πιθανή αλλαγή του διαλύτη (Khatibi, Hamidi, & Siah-Shadbad, 2020). Η συμπύκνωση του εκχυλίσματος επιτυγχάνεται είτε στον περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary evaporator) υπό ελαττωμένη πίεση είτε με διέλευση ρεύματος καθαρού αερίου, συνήθως αζώτου, για μικρούς όγκους εκχυλίσματος (Khatibi, Hamidi, & Siah-Shadbad, 2020).

6.2.1.1. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μέθοδος αυτή παρά την ευρεία χρήση και την καλή απόδοσή της, παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα. Ο σχηματισμός γαλακτώματος, η απώλεια του αναλύτη, η μόλυνση του δείγματος, η χαμηλή ευαισθησία, οι δυσκολίες στον αυτοματισμό, η ανάγκη μεγάλου όγκου δείγματος είναι μερικά από τα προβλήματα που μπορούν να προκύψουν. Επίσης, θεωρείται αρκετά δαπανηρή και χρονοβόρα. Υπάρχει η πιθανότητα συνεκχύλισης άλλων συστατικών του δείγματος, όπως προσμίξεις, λόγω παρόμοιων ιδιοτήτων. Ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι σε κάποιες εφαρμογές της απαιτεί μια μεγάλη σχετικά ποσότητα οργανικών διαλυτών και αυτό την χαρακτηρίζει μη φιλική προς το περιβάλλον. Έτσι, αναπτύχθηκαν τροποποιημένες μέθοδοι ώστε να μειώσουν τον όγκο αυτό. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων είναι η δυναμική μικροεκχύλιση υγρού-υγρού όπου βασίζεται σε μεμβράνες ινών (hollow fiber-HF), η ταχεία εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated solvent extraction– ASE) ή αλλιώς εκχύλιση υγρού υπό πίεση (Pressurized liquid extraction – PLE), η οποία είναι ένα είδος εκχύλισης υγρής φάσης που μπορεί να μειώσει το χρόνο εκχύλισης υπό την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας και υψηλής πίεσης (Narendran, Meyyanathan, & Babu, 2020). Η ASE χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αμιτράζης και των

μεταβολιτών της, της λινκομυκίνης και της σπεκτινομυκίνης σε ζωικούς ιστούς και ακολουθήθηκε από την τεχνική SPE για τον καθαρισμό του αναλύτη (Narendaran, Meyyanathan, & Babu, 2020). Επιπρόσθετα, η ASE σε συνδυασμό με τη μέθοδο SPE εφαρμόστηκε για την εξαγωγή φθοροκινολονών από ζωικά τρόφιμα (Narendaran, Meyyanathan, & Babu, 2020). Άλλες παραλλαγές της τεχνικής LLE είναι η μικροεξαγωγή υγρής φάσης (Liquidphase microextraction – LPME), η τεχνική εξαλάτωσης (Salting-out LLE – SALLE) και η εκχύλιση σε υδατικά διφασικά συστήματα (Aqueous two-phase system – ATPS) (Narendaran, Meyyanathan, & Babu, 2020).

6.3. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe extraction)

Η τεχνική QuEChERS είναι μια σχετικά νέα μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων με ευρύ φάσμα αναφορών για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα. Το όνομά της το έχει από τα αρχικά των κύριων χαρακτηριστικών της. Πιο συγκεκριμένα είναι γρήγορη, εύκολη, φθηνή με χαμηλό κόστος, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής.

Η QuEChERS χαρακτηρίζεται για την απλότητα, τη χαμηλή ευαισθησία σε σφάλματα, την ικανότητά της να εξάγει φυτοφάρμακα από διάφορες μήτρες καθώς και είναι φιλική προς το περιβάλλον λόγω μικρής ποσότητας αποβλήτων (González-Curbelo, Varela-Martínez, & Riaño-Herrera, 2022). Επιπλέον, παρέχει ευελιξία στον τύπο της προσδιοριστικής αναλυτικής τεχνικής που χρησιμοποιείται. Η QuEChERS έχει γίνει αποδεκτή παγκοσμίως ως αξιόπιστη μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων για ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (González-Curbelo, Varela-Martínez, & Riaño-Herrera, 2022).

Η τεχνική αυτή χωρίζεται σε δύο στάδια:

- I. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την εκχύλιση με βιολογικούς διαλύτες και ανόργανα άλατα, όπως MgSO_4 , NaCl ή/και ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων, ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός της υδατικής και της οργανικής φάσης (Targuma, Berka Njobeh, & Ndungu, 2021)

- II. Το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται με τη μέθοδο d-SPE, όπου γίνεται η αφαίρεση παρεμβολών της μήτρας όπως χρωστικές ουσίες, σάκχαρα, οργανικά και λιπαρά οξέα (Pajewska-Szmyt, et al., 2019)

Η μέθοδος χρησιμοποιεί ακετονιτρίλιο, το οποίο επιτρέπει την εκχύλιση πολικών (και όχι μόνο) αναλυτών και παρέχει αυξημένο βαθμό επιλεκτικότητας, ανιχνευσιμότητας και άμεσης συμβατότητας με τις τεχνικές GC-MS και LC-MS. Συγκριτικά με άλλες τεχνικές όπως η SPE και η LLE, η QuEChERS ελαχιστοποιεί τον αριθμό των απαιτούμενων σταδίων της προετοιμασίας του δείγματος, καθώς περιλαμβάνει μόνο δύο βήματα όπως προαναφέρθηκε (Musarurwa, Chimuka, Pakade, & Tavengwa, 2019). Τέλος, έχουν γίνει αρκετές τροποποιήσεις της αρχικής μεθόδου για την βελτιστοποίηση και την εξαγωγή καλύτερων αποτελεσμάτων (Targuma, Berka Njobeh, & Ndungu, 2021).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY – MS)

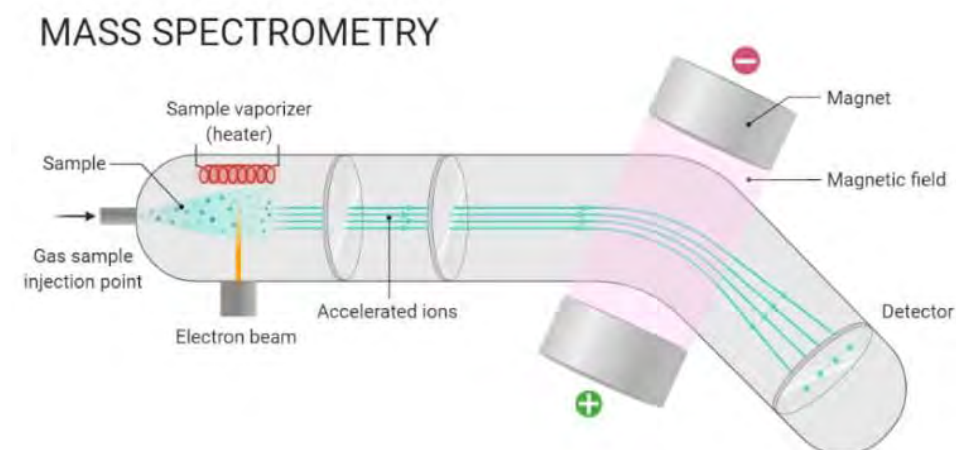
Η φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS) χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων, καθώς εφαρμόζεται πλήρως τόσο σε εργαστήρια αναλύσεων όσο και σε ερευνητικά εργαστήρια (Domínguez, Garrido Frenich, & Romero-González, 2020). Η MS είναι πολύ σημαντική καθώς δίνει πληροφορίες για την ποιοτική και την ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων αγνώστου περιεχομένου, τη δομή ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών με μορφή απεικόνισης, την παρουσία αλλά και την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε διάφορα δείγματα (Lehotay, Sapozhnikova, & Mol, 2015). Επίσης, έχει μεγάλη ευαισθησία και προσδιορίζει με πολύ μεγάλη ακρίβεια τις σχετικές μοριακές μάζες με αποτέλεσμα την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και πολύ μικρών συγκεντρώσεων (Domínguez, Garrido Frenich, & Romero-González, 2020). Συνδυάζεται με την αέρια χρωματογραφία και την υγρή χρωματογραφία για καλύτερα αποτελέσματα.

7.1.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αρχή μεθόδου της φασματομετρίας μάζας στηρίζεται στην παραγωγή μοριακών ιόντων ή θραυσμάτων κατά τον ιονισμό του μορίου και στο διαχωρισμό αυτών των ιόντων σύμφωνα με το λόγο της μάζας τους ως προς το φορτίο τους (m/z). Αυτά τα ιόντα περιέχουν περίσσεια ενέργειας και κατακερματίζονται σε ιόντα μικρότερου μεγέθους, τα οποία στη συνέχεια επιταχύνονται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών με σκοπό να διαχωριστούν. Η καταγραφή των ιόντων γίνεται με τη χρήση κατάλληλων ανιχνευτών και η απεικόνιση των δεδομένων γίνεται από εξειδικευμένο λογισμικό σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

7.1.2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Κάθε φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τρία βασικά στοιχεία: μια πηγή ιόντων, έναν αναλυτή όπου τα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με την αναλογία μάζας προς φορτίο και έναν ανιχνευτή όπου μετρούνται τα ιόντα.



Εικόνα 7.1.: Σχηματική απεικόνιση φασματομέτρου μάζας (Aryal S. , 2022)

ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΩΝ: Η δυνατότητα ιονισμού μιας ουσίας είναι βασική προϋπόθεση για την ανάλυσή της σε φασματόμετρο μάζας. Οι μέθοδοι ιονισμού ποικίλλουν ανάλογα με τη δομή και την αρχή λειτουργίας ενός ιονιστή. Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) είναι οι πιο συχνές μέθοδοι ιονισμού που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στον ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (API) που επιτρέπει την εισαγωγή σημαντικών όγκων διαλυμάτων που ρέουν από τη χρωματογραφική στήλη στο φασματόμετρο μάζας χωρίς τον κίνδυνο απώλειας υψηλού κενού (Awad, Khamis, & El-Aneed, 2014).

Τόσο ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού όσο και ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης καθιστούν δυνατή τη διεξαγωγή αναλύσεων σε δύο τρόπους λειτουργίας, τη δημιουργία θετικών και αρνητικών ιόντων (Awad, Khamis, & El-Aneed, 2014).

ΑΝΑΛΥΤΗΣ: Ο αναλυτής είναι αυτός που καθορίζει την απόδοση ενός φασματομέτρου. Η λειτουργία του είναι να διαχωρίζει τα ιόντα ως προς την αναλογία μάζας προς φόρτιση (m/z) και να κατευθύνει τη δέσμη των εστιασμένων ιόντων στον ανιχνευτή. Τα διαφορετικά είδη αναλυτών διαφέρουν ως προς τα χαρακτηριστικά και τη λειτουργία. Οι βασικές παράμετροι απόδοσης ενός αναλυτή περιλαμβάνουν την απόδοση διαχωρισμού, την ακρίβεια μέτρησης m/z και το εύρος των τιμών m/z που μετρήθηκαν. Η επιλογή ενός συγκεκριμένου αναλυτή καθορίζεται από το είδος της ανάλυσης που διεξάγεται. Για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα χρησιμοποιούνται συχνότερα ο τετραπολικός (Q), ο χρόνος πτήσης (TOF) και ο αναλυτής μάζας παγίδας ιόντων (IT). (Aryal S. , 2022)

ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ: Είναι υπεύθυνος για τη παραγωγή ηλεκτρικού σήματος στην έξοδο, ανάλογα με τον αριθμό και το φορτίο των ιόντων.

7.1.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Οι τεχνικές ανάλυσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ανεξάρτητα από τη μέθοδο ιοντισμού και την τεχνική διαχωρισμού που ακολουθείται, στη φασματομετρία μάζας είναι :

- Η τεχνική πλήρους σάρωσης (full scan)
- Η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (single ion monitoring, SIM)
- Η διαδοχική φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry, MS/MS).

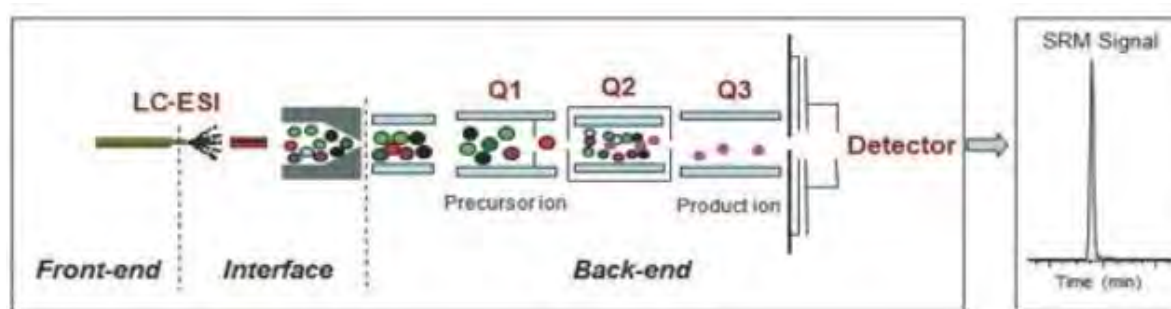
7.1.3.1. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (TANDEM MASS SPECTROMETRY – MS/MS)

Η διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) είναι ένα σύστημα δύο συνδυασμένων αναλυτών του ίδιου ή διαφορετικού τύπου, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλή απόδοση διαχωρισμού (Stachniuk & Fornal, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food, 2015). Η βασική αρχή

της MS/MS περιλαμβάνει την επιλογή του πρόδρομου ιόντος, τον κατακερματισμό του, το διαχωρισμό και την επιλογή των σχηματισθέντων ιόντων (Stachniuk, Szmagara, Czezko, & Fornal, 2017). Πιο συγκεκριμένα, τα πρόδρομα ιόντα που παράγονται από τη πηγή διαχωρίζονται στον πρώτο αναλυτή (MS1). Λόγω της διαδικασίας του κατακερματισμού, παράγονται νέα ιόντα που αναλύονται στον δεύτερο αναλυτή (MS2), σύμφωνα με τη τιμή του λόγου m/z . Η MS/MS παρέχει μια σημαντική βελτίωση στις συνθήκες ανάλυσης, μέσω βελτιωμένης επιλεκτικότητας και σημαντικά αυξημένης ευαισθησίας. Υπάρχουν πολλές δυνατότητες σύνδεσης διαφορετικών τύπων αναλυτών. Για παράδειγμα τα τριπλά τετραπολικά συστήματα (QQQ), τα τετραπολικά συστήματα χρόνου πτήσης (Q-TOF) και τα γραμμικά συστήματα παγίδευσης ιόντων (Q-Trap), αποτελούν τους πιο συχνούς συνδυασμούς αναλυτών που χρησιμοποιούνται στην MS/MS, με στόχο τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φαρμάκων στα τρόφιμα. (Domínguez, Garrido Frenich, & Romero-González, 2020)

7.1.3.1.1. ΤΡΙΠΛΟ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟ (QQQ)

Το τριπλό τετράπολο (QQQ) είναι ένα από τα πιο δημοφιλή διαδοχικά φασματομέτρα μάζας, όπου δύο τετράπολα λειτουργούν ως αναλυτές ιόντων και το τρίτο τετράπολο στη μέση χρησιμεύει ως κυψέλη σύγκρουσης. Πιο συγκεκριμένα, το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το 1^ο τετράπολο (MS1). Στη συνέχεια, οδηγείται στο 2^ο τετράπολο (κυψελίδα συγκρούσεων), όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar ή N₂) παράγοντας θυγατρικά ιόντα (daughter or product ions). Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων γίνεται στο 3^ο τετράπολο (MS2).



Εικόνα 7.2. Σχηματική απεικόνιση τριπλού τετράπουλου (Shi, et al., 2012)

Το τριπλό τετραπολικό διαδοχικό φασματομέτρο μάζας είναι ο πιο δημοφιλής ανιχνευτής που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία στην ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, λόγω υψηλής ευαισθησίας και της επιλεκτικότητάς του που προκύπτουν από τη δυνατότητα λειτουργίας παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων των επιλεγμένων ουσιών.

7.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος επιλογής για τον διαχωρισμό των ενώσεων από ένα σύνθετο μείγμα με βάση τη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ δύο διαφορετικών φάσεων.

Ορισμός της χρωματογραφίας κατά IUPAC (1993): «Η χρωματογραφία είναι μια φυσική μέθοδος διαχωρισμού στην οποία τα συστατικά που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, η μία από τις οποίες είναι στατική, ενώ η άλλη κινείται σε μια καθορισμένη κατεύθυνση». (BRAITHWAITE & SMITH, 1996)

Η βασική αρχή της χρωματογραφίας βασίζεται στην ισορροπία συγκέντρωσης των διαλυμένων ουσιών μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Οι φάσεις επιλέγονται έτσι ώστε διαφορετικές διαλυμένες ουσίες να έχουν διαφορετική κατανομή σε κάθε φάση. (BRAITHWAITE & SMITH, 1996)

Η στατική φάση, η οποία διατηρείται σταθερή, μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή, ενώ η κινητή φάση, η οποία μπορεί να ρέει ελεύθερα πάνω από τη στατική φάση, μπορεί να είναι είτε υγρό, είτε αέριο ή υπερκρίσιμο ρευστό.

Σύμφωνα με τη φυσική κατάσταση της κινητής φάσης η χρωματογραφία μπορεί να ταξινομηθεί σε:

- αέρια χρωματογραφία (GC)
- υγρή χρωματογραφία (LC), όπου με τη σειρά της διακρίνεται σε:
 - χρωματογραφία υγρού-στερεού (LSC): όταν η στατική φάση είναι στερεή (στις περισσότερες περιπτώσεις, π.χ. χρωματογραφία στήλης)
 - χρωματογραφία υγρού-υγρού (LLC): όταν η στατική φάση είναι υγρή (π.χ. φυγοκεντρική χρωματογραφία καταμερισμού)

- χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού (SFC)

Η επιλογή μεταξύ των μεθόδων καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες των προσδιοριζόμενων ενώσεων.

7.2.1. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GAS CHROMATOGRAPHY)

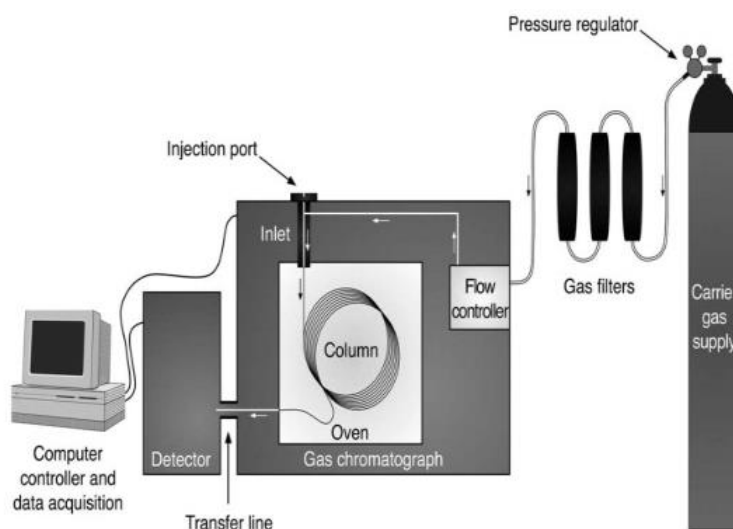
Η αέρια χρωματογραφία είναι μια αναλυτική τεχνική για τον διαχωρισμό ουσιών ενός μείγματος. Η μέθοδος είναι κατάλληλη για την ποιοτική ανάλυση των ουσιών, δηλαδή την ανίχνευση παρουσίας ή απουσίας των ουσιών στο διάλυμα καθώς και για την ποσοτική ανάλυση, δηλαδή σε τι ποσότητα βρίσκονται αυτές οι ουσίες (Stauffer, Dolan, & Newman, 2008). Τα προς ανάλυση συστατικά πρέπει να είναι πτητικά και θερμικά σταθερά, ώστε να μην καταστρέφονται λόγω της θερμοκρασίας.

7.2.1.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο διαχωρισμός γίνεται μέσα σε μια λεπτή τριχοειδή στήλη, όπου τα συστατικά του μείγματος συγκρατούνται σε διαφορετικούς βαθμούς από ένα προσροφητικό υλικό (στατική φάση), ενώ ταυτόχρονα αναγκάζονται να κινούνται παρασυρόμενα από μια αέρια κινητή φάση, συνήθως το αέριο είναι He, N₂ ή H₂). Ο χρόνος κάθε ουσίας στη στήλη (χρόνος κατακράτησης- Retention time), είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων της ουσίας και της στήλης καθώς αποτελεί ένα από τα κριτήρια για τον ποιοτικό προσδιορισμό της ουσίας. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, κριτήριο αποτελεί το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται από τους ανιχνευτές στην έξοδο της στήλης. Το σήμα καταγράφεται ως κορυφή, ενώ το ύψος ή η επιφάνεια της κορυφής χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

7.2.1.2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Τα βασικά μέρη ενός συστήματος αέριας χρωματογραφίας είναι οι φιάλες παροχής αερίων, ο εγχυτής, ο φούρνος, η χρωματογραφική στήλη, οι ανιχνευτές και το καταγραφικό. Πιο αναλυτικά:



Εικόνα 7.3. Αέριος Χρωματογράφος (Stauffer, Dolan, & Newman, 2008)

-Το σύστημα έγχυσης του δείγματος είναι η θύρα για το δείγμα, η οποία είναι απαραίτητη για την εισαγωγή του στη χρησιμοποιούμενη στήλη. Μια βαθμονομημένη μικροσύριγγα χρησιμοποιείται για τη μεταφορά ενός όγκου δείγματος, μέσω ενός λαστιχένιου διαφράγματος, στο θάλαμο εξάτμισης. (BRAITHWAITE & SMITH, 1996)

-Το φέρον αέριο (carrier gas) παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αέρια χρωματογραφία. Θα πρέπει να είναι αδρανές, ξηρό και χωρίς οξυγόνο. Τα αέρια ηλίου, αζώτου, αργού και υδρογόνου χρησιμοποιούνται ως φέροντα αέρια και συσχετίζονται με την επιθυμητή απόδοση και τον ανιχνευτή που χρησιμοποιείται (McNair, Miller, & Snow, 2019). Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση και πρέπει να διαφέρει από τις προς ανάλυση ουσίες, ως προς μία ιδιότητα (π.χ. πυκνότητα).

-Οι στήλες διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη μέθοδο είναι οι τριχοειδείς στήλες, οι στήλες ανοιχτού σωλήνα και οι πληρωμένες στήλες (packed columns), με τις δεύτερες να κυριαρχούν και να περιέχουν ένα αδρανές στερεό υπόστρωμα (Rahman, et al., 2015).

-Στο φούρνο πραγματοποιείται ο έλεγχος της θερμοκρασίας της στήλης και η λειτουργία του στηρίζεται σε δύο αρχές. Η πρώτη αποκαλείται ισοθερμικός προγραμματισμός (isothermal programming) και η θερμοκρασία της στήλης

διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της διαχωριστικής μεθόδου (Cramers, Janssen, M. van Deursen, & Leclercq, 1999). Αντίθετα, η δεύτερη αρχή ονομάζεται προγραμματισμένη θερμοκρασία (temperature programming) και χαρακτηρίζεται από την συνεχή ή τη βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εξέλιξη της μεθόδου (Cramers, Janssen, M. van Deursen, & Leclercq, 1999).

-Ο ανιχνευτής είναι μια συσκευή η οποία καταγράφει τα διαλύματα που εξέρχονται από τη στήλη. Ένα ηλεκτρικό σήμα παράγεται, στις περισσότερες περιπτώσεις ενισχύεται, και αποστέλλεται στο σύστημα δεδομένων (Kaur & Sharma, 2018).

-Το σύστημα ενίσχυσης και καταγραφής είναι υπεύθυνα για τη καταγραφή των σημάτων που προέρχονται από τον ανιχνευτή. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούν ειδικά ηλεκτρονικά κυκλώματα, τα οποία ενισχύουν τα παραγόμενα σήματα έτσι ώστε να εμφανίζονται σε κατανοητή γραφική μορφή (Kaur & Sharma, 2018).

7.2.1.3. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η αέρια χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως μια απλή, ευαίσθητη και γρήγορη τεχνική διαχωρισμού πολύ μικρών μορίων (Coskun, 2016). Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από: υψηλή ακρίβεια που παρέχει στις ποσοτικές αναλύσεις της τάξεως των μL , αξιοπιστία και σχετικά απλή εφαρμογή (Coskun, 2016).

Στην ανάλυση τροφίμων, η αέρια χρωματογραφία είναι μια από τις βασικές τεχνικές διαχωρισμού πολλών ομάδων πτητικών ενώσεων, οι οποίες είναι θερμικά σταθερές στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την εξάτμισή τους. Η υψηλής ισχύς διαχωρισμού σε συνδυασμό με μια μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών, τη καθιστά σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό διαφόρων συστατικών σε πολύπλοκες μήτρες τροφίμων (Kaur & Sharma, 2018).

7.2.1.4. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ με ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη υγρών, αερίων ή στερεών δειγμάτων. Η ανάλυση

ξεκινάει με τον αέριο χρωματογράφο, όπου το δείγμα εξατμίζεται στην αέρια φάση και διαχωρίζεται στα διάφορα συστατικά του. Μόλις ολοκληρωθεί η χρωματογραφία, καθώς αυτά εισέρχονται στο φασματομέτρο μάζας ιονίζονται και κατακερματίζονται. Όταν ένα σύνθετο δείγμα διαχωρίζεται με GC-MS, παράγει πολλές διαφορετικές κορυφές και κάθε κορυφή δημιουργεί ένα μοναδικό φάσμα μάζας που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της κάθε ένωσης.

7.2.1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΟ ΜΕΛΙ

Μέχρι το τέλος της δεκαετίας το 1990, η τεχνική GC-MS ήταν η τεχνική επιλογής για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε οποιαδήποτε μήτρα. Οι μόνες προϋποθέσεις των αναλυτών για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής ήταν η πτητικότητα και η θερμική σταθερότητά τους, η οποία είναι ένα εγγενές χαρακτηριστικό πολλών φυτοφαρμάκων.

Μια μεγάλη κατηγορία φυτοφαρμάκων είναι τα οργανοφωσφορικά, τα οποία ανησυχούσαν/ούν τις αρχές τόσο για την ανίχνευσή τους στα τρόφιμα όσο και για τις τοξικές επιδράσεις τους. Σε μία μελέτη που έγινε το 2010 από τους Wang και την ομάδα του (Wang, Kliks, Jun, & Li, 2010) αναλύθηκαν 38 δείγματα μελιού από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές με την τεχνική GC-MS. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα αναλύθηκαν για το εξαχλωροκυκλοεξάνιο (HCHs), το διχλωροδιφαινυλτριχλωροαιθάνιο (DDTs), το χλωρδάνιο και το εξαχλωροβενζόλιο (HCB). Αποτέλεσμα αυτής της έρευνας ήταν ότι όντως τα ποσοστά υπολειμμάτων και των τεσσάρων ήταν περισσότερα στις αναπτυσσόμενες χώρες από τις ανεπτυγμένες.

Τα πυρεθροειδή αποτελούν μια κατηγορία εντομοκτόνων, η χρήση των οποίων είναι διαδεδομένη παγκοσμίως. Παρά του μικρού χρόνου ζωής τους στο περιβάλλον, έχει αποδειχθεί ότι τα υπολείμματά τους παραμένουν στο νερό, στο έδαφος και στα διάφορα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου και στο μέλι. Σε μια μελέτη (He, et al., 2023) που έγινε μεταξύ του 2018 με 2020 σε δεκαεπτά περιοχές της Κίνας, μελετήθηκαν πέντε πυρεθροειδή εντομοκτόνα σε δείγματα μελιού και σε γύρη. Τα ευρήματα της μελέτης ήταν ότι διαπιστώθηκε η ευρεία και επίμονη μόλυνση των

φυτών από μια ποικιλία πυρεθροειδών εντομοκτόνων σύμφωνα με τις τρέχουσες γεωργικές πρακτικές φυτοφαρμάκων. Οι υψηλότερες μέγιστες και μέσες τιμές υπολειμμάτων ανιχνεύθηκαν στο μέλι για τη δελταμεθρίνη.

Τέλος, τα ακαρεοκτόνα είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στα μελίσσια για την καταπολέμηση των ακάρρων. Ένα από αυτά είναι η αμιτράζη. Το 2001 έγινε μια μελέτη (Korta, et al., 2001) για την αποικοδόμηση της αμιτράζης και άλλων 6 ακαρεοκτόνων με την χρήση GC-MS σε δείγματα μελιού και κερί μέλισσας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αμιτράζη αποικοδομείται εντός μίας ημέρας στο μέλι και σε δέκα μέρες στο κερί, ενώ οι μεταβολίτες που παραμένουν, είναι οι 2,4-διμεθυλφαινυλφορμαμίδιο (DMF) και η N-(2,4-διμεθυλφαινυλ)-N'-μεθυλφορμαμίδίνη (DMPF).

Η αέρια χρωματογραφία δε χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό κτηνιατρικών φαρμάκων λόγω της απαίτησης παραγωγοποίησης (Li, Zhang, Chen, Zhang, & Liu, 2020).

7.2.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (LIQUID CHROMATOGRAPHY-LC)

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια διαδεδομένη παγκοσμίως τεχνική, όπου εφαρμόζεται σε πάρα πολλές μελέτες και αναλύσεις. Η κινητή φάση είναι υγρή, όπως δηλώνει και το όνομα της, ενώ η στερεή φάση μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή ακινητοποιημένη σε κάποιο αδρανές υπόστρωμα.

Σημαντικό ρόλο παίζουν το υλικό πλήρωσης και οι διαστάσεις των στηλών. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στήλες με πολύ μικρή εσωτερική διάμετρο, που συμβάλλουν στην αύξηση της ευαισθησίας και τη μείωση των ποσοτήτων των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και δειγμάτων. Η κινητή φάση που χρησιμοποιείται στην υγρή χρωματογραφία αποτελείται από διαλύτες όπως το νερό, η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο ή μίγματα αυτών. Επίσης, η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου. (Hird, Lau, Schuhmacher, & Krska, 2014)

7.2.2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

I. Σύμφωνα με τον μηχανισμό που διέπει τον διαχωρισμό των ενώσεων μεταξύ των δύο φάσεων, η υγρή χρωματογραφία μπορεί να ταξινομηθεί σε:

- χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography)
- χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography)
- ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία (ion exchange chromatography)
- χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size exclusion chromatography)
- χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography)

Στην πράξη, οι περισσότεροι διαχωρισμοί LC είναι αποτέλεσμα μικτών μηχανισμών.

II. Η υγρή χρωματογραφία μπορεί επίσης να ταξινομηθεί σε:

- χρωματογραφία κανονικής φάσης: όταν η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή φάση
- χρωματογραφία ανάστροφης φάσης: όταν η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση

III. Σύμφωνα με το σχήμα της στατικής φάσης η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε:

- Χρωματογραφία στήλης
 - (1) Χρωματογραφία στήλης βαρύτητας (Gravity Column Chromatography)
 - (2) Υγρή Χρωματογραφία κενού (Vacuum Liquid Chromatography)
 - (3) Υγρή Χρωματογραφία Μέσης Πίεσης (Medium Pressure Liquid Chromatography)
 - (4) Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography - HPLC)
- Επίπεδη Χρωματογραφία
 - i) Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography - TLC)
 - ii) Χρωματογραφία χάρτου (Paper Chromatography)

7.2.2.2. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY – HPLC)

Η Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης και η χρωματογραφία υπέρ-υψηλής απόδοσης (Ultra-high performance liquid chromatography – UHPLC) είναι δύο από τις τεχνικές που έχουν ως βάση την LC (Li, Zhang, Chen, Zhang, & Liu, 2020).

Η τεχνική της HPLC μπορεί και λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες και αυτό την κάνει κατάλληλη για τον διαχωρισμό ουσιών που είναι ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες, όπου λειτουργεί η αέρια χρωματογραφία, ή ουσιών που δύσκολα μεταβαίνουν στην αέρια φάση. Επίσης, είναι μια ευαίσθητη τεχνική και προσαρμόζεται εύκολα και σε ποσοτικούς προσδιορισμούς. (Sahu, et al., 2018)

7.2.2.2.1. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η HPLC έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με την υγρή χρωματογραφία (LC) στήλης:

- Η ανάλυση και η ταχύτητα ανάλυσης υπερβαίνουν αυτές των κλασικών μεθόδων
- Οι στήλες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν χωρίς επανασυσκευασία ή αναγέννηση
- Η αναπαραγωγιμότητα βελτιώνεται σημαντικά επειδή οι παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού μπορούν να ελέγχονται στενά
- Η λειτουργία του οργάνου και η ανάλυση δεδομένων αυτοματοποιούνται εύκολα
- Είναι προσαρμόσιμη σε προπαρασκευαστικές διαδικασίες μεγάλης κλίμακας

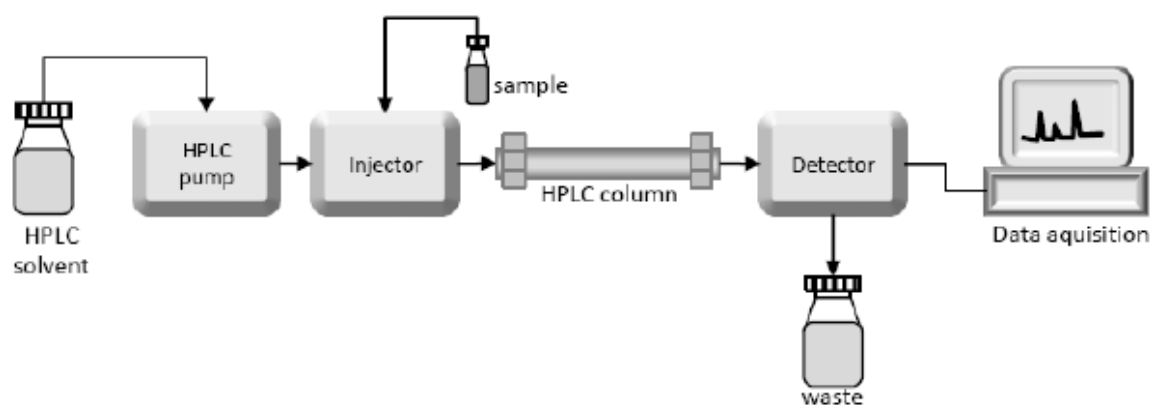
7.2.2.2.2. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC

Η HPLC βασίζεται στη διαφορά μετατόπισης των συστατικών ενός μίγματος, η οποία προέρχεται από το διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασής τους με τη κινητή και τη στατική φάση. Στηρίζεται δηλαδή στη φυσικοχημική συγγένεια των συστατικών με την κάθε φάση.

Ανάλογα με τον τύπο της στατικής φάσης οι ενώσεις μπορούν να διαχωριστούν με βάση το φορτίο, τη μοριακή μάζα και την πολικότητα.

Οι δύο πιο κοινοί τύποι διαχωρισμού της HPLC είναι της κανονικής φάσης (normal phase) και της αντίστροφης (reversed phase). Και στις δυο περιπτώσεις ο διαχωρισμός βασίζεται στο γεγονός ότι είναι εντονότερη η αλληλεπίδραση μεταξύ ουσιών όμοιας πολικότητας και ασθενέστερη μεταξύ ουσιών αντίθετης πολικότητας. Μόρια με παρόμοια πολικότητα έλκονται, ενώ μόρια με ανόμοια πολικότητα έλκονται πολύ λιγότερο ή μπορεί ακόμη και να απωθούνται. Η πολικότητα ενός μορίου οφείλεται στην παρουσία κάποιων χαρακτηριστικών ομάδων και στην έλλειψη συμμετρίας του. (Sahu, et al., 2018)

7.2.2.2.3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ



Εικόνα 7.4. Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)
(Czaplicki, 2013)

Το σύστημα HPLC περιλαμβάνει τα παρακάτω:

- Δεξαμενή διαλύτη: είναι ειδικά δοχεία που περιέχουν τους διαλύτες. Η κινητή φάση μπορεί να είναι ένα μίγμα πολικών και μη πολικών υγρών διαλυτών

- **Αντλία:** η αντλία αναρροφά την κινητή φάση από τη δεξαμενή του διαλύτη και τη μεταφέρει στη στήλη, ώστε στη συνέχεια να περάσει από τον ανιχνευτή. Η πίεση εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων, το ρυθμό ροής και τη σύνθεση της κινητής φάσης
- **Σύστημα εισαγωγής του δείγματος:** ο εγχυτήρας εγχέει δείγματα υγρού όγκου με υψηλή αναπαραγωγικότητα και υπό υψηλή πίεση (Czaplicki, 2013)
- **Στήλες:** το οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία για την κατασκευή των στηλών. Στην HPLC χρησιμοποιούνται συνήθως δύο τύποι στηλών, οι στήλες κανονικής φάσης και οι στήλες ανάστροφης φάσης. Η χρήση χρωματογραφίας κανονικής φάσης, ιδιαίτερα μη πολικών και μέτρια πολικών φαρμάκων μπορεί να προκαλέσει εξαιρετικά αποτελέσματα διαχωρισμού (Coskun, 2016)
- **Ανιχνευτές:** οι ανιχνευτές ανταποκρίνονται σε μια φυσική ιδιότητα της διαλυμένης ουσίας και πιο συγκεκριμένα τη μετρούν, είτε με, είτε χωρίς την αφαίρεση της κινητής φάσης πριν από την ανίχνευση. Ανιχνευτές οι οποίοι δεν απαιτούν την αφαίρεση (εξάτμιση) της κινητής φάσης είναι φασματοφωτομετρικοί ανιχνευτές (UV ή UV-Vis), ανιχνευτές φθορισμού και ηλεκτροχημικής ιδιότητας, ενώ ανιχνευτές ιονισμού φλόγας ή ανιχνευτές δέσμησης ηλεκτρονίων απαιτούν την αφαίρεση της κινητής φάσης πριν από τον εντοπισμό (Swartz, 2010)
- **Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων:** τα σήματα από τον ανιχνευτή στέλνονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος επεξεργάζεται, αποθηκεύει και ξανά επεξεργάζεται τις χρωματογραφικές πληροφορίες μέσω εξειδικευμένων προγραμμάτων

7.2.2.3. ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ με ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC – MS)

Οι περισσότερες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, κτηνιατρικών φαρμάκων και άλλων χημικών ενώσεων είναι η LC σε συνδυασμό με άλλα συστήματα (Song, et al., 2019). Σήμερα, η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με ανιχνευτή υπεριώδους (LC-UV) και με φασματόμετρο μάζας (LC-MS) είναι από τις πιο ισχυρές τεχνικές για την αντιμετώπιση προβλημάτων που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων και την πιστοποίηση της γνησιότητάς τους. (Núñez & Lucci, 2020)

Η τεχνική αποτελεί ισχυρό εργαλείο για τον ποσοτικό προσδιορισμό οργανικών ενώσεων μέτριας και υψηλής πολικότητας της τάξεως των mg/kg, ακόμα και μg/kg. Αυτό σημαίνει ότι παρέχει την κατάλληλη ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ειδικότητα που απαιτείται για τη συμμόρφωση στις τρέχουσες νομοθεσίες σχετικά με τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια υπολειμμάτων σε δείγματα τροφίμων (Pramod , Deep, Pooja, & Mahendra, 2020). Σε ένα σύστημα LC-MS, το δείγμα που αναλύεται, αρχικά διαχωρίζεται μέσω της υγρής χρωματογραφίας και στη συνέχεια το κλάσμα που εκλούεται από τη χρωματογραφική στήλη υποβάλλεται σε ιονισμό και εισάγεται στο φασματόμετρο (Stachniuk & Fornal, Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food, 2016).

Επιπλέον, η LC σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) επιτρέπει την εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη ποσοτικοποίηση και την επιβεβαίωση πάνω από εκατό αναλυτών στόχων σε μία μόνο ανάλυση (Masiá, Morales Suarez-Varela, Llopis-Gonzalez, & Picó, 2016). Ωστόσο, είναι μία σχετικά ακριβή τεχνική.

7.2.2.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΟ ΜΕΛΙ

Όσον αφορά τα φυτοφάρμακα, η υψηλή επιλεκτικότητα που παρέχεται από τη μέθοδο LC-MS/MS επιτρέπει τον προσδιορισμό πολλών φυτοφαρμάκων, διαφορετικών χημικών οικογενειών. Ειδικά η εφαρμογή τους στην ανάλυση του μελιού και των μελισσοκομικών υποστρώματων έχουν παίξει σημαντικό ρόλο.

Το 2014 οι (Heever, Thompson, Curtis , & Pernal , 2014) ανέπτυξαν και επικύρωσαν μια μέθοδο (LC-MS/MS) ανάστροφης φάσης για την επιβεβαίωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων φουμαγγιλίνης και δικυκλοεξυλαμίνης (DCH) στο μέλι που προοριζόταν για ανθρώπινη κατανάλωση. Συνολικά αναλύθηκαν 16 δείγματα. Το αποτέλεσμα ήταν ότι η φουμαγγιλίνη ανιχνεύθηκε σε 11 από τα 16 δείγματα σε επίπεδα κάτω από 10 ng/g και μόνο σε 2 δείγματα σε επίπεδα πάνω από 10 ng/g. Η DCH ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα που δοκιμάστηκαν με συγκεντρώσεις πάνω από 10 ng/g που παρατηρήθηκαν για 15 από τα 16 δείγματα, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 20,0 έως 234,6 ng/g. Να επισημανθεί ότι η χρήση της φουμαγγιλίνης στο μέλι και στα μελισσοκομικά υποστρώματα έχει απαγορευθεί, οπότε έστω και η ανίχνευση ιχνών σημαίνει μη συμμόρφωση με τη νομοθεσία.

Επιπρόσθετα, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι με LC-MS/MS για νεονικοτινοειδή σε δείγματα μελιών. Το 2011 (Tanner & Czerwenka, 2011) αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων οκτώ νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων και δύο μεταβολιτών στο μέλι χρησιμοποιώντας την LC-MS/MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως κανένα δείγμα δεν υπερέβη τα μέγιστα όρια καταλοίπων. Κατά μέσο όρο, τα δείγματα μελιού ανθέων περιείχαν υπολείμματα νεονικοτινοειδών σε υψηλότερες ποσότητες σε σύγκριση με δείγματα μελιού του δάσους.

Άλλη μελέτη που έχει διεξαχθεί για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι και στα μελισσοκομικά υποστρώματα είναι αυτή των (Kasiotis, Anagnostopoulos, Anastasiadou, & Machera, Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees, 2014). Πιο αναλυτικά, ο στόχος ήταν να διερευνηθεί η αιτία περιστατικών θανάτου μελισσών σε σχέση με την πιθανή αλληλεπίδραση με την έκθεση σε φυτοφάρμακα. Αναλύθηκαν δείγματα

μελισσών, γύρης και μελιού από διάφορες περιοχές της Ελλάδος. Έτσι, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια μέθοδος πολλαπλών υπολειμμάτων LC–ESI-MS/MS με συνολικά 115 αναλυτές διαφορετικών χημικών τάξεων, όπως νεονικοτινοειδή, οργανοφωσφορικά, τριαζόλια, καρβαμιδικά, δικαρβοξυμίδια και δινιτροανιλίνες σε σώματα μελισσών, μέλι και γύρη μελισσών. Από την ανάλυση των δειγμάτων παρατηρήθηκε η παρουσία 14 δραστικών ουσιών σε όλες τις μήτρες με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν για τις μέλισσες από 0,3 έως 81,5 ng/g, για τη γύρη από 6,1 έως 1273 ng/g και για το μέλι ένα δείγμα ήταν θετικό στην ουσία carbendazim στα 1,6 ng/g.

ΜΕΡΟΣ Β: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ & ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1.1. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΣΚΕΥΗ & ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

1. Γυάλινες σφαιρικές φιάλες 50 mL
2. Σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια όγκου 1,5 mL με βιδωτό πώμα κατάλληλα για υγρή και αέρια χρωματογραφία
3. Πλαστικά σωληνάρια φυγοκέντρισης (PP, τύπου Falcon) όγκου 50 mL με βιδωτό πώμα
4. Γυάλινες πιπέτες Pasteur των 150 mm
5. Φυσίγγια για εκχύλιση στερεάς φάσης Phenomenex Strata-X 60 mg, volume 3 mL
6. Φυσίγγια για εκχύλιση στερεάς φάσης MCX 6 mL Oasis, Waters Corporation, Milford, MA, USA
7. Σπάτουλες και σκαφίδια ζύγισης
8. Πλαστικά και γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 25, 50 και 100 mL
9. Πλαστικοί και γυάλινοι ογκομετρικοί κύλινδροι των 10, 25 και 50 mL
10. Πλαστικές σύριγγες των 2 mL B BRAUN Injekt®
11. Φιλτράκια (syringe filter) Nylon, 25mm, 0,22μm, Membrane Solutions
12. Μέσα ατομικής προστασίας (εργαστηριακή ποδιά, γάντια νιτριλίου, προστατευτικά γυαλιά)

1.2. ΟΡΓΑΝΑ & ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ

1. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας (5 δεκαδικών ψηφίων) AB 135-S/FACT, Mettler Toledo
2. Αυτόματες πιπέτες Gilson μεταβλητού όγκου 1-10 μL (M10), 10-100 μL (M100) και 100-1000 μL (M1000)
3. Αυτόματη πιπέτα Transferpette S BRAND μεταβλητού όγκου 1- 10 mL

4. Συσκευή υπερκάθαρου νερού Ultra-Clear® TWF UV with 30 liter permeate tank, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation Gmb
5. Ψυχόμενη φυγόκεντρος HERMLE Laortechnik GmbH Z 446 K
6. Αυτόματος αναδευτήρας περιδίνησης Vortex MS1 Minishaker IKA®Agytax
7. Αναδευτήρας περιδίνησης Vortex-Genie 2 Si™
8. Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού, Heidolph/WB2001,VV2011
9. Εργαστηριακή αντλία κενού Thomas Industries Inc. model 905CD18 524 ITFE, Gilford Instruments Lab. USA model 3022A
10. Σύστημα συστοιχίας κενού για εκχύλιση στερεάς φάσης 10 θέσεων IST Vac Master 10
11. Σύστημα συμπίκνωσης διαλυμάτων με ρεύμα αζώτου Techne®, Bibby Scientific
12. Συσκευή λουτρό υπερήχων Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Germany
13. Συσκευή εξάτμισης συμπυκνωτή κενού SpeedVac HyperVac VC2124, Gyrozen, Gimpo, South Korea
14. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετράπολων, SHIMADZU LC-MS/MS-8060 NX, Kyoto, Japan (Degasser DGU-405, Pump LC-40D, Autosampler SIL-40C, Column Oven CTO-40 °C)
15. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετράπολων, Agilent Technologies 6410 LC/MS, USA, G4225A 1260 HiP Degasser, G1312B Bin Pump SL, G1329B ALS SL, εξοπλισμένο με γεννήτρια αζώτου Parker (NitroFlowLab)
16. Για τον έλεγχο οργάνων χρησιμοποιήθηκαν: η απόκτηση δεδομένων Agilent Mass Hunter Triple Quad B.01.04 και για την επεξεργασία δεδομένων Agilent MassHunter Workstation Quantitative Analysis version B.09.00 για τα δείγματα που αναλύθηκαν για τα φυτοφάρμακα, τη φουμαγγιλίνη και την αμιπράζη
17. Η απόκτηση και η επεξεργασία δεδομένων για το σύστημα υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετράπολων, SHIMADZU LC-MS/MS-8060 πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό LabSolutions SHIMADZU
18. Σύστημα αέριας χρωματογραφίας συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετράπολων Shimadzu GC-MS/MS Nexis GC 2030 Kyoto, Japan, AOC-6000 autosampler με GCMS-TQ8040 NX

19. Η απόκτηση και η επεξεργασία δεδομένων πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό LabSolutions GCMS, έκδοση 4.52

1.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1.3.1. ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

1.3.1.1. Για τα Φυτοφάρμακα χρησιμοποιήθηκαν ως Εσωτερικά Πρότυπα:

1. Chloropyrifos D10 καθαρότητα $\geq 97,5$ %, Sigma-Aldrich® Solutions
2. Imidacloprid D4 καθαρότητα $\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich® Solutions
3. Carbendazim D3 καθαρότητα $\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich® Solutions
4. Dimethoate D6 καθαρότητα $\geq 95,0$ %, Sigma-Aldrich® Solutions
5. Deltamethrin D5 καθαρότητα $\geq 95,0$ %, Sigma-Aldrich® Solutions
6. Triphenyl phosphate (TPP) καθαρότητα $\geq 96,0$ %, Sigma-Aldrich® Solutions

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, τα οποία έχουν καθαρότητα $>90\%$ και αγοράστηκαν από τις Sigma-Aldrich (Büchs, Switzerland), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany), και ChemService (Milan, Italy):

Πίνακας 1.1. Οι ουσίες εμβολιασμού για τα φυτοφάρμακα με τα όρια ποσοτικοποίησης

Αναλύτης	LOQ	Αναλύτης	LOQ	Αναλύτης	LOQ
	mg/kg		mg/kg		mg/kg
acetamiprid	0,0005	EPN	0,01	penconazole	0,005
acetonifen	0,01	ethion	0,01	pencycuron	0,01
alachlor	0,0005	ethoprophos	0,0005	pendimethalin	0,01
aldicarb sulfone	0,005	famoxadone	0,0005	phosalone	0,005
ametryn	0,0005	fenamidone	0,005	phosmet	0,001
atrazine	0,01	fenamiphos	0,005	phosphamidine	0,005

azimsulfuron	0,001	fenamiphos sulfone	0,001	phoxim	0,005
azoxystrobin	0,0005	Fenamiphos sulfoxide	0,001	Piperonyl butoxide	0,005
benalaxyl	0,005	fenbuconazole	0,001	pirimicarb	0,005
benfuracarb	0,001	fenpropathrin	0,01	pirimiphos-methyl	0,001
bensulfuron-methyl	0,001	fenpropimorph	0,01	prometryn	0,0005
bifenthrin	0,005	fenthion	0,01	propiconazole	0,005
boscalid	0,005	fenthion-sulfone	0,01	prothioconazole desthio	0,005
bupirimate	0,005	fenthion-sulfoxide	0,001	pyraclostrobin	0,005
buprofezin	0,005	flusilazole	0,001	pyrazophos	0,001
cadusafos	0,001	fosthiazate	0,001	pyrimethanil	0,005
carbendazim	0,001	haloxyfopethyl ester	0,005	quinoxifen	0,005
carbofuran	0,001	imazalil	0,005	spinosad A	0,0005
carboxin	0,001	imidacloprid	0,001	spiroxamine	0,0005
Chlorpyrifos ethyl	0,005	indoxacarb	0,001	tebuconazole	0,005
chlorsulfuron	0,005	iprodione	0,005	tebufenozide	0,005
clethodim	0,005	iprovalicarb	0,001	terbufos	0,005
clofentezine	0,005	isoproturon	0,001	terbuthylazine	0,005
clothianidin	0,001	linuron	0,0005	tetraconazole	0,01
λ-cyhalothrin	0,01	malaoxon	0,005	thiabendazole	0,001
Cyproconazole 1	0,005	malathion	0,005	thiacloprid	0,0005
Cyproconazole 2	0,005	mepanipyrim	0,005	thiamethoxam	0,0005
cyprodinil	0,005	metalaxyl	0,0005	thifensulfuron-methyl	0,005
demeton-S-methyl	0,01	metconazole	0,0005	thiodicarb	0,001
demeton-S-methyl sulfoxide	0,005	methidathion	0,001	triazophos	0,001
desmetryn	0,001	methoxyfenozide	0,0005	tricyclazole	0,001
diazinon	0,005	metoxuron	0,005	trifloxystrobin	0,005
diethofencarb	0,005	metribuzin	0,001	triticonazole	0,01
difenoconazole	0,001	monocrotophos	0,0005	triadimefon	0,01

dimethoate	0,001	monolinuron	0,001	zoxamide	0,005
dimethomorph	0,005	myclobutanil	0,005	coumaphos	0,001
disulfoton	0,005	nicosulfuron	0,001	hexaconazole	0,01
disulfoton sulfoxide	0,01	omethoate	0,001	cypermethrin	0,01
dodemorph	0,001	oxadiazon			

1.3.1.2. Για τις Νιτροϊμιδαζόλες χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ουσίες για τον εμβολιασμό των δειγμάτων:

1. HMMNI (2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole), καθαρότητα $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich® Solutions
2. Hydroxymetronidazol (MNZOH), καθαρότητα $\geq 99,0 \%$, Sigma-Aldrich® Solutions
3. Dimetridazole, καθαρότητα $\geq 98,0 \%$, Sigma-Aldrich® Solutions
4. Metronidazole, καθαρότητα $\geq 98,0 \%$, Sigma-Aldrich® Solutions
5. Ronidazol καθαρότητα $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich® Solutions
6. IPOH (Hydroxyipronidazole) καθαρότητα 99,14%, DR EHRENSORFER™, LGC
7. Ternidazole Hydrochloride καθαρότητα 86,0%, DR EHRENSORFER™, LGC

Το Εσωτερικό Πρότυπο ήταν το Ipronidazole D3 99,5%, DR EHRENSORFER™, LGC

1.3.1.3. Για τη Φουμαγγιλίνη χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω ουσία για τον εμβολιασμό:

Fumagillin καθαρότητα 93%, Toronto Research Chemicals (TRC), LGC

1.3.1.4. Για την Αμιτράζη χρησιμοποιήθηκαν ως Εσωτερικά Πρότυπα:

1. Amitraz-d6 καθαρότητα 98%, Toronto Research Chemicals (TRC), LGC
2. DMA D6 (N, N-Dimethylaniline-d6) καθαρότητα 97%, Toronto Research Chemicals (TRC), LGC

Για τον εμβολιασμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

1. 2,4-dimethylformamide (DMF) (Amitraz Related Compound A), καθαρότητα $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich® Solutions
2. 2,4-dimethylphenyl-N'-methylformamidine (DMPF) (Amitraz Related Compound B), καθαρότητα $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich® Solutions
3. DMA καθαρότητα $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich® Solutions
4. Amitraz καθαρότητα $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich® Solutions

1.3.2. ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Υπερκάθαρο νερό (ddH₂O)
2. Μεθανόλη (MeOH), Methanol LC-MS Grade ($\geq 99,9\%$), Fisher Chemical
3. Ακετονιτρίλιο (ACN), Acetonitrile LC-MS Grade ($\geq 99,9\%$), Fisher Chemical
4. Ακετόνη (Acetone), PESTIPURE or pesticide analysis ($\geq 99,9\%$), CARLO ERBA
5. Φορμικό οξύ (CH₂O₂), Formic acid for mass spectrometry, Honeywell Fluka TM
6. PSA (Primary Secondary Amin) (99%) ISOLUTE®, BIOTAGE
7. QuE Z-Sep SupelTM, 20 (99%) Gram Bulk, SUPELCO
8. Sorbent C₁₈ ec, (99%) CHROMABOND®, MACHEREY-NAGEL
9. Κιτρικό οξύ, disodium salt sesquihydrate (99%), ACROS
10. Sodium citrate tribasic dihydrate ($\geq 99\%$), CARLO ERBA
11. Χλωριούχο νάτριο (NaCl) 99,5%, FISHER SCIENTIFIC
12. Θεικό μαγνήσιο (MgSO₄) 99,5%, THERMOS SCIENTIFIC
13. Μυρμηκικό αμμώνιο (ammonium formate), καθαρότητα 98%, CARLO ERBA
14. Οξικό αμμώνιο (ammonium acetate), καθαρότητα 98%, Scharlau, Scharlab S.L.
15. Οξικό οξύ (acetic acid) ($\geq 99\%$), Sigma-Aldrich® Solutions
16. Αμμωνία (NH₃) 25% ($\geq 99,9\%$), Sigma-Aldrich® Solutions

1.3.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

1.3.3.1. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ

Παρασκευάστηκαν μεμονωμένα διαλύματα παρακαταθήκης, τόσο για τα δείγματα εμβολιασμού όσο και για τα εσωτερικά πρότυπα, από τις πρότυπες ουσίες που αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο (1.3.1.) σε συγκέντρωση 500-1000ppm σε μεθανόλη για τα φυτοφάρμακα και τις νιτροϊμιδαζόλες, σε ακετονιτρίλιο για την αμιτράζη και τη φουμαγγιλίνη, τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

1.3.3.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκε ένα μείγμα για τα φυτοφάρμακα με τις ουσίες που αναφέρονται στην παράγραφο 1.3.1.1. καθώς και ένα μείγμα για τις νιτροϊμιδαζόλες με τις ουσίες που αναφέρονται στην παράγραφο 1.3.1.2., ενώ επιλέχθηκαν μεμονωμένα διαλύματα εργασίας για τη φουμαγγιλίνη, την αμιτράζη και τους μεταβολίτες της, στους ίδιους διαλύτες και στις ίδιες συνθήκες αποθήκευσης με τα διαλύματα παρακαταθήκης.

Τα εσωτερικά πρότυπα έγιναν μεμονωμένα από τα πρότυπα παρακαταθήκης.

1.3.3.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

Τα διαλύματα βαθμονόμησης (calibration solutions) παρασκευάστηκαν με ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων από τα διαλύματα εργασίας με τελικές συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη για τα φυτοφάρμακα και τις νιτροϊμιδαζόλες, ακετονιτρίλιο για την αμιτράζη και τη φουμαγγιλίνη.

1.4. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ

Σε ότι αφορά την επικύρωση των μεθόδων, για την πλειονότητα των φυτοφαρμάκων η ομάδα του ΕΤΕΓΦ του ΜΦΙ έχει δημοσιεύσει πληθώρα εργασιών σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά στις οποίες παρατίθενται αναλυτικά στοιχεία για τα κριτήρια επικύρωσης των μεθόδων. Στην εν λόγω εργασία, δόθηκε έμφαση στην επικύρωση των μεθόδων για τις νιτροϊμιδαζόλες και τη φουμαγγιλίνη, και ειδικά στη μελέτη ανάκτησης.

2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Συνολικά ήταν τριάντα δείγματα μελιών από όλη την Ελλάδα, τα οποία αναλύθηκαν όλα για πιθανά υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Από αυτά επιλέχθηκαν μερικά να αναλυθούν για εύρεση αντιβιοτικών φουμαγγιλίνης και νιτροϊμιδαζολών και κάποια για ακαρεοκτόνο αμιτράζη.

Πίνακας 2.1. Αναλυτικά Τα δείγματα που αναλύθηκαν

ΔΕΙΓΜΑ	ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ 1	ΕΙΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ 2
1	ΜΕΛΙ	Κρήτη	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ
2	ΜΕΛΙ	Μακεδονία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
3	ΜΕΛΙ	Κρήτη	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
4	ΜΕΛΙ	Μακεδονία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ
5	ΜΕΛΙ	Λέσβος	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
6	ΜΕΛΙ	Ανατολική Αττική	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ
7	ΜΕΛΙ	Καρδίτσα	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
8	ΜΕΛΙ	Αρκαδία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
9	ΜΕΛΙ	Λακωνία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ

10	ΜΕΛΙ	Αρκαδία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ
11	ΜΕΛΙ	Άρτα	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
12	ΜΕΛΙ	Χαλκιδική	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ
13	ΜΕΛΙ	Αρκαδία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
14	ΜΕΛΙ	Ανατολική Αττική	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
15	ΜΕΛΙ	Δυτική Αττική	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ
16	ΜΕΛΙ	Μεσσηνία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ
17	ΜΕΛΙ	Ανατολική Αττική	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ
18	ΜΕΛΙ	Θεσσαλονίκη	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ
19	ΜΕΛΙ	Αρκαδία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
20	ΜΕΛΙ	Αρκαδία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ
21	ΜΕΛΙ	Αρκαδία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ
22	ΜΕΛΙ	Μεσσηνία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
23	ΜΕΛΙ	Δυτική Αττική	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
24	ΜΕΛΙ	Δυτική Αττική	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
25	ΜΕΛΙ	Λασιθί	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
26	ΜΕΛΙ	Ηλεία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
27	ΜΕΛΙ	Χαλκιδική	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ
28	ΜΕΛΙ	Πάρος	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ
29	ΜΕΛΙ	Αρκαδία	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ
30	ΜΕΛΙ	Φλώρινα	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	ΑΜΙΤΡΑΖΗ

3. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιών, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τη μέθοδο QuEChERS και αναλύθηκαν με

τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC/MS-MS) καθώς και με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC/MS-MS).

3.1.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν: Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 2g μελιού σε falcon των 50mL και προστέθηκαν 2 mL υπερκάθαρου νερού (H₂O) και 4 mL ακετονιτρίλιο (ACN), καθώς και τα έξι εσωτερικά πρότυπα που αναφέρονται στην παράγραφο 1.3.3.2. Ομογενοποιήθηκαν στο Vortex για 30 sec και στη συνέχεια προστέθηκαν τα άλατα για την εκχύλιση της μήτρας (QuEChERS salts). Πιο συγκεκριμένα τα άλατα που προστέθηκαν ήταν 0,8g MgSO₄, 0,2g NaCl, 0,2g trisodium citrate dihydrate και 0,1g sodium hydrogen citrate sesquihydrate. Στη συνέχεια αναδεύτηκαν για 4 λεπτά στον αναδευτήρα δοχείων (Agytax) και φυγοκεντρήθηκαν σε συνθήκες 4500 rpm, 20°C για 5 min. Με την πιπέτα έγινε η παραλαβή της στιβάδας του ACN και τοποθετήθηκαν σε ξηρό πάγο για 3 min. Από το υπερκείμενο παραλάβαμε 2mL σε falcon των 50mL και προστέθηκαν τα άλατα καθαρισμού (clean up salts). Πιο αναλυτικά προστέθηκαν 0,5g MgSO₄, 50 mg PSA, 50 mg C18 και 50mg z-Sep. Αναδεύτηκαν για 4 min στον αναδευτήρα δοχείων (Agytax) και φυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες με την προηγούμενη φυγοκέντρωση. Στο τέλος φιλτράραμε το υπερκείμενο και το τοποθετήσαμε σε σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια με πώμα.

3.1.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΓΡΗΣ/ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων στα δείγματα μελιού χρησιμοποιήθηκαν τόσο η υγρή χρωματογραφία όσο και η αέρια σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας.

3.1.2.1. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC-MS/MS)

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS για τις ουσίες που περιγράφονται στον Πίνακα 1.1., εξοπλισμένο με το λογισμικό Agilent Mass Hunter Triple Quad B.01.04 για τη λειτουργία οργάνων και Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.01.04. για την αξιολόγηση των δεδομένων. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη ανάστροφης φάσης ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent, 150 mm × 2,1 mm × 3,5 μm. Ο όγκος της έγχυσης ήταν 10 μL για κάθε δείγμα. Οι κινητές φάσεις ήταν: η Α φάση ήταν νερό με 5 mM μυρμηκικό αμμόνιο, 0,1% μυρμηκικό οξύ και 0,02% ακετονιτρίλιο και η Β φάση ήταν μεθανόλη με 5 mM μυρμηκικό αμμόνιο και 0,1% μυρμηκικό οξύ. Ο ρυθμός ροής και η θερμοκρασία της στήλης καθορίστηκαν στα 0,3 mL min⁻¹ και 30 °C αντίστοιχα. Η βαθμιδωτή έκλουση ήταν ως εξής: από 0–2 min 20% Β, 2–12 min γραμμικά με κλίση από 20 σε 60% Β, 12–30 min γραμμικά από 60 έως 100% Β και 30–35 min 100 % Β. Στη συνέχεια το σύστημα αυξήθηκε γραμμικά έως 20 min σε συγκέντρωση 100%. Σε αυτό το σημείο, πραγματοποιήθηκε 10 min μετά την ώρα προσαρμογής στις αρχικές συνθήκες. Το φασματόμετρο μάζας εκτελέστηκε σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλής αντίδρασης (MRM) με θετικό ιονισμό ψεκασμού ηλεκτρονίων (ESI). Ως αέριο εκνέφωσης και σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε πολύ υψηλής καθαρότητας άζωτο. Οι μεταπτώσεις των ουσιών που αναλύθηκαν αναγράφονται λεπτομερώς στα επιστημονικά άρθρα: «Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees», (Kasiotis, Anagnostopoulos, Anastasiadou, & Machera, Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees, 2014), «Pesticide and Metabolites Residues in Honeybees: A 2014-2017 Greek Compendium» (Kasiotis & Machera, Pesticide and Metabolites Residues in Honeybees: A 2014-2017 Greek Compendium, 2018), «Pesticides residues and metabolites in honeybees: A Greek overview exploring Varroa and Nosema potential synergies» (Kasiotis, et al., 2021), «Pesticide Residues and Metabolites in Greek Honey and Pollen: Bees and Human Health Risk Assessment» (Kasiotis, Zafeiraki, Manea-Karga, Anastasiadou, & Machera, 2023).

3.1.2.2. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (GC-MS/MS)

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αέριας χρωματογραφίας συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετράπολων Shimadzu GC-MS/MS Nexis GC 2030 Kyoto, Japan, AOC-6000 autosampler με GCMS-TQ8040 NX και η απόκτηση και η επεξεργασία δεδομένων πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό LabSolutions GCMS, έκδοση 4.52. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν MEGA-5HT 30m × 0,25mm × 0,25 mm με θερμοκρασία 50°C. Η ένεση γίνεται στους 250°C, ο χρόνος της δειγματοληψίας είναι 1min και η λειτουργία της έγχυσης είναι splitless. Η ροή αερίου είναι ήλιο και η ροή στήλης είναι 1,69 mL/min. Ο έλεγχος της ροής είναι Linear velocity. Το πρόγραμμα της θερμοκρασίας φούρνου ήταν ο εξής: 50°C για 1min, αυξάνεται στους 100°C με ρυθμό 20°C/min, στη συνέχεια φτάνει στους 200°C με ρυθμό 5°C/min, ύστερα τους 280°C με ρυθμό 5°C/min και τέλος φτάνει τους 300°C με ρυθμό 5°C/min, έχοντας συνολική διάρκεια ανάλυσης τα 58,50 min. Οι μεταπτώσεις των ενώσεων που αναλύθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 3.1. Οι μεταπτώσεις των ενώσεων που αναλύθηκαν για τα φυτοφάρμακα με αέρια χρωματογραφία GC-MS/MS

Compound		m/z 1	m/z 2	m/z 3
TPP (ISTD)	MRM	215.10>168.10	325.10>169.10	326.10>233.00
p,p'-DDT	MRM	235.00>165.00	237.00>165.00	235.00>199.00
Tetramethrin-1 / Tetramethrin-2	MRM	164.10>107.10	164.10>77.00	164.10>135.10
Phosmet	MRM	160.00>77.00	160.00>133.00	160.00>105.00
Bromopropylate	MRM	340.90>182.90	340.90>184.90	340.90>157.00
Bifenthrin	MRM	181.10>166.10	181.10>179.10	181.10>153.10
Fenpropathrin	MRM	181.10>152.10	265.10>210.10	181.10>127.10
Phenothrin-1 / Phenothrin-2	MRM	123.10>81.00	183.10>153.10	183.10>168.10
Tetradifon	MRM	226.90>199.00	355.90>159.00	355.90>228.90
Azinphos-methyl	MRM	160.10>132.10	160.10>77.00	132.10>77.00
lambda-Cyhalothrin	MRM	181.10>152.10	163.10>91.00	163.10>127.00
Acrinathrin-1 / Acrinathrin-2	MRM	181.10>152.10	289.10>93.00	181.10>127.10
Azinphos-ethyl	MRM	132.10>77.00	160.10>132.10	160.10>77.00
Bitertanol-1	MRM	170.10>141.10	170.10>115.10	141.10>115.10
Acrinathrin-2	MRM	181.10>152.10	289.10>93.00	181.10>127.10
Bitertanol-1	MRM	170.10>141.10	170.10>115.10	141.10>115.10
Permethrin-1	MRM	183.10>153.10	183.10>168.10	183.10>165.10
Bitertanol-2	MRM	170.10>141.00	170.10>115.10	141.10>115.10
Coumaphos	MRM	362.00>109.00	362.00>226.00	0.00>0.00
Permethrin-2	MRM	183.10>153.10	183.10>168.10	163.10>127.10
Bitertanol-1	MRM	170.10>141.10	170.10>115.10	141.10>115.10
Cyfluthrin-1 / Cyfluthrin-2 / Cyfluthrin-3 / Cyfluthrin-4	MRM	163.10>127.10	163.10>91.00	226.10>206.10
Benzo(b)fluoranthene / Benzo(k)fluoranthene	MRM	252.00>250.00	250.00>248.00	0.00>0.00
Cypermethrin-1 / Cypermethrin-2	MRM	163.10>127.10	163.10>91.00	181.10>152.10
Boscalid	MRM	140.10>112.10	140.10>76.00	342.10>140.10
Flucythrinate-1 / Flucythrinate-2	MRM	199.10>157.10	157.10>107.10	199.10>107.10
Benzo(a)pyrene	MRM	252.00>250.00	252.00>224.00	0.00>0.00
Cyfluthrin-4	MRM	163.10>127.10	163.10>91.00	226.10>206.10
Cypermethrin-1 / Cypermethrin-2 / Cypermethrin-3 / Cypermethrin-4	MRM	163.10>127.10	163.10>91.00	181.10>152.10
Benzo(a)pyrene	MRM	252.00>250.00	252.00>224.00	0.00>0.00
Thiacloprid	MRM	251.00>224.00	224.00>170.00	224.00>197.00
Fenvalerate-1 / Fenvalerate-2 (Esfenvalerate)	MRM	225.10>119.10	225.10>147.10	419.10>225.10
tau-Fluvalinate-1 / tau-Fluvalinate-2	MRM	250.10>55.00	250.10>200.10	0.00>0.00
Fluvalinate-1 / Fluvalinate-2	MRM	250.10>55.00	250.10>200.00	252.10>55.00
Deltamethrin-1 (Tralomethrin deg.-1)	MRM	180.90>151.90	252.90>93.00	252.90>171.90
tau-Fluvalinate-2	MRM	250.10>55.00	250.10>200.10	0.00>0.00
Fluvalinate-2	MRM	250.10>55.00	250.10>200.00	252.10>55.00
Fenvalerate-2 (Esfenvalerate)	MRM	225.10>119.10	225.10>147.10	419.10>225.10
Deltamethrin-1 (Tralomethrin deg.-1) / Deltamethrin-2 (Tralomethrin deg.-2)	MRM	180.90>151.90	252.90>93.00	252.90>171.90

3.2. ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ

Για τον προσδιορισμό νιτροϊμιδαζολών και των μεταβολιτών τους σε δείγματα μελιού, αναλύθηκαν 4 δείγματα από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για την ανάλυσή τους με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC/MS-MS).

3.2.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Ζυγίστηκαν 2g μελιού σε σωληνάρια falcon των 50 mL και προστέθηκε το εσωτερικό πρότυπο. Στη συνέχεια, τα δείγματα εκχυλίστηκαν με 15 mL ddH₂O με 2% οξικό οξύ (v/v) σε λουτρό υπερήχων για 10 min και τα προκύπτοντα εκχυλίσματα πέρασαν μέσα από φυσίγγια MCX (6 mL). Τα φυσίγγια είχαν προηγουμένως ενεργοποιηθεί με 5 mL MeOH ακολουθούμενα από 5 mL του διαλύματος οξικού οξέος 2%. Το ίδιο σύστημα διαλυτών με αντίστροφη σειρά χρησιμοποιήθηκε για το πλύσιμο των φυσιγγίων. Πραγματοποιήθηκε έκλουση με 5 mL ενός μίγματος ακετονιτρίλιου-υδροξειδίου του αμμωνίου (25% v/v) σε αναλογία 95:5 v/v και ακολούθησε εξάτμιση σε συμπυκνωτή κενού SpeedVac. Τέλος, έγινε ανασύσταση σε 0,5 mL ddH₂O με 0,1% φορμικό οξύ: ακετονιτρίλιο με 0,1% φορμικό οξύ 1:1 (v/v) και στη συνέχεια φιλτραρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια με πώμα.

3.2.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC-MS/MS) ΓΙΑ ΤΙΣ ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υγρής χρωματογραφίας συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετράπολων SHIMADZU LC-MS/MS-8060 NX, Kyoto, Japan (Degasser DGU-405, Pump LC-40D, Autosampler SIL-40C, Column Oven CTO-40C). Η απόκτηση και η επεξεργασία δεδομένων πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό LabSolutions LCMS, έκδοση 4.52. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Kinetex, 150mm × 2,1mm × 2,6mm θερμοστατούμενη στους 35°C. Ο όγκος της ένεσης ήταν 10 μL.

Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 0.25mL×min⁻¹. Οι κινητές φάσεις που εφαρμόστηκαν ήταν η Α φάση νερό με 0,1% (v/v) φορμικό οξύ και η Β φάση ήταν ακετονιτρίλιο με 0,1% (v/v) φορμικό οξύ. Η βαθμιδωτή έκλουση της μεθόδου ήταν: Το 5% της κινητής φάσης Β διατηρήθηκε για 1 min, αυξήθηκε στο 40% στο 1 min και διατηρήθηκε για 4 min. Στη συνέχεια, μειώθηκε γραμμικά εντός 0,5 min στις αρχικές συνθήκες και διατηρήθηκε για 10 min για εξισορρόπηση της πίεσης της αντλίας.

Το φασματόμετρο μάζας εκτελέστηκε σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων (MRM) με θετικό ιονισμό ψεκασμού ηλεκτρονίων (ESI). Ως αέριο

εκνέφωσης και σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε πολύ υψηλής καθαρότητας άζωτο. Οι μεταπτώσεις των ουσιών που αναλύθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 3.2. Χρόνος έκλουσης, πρόδρομο και θυγατρικά ιόντα, ενέργειες σύγκρουσης και αναλογία μεταπτώσεων

Αναλύτης	Χρόνος έκλουσης (min)	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Θυγατρικά ιόντα (m/z)	Ενέργεια Σύγκρουσης (eV)	Αναλογία μεταπτώσεων
<i>Metronidazole (MNZ)</i>	5,92	171,9	82,2	24	0,947
			128,2	15	
<i>Ronidazole (RND)</i>	6,54	200,8	140,1	17	0,24
			98,05	12	
<i>Dimetridazole (DMZ)</i>	6,04	141,9	81,1	27	0,51
			96,1	17	
<i>Ipronidazole (IPZ)</i>	8,48	169,9	124,2	20	0,59
			109,2	24	
<i>Ipronidazole D3 (IPZ-D3)</i>	8,43	172,9	127,3	21	
<i>Hydroxymetronidazole (MND-OH)</i>	4,46	187,9	126,2	17	0,63
			123,2	13	
<i>Hydroxydimetridazole (DMZ-OH)</i>	6,56	157,9	140,2	16	0,07
			55,3	19	
<i>Hydroxyipronidazole (IPZ-OH)</i>	7,3	186	168,2	17	0,67
			122,2	21	
<i>Ternidazole (TND)</i>	5,87	185,9	128,2	15	0,58

3.3. ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ

Για τον προσδιορισμό της φουμαγγιλίνης σε δείγματα μελιού, αναλύθηκαν 9 δείγματα από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για την ανάλυσή τους με τη μέθοδο της υγρή χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC/MS-MS).

3.3.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Ζυγίσαμε 5g μέλι σε falcon των 50mL και προσθέσαμε 10 mL ddH₂O. Τα δείγματα ανακινήθηκαν με μηχανική ανάδευση στο Agytax για 600 sec και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min, στους 20°C, στις 4500 rpm. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) με τη χρήση των SPE Phenomenex Strata-X cartridges 60 mg, 3 mL. Η ενεργοποίηση αυτών έγινε με 5 mL MeOH και 5 mL H₂O. Έπειτα, έγινε η φόρτωση των δειγμάτων και ακολούθησε το πλύσιμο με 10 mL H₂O και MeOH σε αναλογία 60:40 (v/v). Η έκλουση έγινε με 3 mL ACN σε σφαιρικές φιάλες ώστε να εξατμιστούν στον περιστροφικό εξατμιστή. Η ανασύσταση έγινε σε 1 mL ACN και φιλτραρίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε υάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια με πώμα. Επειδή, η φουμαγγιλίνη είναι φωτοευαίσθητη ουσία, όλη η πειραματική πορεία έγινε στο σκοτάδι.

3.3.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ(LC-MS/MS) ΓΙΑ ΤΗ ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS εξοπλισμένο με την απόκτηση δεδομένων Agilent Mass Hunter Triple Quad B.01.04 για τη λειτουργία οργάνων και Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.01.04. για την αξιολόγηση των δεδομένων. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη ανάστροφης φάσης Zorbax XDB 150mm x 2,7mm x 3,5μm. Οι κινητές φάσεις ήταν η Α φάση ήταν νερό με 2mM Ammonium Formate και η Β ήταν ACN με 2mM Ammonium Formate. Ο ρυθμός ροής και η θερμοκρασία της στήλης καθορίστηκαν στα 0,3 mL min⁻¹ και 30 °C αντίστοιχα. Η βαθμιδωτή έκλουση ήταν ισοκρατική.

Το φασματόμετρο μάζας εκτελέστηκε σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλής αντίδρασης (MRM) με θετικό ιονισμό ψεκασμού ηλεκτρονίων (ESI). Ως νεφελοποιητής χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο. Το Πρόδρομος Ιόν ήταν 459,2 και τα Ιόντα Προϊόντος ήταν 177 και 131.

3.4. ΑΜΙΤΡΑΖΗ

Για τον προσδιορισμό της αμιτράζης και των μεταβολιτών της σε δείγματα μελιού, αναλύθηκαν 16 δείγματα από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδος και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για την ανάλυσή τους με τη μέθοδο της υγρή χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC/MS-MS).

3.4.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Η πειραματική πορεία που χρησιμοποιήθηκε είναι η παρακάτω:

Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν 2g μελιού σε falcon των 50 mL και προστέθηκαν 2 mL υπερκάθαρου νερού (H₂O), 4 mL ACN, καθώς και τα δύο εσωτερικά πρότυπα. Ομογενοποιήθηκαν στο Vortex για 30 sec και στη συνέχεια προστέθηκαν τα άλατα για την εκχύλιση (QuEChERS salts). Πιο συγκεκριμένα τα άλατα που προστέθηκαν ήταν 0,8g MgSO₄, 0,2g NaCl, 0,2g trisodium citrate dihydrate και 0,1g sodium hydrogen citrate sesquihydrate. Στη συνέχεια αναδεύτηκαν για 4 min στον αναδευτήρα μαγνητικής μετεώρισης (Agytax) και φυγοκεντρήθηκαν σε συνθήκες 4500rpm, 20 °C για 5 min. Με τη χρήση πιπέτας έγινε η παραλαβή της στιβάδας του ACN και τοποθετήθηκαν σε ξηρό πάγο για 3 min. Από το υπερκείμενο παραλάβαμε 2mL σε falcon των 50mL και προστέθηκαν τα άλατα καθαρισμού (clean up salts). Πιο αναλυτικά προστέθηκαν 0,5g MgSO₄, 50mg PSA, 50mg C18 και 50mg Z-Sep. Αναδεύτηκαν για 4 min στον αναδευτήρα μαγνητικής μετεώρισης (Agytax) και φυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες με την προηγούμενη φυγοκέντρωση. Στο τέλος φιλτράραμε το υπερκείμενο και το τοποθετήσαμε σε σκουρόχρωμα υάλινα φιαλίδια με πώμα.

3.4.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (LC-MS/MS) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΜΗΤΡΑΖΗ

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS εξοπλισμένο με την απόκτηση δεδομένων Agilent Mass Hunter Triple Quad B.01.04 για τη λειτουργία οργάνων και Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.01.04. για την αξιολόγηση των δεδομένων. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη ανάστροφης φάσης (ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent, $2,1 \times 150$ mm, 3,5 μ). Ο όγκος της ένεσης ήταν 10 μ L για κάθε δείγμα. Οι κινητές φάσεις ήταν η υδατική A: 1L H₂O με 314 mg μυρμηκικό αμμώνιο και 1 mL φορμικό οξύ, η οργανική φάση B: 1L ACN με 1mL φορμικό οξύ. Ο ρυθμός ροής και η θερμοκρασία της στήλης καθορίστηκαν στα 0,2 mL min⁻¹ και 30 °C αντίστοιχα. Η βαθμιδωτή έκλυση περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.3. Η βαθμιδωτή έκλυση για την μέθοδο της αμιτράζης και των μεταβολιτών της

Time (min)	B%	Flow Gradient (ml/min)
0	60	0,2
2	60	0,2
25	80	0,25
30	100	0,28
35	100	0,28
35,1	60	0,20

Το φασματόμετρο μάζας εκτελέστηκε σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλής αντίδρασης (MRM) με θετικό ιονισμό ψεκασμού ηλεκτρονίων (ESI). Ως νεφελοποιητής και σύγκρουσης χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο. Οι μεταπτώσεις της αμιτράζης και των μεταβολιτών της παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.4. Οι μεταπτώσεις της αμιτράζης και των μεταβολιτών της

Αναλύτης	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Θυγατρικά ιόντα (m/z)
AMITRAZ D6	300	166
AMITRAZ D6	300	138
AMITRAZ D6	300	125 (quant)
AMITRAZ	294	163 (quant)
AMITRAZ	294	122
DMPF	163,1	122
DMPF	163,1	117
DMPF	163,1	106,9 (quant)
DMPF	163,1	77
DMF	149,9	132,2
DMF	149,9	107,1 (quant)
DMA-D6	128	122
DMA-D6	128	117
DMA-D6	128	110 (quant)
DMA-D6	128	106,9

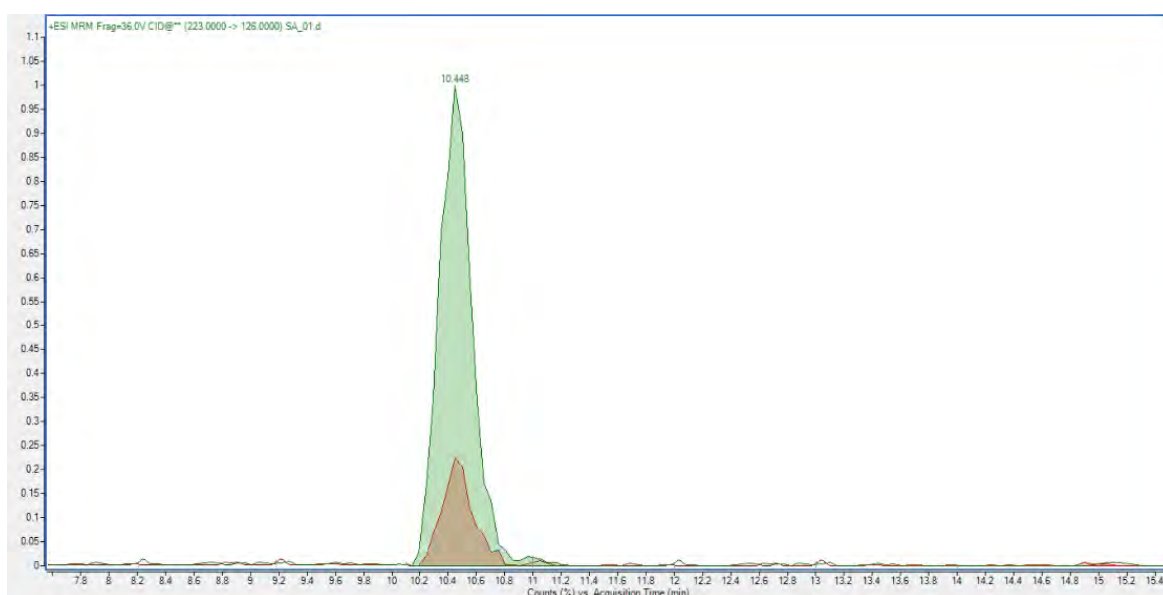
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

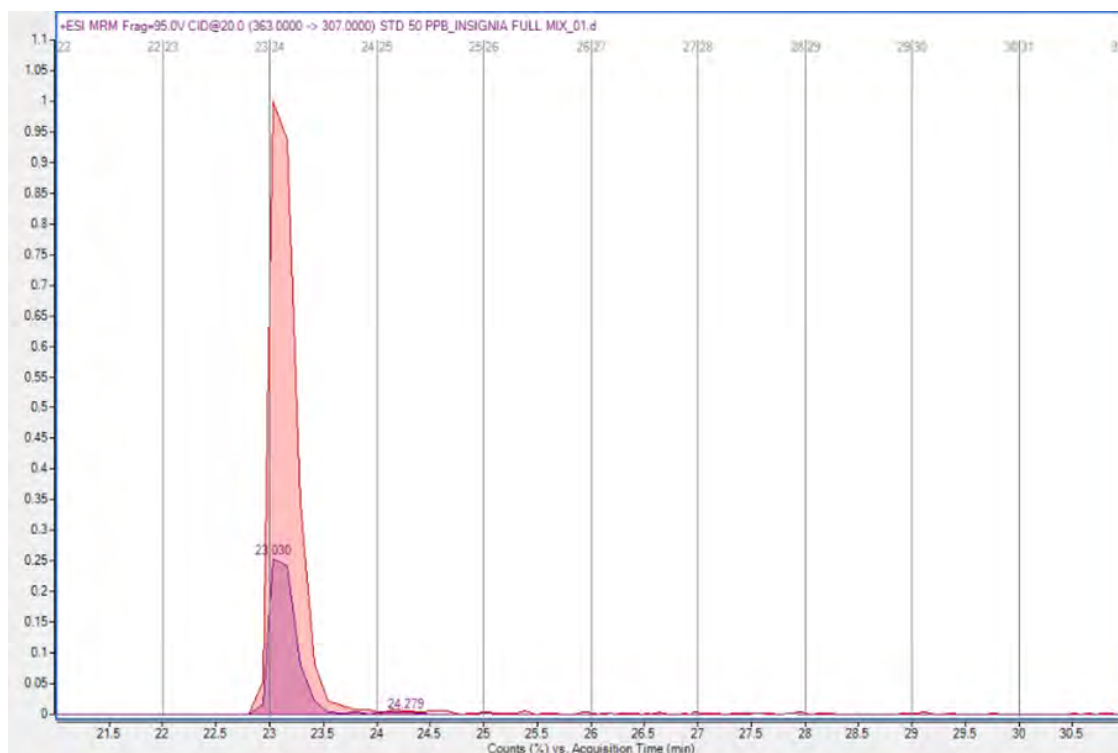
Οι φυτοπροστατευτικές ουσίες βοηθούν στην καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών στα φυτά, όμως δεν απομακρύνονται τόσο εύκολα από το περιβάλλον με αποτέλεσμα να παραμένουν στα τρόφιμα και να ανιχνεύονται υπολείμματα αυτών. Το μέλι είναι ένα τρόφιμο το οποίο δεν υποβάλλεται σε κάποια επεξεργασία, οπότε το καθιστά ένα αρκετά ευαίσθητο τρόφιμο με πλούσια διατροφική αξία. Επίσης, είναι δείκτης για τη κατάσταση των ουσιών που επιβαρύνουν το οικοσύστημα και την ατμόσφαιρα.

Από τα τριάντα δείγματα που έτρεξαν τα δεκαοχτώ είχαν ευρήματα σε έξι φυτοπροστατευτικές ουσίες. Ύστερα από υπολογισμούς που έγιναν στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα. Όπως αποδεικνύεται όλες οι τιμές είναι κάτω από τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRL) που έχει καθορίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως είναι ασφαλή να διατεθούν στην αγορά.

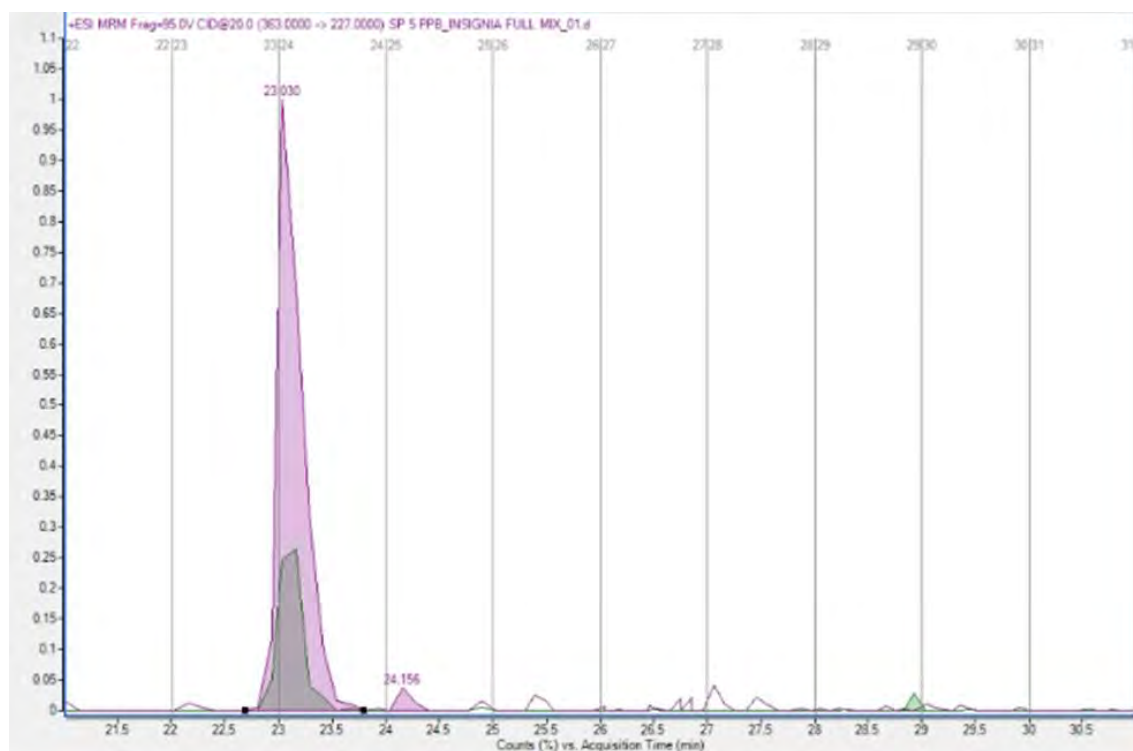
Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές απεικονίσεις των αποτελεσμάτων από τα δείγματα που αναλύθηκαν:



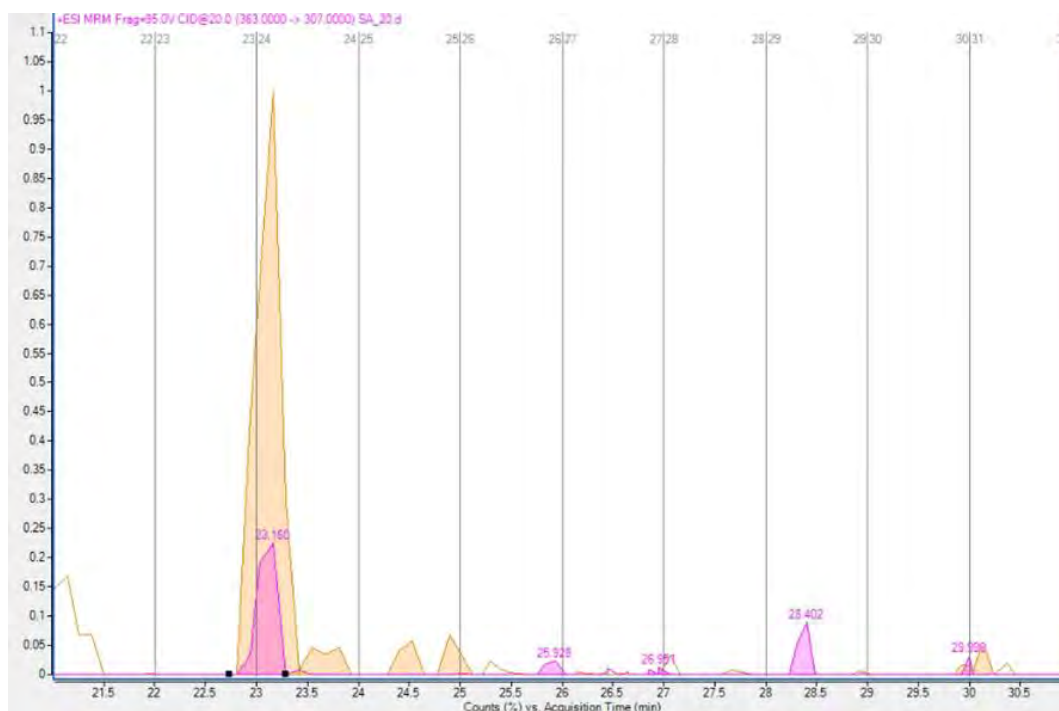
Εικόνα 4.1. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας acetamiprid στο δείγμα 1 με τη μέθοδο LC-MS/MS



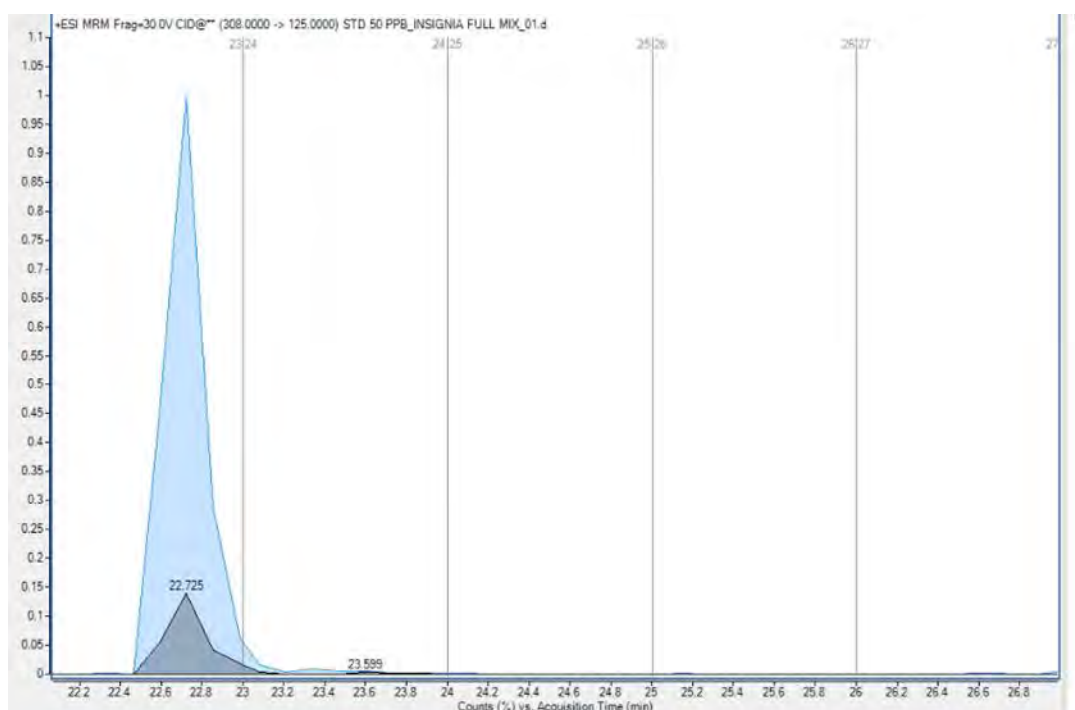
Εικόνα 4.2. MRM χρωματογράφηματα (σε επικάλυψη) της ουσίας coumaphos στο διάλυμα εργασίας (standard) 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS



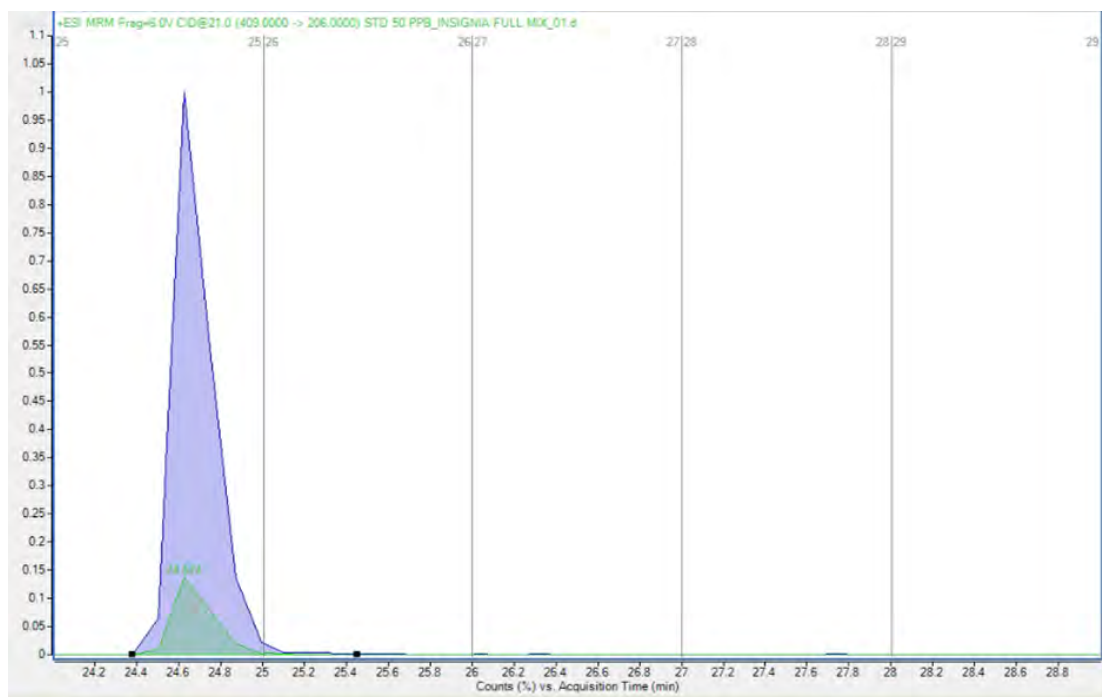
Εικόνα 4.3. MRM χρωματογράφηματα (σε επικάλυψη) της ουσίας coumaphos στο διάλυμα εμβολιασμού (spike) σε συγκεντρωση 5ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS



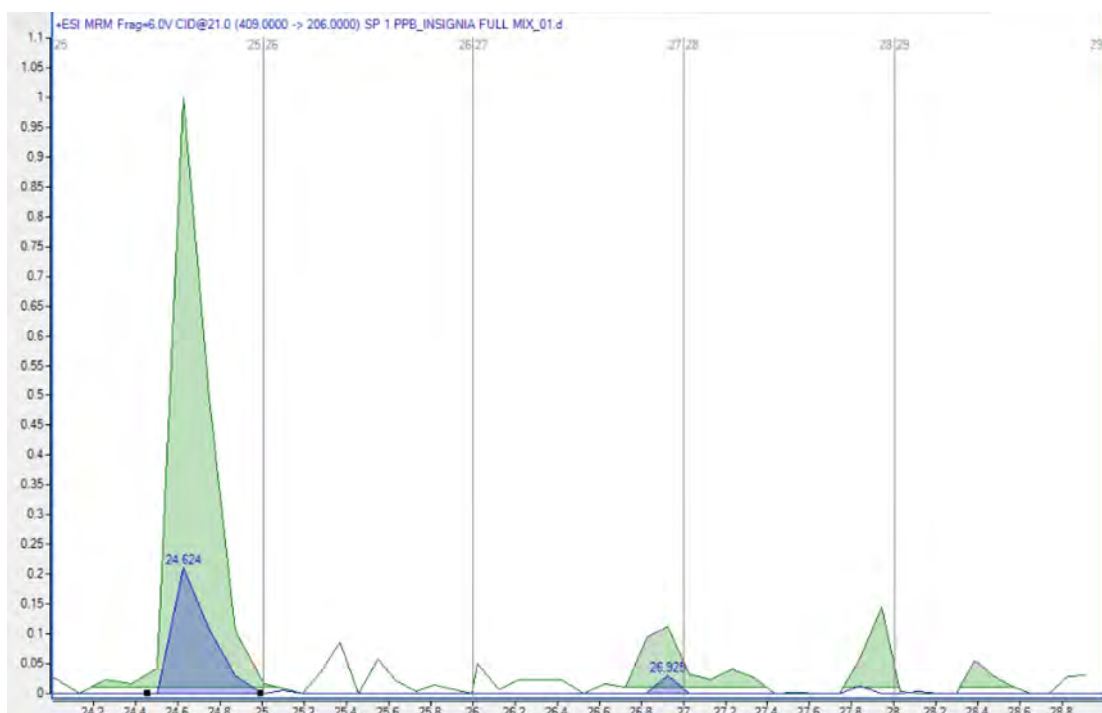
Εικόνα 4.4. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας coumaphos στο δείγμα 20 με τη μέθοδο LC-MS/MS



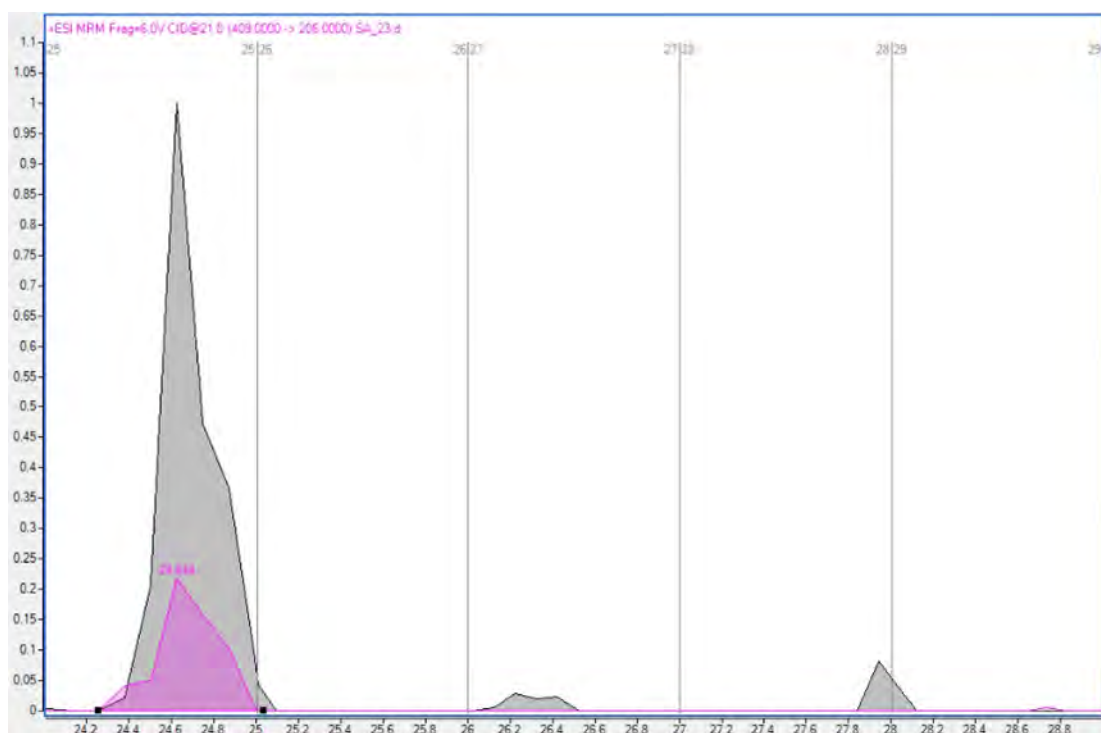
Εικόνα 4.5. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας tebuconazole του διαλύματος εργασίας (standard) 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS



Εικόνα 4.6. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας trifloxystrobin του διαλύματος εργασίας (standard) 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS



Εικόνα 4.7. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας trifloxystrobin του διαλύματος εμβολιασμού (spike) 1ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS



Εικόνα 4.8. MRM χρωματογράφημα (σε επικάλυψη) της ουσίας trifloxystrobin του δείγματος 23 με τη μέθοδο LC-MS/MS

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα αποτελέσματα των ευρυμάτων ύστερα από την ανάλυση:

Πίνακας 4.1. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για τα φυτοφάρμακα (παρατίθεται το MRL)

ΟΥΣΙΕΣ	MRL (ng/g)	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΑΟΠΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Acetamiprid	50	1ο	6,691	Κρήτη
		4ο	1,116	Μακεδονία
		6ο	< LOQ	Ανατολική Αττική
		12ο	<LOQ	Χαλκιδική
		14ο	0,665	Ανατολική Αττική
		17ο	3,775	Ανατολική Αττική
		18ο	0,500	Θεσσαλονίκη
		21ο	< LOQ	Αρκαδία
		30ο	0,943	Φλώρινα

Carbendazim	1000	20o	<LOQ	Αρκαδία
Coumaphos	100	3o	<LOQ	Κρήτη
		4o	1,264	Μακεδονία
		6o	<LOQ	Ανατολική Αττική
		9o	<LOQ	Λακωνία
		10o	<LOQ	Αρκαδία
		16o	<LOQ	Μεσσηνία
		17o	3,832	Ανατολική Αττική
		20o	<LOQ	Αρκαδία
		21o	<LOQ	Αρκαδία
		25o	< LOQ	Λασιθι
		28o	0,183	Πάρος
Tebuconazole	50	20o	<LOQ	Αρκαδία
Thiabendazole	50	12o	14,507	Χαλκιδική
		15o	2,886	Δυτική Αττική
		28o	3,863	Πάρος
Trifloxystrobin	50	23o	<LOQ	Δυτική Αττική

4.2. ΝΙΤΡΟΪΜΙΔΑΖΟΛΕΣ & ΦΟΥΜΑΓΓΙΛΙΝΗ

Η φουμαγγιλίνη, έχει σχετιστεί με γονοτοξικές και καρκινογόνες επιδράσεις στον άνθρωπο και στα ζώα. Για αυτό έχει απαγορευτεί η χρήση της στη μελισσοκομία και η Ευρωπαϊκή Ένωση δεν έχει ορίσει καμία τιμή για τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRL). Επομένως, έστω και μία ελάχιστη ποσότητα ανίχνευσης σε δείγμα μελιού από τη συγκεκριμένη ουσία σημαίνει μη συμμόρφωση με τη νομοθεσία.

Επίσης, οι νιτροϋμιδαζόλες καθώς και οι μεταβολίτες τους έχει αποδειχθεί η μεταλλαξιογόνο δράση τους. Κατά συνέπεια, δεν έχουν καθοριστεί ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRL) για αυτές τις ενώσεις. Επομένως, η διμετρινδαζόλη και η

ρονιδαζόλη έχουν απαγορευτεί, ενώ οι άλλες νιτροϊμιδαζόλες δεν έχουν λάβει άδεια χρήσης σε ζώα παραγωγής τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των μελισσών, εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (THE EUROPEAN COMMISSION, 2010).

Σε κανένα από τα δείγματα που αναλύθηκαν δεν ανιχνεύθηκε καμία από αυτές τις ουσίες. Για τη φουμαγιλίνη μπορεί να προβλεφθεί η απουσία της από τα δείγματα, καθώς είναι σταθερή για σχεδόν 1 μήνα σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας, ενώ με την ακτινοβολία εξαφανίζεται γρήγορα. Αυτή θα μπορούσε να είναι η εξήγηση για τη συχνή απουσία της ένωσης στο μέλι από επεξεργασμένα μελίσσια υπό κτηνιατρική επίβλεψη (Nozal M. , et al., 2008).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα στοιχεία επικύρωσης των δύο μεθόδων που αναπτύχθηκαν για την ανάλυση φουμαγιλίνης και νιτροϊμιδαζολών σε δείγματα μελιών:

Πίνακας 4.2. Στοιχεία επικύρωσης για τις νιτροϊμιδαζόλες και τη φουμαγιλίνη στο μέλι

Αναλύτης	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Εύρος καμπύλης βαθμονόμησης (ng/g)	Ανάκτηση (%)			RSD (%)		
				1 (μg/ kg)	10 (μg/kg)	100 (μg/ kg)	1 (μg/kg)	10 (μg/kg)	100 (μg/kg)
<i>Metronidazole</i> (MNZ)	0.1	1	0.5 - 250	89,2	93,7	99,2	8	3	6
<i>Ronidazole</i> (RND)	0.5	1		76,5	82,1	87,5	13	9	7
<i>Dimetridazole</i> (DMZ)	0.1	1		88,4	93,7	101, 9	6	7	2
<i>Ipronidazole</i> (IPZ)	0.1	1		94,9	102,4	113, 1	9	9	5
<i>Hydroxymetro nidazole</i> (MND-OH)	0.1	1		84,3	92,5	103, 8	12	7	4
<i>Hydroxydimet ridazole</i> (DMZ_OH)	0.5	1		80,7	85,4	97,3	7	5	5
<i>Ternidazole</i> (TND)	0.1	1		97,6	95,9	108, 4	11	9	6
<i>Fumagillin</i>	0.5	1		86,2	93,3	97,4	8	7	4

4.3. ΑΜΙΤΡΑΖΗ

Η αμιτράζη είναι ένα ακαρεοκτόνο, το οποίο είναι εξαιρετικά ασταθές και μεταβολίζεται γρήγορα στις ενώσεις DMPF, DMF και DMA. Οι μεταβολίτες της και κυρίως ο DMPF είναι αυτός που ανιχνεύεται πιο συχνά στις κυψέλες και στα μελισσοκομικά προϊόντα. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ορίζει τα υπολείμματα δεικτών amitraz ως το άθροισμα της αμιτράζης και όλων των μεταβολιτών που περιέχουν το τμήμα 2,4-DMA, εκφραζόμενο ως αμιτράζη (European Food Safety Authority (EFSA), 2016). Το μέγιστο επίπεδο υπολειμμάτων (MRL) του amitraz στο μέλι είναι 200 ng/g (THE EUROPEAN COMMISSION, 2017).

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν για την αμιτράζη και για τους μεταβολίτες της παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, καθώς και τα όρια ποσοτικοποίησης:

Πίνακας 4.3. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την αμιτράζη και των μεταβολιτών της

ΔΕΙΓΜΑ	MRL (ng/g)	DMF (ng/g)	DMPF (ng/g)	DMA (ng/g)	ΑΘΡΟΙΣΜΑ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
2ο	200	39,6	30,7	10,3	80,6	Μακεδονία
3ο		9,3	180,5	< LOQ	189,8	Κρήτη
5ο		13,7	11,3	< LOQ	25	Λέσβος
7ο		69,8	30,2	<LOQ	100	Καρδίτσα
8ο		6,2	43,8	< LOQ	50	Αρκαδία
11ο		5,26	ND	< LOQ	5,26	Άρτα
13ο		16,3	ND	< LOQ	16,3	Αρκαδία
14ο		14,5	ND	< LOQ	14,5	Ανατολική Αττική
19ο		< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Αρκαδία

22ο	200	42,7	6,8	ND	49,5	Μεσσηνία
23ο		53,7	< LOQ	36,1	89,8	Δυτική Αττική
24ο		37,5	27	10,7	75,2	Δυτική Αττική
25ο		37,8	< LOQ	11	48,8	Λασιίθι
26ο		25,36	< LOQ	11,6	36,96	Ηλεία
27ο		33,2	< LOQ	17,9	51,1	Χαλκιδική
30ο		ND	ND	< LOQ	< LOQ	Φλώρινα

ND=Not Detected

Τα όρια ποσοτικοποίησης για τις ενώσεις ήταν:

Αναλύτης	Όριο Ποσοτικοποίησης (mg/kg)
Amitraz	0,005
DMF	0,005
DMPF	0,005
DMA	0,01

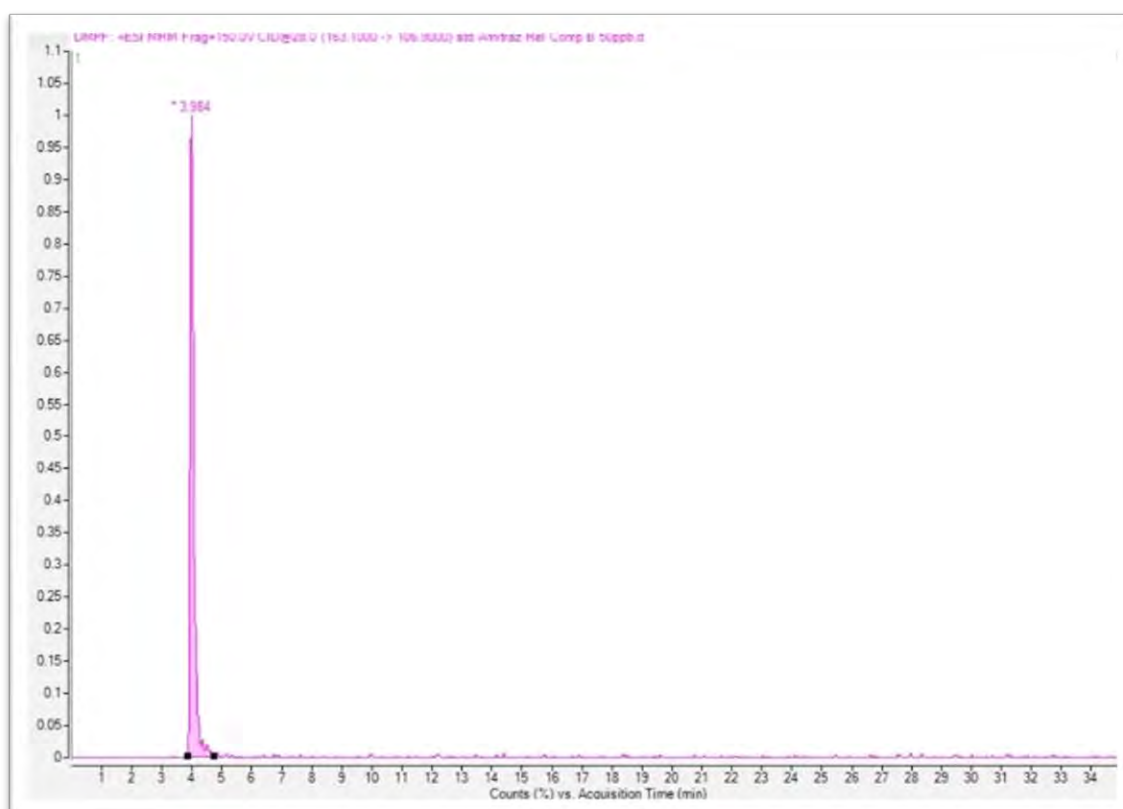
Πίνακας 4.4. Τα όρια ποσοτικοποίησης για την αμιτράζη και τους μεταβολίτες της

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα τα περισσότερα δείγματα είναι κάτω των μέγιστων επιπέδων υπολειμμάτων, κάποια είναι κάτω του ορίου ανίχνευσης και σε κάποια δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου ούτε η αμιτράζη ούτε οι μεταβολίτες της. Αυτό σημαίνει ότι είναι ασφαλή τα συγκεκριμένα μέλια να διατεθούν στην αγορά.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι τρεις μεταβολίτες της αμιτράζης σε δείγμα εμβολιασμού συγκέντρωσης 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS



Εικόνα 4.9. Χρωματογράφημα της ουσίας DMF, μεταβολίτης της αμιτράζης σε δείγμα εμβολιασμού (spike) συγκεντρώσεως 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS



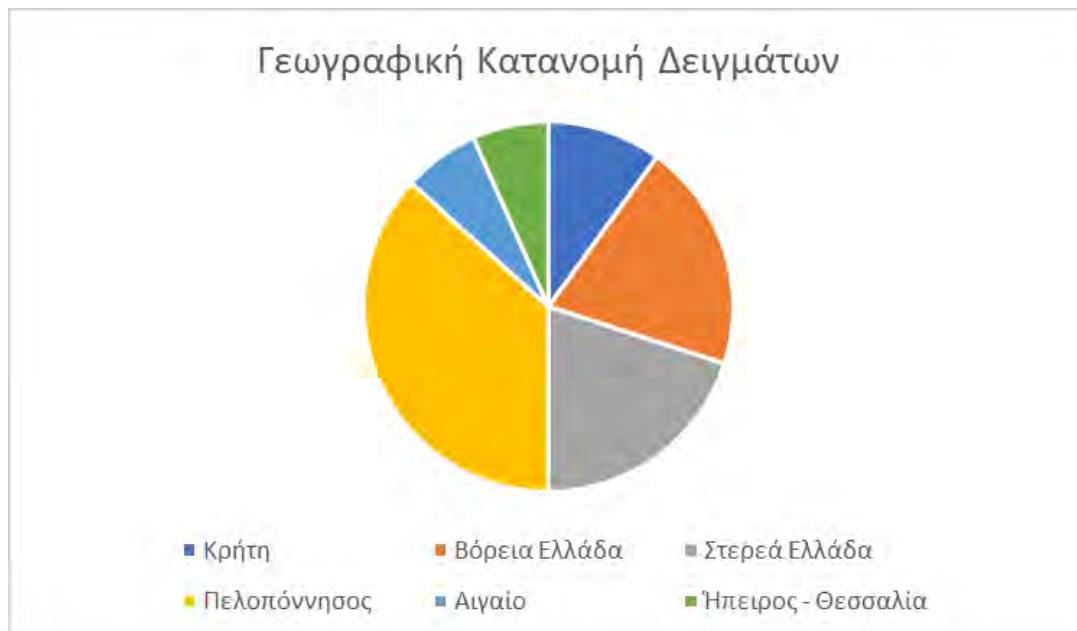
Εικόνα 4.10. Χρωματογράφημα της ουσίας DMPF, μεταβολίτης της αμιτράζης σε δείγμα εμβολιασμού (spike) συγκεντρώσεως 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS



Εικόνα 4.11. Χρωματογράφημα της ουσίας DMA, μεταβολίτης της αμιτράζης σε δείγμα εμβολιασμού (spike) συγκεντρώσεως 50ppb με τη μέθοδο LC-MS/MS

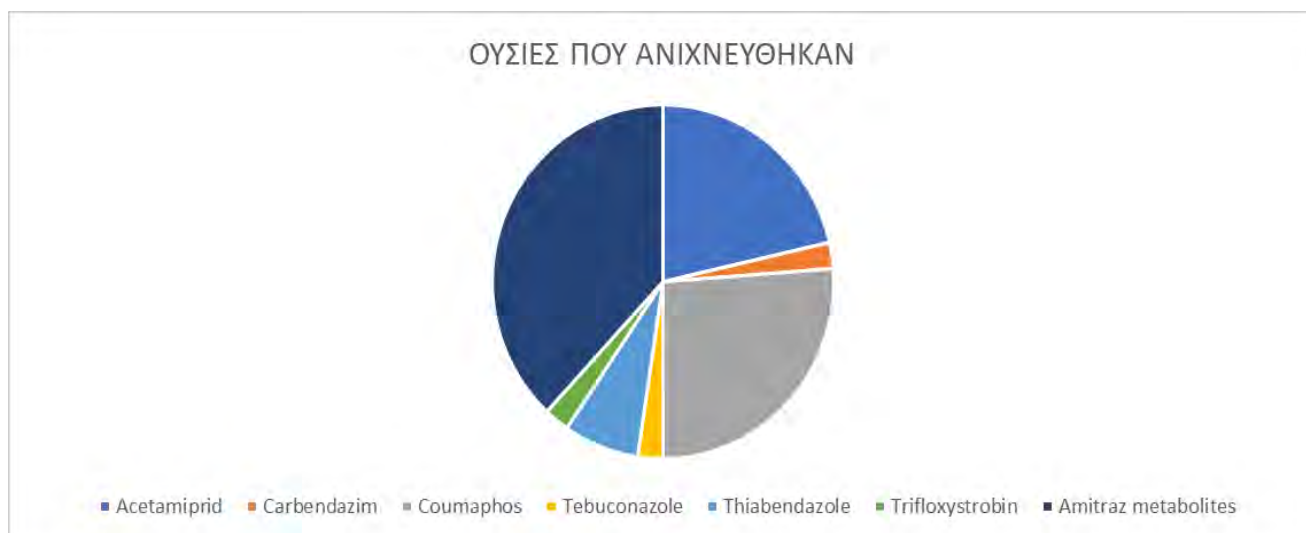
4.4. ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΕΥΡΥΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Όπως φαίνεται παρακάτω τα περισσότερα δείγματα ήταν από την Πελοπόννησο, τη Βόρεια Ελλάδα και τη Στερεά Ελλάδα



Εικόνα 4.12. Η γεωγραφική κατανομή των δειγμάτων

Παρακάτω απεικονίζονται γραφικά οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν. Όπως παρατηρείται τα περισσότερα δείγματα βρέθηκαν θετικά στην αμιτράζη και τους μεταβολίτες της, στην acetamiprid και στην coumaphos.

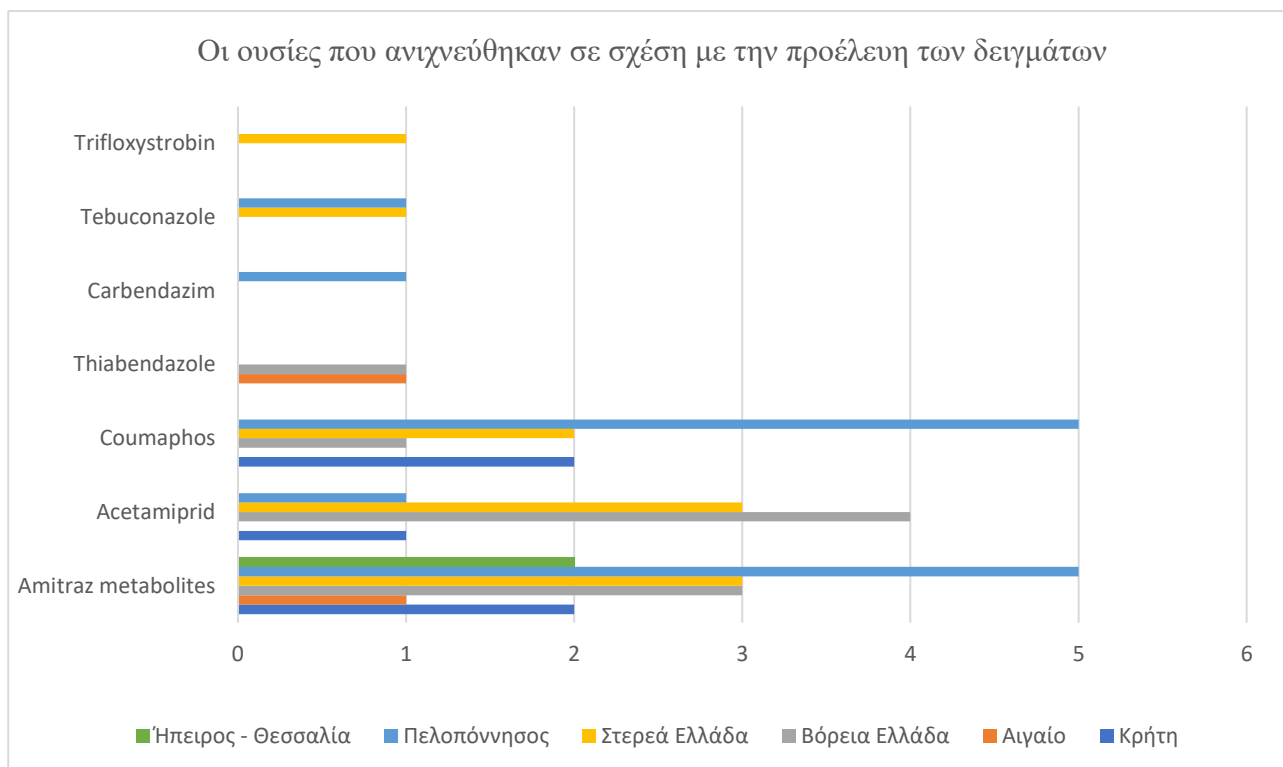


Εικόνα 4.13. Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα μελιών

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι ουσίες σε σχέση με την προέλευση των δειγμάτων. Παρατηρούμε ότι η αμιτράζη με τους μεταβολίτες της και η coumaphos είναι οι δύο κύριες ουσίες που βρέθηκαν περισσότερο στα δείγματα της Πελοποννήσου.

Στα δείγματα της Βορείου Ελλάδος ανιχνεύθηκαν κυρίως η acetamiprid καθώς και η αμιτράζη με τους μεταβολίτες της.

Στη Στερεά Ελλάδα βρέθηκαν κυρίως οι acetamiprid, η αμιτράζη με τους μεταβολίτες της και η coumaphos.



Εικόνα 4.14. Οι ουσίες που ανιχνεύθηκαν σε σχέση με την προέλευση των δειγμάτων

Συμπεραίνεται ότι είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων 1. με υψηλή ευαισθησία και σταθερότητα, έχοντας πολύ καλές ανακτήσεις ώστε να ανιχνεύουν ίχνη ουσιών, ειδικά εκείνες που είναι απαγορευμένες και δεν έχουν ορισθεί MRLs, 2. μεθόδους που θα αναλύουν τόσο σύνθετες μήτρες, όπως το μέλι, δίνοντας την ποιοτική και την ποσοτική τους σύσταση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aloizou , A.-M., Siokas, V., Vogiatzi, C., Peristeri, E., Docea, A., Petrakis, D., . . . Dardiotis, E. (2020, June). Pesticides, cognitive functions and dementia: A review. *Toxicology Letters*, σσ. 31-51. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.03.005>
- Ahamad, A., & Jitendra Kumar Ph.D. (2023, March). Pyrethroid pesticides: An overview on classification, toxicological assessment and monitoring. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 10. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100284>
- Ambrus, Á., & Yang, Y. (2015, January 20). Global Harmonization of Maximum Residue Limits for Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, σσ. 30–35. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1021/jf505347z>
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S., ŠTAJNBAHER, D., & SCHENCK, F. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), σσ. 412- 431.
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., & Cerdà, V. (2016, JUNE). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, pp. 641-654. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>
- Aryal, S. (2022, March 4). Mass Spectrometry (MS)- Principle, Working, Parts, Steps, Uses. *Microbe Notes*.
- Aryal, S., Ghosh, S., & Jung, C. (2020, June 25). Ecosystem Services of Honey Bees; Regulating, Provisioning and Cultural Functions. *Journal of Apiculture*, σσ. 119-128. doi:10.17519/apiculture.2020.06.35.2.119
- Ashraf, S. A., Mahmood, D., Elkhalfa, A., Siddiqui, A., Khan , M., Ashfaq , F., . . . Adnan , M. (2023, October). Exposure to pesticide residues in honey and its potential cancer risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114014>
- Awad, H., Khamis, M., & El-Aneed, A. (2014, September 25). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, σσ. 158-175. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>
- Barros, V. M., Joab Luhan Ferreira Pedrosa, Débora Ribeiro Gonçalves, Fernanda Carvalho Lopes de Medeiros, Gladyston Rodrigues Carvalho, Adenilson Henrique Gonçalves, & Pedro Victor Vicente Quinute Teixeira. (2020, November 23). Herbicides of biological origin: a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, σσ. 288-296. doi:<https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1846465>
- Bassil, K., C. Vakil, M. Sanborn, D.C. Cole, J.S. Kaur , & K.J. Kerr. (2007, October). Cancer health effects of pesticides. *Canadian Family Physician*, σσ. 1704-1711.

- Biagi, G. L. (1982). The Pharmacology and Toxicology of 5-Nitroimidazoles. In A. Breccia, B. Cavalleri, & G. E. Adams, *Nitroimidazoles Chemistry, Pharmacology and Clinical Application* (pp. 1-4). Springer. doi:10.1007/978-1-4684-4151-2
- Blacque`re, T., Guy Smagghe, Cornelis A. M. van Geste, & Veerle Mommaerts. (2012, February 18). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects. *Ecotoxicology*, σσ. 973–992. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>
- BRAITHWAITE, A., & SMITH, F. (1996). *CHROMATOGRAPHIC METHODS*. KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS.
- Brown, M. J., & Paxton, R. (2009, May 1). The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, pp. 410-416. Retrieved from <https://doi.org/10.1051/apido/2009019>
- Buszewski, B., & Szultka, M. (2012, JUNE 13). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, σσ. 198-213. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413>
- CA, J., Rajput KH, & Ugale BJ. (2017). Assessing the impact of pesticides: An overview . *International J. of Life Sciences*, σσ. 474-479.
- Cao, J., Miao Wang, He Yu, Yongxin She, Zhen Cao, Jiaming Ye, . . . Shuibing Lao. (2020, June 17). An Overview on the Mechanisms and Applications of Enzyme Inhibition-Based Methods for Determination of Organophosphate and Carbamate Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, σσ. 7298–7315. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01962>
- Chen, J., Guan, S.-M., Sun, W., & Fu , H. (2016, March 17). Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom. *Neuroscience Bulletin*, pp. 265–272. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0024-y>
- Clement, H. (2017). ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΑ. ΨΥΧΑΛΟΣ.
- Codex Alimentarius Commission. (2021). CODEX COMMITTEE ON RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN FOODS. *FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME*. Italy.
- Coskun, O. (2016, November 11). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, pp. 156-160. Retrieved from <https://doi.org/10.14744/2Fnci.2016.32757>
- Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M., & Vitalone, A. (2008, January 01). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience* 13, σσ. 1240-1249.
- Cramers, C. A., Janssen, H.-G., M. van Deursen, M., & Leclercq, P. (1999, September 24). High-speed gas chromatography: an overview of various concepts. *Journal of Chromatography A*, pp. 315-329. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00227-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00227-7)
- Cronly, M., Behan, P., Foley, B., Malone, E., Martin, S., Doyle, M., & Regan, L. (2010, June 30). Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramphenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS). *Food Additives & Contaminants: Part A*, pp. 1233-1246. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.489579>

- Czaplicki, S. (2013). Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. Στο D. F. Martin, & B. Martin, *Column Chromatography* (σσ. 99-122). Ανάκτηση από <http://dx.doi.org/10.5772/55620>
- Danforth, B. N., Minckley, R., & Neff, J. (2019). *The Solitary Bees: Biology, Evolution, Conservation*. Princeton University Press.
- Domínguez, I., Garrido Frenich, A., & Romero-González, R. (2020, January 28). Mass spectrometry approaches to ensure food safety. *Analytical Methods*, σσ. 118-1162. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1039/C9AY02681A>
- Ensley, S. M. (2018). Pyrethrins and Pyrethroids. Στο R. C. Gupta, *Veterinary Toxicology (Third Edition)* (σσ. 515-520). Academic Press. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00039-8>
- Esawy, M. A., Awad, G., Ahmed, E., Dania, E., & Mansour, N. (2012, February 08). EVALUATION OF HONEY AS A NEW RESERVOIR FOR PROBIOTIC BACTERIA. *Advances in Food Sciences*, pp. 72-81.
- European Commission. (2009). ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 37/2010 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2016, August 26). Setting of maximum residue levels for amitraz, coumaphos, flumequine, oxytetracycline, permethrin and streptomycin in certain products of animal origin. *EFSA JOURNAL*, 14(8). Ανάκτηση από <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4570>
- Evans, J. D., & Schwarz, R. (2011, December). Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, σσ. 614-620. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.003>
- Evans, P. D., & Gee, J. (1980, September). Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *nature*, σσ. 60-62. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1038/287060a0>
- Fikadu, Z. (2020, February 01). Pesticides use, practice and its effect on honeybee in Ethiopia: a review. *International Journal of Tropical Insect Science*, σσ. 473-481.
- Floyd, A. S., Mott, B., Maes, P., Copeland, D., McFrederick, Q., & Anderson, K. (2020, August 20). Microbial Ecology of European Foul Brood Disease in the Honey Bee (*Apis mellifera*): Towards a Microbiome Understanding of Disease Susceptibility. *Insects*. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/insects11090555>
- Fumes, B., Silva, M., Andrade, F., Domingues Nazario, C., & Lancas, F. (2015, JUNE). Recent advances and future trends in new materials in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, pp. 9-25. doi:10.1016/j.trac.2015.04.011
- Gad, S. (2014, April 14). Nematicides. *Reference Module in Biomedical Sciences, Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, σσ. 473-474. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00888-5>
- Galarini, R., Saluti, G., Giusepponi, D., Rossi, R., & Moretti, S. (2015, February). Multiclass determination of 27 antibiotics in honey. *Food Control*, pp. 12-24. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.048>

- Garcia, F. P., Cortés Ascencio, S., Gaytan Oyarzun, J., Ceruelo Hernandez, A., & Vazquez Alavarado, P. (2012, December). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*, pp. 279-293.
- Goblirsch, M. (2017, August 11). Nosema ceranae disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, pp. 131–150. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0535-1>
- González-Curbelo, M. Á., Varela-Martínez, D., & Riaño-Herrera, D. (2022, July 5). Pesticide-Residue Analysis in Soils by the QuEChERS Method: A Review. *molecules*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/molecules27134323>
- Goulson, D. (2003). *Bumblebees: Their Behaviour and Ecology*. Oxford University Press.
- Goulson, D. (2013, June 13). REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, pp. 977-987. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- Goulson, D., Hanley, M., Darvill, B., Ellis, J., & Knight, M. (2005, March). Causes of rarity in bumblebees. *Biological Conservation*, pp. 1-8. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.06.017>
- Graaf, D. D., Alippi, A., Brown, M., Evans, J., Feldlaufer, M., Gregorc, A., . . . Ritter, W. (2006, December 1). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Applied Microbiology*, pp. 583–590. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02057.x>
- Graham, A. J. (2015, July 31). Beehives from Ancient Greece. *Bee World*, pp. 64-75. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/0005772X.1975.11097545>
- Gu, H., Han, S., & Park, K.-K. (2020, March 19). Therapeutic Effects of Apamin as a Bee Venom Component for Non-Neoplastic Disease. *toxins*. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/toxins12030195>
- Gupta, R. C., Jitendra K. Malik, & Dejan Milatovic. (2011). Organophosphate and carbamate pesticides. Στο R. C. Gupta, *Reproductive and Developmental Toxicology* (σσ. 471-486). Academic Press. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/C2009-0-62417-X>
- Guruceaga, X., Perez-Cuesta, U., Cerio, A.-D., Gonzalez, O., Alonso, R., Hernando, F., . . . Rementeria, A. (2019, December 20). Fumagillin, a Mycotoxin of *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Biological Activities, Detection, and Applications. *toxins*. doi:10.3390/toxins12010007
- Hassaan, M. A., & Ahmed El Nemr. (2020, September). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, σσ. 207-220. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007>
- He, Q., Zhang, S., Yin, F., Liu, Q., Gao, Q., Xiao, J., . . . Cao, H. (2023, November 15). Risk assessment of honeybee larvae exposure to pyrethroid insecticides in beebread and honey. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115591>

- Heever, J. P., Thompson, T., Curtis, J., & Pernal, S. (2014, August 12). Determination of Dicyclohexylamine and Fumagillin in Honey by LC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, pp. 767–777. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9956-x>
- Hernández-Mesa, M., García-Campaña, A., & Cruces-Blanco, C. (2014, February 15). Novel solid phase extraction method for the analysis of 5-nitroimidazoles and metabolites in milk samples by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, σσ. 161-167. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.002>
- Hird, S. J., Lau, B.-Y., Schuhmacher, R., & Krska, R. (2014, August). Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, pp. 59-72. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.005>
- Huang, X., Lin, J., & Yuan, D. (2011, January 17). Simple and sensitive determination of nitroimidazole residues in honey using stirbar sorptive extraction with mixed mode monolith followed by liquid chromatography. *Separation Science*, σσ. 2138–2144. doi:10.1002/jssc.201000880
- Jactel, H., Verheggen, F., Thiéry, D., Escobar-Gutiérrez, A., Gachet, E., Desneux, N., & the Neonicotinoids Working Group. (2019, August). Alternatives to neonicotinoids. *Environment International*, pp. 423-429. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.045>
- Kang, S. S., Pak, S., & Choi, S. (2002). The Effect of Whole Bee Venom on Arthritis. *The American Journal of Chinese Medicine*, pp. 73-80. Retrieved from <https://doi.org/10.1142/S0192415X02000089>
- Kasiotis, K. M., & Machera, K. (2018, July 26). Pesticide and Metabolites Residues in Honeybees: A 2014-2017 Greek Compendium. *Julius-Kühn-Archiv*. doi:10.5073/JKA.2018.462.058
- Kasiotis, K. M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., & Machera, K. (2014, July 1). Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of The Total Environment*, σσ. 633-642. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.042>
- Kasiotis, K. M., Zafeiraki, E., Kapaxidi, E., Manea-Karga, E., Antonatos, S., Anastasiadou, P., . . . Machera, K. (2021, May 15). Pesticides residues and metabolites in honeybees: A Greek overview exploring Varroa and Nosema potential synergies. *Science of The Total Environment*. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145213>
- Kasiotis, K. M., Zafeiraki, E., Manea-Karga, E., Anastasiadou, P., & Machera, K. (2023, February 6). Pesticide Residues and Metabolites in Greek Honey and Pollen: Bees and Human Health Risk Assessment. *Foods*. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/foods12040706>
- Kaur, G., & Sharma, S. (2018, July). Gas Chromatography – A Brief Review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF INFORMATION AND COMPUTING SCIENCE*, pp. 124-131. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/344042922_Gas_Chromatography_-_A_Brief_Review

- Khaled, A., Gionfriddo, E., Acquaro Jr, V., Singh, V., & Pawliszyn, J. (2019, May 16). Development and validation of a fully automated solid phase microextraction high throughput method for quantitative analysis of multiresidue veterinary drugs in chicken tissue. *Analytica Chimica Acta*, pp. 34-46. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.044>
- Khatibi, S. A., Hamidi, S., & Siah-Shadbad, M. (2020, August 4). Application of Liquid-Liquid Extraction for the Determination of Antibiotics in the Foodstuff: Recent Trends and Developments. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, σσ. 327-342. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1798211>
- Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L., Gallo, B., Vicente, F., Kilchenmann, V., & Bogdanov, S. (2001, December). Study of Acaricide Stability in Honey. Characterization of Amitraz Degradation Products in Honey and Beeswax. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 5697-6078. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/jf010787s>
- Krupke, C. H., Hunt, G., & Foster, R. (2020, August/September). Beekeeping: Protecting Honey Bees from Pesticides. *South Central NY Dairy & Field Crops Digest*.
- Kubiak, A., & Biesaga, M. (2020). Solid phase-extraction procedure for the determination of amitraz degradation products in honey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, pp. 1888-1896. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1818850>
- Kumar, J., & Jose Savio Melo. (2017, June 17). Overview on Biosensors for Detection of Organophosphate Pesticides. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 5(3). doi:10.19080/CTBEB.2017.05.555663
- Leeuwen, T. V., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Dermauw, W., & Tirry, L. (2010, August). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, σσ. 563-572. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.008>
- Lehotay, S. J., Sapozhnikova, Y., & Mol, H. (2015, March). Current issues involving screening and identification of chemical contaminants in foods by mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, σσ. 62-75. Ανάκτηση από <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.012>
- Lei, H., Guo, J., Lv, Z., Zhu, X., Xue, X., Wu, L., & Cao, W. (2018, January 18). Simultaneous Determination of Nitroimidazoles and Quinolones in Honey by Modified QuEChERS and LC-MS/MS Analysis. *International Journal of Analytical Chemistry*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1155/2018/4271385>
- Leoci, R., & Ruberti, M. (2021, August). Pesticides: An Overview of the Current Health Problems of Their Use. *Journal of Geoscience and Environment Protection*. doi:<https://doi.org/10.4236/gep.2021.98001>
- Li, S., Zhang, Q., Chen, M., Zhang, X., & Liu, P. (2020, August 06). Determination of veterinary drug residues in food of animal origin: Sample preparation methods and analytical techniques. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, pp. 701-724. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1798247>

- Li, Z. (2018, August 1). Evaluation of regulatory variation and theoretical health risk for pesticide maximum residue limits in food. *Journal of Environmental Management*, σσ. 153-167. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.067>
- Liao, F., Han, C., Deng, Q., Zhou, Z., Bao, T., Zhong, M., . . . Hu, Y. (2023, September 27). Natural Products as Mite Control Agents in Animals: A Review. *Molecules*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/molecules28196818>
- Lima, C. M., Nora, F., Seraglio, S., Silva, J., Marzoque, H., Santana, R., . . . Scussel, V. (2020, August 11). Antibiotic residues in honey: a public health issue. *Research, Society and Development*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.9604>
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., & Joachim R. de Miranda. (2012, January). Acaricide Treatment Affects Viral Dynamics in Varroa destructor-Infested Honey Bee Colonies via both Host Physiology and Mite Control. *American Society for Microbiology*, 78(1), σσ. 227 - 235.
- Maccagnani, B., & Sgolastra, F. (2020, June 30). Solitary Bees As Pollinators. *Entomovectoring for Precision Biocontrol and Enhanced Pollination of Crops*, pp. 63-79. Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-3-030-18917-4_4
- Mallinger, R. E., Gaines-Day, H., & Gratton, C. (2017, December 8). Do managed bees have negative effects on wild bees?: A systematic review of the literature. *PLOS ONE*. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189268>
- Marrs, T. C., & Lakshman Kavalliede. (2012). The toxicology of pesticides. Στο D. Baker, Lakshman Karalliedde, Virginia Murray, Robert Maynard, & Norman HT Parkinson, *Essentials of Toxicology for Health Protection* (σσ. 187-198). OXFORD.
- Masalha, M., Abu-Lafi, S., Abu-Farich, B., Rayan, M., Issa, N., Zeidan, M., & Rayan, A. (2018, December 17). A New Approach for Indexing Honey for Its Health/Medicinal Benefits: Visualization of the Concept by Indexing Based on Antioxidant and Antibacterial Activities. *medicines*. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/medicines5040135>
- Masiá, A., Morales Suarez-Varela, M., Llopis-Gonzalez, A., & Picó, Y. (2016, September 14). Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, pp. 40-61. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.023>
- McGee, C., McGilloway, D., & Buckle, A. (2020). Anticoagulant rodenticides and resistance development in rodent pest species – A comprehensive review. *Journal of Stored Products Research*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101688>
- McNair, H. M., Miller, J., & Snow, N. (2019). *Basic Gas Chromatography*. WILEY.
- Md Shohel Rana, Lee, S., Kang, H., & Hur, S. (2019, October 31). Reducing Veterinary Drug Residues in Animal Products: A Review. *Food Science of Animal Resources*, pp. 687–703. Retrieved from <https://doi.org/10.5851/2Fkosfa.2019.e65>
- Melekhin, A., Tolmacheva, V., Goncharov, N., Apyari, V., Parfenov, M., Bulkatov, D., . . . Zolotov, Y. (2024, January). Rapid multi-residue LC-MS/MS determination of nitrofurans metabolites, nitroimidazoles, amphenicols, and quinolones in honey with

- ultrasonic-assisted derivatization – magnetic solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 237. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115764>
- MITAL, A. (2009, August 12). Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships. *Scientia Pharmaceutica*, σσ. 497-520. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3797/scipharm.0907-14>
- Mitrowska, K., & Antczak, M. (2016, December 05). Transfer of nitroimidazoles from contaminated beeswax to honey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, σσ. 573-581. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1260166>
- Mitrowska, K., Andrzej Posyniak, & Jan Zmudzki. (2014, June 26). Selective Determination of Fourteen Nitroimidazoles in Honey by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Letters*, pp. 1634-1649. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.883522>
- Moretti, S., Saluti, G., & Galarini, R. (2017). Residue Determination in Honey. In S. Moretti, G. Saluti, R. Galarini, & e. al., *Honey Analysis* (pp. 325-327). Vagner de Alencar Arnaut de Toledo. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.5772/67135>
- Murray, T. E., Kuhlmann, M., & Potts, S. (2009). Conservation ecology of bees: populations, species and communities. *Apidologie*, pp. 211–236. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2009015>
- Musarurwa, H., Chimuka, L., Pakade, V., & Tavengwa, N. (2019, December). Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103314>
- Mustapha, M. U., Normala Halimoon, Wan Lutfi Wan Johar, & Mohd Yunus Abd Shukor. (2019). An Overview on Biodegradation of Carbamate Pesticides by Soil Bacteria. *PERTANICA SCIENCE & TECHNOLOGY*, σσ. 547 - 563 .
- Narenderan, S., Meyyanathan, S., & Babu, B. (2020, July). Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. *Food Research International*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109141>
- Nozal, M., Bernal, J., M.T. Martín, Bernal, J., Álvaro, A., Martín, R., & Higes, M. (2008, May). Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, σσ. 224-231. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.019>
- Núñez, O., & Lucci, P. (2020, September 11). Application of Liquid Chromatography in Food Analysis. *Foods*. Retrieved from <https://doi.org/10.3390%2Ffoods9091277>
- O'Neal, S. T., Brewster, C., Bloomquist, J., & Anderson, T. (2017, October). Amitraz and its metabolite modulate honey bee cardiac function and tolerance to viral infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, σσ. 119-126. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.005>

- Ötles, S., & Kartal, C. (2016). SOLID-PHASE EXTRACTION (SPE): PRINCIPLES AND APPLICATIONS IN FOOD SAMPLES. *ACTA SCIENTIARUM POLONORUM*, σσ. 5-15. doi:10.17306/J.AFS.2016.1.1
- Pajewska-Szmyt, M., Sinkiewicz-Darol, E., Bernatowicz-Łojko, U., Kowalkowski, T., Gadzała-Kopciuch, R., & Buszewski, B. (2019, August 26). QuEChERS extraction coupled to GC-MS for a fast determination of polychlorinated biphenyls in breast milk from Polish women. *Environmental Science and Pollution Research*, σσ. 30988-30999. doi:10.1007/s11356-019-06201-y
- Pandya, I. Y. (2018, April-June). Pesticides and Their Applications in Agriculture. *Asian Journal of Applied Science and Technology (AJAST)*, σσ. 894-900.
- Papaefthimiou, C., Papachristoforou, A., & Theophilidis, G. (2013, September). Biphasic responses of the honeybee heart to nanomolar concentrations of amitraz. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, σσ. 132-137. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.005>
- Papini, R., Mancianti, F., Canovai, R., Cosci, F., Rocchigiani, G., Benelli, G., & Canale, A. (2017, July). Prevalence of the microsporidian *Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) apiaries in Central Italy. *Saudi Journal of Biological Sciences*, pp. 979-982. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.010>
- Pelfrène, A. F. (2010). Chapter 100 - Rodenticides. Στο R. Krieger, *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (σσ. 2153-2217). doi:<https://doi.org/10.1016/C2009-1-03818-0>
- PETTIS, J. S. (2004). A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie* 35, σσ. 91-92. doi: 10.1051/apido:2003060
- Pramod, K., Deep, A., Pooja, K., & Mahendra, S. (2020). An overview: LC-ms as tool of sample extraction and quantification in bioanalytical laboratories. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(3). Ανάκτηση από <http://dx.doi.org/10.5958/2231-5675.2020.00030.7>
- Puscas, A., Hosu, A., & Cimpoiu, C. (2013, January 11). Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography A*, pp. 132-135. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.064>
- Rahman, M. M., El-Aty, A., Choi, J.-H., Shin, H.-C., Shin, S., & Shim, J.-H. (2015, November 25). Chapter 3 Basic Overview on Gas Chromatography Columns. *Analytical Separation Science*, pp. 823-834. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep024>
- Ramanathan, A. N., Nair, A., & Sugunan, V. (2018, May). A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods*, σσ. 255-264. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.008>
- Ranjan, A., & Jindal, T. (2021). Overview of Organophosphate Compounds. Στο A. Ranjan, & T. Jindal, *Toxicology of Organophosphate Poisoning* (σσ. 1-25). Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-030-79128-5_1

- Ranneh, Y., Akim, A., Hamid, H., Khazaai, H., Fadel, A., Zakaria, Z., . . . Bakar, M. (2021, January 14). Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03170-5>
- Ratnieks, F. L. (2015, April 01). American Foulbrood: The Spread and Control of an Important Disease of the Honey Bee. *Bee World*, pp. 177-191. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/0005772X.1992.11099136>
- Ravula, A. R., & Yenugu, S. (2021, April). Pyrethroid based pesticides – chemical and biological aspects. *Critical Reviews in Toxicology*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1080/10408444.2021.1879007>
- Reybroeck, W. (2017, June). Residues of antibiotics and chemotherapeutics in honey. *Journal of Apicultural Research*, σσ. 97-112. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1338129>
- Reybroeck, W., Daeseleire, E., Brabander, H., & Herman, L. (2012, July). Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology*, pp. 1-11. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.012>
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010, January). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, σσ. 96-119. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Rouck, S. D., İnak, E., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2023, August). A review of the molecular mechanisms of acaricide resistance in mites and ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 159. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103981>
- Ruiz-Matute, A. I., Soria, A., Martínez-Castro, I., & Sanz, M. (2007, August 4). A New Methodology Based on GC–MS To Detect Honey Adulteration with Commercial Syrups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 7264-7269. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/jf070559j>
- RUSSELL, P. E. (2005). A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science*, σσ. 11-25. doi: <https://doi.org/10.1017/S0021859605004971>
- Sahu, P. K., Ramiset, N., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C., & Panda, J. (2018, January 5). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp. 590-611. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>
- Schulz, D. J., & Robinson, G. (2001, February). Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology A*, σσ. 53-61. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1007/s003590000177>
- Sgolastra, F., Piotr Medrzycki, Laura Bortolotti, Stefano Maini, Claudio Porrini, Noa Simon-Delso, & Jordi Bosch. (2020, January). Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid experience. *Biological Conservation*, 241. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108356>

- Sharma, A. K., Arun Kumar Sharma, & A. K. Chopra. (2020, May 14). An overview of pesticides in the development of agriculture crops. *Applied and Natural Science Foundation*, σσ. 101-109. doi:<https://doi.org/10.31018/jans.vi.2254>
- Shendy, A. H., Al-Ghobashy, M., Gad Alla, S., & Lotfy, H. (2016, January 1). Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC–MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey. *Food Chemistry*, pp. 982-989. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.048>
- Shi, T., Su, D., Liu, T., Tang, K., Camp, D., Qian, W.-J., & Smith, R. (2012, April). Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics. *Proteomics*, pp. 1074–1092. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201100436>
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010, May 12). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, σσ. 295 - 311. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1051/apido/2010016>
- Simone-Finstrom, M., Borba, R., Wilson, M., & Spivak, M. (2017, April 29). Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. *Insects*. Retrieved from <https://doi.org/10.3390/insects8020046>
- Song, N.-E., Lee, J., Mansur, A., Jang, H., Lim, M.-C., Lee, Y., . . . Nam, T. (2019, November 15). Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chemistry*. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125050>
- Stachniuk, A., & Fornal, E. (2015, October 28). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Analytical Methods*, σσ. 1654–1665.
- Stachniuk, A., & Fornal, E. (2016, June). Liquid Chromatography/Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Analytical Methods*, pp. 1654-1665. doi:10.1007/s12161-015-0342-0
- Stachniuk, A., Szmagara, A., Czaczk, R., & Fornal, E. (2017, March 29). LC-MS/MS determination of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* , σσ. 446-457. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1301755>
- Stauffer, E., Dolan, J., & Newman, R. (2008, May 20). CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*, σσ. 235-293. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>
- Swartz, M. (2010, July 14). HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, pp. 1130-1150. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Tanner, G., & Czerwenka, C. (2011, October 25). LC-MS/MS Analysis of Neonicotinoid Insecticides in Honey: Methodology and Residue Findings in Austrian Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, σσ. 12271–12277. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1021/jf202775m>

- Targuma, S., Berka Njobeh, P., & Ndungu, P. (2021, July). Current Applications of Magnetic Nanomaterials for Extraction of Mycotoxins, Pesticides, and Pharmaceuticals in Food Commodities. *molecules*. doi:10.3390/molecules26144284
- TECHNICAL GUIDELINES. (2020). *Technical guidelines for determining the magnitude of pesticide residues in honey and setting Maximum Residue Levels in honey*. SANTE/11956/2016 rev. 9.
- THE EUROPEAN COMMISSION. (2010, January 01). COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, σσ. L15/1-15/72.
- THE EUROPEAN COMMISSION. (2017, March 30). COMMISSION REGULATION (EU) 2017/623. *Official Journal of the European Union*, 14(8). Retrieved from <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/623/oj>
- Tinsley, J. (2015, July 31). The Production of Honey. *Bee World* , σσ. 95-98. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/0005772X.1925.11095874>
- Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., & Toker, O. (2013, April). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products*, pp. 124–131. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.042>
- Trebst, A. (2008). The Mode of Action of Triazine Herbicides in Plants. Στο H. M. LeBaron, Janis E. McFarland, & Orvin C. Burnside, *The Triazine Herbicides* (σσ. 118-127). ELSEVIER.
- Tulloch, A. P. (2015, July 31). Beeswax—Composition and Analysis. *Bee World*, σσ. 47-61. Ανάκτηση από <https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080/0005772X.1980.11097776>
- Venable, R., Haynes, C., & Cook, J. (2014, March 31). Reported prevalence and quantitative LC-MS methods for the analysis of veterinary drug residues in honey: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, σσ. 621-640. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.886339>
- Vidal, J. L., Aguilera-Luiz, M., Romero-González, R., & Garrido Frenich, A. (2009, February 5). Multiclass Analysis of Antibiotic Residues in Honey by Ultraperformance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, σσ. 1760-1767. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1021/jf8034572>
- Wang, J., Kliks, M., Jun, S., & Li, Q. (2010, November). Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. *Food Research International*, pp. 2329-2334. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.08.006>
- Xu, C., Chen, G.-S., Xiong, Z.-H., Fan, N., Liu, Y., & Wang, X.-C. (2016, March). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. doi:10.1016/j.trac.2016.02.022

- Yigit, N., & Yakup Sedat Velioglu. (2019, December 20). Effects of processing and storage on pesticide residues in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, σσ. 3622-3641. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1702501>
- Zaganas, I., Kapetanaki, S., Mastorodemos, V., Kanavouras, K., Colosio, C., Wilks, M., & Tsatsakis, A. (2013, February). Linking pesticide exposure and dementia: What is the evidence? *TOXICOLOGY*, σσ. 3-11.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1907/2006. (2006). για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ. ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ.
- Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 67 Παράρτημα Ι. (2016). ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΚΡΑΤΟΥΣ ΑΝΩΤΑΤΟ ΧΗΜΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ. *ΦΕΚ ΚΥΒΕΡΝΗΣΗΣ*, 1-320.
- Παπαδόπουλος, Η. (2014). Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΙΣΣΑΣ. Στο Η. Παπαδόπουλος, *Μέλισσα: Εκτροφή και νοσήματα* (σσ. 13-22). Σύγχρονη Παιδεία.